

UNIVERZITET U BEOGRADU

Andrea M. Osmokrović

**RAZVOJ NOVIH ANTIMIKROBNIH BIOAKTIVNIH  
KOMPOZITA ZA MEDICINSKU PRIMENU U TERAPIJI  
RANA**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

Andrea M. Osmokrovic

**DEVELOPMENT OF NEW ANTIMICROBIAL  
BIOACTIVE COMPOSITES FOR MEDICAL  
APPLICATION IN WOUND TREATMENT**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

## **Mentori:**

---

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

---

dr Ljiljana Šćepanović, redovni profesor  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

## **Članovi komisije:**

---

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

---

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

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

*Na prvom mestu želela bih da se zahvalim svom mentoru prof. dr Bojani Obradović na nesebičnoj pomoći, savetima i sugestijama prilikom izvođenja eksperimentalnog dela rada i pisanja ove disertacije. Zahvaljujem se i prof. dr Ljiljani Šćepanović na stručnim savetima i podršci. Takođe, zahvaljujem se članovima komisije prof. dr Marini Milenković i prof. dr Maji Vukašinović-Sekulić na velikoj pomoći oko izvođenja i analize rezultata antimikrobne aktivnosti kao i stručnim sugestijama tokom pisanja ove disertacije.*

*Posebno bih želela da se zahvalim kolegama iz laboratorije Jasmini Stojkovskoj, Jovani Zvicer i Danijeli Kostić na konstruktivnim diskusijama i prijateljskom odnosu. Takođe, veliku zahvalnost dugujem Predragu Petroviću, Jovani Vunduk, Ivanu Jančiću, Dragici Spasojević i Slađani Randelović na velikoj pomoći i lepoj saradnji tokom izvođenja pojedinih delova eksperimentalnog rada.*

*Takođe, želela bih da se zahvalim svojim roditeljima na podršci i nesebičnoj pomoći koju su mi pružali tokom izrade ove doktorske disertacije. I na kraju, zahvaljujem se i svom suprugu Vladimiru na velikoj podršci i razumevanju, a posebno kćerki Hani i sinu Filipu na beskrajnom strpljenju.*

## **RAZVOJ NOVIH ANTIMIKROBNIH BIOAKTIVNIH KOMPOZITA ZA MEDICINSKU PRIMENU U TERAPIJI RANA**

### **REZIME**

Danas, razvoj novih kompozitnih biomaterijala za medicinsku primenu u terapiji rana bazira se na poznavanju različitih faktora povezanih sa procesom zarastanja i podrazumeva rešavanje specifičnih problema koji prate hronične rane. Cilj ove doktorske disertacije bio je razvoj novih kompozitnih hidrogelova na bazi alginata i čestica aktivnog uglja (AU) koji će u potencijalnoj primeni u tretmanu rana ispoljiti više povoljnih efekata. Naime, cilj je bio razvoj kompozita iz koga se, u dodiru sa biološkim fluidima, čestice AU kontrolisano i efikasno otpuštaju tokom dužeg perioda. Pri tome, čestice AU mogu biti nosači različitih aktivnih agenasa, dok bi alginatni hidrogel efikasno upijao vlagu. Kao model aktivne supstance izabrani su povidon-jod (PVP-I) i lignin model jedinjenja (LMJ) kao agensi koji ispoljavaju antimikrobno dejstvo.

Rezultati istraživanja su pokazali da su metodom ekstruzije uspešno dobijene kompozitne Ca-alginatne čestice (CaA/AU) i to iz smeša alginata koncentracija u opsegu od 0,5 - 2 mas. % i AU u opsegu od 1-20 mas. %. Ispitivanjem kinetike otpuštanja AU iz suvih CaA/AU čestica u fiziološkom rastvoru utvrđeno je da je sastav optimalne smeše 0,5 mas. % alginata i 20 mas. % AU. Kinetika otpuštanja AU je uspešno opisana modelom unutrašnje difuzije osim u slučaju čestica dobijenih iz smeše optimalnog sastava gde je otpuštanje uzrokovano i erozijom čestica što je opisano Korsmejer-Pepasovim modelom Ekstruzijom smeše optimalnog sastava u rastvor za geliranje koji je sadržao jone cinka uspešno su dobijene i Zn<sub>0,5</sub>/V kompozitne čestice. Čestice na bazi Ca- i Zn-alginata dobijene iz smeše optimalnog sastava (Ca- i Zn<sub>0,5</sub>/V čestice) su u

fiziološkom rastvoru otpustile oko 50 - 60 % ukupnog sadržaja AU tokom perioda od 5 dana koji je relevantan za tretman hroničnih rana. Ove čestice su zatim uspešno impregnirane prvom model supstancom (PVP-I), a u ispitivanjima desorpcije utvrđeno je da je PVP-I čvrsto vezan za čestice AU i da je stepen desorpcije u okolni alginatni matriks, kao i u fiziološki rastvor zanemarljiv. Na čestice AU je takođe uspešno adsorbovana i druga model supstanca (LMJ) i pokazano je da ne dolazi ni u ovom slučaju ne dolazi do desorpcije u fiziološkom rastvoru. Kompozitne Ca- i Zn-alginatne čestice impregnirane sa PVP-I su pokazale izrazitu antimikrobnu aktivnost u suspenzijama svih ispitivanih, standardnih i kliničkih sojeva mikroorganizama. Antimikrobni efekat adsorbovanog joda se može pripisati direktnom kontaktu sa ćelijskom membranom mikroorganizama što je u slučaju ispitivanih Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija bilo dovoljno za baktericidni efekat, za razliku od gljivice *C. albicans* koja se pokazala najotpornijom. Sa druge strane čestice AU sa adsorbovanim LMJ nisu pokazale antimikrobne efekte u ispitivanim suspenzijama što zahteva dalja istraživanja mehanizma adsorpcije ovih jedinjenja, kao i mehanizma njihovog antimikrobnog dejstva. Kompozitni Ca- i Zn-alginatni hidrogelovi sa sadržanim česticama AU na kojima je adsorbovan PVP-I su pokazali potencijal za primenu u oblogama za rane zbog efikasnosti, dostupnosti i širokog spektra dejstva joda, kao i potencijalnog sinergističkog dejstva sa otpuštenim katjonima koji imaju pozitivan efekat na zarastanje oštećenog tkiva.

**Cljučne reči:** aktivni ugalj, alginat, cink, kompozitni hidrogelovi, otpuštanje aktivne supstance, povidon-jod, lignin model jedinjenja, antimikrobna aktivnost, obloge za rane.

**Naučna oblast:** BIOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

# **DEVELOPMENT OF NEW ANTIMICROBIAL BIOACTIVE COMPOSITES FOR MEDICAL APPLICATION IN WOUND TREATMENT**

## **ABSTRACT**

Today, the development of new composite biomaterials for wound treatment application is based on knowledge of different factors which affects the process of wound healing in order to identify solutions for specific problems related to chronic wounds. The aim of this thesis was to develop new composite hydrogels based on alginate and activated charcoal particles (AC) which would show beneficial effects in potential wound treatment application. Specifically, the aim was to develop composites which would during contact with biological fluids, release AC particles in a controlled and efficient manner during a prolonged period of time. Simultaneously, AC particles could be carriers of different active agents while alginate hydrogel would efficiently absorb the fluids. Povidone-iodine (PVP-I) and lignin model compounds (LMC) were chosen as model substances of active agents with antimicrobial activity.

The results showed that the composite Ca-alginate beads (CaA/AC) were successfully obtained by extrusion method using mixtures of alginate in concentration range of 0.5-2 % w/w and AC in a concentration range of 1-20 % w/w. The diffusion model was successfully applied on the release kinetics experimental data of all groups of A/AC beads, except in the case of the beads obtained from the mixture with the optimal composition. In this case, the release of AC particles was a result of diffusion as well as erosion and the Korsmeyer-Peppas model was successfully applied. Zn0.5/H composite beads were successfully obtained by extrusion of optimal mixture in the gelling bath that contained Zn ions. The beads based on Ca- and Zn-alginate obtained from the optimal mixture (Ca- and Zn0.5/H beads) released around 50-60 % of

the total AC content during a 5 day period, which is a period relevant for chronic wound treatment. These beads were successfully impregnated with the first model substance (PVP-I). The desorption studies established that PVP-I was firmly adsorbed onto AC particles and that the level of desorption into alginate matrix as well as saline solution was below the detection level. The second model substance (LMC) was successfully absorbed and the level of desorption in saline solution was below the detection level as well. Both composite Ca- and Zn-alginate beads impregnated with PVP-I showed high antimicrobial activity in the suspensions of all examined ATCC and clinical strains as well. The antimicrobial effect of adsorbed iodine can be explained by direct contact with the cell membrane of microorganisms which was enough to establish bactericidal effect in case of Gram positive and Gram negative bacteria while the yeast *Candida albicans* was the most resistant. On the contrary, AC particles with adsorbed LMC did not exhibit antimicrobial effect in any of the examined suspensions which demands a further investigation of adsorption mechanism and antimicrobial activity of LMC as well. Composite Ca- and Zn-alginate hydrogels with incorporated AC particles with adsorbed PVP-I showed potential for wound dressing application because of its high efficiency, availability and broad antimicrobial spectrum of iodine as well as its potential synergistic effect with released cations that exhibit wound healing effect.

**Keywords:** chronic wounds, activated charcoal, alginate, zinc, composite hydrogels, release of active substance, povidone-iodine, lignin model compounds, antimicrobial activity, multifunctional wound dressings

**Scientific Field:** BIOMEDICAL ENGINEERING



# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DEO.....	3
2.1 Koža-građa, sastav i funkcija.....	3
2.2 Rane-definicija, podela i faze zarastanja.....	5
2.2.1 Podela rana.....	6
2.2.2 Faze zarastanja rana.....	6
2.2.3 Uloga eksudata u zarastanju rane.....	10
2.3 Hronične rane.....	11
2.3.1 Vrste hroničnih rana.....	11
2.3.2 Karakteristike hroničnih rana.....	13
2.4 Holistički pristup lečenju rana.....	16
2.5 Lokalni tretman hronične rane.....	17
2.5.1 Debridman.....	19
2.5.2 Prevenirija i lečenje infekcije.....	19
2.5.2.1 Povidon jod.....	22
2.5.2.2 Lignin.....	25
2.5.3 Potporne obloge za rane.....	28
2.6 Alginat.....	30
2.6.1 Hemijska struktura i mehanizam formiranja gela.....	30
2.6.2 Modelovanje otpuštanja aktivne supstance.....	33
2.6.2.1 Kinetika nultog reda.....	34
2.6.2.2 Model unutrašnje difuzije.....	35

2.6.2.3 Korsmejer-Pepasov model.....	36
2.6.3 Obloge za rane na bazi alginata.....	36
2.7 Katjoni metala kao bioaktivni agensi.....	37
2.7.1 Joni kalcijuma.....	37
2.7.2 Joni cinka.....	39
2.8 Aktivni ugalj.....	42
2.8.1 Dobijanje i karakteristike aktivnog uglja.....	42
2.8.2 Adsorpcija.....	46
2.8.3 Obloge za rane na bazi aktivnog uglja.....	48
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	50
4. MATERIJALI I METODE.....	51
4.1 Materijali.....	51
4.2 Dobijanje kalcijum-alginatnih hidrogelova sa sadržanim česticama aktivnog uglja.....	53
4.2.1 Dobijanje kalcijum-alginatnih kompozitnih čestica metodom ekstruzije.....	53
4.2.2 Dobijanje kalcijum-alginatnih kompozitnih hidrogelova u obliku diskova.....	55
4.2.3 Ispitivanje bubrenja i rehidracije suvih kompozitnih CaA/AU čestica.....	55
4.2.4 Ispitivanje kinetike otpuštanja čestica aktivnog uglja u fiziološkom rastvoru.....	56

4.3 Dobijanje cink-alginatnih hidrogelova sa sadržanim česticama aktivnog uglja.....	57
4.3.1 Dobijanje cink-alginatnih kompozitnih čestica metodom ekstruzije.....	57
4.3.2 Ispitivanje kinetike otpuštanja čestica aktivnog uglja u fiziološkom rastvoru.....	57
4.3.3 Ispitivanje kinetike otpuštanja jona cinka u fiziološkom rastvoru i TS bujon.....	58
4.4 Imobilizacija prve model supstance: povidon-jod (PVP-I).....	59
4.4.1 Dobijanje kompozitnih alginatnih čestica sa imobilisanim PVP-I.....	59
4.4.2 Ispitivanje otpuštanja PVP-I u fiziološkom rastvoru.....	60
4.4.3 Ispitivanje kinetike otpuštanja čestica aktivnog uglja u fiziološkom rastvoru.....	60
4.4.4 Ispitivanje kinetike otpuštanja jona cinka u fiziološkom rastvoru i TS bujonu.....	60
4.5 Imobilizacija druge model supstance: lignin model jedinjenja (LMJ).....	61
4.5.1 Imobilizacija LMJ na čestice aktivnog uglja.....	61
4.5.2 Ispitivanje otpuštanja LMJ u fiziološkom rastvoru.....	62
4.6 Antimikrobna aktivnost.....	62
4.6.1 Optimizacija procedure određivanja antimikrobne aktivnosti.....	62
4.6.2 Određivanje minimalne baktericidne koncentracije CaA/AU čestica sa imobilisanim PVP-I.....	63
4.6.3 Ispitivanje antimikrobne aktivnosti kompozitnih A/AU čestica sa imobilisanim PVP-I.....	64

4.6.4 Ispitivanje antimikrobne aktivnosti čestica aktivnog uglja sa adsorbovanim LMJ.....	66
4.7 Metode karakterizacije.....	67
4.7.1 UV-vidljiva spektroskopija.....	67
4.7.2 Plamena atomska apsorpciona spektrofotometrija.....	68
4.7.3 Optička mikroskopija i određivanje prečnika čestica.....	69
4.7.4 Skenirajuća elektronska mikroskopija sa emisijom polja elektrona (FE-SEM).....	69
4.7.5 Skenirajuća elektronska mikroskopija sa energetske disperznom spektroskopijom (SEM/EDX).....	69
4.7.6 Određivanje specifične površine i poroznosti.....	70
4.7.7 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR).....	70
5. REZULTATI.....	71
5.1 Dobijanje kalcijum-alginatnih hidrogelova sa sadržanim česticama aktivnog uglja.....	71
5.1.1 Optimizacija sastava početnih smeša.....	71
5.1.2 Konstrukcija kalibracione prave za određivanje koncentracije aktivnog uglja.....	73
5.1.2.1 Konstrukcija kalibracione prave za određivanje koncentracije aktivnog uglja u smešama sa Na-alginatom.....	74
5.1.2.2 Konstrukcija kalibracionih prava za određivanje koncentracije aktivnog uglja u fiziološkom rastvoru, tripton soja bujonu i rastvorima kompozitnih hidrogelova.....	75

5.1.3	Optimizacija koncentracije Ca <sup>2+</sup> katjona u rastvoru za geliranje.....	77
5.1.4	Dobijanje kompozitnih kalcijum-alginatnih hidrogelova u obliku čestica.....	78
5.1.5	Dobijanje kalcijum-alginatnih kompozita u obliku diskova.....	85
5.1.6	Ispitivanje bubrenja i rehidracije suvih kompozitnih čestica.....	85
5.1.7	Ispitivanje kinetike otpuštanja čestica aktivnog uglja u fiziološkom rastvoru.....	88
5.2	Dobijanje cink-alginatnih hidrogelova sa sadržanim česticama aktivnog uglja.....	94
5.2.1	Dobijanje kompozitnih cink-alginatnih hidrogelova u obliku čestica.....	94
5.2.2	Ispitivanje kinetike otpuštanja čestica aktivnog uglja u fiziološkom rastvoru.....	97
5.2.3	Ispitivanje kinetike otpuštanja jona cinka u fiziološkom rastvoru.....	99
5.3	Imobilizacija prve model supstance: povidon-jod (PVP-I).....	101
5.3.1	Dobijanje kompozitnih alginatnih čestica sa imobilisanim PVP-I.....	101
5.3.2	Ispitivanje otpuštanja PVP-I u fiziološkom rastvoru.....	105
5.3.3	Ispitivanje kinetike otpuštanja čestica aktivnog uglja u fiziološkom rastvoru.....	107
5.3.4	Ispitivanje kinetike otpuštanja jona cinka u fiziološkom rastvoru.....	108
5.4	Imobilizacija druge model supstance: lignin model jedinjenja (LMJ).....	110
5.4.1	Konstrukcija kalibracione prave.....	110
5.4.2	Ispitivanje kinetike adsorpcije LMJ na čestice aktivnog uglja.....	112
5.4.3	Ispitivanje otpuštanja LMJ u fiziološkom rastvoru.....	115
5.5	Ispitivanje antimikrobne aktivnosti.....	117

5.5.1	Optimizacija procedure određivanja antimikrobne aktivnosti.....	117
5.5.2	Određivanje minimalne baktericidne koncentracije CaA/AU čestica sa imobilisanim PVP-I.....	118
5.5.3	Ispitivanje antimikrobne aktivnosti kompozitnih kalcijum-alginatnih čestica sa imobilisanim PVP-I.....	119
5.5.4	Ispitivanje antimikrobne aktivnosti kompozitnih cink-alginatnih čestica sa imobilisanim PVP-I.....	125
5.5.5	Ispitivanje otpuštanja jona cinka u TS bujonu.....	129
5.5.6	Ispitivanje antimikrobne aktivnosti čestica aktivnog uglja sa adsorbovanim LMJ.....	131
6.	DISKUSIJA.....	133
7.	ZAKLJUČAK.....	150
8.	LITERATURA.....	155
9.	PRILOG.....	176
9.1	Spisak slika.....	177
9.2	Spisak tabela.....	186

## 1. Uvod

Rane su oduvek predstavljale veliki problem. Jedan od najranijih zapisa predstavlja crtež „čoveka sa ranama“ (slika 1.1) nađen u pećinama u Španiji star oko 20000-30000 godina (Gottrup i Leaper, 2004). Prvi pisani zapisi nalaze se u zapisima Asiraca i Egipćana u kojima se opisuju i praktični načini lečenja rana uključujući i šivanje rane (Gottrup i Leaper, 2004). Oduvek su postojali pokušaji da se rane izleče različitim materijalima biljnog, životinjskog i mineralnog porekla. Kao sredstva za zarastanje rana, kroz istoriju su korišćeni blato, mahovina, životinjska mast, smola, razna ulja i voskovi pa sve do vlakana konoplje, koja je bila veoma popularna u 19. veku (Boateng i sar., 2008).



Slika 1.1 Crtež „čovek sa ranama“ (Gottrup i Leaper, 2004)

Napredak u efikasnosti materijala koji se koriste za zarastanje rana počinje od 1960. god. sa otkrićem značaja vlažnog previjanja rane. Do tada su korišćeni isključivo pasivni prirodni materijali (gaza, vata, zavoji i dr.), a primenjivan je i princip suvog zarastanja, koji je podrazumevao aktivno podsticanje isušivanja rane pa se čak preporučivalo i da se rane ostavljaju otvorene. Kod proizvoda novije generacije u potpunosti je odbačen ovaj tradicionalni pristup lečenju rana. Razvoj novih materijala bazira se na poznavanju humoralnih i celularnih faktora povezanih sa procesom zarastanja, kao i na shvatanju da je kontrolisanje mikrookoline rane neophodno da bi se proces zarastanja podigao na optimalan nivo (Drobac i sar., 2013).

Danas, razvoj novih topikalnih preparata za tretman hroničnih rana podrazumeva rešavanje specifičnih problema koji se često javljaju kao što su pojačano vlaženje, prisustvo infekcije, neprijatnog mirisa, itd. U fokusu razvoja su materijali koji vrše kontrolisano i efikasno otpuštanje aktivnih supstanci u sam predeo rane tokom perioda od nekoliko dana (do 7 dana) u cilju omogućavanja delovanja aktivnih komponenti, a uz izbegavanje traume rane usled čestih (uobičajeno 1-2 dana) promena obloga. Hidrogelovi kao što je npr. alginat su se pokazali veoma pogodni kao sistemi za kontrolisano otpuštanje aktivne supstance. Prilikom kontakta sa biološkim fluidima, hidrogelovi bubre pri čemu dolazi do oslobađanja aktivne supstance. Treba napomenuti da npr. alginatni hidrogel može da veže oko 20 puta veću količinu tečnosti u odnosu na svoju početnu masu što ga čini veoma atraktivnim za tretman umereno do jako eksudirajućih rana.

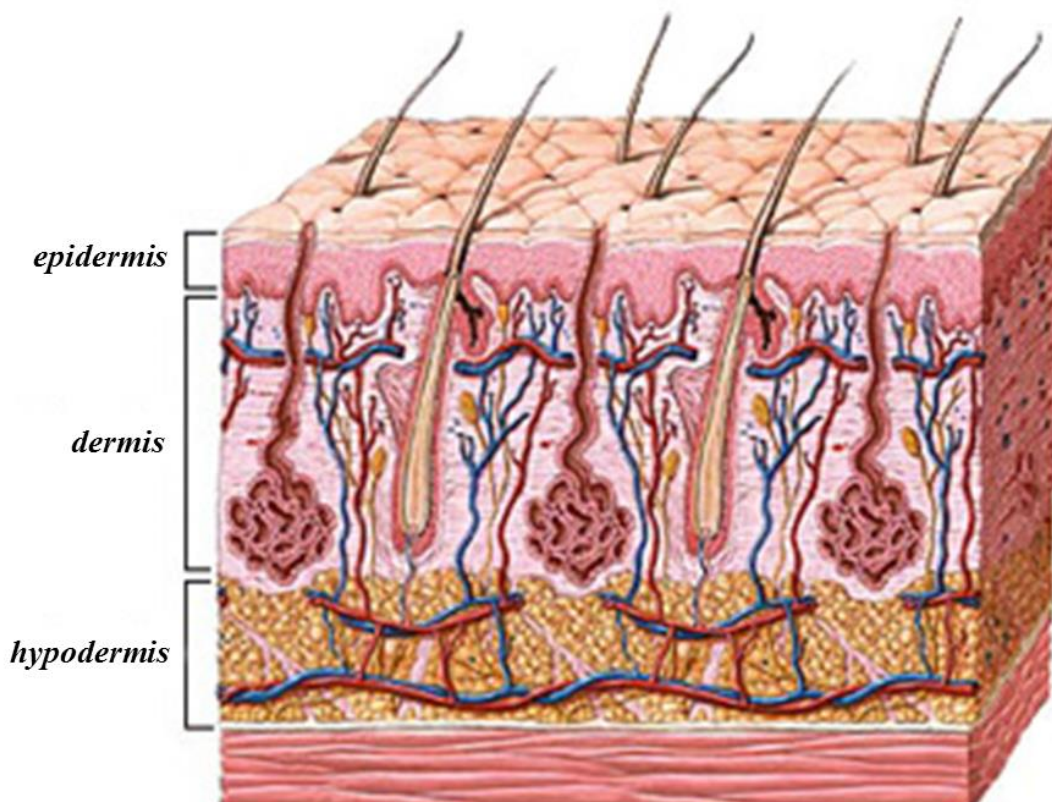
Cilj ove disertacije je bio razvoj novih multifunkcionalnih kompozita na bazi alginatnih hidrogelova i čestica aktivnog uglja (AU) namenjenih potencijalnoj primeni kao obloge za rane. S obzirom, na sve češću izolaciju multirezistentnih sojeva mikroorganizama, između ostalog i zbog neadekvatne upotrebe antibiotika, i sve veći terapijski problem koji se zbog toga javlja, cilj je bio razvijanje antimikrobnog sistema bez upotrebe antibiotika. Konkretno, čestice AU bi bile nosači za različite terapijski aktivne supstance kao što su antimikrobni agensi, a u dodiru sa biološkim fluidima kontrolisano bi se otpuštale tokom vremena, dok bi alginatni hidrogel efikasno upijao vlagu.



## 2. TEORIJSKI DEO

### 2.1 Koža-građa, sastav i funkcije

Koža je najveći organ čovekovog tela čija ukupna površina kod odraslog čoveka iznosi oko 1,5-2 m<sup>2</sup> i čini oko 15-20 % ukupne telesne težine (Lalević-Vasić i sar., 1997). Vrlo je kompleksne strukture i sastoji se iz tri sloja epiderma (*epidermis*), derma (*dermis*) i hipoderma (*hypodermis*) (slika 2.1).



Slika 2.1. Šematski prikaz poprečnog preseka kože (<https://lcsdanatomyphysiology.com>)

Epiderm predstavlja najpovršniji deo kože. Ektodermalnog je porekla i u šesnaestoj nedelji fetalnog života već ima karakteristike adultne kože. Njegova debljina zavisi od područja i iznosi od 0,4-1,5 mm (*Lalević-Vasić i sar., 1997*). Izgrađen je od nekoliko tipova ćelija. Glavni deo mase (80 %) predstavljaju keratinociti, ćelije čiji je zadatak stvaranje keratina. Pored njih, u epidermu se nalaze i druge ćelije, koje ne učestvuju u procesu keratinizacije i imaju druge specifične funkcije, kao što su melanociti, Langerhansove i Merkelove ćelije. U zavisnosti od morfoloških i funkcionalnih karakteristika keratinocita, epiderm se sastoji od nekoliko slojeva: bazalni (*stratum basale*), spinozni (*stratum spinosum*), granulozni (*stratum granulosum*) i rožasti sloj (*stratum corneum*). Idući od bazalnog ka rožastom sloju odvija se diferentovanje keratinocita ka visoko specijalizovanim korneocitima. Epidermalni sloj se regeneriše svake 2-3 nedelje.

Derm je mezodermalnog porekla i nalazi se između epiderma i hipoderma. Sastoji se iz dve faze: fibrozne i amorfne. Fibroznu komponentu čine kolagena, retikulinska i elastična vlakna. Vlakna su okružena amorfnom supstancom koja se sastoji od glikozaminoglikana i zajedno sa serumskim proteinima i drugim mukoproteinima, vodom i elektrolitima obrazuje viskozni gel. Prema izgledu i organizaciji vlakana, derm se deli na dva dela: *papilarni*, površni deo koji se karakteriše nežnim kolagenim, retikulinskim i elastičnim vlaknima, i *retikularni*, donji deo koji je znatno širi, a vlakna su deblja i grublja (*Lalević-Vasić i sar., 1997; Anđelković i sar., 2001*). Pod normalnim okolnostima, u dermu postoji manji broj ćelija, a najvažniji su fibroblasti, koji proizvode i degradiraju fibroznu i amorfnu komponentu derma. Prisutni su još i histiociti, mastociti i krvne ćelije koje se pretežno nalaze u papilarnom delu derma i imaju čitav niz značajnih funkcija.

Hipoderm je mezodermalnog porekla i sastoji se pretežno od masnih ćelija i vezivno-tkivnih pregrada. Hipoderm predstavlja rezervoar energetskih materija (triglicerida), amortizuje mehaničke traume i učestvuje u termoregulaciji kao izolator.

Koža je organ koji obavlja niz veoma važnih funkcija (*Lalević-Vasić i sar., 1997*):

- (a) omotava čovekovo telo i obezbeđuje integritet organizma u celini;
- (b) predstavlja barijeru prema spoljašnjem svetu koja deluje u dva smera: sprečava apsorpciju hemikalija i invaziju mikroorganizama iz spoljašnjeg sveta, a onemogućava gubitak vode i drugih materija iz organizma;
- (c) učestvuje u termoregulaciji kao izolator;
- (d) predstavlja neuroreceptorni organ (dodir, pritisak, vibracije, toplo/hladno, bol);
- (e) deo je opšteg imunološkog sistema;
- (f) učestvuje u sintezi vitamina D pod dejstvom UV zračenja;
- (g) specijalizovane strukture kože (kosa i nokti) i žlezde (lojne i znojne) takođe učestvuju u ukupnoj zaštitnoj funkciji kože;
- (h) ima važan estetsko-kozmetički značaj.

## **2.2 Rane-definicija, podela i faze zarastanja**

Rana predstavlja ozledu sa prekidom kontinuiteta kože ili sluzokože pri čemu su često ozleđena i dublja tkiva (fascije, nervi, kosti, krvni sudovi). Nastaju kao posledica (*Delić i sar., 2013*):

- spoljašnje traume koja može biti mehanička, hemijska, fizička, itd,

- unutrašnje traume odnosno vaskularnog, metaboličkog, neurološkog ili drugog patološkog procesa.

### 2.2.1 Podela rana

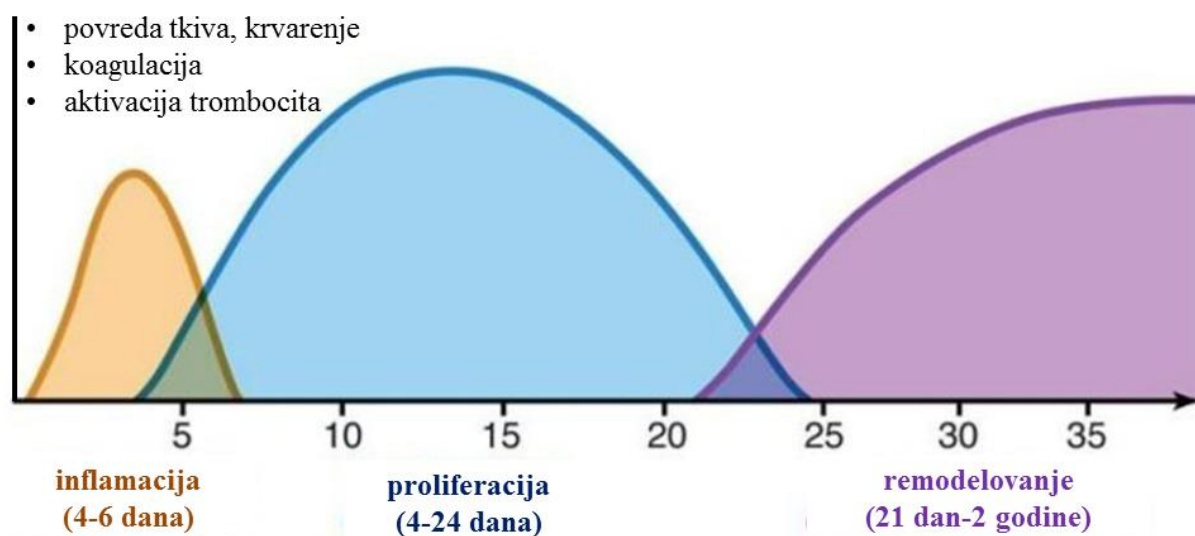
Rane se mogu podeliti prema (*Stevović i sar., 2000; Delić i sar., 2013*):

- *vremenu zarastanja*: akutne i hronične;
- *dubini defekta*: površinske (defekt epiderma i/ili derma) i duboke (zahvataju i dublja tkiva kao što su mišićno, nervno, periost i koštano);
- *etiologiji*: vaskularne i nevaskularne;
- *načinu nastanka*: akcidentalne i arteficialne (operativne);
- tome da li je *otvorena telesna šupljina*: penetrantne i nepenetrantne;
- tome da li je *otvoren lumen unutrašnjeg organa*: perforantne i neperforantne;
- *stepenu kontaminiranosti*: čiste hirurške rane, čiste kontaminirane rane, kontaminirane rane i inficirane rane.

### 2.2.2 Faze zarastanja rana

Zarastanje rana predstavlja složen proces supstitucije oštećenog tkiva novim tkivnim elementima. To je kontinuirani proces tokom kojeg se odvija složena signalizacija događaja i učestvuju različiti tipovi ćelija i brojni medijatori (faktori rasta, citokini, hemokini) tj. proteini ili polipeptidi koji se sintetišu i oslobađaju lokalno u predelu rane i imaju parakrino dejstvo na same ćelije rane. Radi lakšeg izučavanja, proces zarastanja se može podeliti na četiri faze koje se

međusobno prepliću (slika 2.2): faza koagulacije, faza inflamacije, faza proliferacije i faza maturacije i remodelovanja ožiljka (Schultz i sar., 2003; Baum i Arpey, 2005). Sam defekt kože epitelizuje nakon nekoliko nedelja, međutim čitav proces zarastanja, uključujući remodelovanje ožiljka, može trajati i duže od godinu dana.



Slika 2.2. Faze zarastanja rane

1. *Faza koagulacije* je inicijalna faza koja započinje povredom tkiva nakon čega se pokreće intrinzička i ekstrinzička koagulacijska kaskada koja je rezultat tri odvojena procesa-kontrakcije krvnog suda, stvaranja trombocitnog čepa i koagulacije. Ova faza traje 1-5 minuta od ozleđivanja (Huljev, 2011). Formirani krvni ugrušak služi za popunjavanje praznine u prekinutom krvnom sudu i sprečava/usporava dalje krvarenje. Trombociti započinju proces zaceljivanja nastalog defekta i putem oslobađanja brojnih faktora rasta (trombocitni faktor rasta, engl. *platelet-derived growth factor*-PDGF, insulinu sličan faktor rasta, engl. *insulin-like growth factor*-IGF, epidermalni faktor rasta, engl. *epidermal growth factor*-EGF, fibroblastni faktor rasta, engl.

*fibroblast growth factor*-FGF i transformacioni faktor rasta  $\beta$  superfamilije, *engl. transforming growth factor*-TGF- $\beta$ ) (Schultz i sar., 2003; Baum i Arpey, 2005; Stojanović i sar., 2015) Oslobođeni faktori rasta brzo difunduju u okolno tkivo, privlače leukocite u predeo rane i stimulišu proliferaciju ćelija rane odnosno epitelijalnih ćelija, fibroblasta i vaskularnih endotelijalnih ćelija (Schultz i sar., 2003; Baum i Arpey, 2005).

2. *Faza inflamacije* je druga faza koja praktično počinje u trenutku oštećenja tkiva (Huljev, 2013). Dolazi do značajne vazodilatacije, što se vidi kao crvenilo u predelu rane, povećava se propustljivost kapilara i migracija leukocita u predeo rane. Neutrofili i makrofagi fagocituju i uništavaju bakterije, ali takođe oslobađaju i enzime proteaze (npr. elastazu i kolagenazu) koji razgrađuju oštećene komponente ekstracelularnog matriksa (Baum i Arpey, 2005). Oni takođe sekretuju i dodatne faktore rasta, uključujući TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ , heparin-vezujući epidermalni faktor rasta (*engl. heparin-binding epidermal growth factor*-HB-EGF) i bazni fibroblastni faktor rasta (*engl. basic fibroblast growth factor*-bFGF) (Baum i Arpey, 2005; Stojanović i sar., 2015). Ovi faktori rasta stimulišu migraciju ćelija rane (fibroblasti, epitelne ćelije i vaskularne endotelijalne ćelije) u sam predeo rane (Schultz i sar., 2003). Takođe makrofagi privlače druge makrofage u predeo rane.

3. *Faza proliferacije* je treća faza u toku koje broj inflamatornih ćelija počinje da opada, a fibroblasti, keratinociti i endotelijalne ćelije preuzimaju funkciju sinteze faktora rasta. Ova faza sastoji se od nekoliko procesa koji se međusobno prepliću, i to su stvaranje granulacionog tkiva, neoangiogeneza, epitelizacija i kontrakcija rane (Huljev, 2013).

Proces stvaranja granulacionog tkiva predstavlja kliničku manifestaciju proliferacije fibroblasta, a naziv je dobio zbog ružičaste boje i izgleda poput granula (Martin, 1997). Sastoji se od mezenhimalne i nemezenhimalne ćelija „ugrađenih“ u mekani ekstracelularni matriks

(ECM) (Huljev, 2013). Postoje dva osnovna tipa proteina u ECM: fibrozni proteini (kolagen i elastin) i adhezivni proteini (fibronektin i laminin). Kolagen, najzastupljeniji od svih proteina matriksa, ima funkciju osiguravanja strukturnog integriteta i čvrstoće. Međutim, pre integracije novoformiranog tkiva sa postojećim dermalnim matriksom, prvo se moraju odstraniti svi oštećeni proteini. Razgradnja proteina regulisana je sa jedne strane enzimima zvanim proteinaze (serinske, cisteinske i metaloproteinaze) koje sekretuju neutrofilni, makrofagi, fibroblasti, epitelne i endotelijalne ćelije, a sa druge inhibitorima proteinaza, kao što je TIMP-1 (*engl. tissue inhibitor of metalloproteinases*) (Tarnuzzer i Schultz, 1996). Sve u svemu, u slučaju normalnog zarastanja postoji ravnoteža između lučenja proteinaza i njihovih inhibitora (Huljev, 2013).

Neoangiogeneza predstavlja stvaranje novih krvnih sudova i javlja se kao odgovor na metaboličko oštećenje u rani (Huljev, 2013). Hipoksija, koja je posledica povrede i/ili neadekvatnog lokalnog krvotoka je glavni stimulator neoangiogeneze koja je neophodna da bi se mogla ponovo uspostaviti adekvatna krvna perfuzija povređene regije (Huljev, 2013). Novi krvni sudovi formiraju se iz postojećih krvnih sudova sa ivica rane, međusobno stvaraju anastomoze i formiraju novu kapilarnu mrežu (Martenez-Hernandez, 1994; Whaley i Burt, 1995).

Epitelizacija je proces u kome epitelne ćelije proliferišu i migriraju preko granulacionog tkiva sa ciljem rekonstrukcije zaštitne barijere kože, a smatra se da samim procesom upravlja keratinocitni faktor rasta (*engl. keratinocyte growth factor-KFR*) (Slavin, 1996).

Proces kontrakcije predstavlja važan korak toka zarastanja čiji tačan mehanizam nije poznat. Pretpostavlja se da su u proces uključeni miofibroblasti tj. fibroblasti sa visokim koncentracijama aktinomiozina, čija kontraktilna aktivnost dovodi do pomeranja ivica rane prema središtu ozlede čime se smanjuje veličina rane što ima pozitivan efekat na vreme zarastanja (Germain, 1994).

4. *Faza maturacije i remodelovanja ožiljka* je poslednja faza i počinje kada rana zaraste, obično oko 3 nedelje nakon povrede i traje mesecima ili godinama. U ovoj fazi nastavlja se sinteza novih ECM molekula, a nezreli ožiljak je često veoma crven i izdignut iznad nivoa kože. Tokom perioda od nekoliko meseci izgled ožiljka se obično poboljša, postane manje izbočen i crven. Na celularnom i molekularnom nivou, ožiljno tkivo se menja, ožiljak „sazreva“ i postiže se nova ravnoteža između sinteze i degradacije komponenata ECM. Postepeno tokom vremena rana povećava svoju čvrstinu, ali dostigne maksimalno 80 % inicijalne čvrstine tkiva (*Welch i sar., 1990; Clark i sar., 1995*).

### **2.2.3 Uloga eksudata u zarastanju rane**

Eksudat se može definisati kao tečnost koja se luči iz rane. Ta tečnost ima centralnu ulogu u procesu zarastanja. Sastoji se uglavnom od vode, ali sadrži i elektrolite, nutrijente, proteine, inflamatorne medijatore, proteolitičke enzime (npr. metaloproteinaze), faktore rasta, raspadne produkte, kao i razne tipove ćelija (neutrofile, makrofage i trombocite) (*Stevović i sar., 2000*). Eksudat je uglavnom bistar, svetao, vodenast i bez mirisa (*Schultz i sar., 2003*). Njegova funkcija je da obezbedi vlažnu sredinu rane i potpomogne zarastanje tako što olakšava difuziju molekularnih medijatora (faktora rasta, citokina, hemokina), ali i migraciju ćelija preko površine rane (*Schultz i sar., 2003*). Takođe, olakšava proliferaciju ćelija, obezbeđuje nutrijente i pomaže autolizu nekrotičnog i devitalizovanog tkiva. Kako zarastanje rane napreduje smanjuje se količina proizvedenog eksudata (*Schultz i sar., 2003*). Važno je naglasiti da je zapremina „proizvedenog“ eksudata proporcionalna veličini rane i samim tim velike rane proizvode veće količine eksudata (*Schultz i sar., 2003*).



## 2.3 Hronične rane

Hronična rana je svaka rana koja ne zarasta u predviđenom vremenskom periodu za taj tip rane i lokalizaciju uprkos standardnom medicinskom postupku, a pritom je period u kome nije došlo do zarastanja duži od 6 nedelja (*Stevović i sar., 2000; Huljev, 2011*).

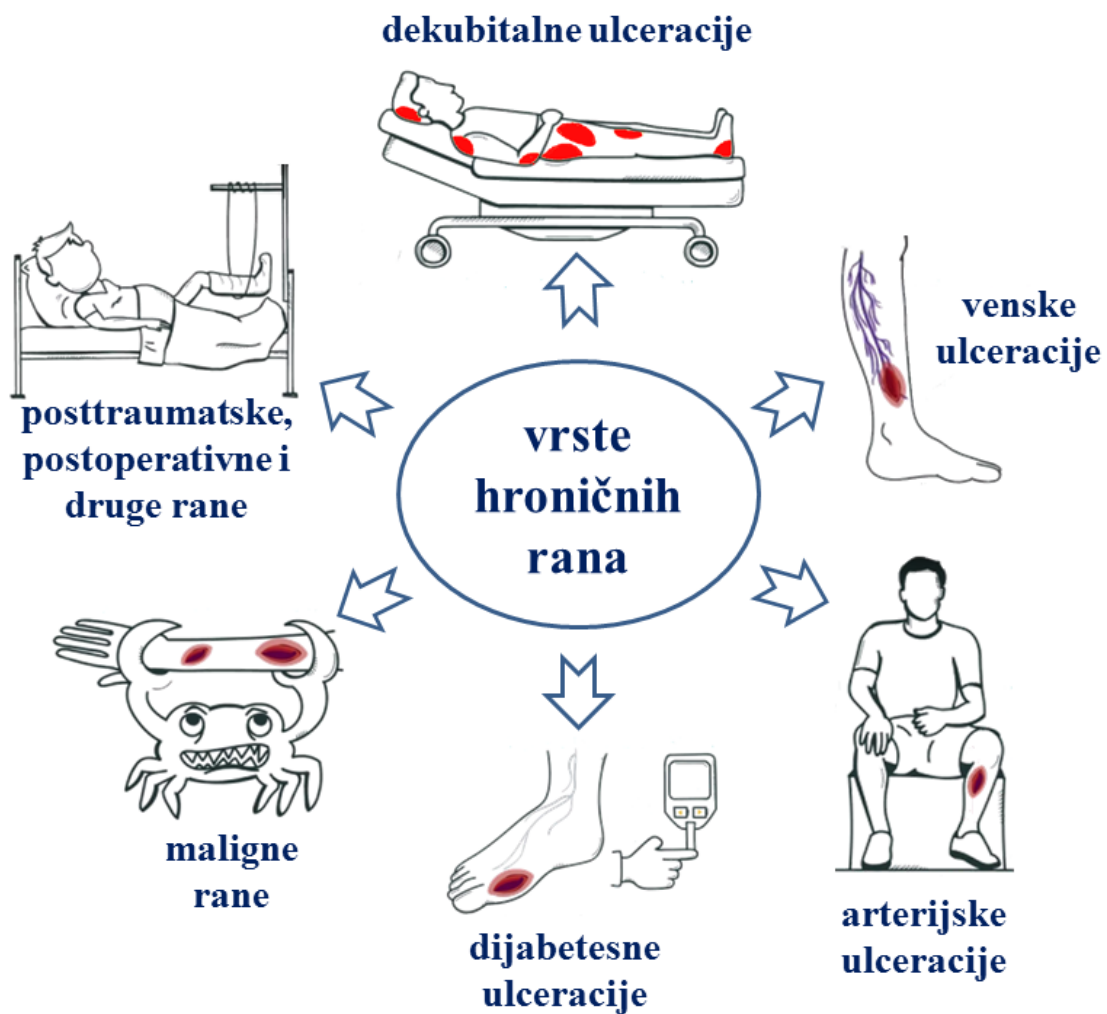
Danas, hronične rane predstavljaju jedan od glavnih uzroka morbiditeta i smanjenog kvaliteta života koji pogađa oko 2 % svetske populacije, a terapija ovih rana iziskuje velika novčana sredstva i predstavlja značajan medicinski problem. S obzirom da ljudska populacija sve više stari projekcije kažu da će prevalencija rana značajno porasti u sledećih 20-tak godina zahvaljujući brojnim faktorima kao što su produžen životni vek, promene u životnom stilu, povećana prevalencija hroničnih bolesti i povećano preživljavanje nakon velikih trauma i operacija (*Delić i sar., 2013*).

### 2.3.1 Vrste hroničnih rana

Hronične rane se mogu podeliti u nekoliko osnovnih grupa (slika 2.3) (*Stevović i sar., 2000; Delić i sar., 2013*).

Venske ulceracije su rane lokalizovane na potkolenicama, a u najvećem broju slučajeva su posledica bolesti vena. One čine 70-80 % svih ulceracija na donjim ekstremitetima.

Dekubitalne ulceracije nastaju kao posledica pritiska na određeni deo tela usled dugotrajnog ležanja ili sedenja. Kod nepokretnih osoba dolazi do prekida cirkulacije i dotoka kiseonika usled stalnog pritiska na određeni deo tela, što predstavlja pogodno tlo za nastanak i razvoj rane.



Slika 2.3. Šematski prikaz podele hroničnih rana (<http://ordinacija.lekarinfo.com>)

Arterijske ulceracije nastaju usled smanjenja dotoka arterijske krvi u donjim ekstremitetima. Najčešći uzrok je ateroskleroza srednjih i velikih arterija, kao i dijabetes, tromboza i sl.

Dijabetesne ulceracije (dijabetesno stopalo) predstavljaju jednu od brojnih komplikacija šećerne bolesti i predstavljaju skup koštanih i meko-tkivnih promena na stopalu dijabetesnih bolesnika. Nastaju kao posledica neuropatije i obliteracije malih krvnih sudova.

Maligne rane nastaju kao posledica malignih oboljenja pacijenata i terapija najčešće zavisi od lokalizacije primarne bolesti.

Najzad, hronične rane mogu nastati i usled drugih uzroka (npr. posttraumatske, postoperativne i druge rane).

### **2.3.2 Karakteristike hroničnih rana**

Hronične rane odlikuje nekoliko karakteristika po kojima se razlikuju od ostalih rana. Produženo vreme zarastanja je glavna karakteristika hroničnih rana i ono može trajati više meseci pa i godina. Poremećen je normalni obrazac zarastanja i vremenski okvir celularnih i biohemijskih događaja, tako da su ove rane „zaglavljene“ u određenoj fazi tj. onemogućene da uđu u sledeću fazu zastanja. Produženo trajanje inflamatorne i/ili proliferativne faze zarastanja, defektno remodelovanje ECM i nemogućnost reepitelizacije su samo neke od odlika hroničnih rana (*Schultz i sar., 2003*).

Ove odlike su posledica i poremećenog celularnog metabolizma. Fibroblasti izolovani iz hroničnih rana pokazuju smanjeni odgovor na primenu faktora rasta kao što su PGDF- $\beta$  i TGF- $\beta$  (*Hasan i sar., 1997; Agren i sar., 1999*) verovatno kao posledica nekog oblika starenja (*Mendez i sar., 1998; Vande Berg i sar., 1998*). Takođe, pokazano je da dermalni fibroblasti izolovani sa ivica hroničnih venskih ulkusa rastu sporije nego fibroblasti izolovani iz zdrave kože istih pacijenata (*Stanley i sar., 1997*). Čelije izolovane sa ivica rane su izgledale staro tj. izgubile su

sposobnost proliferacije, bile su veće i manje osetljive na faktore rasta. To govori u prilog tome da se u hroničnim ranama akumuliraju ćelije koje nisu sposobne da odgovore na normalne molekularne signale tako da ni topikalna primena faktora rasta verovatno ne bi imala nekog značajnijeg efekta.

Eksudat prisutan u hroničnoj rani se biohemijski razlikuje od eksudata prisutnog u akutnoj rani. Eksudat prisutan u hroničnim ranama usporava pa čak i blokira proliferaciju ćelija tj. keratinocita, fibroblasta i endotelijalnih ćelija, i ima štetan uticaj na sam proces zarastanja za razliku od eksudata prisutnog u akutnim ranama koji podstiče njihovo zarastanje (*Schultz i sar., 2003*). Proliferacija zdravih neonatalnih fibroblasta je bila veoma smanjena nakon izlaganja eksudatu iz hroničnog venskog ulkusa (*Raffetto i sar., 2001*). Takođe, eksudat iz hroničnih rana sadrži značajnu količinu fibronektina i vitronektina, proteina matriksa koji sprečavaju adheziju ćelija. Još jedna značajna razlika jeste nivo inflamatornih citokina prisutnih u eksudatu akutnih i hroničnih rana. Kod zarastanja akutnih rana, nivoi faktora nekroze tumora-alfa (*engl. tumor necrosis factor-TNF $\alpha$* ) i interleukina-1 (IL-1) su najviši nakon prvih nekoliko dana i u odsustvu infekcije se vraćaju na početni nizak nivo (*Schultz i sar., 2003*). Nasuprot tome, koncentracije ovih citokina u nezarastajućim ranama su stalno povećane, a počinju da opadaju kada hronične rane počnu da zarastaju (*Ovington, 2002*). Takođe, u eksudatu hroničnih rana je veoma nizak nivo glukoze, zatim sekrecija proteinaza je povećana dok je sekrecija njihovih inhibitora smanjena, što govori u prilog pojačane proteolitičke aktivnosti koja utiče na otežanu epitelizaciju i zarastanje (*Ovington, 2007*). Što su veće koncentracije tkivnih proteinaza to je veća razgradnja proteina matriksa, faktora rasta i citokina neophodnih za reepitelizaciju i proces zarastanja rane (*Ovington, 2007*). Takođe, visok nivo eksudacije utiče štetno lokalno na okolnu zdravu kožu. Naime, usled dugotrajnog vlaženja dolazi do maceracije odnosno razmekšavanja kože i daljeg

širenja rane. Treba napomenuti da hronični venski ulkusi, koji spadaju u tip rana sa povećanom eksudacijom, sekretuju oko 0,5 ml / cm<sup>2</sup> / 24 h eksudata (Thomas i sar., 1996) što znači da se može očekivati da rana površine od 10 cm<sup>2</sup> „proizvede“ oko 5 ml eksudata na dan.

Još jedan od faktora koji može da utiče na brzinu zarastanja rana je prisutnost mikroorganizama. Mikroorganizmi su prisutni u svim hroničnim ranama, međutim to ne znači da će nužno doći do „nazadovanja“ rane niti razvoja infekcije (Kerstein, 1997; Dow i sar., 1999) Čak je pokazano da mali broj bakterija prisutan u rani stimuliše zarastanje (De Haan i sar., 1974; Pollack, 1984) Konkretno, ćelije bakterija proizvode proteolitičke enzime (npr. hijaluronidazu) koji potpomažu debridman rane i stimulišu neutrofile da oslobode proteinaze (Stone, 1980). U početku preovlađuje normalna saprofitna mikroflora kože (*Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus saprophyticus*) koja ne zahteva poseban antibiotski tretman. Međutim, bakterijska mikroflora se u hroničnim ranama menja tokom vremena (Dow i sar., 1999) što zahteva primenu potpornih metoda lečenja u cilju prevencije i lečenja infekcije. Konkretno, dolazi do kolonizacije uslovno patogenim vrstama bakterija kao što su *Staphylococcus aureus* i beta-hemolitički streptokok, a nakon otprilike četiri nedelje, ranu kolonizuju Gram negativne štapičaste bakterije, aerobi i fakultativni anaerobi (*Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.*, *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*). Kako se rana produbljuje postaju pogođene dublje subkutane strukture (mišići, nervi, periost, kost), a dominantna mikroflora postaju striktni anaerobi s tim da su najčešće polimikrobne infekcije.

Najzad, karakteristika koja posebno pogađa pacijente sa hroničnim ranama, posebno malignim ranama, je neprijatan miris. Pacijenti često kažu da se osećaju potpuno socijalno izolovani upravo zbog stalnog prisustva tog neprijatnog mirisa (Probst i sar., 2009). Takođe navode da od svih simptoma rane, neprijatan miris ih najviše uznemirava i uzrokuje socijalnu

izolaciju, depresiju i osećaj odvratnosti (Chase i sar., 2000; Grocott, 2007; Probst i sar., 2009). Posebno treba naglasiti značaj adekvatne terapije neprijatnog mirisa povezanog sa palijativnim ranama s obzirom na činjenicu da su ti pacijenti uglavnom svesni da će ih on pratiti do kraja života. Neprijatan miris nastaje kao posledica većeg broja faktora uključujući proteolitičke vrste bakterija (anaerobi, *Pseudomonas aeruginosa*), nekrotično tkivo, visok nivo eksudacije i slabu vaskularizaciju tkiva (Gethin, 2010).

## 2.4 Holistički pristup lečenju rana

Holistički pristup lečenju rana podrazumeva da se uvek leči „pacijent sa ranom“, a ne „rana na pacijentu“ (Delić, 2013). Iz tog razloga je, pre odluke o lokalnom tretmanu, veoma važno uzeti u obzir moguće spoljašnje i unutrašnje uzroke nezarastanja rana i, ako je moguće, korigovati ih. U tom procesu se polazi od evaluacije opšteg zdravstvenog stanja bolesnika, procene prokrvljenosti tkiva rana i najzad, bolesnik i njegova porodica se adekvatno edukuju.

Ukupni zdravstveni status samog pacijenta ima veoma značajnu ulogu na proces zarastanja. Detaljna anamneza je u tom smislu dragocena radi identifikacije uzroka koji utiču na zarastanje rane. Oralna terapija steroidima, imunosupresivima, nesteroidnim antiinflamatornim lekovima, antikoagulansima itd. će otežati zarastanje, kao i prisustvo nekih bolesti (npr. reumatoidni artritis, sistemski *lupus erythematosus*, itd). Neadekvatna i loša ishrana, posebno ako pacijent unosi nedovoljne količine proteina, će takođe uticati nepovoljno na proces zarastanja (Guo i DiPietro, 2010).

Adekvatna prokrvljenost i oksigenacija tkiva je od vitalnog značaja za proces zarastanja. Rane na donjim ekstremitetima su posebno pogođene lošom perfuzijom tkiva. Spoljašnji faktori

kao što su hipotermija, stres ili bol povećavaju aktivnost simpatikusa i na taj način smanjuju tkivnu prokrvljenost. Pušenje usporava mikrocirkulaciju dok je neki lekovi ubrzavaju. Kiseonik se ćelijama putem krvi doprema u dve forme: vezan za hemoglobin ili rastvoren u plazmi. U hroničnim ranama i koži, za razliku od mišića, kiseonik rastvoren u plazmi može biti dovoljan za zarastanje pod uslovom da je perfuzija tkiva zadovoljavajuća. Zagrevanje tkiva i hiperbarična komora poboljšavaju perfuziju tkiva (*Boykin, 1996; Tibbles i sar., 1996*) dok električna stimulacija povećava mikrocirkulaciju (*Gilcreast i sar., 1998*).

Najzad, ako je rana rekurentna, edukacija bolesnika može biti značajan korak u pravcu zarastanja rane. Bolesnika treba informisati kako napreduje zarastanje, koliko će verovatno trajati lečenje, o adekvatnoj ishrani i značaju unošenja tečnosti i vitamina, o savremenim oblogama za rane i zašto ih treba koristiti. Takođe, važno je edukovati i porodicu bolesnika u smislu pravilne nege rane, ali i o mogućim propratnim pojavama kao što su depresija, socijalna izolacija, redukcija svakodnevnih aktivnosti pa i značajno finansijsko opterećenje vezano za lečenje ovih rana.

## **2.5 Lokalni tretman hronične rane**

Cilj lečenja hronične rane je pretvoriti hroničnu ranu u ranu koja ima potencijal za zarastanje (*Huljev, 2013*). Taj postupak se naziva i priprema dna rane („*wound bed preparation*“) (*Schultz, 2003*).

Danas se primenjuju principi koji osiguravaju sistematski pristup lokalnom tretmanu rane poznati pod engleskim akronimom TIME koncept (*Delić, 2013*).

**T** (*tissue*) = tkivo mora biti vitalno tj. mora se odstraniti devitalizovano i nekrotično tkivo postupkom debridmana odnosno nekrektomije;

**I** (*infection* ili *inflammation*) = infekcija ili upala, potrebna je kontrola broja ćelija bakterija u rani i lečenje infekcije;

**M** (*moisture*) = vlažnost, potrebna je balansirana razina vlažnosti rane;

**E** (*epidermal margin*) = ivice rane moraju omogućavati epitelizaciju.

U hroničnoj rani mogu se razlikovati tri vrste tkiva: nekrotično, fibrinsko (fibrinske naslage) i granulaciono tkivo (slika 2.4). Od navedenih tkiva, jedino granulaciono tkivo omogućava progresiju epitelizacije tako da je glavni cilj lokalnog tretmana rane uspostavljanje uslova za formiranje zdravog granulacionog tkiva i samim tim iniciranje zarastanja rane (*Huljev, 2011*).



Slika 2.4. Potkolenični ulkus u kome su zastupljena sve tri vrste tkiva (granulaciono-crvene boje, fibrin i fibrinske naslage-beličaste i žute boje, i nekrotično tkivo-crne boje) (*Huljev, 2011*)



### **2.5.1 Debridman (nekrektomija)**

Debridman je postupak kojim se odstranjuje devitalizovano tkivo (nekrotično tkivo i fibrinske naslage) koje predstavlja dobro stanište za bakterije kao i mehaničku barijeru koja ograničava fagocitnu aktivnost leukocita. Debridman predstavlja „zlatni standard“ u lečenju hroničnih rana i opšte je prihvaćena činjenica da je oštri debridman „ključ“ koji će preokrenuti hroničnu ranu u akutnu i tako stvoriti uslove za njeno zarastanje (*Kirshen i sar., 2006*). Primenom debridmana otvara se terapijski „prozor“ za delovanje antimikrobnih lekova (antiseptika i antibiotika) tokom 72 h (*Kučišec-Tepeš, 2016*). Postoji nekoliko vrsta debridmana: hirurški, enzimski, autolitički, hemijski, biološki i mehanički (*Delić, 2013*).

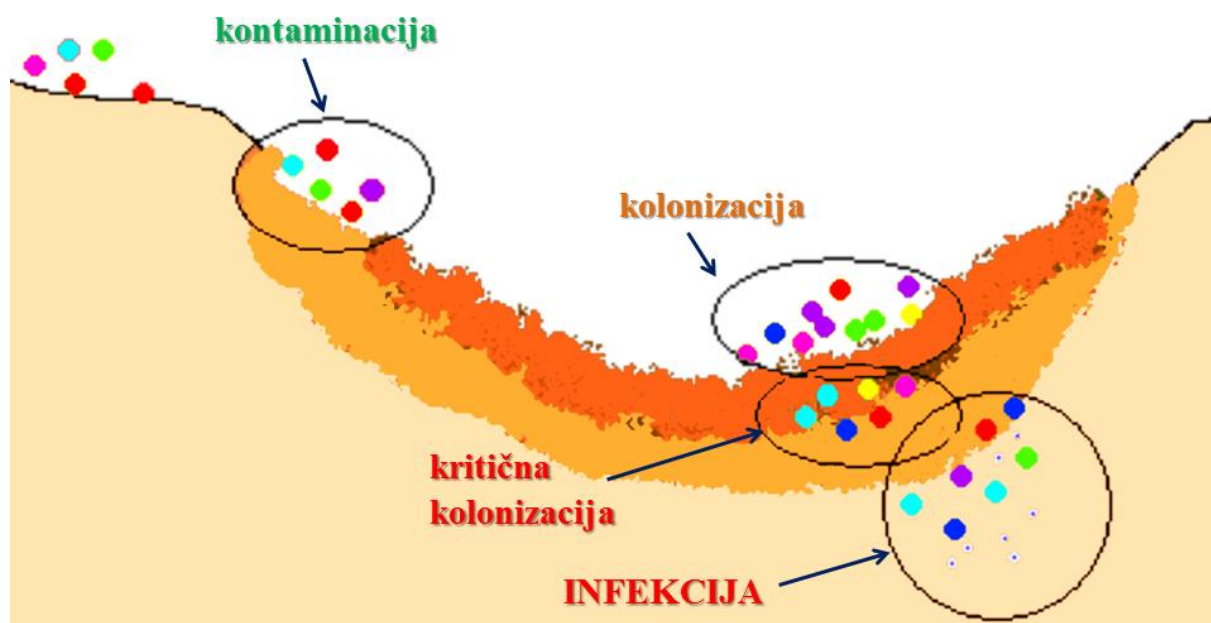
### **2.5.2 Prevencija i lečenje infekcije**

Mikrobiološki status rane se može definisati kao kontaminacija, kolonizacija, kritična kolonizacija i infekcija (slika 2.5).

Kontaminacija znači da su prisutni mikroorganizmi koji se ne razmnožavaju, a u ranu dospevaju iz organizma samog bolesnika ili iz okoline.

Kolonizacija znači da su u rani prisutni mikroorganizmi koji se razmnožavaju, ali koji ne pričinjavaju štetu samom domaćinu (*Dow i sar., 1999*). U ovoj fazi nema kliničkih znakova infekcije, a primenjuju se potporne metode lečenja kao što su antiseptici i obloge za rane. Pokazano je da kada se hronične rane koje nemaju kliničke znake infekcije tretiraju antimikrobnom oblogom za rane koja sadrži srebro dolazi do kliničkog poboljšanja, smanjenja eksudacije kod mnogih pacijenata, kao i boljih rezultata briseva uzetih sa rana (*Sibbald et al, 2001*).

Do kritične kolonizacije dolazi kada se kolonizacija poveća odnosno bakterije počnu da se „takmiče“ sa domaćinom za nutrijente i dolazi do njihovog prodora sa površine u dublje tkivo. To dovodi do oslobađanja toksina, javljaju se lokalni nespecifični znaci upale (*rubor*-crvenilo, *dolor*-bol, *calor*-toplina, *tumor*-otok) koji dovode do odlaganja zarastanja rane (*Browne i sar., 2001; Sibbald et al, 2001*). U ovoj fazi primenjuje se peroralno ciljano lečenje sa antibioticima uz primenu potpornog lečenja.



Slika 2.5. Šematski prikaz mikrobiološkog statusa rane

Infekcija znači da su prisutni mikroorganizmi koji se razmnožavaju i pričinjavaju štetu samom domaćinu odnosno ravnoteža između domaćina, mikroorganizma i okoline je narušena. U ovoj fazi javlja se sistemski odgovor uz lokalne znake infekcije (*Kučišec-Tepeš, 2010*). Treba naglasiti da je infekcija rane *klinička, a ne mikrobiološka dijagnoza* (*Delić i sar., 2013*). Međutim, pokazano je da postoji visoka korelacija između prisustva velikog broja ćelija bakterija

u rani ( $> 10^5$  CFU/gr tkiva) i simptoma kao što su bol, povećanje veličine rane i prisustvo neprijatnog mirisa (*Gardner i sar., 2001*). Kod inficiranih rana, takođe su česte komplikacije kao što su *celulitis, fasciitis*, sepsa, krvarenje, osteomijelitis i ređe, maligna alteracija (*Delić i sar., 2013*).

Takođe, poseban problem predstavlja što bakterijska populacija u oko 90 % hroničnih rana formira biofilm koji interaguje sa okolnim tkivom na parazitski način (*Edwards i Harding, 2004; Leaper i sar., 2012*). Biofilm predstavlja zajednicu mikroorganizama koji su adherirani na površine rana i koje proizvode ekstraselularne polimerne supstance koje ih štite, a pri tome, pokazuju izmenjene osobine (fenotip) u poređenju sa korespondirajućim planktonskim ćelijama. Unutar biofilma, ćelije bakterija se nalaze u smanjenom metaboličkom stanju, što otežava delovanje antibiotika s obzirom da je njihovo delovanje najefikasnije u eksponencijalnoj fazi rasta bakterija (*Kučišec-Tepeš, 2016*).

Poseban problem u bolničkoj, a u novije vreme i u vanbolničkoj sredini, sve češće predstavljaju multirezistentni patogeni sojevi koji ozbiljno ugrožavaju i otežavaju proces lečenja različitih infekcija. Širenje rezistencije prema antibioticima među patogenim vrstama bakterija je evolutivni proces podstaknut selektivnim antimikrobnim pritiskom od strane čoveka i danas je sve više prisutna svest o potrebi restriktivnije upotrebe antibiotika. U tom smislu, najnovije smernice SZO (Svetske zdravstvene organizacije) preporučuju preoperativno korišćenje kvalitetnih antiseptika u odnosu na korišćenje sistemskih antibiotika (*WHO, 2016; Allegranzi i sar., 2016*). Antiseptici su supstance koje ubijaju mikroorganizme ili sprečavaju njihovo razmnožavanje, a primenjuju se samo na živo tkivo (*Varagić i Milošević, 1999*). U određenim slučajevima, antiseptici mogu biti dobra alternativa antibioticima s obzirom da imaju širi spektar antimikrobne aktivnosti (*Lachapelle i sar., 2013*), a istovremeno je manja verovatnoća pojave

rezistencije s obzirom da obično ispoljavaju više mehanizama delovanja na bakterijske ćelije (*Leaper i Durani., 2008*).

„Idealan“ antiseptik bi trebalo da ima sledeće karakteristike (*Konig i sar., 1997; Lipsky i Hoey, 2009; Leaper i Durani., 2008; Jayaraja Kumar i sar., 2009; Lachapelle i sar., 2013*):

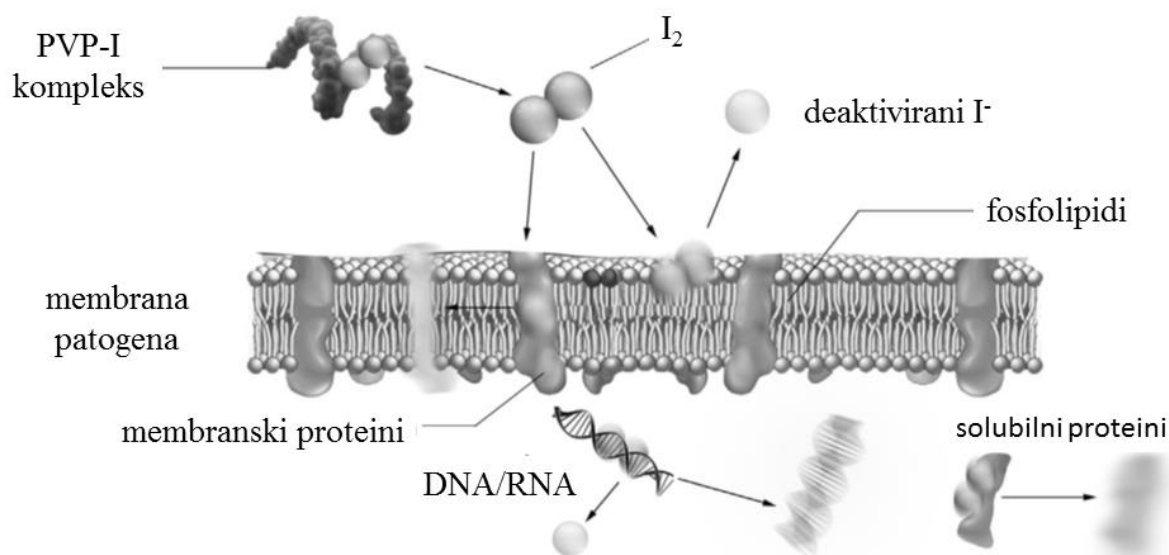
- širok spektar dejstva,
- sposobnost da penetrira u biofilm, nekrotično tkivo i eshare (kraste nastale dejstvom visoke temperature, korozivne ili kaustične supstance),
- da ima mali potencijal za razvoj rezistencije,
- da potpomaže zarastanje rane smanjujući jaku inflamaciju, i
- da ga okolno tkivo dobro toleriše.

Preporuka Evropskog udruženja za lečenje rana (*European Wound Management Association-EWMA*) i Američkog medicinskog udruženja (*American Medical Association-AMA*) je da se u prevenciji i tretmanu infekcija hroničnih rana koriste sledeći antiseptici: povidon-jod, kadeksomer jod, oktenidin dihidrohlorid, poliheksanidin, srebro i manuka-tip meda (*Kučišec-Tepeš, 2016*). Uz to, traga se i za novim antimikrobnim agensima koji su lako dostupni i jeftini kao što su npr. derivati na bazi lignina (*Spasojević i sar., 2016*).

### **2.5.2.1 Povidon-jod**

Povidon-jod (PVP-I) je najznačajniji predstavnik jodofora, „nosećih“ jedinjenja koja mogu vezati jod. U medicinskoj upotrebi je već duži vremenski period. PVP-I je kompleks joda sa sintetskim polimernim nosačem poli-vinil-pirolidonom (povidonom), koji sam po sebi nema mikrobicidnu aktivnost (*Ripa i sar., 2002*). Kompleks PVP-I predstavlja „rezervoar“ joda.

Aktivna komponenta kompleksa je molekul joda ( $I_2$ ) koji se, u vodenom rastvoru otpušta iz kompleksa do uspostavljanja ravnoteže. Prilikom delovanja na mikroorganizme,  $I_2$  se deaktivira prelaskom u jodide ( $I^-$ ), dolazi do disbalansa ravnoteže usled čega se otpuštaju novi molekuli joda iz kompleksa u rastvor i ravnoteža se ponovo uspostavlja (Rackur, 1985; Fleischer i Reimer, 1997). PVP-I ima širok antimikrobni spektar dejstva, efikasan je protiv bakterija, nekoliko virusa, gljivica, spora, protozoa i cista ameba (Fleischer i Reimer, 1997; Ripa i sar., 2002; Cooper, 2007; Jayaraja Kumar i sar., 2009; Lachapelle i sar., 2013). Pokazano je da PVP-I ubija ćelije bakterija koje su uzročnici bolničkih infekcija, između ostalog meticilin-rezistentan *Staphylococcus aureus* (MRSA) i ostale rezistentne sojeve u toku 20-30 sekundi (Kunisada i sar., 1997; Yasuda i sar., 1997).



Slika 2.6. Mehanizam delovanja PVP-I (Bigliardi i sar., 2017)

Mikrobicidna aktivnost joda uključuje inhibitorno delovanje na različite vitalne bakterijske strukture i ćelijske mehanizme (slika 2.6). Precizan redosled događaja na molekulskom nivou još uvek nije dovoljno jasan (*Rackur, 1985; Fleischer i Reimer, 1997; Schreier i sar., 1997; Mangram i sar., 1999; Lachapelle i sar., 2013*). Na nivou ćelijske membrane I<sub>2</sub> vrši oksidaciju masnih i aminokiselina, a unutar ćelije deaktivira i denaturiše enzime respiratornog lanca, vrši oksidaciju nukleinskih kiselina i na taj način inaktivira proteine, kao i DNK i RNK ćelija bakterija (*Kanagalingam i sar., 2015*) (slika 2.6).

Iako je u upotrebi više od 150 godina, do danas nije dokumentovana pojava stečene niti ukrštene rezistencije u slučaju PVP-I (*Fleischer i Reimer, 1997; Kunisada i sar., 1997; Yasuda i sar., 1997; Leaper i Durani., 2008, Lachapelle i sar., 2013*). Sa druge strane, postoje podaci o pojavi rezistentnih kliničkih sojeva prema antisepticima i dezinficijensima kao što su hlorheksidin, kvarterne amonijumske soli, srebro i triklosan (*Kunisada i sar., 1997; Yasuda i sar., 1997; Leaper i Durani., 2008; Lachapelle i sar., 2013; Lanjri i sar., 2017*). Takođe, dokumentovana je i ukrštena rezistencija između nekih antiseptika i antibiotika (*Chuanchuen i sar., 2001; Leaper i Durani., 2008*). Razlog ne razvijanja rezistencije prema PVP-I nije poznat, ali se smatra da je najverovatnije posledica činjenice da I<sub>2</sub> ima brojne mehanizme delovanja prema mikroorganizmima.

Međutim, primena PVP-I, posebno u slučaju aplikacije na oštećenu kožu, sluzokožu, velike površine intaktne kože kao i na kožu dece (*Dela Cruz i sar., 1987; Findik i sar., 2010; Erdogan i sar., 2013*) nosi rizik od sistemske apsorpcije joda koja direktno zavisi od dužine primene (*Nesvodbova, 2015*). Prilikom praćenja pacijenata sa opekotinama drugog i trećeg stepena koje su zahvatile više od 25 % površine tela koji su bili tretirani rastvorom PVP-I, uočeno je da je došlo do značajnog povećanja nivoa joda u serumu (*Nesvodbova, 2015*). U

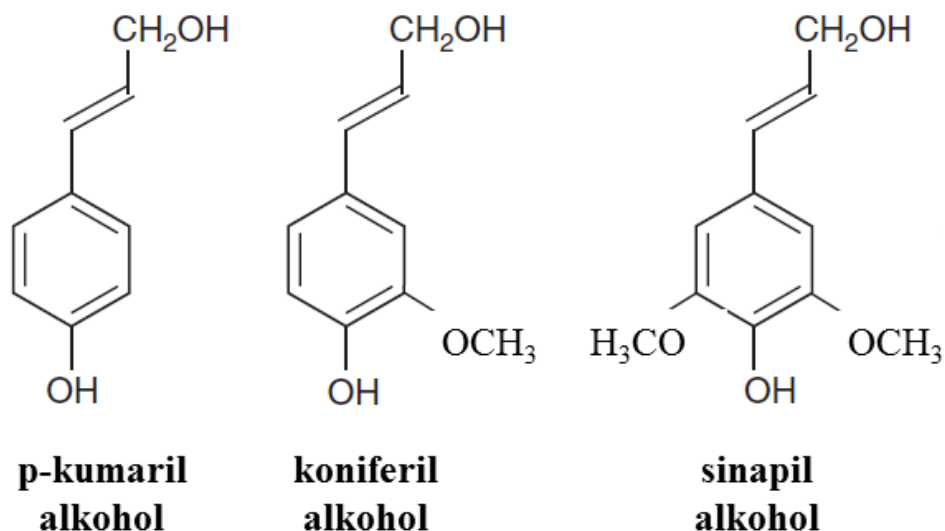
zavisnosti od koncentracije PVP-I kao i veličine rane pokazano je da se oko 0,3-4,5 % joda apsorbuje preko kože (*Below i sar., 2006*). Prilikom praćenja pacijenata sa normalnom funkcijom bubrega, takođe je primećeno povećanje nivoa joda u serumu tokom primene PVP-I, kao i da je nakon poslednje primene bilo potrebno duže od nedelju dana da se nivo joda vrati na normalni nivo (*Steen, 1993*).

### **2.5.2.2 Lignini**

Lignini su kompleksni polimeri aromatičnih alkohola. Najčešće se dobijaju iz drveta i sastavni su deo ćelijskog zida biljaka i nekih algi (*Vanhome i sar., 2010*). Švajcarski botaničar de Kandol (de Candolle) je 1813. godine prvi opisao lignin kao vlaknasti materijal bez ukusa nerastvoran u vodi i alkoholu i nazvao ga je prema latinskoj reči *lignum* koja znači drvo.

Lignini nastaju polimerizacijom lignana, dimera koji se u prirodi uglavnom nalaze u obliku glikozida. Pored celuloze i hemiceluloze glavni su sastojci lignoceluloznog materijala, a ujedno predstavljaju i drugi najzastupljeniji prirodni polimer na svetu, odmah iza celuloze. Lignin ima veoma važnu ulogu u ćelijskom zidu biljaka koja se ogleda u tome da pruža mehaničku čvrstoću biljkama, reguliše transport vode, služi za skladištenje energije, zaslužan je za otpornost biljaka na razne bolesti i različite vrste stresa, itd (*Radotić i sar., 1998*).

Lignini su trodimenzionalni, visoko umreženi makromolekuli, koji su nastali enzimskom polimerizacijom tri vrste substituisanih fenola, koji uključuju: koniferil-, sinapil- i p-kumaril-alkohol (slika 2.7), dajući ogroman broj funkcionalnih grupa i veza (*Radotić i sar., 2005*).

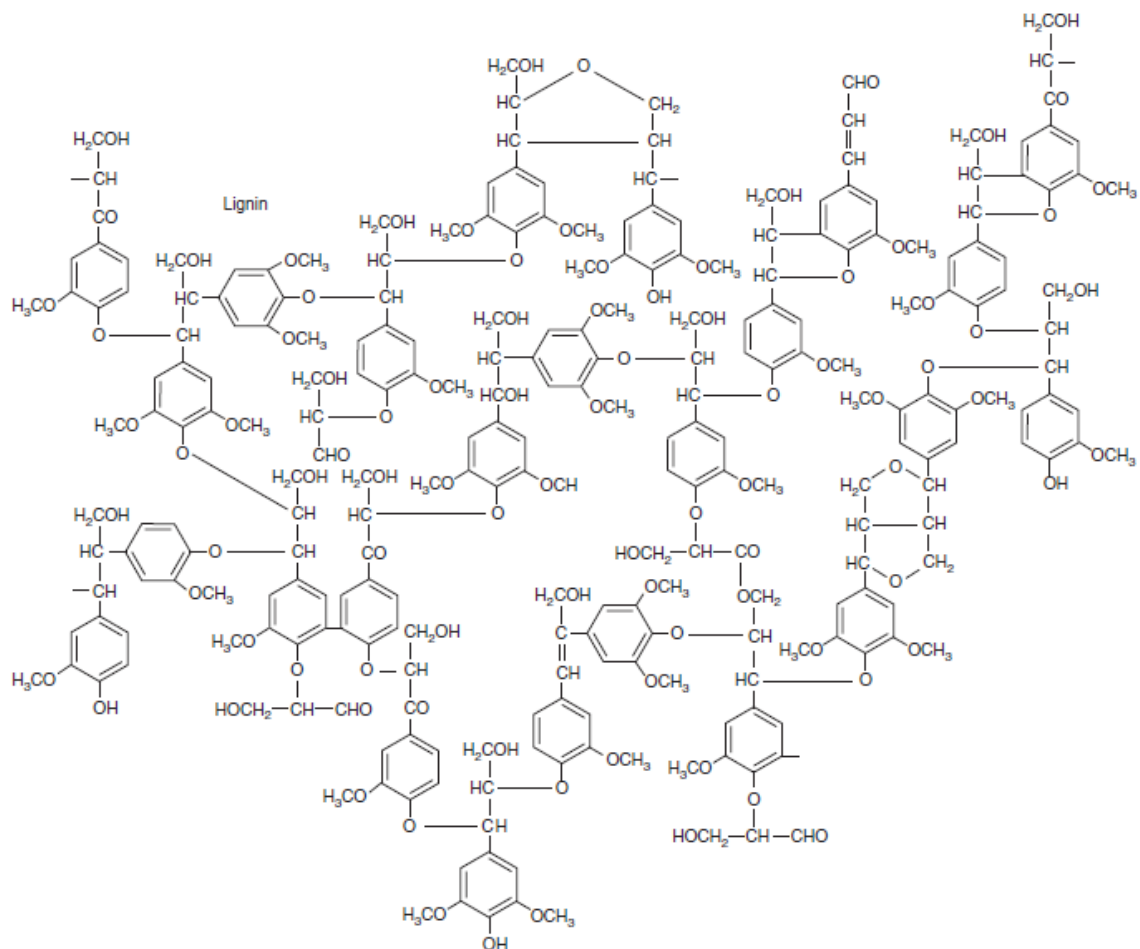


Slika 2.7 Strukturni prikaz osnovnih gradivnih jedinica lignina: p-kumaril-, koniferil- i sinapil-alkohola (Watkins i sar., 2015)

Lignini sadrže metoksi-, acetoksi-, formil- i druge funkcionalne grupe, a u lignoceluloznom materijalu vezan je za polisaharide, tj. celulozu, poluacetalnim i acetalnim vezama (Watkins i sar., 2015). Šematski prikaz lignina dat je na slici 2.8 (Watkins i sar., 2015).

Zbog visokog stepena povezanosti sa ostalim gradivnim jedinicama ćelijskog zida, lignin do sada nije izolovan u prirodnom neizmenjenom obliku tako da se sve informacije o strukturi lignina zasnivaju na ispitivanjima sintetisanih polimera nalik ligninu, kao i izolovanih fragmenata prirodnog polimera. Enzimskom sintezom dehidrogenatnog polimera (DPH) iz koniferil-alkohola dobija se najbolji supstituent lignina koji predstavlja lignin model jedinjenja (LMJ) široko korišćenog u eksperimentalne svrhe (Spasojević, 2017).





Slika 2.8 Šematski prikaz strukture fragmenta lignina (*Watkins i sar., 2015*)

U različitim eksperimentima je pokazano da fragmenti lignina kao i LMJ pokazuju određen nivo antimikrobne aktivnosti (*Radotić, 1998; Spasojević, 2016*). Takođe je pokazano da LMJ u alginatnom hidrogelu pokazuju antimikrobnu aktivnost prema više različitih kolekcijских i kliničkih sojeva Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija, i to jače izraženu u odnosu na slobodne LMJ (*Spasojević, 2016*). S obzirom da alginatni hidrogel nema antimikrobna svojstva, ovaj rezultat se može pripisati činjenici da alginat stvara trodimenzionalnu mrežu koja

najverovatnije zarobljava ćelije bakterija, dovodeći ih na taj način u bliski kontakt sa supstancom koja ispoljava baktericidan efekat (*Spasojević, 2017*).

### **2.5.3 Potporne obloge za rane**

Nakon ukazivanja na značaj sterilnosti od strane Semelvajza (Semmelweis) i Pastera (Pasteur) u 19. veku, jedna od najvećih prekretnica u terapiji rana jeste bilo otkriće značaja vlažnog previjanja početkom 60-tih godina 20. veka (*Ovington, 2007*). Prelomnu tačku predstavlja objavljivanje dva članka 1962. i 1963. godine u časopisu „Nature“ u kojima je pokazano na svinjama (*Winter, 1962*) i ljudima (*Hinnman i Maibach, 1963*) da akutne ekscizione rane značajno brže reepitelizuju ako se održava fiziološki vlažna sredina uz pomoć semiokluzivnog polietilenskog filma u odnosu na rane koje su bile nepokrivene i sušile su se na vazduhu. Koncept vlažnog previjanja rana odnosi se na održavanje optimalne hidratacije tkiva rane. Do tada se u lečenju rana primenjivalo tzv. suvo previjanje pri čemu ne samo da se dozvoljavalo već se i podsticalo sušenje tkiva rane. Sam princip vlažnog previjanja rana ne podrazumeva da rana treba da bude pokrivena tečnošću već da tkivo rane bude fiziološki vlažno, što znači ni suvo ni vlažno (*Lalević-Vasić i sar., 1997*).

Na osnovu tih spoznaja započela je proizvodnja specifičnih obloga za rane kojima se delovalo na lokalno okruženje u rani. Većina obloga za rane se može *prema tipu rane* svrstati u jednu od sledeće tri kategorije (*Ovington, 2007; Abdelrahman i Newton, 2011*):

- obloge koje apsorbuju višak eksudata → ako rana preterano vlaži obloga bi trebalo da apsorbuje taj višak i da uspostavi optimalan nivo vlažnosti; u ove obloge spadaju alginatne obloge;

- obloge koje održavaju postojeći nivo vlažnosti → ako je tkivo rane adekvatno vlažno sa minimalnom eksudacijom, obloga bi trebalo da održava optimalnu hidrataciju tkiva bez veće apsorpcije koja bi dovela do sušenja rane; u ove obloge spadaju hidrokoloide i filmovi;
- obloge koje vlaže ranu → u slučaju ako je rana suva, obloga bi trebalo da vrati tečnost rani i da na taj način obezbedi optimalnu hidrataciju; u ove obloge spadaju hidrogelovi.

Takođe, obloge za rane se mogu podeliti, *prema svojoj primeni*, na:

- *primarne* → obloge koje dolaze u direktan kontakt sa ranom; ove obloge se razlikuju po svojoj strukturi i sastavu kao i po svojoj sposobnosti da apsorbuju višak eksudata;
- *sekundarne* → obloge koje se postavljaju na primarnu oblogu, a ispod zavoja, i dizajnirane su tako da budu drugi sloj, ne dolaze u direktan kontakt sa ranom, a imaju funkciju da apsorbuju višak eksudata i/ili neprijatne mirise.

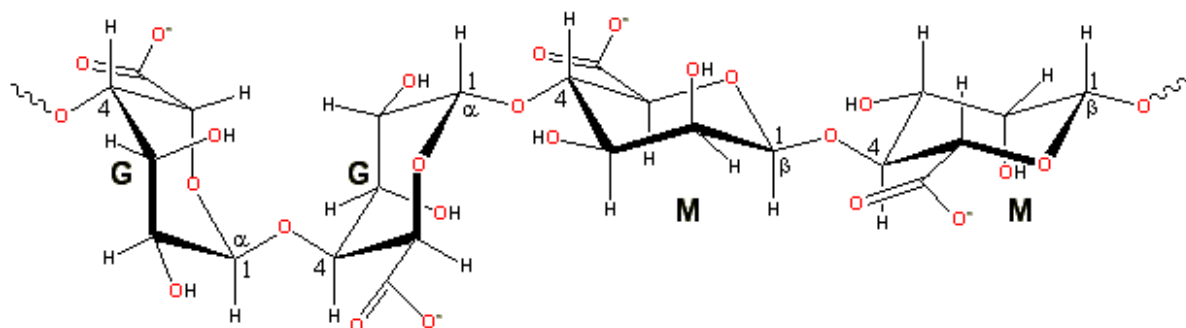
Smatra se da bi „idealna“ obloga za rane trebalo da ima sledeće karakteristike (*Selig i sar., 2012; Moura i sar., 2013*):

- da reguliše nivo vlažnosti,
- da obezbedi termoregulaciju i razmenu gasova, pomogne pri drenaži i otklanjanju debrisa i na taj način podstakne regeneraciju tkiva,
- da je biokompatibilna i da ne izaziva alergijsku ili imunu reakciju organizma,
- da štiti ranu od sekundarne infekcije,
- da se lagano skida bez dodatnog oštećenja tkiva.

## 2.6 Alginat

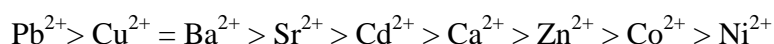
### 2.6.1 Hemijska struktura i mehanizam formiranja gela

Alginat je visokomolekularni linearni polisaharid koji se sastoji od nerazgranatih binarnih kopolimera  $\beta$ -D-manuronske (M) i  $\alpha$ -L-guluronske kiseline (G) koji su međusobno povezani 1,4-glikozidnim vezama (slika 2.9) (Martinsen i sar., 1989, Moe i sar., 1995, Gombotz i sar., 1998). U prirodi se može naći u ćelijskom zidu mrkih morskih algi (*Phaeophyceae*, uglavnom *Laminaria*), a komercijalno je dostupan kao natrijumova so, odnosno kao natrijum alginat. G i M jedinice alginata su povezane u homopolimerne (GG i MM) i heteropolimerne (MG) blokove. Količina i distribucija blokova u sastavu alginata zavisi od vrste, lokacije i starosti alge iz koje je izolovan (Drury i Mooney, 2003) tako da se komercijalni alginati veoma razlikuju po svom sastavu i karakteristikama, pa čak mogu postojati i velike varijacije u G/M odnosu kod alginata dobijenog iz istog izvora.

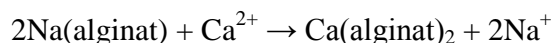


Slika 2.9 Strukturna formula jedinice lanca alginata (G-guluronska kiselina; M-manuronska kiselina)

Alginat pokazuje veoma veliki afinitet prema dvovalentnim katjonima i to prema sledećem redosledu:

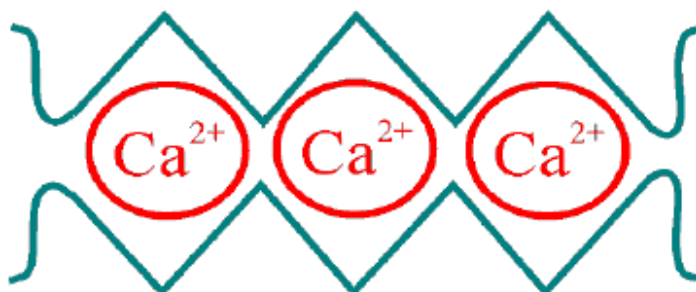


U prisustvu viševalentnih katjona dolazi do izmene jona natrijuma, povezivanja lanaca alginata i formiranja hidrogela. Struktura hidrogela je zasnovana na jonskim vezama i termostabilna je u opsegu od 0 do 100 °C, pa zagrevanje neće učiniti hidrogel tečnim. Od svih dvovalentnih katjona, najčešće korišćen katjon za geliranje je kalcijum. Do formiranja kalcijum-alginatnih hidrogelova dolazi kada se G blokovi uz pomoć jona kalcijuma vezuju za druge G blokove (*Wong i sar., 2004*) što znači da kapacitet obrazovanja gela u prisustvu jona kalcijuma direktno zavisi od prosečne dužine lanca G blokova. Prema tome, alginati koji sadrže najveći procenat GG frakcija imaju najveću sposobnost da formiraju kalcijum-alginatne hidrogelove, i to prema sledećoj reakciji:



Za opisivanje mehanizma formiranja gela, pre više od dve decenije je predložen „egg-box“ model (model „kutije za jaja“, slika 2.10) (*Grant i sar., 1973*). Prema ovom modelu,  $\text{Ca}^{2+}$  joni se u alginatu vezuju najpre samo za G blokove, sve dok ne dođe do zasićenja, odnosno dok sva slobodna mesta na guluronskim ostacima ne budu popunjena. Dva ili više poliuronatnih lanaca međusobno se vezuje stvarajući šupljine poput onih u kutiji za jaja za smeštanje dvovalentnog kalcijuma. Daljim dodavanjem,  $\text{Ca}^{2+}$  jone počinju da vezuju i manuronski ostaci.

Proces vezivanja lanaca se zaustavlja nastajanjem mreže. Kalcijum-alginatni hidrogel se može formirati pod izuzetno blagim uslovima, kao što su sobna ili telesna temperatura, fiziološki pH i izotonični rastvori (*de Vos i sar., 2006*). Za razliku od jona kalcijuma, smatra se da su joni cinka manje selektivni odnosno da se pored guluronskih ostataka vezuju i za manuronske (*McDowell, 1978*).



Slika 2.10 „Egg-box“ model (model kutije za jaja) vezivanja jona kalcijuma u šupljine između GG segmenata (*Bajpai i Sharma, 2004*)

Alginatni hidrogelovi se mogu ponovo rastvoriti uranjanjem u rastvor sa visokom koncentracijom jona natrijuma, kalijuma ili magnezijuma, a rastvaraju se i u prisustvu antigelirajućih agenasa kao što su citrati, laktati i fosfati. U *in vivo* uslovima, ovaj proces je nekontrolisan i spor (*Smidrod i Skjak-Bræk, 1990, Forster i sar, 2010*). Sam mehanizam rastvaranja nije do kraja ispitan, ali generalno, hidrogelovi prvo bubre, a zatim dolazi i do razaranja njihove strukture. Ispitivanje mehanizma degradacije alginatnih čestica u 0,1 M rastvoru fosfatno puferisanog rastvora natrijum-hlorida pokazalo je da se u prisustvu veće koncentracije jona natrijuma prvo zamenjuju joni kalcijuma vezani za manuronske ostatke pri čemu se povećava elektrostatičko odbijanje karboksilnih grupa i relaksacija polimernih lanaca, a

samim tim dolazi do bubrenja hidrogela (*Bajpai i sar., 2008*). Takođe, isti mehanizam razgradnje alginatnih mikročestica pokazan je i u medijumu za kulture ćelija u prisustvu niskih koncentracija natrijum-citrata (*Mitrović i sar., 2010*). Nakon bubrenja dolazi do raspadanja hidrogela na deliće koji najverovatnije predstavljaju GG blokove (*Mitrović i sar., 2010*) i koji u *in vivo* uslovima mogu biti prisutni i više meseci.

Na-alginat je zbog svojih karakteristika našao široku primenu u različitim industrijskim granama. Koristi se kao sredstvo za zgušnjavanje, sredstvo za geliranje, stabilizator i emulgator, a primenu je našao u prehrambenoj industriji, tekstilnoj industriji, proizvodnji papira, proizvodnji kozmetike, farmaceutskoj industriji, medicini (npr. obloge za rane), itd. Takođe, alginat se pokazao veoma pogodnim za imobilizaciju različitih bioaktivnih molekula (lekova, faktora rasta, hormona, enzima itd.) i ćelija različitog porekla kao što su ćelije mikroorganizama (bakterija, kvasaca, plesni, algi), biljaka i životinja, ali i za imobilizaciju humanih ćelija (*Smidsrod i sar., 1990, Nedović, 1999*). Takođe, uspešno su izvedene imobilizacije različitih lekova (*Yang i sar., 2013, Martín i sar., 2015*), enzima (*Taqieddin i Amiji, 2004, Rahim i sar., 2013*), faktora rasta (*Choi i sar., 2010, Kolambkar i sar., 2011*) i hormona (*Lucas i sar., 2015*) unutar matrice alginata.

## **2.6.2 Modelovanje otpuštanja aktivne supstance**

U poslednjih nekoliko decenija razvijen je veliki broj sistema sa kontrolisanim otpuštanjem aktivne supstance za primenu u farmaciji i medicini. Takođe, razvijeni su i brojni kinetički modeli čija funkcija je da objasne mehanizam i predvide kinetiku otpuštanja aktivne supstance korišćenjem eksperimentalnih podataka dobijenih prilikom *in vitro* ispitivanja.

Informacija o mehanizmu otpuštanja aktivne supstance je veoma značajna sa tačke razvoja novih sistema, s obzirom da bilo kakva promena u sistemu bilo kvalitativne bilo kvantitativne prirode može da utiče na stepen i brzinu otpuštanja aktivne supstance i samim tim na potencijalni efekat *in vivo*. Neki od najčešće korišćenih modela za opisivanje kinetike otpuštanja aktivne supstance su kinetika nultog reda, model unutrašnje difuzije i Korsmejer-Pepasov (*Korsmayer-Pepas*) model.

### 2.6.2.1 Kinetika nultog reda

Kinetika nultog reda predstavlja teorijski izveden model koji opisuje sisteme u kojima otpuštanje aktivne supstance iz matriksa ne zavisi od njene koncentracije. Sistemi čiji profil otpuštanja aktivne supstance odgovara kinetici nultog reda otpuštaju konstantnu količinu aktivne supstance po jedinici vremena, što je idealan model otpuštanja za postiznje produženog efekta aktivne supstance. Kinetika nultog reda se opisuje sledećom jednačinom:

$$d_m/d_t = -k_0 \quad (2.1)$$

gde su:  $m$  – količina aktivne supstance preostale u sistemu;  $k_0$  – konstanta brzine otpuštanja aktivne supstance za kinetiku nultog reda.



Integraljenjem od početnog trenutka ( $t=0$ ) i početne količine aktivne supstance,  $m_0$ , do trenutka  $t$  dobija se izraz za određivanje preostale količine aktivne supstance,  $m_t$ :

$$m_t = m_0 - k_0 t \quad (2.2)$$

Otpuštena količina,  $M_t$  se izračunava kao:

$$M_t = m_0 - m_t = k_0 t \quad (2.3)$$

### 2.6.2.2 Model unutrašnje difuzije

Model unutrašnje difuzije se bazira na prvom i drugom Fickovom (Fick) zakonu difuzije. Ovaj model opisuje sisteme u kojima je otpuštanje aktivne supstance iz sistema u direktnoj zavisnosti od gradijenta koncentracije aktivne supstance (*Siepmann i Siepmann, 2012*):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp(-Dn^2\pi^2t/R^2)}{n^2} \quad (2.4)$$

Sledeća jednačina opisuje otpuštanje iz sfere za početni period u kome se otpusti do 40 % aktivne supstance ( $M_t/M_\infty < 0.4$ ) (*Siepmann i Siepmann, 2012*):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 6\sqrt{D/\pi R^2} - 3D/R^2 \quad (2.5)$$

gde su:  $M_t$  i  $M_\infty$  – količina otpuštene aktivne supstance nakon vremena  $t$  i posle beskonačnog vremena, redom;  $D$  – koeficijent difuzije supstance unutar sfere;  $R$  – poluprečnik sfere.

### 2.6.2.3 Korsmejer-Pepasov model

Korsmejer (Korsmeyer) i Pepas (Peppas) su 1983 god. razvili empirijski model za analizu polimernih sistema sa kontrolisanim otpuštanjem aktivne supstance (Korsmeyer i Peppas, 1983). Sledeća jednačina opisuje otpuštanje aktivne supstance iz sfere za početni period u kome se otpusti do 60 % aktivne supstance ( $M_t/M_\infty < 0.6$ ):

$$M_t/M_\infty = kt^n \quad (2.6)$$

gde su:  $k$  – konstanta brzine otpuštanja koja zavisi od strukturnih i geometrijskih karakteristika matriksa sistema;  $n$  – eksponent brzine otpuštanja za Korsmejer-Pepasov model.

Eksponent  $n$  se koristi za opisivanje različitih mehanizama otpuštanja aktivne supstance i za sfere, u slučaju Fikove difuzije iznosi 0,5, a ako mehanizam otpuštanja aktivne supstance ne prati Fikovu difuziju onda se  $n$  nalazi u opsegu od 0,5-1.

### 2.6.3 Obloge za rane na bazi alginata

Postoje brojne komercijalne obloge za rane na bazi kalcijum- i cink-alginata koje su u standardnoj kliničkoj upotrebi (npr. Algisite M, Smith & Nephew, SAD; Curasorb, Medline Int.,

Holandija; Trionic, Systagenix, Velika Britanija; itd.). S obzirom da alginat može da veže oko 20 puta veću količinu eksudata u odnosu na svoju početnu masu, ove obloge su indicirane za korišćenje kod umereno do jako eksudirajućih rana (*Skorkowska-Telichowska, 2013*). Prilikom kontakta sa eksudatom rane, koji je izvor jona natrijuma, dolazi do proste zamene dvovalentnih katjona sa jonima  $\text{Na}^+$  i pretvaranja hidrogela u želatinozni gel. Želatinozni gel čisti ranu, održava vlažnu sredinu i podstiče granulaciju i epitelizaciju (*Paul i Sharma, 2004, Queen i sar, 2004*). Apsorbujući tečnost, alginat veže i bakterije i nekrotični debris imobilizujući ih u gel i na taj način čisti ranu. Pokazano je da neke alginatne obloge aktiviraju makrofage koji su neophodni u fazi inflamacije i na taj način stimulišu proces ozdravljenja rane (*Thomas i sar., 2000*). Alginatne obloge se mogu koristiti i u slučaju dubokih rana i fistula, a uklanjanje je bezbolno što ih čini veoma konformnim za samog pacijenta (*Paul i Sharma, 2004*).

Ove obloge imaju i neke nedostatke i to da ne obezbeđuju termoregulaciju, a u slučaju primene kod dubokih rana može doći do preterane stimulacije fibroblasta što može dovesti do sporijeg zarastanja rana. Pored toga, često je potrebna sekundarna obloga i ne preporučuje se korišćenje alginatnih obloga kod prisustva anaerobnih infekcija, a prisustvo želatinoznog gela u rani može se pomešati sa prisutnim gnojem (*Skorkowska-Telichowska, 2013*).

## **2.7 Katjoni metala kao bioaktivni agensi**

### **2.7.1 Joni kalcijuma**

Kalcijum je veoma rasprostranjen metal u organizmu i kao takav vrlo značajan za aktivnost svih ćelija. Od ukupne količine kalcijuma, 99% se nalazi u kostima i zubima

prvenstveno kao hidroksiapatit. Na količinu kalcijuma u organizmu utiče lučenje hormona paratiroidne žlezde i koncentracija vitamina D (*Manojlović i sar., 1998*). Funkcije ovog metala su brojne: daje strukturnu čvrstinu kostima i zubima, a joni  $\text{Ca}^{2+}$  učestvuju u interćelijskom prenosu signala u mišićima i nervima, zatim u procesu koagulacije, a i kofaktori su za neke enzime, itd (*Manojlović i sar., 1998*).

Joni kalcijuma imaju značajnu ulogu i u homeostazi kože sisara. Konkretno, za održavanje homeostaze epidermisa veoma je važan gradijent koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$ , od 0,5 mM u bazalnom sloju do > 1,4 mM u granuloznom sloju, koji omogućava normalnu tranziciju keratinocita od faze mitoze u donjim slojevima (bazalni sloj) do njihove keratinizacije i ćelijske apoptoze u gornjim slojevima epidermisa (granulozni sloj) (*Lansdown, 2002*).

Nakon povrede ovaj gradijent se remeti, usled čega dolazi do pojačane mitotičke aktivnosti ćelija u bazalnom sloju. Uloga jona kalcijuma je najjasnija u početnoj fazi zarastanja rane tokom koje se kroz aktivaciju protrombina podstiče hemostaza što dovodi do bržeg zaustavljanja krvarenja (*Riddel i sar., 2007, Boateng i sar., 2008*). Sa druge strane, uloga  $\text{Ca}^{2+}$  u fazi inflamacije i proliferacije, još uvek nije dovoljno jasno definisana. Eksperimentalne studije su pokazale da nakon povređivanja tokom 24 h dolazi do značajnog povećanja koncentracije jona kalcijuma koja raste tokom sledećih 5 dana što se poklapa sa periodom najveće inflamacije i visokom proliferativnom aktivnosti u epidermisu i dermisu (*Lansdown, 2002*). *In vitro* studije sa humanim neutrofilima kultivisanim na podlozi sa vitronektinom su nedvosmisleno pokazale da povećana koncentracija kalcijuma utiče na migraciju ovih ćelija (*Lansdown, 2002*). Makrofagi, monociti i fibroblasti migriraju vrlo brzo nakon neutrofila u predeo povrede, međutim još uvek nije jasno da li joni kalcijuma imaju isti efekat i na njih. *In vivo* studije na pacovima su pokazale da su opekotine drugog stepena tretirane oblogama na bazi Ca-alginata brže zarastale u odnosu

na opekotine tretirane koloidnim rastvorom na bazi Na-alginata što se pripisalo pozitivnom efektu jona kalcijuma (*Stojkowska i sar., 2018*). Međutim, treba imati na umu da velike koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  mogu biti uzrok i otežanog zarastanja usled stimulacije prerane keratinizacije keratinocita, kao i inhibicije njihove migracije koja je neophodna da bi došlo do reepitelizacije rane (*Lansdown, 2002*). U svakom slučaju, može se reći da svaka faza u zarastanju rana zavisi u određenoj meri od koncentracije ekstracelularnog kalcijuma, ali sam proces još uvek nije dovoljno poznat.

### **2.7.2 Joni cinka**

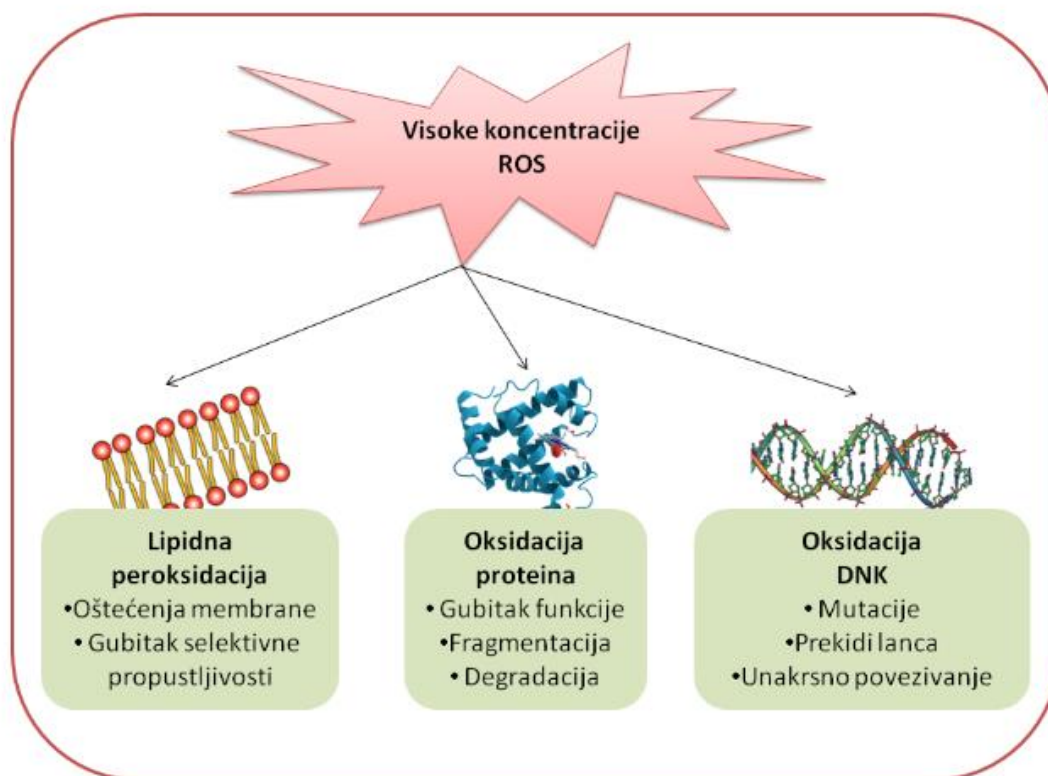
Cink je identifikovan kao esencijalni mikroelement još davne 1934. godine, ali je njegov pravi klinički značaj shvaćen mnogo kasnije (*Lansdown i sar., 2007*). U organizmu odraslog čoveka ima oko 0,8 – 3 g cinka (*Scrimshaw i Young, 1976*) i po količini se nalazi odmah iza gvožđa, koji je najzastupljeniji od svih mikroelemenata. Najveći deo cinka (oko 85 %) se nalazi u mišićima i kostima, a može se naći još u zubima, kosi, koži, jetri, leukocitima i testisima. Cink je neophodan za normalan rast i razvoj, funkcionisanje nervnog i imunog sistema, a posreduje i u procesu zarastanje rana. Pored bioaktivnog dejstva, cink poseduje i izraženo antimikrobno dejstvo.

Ispitivanjem procesa zarastanja rana, utvrđeno je da u ranama dolazi do promene koncentracije jona cinka sa vremenom: tokom prva 24 h, detektuje se porast od 20 % u odnosu na normalne fiziološke vrednosti, zatim sledi dalji porast do 30 % u fazi granulacije i intenzivne proliferacije epitelnih ćelija, a zatim u kasnijim fazama zarastanja rana (10-21 dan) dolazi do postepenog pada i vraćanja na normalne vrednosti usled smanjene deobe ćelija i maturacije

ožiljka (*Lansdown i sar., 2007*). Uloga jona cinka je veoma značajna u početnoj fazi zarastanja rane. Da bi došlo do agregacije trombocita i formiranja krvnog ugruška, neophodno je da se joni kalcijuma iz spoljašnje sredine transportuje u unutrašnjost trombocita kroz jonske kanale za čiju je adekvatnu strukturu i funkciju neophodno prisustvo jona cinka. U slučaju deficijencije  $Zn^{2+}$ , otežan je transport  $Ca^{2+}$  ka unutrašnjosti trombocita, što dovodi do produženog vremena krvarenja (*Tubek i sar., 2008*). Joni cinka imaju značajnu ulogu i u ostalim fazama zarastanja. Oni vrše aktivaciju makrofaga i ćelija ubica (*engl. natural killer cells-NK ćelije*), a stimulišu i proliferaciju limfocita. Takođe, joni cinka stimulišu proliferaciju keratinocita i fibroblasta i na taj način podstiču restauraciju epitela kao i sintezu komponenata ECM. Pored toga, enzimi matriksne metaloproteinaze (MMPs) koji su odgovorni za remodelovanje i degradaciju komponenta ECM, kao i uklanjanje oštećenog tkiva spadaju u familiju cink zavisnih enzima.

Iako je cink esencijalni mikroelement i za prokariote, kao i za eukariote, u koncentracijama većim od fizioloških, cink vrši inhibiciju rasta mikroorganizama (*Lansdown i sar., 2007*). Antibakterijska i antifungalna svojstva cinka (*Miller i McCallan, 1957; Atmaca i Gul, 1998; Padmavathy i Vijayaraghavan, 2008; Cicek Zhang i sar., 2010*) su poznata već duže vreme. Takođe, pokazano je da su Gram pozitivne bakterije osetljivije na dejstvo jona cinka u odnosu na Gram negativne bakterije (*Soderberg i sar., 1989*). Mehanizmi antimikrobnog dejstva jona cinka su putem generisanja reaktivnih kiseoničnih vrsta odnosno ROS (*engl. reactive oxxygen species*), utroška antioksidanata i narušavanjem Fe-S klastera enzima. Iako je cink stabilan u biološkim uslovima, ukoliko je prisutan u višku, može dovesti do indirektnog posredovanja u oksidativnom stresu generisanjem reaktivnih vrsta odnosno slobodnih radikala (*Trevisan i sar., 2014*). Generisani slobodni radikali reaguju sa biomolekulima indukujući nastanak i propagaciju novih slobodnih radikala i na taj način dovode do oksidativnog stresa

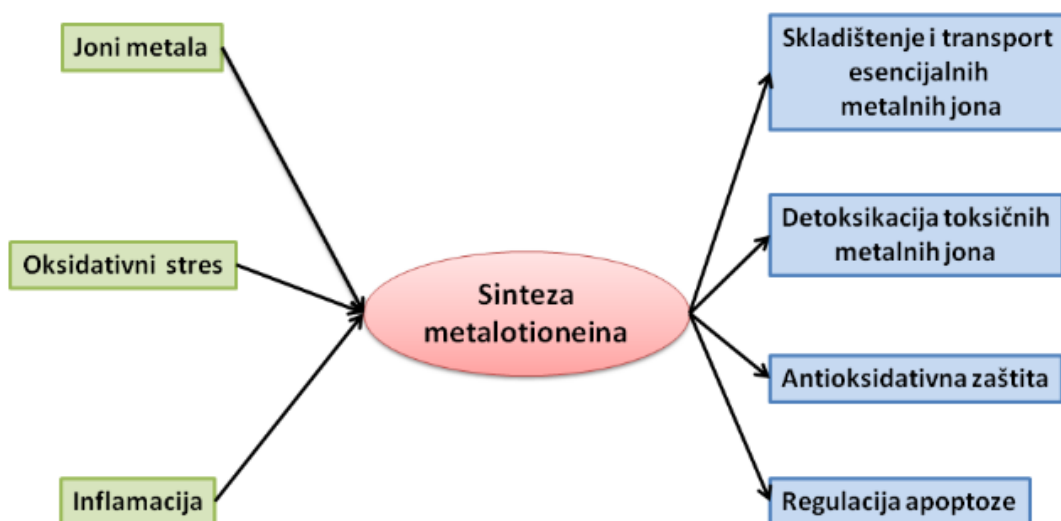
odnosno oštećenja ćelijskih struktura putem denaturacije lipida, proteina i DNK molekula (slika 2.11).



Slika 2.11 Oksidativna oštećenja biomolekula (ROS – reaktivne kiseonične vrste) (Nikolić, 2017)

Kako bi se smanjili ili izbegli štetni efekti reaktivnih kiseoničnih vrsta, organizmi su razvili mehanizme za njihovo uklanjanje koji predstavljaju antioksidativni sistem zaštite. Ovaj sistem se sastoji od enzimskih i neenzimskih komponenti koje su funkcionalno povezane u jednu celinu. Međutim, u slučajevima kada u ćeliji postoji velika koncentracija jona cinka, dolazi do heliranja sa proteinima kao što je metalotionein, što ima za posledicu smanjenje ukupne količine dostupnih antioksidanasa. Joni metala, oksidativni stres i inflamacija dovode do sinteze metalotioneina koji reagujući sa katjonima metala mogu da predstavljaju rezervoar kao i da

transportuju esencijalne metalne katjone ili pak da uklone toksične metalne katjone (slika 2.12). Metalotioneini takođe učestvuju u antioksidativnoj zaštiti i regulaciji apoptoze. Takođe, u uslovima velike koncentracije, joni cinka reaguju sa enzimima koji sadrže Fe-S grupu u katalitičkom centru, istiskuju gvožđe i vezuju se za sumpor, narušavajući na taj način aktivnost ovih enzima (Xu i Imlay, 2012).



Slika 2.12 Uloge metalotioneina (Nikolić, 2017)

## 2.8 Aktivni ugalj

### 2.8.1 Dobijanje i karakteristike aktivnog uglja

Upotreba ugljeničnih materijala se proteže daleko u prošlost. Prvi zabeležen slučaj datira iz starog Egipta iz 3750 godine pne kada je drvo ćumur korišćeno u proizvodnji bronzе. Prvi dokaz lekovite upotrebe ugljeničnih materijala datira iz 1550 godine pne i potiče takođe iz starog



Egipta. Otac medicine Hipokrat je koristio ugalj u lečenju brojnih bolesti uključujući epilepsiju i vertigo dok je Galen proizveo skoro 500 različitih lekova na bazi uglja. Oko 1820. godine napravljen je aktivni ugljeni materijal odnosno aktivni ugalj (AU) kakav danas poznajemo. Francuski hemičar Gabriel Bertrand je 1883. godine, da bi dokazao efikasnost AU u tretmanu trovanja, pred publikom progutao arsen pomešan sa ugljem i preživeo. Početkom 20-tog veka počela je industrijska proizvodnja AU. Danas, AU je našao široku primenu u brojnim industrijskim granama (nanotehnologija, elektronska industrija, farmaceutska industrija, metalurgija, itd.), a masovno se koristi i za prečišćavanje pijaćih i otpadnih voda. U širokoj je medicinskoj upotrebi kao glavno sredstvo za detoksikaciju kod trovanja na nivou gastro-intestinalnog trakta i prema FDA (*engl. American Food and Drug Administration*) kao lek koji se može kupiti bez recepta (*engl. over-the-counter-OTC*) nalazi se u kategoriji 1 („siguran i efikasan“) za tretman akutnih trovanja.

AU se dobija u dvofaznom procesu pirolize ugljeničnog prekursora uz prisustvo aktivacionog sredstva. U prvoj fazi odvija se karbonizacija sirovine uz raskidanje strukturnih veza i eliminaciju vode i oksida azota, sumpora i fosfora. U drugoj fazi vrši se aktivacija koja može biti fizička, pomoću ugljen-dioksida ili vodene pare pri temperaturi od približno 1000 °C, ili hemijska, uz pomoć kiselina ili baza (*Marsh i Rodríguez Reinoso, 2006*). U fazi aktivacije, aromatični prstenovi ugljenika se pravilnije raspoređuju, stvaraju se površinske funkcionalne grupe i dolazi do razvijanja pora (*Marsh i Rodríguez Reinoso, 2006*) usled čega ugalj dobija veliku adsorpcionu površinu koja mu omogućava jedinstvene adsorpcione karakteristike. Treba napomenuti da samo jedan gram AU ima aktivnu površinu od minimum 500 m<sup>2</sup> (radi poređenja teniski teren je veličine oko 260 m<sup>2</sup>) (*Marsh i Rodríguez Reinoso, 2006*). U komercijalnoj proizvodnji se kao prekursori najčešće koriste drvo, ugalj, kokosova ljuska i treset. Međutim,

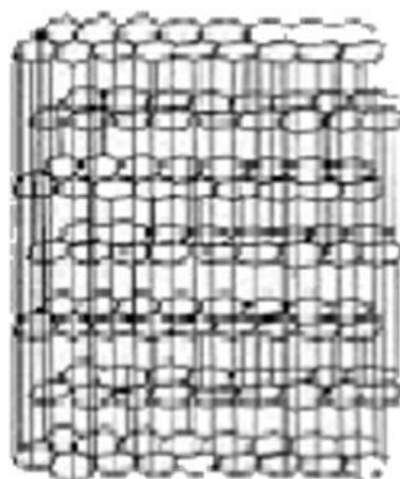
intenzivno se ispituju i razne druge sirovine biljnog porekla kao što su koštice raznog voća i povrća, korenje nekih biljaka, ljuska kikirikija, badema, lešnika, ploda palme i platana, srž ploda kukuruza, itd. u cilju dobijanja jeftinijih AU sa razvijenijom specifičnom površinom i većim adsorpcionim kapacitetom (*Momčilović, 2012, Dodevski, 2017*).

Osnovna jedinica građe AU su mikrokristaliti koji se sastoje iz ravni spojenih šestočlanih ugljeničnih prstenova, kao i mnogih šupljina i defekata između njih (*Dodevski, 2017*). Funkcionalne grupe heteroatoma na ivicama aromatičnih slojeva narušavaju paralelnu orijentaciju ravni koja je svojstvena grafitu i obezbeđuju tzv. turbostratičnu strukturu, koja je svojstvena AU (slika 2.13).

### **turbostratična struktura**



### **grafitna struktura**



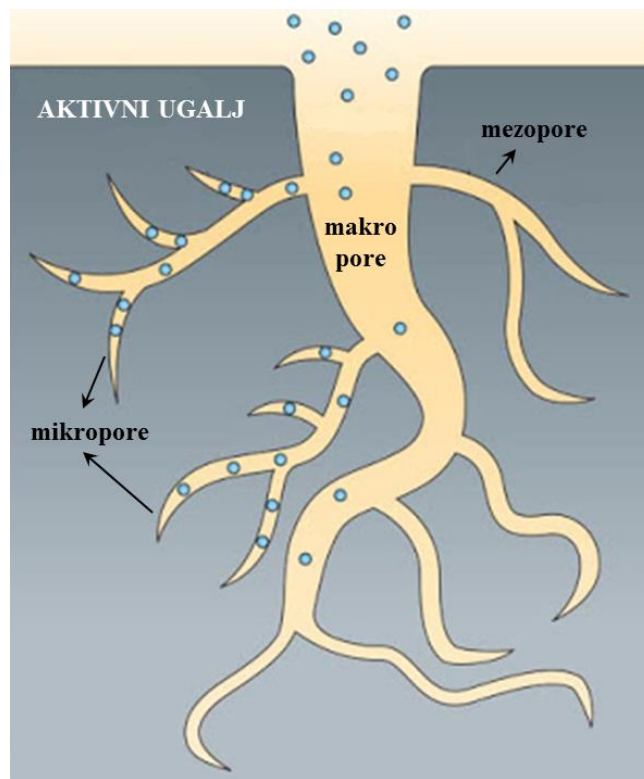
Slika 2.13 Prikaz turbostratične strukture prisutne u AU i grafitne strukture (*Dodevski, 2017*)

Najčešći heteroatomi u strukturi AU su vodonik i kiseonik, a funkcionalne grupe koje oni grade određuju reaktivnost u adsorpcionim procesima (*Marsh i Rodríguez Reinoso, 2006*). Koncentracija, vrsta i distribucija funkcionalnih grupa na površini mogu znatno varirati u zavisnosti od tipa korišćenog prekursora, aktivacionog sredstva, kao i samog postupka dobijanja AU. Kiseonične funkcionalne grupe (karboksilne, hidroksilne, laktonske, etarske, itd) koje se mogu javiti na površini AU su najodgovornije za njegovu hemijsku reaktivnost, a njihova ciljana modifikacija daje mogućnost „podešavanja“ površine radi dobijanja specifičnih adsorpcionih svojstava (*Marsh i Rodríguez Reinoso, 2006*).

Prema IUPAC klasifikaciji, pore unutar AU se mogu podeliti na (slika 2.14):

- *submikropore* - prečnik < 0,4 nm,
- *mikropore* - prečnik od 0,4 - 2,0 nm,
- *mezopore* - prečnik od 2 - 50 nm,
- *makropore* - prečnik > 50 nm.

Aktivni ugalj predstavlja jedan od najefikasnijih i najisplativijih adsorbenata koji se koristi za adsorpciju velikog broja organskih i neorganskih supstanci iz vode, zatim za uklanjanje neprijatnog mirisa i ukusa kao i mikroorganizama i produkata njihove aktivnosti.



Slika 2.14 Šematski prikaz strukture AU: mikropore, mezopore i makropore

## 2.8.2 Adsorpcija

Adsorpcija predstavlja koncentrisanje odnosno akumulaciju supstance na graničnoj površini dve faze. Najčešće je jedna faza čvrsta pa se pod adsorpcijom uobičajeno podrazumeva koncentrisanje komponenata iz rastvora (tečne faze) ili iz smeše gasova (gasne faze) na čvrstoj površini. Supstanca koja se adsorbuje naziva se adsorbat, a materijal na kome se vrši adsorpcija adsorbent. Proces suprotan adsorpciji naziva se desorpcija.

Prema vezama koje se stvaraju između molekula adsorbata i adsorbenta razlikuju se dva tipa adsorpcije, i to fizička i hemijska adsorpcija (Cecen i Aktas, 2011).

Fizička adsorpcija (fizisorpcija) se bazira na slabim međumolekulskim silama odnosno Van der Valsovim (Van der Waals) vezama često obrazujući više slojeva što se označava kao višeslojna adsorpcija. Fizisorpcija ima nizak stepen specifičnosti, a adsorbovane čestice zadržavaju svoju hemijsku strukturu tako da se desorpcijom mogu vratiti u svoje prvobitno stanje. Fizisorpcija se odvija na nižim temperaturama ( $< 150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) i karakteriše je niska entalpija adsorpcije (10 do 20 KJ/mol) (*Cecen i Aktas, 2011*).

Hemijska adsorpcija (hemisorpcija) se bazira na hemijskoj reakciji između adsorbenta i adsorbata. Može se reći da je hemisorpcija nepovratan proces s obzirom da hemisorbovane čestice gube svoj hemijski identitet jer su pretrpele hemijsku promenu i ne mogu se izdvojiti prostom desorpcijom. Hemisorpcija se karakteriše visokim vrednostima entalpije adsorpcije (40 do 400 KJ/mol), obično je monoslojna i odvija se na svim temperaturama, ali pretežno na visokim usled brže hemijske reakcije na višim temperaturama (*Cecen i Aktas, 2011*).

Ne postoji oštra granica između fizisorpcije i hemisorpcije. Generalno je teško razlikovati ova dva tipa adsorpcije jer vrsta uspostavljene veze zavisi od priroda adsorbenta i adsorbata. U slučaju reverzibilne adsorpcije, posle izvesnog vremena, uspostavlja se stanje adsorpcione ravnoteže koja ima dinamički karakter odnosno brzina adsorpcije se izjednačava sa brzinom desorpcije. Adsorpciona izoterma predstavlja zavisnost koncentracije adsorbata na adsorbentu od koncentracije adsorbata u rastvoru na datoj temperaturi i karakteristična je za svaki dati sistem.

Adsorpcija na AU zavisi od prisustva funkcionalnih grupa koje mu daju amfotermni karakter i u zavisnosti od prirode adsorbata, pH vrednosti rastvora i mehanizma adsorpcije, može se bazirati na dipol-dipol interakcijama, kovalentnom vezivanju, vodoničnim vezama ili jonskoj izmeni (*Chingombe i sar., 2006*).

### 2.8.3 Obloge za rane na bazi aktivnog uglja

U novije vreme u primeni su sve više prisutne obloge za rane koje u svom sastavu imaju AU kao jednu od svojih aktivnih komponenti (npr. Carboflex, Convatec; Carbonet, Smith&Nephew; Clinisorb, Clinimed Ltd; Actisorb Silver 220, Systagenix; itd.). Konkretno, radi se o formi AU u obliku karbonizovane i aktivisane tkanine čija je osnovna funkcija uklanjanje neprijatnih mirisa rane. Karbonizovana tkanina se dobija karbonizacijom viskozne (celulozne) tkanine na visokoj temperaturi pod strogo kontrolisanim uslovima. Na taj način dobija se tkanina koja se sastoji od 95-98 % ugljenika u kojoj dolazi do razvijanja pora čime se povećava njena efektivna adsorpciona površina.

Međutim, pokazano je da se karbonizovana tkanina strukturno i funkcionalno razlikuje od čestica AU. Dok se u slučaju AU veličina pora može podešavati, karbonizovana tkanina uglavnom sadrži mikropore (*Starek i sar., 1994*). To praktično znači da molekuli prečnika  $> 2$  nm ne mogu ući u unutrašnje pore karbonizovane tkanine već se samo vezuju za spoljašnju površinu što znatno smanjuje raspoloživu efektivnu adsorpcionu površinu. Radi poređenja, treba napomenuti da su najmanji virusi veličine oko 10 nm, a prečnik prosečne prokariotske ćelije (bakterija) varira između 1 i 10  $\mu\text{m}$ .

Takođe, karbonizovana tkanina u komercijalnim oblogama za rane se uvek nalazi u „sendviču“ odnosno između drugih slojeva obloge. S obzirom da nikada ne dolazi u direktan kontakt sa površinom rane, njena funkcija je svedena samo na adsorpciju malih molekula odgovornih za pojavu neprijatnog mirisa. Međutim, brojne *in vitro* i *in vivo* studije su pokazale da AU vrlo uspešno adsorbuje bakterije, viruse, uklanja endo- i egzotoksine iz tečnosti, kao i proizvode degradacije rane (*Nolan i sar., 1975; Drucker i sar., 1977; Naka i sar., 2001; Cole,*

2002; Howell i sar., 2006; Sandeman i sar., 2008; Kerihuel i sar., 2010; Osmokrović i sar., 2018). U medijumu bogatom *E. coli*, primenom AU otklonjeno je 90-95% toksina ove vrste bakterija (Nolan i sar., 1975). U *in vivo* eksperimentima korišćenjem modela endotoksemije uzrokovane resorpcijom endotoksina preko gastrointestinalnog trakta kod miša, pokazano je da je AU uspešno vezivao endotoksine (Ditter i sar., 1983). Takođe je pokazano da AU, *ex vivo* i *in vitro*, filtrira inflamatorne medijatore kao što su IL-8 ili TNF- $\alpha$  iz krvi (Cole, 2002; Howell i sar., 2006; Sandeman i sar., 2008).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ove disertacije je razvoj novih kompozitnih hidrogelova na bazi alginata i čestica aktivnog uglja (AU) za potencijalnu primenu u tretmanu rana tako da se, u dodiru sa biološkim fluidima, čestice AU kontrolisano otpuštaju. Pri tome, čestice AU mogu biti impregnirane sa antimikrobnim supstancama ili supstancama koje podstiču zarastanje rana dok alginatni hidrogel efikasno upija vlagu. Posebno se mogu izdvojiti sledeći ciljevi:

1. određivanje sastava i uslova geliranja za dobijanje slabo umreženih hidrogelova Ca- i Zn-alginata sa sadržanim česticama AU tako da se ove čestice u biološkim fluidima kontrolisano otpuštaju tokom vremena;
2. određivanje kinetike otpuštanja čestica AU iz odabranih kompozitnih Ca- i Zn-alginatnih hidrogelova;
3. određivanje kinetike otpuštanja  $Zn^{2+}$  iz odabranih kompozitnih Zn-alginatnih hidrogelova u fiziološkom rastvoru;
4. određivanje mogućnosti adsorpcije PVP-I i LMJ kao dve model supstance na čestice AU sadržane u alginatnom hidrogelu;
5. određivanje funkcionalnosti odabranih kompozitnih alginatnih hidrogelova sa česticama AU u potencijalnom tretmanu rana i to u pogledu utvrđivanja antimikrobnog dejstva u suspenzijama odabranih kultura mikroorganizama.



## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1 Materijali

U ovom radu korišćen je Na-alginat srednjeg viskoziteta (A-2033), Ca-hlorid dihidrat i Zn-nitrat heksahidrat, svi nabavljeni od kompanije Sigma (St. Luis, SAD), zatim aktivni ugalj u prahu MEKS 95 kupljen od kompanije Traylor (Kruševac, Srbija), Na-citrat dihidrat kupljen od kompanije Himedia (Bombaj, Indija), Na-hlorid kupljen od kompanije Centrohem (Stara Pazova, Srbija) i azotna kiselina (65 %) kupljena od kompanije Zorka Pharma (Šabac, Srbija).

U eksperimentima adsorpcije korišćeni su povidon-jod (PVP-I) u prahu koji je dobijen na poklon od kompanije Hemofarm (Šabac, Srbija) i lignin model jedinjenja (LMJ) koja su sintetisana na Institutu za multidisciplinarna istraživanja (Beograd, Srbija).

U eksperimentima ispitivanja antimikrobne aktivnosti korišćene su kolekcijske bakterijske kulture *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 poreklom iz američke kolekcije kultura (American Type Culture Collection -ATCC) kao i klinički sojevi meticilin-rezistentnog *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis* i *Candida albicans* izolovani iz rana koji su dobijeni od Gradskog zavoda za javno zdravlje (Beograd, Srbija). Rezultati antibiograma kliničkih sojeva su prikazani u tabeli 4.1. Tripton je kupljen od Instituta za virusologiju, vakcine i serume Torlak (Beograd, Srbija), a ekstrakt kvasca od kompanije BioMerie (BioMerieus, Madrid, Španija). Korišćene su sledeće podloge: tripton soja (TS) bujon i agar, Miler Hinton (*Mueller Hinton*, MH) bujon i agar, sve kupljene od Instituta za virusologiju, vakcine i serume Torlak (Beograd, Srbija).

Tabela 4.1. Rezultati antibiograma kliničkih sojeva korišćenih u ovom radu.

Klinički sojevi izolovani iz rana	Rezultati rezistencije prema antibiogramu
meticilin-rezistentan <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)*	benzilpenicilin, oksacilin, imipenem, gentamicin, ciprofloksacin, moksifloksacin, eritromicin, klindamicin, tetraciklin, fuzidinska kiselina, rifampicin
<i>Escherichia coli</i> (ESBL-EC**)	svi cefalosporini, ampicilin, amoksicilin sa klavulanskom kiselinom, piperacilin, ciprofloksacin, sulfametoksazol/trimetoprim
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ceftazidim, piperacilin, gentamicin, ciprofloksacin
<i>Enterococcus faecalis</i>	ampicilin
<i>Proteus mirabilis</i>	cefaleksin, ceftazidim, ceftriakson, ampicilin, amoksicilin sa klavulanskom kiselinom, piperacilin, amikacin, gentamicin, ciprofloksacin, sulfametoksazol/trimetoprim

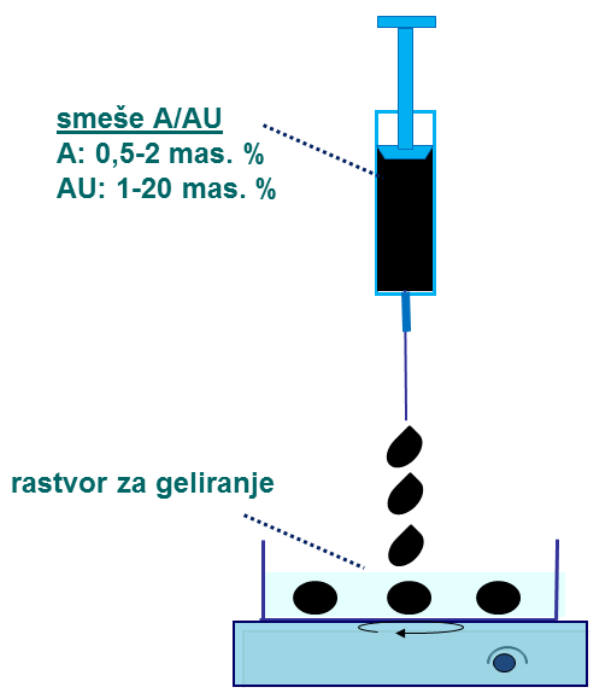
\* potvrđeno je prisustvo *mecA* gena

\*\* beta-laktamaza proširenog spektra delovanja *Escherichia coli*

## 4.2 Dobijanje kalcijum-alginatnih hidrogelova sa sadržanim česticama aktivnog uglja

### 4.2.1 Dobijanje kalcijum-alginatnih kompozitnih čestica metodom ekstruzije

Ca-alginatni hidrogelovi sa sadržanim česticama aktivnog uglja (CaA/AU) u obliku čestica su dobijeni iz serije smeša Na-alginatnih rastvora i AU metodom ekstruzije (slika 4.1).



Slika 4.1. Šematski prikaz aparature za izvođenje ekstruzije i dobijanje A/AU čestica

Konkretno, fino usitnjeni prah AU je suspendovan u vodenom rastvoru Na-alginata uz pomoć mešalice *Ultra-Turrax® T25* (Janke and Kunkel Ika-Labortechnik, Štaufen, Nemačka) na 20000 obrtaja/min tokom perioda od 5 minuta. Napravljena je serija smeša sa finalnim koncentracijama alginata, u opsegu 0,5-2 mas. %, i AU, u opsegu 1-20 mas. %. Dobijene smeše su potiskivane uz pomoć šprica ili peristaltičke pumpe (*Berh Labor-Technik*,

*Dizeldorf, Nemačka*) konstantnim protokom od oko 2,5-5 ml/min kroz iglu od nerđajućeg čelika sa ravnim vrhom (16 G, *Small Parts, Inc., SAD*) u rastvor za geliranje. Kao rastvor za geliranje korišćen je  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , u opsegu koncentracija 0,9-1,5 mas. %. Kapljice smeše su sakupljane u rastvoru za geliranje mešanom na magnetnoj mešalici, pri čemu je dolazilo do razmene jona  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  i očvršćavanja kapi u obliku sferičnih čestica. CaA/AU čestice su nakon formiranja ostavljane da geliraju (30 min), uz mešanje. Nakon toga, čestice su nekoliko puta isprane sa  $\text{dH}_2\text{O}$ , kako bi se uklonili zaostali  $\text{Ca}^{2+}$  i dalje su korišćene u eksperimentalnim istraživanjima.

Ukupno je napravljeno 12 smeša, različitih koncentracija alginata i AU, iz kojih su pravljene CaA/AU čestice. Čestice su grupisane, prema koncentraciji alginata (mas. %) u početnoj smeši, u četiri grupe: 0,5, 1, 1,5 i 2, a zatim su unutar svake grupe, prema koncentraciji AU (mas. %) u početnoj smeši, dobijale oznaku: M (5 mas. %), S (10 mas. %) ili V (20 mas. %) (tabela 4.2).

Tabela 4.2. Sastavi početnih smeša alginata i AU, i odgovarajuće šifre dobijenih CaA/AU čestica

alginat (mas. %)	AU (mas. %)		
	mala (5)	srednja (10)	velika (20)
0.5	0.5/M*	0.5/S	0.5/V
1	1/M	1/S	1/V
1.5	1.5/M	1.5/S	1.5/V
2	2/M	2/S	2/V**

\*0.5/M – koncentracija AU je 1 mas. %

\*\*2/V – koncentracija AU je 15 mas. %

Izuzetak su predstavljale dve formulacije, 0,5/M koja je imala koncentraciju AU od 1 mas. % i 2/V koja je imala koncentraciju AU od 15 mas. %. Manja koncentracija AU u česticama 0,5/M je izabrana sa pretpostavkom da će se najviše čestica AU osloboditi iz čestica sa najmanjom koncentracijom alginata i AU, a u česticama 2/V koncentracija AU je morala da se smanji na 15 mas. % u cilju dobijanja sferičnih čestica.

Kontrolne Ca-alginatne čestice (CaA) su pravljene pod istim uslovima pri čemu su, u rastvor za geliranje, ukapavani vodeni rastvori Na-alginata različitih koncentracija (0,5-2 mas. %).

#### **4.2.2 Dobijanje kalcijum-alginatnih kompozitnih hidrogelova u obliku diskova**

CaA/AU diskovi su dobijeni razlivanjem svih 12 smeša alginata i AU (tabela 4.2) u posude sa 12 bunarića. U svaki bunarić je prethodno postavljen filter papir natopljen rastvorom za geliranje (0,9 mas. %  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), a nakon razlivanja, drugi filter papir takođe natopljen rastvorom za geliranje je pažljivo postavljen na površinu razlivene smeše. Zatim je niz zid bunarića pažljivo dodato 1-2 ml rastvora za geliranje, koji je promenjen nakon 24 h. Formirani diskovi su iz bunarića izvadjeni nakon 48 h, a zatim nekoliko puta isprani sa  $\text{dH}_2\text{O}$ , i dalje su korišćeni u eksperimentima konstrukcije kalibracione prave za određivanje koncentracije AU.

#### **4.2.3 Ispitivanje bubrenja i rehidracije suvih kompozitnih čestica**

Mogućnost rehidracije suvih kompozitnih CaA/AU čestica je ispitivana u fiziološkom rastvoru (0,9 mas. % NaCl) u dinamičkim uslovima sa mešanjem. Konkretno, vlažne CaA/AU kompozitne čestice iz svih 12 grupa (po 2 g vlažne mase) su sušene na

vazduhu do konstantne mase na sobnoj temperaturi, a zatim su potopljene u fiziološki rastvor (20 ml) i stavljene u vodeno kupatilo na 37 °C uz mešanje od 120 obrtaja/min u periodu od 5 dana. U unapred određenim vremenskim intervalima, nakon 1, 3, 5, 24, 48 i 120 h inkubacije, čestice su uzorkovane, slikane pod mikroskopom, a zatim vraćane nazad u sistem. Eksperimenti su rađeni u triplikatu.

Zapreminski stepen bubrenja,  $q_v$ , je računat na osnovu merenja prečnika čestica prema jednačini:

$$q_v = (d/d_0)^3 \quad (4.1)$$

gde su  $d$  i  $d_0$  prečnici čestica izmereni u nekom vremenskom trenutku i na početku eksperimenta, redom.

#### **4.2.4 Ispitivanje kinetike otpuštanja čestica aktivnog uglja u fiziološkom rastvoru**

Kinetika otpuštanja čestica AU je ispitivana za CaA/AU čestice iz svih eksperimentalnih grupa datih u tabeli 4.2. Kompozitne čestice mase 2 g su sušene na vazduhu na sobnoj temperaturi do konstantne mase, a zatim su stavljene u fiziološki rastvor (20 ml) u vodeno kupatilo na 37 °C uz mešanje od 120 obrtaja/min tokom perioda od 5 dana. U unapred određenim vremenskim intervalima, nakon 1, 3, 5, 24, 48 i 120 h inkubacije, uzimani su uzorci rastvora (0,4 ml) dok je ista količina svežeg fiziološkog rastvora vraćana u sistem. Kinetika otpuštanja čestica AU praćena je uz pomoć UV-vidljive spektroskopije na talasnoj dužini od 600 nm. Eksperimenti su rađeni u triplikatu.

## **4.3 Dobijanje cink-alginatnih hidrogelova sa sadržanim česticama aktivnog uglja**

### **4.3.1 Dobijanje cink-alginatnih kompozitnih čestica metodom ekstruzije**

Cink-alginatne čestice sa sadržanim česticama aktivnog uglja (ZnA/AU) su dobijene na isti način kao i CaA/AU čestice. Ukratko, odabrana smeša koncentracije 0,5 mas. % alginata i 20 mas. % AU je potiskivana uz pomoć šprica ili peristaltičke pumpe (*Berh Labor-Technik, Dizeldorf, Nemačka*) konstantnim protokom od oko 3 ml/min kroz iglu sa ravnim vrhom (16 G) u rastvor za geliranje 1,8 mas. %  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Čestice su nakon formiranja ostavljene da geliraju još 30 min, uz mešanje. Nakon toga dobijene čestice označene kao Zn0,5/V su nekoliko puta isprane sa dH<sub>2</sub>O kako bi se uklonili zaostali  $\text{Zn}^{2+}$  i dalje su korišćene u eksperimentalnim istraživanjima.

Kontrolne Zn-alginatne čestice (ZnA) su pravljene pod istim uslovima pri čemu je u rastvor za geliranje ukapavan 0,5 mas. % rastvor Na-alginata.

### **4.3.2 Ispitivanje kinetike otpuštanja čestica aktivnog uglja u fiziološkom rastvoru**

Kinetika otpuštanja čestica AU iz kompozitnih Zn0,5/V čestica je ispitivana u fiziološkom rastvoru na isti način kao što je to opisano u poglavlju 4.2.4. Ukratko, vlažne kompozitne čestice mase 2 g su sušene na vazduhu na sobnoj temperaturi do konstantne mase, a zatim su stavljene u fiziološki rastvor (20 ml) u vodeno kupatilo na 37 °C uz mešanje od 120 obrtaja/min tokom perioda od 5 dana. U unapred određenim vremenskim intervalima, nakon 1, 3, 7, 33, 48 i 120 h inkubacije, uzimani su uzorci rastvora (0,4 ml) dok je ista količina svežeg fiziološkog rastvora vraćana u sistem. Kinetika otpuštanja čestica AU

praćena je pomoću UV-vidljive spektroskopije na talasnoj dužini od 600 nm. Takođe, u isto vreme uzorkovane su i čestice koje su slikane pod mikroskopom, a zatim vraćane nazad u sistem.

#### **4.3.3 Ispitivanje kinetike otpuštanja jona cinka u fiziološkom rastvoru i TS bujonu**

Radi određivanja ukupnog sadržaja  $Zn^{2+}$  suve ZnA i Zn0,5/V čestice (0,1 g) su rastvorene u rastvoru 2 mas. % Na-citrata (9,9 ml). Uzorci su zatim centrifugirani na  $5000 \times g$  5 min da bi se iz rastvora odstranile čestice AU. U slučaju rastvorenih ZnA čestica, ispitan je uticaj centrifugiranja na preciznost merenja koncentracije  $Zn^{2+}$  tako što su upoređene vrednosti za osnovni i centrifugirani uzorak. Ukupni sadržaja  $Zn^{2+}$  je određen uz pomoć plamene atomske apsorpcione spektrofotometrije (FAAS).

Kinetika otpuštanja  $Zn^{2+}$  iz ZnA i Zn0,5/H čestica praćena je u dve eksperimentalne serije. U prvoj seriji, kinetika otpuštanja  $Zn^{2+}$  je praćena u fiziološkom rastvoru pod istim uslovima kao i kinetika otpuštanja čestica AU. Konkretno, ZnA i Zn0,5/H čestice, vlažne mase 2 g, su sušene na sobnoj temperaturi do konstantne mase, a zatim su stavljene u fiziološki rastvor (20 ml) u vodeno kupatilo na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  uz mešanje od 120 obrtaja/min tokom perioda od 5 dana. U unapred određenim vremenskim intervalima uzimani su uzorci (0,4 ml) dok je ista količina novog fiziološkog rastvora vraćana nazad u sistem. Uzorci su zatim razblaženi 15 puta tj. dodavano im je 5,6 ml  $dH_2O$  pa su centrifugirani na  $5000 \times g$  5 min da bi se iz rastvora odstranile čestice AU. Koncentracija  $Zn^{2+}$  u uzorcima određena je direktno uz pomoć plamene atomske apsorpcione spektrofotometrije (FAAS). Takođe, čestice su tokom vremena uzorkovane, slikane pod mikroskopom, a zatim vraćane nazad u sistem.

U drugoj seriji, kinetika otpuštanja  $Zn^{2+}$  iz ZnA i Zn0,5/V čestica ispitivana je u TS bujonu. Konkretno, ZnA i Zn0,5/V čestice, mase 4 g, su sušene na vazduhu na sobnoj



temperaturi do konstantne mase, a zatim su stavljene u TS bujon (10 ml) i inkubirane na 37 °C tokom perioda od 24 h u statičkim uslovima. Nakon 1 i 24 h uzimani su uzorci (1 ml) dok je ista količina novog bujona vraćana nazad u sistem. Uzorci su zatim razblaženi 10 puta tj. dodavano im je 9 ml dH<sub>2</sub>O, zatim su centrifugirani na 5000 ×g 5 min da bi se iz rastvora odstranile čestice AU. Koncentracija Zn<sup>2+</sup> u uzorcima određena je direktno uz pomoć plamene atomske apsorpcione spektrofotometrije (FAAS). Takođe, čestice su tokom vremena uzorkovane, slikane pod mikroskopom, a zatim vraćane nazad u sistem.

#### **4.4 Imobilizacija prve model supstance: povidon-jod (PVP-I)**

##### **4.4.1 Dobijanje kompozitnih alginatnih čestica sa imobilisanim PVP-I**

PVP-I je imobilisan u kompozitne 0,5/V čestice u dve eksperimentalne serije. U prvoj eksperimentalnoj seriji korišćene su Ca<sub>0,5/V</sub>, a u drugoj Zn<sub>0,5/V</sub> kompozitne čestice. Konkretno, kompozitne čestice su napravljene pod sterilnim uslovima u laminarnoj komori, a zatim su vlažne čestice (4 g) potopljene u 10 mas. % vodeni rastvor PVP-I (4 ml) i ostavljene tokom 24 h u mraku. Dobijene čestice sa imobilisanim PVP-I (0,5/V/PVP-I) su zatim isprane nekoliko puta sa dH<sub>2</sub>O i sušene u sterilnim uslovima u laminarnoj komori na vazduhu na sobnoj temperaturi do konstantne mase.

Prisustvo joda u vodenom rastvoru nakon adsorpcije je ispitivano uz pomoć UV-vidljive spektroskopije na talasnoj dužini od 351 nm.

#### **4.4.2 Ispitivanje otpuštanja PVP-I u fiziološkom rastvoru**

Mogućnost desorpcije PVP-I iz kompozitnih 0,5/V/PVP-I čestica ispitivana je u dve eksperimentalne serije. U prvoj seriji korišćene su suve Ca0,5/V/PVP-I, a u drugoj suve Zn0,5/V/PVP-I kompozitne čestice. Konkretno, kompozitne čestice sa imobilisanim PVP-I (2 g) su sušene na vazduhu na sobnoj temperaturi do konstantne mase, a zatim su potopljene u fiziološki rastvor (20 ml) i stavljene u vodeno kupatilo na 37 °C uz mešanje od 120 obrtaja/min. Nakon perioda od 72 h čestice su odvojene od fiziološkog rastvora i rastvorene u rastvoru 2 mas. % Na-citrata. I fiziološki rastvor i rastvorene čestice su centrifugirane na 600 ×g 10 minuta, da bi se odstranile čestice AU, a zatim je, uz pomoć UV-vidljive spektroskopije, ispitivano prisustvo joda u oba supernatanta na talasnoj dužini od 351 nm. Eksperimenti su rađeni u triplikatu.

#### **4.4.3 Ispitivanje kinetike otpuštanja čestica aktivnog uglja u fiziološkom rastvoru**

Kinetika otpuštanja čestica AU iz Zn-alginatnih čestica impregniranih sa PVP-I (Zn0,5/V/PVP-I) je ispitivana u fiziološkom rastvoru na isti način kao i iz kompozitnih Zn0,5/H čestica po proceduri opisanoj u poglavlju 4.3.2.

#### **4.4.4 Ispitivanje kinetike otpuštanja jona cinka u fiziološkom rastvoru i TS bujonu**

Ukupni sadržaj  $Zn^{2+}$  kao i kinetika otpuštanja iz Zn0,5/V/PVP-I čestica je ispitivana u fiziološkom rastvoru i TS bujonu na isti način kao i iz kompozitnih Zn0,5/V čestica po proceduri opisanoj u poglavlju 4.3.3.

## 4.5 Imobilizacija druge model supstance: lignin model jedinjenja (LMJ)

### 4.5.1 Imobilizacija LMJ na čestice aktivnog uglja

Imobilizacija LMJ na čestice AU je ispitivana u dve eksperimentalne serije. U prvoj eksperimentalnoj seriji, korišćeni su rastvori LMJ u 5 mas. % dimetil sulfoksidu (DMSO) koncentracije LMJ od 1 mg/ml, 5 mg/ml i 10 mg/ml, a adsorpcija je ispitivana u pločama sa 6 bunarića. Konkretno, u svaki bunarić je stavljeno po 0,5 g AU, a zatim je dodato po 6 ml rastvora LMJ u DMSO. U drugoj eksperimentalnoj seriji, korišćeni su rastvori LMJ/DMSO koncentracije LMJ od 0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml i 1 mg/ml. U svaki balon od 250 ml za ispitivanje adsorpcije LMJ na čestice AU, stavljeno je po 0,5 g AU, a zatim je dodato po 100 ml rastvora LMJ/DMSO. U obe eksperimentalne serije imobilizacija LMJ je ispitivana na sobnoj temperaturi uz stalno mešanje od 120 obrtaja/min tokom perioda od 72 h. U unapred određenim vremenskim intervalima uzimani su uzorci rastvora (1 ml u prvoj i 1,5 ml u drugoj seriji) koji su zatim centrifugirani na  $1000 \times g$  10 min da bi se izdvojile čestice AU. Koncentracija LMJ je određivana iz supernatanta uz pomoć UV-vidljive spektroskopije na talasnoj dužini od 272 nm. Nakon 72 h, rastvori LMJ/DMSO su centrifugirani na  $1000 \times g$  10 min da bi se izdvojile čestice AU, a zatim i liofilizovani radi ispitivanja prisustva LMJ primenom FT-IR analize. Takođe, izdvojene čestice AU sa adsorbovanim LMJ su isprane više puta sa destilovanom vodom i takođe liofilizovane radi daljeg korištenja u eksperimentima.

Adsorbovana količina LMJ na čestice AU,  $q$ , je računata na osnovu izmerenih koncentracija LMJ u rastvoru, poznate zapremine rastvora i mase AU:

$$q = V (C - C_0) / m \quad (4.2)$$

gde su  $C_0$  i  $C$  početna i izmerena koncentracija LMJ u rastvoru u određenom vremenskom trenutku, redom;  $V$  je zapremina rastvora;  $m$  je masa AU.

#### **4.5.2 Ispitivanje otpuštanja LMJ u fiziološkom rastvoru**

Liofilizovane čestice AU sa adsorbovanim LMJ (0,5 g) su potopljene u fiziološki rastvor (20 ml) i stavljene u vodeno kupatilo na 37 °C uz mešanje od 120 obrtaja/min. Nakon 72 h fiziološki rastvor je centrifugiran na 1000 ×g 10 min da bi se čestice AU oborile i odstranile iz rastvora. Zatim je, uz pomoć UV-vidljive spektroskopije određivano prisustvo LMJ u fiziološkom rastvoru na talasnoj dužini od 272 nm. Eksperimenti su rađeni u duplikatu.

### **4.6 Antimikrobna aktivnost**

#### **4.6.1 Optimizacija procedure određivanja antimikrobne aktivnosti**

U ispitivanjima antimikrobne aktivnosti korišćene su kompozitne A/AU čestice koje najbolje otpuštaju AU u rastvor da bi se na taj način postigla adsorpcija mikroorganizama, a zatim i dejstvo imobilisane supstance. U prvom koraku je stoga bilo potrebno odrediti broj obrtaja centrifuge koji bi istovremeno oborio čestice AU, a ne bi imao uticaj na ćelije mikroorganizama u suspenziji. Uticaj broja obrtaja od 600 ×g, predložen u literaturi (*Naka et al., 2001*), ispitivan je na ukupan broj bakterijskih ćelija u suspenziji i na ukupan broj bakterijskih ćelija u suspenziji u prisustvu čestica AU. Korišćena je Gram negativna vrsta bakterije *Escherichia coli* ATCC 25922.

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

U erlenmajer od 500 ml je sipano 30 ml sterilnog LB bujona i zatim je dodato 0,3 ml prekonoćne bakterijske suspenzije u fiziološkom rastvoru, a u drugi erlenmajer je prvo sterilno odmereno 2,4 g praha AU, a zatim dodato 30 ml sterilnog LB bujona i 0,3 ml prekonoćne bakterijske suspenzije. Početna koncentracija ćelija bakterija u oba erlenmajera je iznosila oko  $10^6$  CFU/ml. Erlenmajeri su zatim inkubirani na 37 °C u toku 24 h i u određenim vremenskim intervalima (0, 1, 3 i 24 h) medijum je sterilno uzorkovan dva puta. Prvi uzorak (1 ml) je centrifugiran na 600 ×g 10 min, da bi se odstranile čestice AU, i zasejavanje je vršeno iz supernatanta (0,1 ml), dok drugi uzorak (0,1 ml), koji je predstavljao kontrolu nije centrifugiran. Oba su zatim serijski razblažena do željene koncentracije iz kojih je po 0,1 ml pomešan sa 20 ml rastopljenog LB agara (temperatura 55 °C) i zatim razliven u Petrijeve šolje koje su inkubirane naredna 24 h na 37 °C. Nakon toga su prebrojane formirane kolonije korišćenjem brojača kolonija kako bi se odredio broj živih ćelija u suspenziji. Eksperimenti su rađeni u duplikatu i rezultati su izraženi u CFU/ml što predstavlja broj ćelija ispitivanog soja po ml.

#### **4.6.2 Određivanje minimalne baktericidne koncentracije (MBK) CaA/AU čestica sa imobilisanim PVP-I**

Minimalna baktericidna koncentracija je određena za Ca0,5/V/PVP-I čestice u kulturi Gram negativne vrste bakterije *Escherichia coli* ATCC 25922.

Aktivna bakterijska kultura je pripremljena tako što je odabrano nekoliko izolovanih kolonija, poraslih nakon 18-24 h inkubacije, i napravljena je suspenzija u fiziološkom rastvoru (10 ml) turbidnosti 0,5 prema Mek Farlandovoj (McFarland) skali koja odgovara koncentraciji ćelija bakterija od  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml iz koga su dalje pravljena razblaženja.

Kompozitne Ca<sub>0,5</sub>/V čestice sa adsorbovanim PVP-I su dobijene sterilno na prethodno opisan način (odjeljak 2.3.1). Ostavljene su da se suše na vazduhu u laminarnoj komori do konstantne mase. U svaki erlenmajer od 100 ml stavljeno je po 0,363 g, 0,726 g, 1,089 g i 1,452 g suvih čestica, dobijene sušenjem 1 g, 2 g, 3 g i 4 g vlažne mase čestica, redom. U erlenmajere je zatim dodato 10 ml sterilnog TS bujona i 0,1 ml prekonoćne bakterijske suspenzije u fiziološkom rastvoru tako da je broj bakterija u svakom iznosio oko  $10^5$  CFU/ml. Erlenmajeri su zatim inkubirani na 37 °C u toku 24 h nakon čega je medijum sterilno uzorkovan (1 ml), centrifugiran na 600 ×g 10 min da bi se odstranile čestice AU, a zatim je supernatant (0,01 ml) direktno zasejan na TS agar ploče. Ploče su zatim inkubirane 24 h na 37 °C nakon čega su kolonije prebrojane kako bi se odredio broj živih ćelija u suspenziji. Eksperiment je rađen u duplikatu.

#### **4.6.3 Ispitivanje antimikrobne aktivnosti kompozitnih A/AU čestica**

Antimikrobna aktivnost suvih kompozitnih A/AU čestica je ispitivana makrodilucionim metodom u šest eksperimentalnih serija. U prve četiri eksperimentalne serije korišćene su Ca<sub>0,5</sub>/V/PVP-I, a u petoj i šestoj Zn<sub>0,5</sub>/V/PVP-I kompozitne čestice. U prvoj seriji, antimikrobna aktivnost je ispitivana prema dva kolekcijaska bakterijska soja (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), a u drugoj, trećoj i četvrtoj seriji prema kliničkim sojevima izolovanim iz rana pacijenata i to u drugoj seriji prema MRSA, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*,

*Enterococcus faecalis* i *Candida albicans*, u trećoj prema *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterococcus faecalis*, a u četvrtoj prema bakterijskom soju MRSA. U petoj eksperimentalnoj seriji, antimikrobna aktivnosti je ispitivana prema jednom standardnom bakterijskom soju (*Escherichia coli* ATCC 25922), a u šestoj seriji prema 6 kliničkih sojeva (MRSA, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis* i *Candida albicans*) izolovanim iz rana pacijenata.

Aktivne kulture mikroorganizama su pripremljene tako što je odabrano nekoliko izolovanih kolonija, poraslih nakon 18 – 24 h inkubacije od kojih je napravljena suspenzija u fiziološkom rastvoru (10 ml) turbidnosti 0,5 prema Mek Farland skali koja odgovara koncentraciji ćelija bakterija od  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml iz koje su dalje pravljena razblaženja.

Kompozitne 0,5/V čestice su sterilno dobijene i deo čestica je ostavljen preko noći u PVP-I dok je drugi deo ostavljen u istoj količini dH<sub>2</sub>O pod istim uslovima. Čestice su zatim isprane nekoliko puta sa dH<sub>2</sub>O i ostavljene da se suše na vazduhu u laminarnoj komori pod sterilnim uslovima na sobnoj temperaturi do konstantne mase.

U svaki erlenmajer od 100 ml za ispitivanje antimikrobne aktivnosti je stavljeno po 1,452 g suvih 0,5/V/PVP-I čestica, dobijenih sušenjem 4 g vlažnih čestica. U prvoj, drugoj, petoj i šestoj eksperimentalnoj seriji, u erlenmajere je zatim dodato po 10 ml sterilnog TS bujona i 0,1 ml prekonoćne bakterijske suspenzije u fiziološkom rastvoru tako da je koncentracija ćelija mikroorganizama u svakom balonu iznosila oko  $10^5$  CFU/ml za bakterije i oko  $10^6$  CFU/ml za kvasca *Candida albicans*. U trećoj i četvrtoj eksperimentalnoj seriji, u erlenmajere je dodato po 30 ml sterilnog TS bujona i 0,3 ml prekonoćne bakterijske suspenzije u fiziološkom rastvoru tako da je koncentracija ćelija bakterija u svakom erlenmajeru u trećoj seriji iznosila oko  $10^6$  CFU/ml, a u četvrtoj oko  $10^3$  CFU/ml. Kao kontrola korišćene su CaA odnosno ZnA čestice (0,12 g) dobijene geliranjem 0,5 mas. % rastvora alginata i Ca- odnosno Zn0,5/V kompozitne čestice (1,240 g) dobijene sušenjem

rezultujućih čestica (4 g) do konstantne mase. Kao kontrola korišćen je i AU u prahu (1,2 g) dok je suspenzija mikroorganizama bila pozitivna kontrola, a sam bujon negativna kontrola. Erlenmajeri su inkubirani na 37 °C u toku 24 h. U određenim vremenskim intervalima, i to nakon 1 i 24 h u prvoj i drugoj seriji, a nakon 1, 3, 6 i 24 h u trećoj i četvrtoj seriji medijum je sterilno uzorkovan (1 ml), centrifugiran na 600 ×g 10 min da bi se odstranile čestice AU, a zatim je supernatant (0,01 ml) zasejan na TS agar ploče koje su inkubirane naredna 24 h na 37 °C. Kolonije su zatim prebrojane kako bi se odredio broj živih ćelija u suspenziji. Eksperimenti su rađeni u duplikatu i rezultati su izraženi u CFU/ml.

#### **4.6.4 Ispitivanje antimikrobne aktivnosti aktivnog uglja sa adsorbovanim LMJ**

Antimikrobna aktivnost AU sa adsorbovanim LMJ (AU/LMJ) je ispitivana prema pet rezistentnih kliničkih bakterijskih sojeva (MRSA, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* i *Enterococcus faecalis*) i jednom kliničkom soju kvasca (*Candida albicans*) izolovanim iz rana.

Aktivne kulture mikroorganizama su pripremljene tako što je odabrano nekoliko izolovanih kolonija, poraslih nakon 18 – 24 h inkubacije od kojih je napravljena suspenzija u fiziološkom rastvoru (10 ml) turbidnosti 0,5 prema Mek Farland skali koja odgovara koncentraciji ćelija bakterija od  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml iz koje su pravljena razblaženja.

U epruvete od 2 ml, koje su korišćene za ispitivanje antimikrobne aktivnosti, je stavljeno po 0,12 g AU sa adsorbovanim LMJ iz rastvora koncentracije 1 mg/ml, a zatim je dodato 0,8 ml sterilnog TS bujona i 0,1 ml prekonoćne bakterijske suspenzije u fiziološkom rastvoru tako da je koncentracija mikroorganizama u svakoj epruveti iznosila oko  $10^5$  CFU/ml za bakterije i oko  $10^6$  CFU/ml za kvasac. Kao kontrola je korišćen sam prah AU (0,12 g), pozitivna kontrola je bila sama suspenzija mikroorganizama, dok je bujon bio



negativna kontrola. Epruvete su inkubirane na 37 °C u toku 24 h nakon čega su centrifugirane na 600 ×g 10 min da bi se odstranile čestice AU. Supernatant (0,01 ml) je zasejan na TS agar ploče koje su inkubirane naredna 24 h na 37 °C, a zatim su prebrojane kolonije kako bi se odredio broj živih ćelija u suspenziji. Eksperimenti su rađeni u duplikatima i rezultati su izraženi u CFU/ml.

## **4.7 Metode karakterizacije A/AU kompozitnih čestica**

### **4.7.1 UV-vidljiva spektroskopija**

Koncentracija AU u početnim smešama, kompozitnim česticama nakon rastvaranja u 2 mas. % rastvoru Na-citrata dihidrata kao i u fiziološkom rastvoru i u TS bujonu je ispitivana UV-vidljivom spektroskopijom, pomoću *UV 3100 Mapada (Šangaj, Kina)* na talasnoj dužini od 600 nm. S obzirom da suspenzije AU u opsegu talasnih dužina od 200-1000 nm nisu pokazale specifičan apsorpcioni maksimum, izabrana je talasna dužina od 600 nm da bi se napravile reprezentativne kalibracione prave.

U cilju ispitivanja uticaja različitih medijuma na određivanje koncentraciju AU, kalibracione prave su konstruisane korišćenjem suspenzija AU poznatih koncentracija u različitim medijima, i to u dH<sub>2</sub>O, fiziološkom rastvoru i TS bujonu.

U cilju ispitivanja uticaja Na-alginata u početnim smešama kao i uticaja geliranja i rastvaranja kompozitnih hidrogelova u rastvoru 2 mas. % Na-citrata dihidrata na koncentraciju AU, ispitane su smeše finalnih A/AU koncentracija 0,5/1, 0,5/20, 2/1 i 2/20 kao i suspenzije rastvorenih kompozitnih diskova u 2 mas.% rastvoru Na-citrata dihidrata dobijenih iz tih navedenih smeša. Takođe, ispitane su suspenzije AU poznatih koncentracija u 2 mas. % rastvoru Na-citrata dihidrata.

Kalibracione prave su u svim slučajevima konstruisane na isti način tj. napravljene su suspenzije koncentracije 0,1 mas.% AU (*engl. stock*, radna suspenzija). Konkretno, AU u prahu je suspendovan u odgovarajućem medijumu (dH<sub>2</sub>O, fiziološki rastvor, TS bujon, Na-citrat dihidrat), a takođe su napravljena razblaženja početnih smeša poznatih koncentracija odnosno suspenzija rastvorenih diskova dobijenih iz tih smeša. Iz radnih suspenzija su zatim pravljena dvostruka razblaženja čije su apsorbance očitavane spektrofotometrijski na 600 nm, s tim što je od svake vrednosti apsorbance oduzeta vrednost apsorbance dobijene za slepu probu tj dH<sub>2</sub>O, fiziološki rastvor, TS bujon, 2 mas. % rastvor Na-citrata dihidrata, Na-alginatne rastvore odgovarajućih koncentracija kao i rastvorene alginatne hidrogelove odgovarajućih koncentracija u 2 mas. % rastvoru Na-citrata dihidrata.

UV-vidljivom spektroskopijom je takođe ispitivana koncentracija PVP-I na talasnoj dužini od 351 nm kao i koncentracija LMJ na talasnoj dužini od 272 nm u rastvoru nakon adsorpcije, kao i u fiziološkom rastvoru.

#### **4.7.2 Plamena atomska apsorpciona spektrofotometrija (FAAS)**

Koncentracija slobodnih Zn<sup>2+</sup> u fiziološkom rastvoru i TS bujonu je određena direktnim merenjem, dok je ukupni sadržaj Zn<sup>2+</sup> u česticama (ZnA, Zn0,5/V i Zn0,5/V/PVP-I) određen nakon njihovog rastvaranja u 2 mas. % rastvoru Na-citrata dihidrata pomoću uređaja *Perkin Elmer 3100* (*Perkin Elmer, SAD*). Neposredno pre određivanja koncentracije Zn<sup>2+</sup> primenom FAAS, svaki uzorak je dodatno razblažen sa destilovanom vodom i dodata je koncentrovana azotna kiselina (65 mas.%) tako da u finalnom razblaženju koncentracija bude 2 mas. %.

#### **4.7.3 Optička mikroskopija i određivanje prečnika čestica**

Mikroskopske slike čestica su napravljene pomoću optičkog mikroskopa (*Olympus CX41RF, Tokio, Japan*). Prečnik čestica je određen pomoću kamere *HDR-CX210 (Sony, Japan)*. Konkretno, čestice su fotografisane u Petri šolji koja je bila postavljena na milimetarski papir. Srednji prečnik je zatim izračunat na osnovu merenja najmanje 20 mikročestica pomoću programa za analizu slike „*CellA*” (*Olympus, Tokio, Japan*).

#### **4.7.4 Skenirajuća elektronska mikroskopija sa emisijom polja elektrona (FE-SEM)**

Morfologija suvih kompozitnih CaA/AU (1,5/M, 0,5/V i 0,5/V/PVP-I) i ZnA/AU čestica (0,5/V i 0,5/V/PVP-I) ispitivana je kvalitativnom metodom FE-SEM. Pored toga, analizirane su i CaA (1,5 mas.%) i ZnA (0,5 mas.%) čestice kao i AU u prahu. Čestice su presečene na pola, a zatim su preseci kao i čestice AU, naparavani u vakumu tj. prekriveni tankim slojem (15 – 25 nm) zlata i ispitivani pomoću uređaja *MIRA 3 XMU (Tescan USA Inc., SAD)*.

#### **4.7.5 Skenirajuća elektronska mikroskopija sa energetsko disperznom spektroskopijom (SEM/EDS)**

Ispitivanje hemijskog sastava suvih presečenih kompozitnih Ca<sub>0,5</sub>/H/PVP-I i Zn<sub>0,5</sub>/H/PVP-I čestica je izvršeno pomoću *Jeol JSM 5800 (Tokio, Japan)* sa EDS detektorom.

#### 4.7.6 Određivanje specifične površine i poroznosti

Specifična površina uzoraka određivana je pomoću instrumenta *ASAP 2020* (*Micromeritics, SAD*). Ispitane su suve kompozitne CaA/AU (0,5/M, 0,5/V, 1,5/M i 1,5/V) i ZnA/AU (0,5/V i 0,5/V/PVP-I) čestice, kao i ZnA (0,5 mas. %) čestice i AU u prahu.

Pre ispitivanja, uzorci su degasirani na 105 °C, 10 h pod sniženim pritiskom. Specifična površina uzoraka je izračunata prema Bruner-Emet-Teler (Brunauer-Emmet-Teller, BET) metodi iz linearnog dela adsorpcionih izoterma. Iz desorpcionog dela izoterma, prema Baret-Džojner-Halendovoj (Barrett-Joyner-Halenda) metodi izračunata je zapremina mezopora ( $V_{\text{mezo}}$ ), dok je zapremina mikropora ( $V_{\text{mikro}}$ ), izračunata iz  $\alpha$ -S dela. Ukupna zapremina pora ( $V_{\text{total}}$ ) je izračunata pri uslovima  $p/p^{\circ} = 0.998$ , gde  $p$  i  $p^{\circ}$  predstavljaju ravnotežni i saturacioni pritisak gasa na temperaturi adsorpcije.

#### 4.7.7 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)

Spektri kompozitnih CaA/AU (0,5/M, 0,5/V, 0,5/V/PVP-I, 1,5/M i 1,5/V) i ZnA/AU (0,5/V i 0,5/V/PVP-I) čestica, zatim Ca-alginatnih čestica (0,5 mas. % i 1,5 mas. %) i Zn-alginatnih čestica (0,5 mas. %), kao i prahova AU i PVP-I određeni su na FT-IR spektrometru *BOMEM (Hartmann & Braun, Frankfurt, Nemačka)* u opsegu od 400 – 4000  $\text{cm}^{-1}$  sa rezolucijom od 4  $\text{cm}^{-1}$  na sobnoj temperaturi. Uzorci su sprašeni sa suvim KBr do maksimalne veličine čestica od 0,25  $\mu\text{m}$ . Sprašena smeša je presovana ručnom presom u trajanju od najmanje 15 s, kako bi se dobila tableta prečnika 7 mm.

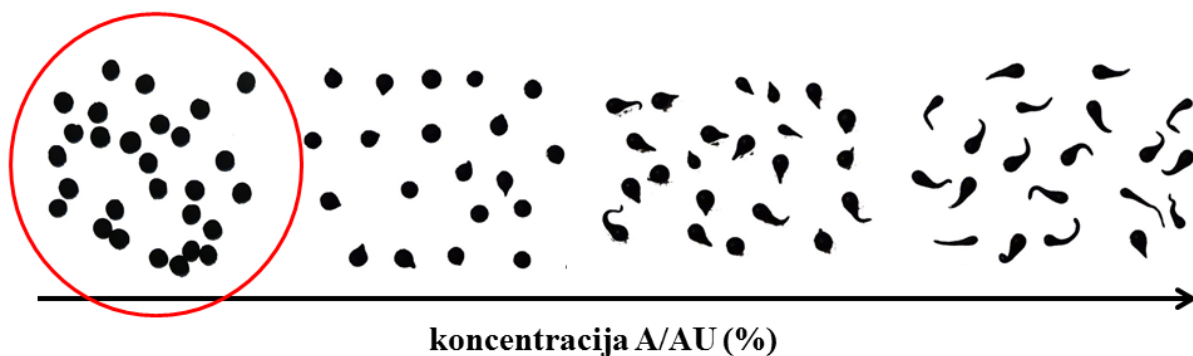
## **5. REZULTATI**

Istraživanja u ovom radu su obuhvatala razvoj novih kompozita na bazi Ca- i Zn-alginatnih hidrogelova sa sadržanim česticama AU. Pri tome, čestice AU treba da imaju dvojaku funkciju, predstavljaju aktivnu supstancu koja se oslobađa iz alginatnog matriksa prilikom kontakta sa fiziološkim fluidima, a i potencijalni nosač za terapijski aktivne supstance adsorbovane na njih. Istraživanja su obuhvatala optimizaciju procesa dobijanja kompozita u cilju identifikacije kompozita sa najboljim profilom kinetike otpuštanja čestica AU, ispitivanje mogućnosti adsorpcije dve različite terapijski aktivne supstance i sveobuhvatnu karakterizaciju dobijenih kompozita uključujući i *in vitro* ispitivanje funkcionalnosti u pogledu antimikrobne aktivnosti.

### **5.1 Dobijanje kalcijum-alginatnih hidrogelova sa sadržanim česticama aktivnog uglja**

#### **5.1.1 Optimizacija sastava početnih smeša**

Smeše Na-alginata i AU različitih koncentracija su, metodom ekstruzije, ukapavane u rastvor za geliranje (1,5 mas. %  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) sa ciljem identifikacije opsega koncentracija radi dobijanja kompozitnih čestica sferičnog oblika (slika 5.1).

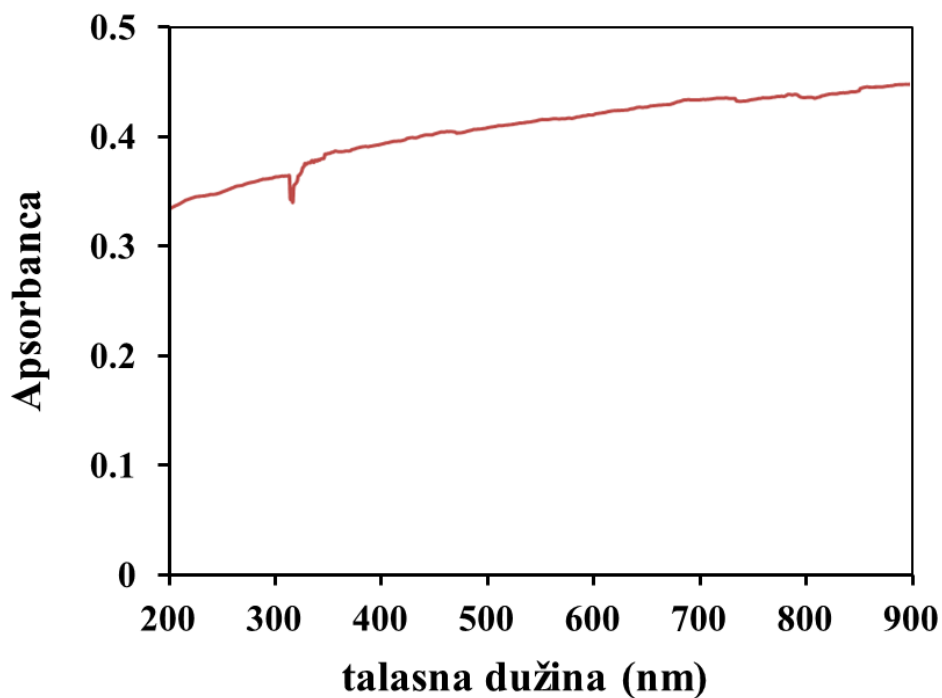


Slika 5.1 Različiti oblici kompozitnih čestica dobijeni iz smeša A/AU sa povećanjem koncentracija alginata i/ili AU

S obzirom da su smeše A/AU, sa porastom koncentracije i AU i alginata, bile sve gušće i viskoznije, za ukapavanje je izabrana igla prečnika 16 G. Gornja granica koncentracije alginata je određena kao 2 mas. % pošto su smeše većih koncentracija alginata već i pri dodavanju male količine AU bile veoma guste i nije ih bilo moguće potisnuti kroz iglu. Donja granica koncentracije alginata u smešama je određena kao 0,5 mas. % pošto su se čestice, pravljene iz smeša manjih koncentracija, raspadale u rastvoru za geliranje. Gornja koncentracija AU je određena kao 20 mas. % s obzirom da je prilikom ekstruzije i geliranja smeša alginata koncentracije 0,5 mas. % i koncentracija AU većih od 20 mas. % dolazilo do značajnih gubitaka sadržaja AU ispuštanjem u rastvor za geliranje. Izuzetak je predstavljala smeša sa 2 mas. % alginata u kojoj je gornja koncentracija AU morala da se smanji na 15 mas. % u cilju dobijanja sferičnih čestica. Donja koncentracija AU nije bila limitirajući faktor ni u pogledu dobijanja sferičnih čestica niti u pogledu geliranja i postavljena je na 1 mas. %.

### 5.1.2 Konstrukcija kalibracione prave za određivanje koncentracije aktivnog uglja

UV-vidljivi spektri suspenzija AU nisu pokazali apsorpcioni maksimum na talasnim dužinama od 200-900 nm (slika 5.2) pa je za spektrofotometrijsko određivanje koncentracija AU uzeta talasna dužina od 600 nm.



Slika 5.2. Apsorpcioni spektar AU

Radi pouzdanog određivanja koncentracija AU u različitim rastvorima kao i u alginatnim smešama i rastvorima konstruisane su kalibracione prave u datim medijumima (dH<sub>2</sub>O, fiziološki rastvor, TS bujon, 2 mas. % rastvor Na-citrata dihidrata kao i smeše Na-alginata).

### 5.1.2.1 Konstrukcija kalibracione prave za određivanje koncentracije aktivnog uglja u smešama sa Na-alginatom

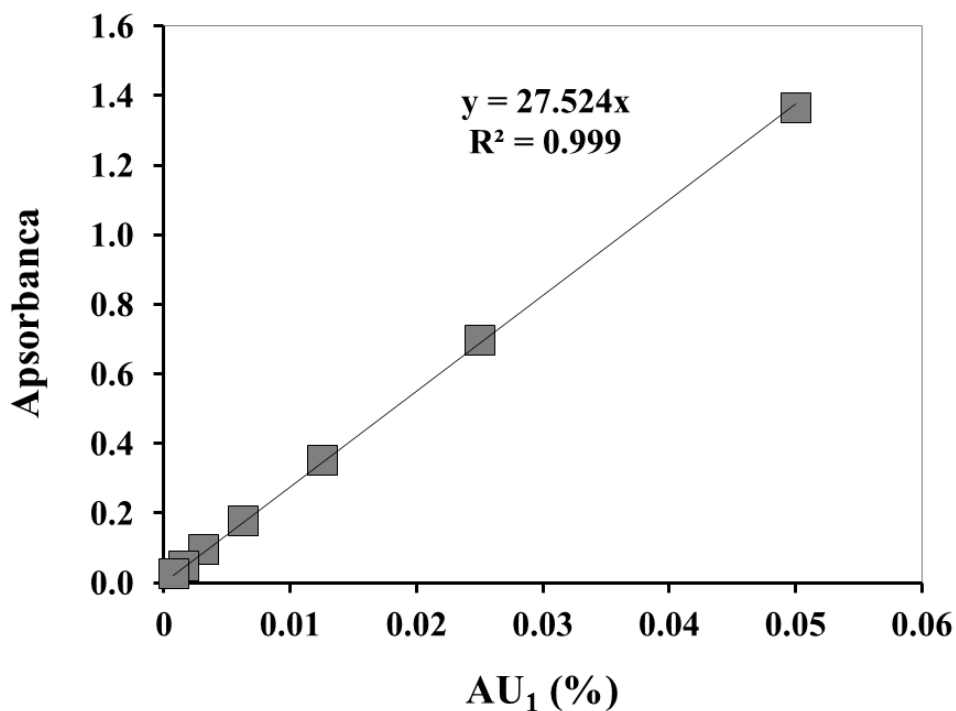
Za konstrukciju kalibracione prave korišćene su smeše koncentracija: a) 0,5 mas. % A i 1 mas. % AU, b) 0,5 mas. % A i 20 mas. % AU, c) 2 mas. % A i 1 mas. % AU, d) 2 mas. % A i 20 mas. % AU.

Sve četiri smeše su prvo razblažene destilovanom vodom do koncentracije od 0,1 mas. % AU (radna suspenzija), iz koje su zatim pravljena razblaženja čije su vrednosti apsorbanci očitavane spektrofotometrijski na 600 nm, s tim što je od svake vrednosti apsorbance oduzeta vrednost slepe probe tj. Na-alginatne rastvore odgovarajućih koncentracija. Crtanjem zavisnosti apsorbance od koncentracije AU konstruisane su kalibracione prave za sve četiri smeše. S obzirom da su standardne devijacije apsorbanci za navedene smeše u svim tačkama bile manje od 5 %, određene su srednje vrednosti i konstruisana je zajednička kalibraciona prava prikazana na slici 5.3.

Na osnovu dobijene linearne zavisnosti ( $R^2 = 0,999$ ), izvedena je jednačina za izračunavanje nepoznate koncentracije AU u smešama sa Na-alginatom ( $AU_1$ ) u zavisnosti od očitane apsorbance na talasnoj dužini od 600 nm ( $Abs$ ).

$$AC_1 = 3,63 \times 10^{-2} \times Abs \quad (5.1)$$



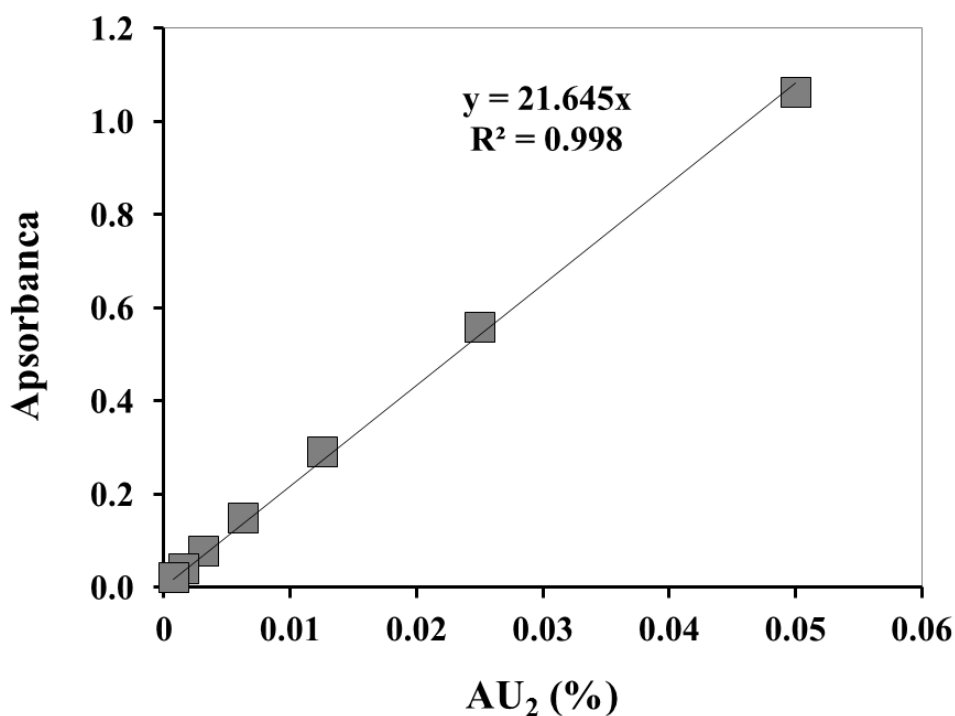


Slika 5.3. Kalibraciona prava zavisnosti apsorbance na 600 nm od koncentracije AU u smešama sa Na-alginatom različitih koncentracija (0,5 – 2 mas. %), AU<sub>1</sub>; eksperimentalni podaci su srednje vrednosti minimum 12 merenja

#### 5.1.2.2 Konstrukcija kalibracionih pravih za određivanje koncentracije aktivnog uglja u fiziološkom rastvoru, TS bujonu i rastvorima kompozitnih hidrogelova

Za konstrukciju kalibracionih pravih u različitim vodenim medijumima korišćene su suspenzije AU poznatih koncentracija. U prvoj seriji, korišćene su suspenzije AU u dH<sub>2</sub>O, u drugoj u fiziološkom rastvoru, u trećoj u TS bujonu, a u četvrtoj u 2 mas. % rastvoru Na-citrata dihidrata. U petoj seriji, korišćene su suspenzije rastvorenih kompozitnih diskova različitih koncentracija u 2 mas. % rastvoru Na-citrata dihidrata, i to diskova dobijenih iz smeša A/AU koncentracija (mas. %): 0,5/1, 0,5/20, 2/1 i 2/20.

Napravljene su suspenzije koncentracije 0,1 mas. % AU (radne suspenzije) u različitim medijumima, iz kojih su zatim pravljena razblaženja čije su vrednosti apsorbance očitavane spektrofotometrijski na 600 nm, s tim što je od svake vrednosti apsorbance oduzeta vrednost apsorbance odgovarajuće slepe probe. U petoj eksperimentalnoj seriji slepa proba su bili rastvoreni Na-alginatni diskovi odgovarajućih koncentracija u 2 mas. % rastvoru Na-citrata dihidrata. Crtanjem zavisnosti apsorbance od koncentracije AU konstruisane su kalibracione prave za sve navedene suspenzije. S obzirom da su standardne devijacije apsorbance za navedene serije bile zanemarljive ( $SD < 5\%$ ), konstruisana je zajednička kalibraciona prava prikazana na slici 5.4.



Slika 5.4. Kalibraciona prava zavisnosti apsorbance na 600 nm od koncentracije AU u različitim vodenim medijumima, AU<sub>2</sub>; eksperimentalni podaci su srednje vrednosti minimum 24 merenja

Na osnovu dobijene linearne zavisnosti ( $R^2 = 0,998$ ), izvedena je jednačina za izračunavanje nepoznate koncentracije aktivnog uglja u različitim vodenim medijumima ( $AU_2$ ) u zavisnosti od očitane apsorbance ( $Abs$ ) na talasnoj dužini od 600 nm:

$$AC_2 = 4,62 \times 10^{-2} \times Abs \quad (5.2)$$

### 5.1.3 Optimizacija koncentracije kalcijumovih katjona u rastvoru za geliranje

U cilju dobijanja kompozitnih čestica koje su slabo gelirane, ali iz kojih se čestice AU prilikom procesa geliranja ne otpuštaju u većoj meri određena je donja granica koncentracije kalcijumovih katjona u rastvoru za geliranje. Ispitivane su četiri koncentracije  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  i to 1,5 mas. %, 0,9 mas. %, 0,2 mas. % i 0,09 mas. %. Čestice su pravljene iz smeše A/AU koncentracije 2 mas. % alginata i 1 mas. % AU. U svaki pojedinačni rastvor za geliranje istisnuto je po 10 ml smeše kroz iglu 16 G, a čestice su zatim ostavljene da geliraju još 30 min. Nakon toga su ocedene, blago osušene filter papirom, izmerene, a zatim i rastvorene u 2 mas. % rastvoru Na-citrata dihidrata nakon čega je određivana koncentracija AU u dobijenim česticama ( $AU_2$ ) spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 600 nm primenom jednačine (5.2). Rezultati su prikazani u tabeli 5.1.

Dobijeni rezultati koncentracije AU u česticama su bili u skladu i sa vizuelnim zapažanjima tj. rastvor za geliranje koncentracije 0,09 mas. % je bio izrazito crn dok su rastvori 1,5 mas. % i 0,9 mas. % ostali providni. Iz tabele 4.1 može se takođe zapaziti da je došlo do povećanja koncentracija AU u česticama tokom geliranja u ovim rastvorima što je očekivano usled sinerezisa odnosno skupljanja hidrogela tokom geliranja (*Velings i Mestdagh, 1995*). Slične koncentracije u česticama dobijenih iz rastvora 1,5 i 0,9 mas. %

CaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O ukazuje na isti procenat zadržavanja AU unutar čestica tako da je za dalji rad izabran rastvor 0,9 mas. % CaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O.

Tabela 5.1. Koncentracije AU u česticama (AU<sub>č</sub>) dobijenih geliranjem u rastvorima CaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O različitih koncentracija

CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O (mas. %)	AU <sub>č</sub> (mas. %)
1,5	3,1 ± 0,2
0,9	2,9 ± 0,1
0,2	2,2 ± 0,1
0,09	1,1 ± 0,0

#### 5.1.4 Dobijanje kompozitnih kalcijum-alginatnih hidrogelova u obliku čestica

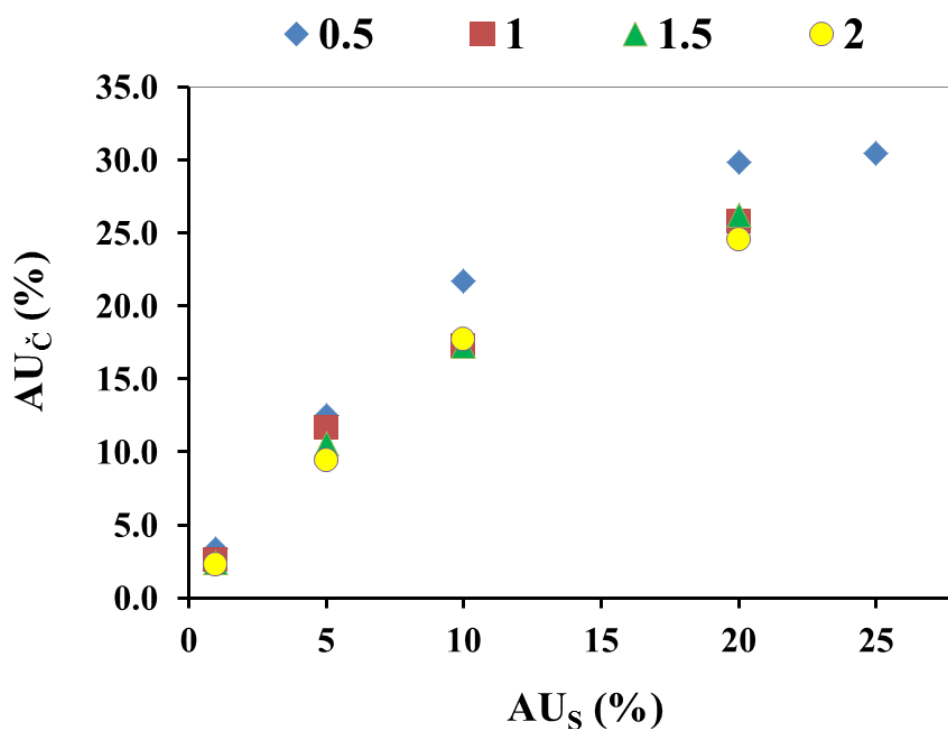
Kompozitne CaA/AU čestice su uspešno dobijene procesom ekstruzije serije smeša Na-alginatnih rastvora i AU različitih koncentracija datih u tabeli 4.2. Dobijene čestice su bile sferičnog oblika (prečnik u opsegu 2,5 – 4 mm), koji su zadržale i nakon sušenja (prečnik u opsegu 1 – 3,5 mm) (tabela 5.2).

Tabela 5.2. Vrednosti prečnika vlažnih ( $d_v$ ) i suvih ( $d_s$ ) kompozitnih CaA/AU čestica

CaA/AU		vlažne čestice	suve čestice	$d_s/d_v$
		$d_v$ (mm)	$d_s$ (mm)	(%)
0,5/	M	$2,8 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2$	45,9
	S	$3,3 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,2$	76,9
	V	$3,9 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,3$	87,0
1/	M	$3,4 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,2$	64,1
	S	$3,6 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,2$	72,6
	V	$3,6 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,1$	88,3
1,5/	M	$3,3 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$	61,3
	S	$3,5 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,1$	73,4
	V	$3,6 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,1$	78,6
2/	M	$3,3 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	63,4
	S	$3,4 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,1$	73,5
	V	$3,5 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,1$	78,8

Može se uočiti da koncentracija alginata nema uticaja na prečnik vlažnih čestica dok sa porastom koncentracije AU dolazi do povećanja prečnika vlažnih, a zatim i suvih čestica. Pored toga, koncentracija AU ima značajan uticaj na kontrakciju tokom sušenja i što je veća koncentracija AU manje je skupljanje hidrogela odnosno prečnik suvih čestica je približniji prečniku vlažnih čestica.

Pomoću UV-vidljive spektroskopije je, nakon rastvaranja u rastvoru Na-citrata određivana koncentracija AU u dobijenim česticama (slika 5.5). Dobijene čestice su sadržale nekoliko puta (1,5 - 3) veću koncentraciju AU u poređenju sa inicijalnim smešama. Ovi rezultati su, takođe, potvrdili da koncentracija AU ima značajan uticaj na kontrakciju gela pri čemu je kontrakcija gela u toku geliranja bila obrnuto proporcionalna koncentraciji AU.

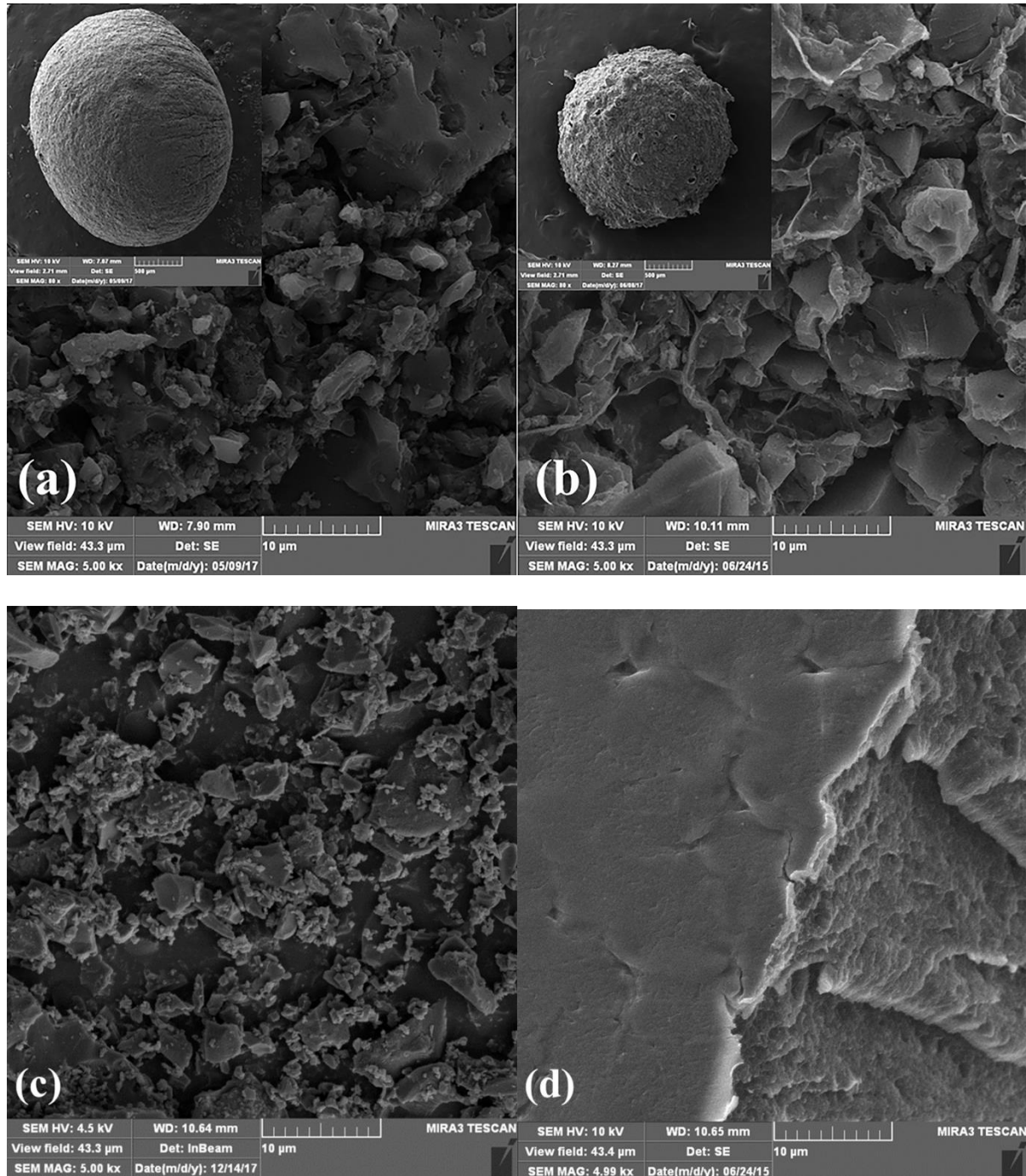


Slika 5.5. Koncentracije AU u česticama,  $AU_{\check{c}}$ , kao funkcija nominalne koncentracije AU u odgovarajućim početnim A/AU smešama,  $AU_s$ ; A/AU čestice su prikazane u četiri grupe (0,5, 1, 1,5 i 2) u odnosu na sadržaj alginata (mas. %); eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 6 merenja, SD ( $\leq 10\%$ ) su izostavljene kako bi podaci bili uočljiviji

Četiri reprezentativne grupe čestica (0,5/M, 0,5/V, 1,5/M i 1,5/V, tabela 4.2) su dalje ispitane primenom FE-SEM, BET i FT-IR analiza. Ove grupe čestica su izabrane da bi se ispitaio uticaj najnižih i najviših koncentracija AU (1 i 5 vs. 20, tabela 4.2) mas. % na teksturalne, hemijske i strukturne karakteristike kompozitnih CaA/AU čestica.

Na slici 5.6 prikazane su morfologije spoljašnjih površina i poprečnih preseka 0,5/V i 1,5/M kompozitnih CaA/AU čestica kao i CaA čestica (1,5 mas. %) i morfologija AU u prahu. Spoljašnje površine ispitivanih kompozitnih čestica (0,5/V i 1,5/M) izgledaju grubo i neravno za razliku od potpuno glatke spoljašnje površine CaA čestice (slika 5.6, insert a, b, d, redom). Poprečni preseki kompozitnih čestica su po izgledu slični (slika 5.6 a i b) i mogu se

uočiti čestice AU različite veličine slične inicijalnim česticama AU u prahu prikazanim na slici 5.6 c. Za razliku od njih, na poprečnom preseku CaA čestice se vidi uniforman alginatni matriks (slika 5.6d).



Slika 5.6. FE-SEM mikrofotografije spoljašnjih površina (inserti) i poprečnih preseka suvih čestica: (a) 0.5/V; (b) 1.5/M; (c) AU; (d) 1,5 mas. % CaA; (razmernik: 500  $\mu\text{m}$  (inserti) i 10  $\mu\text{m}$ )

Teksturalne karakteristike odabranih čestica su određene pomoću BET metode (tabela 5.3), a kao kontrola je korišćen AU u prahu.

Tabela 5.3. Teksturalne karakteristike 0,5/M, 0,5/V, 1,5/M i 1,5/V CaA/AU čestica, i AU praha

	$S_p$ ( $m^2/g$ )	$V_{tot}$ ( $cm^3/g$ )	$V_{mezo}$ ( $cm^3/g$ )	$V_{mikro}$ ( $cm^3/g$ )	$D_{sr}$ (nm)
AU prah	1109.05	0.6303	0.2779	0.5194	3.01
0,5/M	645.68	0.3644	0.1536	0.3028	2.96
0,5/V	1058.64	0.6064	0.2651	0.4979	2.29
1,5/M	826.48	0.4710	0.2932	0.4126	2.63
1,5/V	1040.78	0.5919	0.2595	0.4905	2.97

$S_p$ -ukupna specifična površina;  $V_{tot}$ -ukupna zapremina pora;  $V_{mezo}$ -zapremina mezopora;

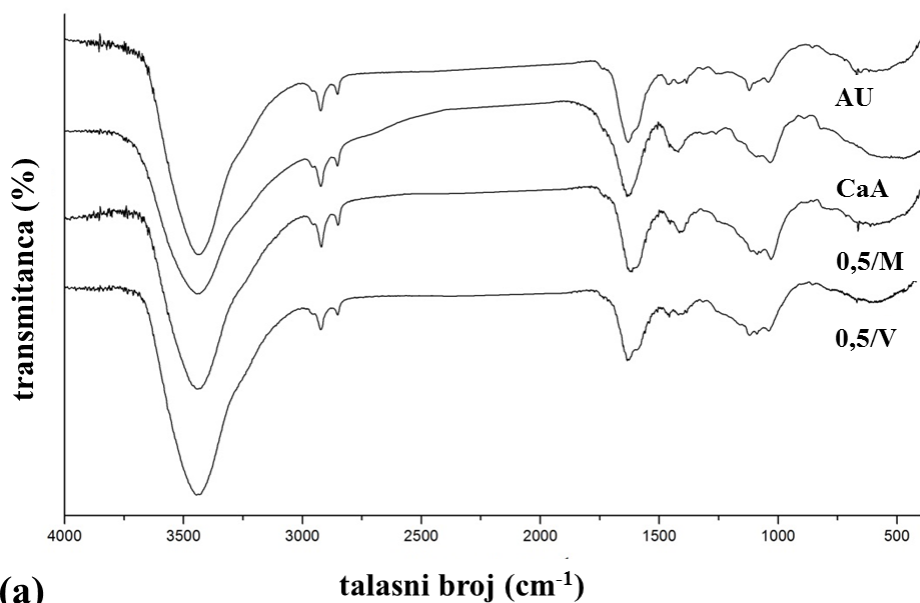
$V_{mikro}$ -zapremina mikropora;  $D_{sr}$ -srednji prečnik pora

Rezultati su pokazali da AU u prahu ima najveću ukupnu specifičnu površinu ( $S_p$ ), što je i očekivano. Iz dobijenih rezultata se može uočiti da kompozitne čestice sa velikom (0,5/V i 1,5/V) i malom (0,5/M i 1,5/M) koncentracijom AU prate isti trend. Konkretno, specifična površina ( $S_p$ ) i zapremina ( $V_{tot}$ ) su u slučaju kompozitnih čestica sa velikom koncentracijom AU blago redukovane (oko 5 % u oba slučaja) u poređenju sa prahom AU, dok je u slučaju čestica sa malom koncentracijom AU redukcija značajnija i iznosi oko 40 % i 20 %, redom u odnosu na prah AU. Ovi rezultati govore u prilog da dolazi do blokiranja pora AU unutar kompozitnih čestica usled taloženja alginatnih lanaca, koje je najizraženije u slučaju čestica sa malom koncentracijom AU, i to posebno u slučaju 0,5/M dok je kod čestica sa većom koncentracijom alginata (1,5/M) taj efekat manje izražen najverovatnije zbog viskoznije početne smeše koja teže ulazi u pore AU. U slučaju čestica sa velikom koncentracijom AU,

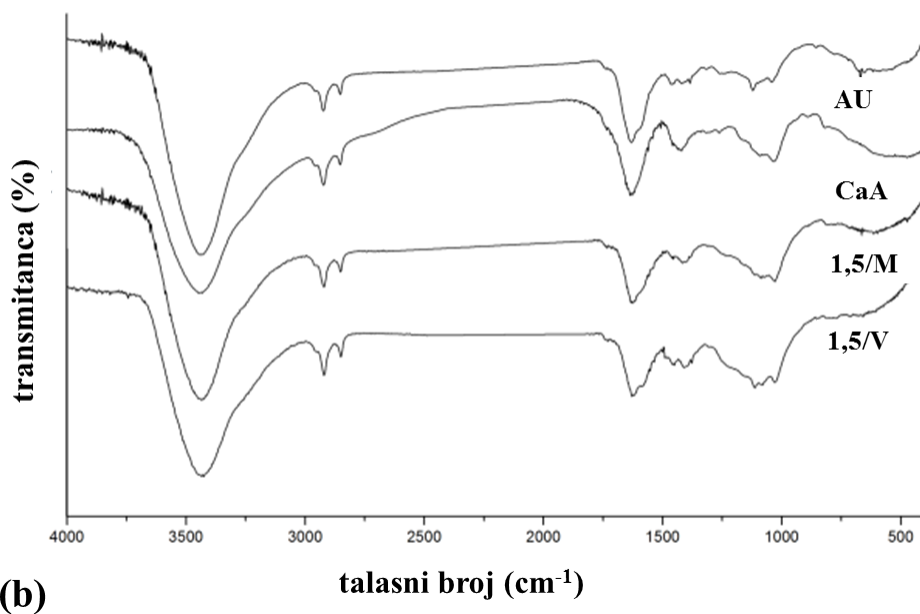


0,5/V i 1,5/V, taj efekat postaje zanemarljiv, što je i očekivano s obzirom na ogromnu specifičnu površinu samih čestica AU, tako da se može zaključiti da je poroznost AU unutar kompozitnih čestica sa velikom koncentracijom AU u potpunosti očuvana.

Na slici 5.7 su prikazani FT-IR spektri odabranih kompozitnih čestica, CaA čestica i AU.



(a)



(b)

Slika 5.7. FT-IR spektri (a) AU, CaA i kompozitnih 0,5/M i 0,5/V CaA/AU čestica; (b) AU, CaA i kompozitnih 1,5/M i 1,5/V CaA/AU čestica

FT-IR spektri AU kao i alginata pokazuju odgovarajuće karakteristične pikove. Široka traka na  $\sim 3440\text{ cm}^{-1}$ , u oba uzorka, odgovara O-H vibracijama savijanja, koje potiču uglavnom od alkoholnih (kod alginata) ili fenolnih (kod AU) grupa kao i od karboksilnih grupa, dok dupla traka na  $2925\text{ cm}^{-1}$  i  $2850\text{ cm}^{-1}$  potiče od C-H grupa. Slaba traka na  $1740\text{ cm}^{-1}$ , u spektru AU, odgovara karbonilnim grupama ketona i aldehida, karboksilnim grupama ili njihovim anhidridima (koje sve mogu biti prisutne na AU) dok trake na  $1630\text{ cm}^{-1}$  i  $1600\text{ cm}^{-1}$  mogu biti povezane sa aromatičnim C=C vezama ili anjonskom formom karboksilnih grupa. U spektru alginata postoji samo jedna traka na  $1628\text{ cm}^{-1}$ , koja potiče od asimetričnih vibracija savijanja karboksilnih anjona. Vibracije savijanja karboksilnih kiselina se, kod alginata, vide kao slabo „rame“ trake na  $1743\text{ cm}^{-1}$  (asimetrične vibracije) i kao trake blizu  $1400\text{ cm}^{-1}$  (simetrične vibracije), koje se preklapaju sa trakom na  $1418\text{ cm}^{-1}$  (C-O-H savijanje). Kod AU postoji, takođe, relativno slaba, ali dobro razvijena traka na  $1465\text{ cm}^{-1}$  karakteristična za aromatične C=C veze. U regionu „otiska prsta“ (*fingerprint region*,  $\sim 1200\text{ cm}^{-1} - 800\text{ cm}^{-1}$ ) i AU i alginat imaju ne-karakteristične trake koje potiču uglavnom od C-O vibracija, ali njihov intenzitet se razlikuje. Naime, najizraženija traka u spektru AU u ovom regionu nalazi se na  $1120\text{ cm}^{-1}$ , dok se u spektru alginata pojavljuje na  $1030\text{ cm}^{-1}$ .

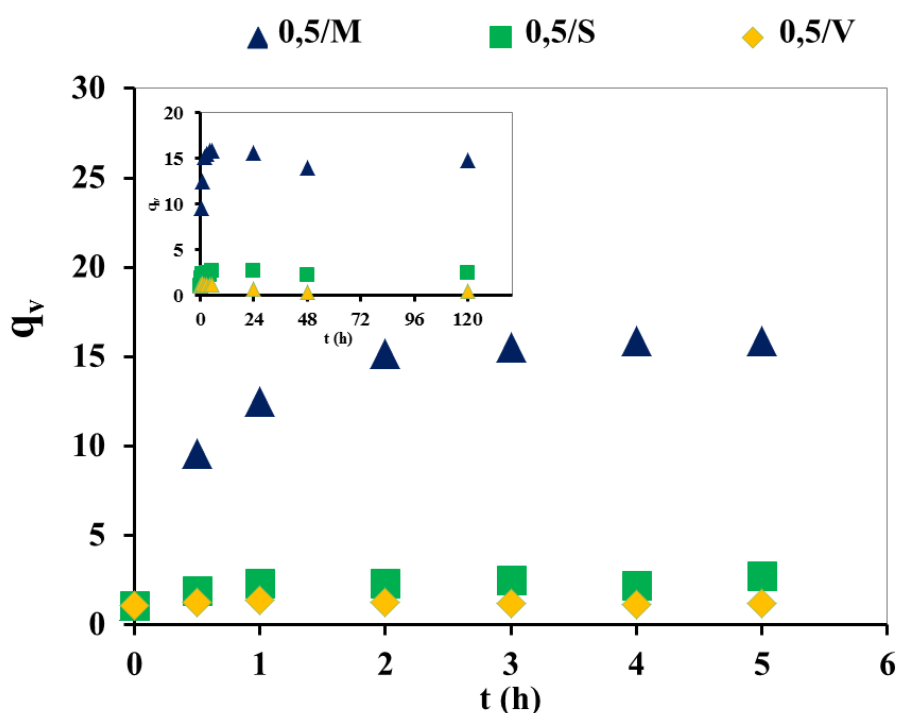
U spektrima ispitivanih CaA/AU čestica, relativni odnos intenziteta ove dve trake odgovara koncentracijama alginata i AU. Konkretno, spektar 0,5/M uglavnom liči na spektar alginata, dok na prisustvo AU pokazuju trake na  $1600\text{ cm}^{-1}$  (prisutna kao „rame“ trake na  $1628\text{ cm}^{-1}$ ) i  $1465\text{ cm}^{-1}$  (poreklom od C=C aromatičnih veza), kao i blago povećanje intenziteta trake na  $1120\text{ cm}^{-1}$ . U spektru 0.5/V čestica, navedene trake su još izraženije tako da je spektar ovih čestica sličniji spektru AU. Sličan trend se može uočiti i u FT-IR spektrima 1.5/M i 1.5/V CaA/C čestica.

### 5.1.5 Dobijanje kalcijum-alginatnih kompozita u obliku diskova

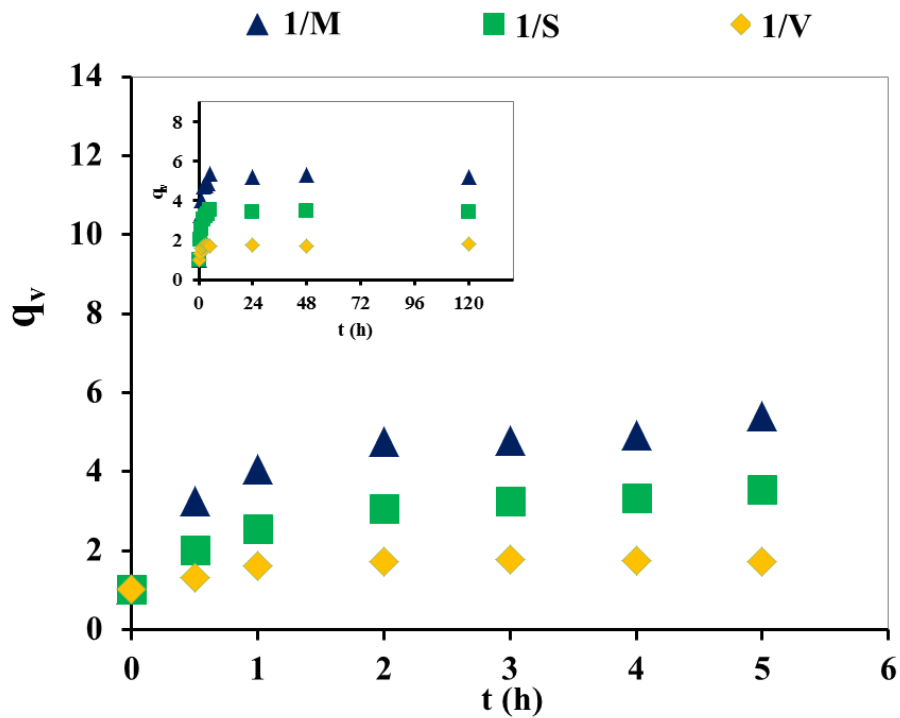
Kompozitni Ca-alginatni diskovi su uspešno dobijeni razlivanjem smeša alginata i AU različitih koncentracija (tabeli 4.2) u posude sa 12 bunarića, a zatim su rastvarani u rastvoru Na-citrata i dalje korišćeni za određivanje kalibracionih pravih.

### 5.1.6 Ispitivanje bubrenja i rehidracije suvih kompozitnih čestica

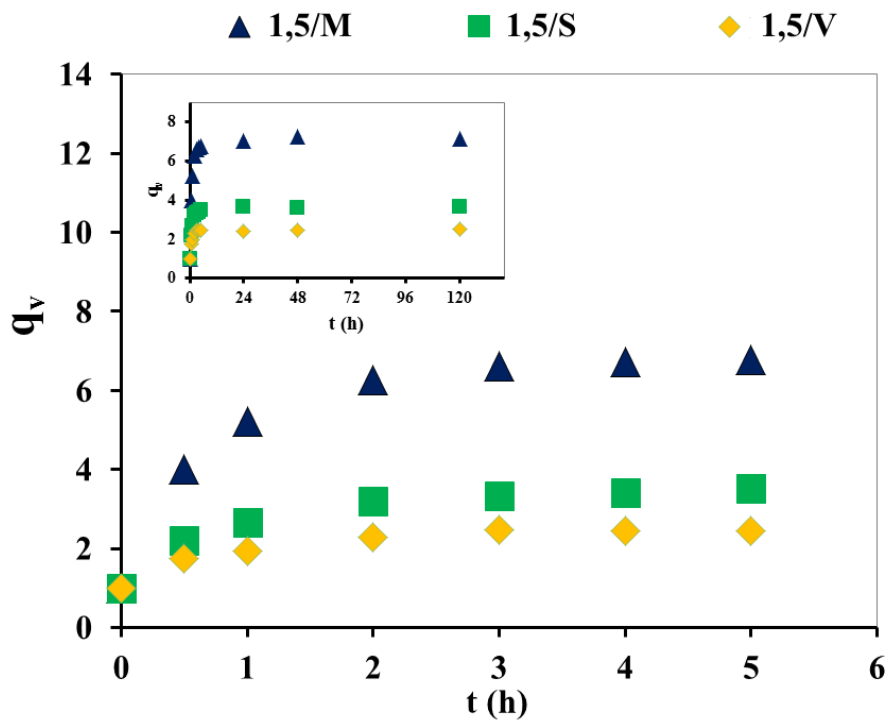
Ispitivano je bubrenje i rehidracija suvih CaA/AU čestica iz svih 12 grupa (tabela 4.2) u fiziološkom rastvoru na 37 °C tokom perioda od 5 dana u uslovima sa mešanjem. Zapreminski stepeni bubrenja,  $q_v$ , izracunati na osnovu jednačine (4.1) su prikazani na slikama 5.8-5.11.



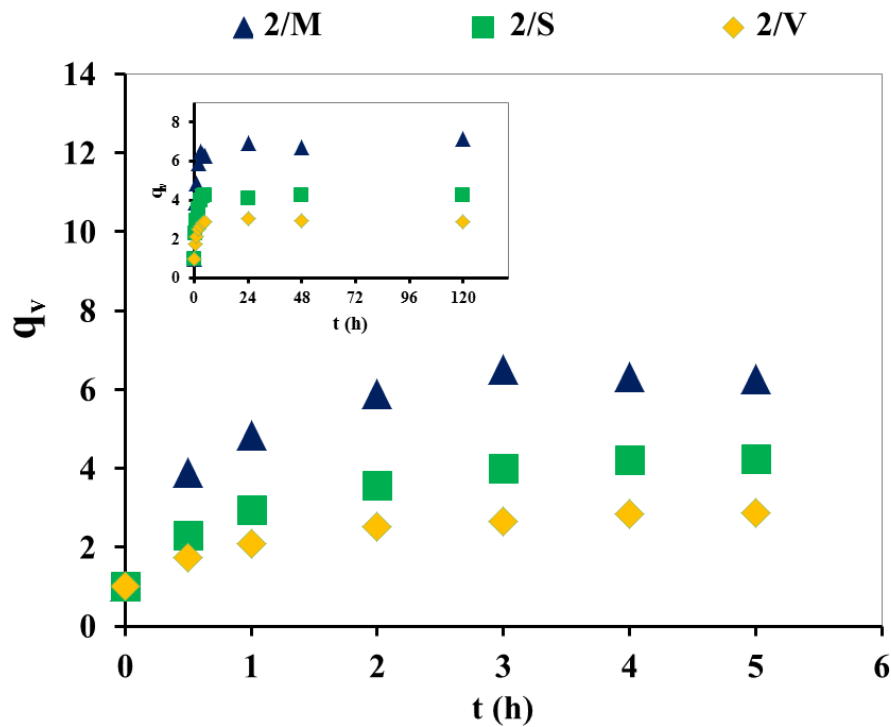
Slika 5.8. Zapreminski stepeni bubrenja,  $q_v$ , suvih 0.5/M, 0.5/S i 0.5/V CaA/AU čestica tokom perioda od 5 dana (insert) i tokom inicijalnih 6 h



Slika 5.9. Zapreminski stepeni bubrenja,  $q_v$ , suvih 1/M, 1/S i 1/V CaA/AU čestica tokom perioda od 5 dana (insert) i tokom inicijalnih 6 h



Slika 5.10. Zapreminski stepeni bubrenja,  $q_v$ , suvih 1,5/M, 1,5/S i 1,5/V CaA/AU čestica tokom perioda od 5 dana (insert) i tokom inicijalnih 6 h

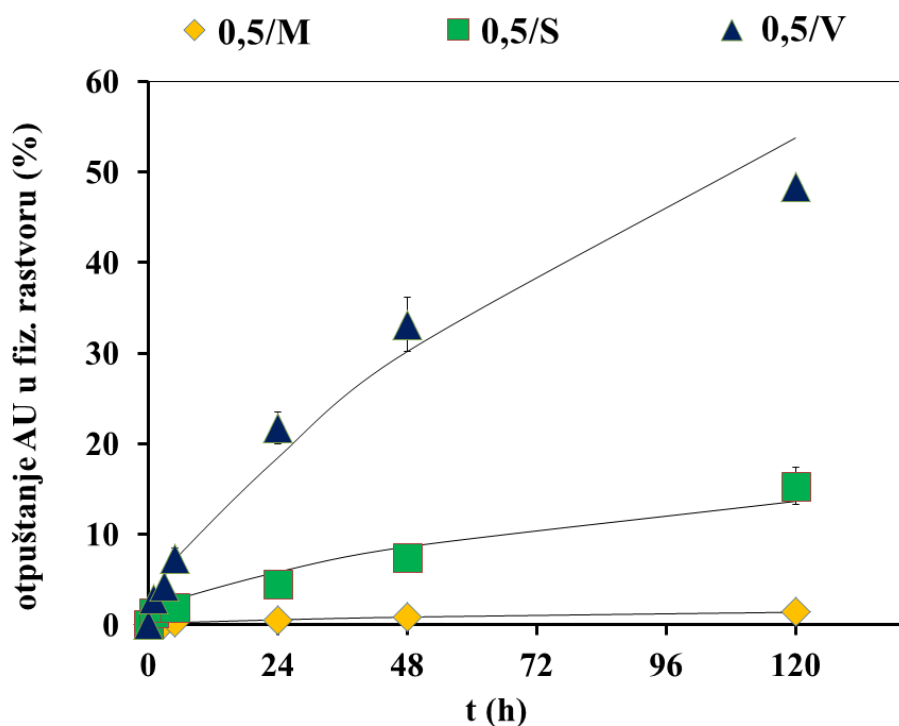


Slika 5.11. Zapreminski stepeni bubrenja,  $q_v$ , suvih 2/M, 2/S i 2/V CaA/AU čestica tokom perioda od 5 dana (insert) i tokom inicijalnih 6 h

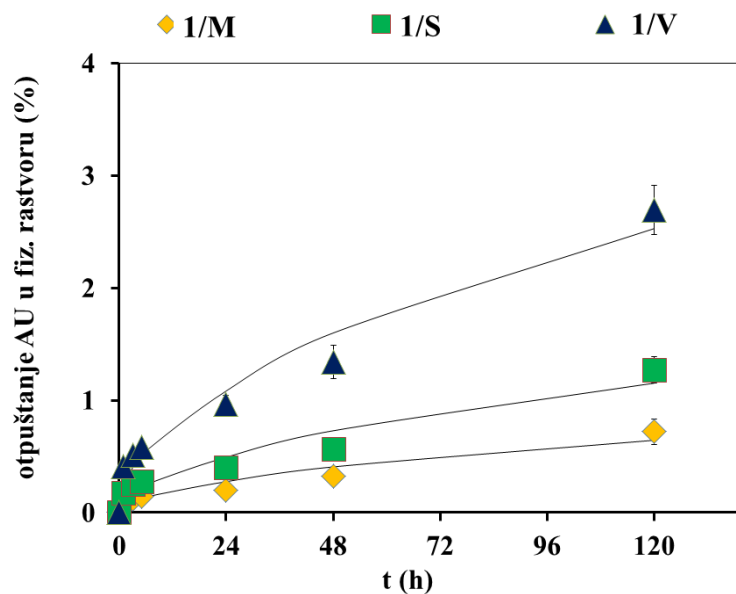
Sve čestice su nabubrele i povećale svoje prečnike, a ekvilibrijum su dostigle u roku od prva 3 h. Ako se posmatraju čestice sa istom koncentracijom alginata, očigledno je da postoji isti trend tj. najviše bubre čestice sa najmanjim sadržajem AU dok najmanje bubre one sa najvećim sadržajem AU (slike 5.8-5.11). Upoređujući sve čestice ukupno, najviše su nabubrile one koje imaju najmanji sadržaj AU 1 mas. % i najmanju koncentraciju alginata 0,5 mas. % (0,5/M). Upoređujući čestice sa najvećim sadržajem AU (označene V) najslabije su nabubrile 0,5/V, što je i očekivano, s obzirom da imaju najmanji procenat alginata.

### 5.1.7 Ispitivanje kinetike otpuštanja čestica aktivnog uglja u fiziološkom rastvoru

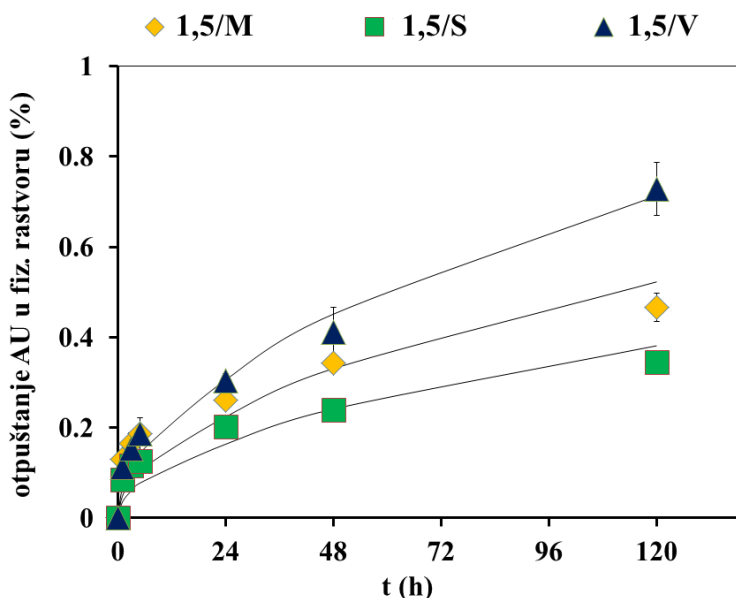
Kinetika otpuštanja čestica AU iz CaA/AU čestica je praćena u fiziološkom rastvoru tokom 5 dana pomoću UV-vidljive spektroskopije (slike 5.12-5.15).



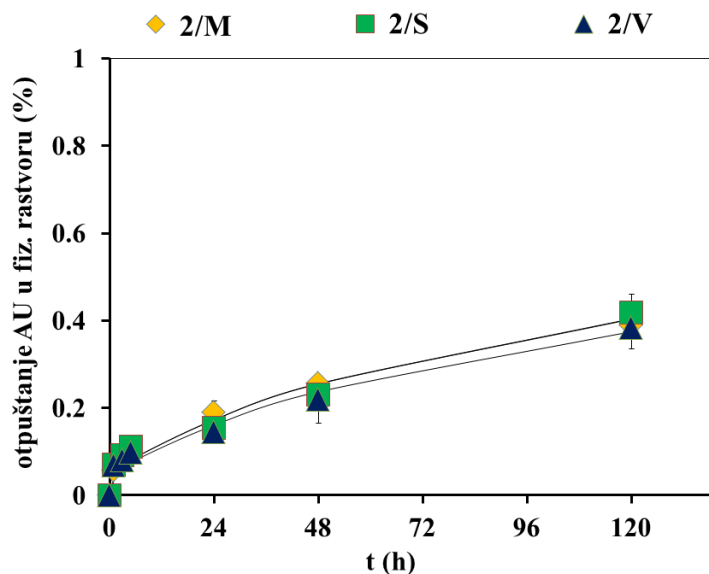
Slika 5.12. Otpuštanje AU iz kompozitnih 0.5/M, 0.5/S, 0.5/V CaA/AU čestica normalizovano u odnosu na početni sadržaj AU tokom perioda od 5 dana u fiziološkom rastvoru; prikazani su eksperimentalni podaci (simboli) i predviđanja modela unutrašnje difuzije osim za Ca0.5/V čestice kod kojih su prikazana predviđanja Korsmejer-Pepasovog model (linije); eksperimentalni podaci su prikazani kao srednje vrednosti 3 merenja  $\pm$  SD



Slika 5.13. Otpuštanje AU iz kompozitnih 1/M, 1/S, 1/V CaA/AU čestica normalizovano u odnosu na početni sadržaj AU tokom perioda od 5 dana u fiziološkom rastvoru; prikazani su eksperimentalni podaci (simboli) i predviđanja modela unutrašnje difuzije (linije); eksperimentalni podaci su prikazani kao srednje vrednosti 3 merenja  $\pm$  SD



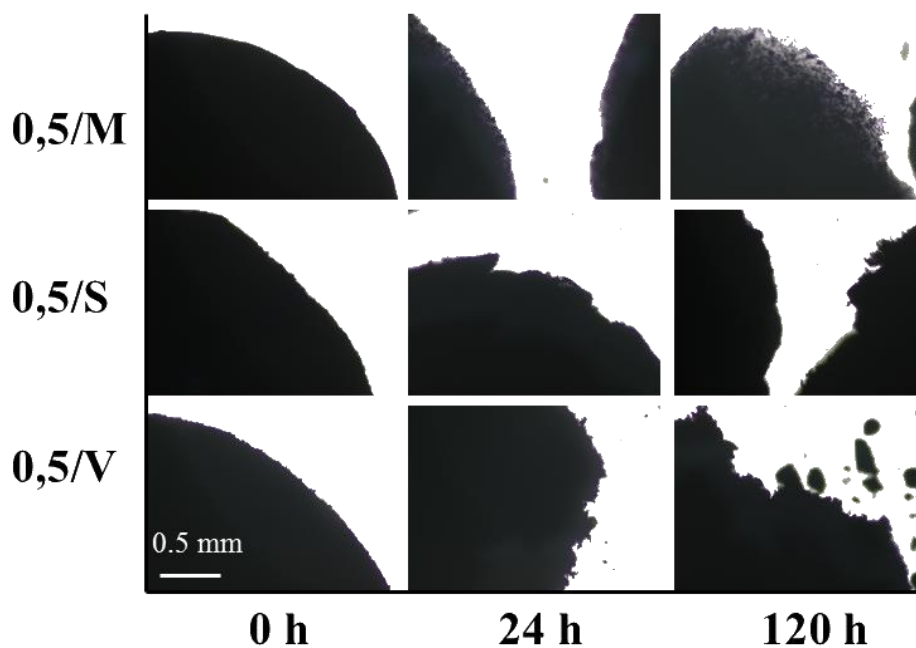
Slika 5.14. Otpuštanje AU iz kompozitnih 1,5/M, 1,5/S, 1,5/V CaA/AU čestica normalizovano u odnosu na početni sadržaj AU tokom perioda od 5 dana u fiziološkom rastvoru; prikazani su eksperimentalni podaci (simboli) i predviđanja modela unutrašnje difuzije (linije); eksperimentalni podaci su prikazani kao srednje vrednosti 3 merenja  $\pm$  SD



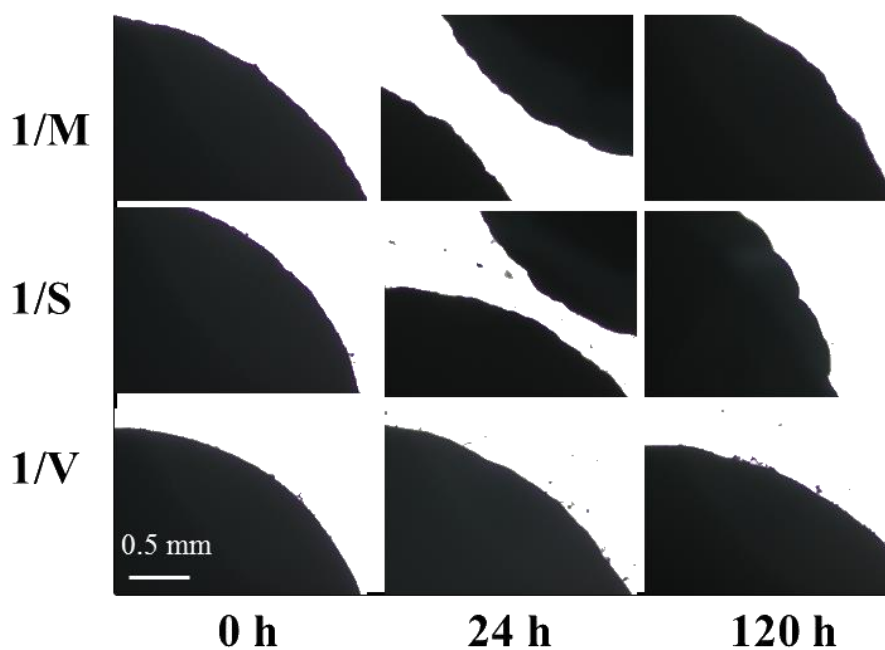
Slika 5.15. Otpuštanje AU iz kompozitnih 2/M, 2/S, 2/V CaA/AU čestica normalizovano u odnosu na početni sadržaj AU tokom perioda od 5 dana u fiziološkom rastvoru; prikazani su eksperimentalni podaci (simboli) i predviđanja modela unutrašnje difuzije (linije); eksperimentalni podaci su prikazani kao srednje vrednosti 3 merenja  $\pm$  SD

Može se uočiti da su čestice 0,5/V pokazale najbolji profil otpuštanja AU u fiziološkom rastvoru s obzirom da su tokom perioda od pet dana otpustile oko 50 % ukupnog sadržaja AU (slika 5.12). Čestice 0,5/S su tokom istog perioda otpustile oko 15 % AU dok je otpuštanje svih ostalih formulacija praktično zanemarljivo i iznosi  $< 3$  % ukupnog sadržaja AU. Rezultati kinetike otpuštanja su u skladu sa izgledom površina čestica slikanim tokom trajanja eksperimenta (slika 5.16-5-18).

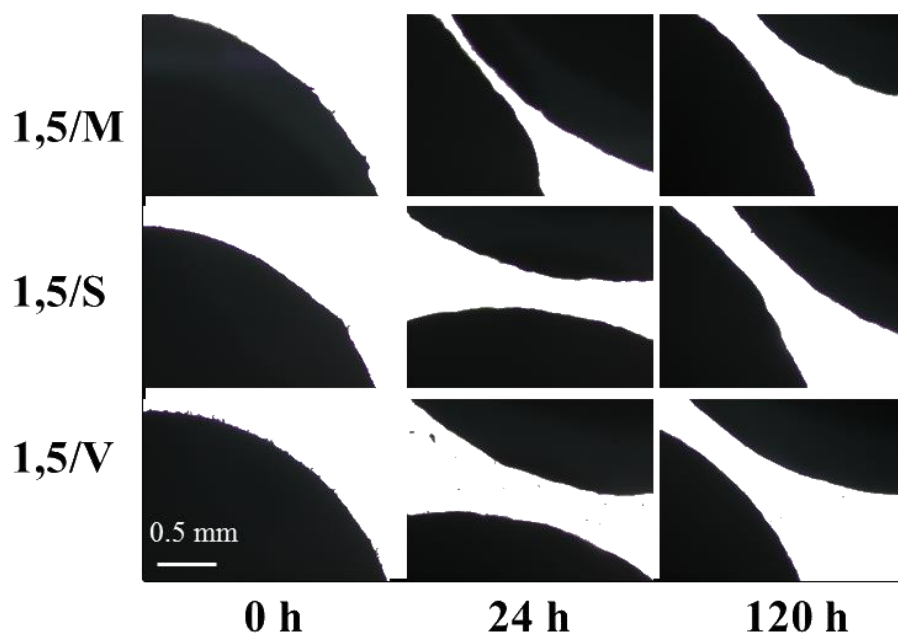




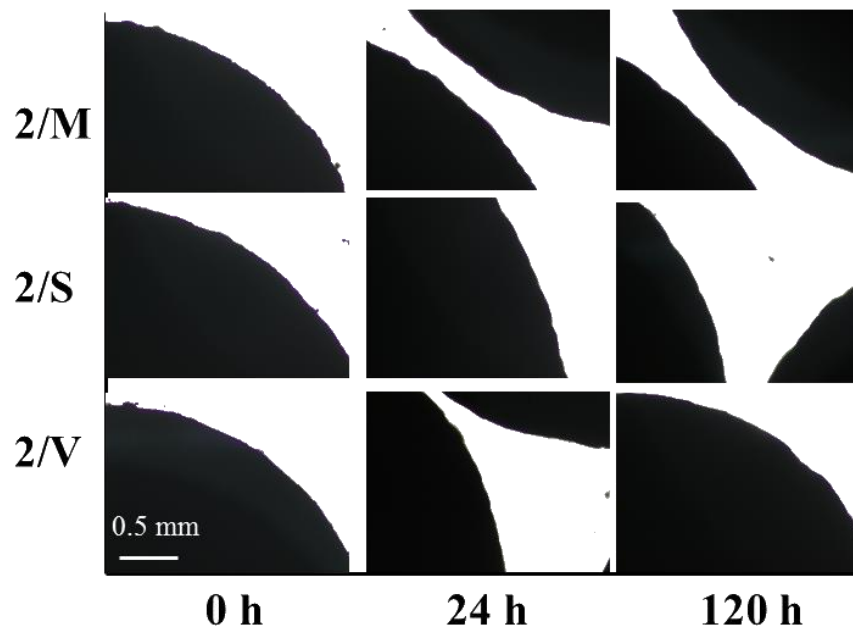
Slika 5.16. Optičke mikrofotografije površina 0,5/M, 0,5/S i 0,5/V CaA/AU čestica tokom trajanja eksperimenta (razmernik: 0.5 mm)



Slika 5.17. Optičke mikrofotografije površina 1/M, 1/S i 1/V CaA/AU čestica tokom trajanja eksperimenta (razmernik: 0.5 mm)



Slika 5.18. Optičke mikrofotografije površina 1,5/M, 1,5/S i 1,5/V CaA/AU čestica tokom trajanja eksperimenta (razmernik: 0.5 mm)



Slika 5.19. Optičke mikrofotografije površina 2/M, 2/S i 2/V CaA/AU čestica tokom trajanja eksperimenta (razmernik: 0.5 mm)

Podaci dobijeni na osnovu praćenja otpuštanja AU iz kompozitnih CaA/AU čestica analizirani su primenom kinetičkih modela u cilju definisanja mehanizma otpuštanja AU. Primenjeni su sledeći matematički modeli, i to kinetika nultog reda, model unutrašnje difuzije i Korsmejer-Pepasov model, čiji su matematički izrazi dati u poglavlju 2.6.2. Model kinetike nultog reda nije uspešno opisao podatke otpuštanja AU. Korsmejer-Pepasov model je uspešno opisao kinetiku otpuštanja AU iz čestica dobijenih iz smeše sa 0,5 mas. % alginata (slika 5-11). Pri tome su eksponenti  $n$  u ovom modelu iznosili 0,53 i 0,51 za 0,5/M i 0,5/S čestice, redom, što govori u prilog da je mehanizam otpuštanja iz ovih čestica Fikova difuzija. Za formulaciju 0,5/V, eksponent otpuštanja je iznosio 0,63, što govori u prilog da je u slučaju ovih čestica mehanizam otpuštanja AU iz alginatnog matriksa uključuje pored difuzije i eroziju što je potvrđeno i vizuelno (slika 5.16). Takođe, merenjem vrednosti prečnika, utvrđeno je da je jedino u slučaju ove grupe čestica prečnik varirao tokom pet dana u fiziološkom rastvoru. Konkretno, tokom prvog sata čestice su malo nabubrile (sa  $3.4 \pm 0.1$  mm na  $3.6 \pm 0.1$  mm u prečniku), ali je prečnik, nakon nekoliko sati usled otpuštanja AU, počeo da se smanjuje i nakon 5 dana je iznosio oko 2,6 mm. Sve ostale formulacije čestica su nabubrile u toku prva 3 h i prečnik je ostao konstantan tokom svih 5 dana. U slučaju ostalih grupa čestica eksponent Korsmejer-Pepasovog modela je bio van granica ( $n < 0,5$  za sfere) stoga je na rezultate otpuštanja AU na te grupe CaA/AU čestica primenjen difuzioni model koji je pokazao visok stepen korelacije (slika 5.13-5.15). Prividni koeficijenti difuzije AU se kreću u opsegu od  $10^{-11}$ - $10^{-14}$  m<sup>2</sup>/s (tabela 5.4) i opadaju sa povećanjem koncentracije alginata dok rastu sa povećanjem koncentracije AU što je i očekivano.

Tabela 5.4. Vrednosti prividnog koeficijenta difuzije,  $D$

formulacije	$D$ (m <sup>2</sup> /s)	formulacije	$D$ (m <sup>2</sup> /s)
0.5/M	3.80E-13	1.5/M	7.55E-14
0.5/S	3.98E-11	1.5/S	4.02E-14
0.5/V	-	1.5/V	1.33E-13
1/M	1.09E-13	2/M	4.72E-14
1/S	3.67E-13	2/S	4.99E-14
1/V	1.68E-12	2/V	3.88E-14

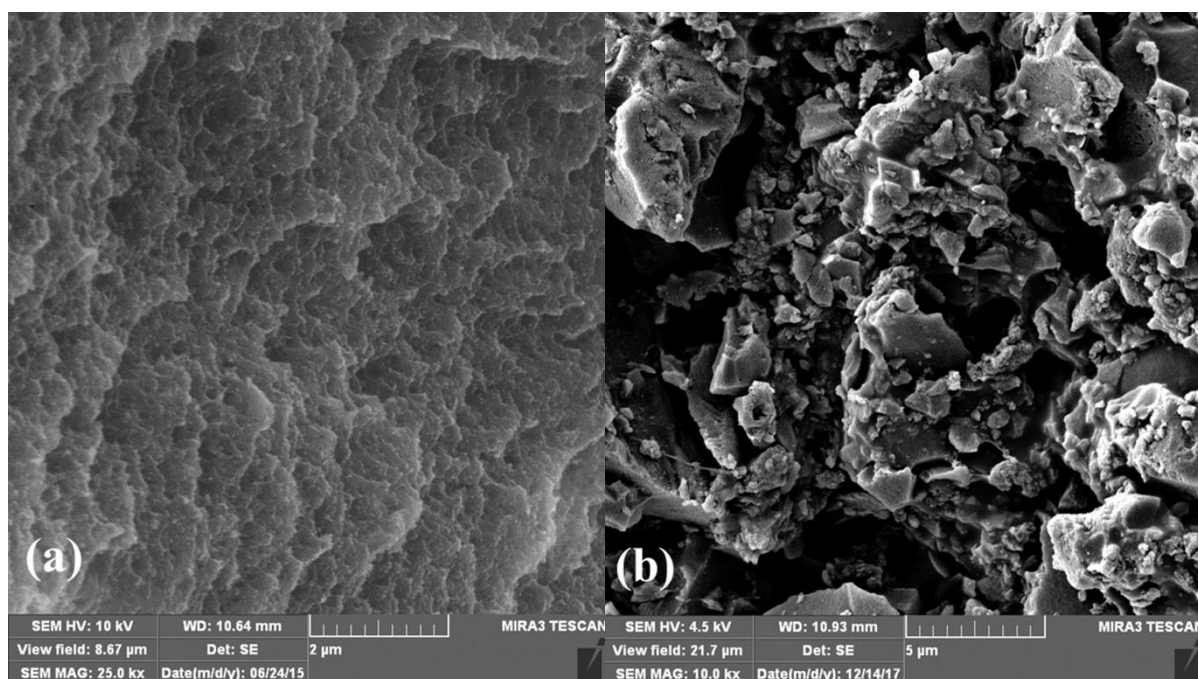
## 5.2 Dobijanje cink-alginatnih hidrogelova sa sadržanim česticama aktivnog uglja

### 5.2.1 Dobijanje kompozitnih cink-alginatnih hidrogelova u obliku čestica

Kompozitne ZnA/AU čestice su uspešno dobijene procesom ekstruzije smeše 0,5 mas. % rastvora Na-alginata i 20 mas. % AU. Dobijene čestice su bile sferične prečnika  $3.9 \pm 0.1$  mm, a nakon sušenja na vazduhu na sobnoj temperaturi do konstantne mase čestice su zadržale približno sferičan oblik sa prečnikom  $3.4 \pm 0.1$  mm.

U dobijenim česticama je uz pomoć UV-vidljive spektroskopije, nakon rastvaranja u Na-citratu, određena koncentracija AU od  $30,0 \pm 1,9$  mas. %. Povećanje koncentracije AU tokom geliranja alginata je očekivano kao i u slučaju CaA/AU čestica gde je za istu grupu čestica 0,5/V dobijena slična koncentracija AU ( $30 \pm 2,5$  %, slika 5.5)

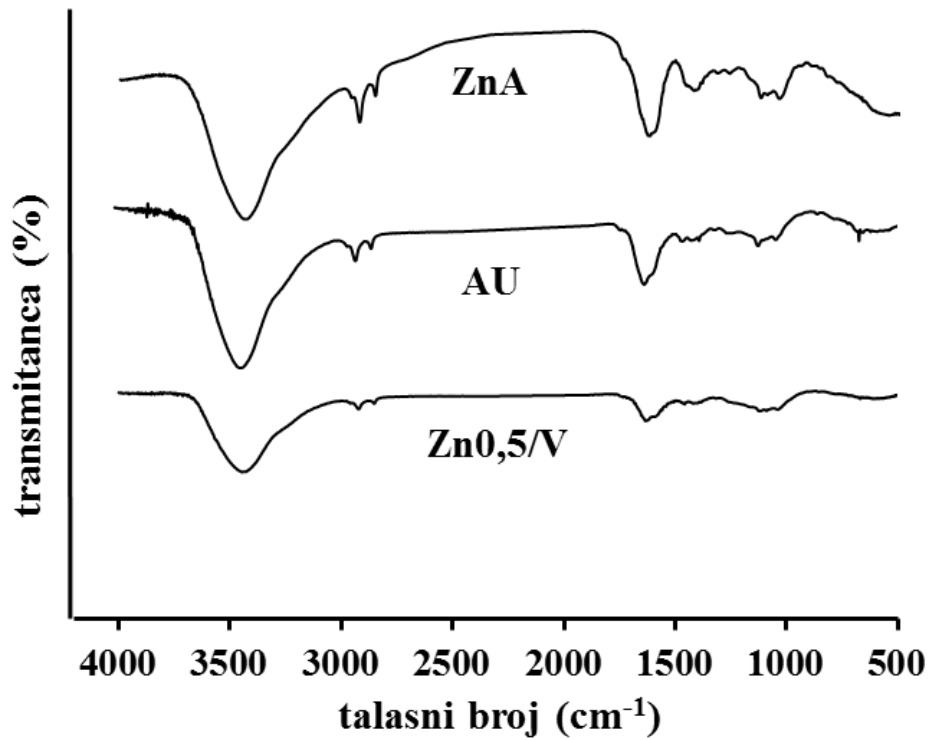
Na slikama 5.20 i 5.21 su prikazane FE-SEM mikrofotografije i FT-IR spektri, redom, ZnA i Zn0,5/V čestica, kao i AU u prahu.



Slika 5.20. FE-SEM mikrofotografije poprečnih preseka suvih čestica: (a) ZnA; (b) Zn<sub>0,5</sub>/V; (razmernik: 5 µm)

Morfologija poprečnog preseka kompozitnih Zn<sub>0,5</sub>/V čestica je slična kao i kod ispitivanih CaA/AU čestica, što je i očekivano. Konkretno, vidi se gruba struktura (slika 5.20b) sa vidljivim AU česticama sličnim AU u prahu (slika 5.6c) za razliku od uniformnog alginatnog matriksa ZnA čestica (slika 5.20a).

FT-IR spektri AU i alginata imaju najjače izražene apsorpcione trake slično pozicionirane iako su hemijski veoma različiti, i već su detaljno opisani u poglavlju 5.1.4. Kao i u slučaju CaA/AU čestica sa visokom koncentracijom AU (0,5/V i 1,5/V), spektar Zn<sub>0,5</sub>/V čestica uglavnom liči na spektar AU, što je i očekivano. Prisustvo alginata u česticama, vidi se samo u regionu „otiska prsta“ na osnovu trake na 1030 cm<sup>-1</sup> koja je izraženija u kompozitnim česticama nego u samom AU. Kod Zn<sub>0,5</sub>/V čestica, intenziteti ove trake i trake na 1120 cm<sup>-1</sup> su skoro potpuno isti dok je njihov relativni odnos različit i u spektru alginata i u spektru AU.



Slika 5.21. FT-IR spektri ZnA čestica, AU i Zn<sub>0,5</sub>/V kompozitnih čestica

Teksturalne karakteristike kompozitnih Zn<sub>0,5</sub>/V čestica određene su BET metodom (tabela 5.5).

Tabela 5.5. Teksturalne karakteristike kompozitnih Zn<sub>0,5</sub>/V čestica i AU u prahu

	$S_p$ (m <sup>2</sup> /g)	$V_{tot}$ (cm <sup>3</sup> /g)	$V_{mezo}$ (cm <sup>3</sup> /g)	$V_{mikro}$ (cm <sup>3</sup> /g)	$D_{sr}$ (nm)
AU prah	1109,05	0,6303	0,2779	0,5194	3,01
Zn <sub>0,5</sub> /V	1009,6	0,5687	0,2446	0,4738	2,94

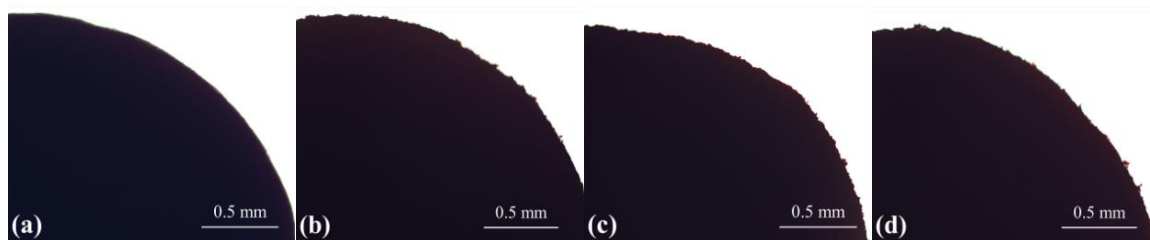
$S_p$ -ukupna specifična površina;  $V_{tot}$ -ukupna zapremina pora;  $V_{mezo}$ -zapremina mezopora;

$V_{mikro}$ -zapremina mikropora;  $D_{sr}$ -srednji prečnik pora.

Teksturalne karakteristike kompozitnih Zn0,5/V čestica su slične kao i kod 0,5/V i 1,5/V CaA/AU čestica. Konkretno, ukupna specifična površina ( $S_p$ ) kao i ukupna zapremina pora ( $V_{tot}$ ) su blago snižene u poređenju sa samim AU (za oko 10 %). Izmereni srednji prečnik pora  $D_{sr}$  govori u prilog da je, i u slučaju Zn0,5/V kao i CaA/AU čestica sa visokom koncentracijom AU, poroznost AU unutar samih čestica očuvana (2,94 nm u česticama vs. 3,01 nm u AU u prahu).

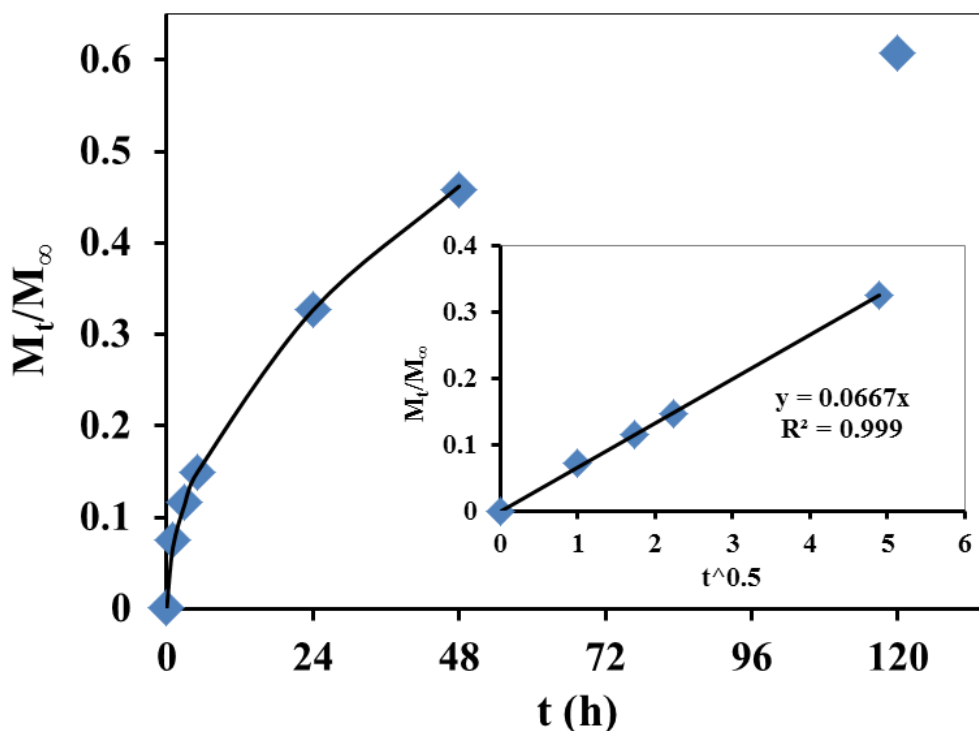
### 5.2.2 Ispitivanje kinetike otpuštanja čestica aktivnog uglja u fiziološkom rastvoru

Kinetika otpuštanja čestica AU iz Zn0,5/V čestica je praćena u fiziološkom rastvoru pomoću UV-vidljive spektroskopije. Prečnik čestica je varirao tokom vremena, ali su one zadržale sferični oblik. Konkretno, tokom prvog sata u fiziološkom rastvoru došlo je do blagog bubrenja (sa  $3.4 \pm 0.1$  mm na  $3.6 \pm 0.1$  mm u prečniku), ali nakon 7 h prečnik čestica je počeo da se smanjuje usled otpuštanja AU i nakon 5 dana je iznosio oko 2,6 mm. Ipak površina čestica je ostala prilično očuvana bez vidljivih erozija (slika 5.22) za razliku od Ca0,5/V kod kojih su erozije bile vidljive već nakon 24 h (slika 5.16). Ipak i u ovom slučaju je površina čestica bila vidljivo grublja u odnosu na površinu suvih čestica (slika 5.22).



Slika 5.22. Optičke mikrofotografije površina kompozitnih Zn0,5/V čestica slikane u fiziološkom rastvoru: (a) početni trenutak; (b) 24 h; (c) 48 h; (d) 5 dana; (razmernik: 0.5 mm)

Čestice su tokom perioda od pet dana otpustile oko 60 % ukupnog sadržaja AU, a rezultati otpuštanja su prikazani na slici 5.23.



Slika 5.23. Otpuštena masa AU u fiziološkom rastvoru iz Zn<sub>0,5</sub>/V kompozitnih čestica ( $M_t$ ) normalizovana u odnosu na početni sadržaj AU u česticama ( $M_\infty$ ) tokom perioda od 5 dana u fiziološkom rastvoru: prikazani su eksperimentalni podaci (simboli) i predviđanja modela unutrašnje difuzije tokom perioda od 48 h (linije); insert: primena modela unutrašnje difuzije u početnom periodu otpuštanja ( $M_t/M_\infty < 0,4$ ) kao funkcija  $M_t/M_\infty$  od  $t^{0.5}$ ; eksperimentalni podaci su prikazani kao srednje vrednosti 3 merenja  $\pm$  SD

U cilju definisanja mehanizma otpuštanja AU, podaci dobijeni na osnovu praćenja otpuštanja AU iz kompozitnih Zn<sub>0,5</sub>/V čestica su modelovani na isti način kao i u slučaju CaA/AU čestica (poglavljje 5.1.7). Na eksperimentalne podatke su primenjeni modeli kinetika nultog reda, Korsmejer-Pepasov model i model unutrašnje difuzije, čiji su matematički izrazi dati u poglavljju 2.6.2. I u ovom slučaju kinetika nultog reda nije bila primenjiva dok je Korsmejer-Pepasov model predvideo eksponent otpuštanja  $n$  od 0,48 što je ukazalo na Fikovu

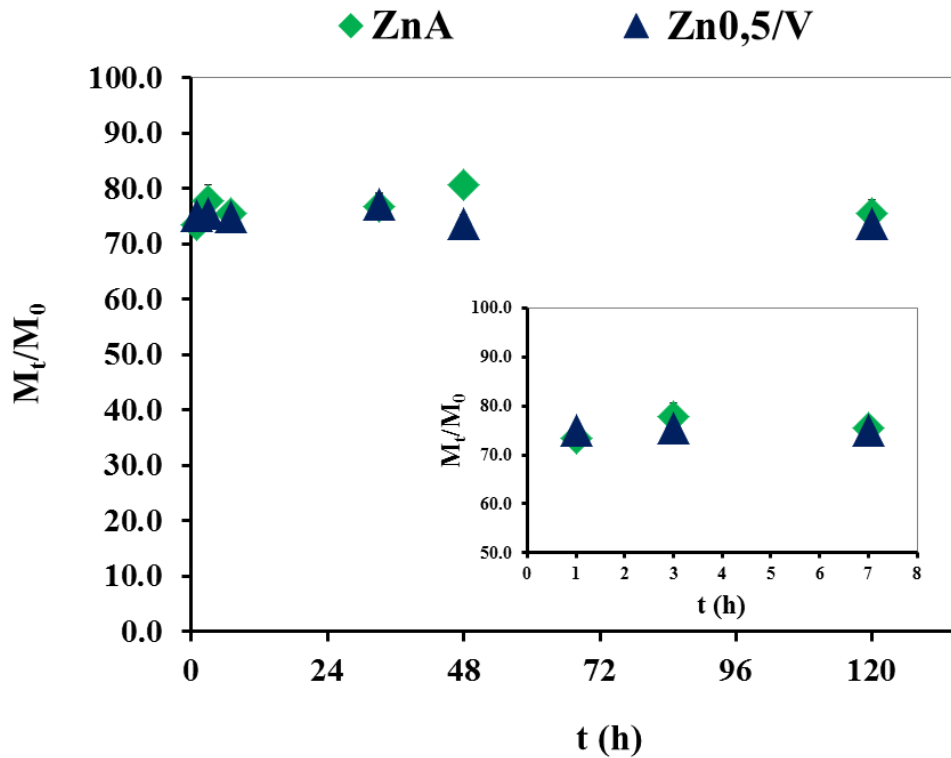


difuziju. Iako je prečnik čestica blago varirao tokom vremena, tokom početnog perioda od 24 h prečnik čestica je bio u opsegu 3 – 3,6 mm tako da je usvojen konstantan prečnik i primenjen model unutrašnje difuzije. Ovaj model je dao najbolje slaganje sa eksperimentalnim podacima (slika 5.23) pri čemu je prividni koeficijent difuzije predviđen kao  $D = 3 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ .

### **5.2.3 Ispitivanje kinetike otpuštanja jona cinka u fiziološkom rastvoru**

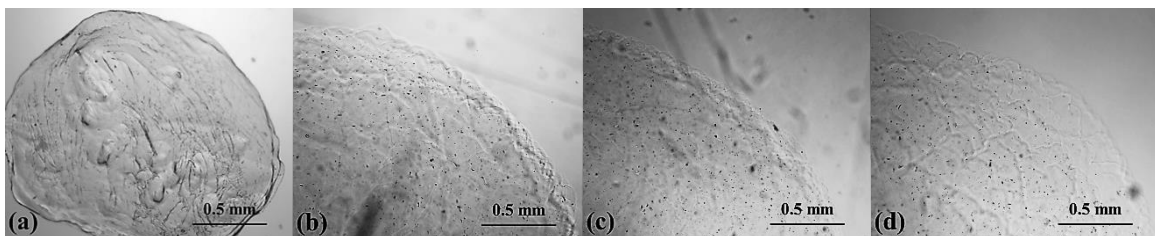
Ukupan sadržaj  $\text{Zn}^{2+}$  u ZnA i Zn0,5/V je određen primenom FAAS. Nije bio statistički značajno različit i iznosio je  $64.3 \pm 2.9$  i  $63.6 \pm 1.7 \text{ } \mu\text{mol/g}$  vlažne mase alginata, redom. Ovaj rezultat ukazuje da AU nije interferirao sa vezivanjem jona cinka.

Kinetika otpuštanja  $\text{Zn}^{2+}$  iz ZnA i Zn0,5/V čestica je praćena u fiziološkom rastvoru tokom 5 dana. U ovom periodu su obe vrste čestica otpustile sličnu količinu  $\text{Zn}^{2+}$  na isti način. Konkretno, i ZnA i Zn0,5/V čestice su tokom prvog sata otpustile oko 75 % od ukupnog sadržaja  $\text{Zn}^{2+}$  i nakon toga se izmerene koncentracije  $\text{Zn}^{2+}$  u rastvoru nisu značajno menjale ( $321.9 \pm 10.3 \text{ mg/l}$  i  $310.3 \pm 3.1 \text{ mg/l}$ , redom, slika 5.24). Ovi rezultati ukazuju da je u toku prvog sata došlo do brze zamene  $\text{Zn}^{2+}$  sa  $\text{Na}^+$  iz fiziološkog rastvora tako da je uspostavljena ravnoteža.



Slika 5.24. Otpuštena količina  $Zn^{2+}$  u fiziološkom rastvoru iz ZnA i Zn0,5/V čestica ( $M_t$ ) normalizovana u odnosu na vlažnu masu alginata u česticama i početnu količinu  $Zn^{2+}$  ( $M_0$ ); insert: otpuštena količina  $M_t/M_0$   $Zn^{2+}$  tokom početnog perioda od 8 h (eksperimentalni podaci su prikazani kao srednje vrednosti 3 merenja  $\pm$  SD; SD < 5%)

Na slici 5.25 su prikazane površine ZnA čestica slikane pod optičkim mikroskopom nakon različitih vremenskih perioda u fiziološkom rastvoru.



Slika 5.25. Optičke mikrofotografije površina ZnA čestica slikane u fiziološkom rastvoru: (a) početni trenutak; (b) 24 h; (c) 48 h; (d) 5 dana; (razmernik: 0.5 mm)

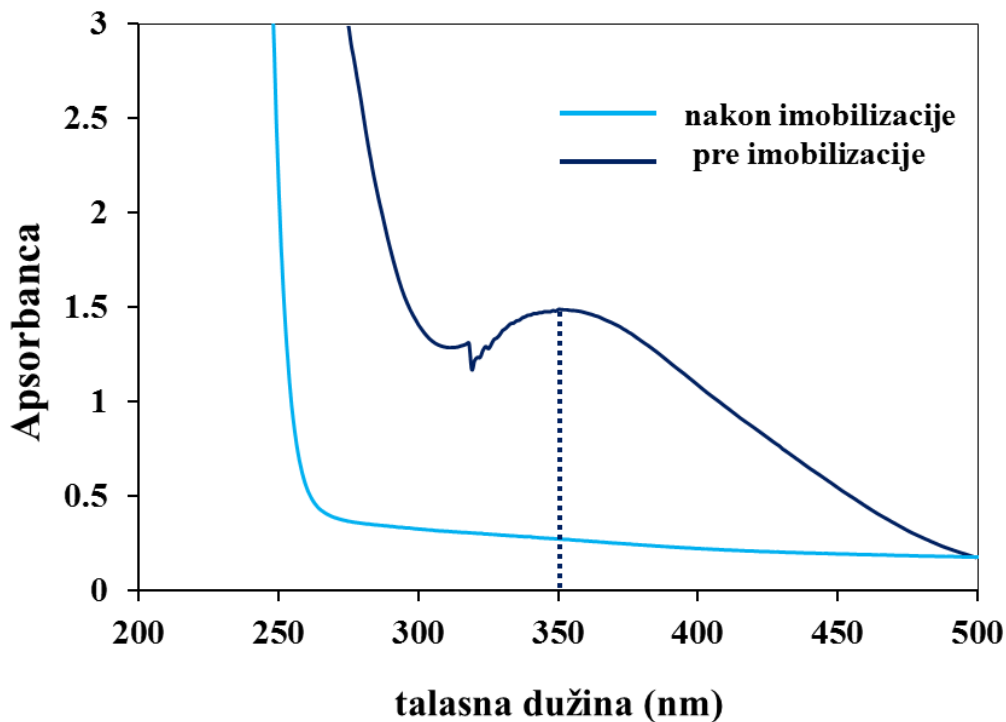
Može se uočiti da su ZnA čestice nabubrile, ali se ni nakon 5 dana nisu raspale i nema vidljivih erozija na površini. Kao i u slučaju Zn<sub>0,5</sub>/V čestica (slika 5.22), njihova površina je već nakon 24 h vidno grublja u odnosu na površinu suvih čestica.

### **5.3 Imobilizacija prve model supstance: povidon-jod (PVP-I)**

#### **5.3.1 Dobijanje kompozitnih alginatnih čestica sa imobilisanim PVP-I**

Kompozitne Ca- i Zn-alginatne čestice sa imobilisanim PVP-I su uspešno dobijene jednostavnom metodom potapanja Ca<sub>0,5</sub>/V i Zn<sub>0,5</sub>/V čestica u 10 mas. % vodeni rastvor PVP-I tokom 24 h u mračnim uslovima. Nakon impregnacije, u slučaju obe vrste čestica nije došlo do promene prečnika vlažnih čestica ( $3,9 \pm 0,1$  mm), dok se njihova masa povećala za oko 1 mas. %. Nakon sušenja, čestice su zadržale približno sferični oblik sa prečnikom od  $3,4 \pm 0,3$  mm.

Uspešna impregnacija čestica je potvrđena na više načina, vizuelno, UV-vidljivom spektroskopijom, SEM/EDS i FT-IR analizom. Vizuelnom metodom je primećeno da je došlo do dekolorizacije rastvora PVP-I, čija izrazito crveno-braon boja vodi poreklo od prisutnog joda. Nakon 24 h rastvor je postao providan. Dekolorizacija rastvora govori u prilog pretpostavci da se jod više nije nalazio u visokoj koncentraciji u vodenom rastvoru. Vodeni rastvor PVP-I nakon imobilizacije na čestice je analiziran UV-vidljivom spektroskopijom kojom je pokazano da je koncentracija joda bila ispod nivoa detekcije s obzirom da nije utvrđeno prisustvo karakterističnog pika na talasnoj dužini od 351 nm (slika 5.26).



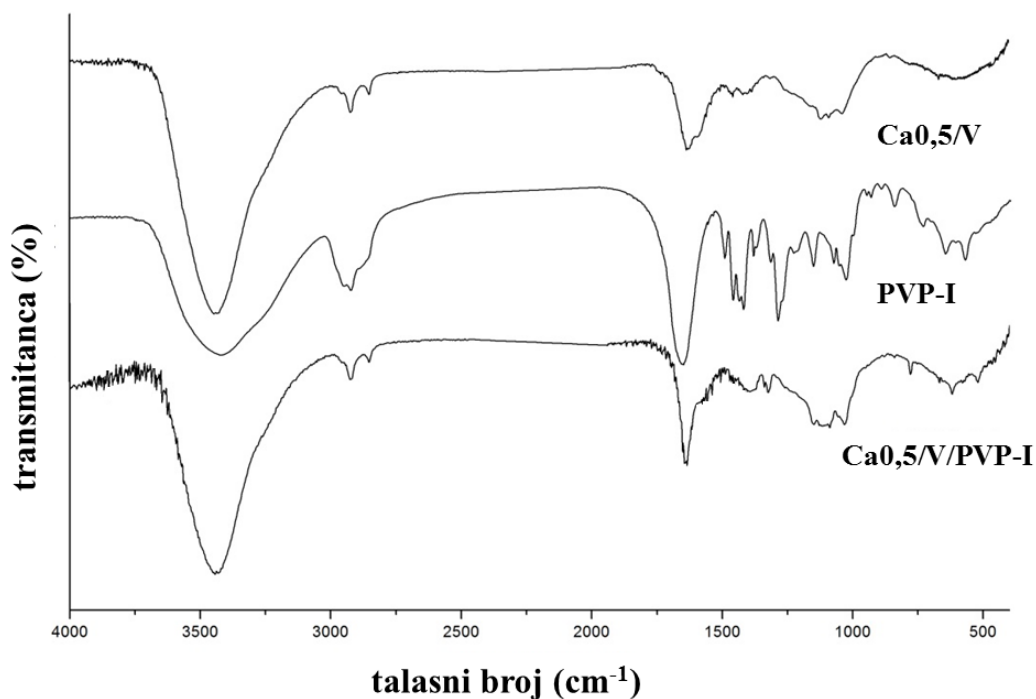
Slika 5.26. UV-vidljivi spektar (200-500 nm) 10 mas. % vodenog rastvora PVP-I pre i nakon imobilizacije na čestice Ca<sub>0,5</sub>/V

Kompozitne čestice su analizirane primenom SEM/EDS analize. Elementarna analiza je potvrdila prisustvo joda u česticama (tabela 5.6). Treba napomenuti da prikazani atomski udeli nisu kvantitativni odnosno ne predstavljaju realne udele detektovanih elemenata već su to njihove relativne koncentracije merene u odnosu na atom kiseonika.

Tabela 5.6. Elementarna analiza kompozitnih čestica Ca<sub>0,5</sub>/V/PVP-I i Zn<sub>0,5</sub>/V/PVP-I pomoću SEM/EDS tehnike

Elementi	%	
	Ca <sub>0,5</sub> /V/PVP-I	Zn <sub>0,5</sub> /V/PVP-I
O	82,5 ± 2,5	80,0 ± 3,7
Zn	-	2,1 ± 0,1
I	17,5 ± 2,1	17,9 ± 3,7

Na slici 5.27 su prikazani reprezentativni FT-IR spektri kompozitnih Ca-alginatnih čestica sa i bez PVP-I i samog PVP-I praha. Treba napomenuti da spektri kompozitnih Zn-alginatnih čestica sa i bez PVP-I nisu prikazani s obzirom da su identični prikazanim spektrima.

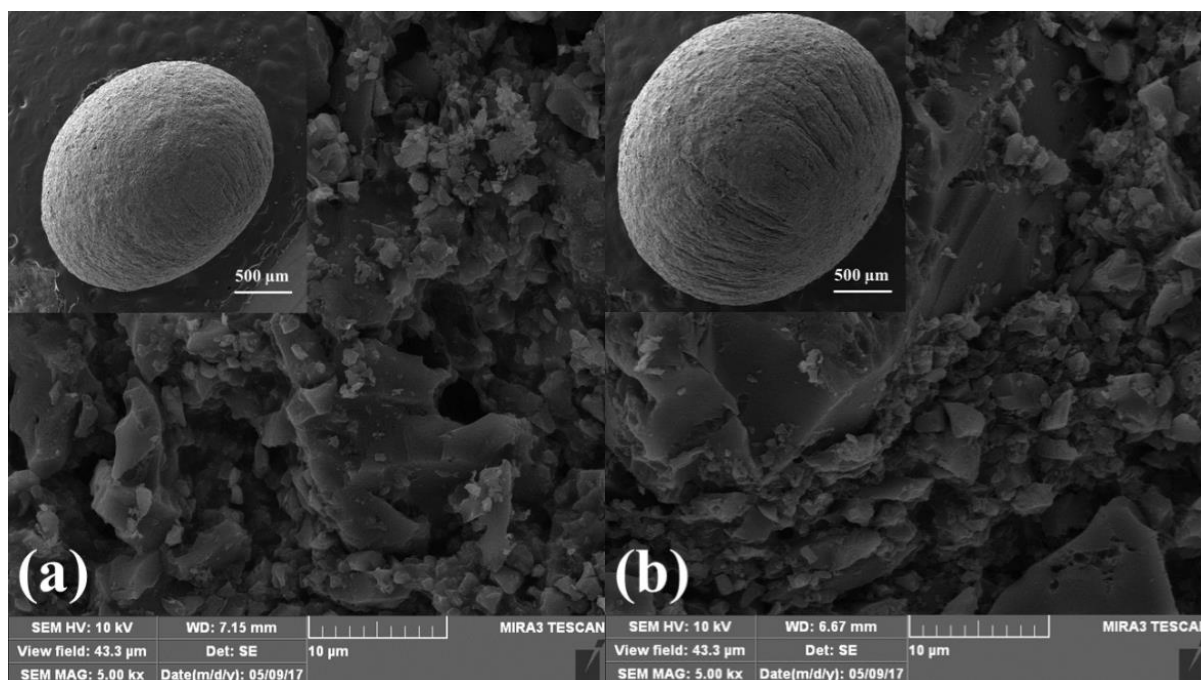


Slika 5.27. FT-IR spektri kompozitnih Ca-alginatnih čestica (Ca<sub>0,5</sub>/V), PVP-I i kompozitnih Ca-alginatnih čestica impregniranih sa PVP-I (Ca<sub>0,5</sub>/V/PVP-I)

FT-IR spektar PVP-I je prilično složen i većina traka se preklapa sa trakama prisutnim u spektrima alginata i AU. Najizraženija traka prisutna u spektru PVP-I (osim trake na 3420 cm<sup>-1</sup> poreklom od hidroksilnih grupa) potiče od amidnih grupa pirolidona i pojavljuje se na 1660 cm<sup>-1</sup>. Ona je takođe prisutna i u spektru 0,5/V/PVP-I čestica kao „rame“ trake na 1630 cm<sup>-1</sup>. Iako PVP izrazito apsorbuje/transmituje u regionu od 1500-1200 cm<sup>-1</sup>, ove trake se preklapaju sa trakama prisutnim u spektru 0,5/V čestica, i daju nove trake. U regionu „otiska prsta“, u spektru PVP se javlja traka na 1154 cm<sup>-1</sup>, koja je takođe prisutna u 0,5/V/PVP-I

česticama dok je nema ili je veoma slaba u spektru 0,5/V čestica. U spektru PVP se, takođe, nalazi izražena traka na  $1030\text{ cm}^{-1}$ , kao i kod alginata, koja se, u spektru 0,5/V/PVP-I čestica, izrazito pojačava. Svi ovi rezultati ukazuju da FT-IR analiza potvrđuje prisustvo PVP u 0,5/V/PVP-I česticama.

Morfologija spoljašnjih površina kao i poprečnih preseka čestica sa imobilisanim PVP-I ispitivana je pomoću FE-SEM analize (slika 5.28).



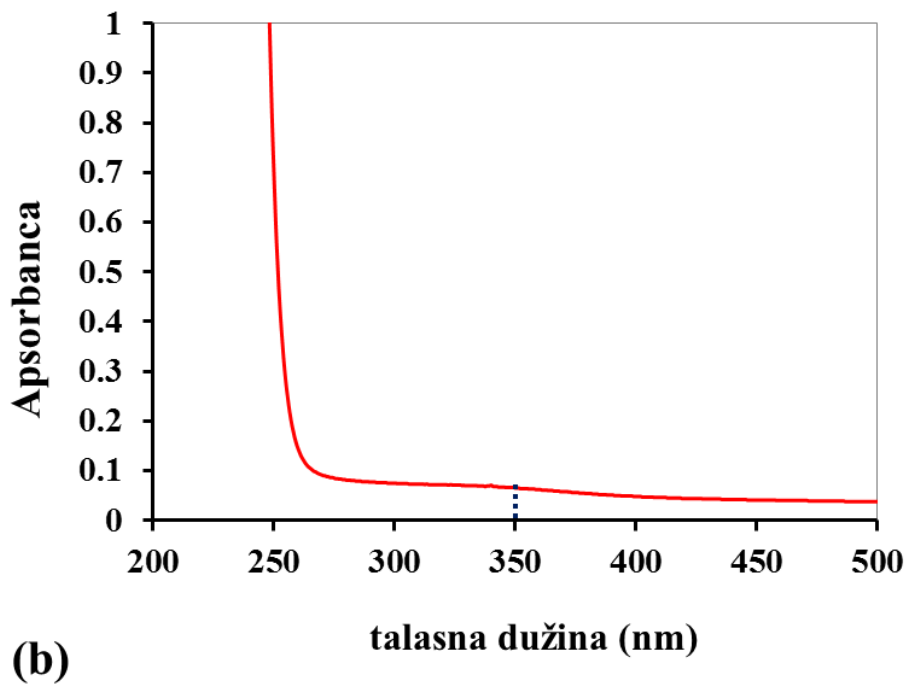
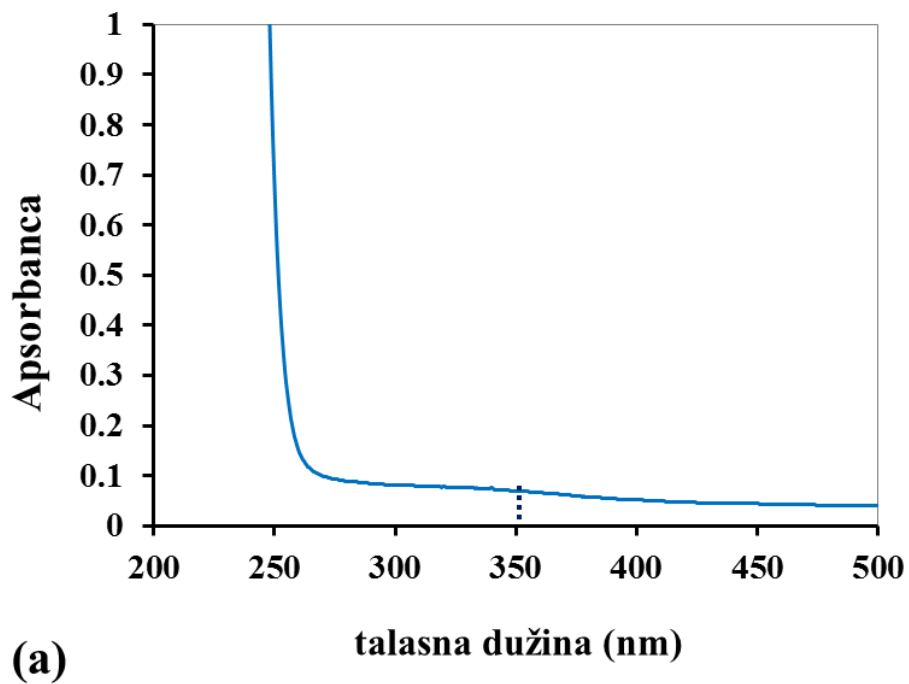
Slika 5.28. FE-SEM mikrofotografije spoljašnjih površina (inserti) i poprečnih preseka suvih čestica: (a) Ca0.5/V/PVP-I; (b) Zn0.5/V/PVP-I; (razmernik: 500 μm (inserti) i 10 μm).

Spoljašnje površine (slika 5.28 inserti) kao i poprečni preseki (slika 5.28) kompozitnih Ca- i Zn-alginatnih čestica impregniranih sa PVP-I se ne razlikuju od kompozitnih čestica bez PVP-I (slike 5.6a i 5.20b). Može se uočiti gruba i hrapava struktura sa vidljivim česticama AU.

### 5.3.2 Ispitivanje otpuštanja povodon-joda u fiziološki rastvor

Desorpcija joda sa  $\text{Ca}_{0,5}/\text{V}/\text{PVP-I}$  i  $\text{Zn}_{0,5}/\text{V}/\text{PVP-I}$  čestica je ispitivana tokom perioda od 48 h na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  u uslovima sa mešanjem. Analiza rastvora posle tog perioda UV-vidljivom spektroskopijom je pokazala da je otpuštanje joda sa čestica AU zanemarljivo tj ispod nivoa detekcije s obzirom da u snimljenom spektru nije utvrđeno postojanje karakterističnog pika na 351 nm (slika 5.29a).

Istom metodom su zatim analizirane rastvorene  $\text{Ca}_{0,5}/\text{V}/\text{PVP-I}$  i  $\text{Zn}_{0,5}/\text{V}/\text{PVP-I}$  čestice u rastvoru Na-citrata. Čestice AU su prethodno uklonjene centrifugiranjem, a spektri dobijenih rastvora nisu pokazali prisustvo karakterističnog pika na 351 nm (slika 5.29b).

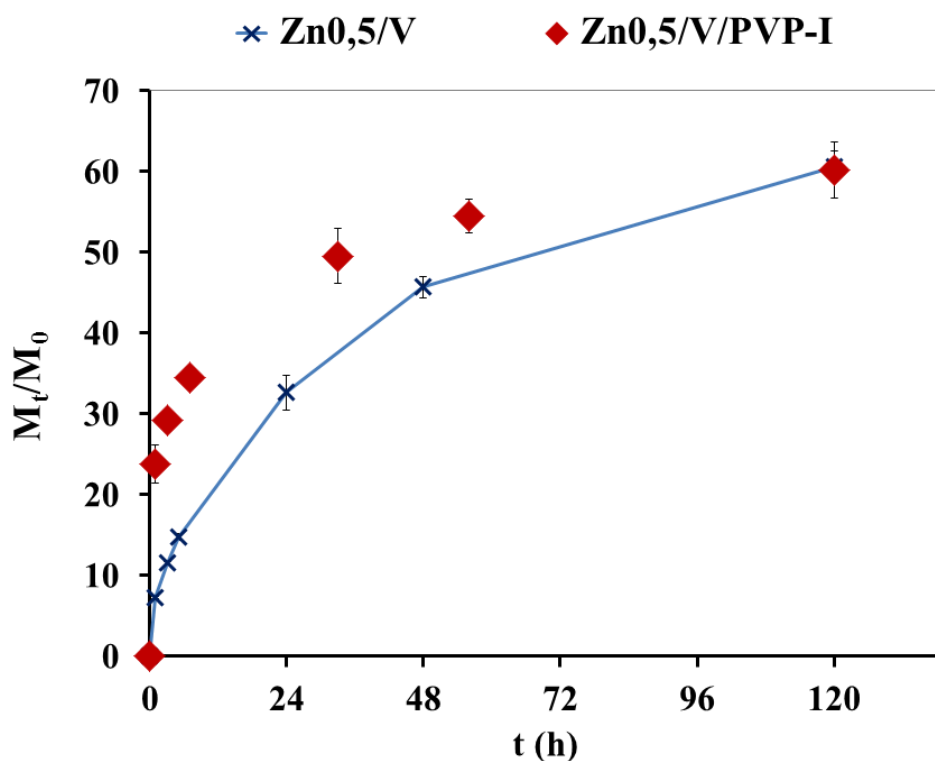


Slika 5.29. UV-vidljivi spektri u eksperimentu desorpcije joda nakon 48 h: (a) fiziološki rastvor; (b) rastvorene čestice



### 5.3.3 Ispitivanje kinetike otpuštanja čestica aktivnog uglja u fiziološkom rastvoru

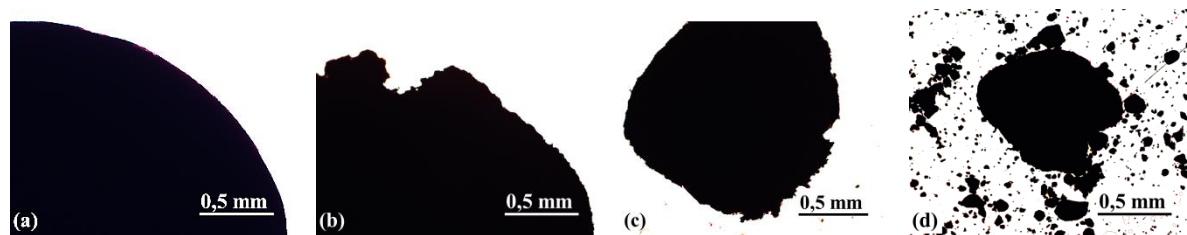
Kinetika otpuštanja čestica AU iz Zn0,5/V/PVP-I čestica je praćena u fiziološkom rastvoru pomoću UV-vidljive spektroskopije. Rezultati otpuštanja su upoređeni sa rezultatima otpuštanja AU iz odgovarajućih kompozitnih čestica bez PVP-I (slika 5.30).



Slika 5.30. Otpuštena količina AU u fiziološkom rastvoru iz kompozitnih Zn0,5/V/PVP-I i Zn0,5/V čestica ( $M_t$ ) normalizovana u odnosu na početni sadržaj AU u česticama ( $M_0$ ) tokom perioda od pet dana u fiziološkom rastvoru

Može se uočiti da su obe vrste čestica, Zn0,5/V sa i bez PVP-I tokom 5 dana u fiziološkom rastvoru otpustile sličnu količinu AU (oko 60 %), ali da su čestice impregnirane sa PVP-I otpustile AU vidljivo brže. Takođe, površine Zn0,5/V čestica sa i bez PVP-I, slikane pod optičkim mikroskopom u različitim vremenskim trenucima tokom eksperimenta,

su se bitno razlikovale. Površina kompozitnih Zn<sub>0,5</sub>/V čestica je i nakon pet dana provedenih u fiziološkom rastvoru bila bez vidljivih erozija (slika 5.22) za razliku od čestica sa PVP-I na kojima su erozije bile vidljive već nakon 24 h (slika 5.31b). Prečnik čestica je bio vidno smanjen već nakon 48 h (slika 5.31c), a nakon 5 dana u rastvoru su se uglavnom nalazili ostaci tj. manji i veći delovi raspadnutih čestica (slika 5.31d).



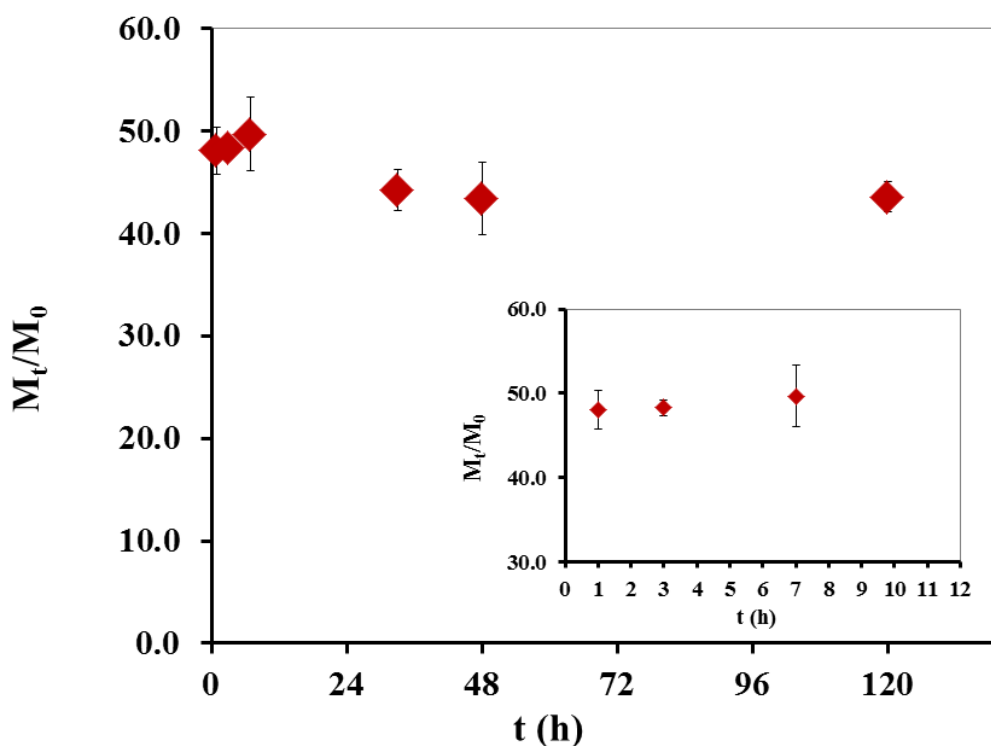
Slika 5.31. Optičke mikrofotografije površina kompozitnih Zn<sub>0,5</sub>/V/PVP-I čestica u fiziološkom rastvoru: (a) početni trenutak; (b) 24 h; (c) 48 h; (d) 5 dana; (razmernik: 0.5 mm)

#### 5.3.4 Ispitivanje kinetike otpuštanja jona cinka u fiziološkom rastvoru

Ukupan sadržaj Zn<sup>2+</sup> u Zn<sub>0,5</sub>/V/PVP-I česticama određen uz pomoć FAAS je iznosio  $14.4 \pm 0.8$   $\mu\text{mol/g}$  vlažne mase alginata. Ova vrednost je značajno niža (oko 80 %) u odnosu na vrednosti dobijene za Zn<sub>0,5</sub>/V i ZnA čestice, kod kojih nije bilo statistički značajne razlike u ukupnom sadržaju Zn<sup>2+</sup> ( $63.6 \pm 1.7$  i  $64.3 \pm 2.9$   $\mu\text{mol/g}$ , redom). Dobijeni rezultat nije logičan i može se objasniti afinitetom PVP prema Zn<sup>2+</sup> (Wang i sar, 2006). Najverovatnije su se Zn<sup>2+</sup>, nakon rastvaranja čestica u rastvoru Na-citrata, vezali za PVP, a zatim su centrifugiranjem i odstareni iz rastvora. Uzevši u obzir izmerene koncentracije Zn<sup>2+</sup> u rastvoru tokom praćenja kinetike otpuštanja Zn<sup>2+</sup> ova vrednost dalje nije uzimana u obzir, a kao ukupni sadržaj Zn<sup>2+</sup> u Zn<sub>0,5</sub>/V/PVP-I česticama je uzeta srednja vrednost dobijena za Zn<sub>0,5</sub>/V i ZnA čestice.

Kinetika otpuštanja Zn<sup>2+</sup> iz Zn<sub>0,5</sub>/V/PVP-I čestica je praćena u fiziološkom rastvoru pomoću FAAS tokom perioda od pet dana (slika 5.32). I u ovom slučaju kao i kod ZnA i

Zn<sub>0,5</sub>/V čestica je u toku prvog sata postignuta ravnoteža pri čemu je ukupno otpuštena količina Zn<sup>2+</sup> iznosila 40 % od početne količine Zn<sup>2+</sup> u česticama. Koncentracija Zn<sup>2+</sup> u fiziološkom rastvoru je praktično bila konstantna nakon prvog sata (166,1 ± 10,0 mg/l). Značajno manje otpuštanje Zn<sup>2+</sup> u ovom slučaju u odnosu na ZnA i Zn<sub>0,5</sub>/V čestice je verovatno posledica interakcija sa PVP.



Slika 5.32. Otpuštena količina Zn<sup>2+</sup> u fiziološkom rastvoru iz Zn<sub>0,5</sub>/V/PVP-I čestica ( $M_t$ ) normalizovana u odnosu na vlažnu masu alginata u česticama i početnu količinu Zn<sup>2+</sup> ( $M_0$ ); insert: otpuštena količina  $M_t/M_0$  Zn<sup>2+</sup> tokom početnog perioda od 8 h (eksperimentalni podaci su prikazani kao srednje vrednosti 3 merenja ± SD)

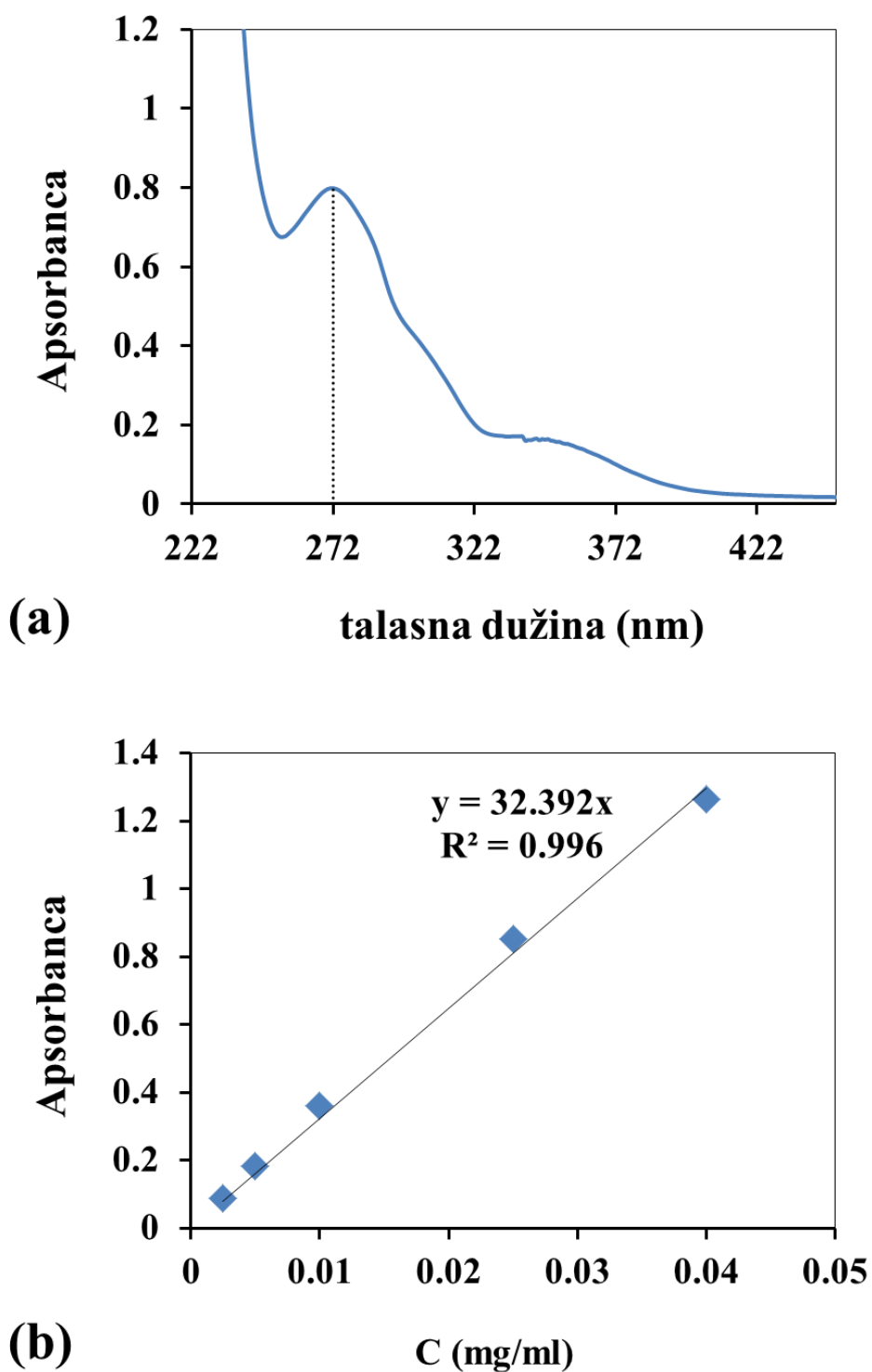
## 5.4 Imobilizacija druge model supstance: lignin model jedinjenja (LMJ)

### 5.4.1 Konstrukcija kalibracione prave

LMJ korišćena u ovom radu su sintetisana prema proceduri opisanoj u literaturi (*Spasojević, 2016*). Apsorpcioni spektar LMJ u 5 mas. % rastvoru DMSO je prikazan na slici 5.33a, na kojoj se može uočiti apsorpcioni maksimum na talasnoj dužini od 272 nm. Kalibraciona prava (slika 5.33b) je konstruisana merenjem maksimalne apsorbance rastvora sa različitim koncentracijama LMJ u 5 mas. % rastvoru DMSO.

Na osnovu dobijene linearne zavisnosti, izvedena je jednačina za izračunavanje nepoznate koncentracije LMJ u rastvoru (C) od očitane apsorbance na talasnoj dužini od 272 nm (Abs).

$$C = 3,08 \times 10^{-2} \times Abs \quad (5.3)$$

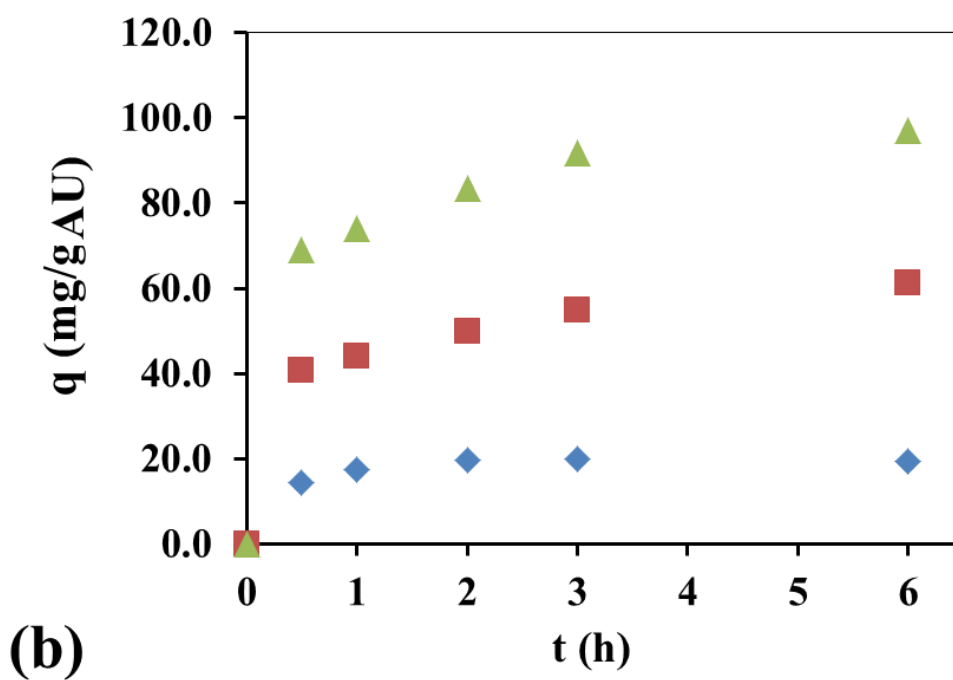
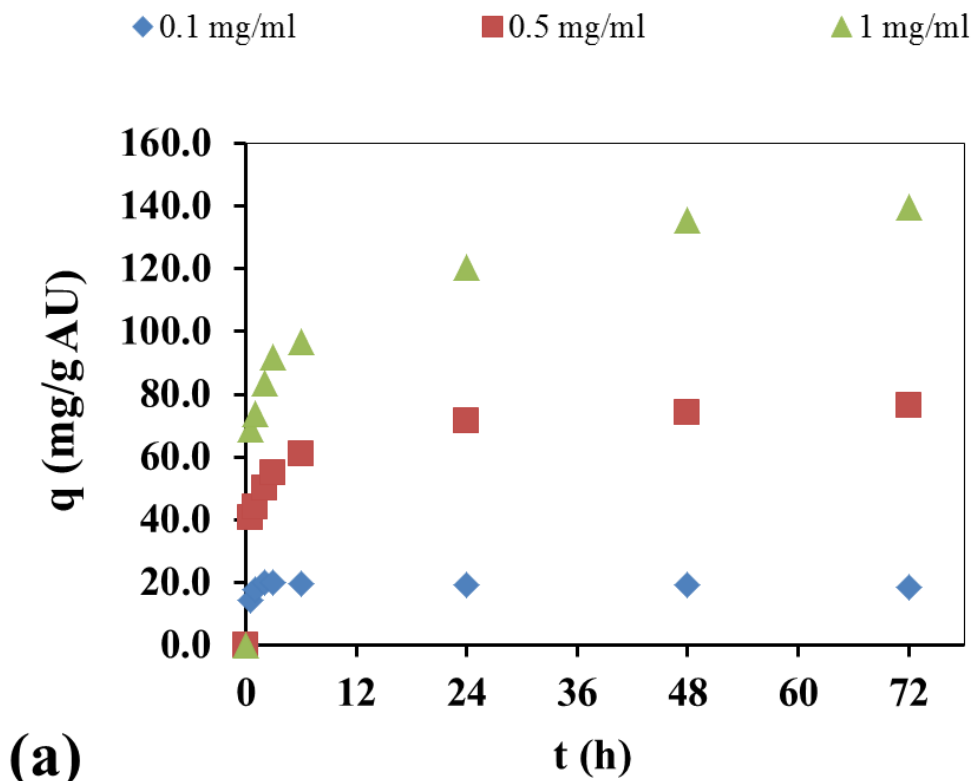


Slika 5.33. Rezultati UV-vidljive spektroskopije: (a) apsorpcioni spektar rastvora LMJ u 5 mas. % rastvoru DMSO; (b) kalibraciona prava zavisnosti maksimalne apsorbance na 272 nm od koncentracije LMJ u 5 mas. % rastvoru DMSO; eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja

#### 5.4.2 Kinetika adsorpcije LMJ na čestice aktivnog uglja

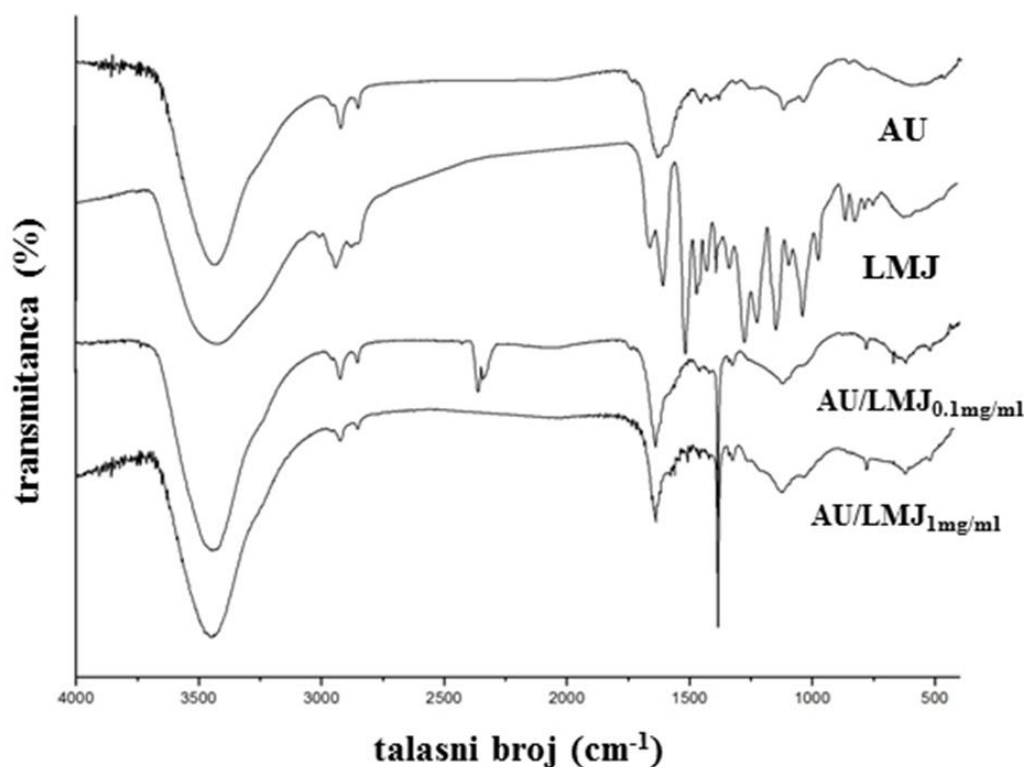
Kinetika adsorpcije LMJ na čestice AU je ispitivana u dve eksperimentalne serije. U prvoj seriji, kinetika adsorpcije LMJ na čestice AU je praćena iz rastvora LMJ/DMSO početnih koncentracija 1, 5 i 10 mg/ml. Međutim, početni rastvori LMJ/DMSO su bili prilično viskozni tako da čestice AU nisu mogle da se izdvoje centrifugiranjem i nije bilo moguće primeniti UV-vidljivu spektroskopiju na ove rastvore. U drugoj seriji, kinetika adsorpcije je praćena iz rastvora LMJ/DMSO početnih koncentracija 0,1, 0,5 i 1 mg/ml. U ovom slučaju su čestice AU izdvajane centrifugiranjem uzoraka, a zatim su merene apsorbanse supernatanta na 272 nm, pomoću UV-vidljivog spektrofotometra. Na slici 5.34 su prikazane izračunate vrednosti adsorbovanih količina LMJ na AU u toku vremena.

Sa slike 5.34 se može uočiti da se ravnotežna koncentracija u rastvoru najniže koncentracije, 0,1 mg/ml, uspostavila već nakon 2 h dok se u rastvoru najviše koncentracije, 1 mg/ml, uspostavila tek nakon 72 h.



Slika 5.34. Kinetika adsorbovane količine LMJ na čestice AU ( $q_e$ ) za tri različite početne koncentracije LMJ u 5 mas. % rastvoru DMSO tokom: (a) 72 h; (b) prvih 6 h; eksperimentalni podaci su srednja vrednost 3 merenja  $\pm$  SD

Adsorpcija LMJ na čestice AU potvrđena je i FT-IR analizom. Na slici 5.35 prikazani su transmisioni spektri AU, suvog polimera LMJ i čestica AU sa adsorbovanim LMJ iz rastvora početnih koncentracija 0,1 i 1 mg/ml.



Slika 5.35. FT-IR spektri AU u prahu, LMJ, čestica AU sa adsorbovanim LMJ iz rastvora koncentracije 0,1 mg/ml i čestica AU sa adsorbovanim LMJ iz rastvora koncentracije 1 mg/ml

FT-IR spektri alginata i AU su detaljno opisani u poglavlju 5.1.4. Na FT-IR spektru LMJ može se uočiti široka traka sa pikom na 3420 cm<sup>-1</sup> koja potiče od vodoničnih veza unutar ligninskih lanaca. Slede duple trake na 2938 i 2877 cm<sup>-1</sup> koje potiču od C-H veza. Traka na 1655 cm<sup>-1</sup> može da se poveže sa C=C vezama (pre svega alifatičnim), kao i najizraženija traka na 1509 cm<sup>-1</sup> (aromatičnim). Traka na 1600 cm<sup>-1</sup> potiče od karboksilnih grupa sa perifernih monomera. Traka na 1327 cm<sup>-1</sup> potiče od skeletnih vibracija S-prstena

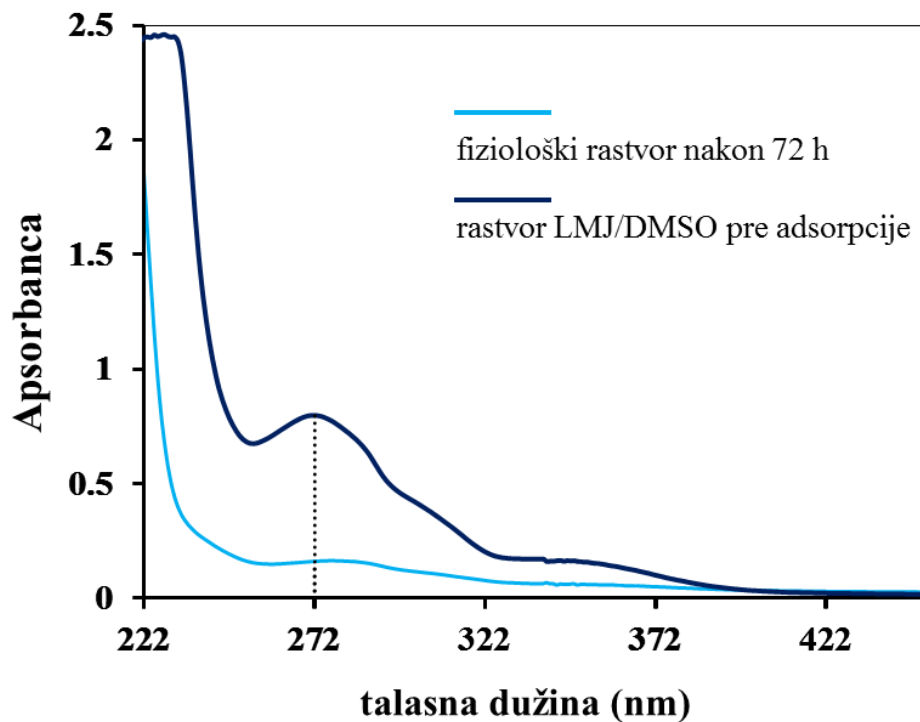


(siringil-monomeri), dok bi traka na  $1266\text{ cm}^{-1}$  mogla da se poveže sa skeletnim vibracijama G-prstena (gvajacil-monomeri). Ostale preklapajuće trake u regionu od  $1500$  do  $1250\text{ cm}^{-1}$  uglavnom potiču od raznih C-H vibracija, a u regionu od  $1250 - 800\text{ cm}^{-1}$  od C-O vibracija, slično kao kod AU.

FT-IR spektri kompleksa AU i LMJ imaju najviše sličnosti sa spektrom AU, čiji je maseni udeo u kompleksu daleko veći od udela LMJ. Ipak, određene trake LMJ vidljive su u oba tipa ispitivanih uzoraka. Traka na  $1509\text{ cm}^{-1}$ , koja je najintenzivnija u spektru LMJ, vidljiva je u kompleksima AU i LMJ pri obe ispitivane koncentracije, ali je bolje i jasnije definisana u česticama sa većom koncentracijom LMJ. Takođe, u oba slučaja vidljiva je traka na  $1215\text{ cm}^{-1}$ , koja potiče od LMJ, a u regionu C-O vibracija, u kompleksima sa većom koncentracijom LMJ dolazi do spajanja traka na  $1040\text{ cm}^{-1}$ , koja potiče od AU, i  $1030\text{ cm}^{-1}$ , koja potiče od LMJ, u novu traku sa pikom na  $1033\text{ cm}^{-1}$ . Ova traka nije vidljiva u spektru kompleksa AU sa adsorbovanom nižom koncentracijom LMJ. Ostale trake potiču ili od AU ili su prisutne i kod AU i LMJ pa je njihov značaj u interpretaciji daleko nepouzdaniji. Takođe, u kompleksima se javlja i intenzivna traka na  $1383\text{ cm}^{-1}$  koja verovatno potiče od neorganskih anjona (hlorida) adsorbovanih iz fiziološkog rastvora na čestice AU. Sve u svemu, dobijeni spektri jasno ukazuju na adsorpciju LMJ na čestice AU.

### **5.4.3 Ispitivanje otpuštanja LMJ u fiziološkom rastvoru**

Otpuštanje LMJ sa čestica AU u fiziološkom rastvoru je ispitivano u toku 72 h sa česticama AU sa adsorbovanim LMJ dobijenih iz sva tri rastvora. UV-vidljivi spektar fiziološkog rastvora nakon tog perioda, u kome su se nalazile čestice AU sa adsorbovanom LMJ iz rastvora početne koncentracije  $1\text{ mg/ml}$ , prikazan je na slici 5.36.



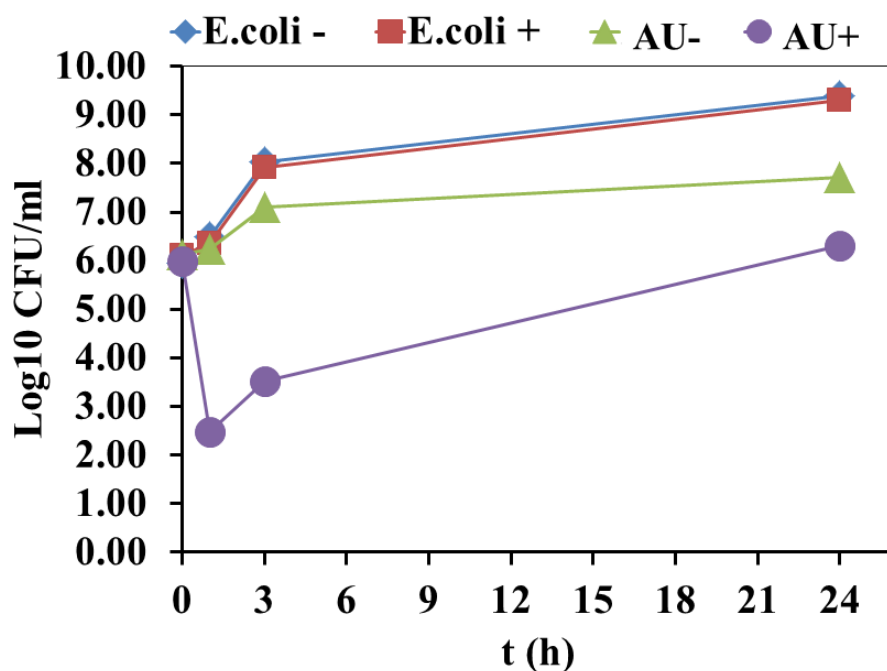
Slika 5.36. UV-vidljivi spektri rastvora LMJ/DMSO pre adsorpcije i fiziološkog rastvora nakon 72 h desorpcije LMJ sa čestica AU sa adsorbovanom LMJ iz rastvora početne koncentracije 1 mg/ml

Na UV-vidljivom spektru fiziološkog rastvora se može uočiti odsustvo pika na karakterističnoj talasnoj dužini za LMJ od 272 nm, što ukazuje da nema otpuštanja LMJ sa čestica AU u fiziološkom rastvoru ili je ono zanemarljivo tako da se ne može odrediti UV-vidljivom spektroskopijom.

## 5.5 Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

### 5.5.1 Optimizacija procedure određivanja antimikrobne aktivnosti

U cilju optimizacije procedure ispitivanja antimikrobne aktivnosti, ispitan je uticaj centrifugiranja na ukupan broj bakterijskih ćelija u bakterijskoj suspenziji *Escherichia coli* ATCC 25922 kao i u bakterijskoj suspenziji u prisustvu AU u prahu. Rezultati su prikazani na slici 5.37.

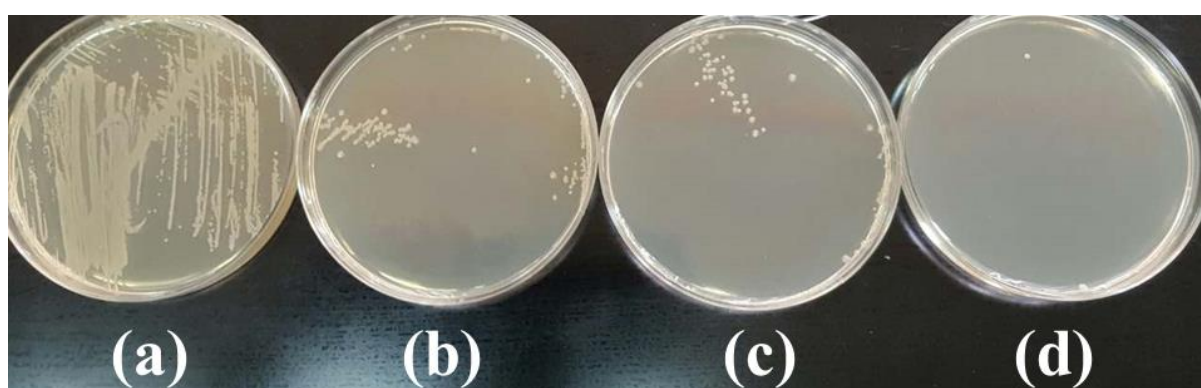


Slika 5.37. Ukupan broj ćelija bakterije *E. coli* ATCC 25922 u suspenziji i u suspenziji u prisustvu AU u prahu; (-) označava kontrolno zasejavanje na ploče direktno iz suspenzija bez prethodnog centrifugiranja uzoraka; (+) označava zasejavanje na ploče iz supernatanta centrifugiranih uzoraka na 600 ×g tokom 10 min; rezultati su prikazani kao log<sub>10</sub> CFU/ml i predstavljaju srednje vrednosti 2 merenja ± SD

Može se uočiti da nakon 10 min centrifugiranja nema statistički značajne razlike između ukupnog broja ćelija bakterije zasejanih pre i nakon centrifugiranja. Međutim, u slučaju prisustva AU, ploče zasejane pre centrifugiranja su imale značajno veći broj ćelija u odnosu na ploče koje su zasejane iz supernatanta, najverovatnije jer su u prvom slučaju „zasejane“ i čestice AU sa adsorbovanim ćelijama bakterija.

### 5.5.2 Određivanje minimalne baktericidne koncentracije (MBK) CaA/AU čestica sa imobilisanim PVP-I

Minimalna baktericidna koncentracija (MBK) za kompozitne Ca0,5/V/PVP-I čestice je ispitivana u suspenziji *E. coli* ATCC 25922 u opsegu koncentracija čestica od 0,1-0,4 g/ml. TS agar ploče sa zasejanim uzorcima suspenzija su prikazane na slici 5.37. Koncentracije 0,2 i 0,3 g/ml su dovele do značajne redukcije broja bakterija u suspenzijama (slika 5.37b i c), dok koncentracija 0,1 g/ml nije imala negativan efekat na rast bakterijskih ćelija ( $> 10^6$  CFU/ml). Kao MBK određena je koncentracija čestica od 0,4 g/ml.



Slika 5.38. Određivanje MBK za kompozitne Ca0,5/V/PVP-I čestice u suspenziji *E. coli* ATCC 25922: (a) 0,1 g/ml; (b) 0,2 g/ml; (c) 0,3 g/ml; (d) 0,4 g/ml

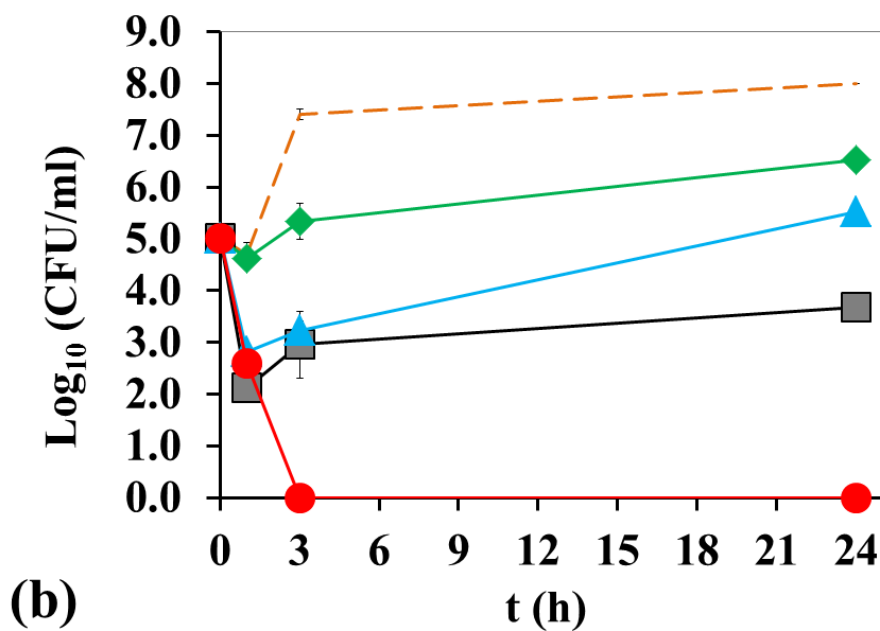
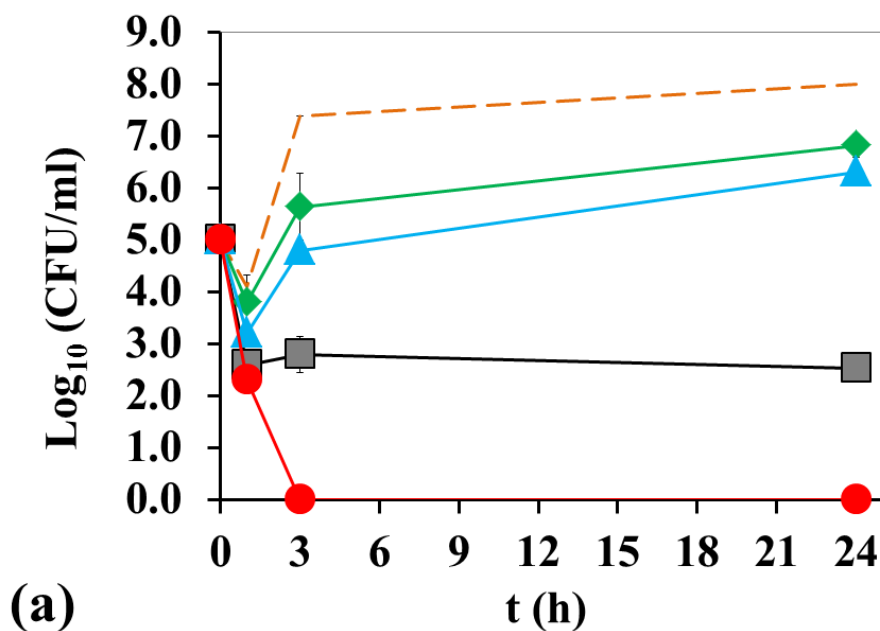
### 5.5.3 Ispitivanje antimikrobne aktivnosti kompozitnih kalcijum-alginatnih čestica sa imobilisanim PVP-I

Antibakterijska aktivnost Ca<sub>0,5</sub>/V čestica sa PVP-I je u prvoj eksperimentalnoj seriji ispitana u suspenziji dva kolekcijska soja, Gram pozitivne *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i Gram negativne *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pri koncentraciji od 0,4 g/ml. Rezultati su prikazani na slici 5.39.

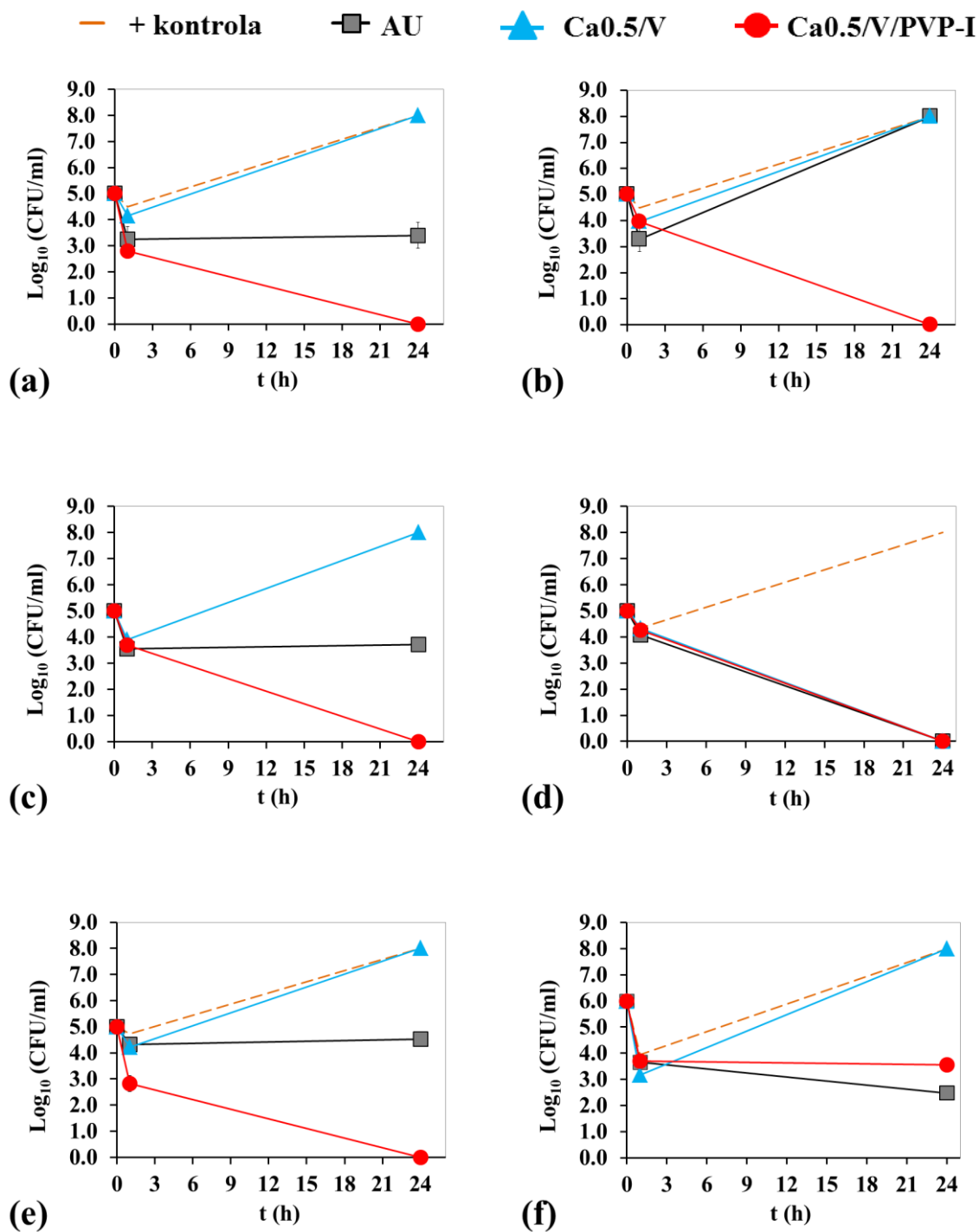
Rezultati pokazuju da kompozitne Ca<sub>0,5</sub>/V čestice, AU u prahu i CaA čestice imaju negativan efekat na rast Gram pozitivne vrste bakterije *S. aureus* i Gram negativne vrste bakterije *P. aeruginosa*, ali da je za baktericidni efekat neophodno prisustvo antimikrobne supstance. Iako su i CaA čestice i kompozitne Ca<sub>0,5</sub>/V čestice usporile rast ćelija bakterija, taj efekat je bio mnogo izraženiji kod AU u prahu koji je, nakon perioda od 24 h, redukovao broj bakterijskih ćelija za 3–4 logaritamske jedinice u poređenju sa pozitivnom kontrolom. Međutim, impregnirane čestice sa PVP-I, Ca<sub>0,5</sub>/V/PVP-I, su kod obe vrste bakterijske suspenzije postigle izrazit baktericidni efekat i to nakon svega 3 h (slika 5.39).

U drugoj eksperimentalnoj seriji, za ispitivanje antimikrobne aktivnosti korišćeni su rezistentni klinički sojevi izolovani iz rana pacijenata (MRSA, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *P. mirabilis* i *C. albicans*) pri koncentraciji od 10<sup>5</sup> CFU/ml za bakterije i 10<sup>6</sup> CFU/ml za kvasac, kao i koncentraciji čestica od 0,4 g/ml. Ovi rezultati prate sličan trend kao i rezultati dobijeni u prvoj eksperimentalnoj seriji (slika 5.40).

—+ kontrola    ◆ CaA    ■ AU    ▲ Ca0,5/V    ● Ca0,5/V/PVP-I



Slika 5.39. Antibakterijska aktivnost Ca0,5/V čestica sa PVP-I u suspenziji: (a) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i (b) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; kontrole su bile bakterijske suspenzije (+ kontrola), AU u prahu, Ca-alginatne čestice (CaA) i Ca0,5/V čestice; početni broj ćelija bakterija je bio  $10^5$  CFU/ml; rezultati su prikazani kao  $\log_{10}$  CFU/ml i predstavljaju srednje vrednosti 2 merenja  $\pm$  SD



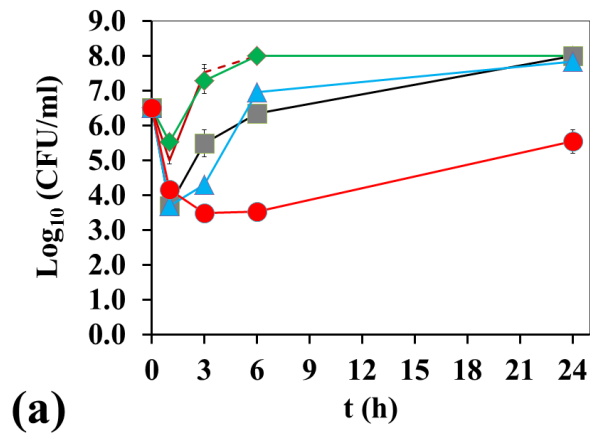
Slika 5.40. Antimikrobna aktivnost Ca0,5/V čestica sa PVP-I ispitivana u suspenzijama: (a) MRSA, (b) *E. coli*, (c) *P. aeruginosa*, (d) *E. faecalis*, (e) *P. mirabilis*, (f) *C. albicans*; kontrole su bile suspenzije mikroorganizama (+ kontrola), AU u prahu i Ca0,5/V čestice; početni broj ćelija je bio  $10^5$  CFU/ml za vrste bakterija i  $10^6$  CFU/ml za ispitivanu vrstu kvasca; rezultati su prikazani kao  $\log_{10}$  CFU/ml i predstavljaju srednje vrednosti 2 merenja  $\pm$  SD

AU u prahu i kompozitne Ca0,5/V čestice su i ovde dovele do redukcije broja ćelija bakterija nakon 1 h. Međutim, nakon 24 h u slučaju Ca0,5/V čestica u većini suspenzija broj ćelija bakterija je bio istog reda veličine kao i pozitivna kontrola dok je u slučaju praha AU broj bakterija za 3 – 4 logaritamske jedinice ostao niži nego pozitivna kontrola. Izuzetak predstavljaju suspenzije *E. coli* i *E. faecalis*. Nakon 24 h, u suspenziji *E. coli* nije došlo do redukcije broja ćelija bakterija ni kod AU niti kod kompozitnih Ca0,5/V čestica tj. broj ćelija bakterija je istog reda veličine kao i pozitivna kontrola. S druge strane, u suspenziji *E. faecalis*, nakon 24 h, i AU i kompozitne Ca0,5/V čestice su u potpunosti uklonile bakterijske ćelije iz bujona, najverovatnije putem adsorpcije. Međutim, čestica Ca0,5/V/PVP-I su postigle baktericidan efekat u svim bakterijskim suspenzijama nakon 24 h (slika 5.40a-e). U slučaju kvasca *Candida albicans*, Ca0,5/V/PVP-I čestice kao i AU su značajno snizili broj vijabilnih ćelija u suspenziji, ali fungicidni efekat nije postignut ni nakon 24 h. U poređenju sa Ca0,5/V česticama, Ca0,5/V/PVP-I čestice su nakon 24 h snizile broj ćelija kvasaca za 4 logaritamske jedinice što pokazuje da imobilisani PVP-I ima negativan efekat na ćelije *C. albicans*, ali očigledno ne dovoljan da bi doveo do potpunog uklanjanja ovih ćelija iz suspenzije.

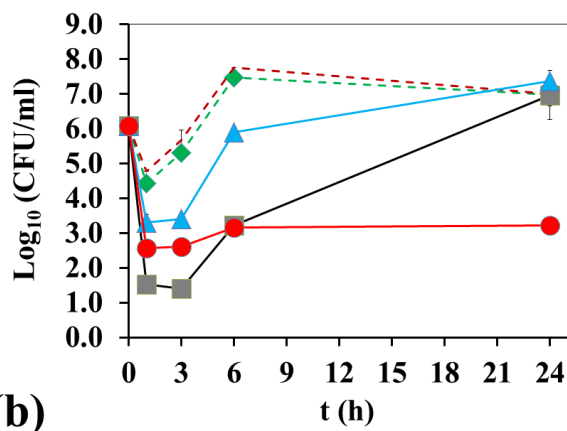
U trećoj eksperimentalnoj seriji ispitana je antibakterijska aktivnost Ca0,5/V čestica sa PVP-I u suspenzijama tri klinička soja izolovana iz rana pacijenata (*E. coli*, *E. faecalis* i *P. mirabilis*) pri većoj početnoj koncentraciji od oko  $10^6 - 10^7$  CFU/ml. Pri tome je koncentracija čestica bila 0,13 g/ml, što je tri puta manje u odnosu na MBK određenu za Ca0,5/V/PVP-I čestice u suspenziji *E. coli* koncentracije  $10^5$  CFU/ml. Rezultati su prikazani na slici 5.41.



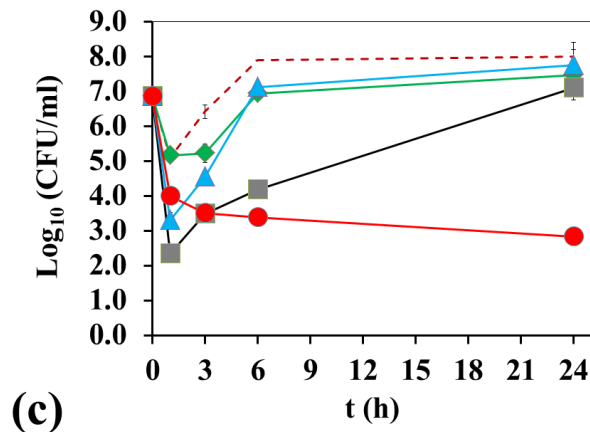
—+ kontrola    ◆ CaA    ■ AU    ▲ Ca0,5/V    ● Ca0,5/V/PVP-I



(a)



(b)



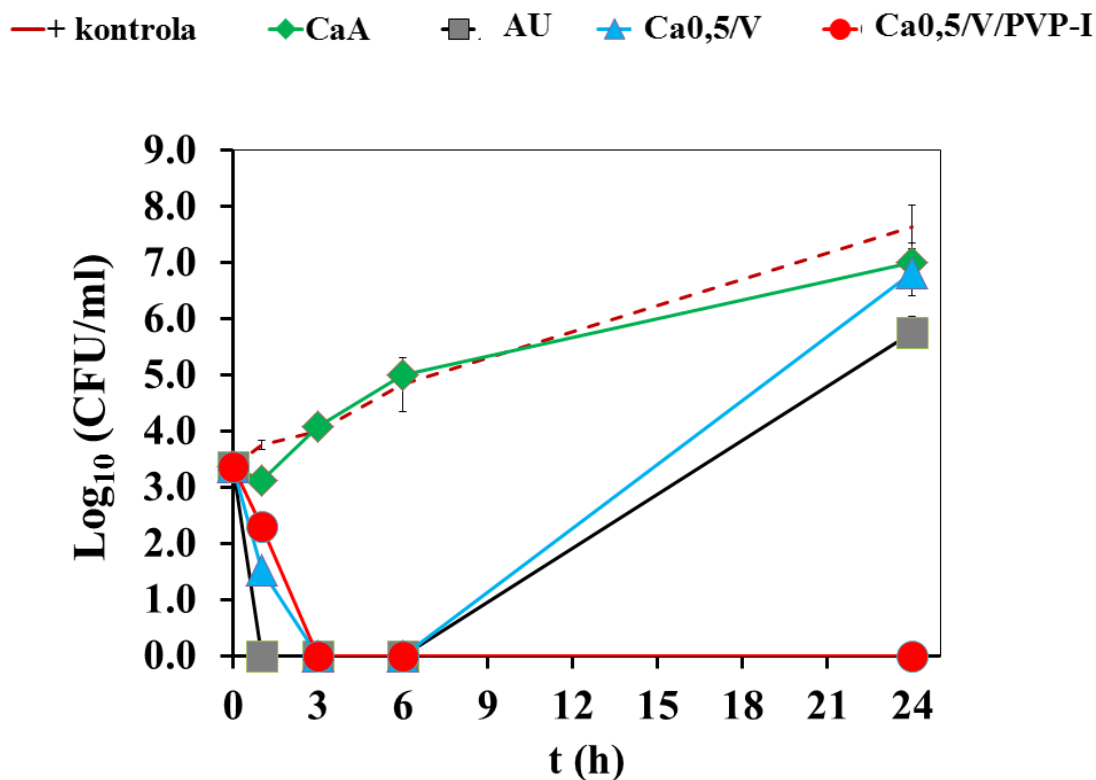
(c)

Slika 5.41. Uticaj kompozitnih čestica Ca0,5/V sa PVP-I na rast vrsta bakterija u suspenzijama: (a) *E. coli*, (b) *E. faecalis*, (c) *P. mirabilis*. Kao kontrole su korišćene Ca-alginatne čestice (CaA), Ca0,5/V čestice, AU u prahu i bakterijska suspenzija (pozitivna kontrola); početni broj ćelija bakterija je bio  $10^6$ - $10^7$  CFU/ml; rezultati su prikazani kao  $\log_{10}$  CFU/ml i predstavljaju srednje vrednosti 2 merenja  $\pm$  SD

I u slučaju vrlo velikog početnog broja ćelija bakterija od  $10^6 - 10^7$  CFU/ml, i tri puta niže koncentracije, AU prah je tokom prvog sata redukovao broj ćelija bakterija za 2,5-3 logaritamske jedinice kod *E. coli* i za čak 5 logaritamskih jedinica kod ostale dve vrste bakterija. Međutim, ni u jednom slučaju nije bilo dugoročnog negativnog efekta, što je i očekivano. Sličan trend su pokazale i Ca<sub>0,5</sub>/V čestice, uz manju redukciju broja ćelija bakterija nakon prvog sata (2-3 logaritamske jedinice) nego u slučaju AU.

Impregnirane kompozitne čestice Ca<sub>0,5</sub>/V/PVP-I su i u ovom slučaju pokazale antibakterijski efekat. Naime, u sve tri suspenzije čestice su, u toku prvog sata, snizile broj bakterijskih ćelija za 2-3 logaritamske jedinice, a tokom 24 h, je u u suspenzijama *E. faecalis* i *P. mirabilis* taj broj i održan (oko  $10^3$  CFU/ml, slika 5.41b i c). U slučaju *E. coli*, broj živih bakterijskih ćelija u suspenziji, nakon 24 h, je bio nešto viši i iznosio je  $10^5-10^6$  CFU/ml, što je još uvek 2-3 logaritamske jedinice niže nego u kontrolnoj suspenziji (slika 5.41a).

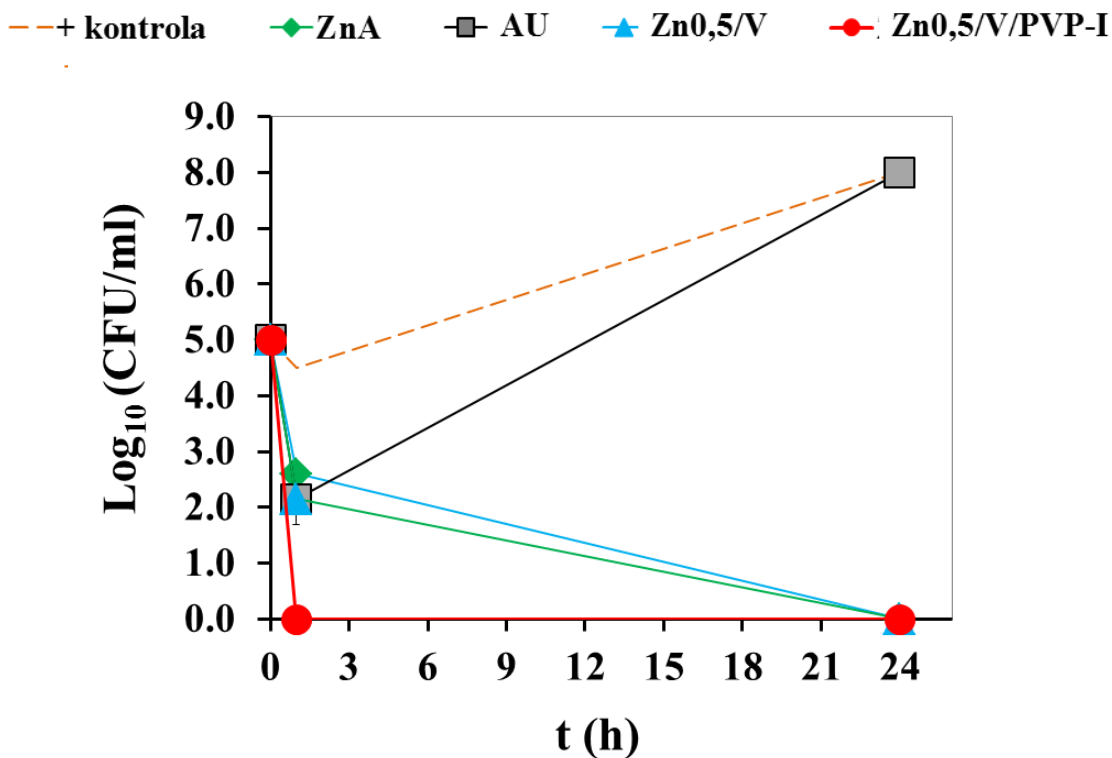
Najzad u četvrtoj eksperimentalnoj seriji, ispitan je uticaj Ca<sub>0,5</sub>/V čestica sa PVP-I na soj MRSA pri maloj koncentraciji ćelija u suspenziji od  $10^3$  CFU/ml i istoj koncentraciji čestica od 0,13 g/ml kao u trećoj eksperimentalnoj seriji. Rezultati su prikazani na slici 5.42. Kao što je i očekivano, ćelija bakterija su u potpunosti odstranjene iz rastvora, i to za tri sata u slučaju kompozitnih čestica, Ca<sub>0,5</sub>/V i Ca<sub>0,5</sub>/V/PVP-I, a za samo jedan sat u slučaju AU. Međutim, jedino u suspenziji sa impregniranim česticama Ca<sub>0,5</sub>/V/PVP-I, nakon 24 h nisu pronađene žive ćelije bakterija dok su se, u slučaju praha AU i Ca<sub>0,5</sub>/V čestica, ćelije bakterija ponovo nađene u bujonu, i to u broju  $10^5-10^6$  CFU/ml.



Slika 5.42. Uticaj kompozitnih čestica Ca0,5/V sa PVP-I na rast bakterija u suspenziji MRSA. Kao kontrole su korišćene Ca-alginatne čestice (CaA), Ca0,5/V čestice, AU u prahu i bakterijska suspenzija (pozitivna kontrola); početni broj ćelija bakterije je bio  $10^3$  CFU/ml; rezultati su prikazani kao  $\log_{10}$  CFU/ml i predstavljaju srednje vrednosti 2 merenja  $\pm$  SD

#### 5.5.4 Ispitivanje antimikrobne aktivnosti kompozitnih cink-alginatnih čestica sa imobilisanim PVP-I

Antibakterijska aktivnost Zn0,5/V čestica sa PVP-I je prvo ispitana u suspenziji *E.coli* ATCC 25922 koncentracije  $10^5$  CFU/ml i koncentraciji čestica od 0,4 g/ml (slika 5.43).

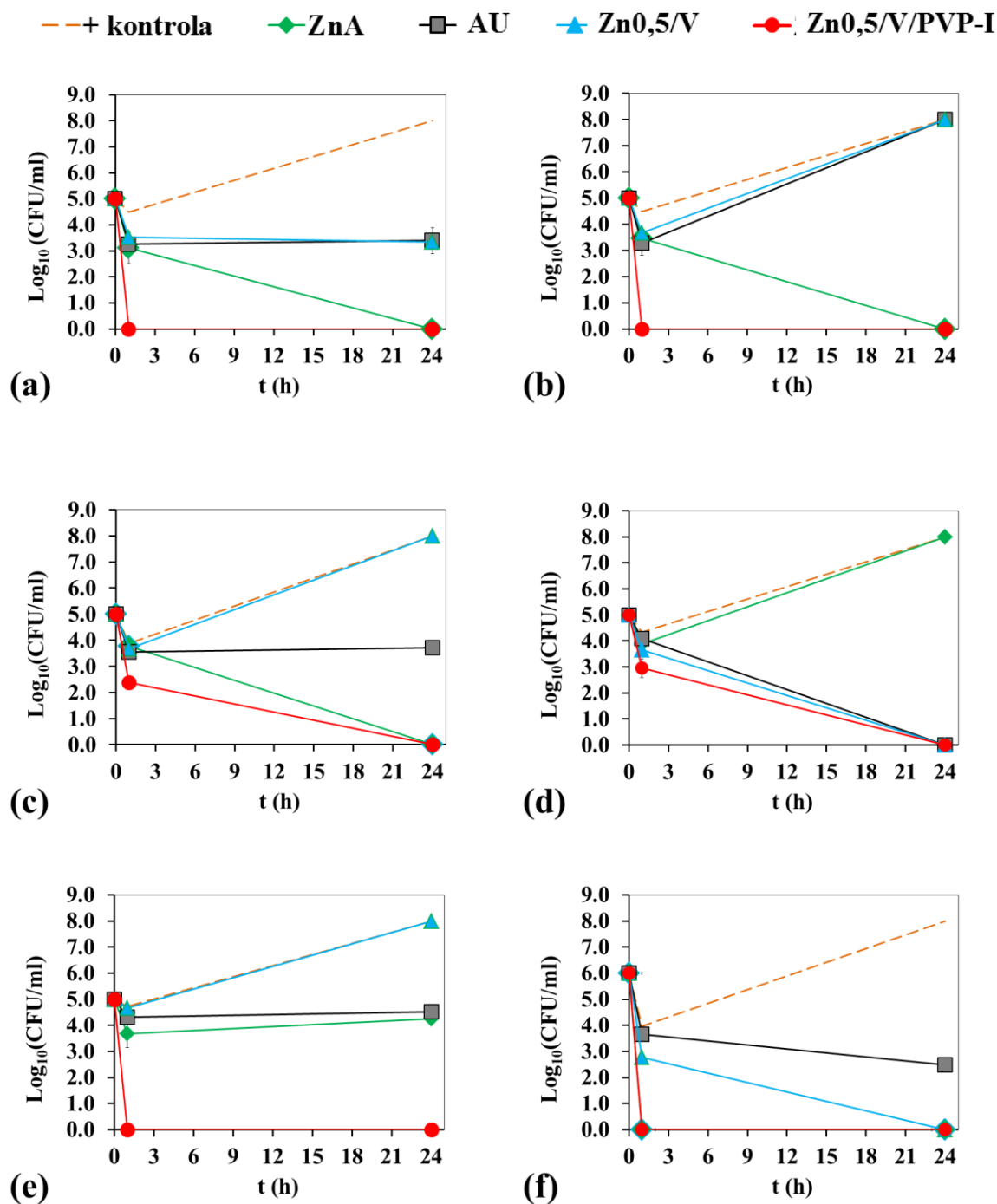


Slika 5.43. Antibakterijska aktivnost Zn<sub>0,5/V</sub> čestica sa PVP-I ispitivana u suspenziji *E. coli* ATCC 25922; kontrole su bile suspenzije mikroorganizama (+ kontrola), AU u prahu, ZnA i Zn<sub>0,5/V</sub> čestice; početni broj ćelija bakterija je bio 10<sup>5</sup> CFU/ml; rezultati su prikazani kao log<sub>10</sub> CFU/ml i predstavljaju srednje vrednosti 2 merenja ± SD

Rezultati su pokazali baktericidan efekat Zn<sub>0,5/V</sub>/PVP-I čestica, ali i Zn<sub>0,5/V</sub> i ZnA čestica. Pri tome su Zn<sub>0,5/V</sub>/PVP-I čestice postigle baktericidni efekat nakon svega 1 h. Prah AU je nakon prvog sata snizio broj ćelija bakterija za 3 logaritamske jedinice, ali nakon 24 h nije imao antibakterijski efekat.

Zatim, antimikrobna aktivnost Zn<sub>0,5/V</sub> čestica sa PVP-I je ispitivana u suspenzijama kliničkih sojeva izolovanih iz rana pacijenata (MRSA, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *P. mirabilis* i *C. albicans*) pri koncentraciji od 10<sup>5</sup> CFU/ml za bakterije i 10<sup>6</sup> CFU/ml za kvasac, kao i koncentraciji čestica od 0,4 g/ml. Rezultati su prikazani na slici 5.43.

Zn<sub>0,5</sub>/V/PVP-I čestice su pokazale mikrobicidni efekat u svim suspenzijama, a posebno u suspenzijama MRSA, *E. coli*, *P. mirabilis* i *C. albicans* gde su u potpunosti redukovale broj ćelija već nakon prvog sata. Takođe, u suspenzijama te četiri vrste mikroorganizama su i kontrolne ZnA čestice pokazale jak antimikrobni efekat, i to *C. albicans* je eliminisana iz rastvora nakon prvog sata, a ostale tri vrste bakterija nakon 24 h. Kompozitne Zn<sub>0,5</sub>/V čestice su imale najslabiju aktivnost i delovale su antimikrobno samo na vrstu bakterije MRSA i vrstu kvasca *C. albicans*, i to na prvu inhibitorno, a na drugu mikrobicidno nakon 24 h. Može se zaključiti da su ove vrste mikroorganizama, MRSA i posebno *C. albicans* pokazale najveću osetljivost na Zn<sup>2+</sup> u odnosu na ostale ispitivane kliničke sojeve pošto su jedino na njih sve tri vrste ispitivanih čestica imale antimikrobni efekat. Sa druge strane, najotpornije na Zn<sup>2+</sup> su se pokazale vrste bakterija *P. mirabilis* i *E. faecalis*. ZnA čestice su na *P. mirabilis* delovale inhibitorno odnosno broj ćelija je nakon 24 h ostao na promenjen ( $10^4$ - $10^5$  CFU/ml), dok Zn<sub>0,5</sub>/V nisu ispoljile antibakterijski efekat. Nasuprot tome, u slučaju vrste bakterije *E. faecalis*, ZnA čestice nisu ispoljile antibakterijski efekat dok su Zn<sub>0,5</sub>/V u potpunosti uklonile bakterijske ćelije iz suspenzije. Međutim, ovaj efekat se najverovatnije može pripisati adsorpciji bakterija na čestice AU kao i u slučaju Ca<sub>0,5</sub>/V čestica, a ne antibakterijskom delovanju Zn<sup>2+</sup> jona. Posebno je interesantan rezultat prema kolekcijskom i kliničkom soju *E. coli*. Naime, Zn<sub>0,5</sub>/V čestice su, nakon 24 h, u potpunosti eliminisale kolekcijski soj iz rastvora (slika 5.43), dok na klinički soj nisu pokazale antibakterijski efekat (slika 5.44).

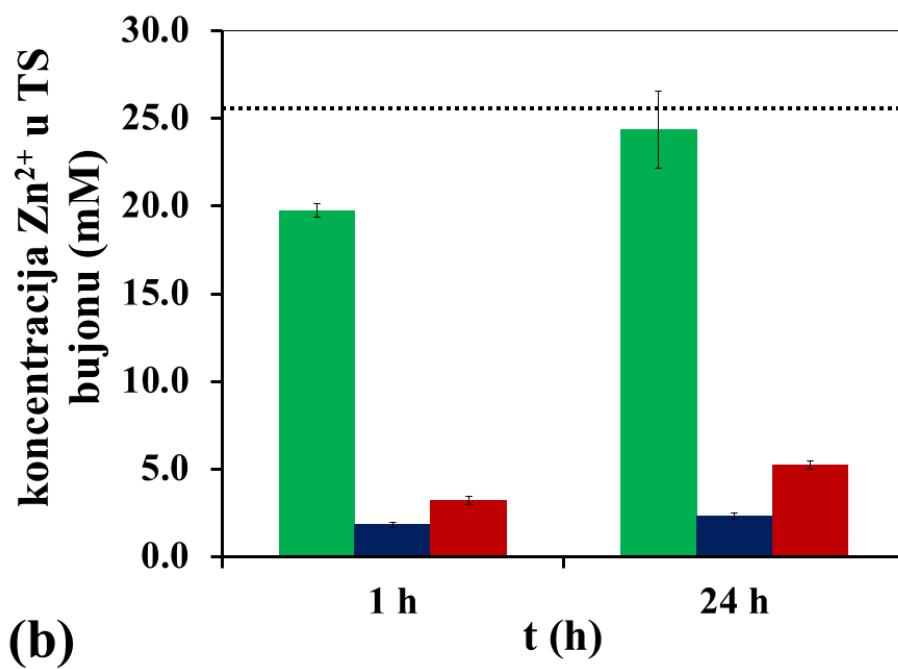
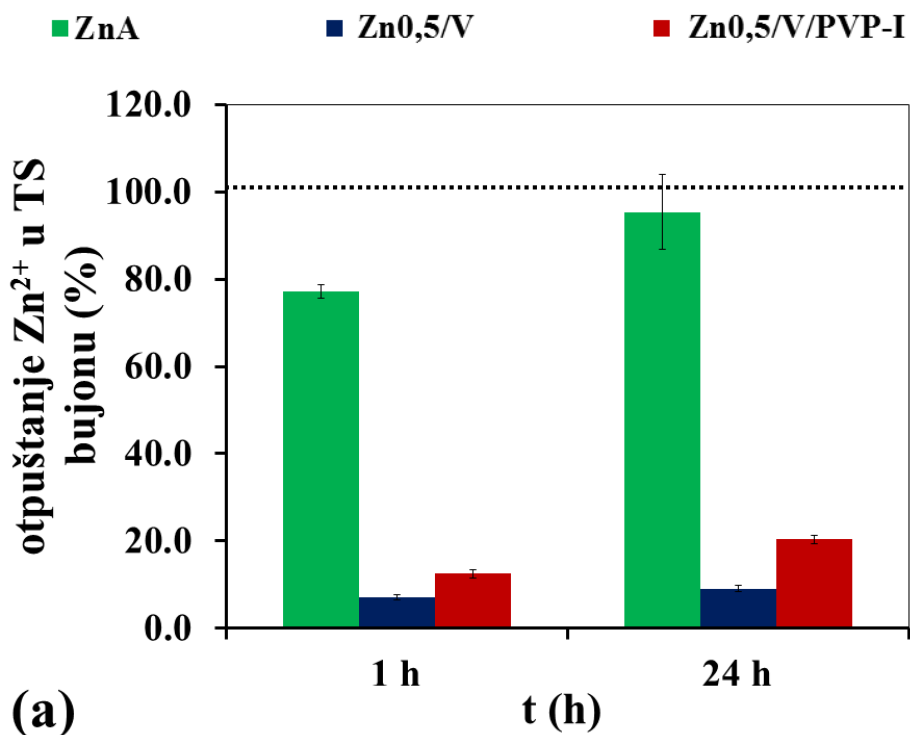


Slika 5.44. Antimikrobna aktivnost Zn<sub>0,5</sub>/V čestica sa PVP-I ispitivana u suspenzijama (a) MRSA, (b) *E. coli*, (c) *P. aeruginosa*, (d) *E. faecalis*, (e) *P. mirabilis*, (f) *C. albicans*; kontrole su bile suspenzije mikroorganizama (+ kontrola), AU u prahu, ZnA i Zn<sub>0,5</sub>/V čestice; početni broj ćelija je bio 10<sup>5</sup> CFU/ml za vrste bakterija i 10<sup>6</sup> CFU/ml za ispitivanu vrstu kvasca; rezultati su prikazani kao log<sub>10</sub> CFU/ml i predstavljaju srednje vrednosti 2 merenja ± SD

### 5.5.5 Ispitivanje otpuštanja jona cinka u TS bujonu

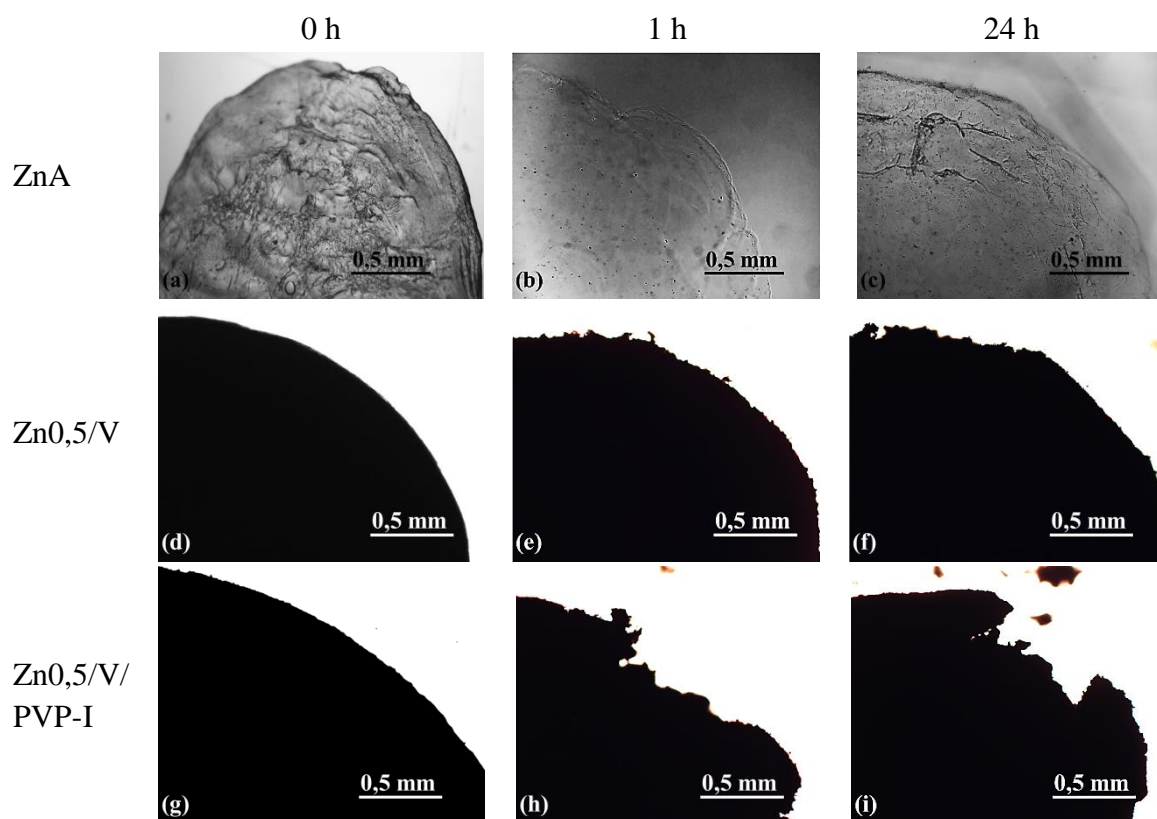
Otpuštanje  $Zn^{2+}$  iz ZnA, Zn0,5/V i Zn0,5/V/PVP-I čestica je praćeno u TS bujonu nakon 1 i 24 h. Rezultati su prikazani na slici 5.45.

Dobijeni rezultati prate sličan trend kao i u slučaju otpuštanja  $Zn^{2+}$  u fiziološkom rastvoru, odnosno najveće je otpuštanje  $Zn^{2+}$  na samom početku tj. u prvom satu nakon čega se postiže ravnoteža. ZnA čestice su otpustile najveći procenat  $Zn^{2+}$ , i to do 80 % tokom prvog sata. Nakon 24 h, čestice su nabubrile i upile skoro svu tečnost, što je veoma otežalo uzorkovanje, tako da je dobijen rezultat od skoro 100 % ukupnog sadržaja  $Zn^{2+}$ , jer su čestice i okolni medijum postali jedna te ista masa. Sa druge strane, kompozitne čestice Zn0,5/V i Zn0,5/V/PVP-I su u TS bujonu otpustile mnogo manje količine  $Zn^{2+}$  u odnosu na ZnA, i to oko 10 i 20 %, redom, tokom 24 h. Međutim, otpuštene koncentracije iz kompozitnih čestica (u opsegu od 1,8-5,2 mM, slika 5.45b) su, prema podacima iz literature, u opsegu MIK za  $Zn^{2+}$  za vrste Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija (*Aarestrup i Hasman, 2004*) koje se često izoluju iz rana pacijenata. Površine čestica slikane optičkim mikroskopom su prikazane na slici 5.46. U slučaju Zn0,5/V/PVP-I čestica, erozije su vidljive već nakon prvog sata, dok Zn0,5/V čestice i nakon 24 h zadržavaju sferičan oblik bez dubokih erozija iako je njihova površina vidljivo grublja.



Slika 5.45. Otpuštanje  $Zn^{2+}$  u TS bujonu iz ZnA, Zn<sub>0,5/V</sub> i Zn<sub>0,5/V/PVP-I</sub> čestica: (a) otpuštena količina  $Zn^{2+}$  ( $M_t$ ) normalizovana u odnosu na vlažnu masu alginata i početnu količinu  $Zn^{2+}$  u česticama ( $M_0$ ), u toku vremena; (b) koncentracija  $Zn^{2+}$  u TS bujonu; eksperimentalni podaci su prikazani kao srednje vrednosti 3 merenja  $\pm$  SD

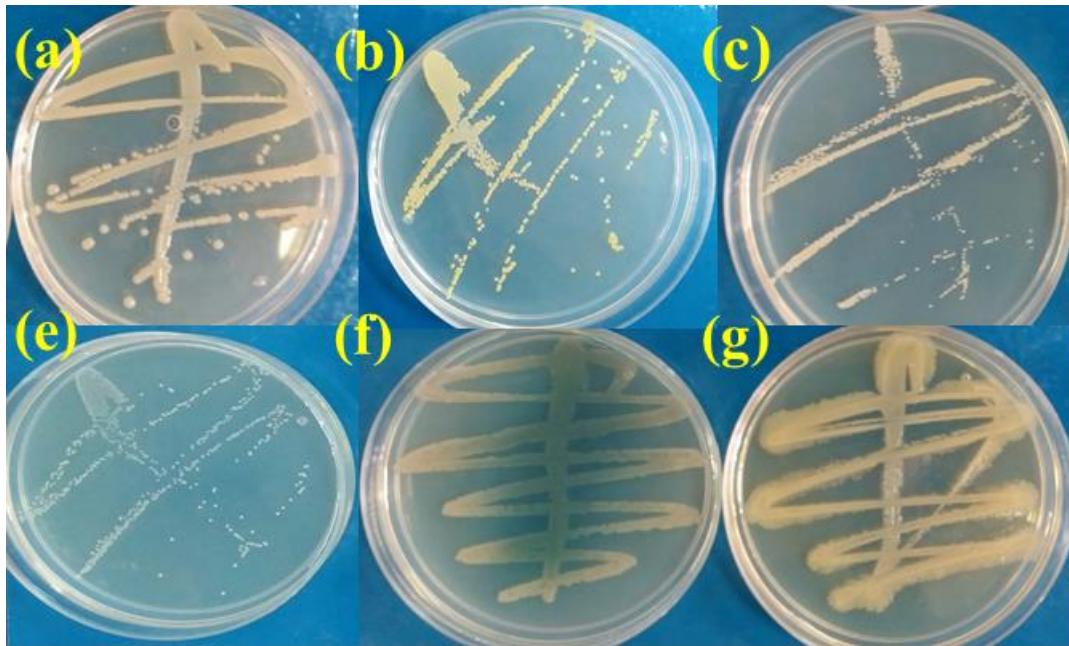




Slika 5.46. Optičke mikrofotografije površina ZnA, Zn0,5/V i Zn0,5/V/PVP-I čestica u TS bujonu: u početnom trenutku (a, d, g redom); nakon 1 h (b, e, h redom); nakon 24 h (c, f, i redom); (razmernik: 0.5 mm)

### 5.5.6 Ispitivanje antimikrobne aktivnosti čestica aktivnog uglja sa adsorbovanim LMJ

Antimikrobna aktivnost liofilizovanih čestica AU sa adsorbovanim LMJ iz rastvora početne koncentracije 1 mg/ml ispitivana je u šest suspenzija kliničkih sojeva izolovanih iz rana pacijenata (MRSA, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *P. mirabilis* i *C. albicans*) pri početnom broju ćelija od  $10^5$  CFU/ml za vrste bakterija i  $10^6$  CFU/ml za ispitivanu vrstu kvasca. U obe eksperimentalne serije koncentracija čestica AU/LMJ je iznosila 0,12 g/ml. Nakon 24 h nije bilo razlike u broju bakterijskih ćelija u odnosu na pozitivnu kontrolu niti u jednoj suspenziji, što ukazuje da čestice AU sa adsorbovnim LMJ nisu ispoljile antimikrobnu aktivnost ni prema jednom ispitivanom kliničkom soju. (slika 5.47).



Slika 5.47. Antimikrobna aktivnost čestica AU sa adsorbovanim LMJ ispitivana u suspenzijama: (a) *E. coli*; (b) *C. albicans*; (c) MRSA; (e) *E. faecalis*; (f) *P. aeruginosa*; (g) *P. mirabilis*

## 5. DISKUSIJA

Cilj ove disertacije je bio razvoj novih kompozita na bazi Ca- i Zn-alginatnih hidrogelova i čestica aktivnog uglja (AU) namenjenih potencijalnoj primeni kao obloge za rane. Pri tome, čestice AU mogu biti impregnirane različitim terapeutski aktivnim supstancama koje se u dodiru sa biološkim fluidima kontrolisano otpuštaju tokom vremena, dok alginatni hidrogel efikasno upija vlagu. Takođe, cilj ove disertacije je bio i karakterizacija dobijenih kompozita, kao i *in vitro* ispitivanje njihove funkcionalnosti u pogledu antimikrobne aktivnosti.

U ovoj tezi, prvi korak je bio optimizacija sastava i uslova geliranja za dobijanje slabo umreženih kompozitnih alginatnih hidrogelova sa sadržanim česticama AU kako bi se u biološkim fluidima kontrolisano otpuštale tokom vremena. U literaturi su opisani različiti sistemi bazirani na alginatu i AU. Ovi sistemi su razvijani sa ciljem potencijalne primene u tretmanu pijućih i otpadnih voda, i njihova glavna funkcija je bila efikasna adsorpcija boja, teških metala, toksičnih organskih i neorganskih jedinjenja, itd (*Park i sar., 2007; Hassan i sar., 2014; Lloyd i sar., 2015*). Takođe, kombinacija ove dve komponente je pokazala sinergistički efekat, i to u smislu veće ukupne adsorpcije neorganskih (alginat) i organskih jedinjenja (AU), u odnosu na pojedinačnu primenu svake od njih (*Park i sar., 2007*). Međutim, funkcionalnost ovih sistema u navedenim primerima je direktno zavisila od toga da čestice AU ostanu zarobljene u alginatnom hidrogelu. Sa druge strane, sistem u ovoj tezi je razvijan sa ciljem korišćenja za biomedicinsku primenu, konkretno za primenu u tretmanu hroničnih rana i njegova funkcionalnost, upravo

suprotno, zavisi od kontrolisanog, kontinuiranog i efikasnog oslobađanje čestica AU iz alginatnog matriksa tokom vremena. Na taj način, otpuštene čestice AU bi bile dovedene u direktan kontakt sa površinom rane, čime bi bila omogućena *in situ* adsorpcija mikroorganizama, toksina i proizvoda degradacije rane, i u isto vreme predstavljale bi i nosače aktivnih supstanci koje bi ispoljavale bioaktivni efekat u samoj rani. U komercijalnoj upotrebi nalaze se brojne obloge za rane koje u svom sastavu imaju sloj aktivisane karbonizovane tkanine. S obzirom da karbonizovana tkanina ima skoro isključivo mikroporoznu strukturu (*Starek i sar., 1994*), njena jedina funkcija je uklanjanje malih molekula odgovornih za pojavu neprijatnog mirisa. U ovom radu korišćen je AU u prahu pošto se njegova struktura može različitim metodama pripreme „krojiti“ prema potrebama (*Marsh i Rodríguez Reinoso, 2006*). Tako se mogu dobiti AU sa dominantno mezo- i makroporoznom strukturom koja samim tim omogućava bolju adsorpciju većih molekula pa i samih ćelija mikroorganizama.

Napravljeno je 12 različitih formulacija smeša alginata i AU (tabela 4.2) od kojih su i uspešno dobijeni kompozitni hidrogelovi sa sadržanim česticama AU u obliku čestica i diskova. Izmerene koncentracije AU u hidrogelovima, merene pomoću UV-vidljive spektrometrije, su bile značajno veće nego u inicijalnim smešama najverovatnije usled kontrakcije alginatnog gela tokom geliranja kao što je to navedeno u literaturi (*Velings i Mestdagh, 1995*). Ovi podaci su u skladu sa rezultatima prethodnih ispitivanja gde je pokazano da je koncentracija srebra bila znatno veća u alginatnim mikročesticama nego u početnom koloidnom rastvoru (*Stojkowska, 2015*). Sledeći korak je bio dobijanje slabo geliranih hidrogelova u cilju obezbeđivanja što efikasnijeg otpuštanja čestica AU. U tom smislu, bilo je potrebno optimizovati koncentraciju dvovalentnih katjona u rastvoru za geliranje. Konkretno, određeno je da optimalna koncentracija

rastvora za geliranje iznosi 60 mM tako da su u daljem radu korišćeni 0,9 mas. % rastvor Ca-klorida dihidrata i 1,8 mas. % rastvor Zn-nitrata heksahidrata.

Lokalni tretman rana (takozvani „TIME“ koncept) podrazumeva korišćenje obloga za rane koje regulišu nivo vlažnosti u rani i samim tim sprečavaju maceraciju okolne kože. Iz tog razloga se kao obloge za rane veoma često koriste hidrogelovi, a jedan od najzastupljenijih je Ca-alginat. S obzirom da se obloge za rane koriste u suvom obliku, sledeći logičan korak u ovoj tezi bio je ispitivanje mogućnosti sušenja, kao i rehidratacije kompozitnih hidrogelova. Sušenjem vlažnih CaA/AU čestica na vazduhu na sobnoj temperaturi dobijene su suve čestice sa istom koncentracijom AU. Mogućnost rehidratacije alginatnog gela je ispitivana u fiziološkom rastvoru na 37 °C kako bi se imitirali uslovi u rani sa sekrecijom. Eksperimentalno dobijeni rezultati su ukazali da prisustvo AU u alginatnom hidrogelu ojačava alginatnu mrežu i otežava bubrenje. Konkretno, može se uočiti da najslabije bubre one čestice koje imaju najveću koncentraciju AU, a najbolje bubre čestice sa najmanjom koncentracijom AU (slike 5.8-5.11). Takođe, od svih 12 grupa čestica najbolje su bubrile čestice sa apsolutno najmanjom količinom AU odnosno 0,5/M što je potvrđeno i mikrofotografijama (slika 5.16). Prema podacima iz literature, kompozitni alginatni hidrogelovi sa sadržanim česticama AU koji su bili umreženi pomoću glutaraldehida su pokazali bolje bubrenje u odnosu na sam alginatni hidrogel umrežen na isti način (*Aminabhavi i sar., 2009*). Razlika u odnosu na dobijene rezultate u ovoj tezi bi mogla da se objasni činjenicom da AU adsorbuje glutaraldehyd (*Lloyd i sar., 2015*) za razliku od jona metala kao što su  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$  (*Park i sar., 2007*) i da je samim tim, kompozitni alginatni hidrogel bio slabije umrežen glutaraldehydom u odnosu na sam alginat geliran na isti način. S obzirom da se prema navodima iz literature može pretpostaviti da AU ne utiče na koncentraciju  $Ca^{2+}$  u gelirajućem rastvoru, a da su ekperimentalni podaci pokazali da je stepen bubrenja manji što je veća

koncentracija AU, može se zaključiti da u slučaju CaA/AU kompozitnih čestica AU sprečava širenje alginatne mreže, i to najverovatnije usled adsorpcije alginatnih lanaca. Takođe, teksturalna karakterizacija kompozitnih hidrogelova je pokazala da je u slučaju kompozitnih čestica sa malim sadržajem AU (1 i 5 mas. %, tabela 5.3) u poređenju sa prahom AU došlo do smanjenja ukupne specifične površine što govori u prilog da je unutar pora AU došlo do depozicije alginata. Ovi podaci su u skladu sa podacima iz literature gde je takođe, teksturalnom karakterizacijom kompozitnih A/AU čestica (0,7 mas. % AU) namenjenih adsorpciji metilen plave boje iz otpadnih voda, pokazano da je došlo do značajne redukcije specifične površine i ukupne zapremine u odnosu na prah AU (*Hassan i sar., 2014*). Ipak, u slučaju čestica sa velikim sadržajem AU (20 mas. %, tabele 5.3 i 5.5) rezultati su pokazali da je uprkos depoziciji alginatnih lanaca ukupna specifična površina AU unutar čestica ostala očuvana. Ovaj rezultat se može objasniti velikom koncentracijom AU i raspoloživom površinom u odnosu na malu koncentraciju alginata u hidrogelu (0,5 i 1,5 mas. %).

Sledeći korak bio je ispitivanje mehanizma i kinetike otpuštanja čestica AU iz kompozitnih A/AU hidrogelova u sredini relevantnoj za biomedicinsku primenu. Kompozitne CaA/AU iz svih 12 grupa su ispitivane u fiziološkom rastvoru kao modelu bioloških fluida sa ciljem identifikacije formulacije sa najboljim profilom otpuštanja. Iako su čestice dobijene iz smeše sa najmanjim koncentracijama alginata i AU (0,5/M) najviše bubrile, u slučaju otpuštanja AU, otpuštena količina AU je bila zanemarljiva. Konkretno, otpuštanje AU iz kompozitnih čestica je pratilo suprotni trend u odnosu na bubrenje i bilo je najveće iz čestica koje su imale najveću koncentraciju AU. Od svih 12 grupa, najveću količinu AU su otpustile čestice Ca0,5/V, i to oko 50 % tokom 5 dana (slika 5.12), dok je iz svih ostalih formulacija otpuštanje nakon 5 dana bilo premalo da bi bilo relevantno za potencijalnu medicinsku primenu (< 15 %). Kao zaključak,

smeša koncentracije 0,5 mas. % alginata i 20 mas. % AU je identifikovana kao optimalna formulacija za dobijanje kompozitnih A/AU čestica za potencijalnu primenu u terapiji hroničnih rana.

Na eksperimentalne podatke otpuštanja AU iz kompozitnih čestica primenjena su tri kinetička modela u cilju definisanja mehanizma procesa. Kinetika nultog reda opisuje sisteme sa konstantnom brzinom otpuštanja supstance i predstavlja ideal kome se teži prilikom formulacije sistema sa kontrolisanim otpuštanjem aktivne supstance. Međutim, alginatni matriks nije inertan i nije realno očekivati da se čestice AU u toku celokupnog vremenskog perioda otpuštaju konstantnom brzinom što je primena ovog modela i potvrdila ne dajući slaganje sa eksperimentalnim rezultatima. Sa druge strane, primenom modela unutrašnje difuzije i Korsmejer-Pepasovog modela, dobijeni su visoki stepeni korelacije ( $R^2 > 0,9$ ) u oba slučaja u svih 12 grupa čestica. Međutim, u slučaju Korsmejer-Pepasovog modela parametar  $n$  eksponent je bio van realnog opsega ( $< 0,5$ ) što je pokazalo da se ovaj model može primeniti samo u slučaju Ca<sub>0,5</sub>/V čestica ( $n=0,63$ ). U tom slučaju je mehanizam otpuštanja uključio i eroziju. Takođe, u slučaju ovih čestica došlo je i do redukcije prečnika za 30 % (sa 3,6 mm na 2,6 mm nakon 5 dana), dok se prečnici kompozitnih čestica iz ostalih grupa u istom vremenskom periodu nisu statistički bitno promenili. U ostalim grupama, model unutrašnje difuzije je uspešno opisao otpuštanje čestica AU pri čemu je i površina ostala glatka što je potvrđeno i mikrofotografijama površina čestica (slike 5.16-5.19).

Odabrana smeša (0,5 mas. % alginata i 20 mas. % AU) je primenjena i za dobijanje kompozitnih Zn-alginatnih čestica. Te kompozitne čestice (Zn<sub>0,5</sub>/V) su otpustile i veću količinu AU u odnosu na Ca<sub>0,5</sub>/V čestice, i to oko 60 % od ukupnog sadržaja AU nakon 5 dana (slika

5.23). I u ovom slučaju se pokazalo da kinetika nultog reda nije bila adekvatan model za opisivanje eksperimentalnih rezultata, što je bilo i očekivano. Međutim, kao i u slučaju CaA/AU kompozitnih čestica, model unutrašnje difuzije i Korsmejer-Pepasov model su pokazali visok stepen korelacije ( $R^2 > 0,9$ ) i određeno je da je mehanizam otpuštanja bio Fikova difuzija ( $n = 0,48$ ). To je potvrđeno i mikrofotografijama površina Zn<sub>0,5</sub>/V čestica (slika 5.22) na kojima se, za razliku od Ca<sub>0,5</sub>/V čestica (slika 5.16), nisu mogle uočiti duboke erozije ni nakon 5 dana u fiziološkom rastvoru. Ovi različiti mehanizmi otpuštanja u slučaju Ca- i Zn<sub>0,5</sub>/V kompozitnih čestica se mogu objasniti različitim mestima vezivanja Ca<sup>2+</sup> i Zn<sup>2+</sup> odnosno činjenicom da su Ca<sup>2+</sup> selektivniji i vezuju se prvenstveno za G ostatke alginatnih lanaca (*Wong i sar., 2004*) dok su Zn<sup>2+</sup> joni manje selektivni i vezuju se ravnomerno i za G i za M ostatke (*McDowell, 1978*) pa je samim tim i otpuštanje AU iz Zn<sub>0,5</sub>/V kompozitnih čestica ravnomernije.

Kompozitne ZnA/AU čestice imaju i tu funkciju da pored otpuštanja čestica AU otpuštaju i jone cinka koji imaju antimikrobnu ulogu. Ukupna količina Zn<sup>2+</sup> u ZnA i Zn<sub>0,5</sub>/V česticama bila je ista i iznosila je ~ 64 μmol/g. Ova vrednost je u skladu sa podacima iz literature, gde je pokazano da je ukupna količina Zn<sup>2+</sup> u Zn-alginatnim mikročesticama sa značajno većom koncentracijom alginata (1,9 mas. % vs. 0,5 mas. % u ovom radu) iznosila 159 ± 7 μmol/g (*Malagurski i sar., 2017*). Ovi ekperimentalni rezultati govore u prilog da AU nije adsorbovao Zn<sup>2+</sup>. U literaturi postoje različiti podaci vezano za adsorpciju Zn<sup>2+</sup> od strane AU. Neke studije su pokazale da je AU efikasan adsorbent za teške metale uključujući i Zn<sup>2+</sup> (*Madhava i sar., 2008; Kouakou i sar., 2013*) dok su druge pokazale da AU ima veoma mali afinitet prema Zn<sup>2+</sup> (*Gyu i sar., 2007*). Treba naglasiti da efikasnost adsorpcije različitih supstanci na AU, pa tako i teških metala, zavisi pre svega od prisustva funkcionalnih grupa na površini AU. Koje će funkcionalne grupe na površini biti prisutne, direktno zavisi od uslova



aktiviranja i korišćene temperature prilikom dobijanja AU. Pokazano je da je stepen adsorpcije jona metala pa tako i  $Zn^{2+}$  u direktnoj zavisnosti od prisustava sumpornih funkcionalnih grupa na površini AU (Bandosz, 2006; Madhava i sar., 2008). Međutim, u ovom radu korišćen je AU za medicinsku upotrebu dobijen aktivacijom sa vodenom parom i FT-IR analizom je potvrđeno da na njegovoj površini nema funkcionalnih grupa koje sadrže sumpor (slika 5.7). Eksperimentalna ispitivanja otpuštanja  $Zn^{2+}$  su pokazala da su se ovi joni, za razliku od čestica AU, otpustili brzo i da je već nakon prvog sata postignuta ravnoteža i u slučaju ZnA i Zn<sub>0,5</sub>/V čestica. Otpuštena koncentracija u medijumu je iznosila  $321,9 \pm 10,3$  i  $310,3 \pm 3,1$  mg/l, redom. Treba napomenuti da će otpuštena koncentracija  $Zn^{2+}$  u realnoj primeni zavisiti od količine i brzine izmene eksudata u rani. U svakom slučaju može se očekivati brzo uspostavljanje ravnoteže, a postizanje terapijski aktivnih koncentracija će zavisiti od uslova tokom primene (veličina obloge, količina eksudata, učestalost zamene obloge i sl.).

U ovoj tezi je ispitana i hipoteza o mogućnosti imobilizacije terapijski aktivne supstance i to, u ovom slučaju sa antimikrobnim dejstvom, adsorpcijom na čestice AU. Globalno javno zdravlje danas je ugroženo pojavom multirezistentnih sojeva mikroorganizama i sve je više prisutna svest o potrebi racionalnije upotrebe antibiotika. Iz bolničkog, a sve češće i iz vanbolničkog okruženja se izoluju sojevi „super-bakterija“ koji predstavljaju veliki terapijski problem (Spellberg i sar., 2008). S obzirom na tu činjenicu, jedan od glavnih ciljeva ove disertacije bio je da se razvije antimikrobni sistem koji bi izbegao upotrebu antibiotika. U tom smislu odabrane su dve model supstance, PVP-I i LMJ, za impregnaciju odabranih kompozitnih čestica Ca<sub>0,5</sub>/V i Zn<sub>0,5</sub>/V. PVP-I je odabran kao efikasan antiseptik koji je u standardnoj medicinskoj upotrebi u celom svetu već preko 150 godina (Bigliardi i sar., 2017), koji ima širok spektar antimikrobnog delovanja i jedna je od retkih antimikrobnih supstanci za koju do danas

nije dokumentovana pojava stečene niti ukrštene rezistencije. Međutim, problem primene PVP-I je opasnost od sistemske adsorpcije joda što može dovesti do neželjenih efekata, posebno u slučaju dugotrajne upotrebe npr. kod opekotina, zatim rana velike površine kao i kod dece (*Dela Cruz i sar., 1987; Findik i sar., 2010; Erdogan i sar., 2013*). Sa druge strane, veoma je aktuelno i ispitivanje i razvoj novih antimikrobnih supstanci kao što su lignin i LMJ čija je antimikrobna aktivnost pokazana prema različitim kolekcijским i kliničkim sojevima. (*Slavikova i Kosikova, 1994; Nelson i sar., 1994; Spasojević i sar., 2016*).

PVP-I je uspešno adsorbovan metodom potapanja kompozitnih Ca<sub>0,5</sub>/V i Zn<sub>0,5</sub>/V čestica u 10 mas. % rastvor PVP-I. Prisustvo joda u kompozitnim česticama je, zatim, potvrđeno pomoću EDS analize (tabela 5.6), dok je prisustvo PVP potvrđeno FT-IR analizom (slika 5.27). Takođe, nakon adsorpcije, u početnom rastvoru nije više bilo moguće detektovati jod UV-vidljivom spektroskopijom (slika 5.26). Ovi rezultati nesumnjivo potvrđuju da je jod u potpunosti adsorbovan na čestice AU, što je i očekivano s obzirom na veliki afinitet AU prema jodu (*Marsh i Rodríguez Reinoso, 2006*). Studije desorpcije su, zatim, pokazale da je jod čvrsto vezan za čestice AU i da se nije otpustio ni u okolni alginatni matriks niti u fiziološki rastvor u periodu od 48 h odnosno karakterističan pik nije detektovan UV-vidljivom spektroskopijom niti u jednom od ova dva slučaja. Međutim, adsorpcija PVP-I je imala uticaj na otpuštanje čestica AU iz Zn<sub>0,5</sub>/V/PVP-I kompozitnih čestica. Iako nije bilo statistički značajne razlike u ukupno otpuštenoj količini AU nakon 5 dana u fiziološkom rastvoru (oko 60 %), početna brzina otpuštanja čestica AU je bila mnogo brža u slučaju impregniranih čestica u odnosu na Zn<sub>0,5</sub>/V čestice. Ovaj rezultat ukazuje da su veze između alginata i AU, nakon adsorpcije PVP-I, oslabile i samim tim AU se brže i lakše otpuštao iz kompozitnih čestica. U pogledu otpuštanja Zn<sup>2+</sup>, i u ovom slučaju kao i kod ZnA i Zn<sub>0,5</sub>/V čestica, ravnoteža je postignuta u toku prvog sata i nakon

toga se nije značajnije menjala u toku 5 dana. Međutim, izmerene vrednosti koncentracija su bile dosta manje u odnosu na vrednosti otpuštenih koncentracija  $Zn^{2+}$  iz ZnA i Zn0,5/V čestica ( $321,9 \pm 10,3$  i  $310,3 \pm 3,1$  mg/l, redom vs.  $166,1 \pm 10,0$  mg/l). Ovaj rezultat se može objasniti afinitetom PVP prema  $Zn^{2+}$  usled snažnog afiniteta piridil-grupe ka metalima (Wang i sar, 2006).  $Zn^{2+}$  je zatim najverovatnije centrifugiranjem odstranjen iz rastvora sa česticama AU pre merenja koncentracije  $Zn^{2+}$  u rastvoru.

Druga model supstanca korišćena u ovom radu bila su LMJ. LMJ su, takođe, uspešno adsorbovana na čestice AU, i to iz tri rastvora različitih koncentracija (slika 5.34), što je potvrđeno i FT-IR analizom (slika 5.35) liofilizovanog AU nakon adsorpcije. Takođe, i u ovom slučaju je pokazano da se LMJ čvrsto vezuju za čestice AU i da ne dolazi do desorpcije ovih jedinjenja u fiziološkom rastvoru nakon perioda od 72 h (slika 5.36).

Dobijene impregnirane Ca- i Zn-kompozitne čestice sa PVP-I, kao i AU sa adsorbovanim LMJ su, zatim ispitane u pogledu funkcionalnosti i to u odnosu na antimikrobnu aktivnost. Prvi korak bio je optimizacija procedure ispitivanja antimikrobne aktivnosti. U literaturi je predložen broj obrtaja od  $600 \times g$  za izdvajanje čestica AU iz bakterijskih suspenzija (Naka i sar., 2001). I u ovoj tezi taj broj obrtaja se pokazao optimalan za efikasno uklanjanje čestica AU sa adsorbovanim bakterijama bez uticaja na broj slobodnih bakterija u suspenziji. Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti korišćeni su kolekcijски bakterijski sojevi (*S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 27853 i *E. coli* ATCC 25922), kao i klinički rezistentni sojevi izolovani iz rana pacijenata (MRSA, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *E. faecalis* i *C. albicans*). Ove vrste mikroorganizama spadaju među najčešće izolovane predstavnike iz humanih rana, a konkretni sojevi su odabrani na osnovu antibiograma odnosno dokazane rezistencije prema barem jednom

antibiotiku (tabela 4.1), a u cilju ispitivanja kompozitnih čestica u uslovima što približnijim realnim uslovima u rani.

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti Ca<sub>0,5</sub>/V/PVP-I čestica prema dva kolekcijska soja *S. aureus* i *P. aeruginosa* su pokazali da sve komponente ovog sistema, i alginat i AU i jod adsorbovan na AU, imaju antibakterijski efekat na rast Gram pozitivnih i Gram negativnih vrsta bakterija. Najslabiji efekat su ispoljile CaA čestice, što je i očekivano. CaA čestice su blago redukovale broj ćelija bakterija za red veličine 1-1,5 logaritamske jedinice, najverovatnije putem imobilizacije bakterija u alginatni matriks (*Qin, 2007*). Mnogo značajnijim se pokazao antibakterijski efekat AU u prahu, što je i očekivano. Naime, poznato je da AU može veoma brzo da smanji broj ćelija bakterija, i to već tokom prvog sata (*Muller i sar., 2003; Naka et al., 2001*), što su eksperimentalni rezultati u ovoj tezi i potvrdili. Međutim, u literaturi nema mnogo podataka o uticaju AU na broj ćelija bakterija nakon dužeg vremenskog perioda (npr. nakon 24 h), a sa tačke tretmana hroničnih rana ti podaci bi bili mnogo relevantniji. Eksperimentalni podaci dobijeni u ovom radu su pokazali da je AU u prahu, nakon 24 h, značajno redukovao broj bakterija u većini suspenzija, i to za 3-4 logaritamske jedinice u odnosu na pozitivnu kontrolu. Sa druge strane, Ca<sub>0,5</sub>/V čestice su antibakterijski efekat ispoljile jedino u supenziji *E. faecalis*, dok na druge vrste mikroorganizama nisu imale nikakav antibakterijski efekat. Ovi različiti rezultati između praha AU i Ca<sub>0,5</sub>/V čestica se mogu objasniti sporim otpuštanjem čestica AU iz kompozitnih Ca<sub>0,5</sub>/V. Naime, u slučaju AU u prahu, cela količina je odmah na raspolaganju za adsorpciju, što se u konkretnom slučaju pokazalo presudnim, s obzirom da je adsorpcija ćelija bakterija na AU dozno-zavisna odnosno zavisna od njegove količine (*Naka et al. 2001*).

U ovom radu, eksperimentalno dobijeni rezultati za suspenzije Gram pozitivne vrste bakterije *E. faecalis* i Gram negativne vrste bakterije *E. coli* predstavljaju izuzetak i zaslužuju poseban osvrt. Naime, nakon 24 h, ni AU ni Ca0,5/V čestice nisu pokazale antibakterijski efekat u suspenziji *E. coli* (slika 5.40b), dok su ćelije *E. faecalis* u istom vremenskom periodu u potpunosti eliminisane iz suspenzije (slika 5.40d), najverovatnije putem adsorpcije. Ovi rezultati pokazuju da na dugoročan efekat AU na broj ćelija bakterija, pored njihovog početnog broja, presudan uticaj mogu imati i njihove druge specifične karakteristike. Rezultati dobijeni u ovoj tezi su pokazali da AU ima veći afinitet prema Gram pozitivnim nego prema Gram negativnim vrstama bakterija. Takođe, karakteristika *E. coli* da se veoma brzo razmnožava, pri čemu njeno generacijsko vreme pod optimalnim uslovima iznosi svega oko 15-20 min, može biti bitan faktor koji presudno utiče na brzinu popunjavanja unutrašnje i spoljašnje površine AU. Kada se sva raspoloživa površina popuni, adsorbovane bakterijske ćelije se odvajaju sa površine AU i ponovo vraćaju nazad u bujon (slika 5.42). Sve u svemu, može se zaključiti da iako AU uglavnom u značajnoj meri redukuje bakterijske ćelije putem adsorpcije, za antimikrobni efekat u realnoj primeni je presudno prisustvo antimikrobne supstance.

Ca-kompozitne čestice impregnirane sa PVP-I su ispoljile snažan antimikrobni efekat u svim suspenzijama. Izuzetak je predstavljala suspenzija *C. albicans*, u kojoj Ca0,5/V/PVP-I čestice nisu postigle antifungalni efekat, ali su, nakon 24 h, u značajnoj meri redukovale broj ćelija kvasaca. Antimikrobno dejstvo slobodnog joda uključuje više mehanizama delovanja na bakterijske ćelije kao što su deaktivacija proteina, DNK i RNK, kao i inhibiciju funkcije vitalnih struktura kao što je ćelijska membrana putem oksidacije masnih i aminokiselina (Bigliardi i sar., 2017). Rezultati dobijeni u ovom radu su pokazali da je antimikrobni efekat adsorbovanog joda na česticama AU postignut putem direktnog kontakta sa citoplazmatičnom membranom

bakterijske ćelije bez otpuštanja joda u okolni rastvor, što se ispostavilo dovoljnim za postizanje efikasnog baktericidnog efekta. Čak i u slučaju veoma velikog početnog broja ćelija bakterija (oko  $10^7$  CFU/ml) i tri puta niže koncentracije impregniranih čestica, adsorbovani jod se pokazao kao efikasan antibakterijski agens. Iako nakon 24 h nije postignut baktericidni efekat, ćelije bakterija su u značajnoj meri redukovane, i to za 3-5 logaritamskih jedinica u odnosu na pozitivnu kontrolu (slika 5.41).

Zn-kompozitne čestice impregnirane sa PVP-I su postigle još brži efekat nego Ca<sub>0,5</sub>/V/PVP-I. U većini ispitivanih suspenzija, bakterije su bile eliminisane već nakon prvog sata (slike 5.43 i 5.44), dok je u suspenzijama sa Ca<sub>0,5</sub>/V/PVP-I česticama bilo potrebno oko 3 h da bi se eliminisale ćelije bakterija *S. aureus* i *P. aeruginosa* (slika 5.39). Eksperimentalno dobijeni podaci su pokazali da je otpuštanje čestica AU brže iz Zn-kompozitnih čestica (slika 5.23) u odnosu na Ca-kompozitne čestice (slika 5.12). Sa druge strane, ZnA čestice iako su otpustile 6 puta veću količinu  $Zn^{2+}$  u TS bujonu u odnosu na Zn<sub>0,5</sub>/V/PVP-I tako da su koncentracije  $Zn^{2+}$  u rastvorima iznosile 19,8 vs. 3,2 mM, redom (slika 5.45b), tokom prvog sata nisu postigle baktericidni efekat niti u jednoj bakterijskoj suspenziji. Takođe, nakon prvog sata nije postojala statistički značajna razlika u rezultatima između ZnA i kompozitnih Zn<sub>0,5</sub>/V čestica, iako su ZnA čestice u TS bujonu otpustile 11 puta veću količinu  $Zn^{2+}$  (19,8 vs. 1,8 mM, redom, slika 5.45b). Međutim, nakon 24 h, iako otpuštena količina  $Zn^{2+}$  u TS bujonu nije bila značajno viša u odnosu na prvi sat (~ 24,4 mM), ZnA čestice su postigle baktericidni efekat u suspenzijama MRSA, *E. coli* i *P. aeruginosa* (slika 5.44). Iz ovih rezultata se može zaključiti da je jonima  $Zn^{2+}$  potrebno duže vreme za ispoljavanje antibakterijskog efekta u odnosu na adsorbovani jod koji deluje vrlo brzo direktnim kontaktom sa citoplazmatičnom membranom bakterije. Brži antimikrobni efekat Zn<sub>0,5</sub>/V/PVP-I čestica u odnosu na Ca<sub>0,5</sub>/V/PVP-I čestice je

stoga najverovatnije posledica bržeg otpuštanja čestica AU i samim tim adsorbovanog joda u rastvor, a ne delovanja  $Zn^{2+}$ . Sa druge strane, otpušteni  $Zn^{2+}$  joni mogu imati u rani odloženo dejstvo što takođe može biti povoljno.

Prema eksperimentalno dobijenim rezultatima, najveću osetljivost na delovanje  $Zn^{2+}$  je pokazala vrsta kvasca *C. albicans*. Konkretno, od svih ispitivanih sojeva jedino su prema njoj sve tri vrste ispitivanih čestica Zn-alginata (ZnA, Zn0,5/V i Zn0,5/V/PVP-I) ispoljile antifungalni efekat. ZnA i Zn0,5/V/PVP-I čestice su postigle antifungalni efekat već nakon prvog sata, pri čemu su koncentracije u bujonu iznosile ~ 19,8 i 3,2 mM  $Zn^{2+}$ , redom, dok je Zn0,5/V česticama za postizanje istog efekta bilo potrebno 24 h (slika 5.44f), a koncentracija otpuštenog  $Zn^{2+}$  je iznosila ~ 2,3 mM. Sa druge strane, Ca0,5/V/PVP-I čestice, iako su značajno redukovale broj ćelija *C. albicans*, nisu postigle antifungalni efekat ni nakon 24 h (slika 5.40f) odnosno adsorbovani jod je prema *C. albicans* pokazao najslabije delovanje u poređenju sa svim ostalim kliničkim sojevima. Čak je i AU u prahu redukovao broj ćelija *C. albicans* za 0,5-1 logaritamsku jedinicu više u odnosu na Ca0,5/V/PVP-I čestice (slika 5.40f). S obzirom da prema podacima iz literature *Candida* spp. spada u mikroorganizme koji imaju višu toleranciju prema teškim metalima (Harrison i sar., 2007), može se zaključiti da je brzo antifungalno dejstvo Zn0,5/V/PVP-I čestica najverovatnije posledica sinergističkog delovanja čestica AU, adsorbovanog joda i  $Zn^{2+}$ .

Od ispitivanih bakterija, MRSA se pokazala najosetljivijom na delovanje  $Zn^{2+}$ . Antibakterijski efekat je u slučaju Zn0,5/V/PVP-I čestice postignut već nakon prvog sata, dok je ZnA česticama bilo potrebno 24 h (slika 5.44a). Zn0,5/V kompozitne čestice su tokom 24 h otpustile najmanju količinu  $Zn^{2+}$  tako da je koncentracija iznosila ~ 2,3 mM  $Zn^{2+}$  što je bilo

dovoljno za inhibitorski efekat, što je u skladu sa podacima iz literature gde je pokazano da se vrednosti MIK za stafilokoke kreću u opsegu od 0,25-2 mM  $Zn^{2+}$  (Van Alen i sar., 2018). Treba napomenuti da se sojevi kod kojih je vrednost MIK  $> 2$  mM smatraju rezistentnim na  $Zn^{2+}$  (Van Alen i sar., 2018). U slučaju MRSA humanog porekla koje su izolovane iz bolničkog okruženja rezistencija na  $Zn^{2+}$  je veoma retka pojava odnosno pokazano je da je svega oko 2 % sojeva rezistentno na  $Zn^{2+}$  (Van Alen i sar., 2018). Međutim, tokom poslednje decenije epidemiološka ispitivanja su detektovala pojavu sojeva MRSA životinjskog porekla koje izazivaju zoonoze odnosno mogu se preneti sa životinje na čoveka (Van Alen i sar., 2018). Čak štaviše, određeni sojevi kao što je MRSA CC398 se nakon toga mogu prenositi i interhumano odnosno sa čoveka na čoveka. Ono što je zabrinjavajuće je da su humani izolati MRSA životinjskog porekla rezistentni na  $Zn^{2+}$  u preko 50 % slučajeva (Van Alen i sar., 2018). Dodavanje Zn-oksida kao antimikrobnog agensa u hranu domaćih životinja u cilju njihovog boljeg rasta i prevencije gastrointestinalnih poremećaja (Van Paemel i sar., 2010; Lazarus i sar., 2015; Angeles Argudín i Butaye, 2016) je postala veoma rasprostranjena pojava, posebno nakon zabrane korišćenja antibiotika prilikom uzgoja životinja. Međutim, pored evidentnih pozitivnih efekata, smatra se da je široka upotreba ovog teškog metala prilikom uzgoja stoke istovremeno proizvela selektivni pritisak za razvijanje sojeva *S. aureus* koji su rezistentni i na cink i na meticilin. Konkretno, teški metali vrše selektivni pritisak usled koga dolazi do razvoja rezistencije prema metalima, ali i do razvoja rezistencije prema antibioticima, pošto su ove dve vrste rezistencije genetski i fiziološki povezane (Poole, 2017). Takođe, selektivni pritisak  $Zn^{2+}$  na preživljavanje rezistentnih sojeva je dokumentovan i u slučaju vrste bakterije *E. coli*. Pokazano je da  $Zn^{2+}$  selektuje sojeve koji su rezistentni na sulfametoksazol, ciprofloksacin ili imaju stečenu multi-rezistentnost (Becerra-Castro i sar., 2015). U ovoj tezi ispitivano je delovanje  $Zn^{2+}$  na kolekcijski soj *E. coli* ATCC



25922 i soj *E. coli* koji je, pored ostalih, bio otporan i na dva navedena antimikrobna leka (tabela 4.1). Eksperimentalno dobijeni rezultati su pokazali da su Zn<sub>0,5/V</sub> kompozitne čestice, nakon 24 h, postigle baktericidni efekat u suspenziji kolekcijskog soja (slika 5.43) dok na klinički soj nisu imale antibakterijski efekat (slika 5.44b), što potvrđuje tezu da Zn<sup>2+</sup> mogu da selektuju rezistentne sojeve bakterija.

Neke vrste bakterija imaju urođeno veću toleranciju na Zn<sup>2+</sup> (Teitzel i Parsek, 2003), a *P. aeruginosa* je jedna od njih. Eksperimentalno dobijeni rezultati su pokazali da koncentracija ~ 2,3 mM Zn<sup>2+</sup> koja je postignuta primenom Zn<sub>0,5/V</sub> čestica za 24 h nema antibakterijski efekat prema ovoj vrsti bakterija, što je u skladu sa podacima iz literature za vrednost MIK koja iznosi 8 mM Zn<sup>2+</sup> (Teitzel i Parsek, 2003). Međutim, rezultati dobijeni u ovoj tezi su pokazali da su se još otpornijim na Zn<sup>2+</sup> pokazali sojevi vrsta *P. mirabilis* i *E. faecalis*. ZnA čestice koje su nakon 24 h oslobodile vrlo visoku koncentraciju od 24,4 mM Zn<sup>2+</sup> su prema *P. aeruginosa* delovale baktericidno, dok su na *P. mirabilis* delovale inhibitorno, a prema *E. faecalis* nisu pokazale antibakterijski efekat. Prema podacima iz literature, rezistencija na antibiotik ampicilin može biti povezana sa povišenom tolerancijom na Zn<sup>2+</sup>. Konkretno, pokazano je da su ampicilin rezistentni sojevi u 50 % slučajeva tolerantni i na Zn<sup>2+</sup> (Sabry i sar., 1997). S obzirom da su ispitivani sojevi *P. mirabilis* i *E. faecalis* rezistentni na ampicilin (tabela 4.1) to bi moglo objasniti njihovu toleranciju prema ovako visokim koncentracijama Zn<sup>2+</sup>. Takođe, prema literaturi MIK vrednosti određene za *E. faecalis* su se kretale u širokom opsegu od 2-12 mM Zn<sup>2+</sup>, s tim što je za najveći broj izolata (24/26) bila u opsegu 8-12 mM (Aarestrup i Hasman, 2004). Ovi podaci govore u prilog prirodno visokoj toleranciji vrste bakterije *E. faecalis* na Zn<sup>2+</sup>. Međutim, za razliku od Zn<sup>2+</sup> koji ni u visokim koncentracijama nije imao antibakterijski efekat na *E. faecalis*, AU se pokazao veoma efikasnim. Konkretno, Zn<sub>0,5/V</sub> čestice i AU u prahu (slika 5.44d) su slično kao i

CaO<sub>5</sub>/V čestice (slika 5.40d) nakon 24 h u potpunosti odstranile *E. faecalis* iz suspenzije, i to najverovatnije putem adsorpcije.

Najzad, ispitana je antimikrobna aktivnost i druge model supstance adsorbovane na čestice AU. Primjenjene su suspenzije šest rezistentnih kliničkih sojeva izolovanih iz rana pacijenata i to MRSA, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *E. faecalis* i *C. albicans* (tabela 4.1). Prema literaturi, LMJ su pokazala antimikrobnu aktivnost prema više kolekcijskih i kliničkih sojeva, a vrednosti MIK su se kretale u opsegu od 0,12-0,5 mg/ml, dok su se vrednosti MBK kretale u opsegu 0,25-0,9 mg/ml (*Spasojević i sar., 2016*). Koncentracija adsorbovanih LMJ primjenjena u suspenzijama mikroorganizama u ovoj tezi je bila znatno veća i iznosila je 16,8 mg/ml. I pored toga, adsorbovana LMJ nisu pokazala antimikrobni efekat niti prema jednom od ispitivanih sojeva (slika 5.47). Tačan mehanizam antimikrobnog dejstva LMJ još uvek nije utvrđen (*Spasojević i sar., 2016*). Prilikom adsorpcije na AU, pokazano je da se LMJ čvrsto vezuju na čestice AU i da ne dolazi do desorpcije u fiziološki rastvor što znači da je za postizanje antimikrobnog efekta, slično kao u slučaju adsorbovanog joda, neophodno da LMJ deluju direktno na citoplazmatičnu membranu mikroorganizma. Međutim, nije poznato da li LMJ imaju ovakvo dejstvo, a takođe moguće je da je prilikom adsorpcije došlo do promene konformacije aktivne komponente LMJ koja je nakon toga izgubila sposobnost vezivanja za ćelije mikroorganizama. Takođe, treba napomenuti da je tokom centrifugiranja rastvora LMJ različite koncentracije sa česticama AU uočeno da se čestice AU mnogo lakše izdvajaju iz rastvora u početnom periodu (prvih 6 h) nego nakon 24 h, a posebno nakon 48 h što bi moglo značiti da se ne adsorbuju sve komponente LMJ ravnomerno tokom vremena. Takođe, u našem radu LMJ su prvi put testirana prema rezistentnim sojevima pa je i to faktor koji bi mogao imati uticaja na odsustvo antimikrobne aktivnosti s obzirom na dosta čestu pojavu ukrštene rezistencije između

antibiotika i drugih biocida (*Wales i Davies, 2015*). U svakom slučaju, potrebna su dalja istraživanja u pravcu utvrđivanja mehanizma delovanja LMJ.

## 7. Zaključak

Predmet istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji je dobijanje i karakterizacija slabo umreženih kompozitnih alginatnih hidrogelova sa sadržanim česticama AU koje se prilikom kontakta sa biološkim fluidima kontrolisano otpuštaju u okolnu sredinu i vrše adsorpciju bakterija, toksina i metaboličkih proizvoda rane, a istovremeno predstavljaju i nosače za terapijski aktivne supstance kao što su antimikrobni agensi. U ovoj disertaciji je ispitivana adsorpcija dve model antimikrobne supstance, i to PVP-I i LMJ. Funkcionalnost ovih kompozita direktno zavisi od stepena efikasnosti otpuštanja čestica AU iz alginatnog hidrogela pa je samim tim veoma značajno poznavanje mehanizma i kinetike njihovog otpuštanja. U ovoj disertaciji poseban fokus je bio stavljen na ispitivanje funkcionalnosti ovih kompozita odnosno njihove antimikrobne aktivnosti i to prema većem broju relevantnih vrsta mikroorganizama kako kolekcijskih, tako i rezistentnih kliničkih sojeva izolovanih iz rana pacijenata.

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Iz smeša alginata koncentracija u opsegu od 0,5 - 2 mas. % i AU u opsegu od 1-20 mas. % uspešno su metodom ekstruzije dobijene sferične kompozitne Ca-alginatne čestice (CaA/AU) prečnika u opsegu od 3 - 4 mm. Dobijene čestice su sadržale nekoliko puta (1,5 - 3) veću koncentraciju AU u poređenju sa inicijalnim smešama što se može objasniti kontrakcijom gela u toku geliranja pri čemu je kontrakcija gela bila obrnuto proporcionalna koncentraciji AU.

- Ispitivanjem teksturalnih karakteristika kompozitnih čestica pokazano je da dolazi do depozicije alginatnih lanaca unutar pora AU i ta pojava je najizraženija pri maloj koncentraciji AU. Sa porastom koncentracije AU, a samim tim i ukupne specifične površine, smanjenje veličine pora i poroznosti usled depozicije alginatnih lanaca postaje zanemarljivo.
- Ispitivanjem kinetike otpuštanja AU iz suvih CaA/AU čestica u fiziološkom rastvoru utvrđeno je da je optimalna smeša sastava 0,5 mas. % alginata i 20 mas. % AU. Čestice dobijene iz te smešte (0,5/V) su otpustile oko 50 % ukupnog sadržaja AU u fiziološkom rastvoru tokom perioda od 5 dana odnosno periodu relevantnom za tretman hroničnih rana.
- Model unutrašnje difuzije je uspešno opisao kinetiku otpuštanja AU iz CaA/AU čestica osim u slučaju optimalnih Ca<sub>0,5</sub>/V čestica kod kojih dolazi do erozije površine tako da je primena Korsmejer-Pepasovog modela dala najbolje rezultate.
- Ekstruzijom smeše optimalnog sastava u rastvor koji je sadržao jone cinka uspešno su dobijene Zn<sub>0,5</sub>/V kompozitne čestice prečnika oko 4 mm. U toku 5 dana u fiziološkom rastvoru ove čestice su otpustile oko 60 % ukupnog sadržaja AU.
- Kompozitne čestice Ca- i Zn<sub>0,5</sub>/V su uspešno impregnirane sa prvom model supstancom tj. PVP-I i to metodom jednostavnog potapanja u 10 mas. % vodeni rastvor. PVP-I je adsorbovan na čestice AU unutar kompozitnih hidrogelova što je potvrđeno UV-vidljivom spektroskopijom, EDS i FT-IR analizama.

- Ispitivanjem desorpcije PVP-I sa čestica AU utvrđeno je da je PVP-I čvrsto vezan za čestice AU i da je stepen desorpcije u okolni alginatni matriks, kao i u fiziološki rastvor tokom perioda od 48 h beznačajan odnosno ispod nivoa detekcije pomoću UV-vidljive spektroskopije.
- Čestice AU su uspešno impregnirane sa drugom model supstancom tj. LMJ i to iz rastvora LMJ/DMSO početnih koncentracija 0,1, 0,5 i 1 mg/ml. Ravnoteža je u slučaju rastvora najmanje koncentracije postignuta već nakon 3 h, dok je u slučaju rastvora najveće koncentracije bilo potrebno 72 h.
- Ispitivanjem desorpcije LMJ sa čestica AU utvrđeno je da su LMJ čvrsto vezana za čestice AU i da je stepen desorpcije u okolni fiziološki rastvor tokom perioda od 48 h beznačajan odnosno ispod nivoa detekcije pomoću UV-vidljive spektroskopije.
- Kompozitne Ca0,5/V/PVP-I čestice su pokazale antimikrobnu aktivnost u suspenzijama svih ispitivanih vrsta mikroorganizama. Baktericidni efekat je postignut i kod kolekcijskih (*S. aureus* ATCC 6538 i *P. aeruginosa* ATCC 27853) i kod rezistentnih kliničkih bakterijskih sojeva (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* i *P. mirabilis*), dok je broj ćelija kvasaca *C. albicans* značajno redukovan, ali ne u potpunosti. Antimikrobni efekat adsorbovanog joda se može pripisati direktnom kontaktu sa citoplazmatičnom membranom ćelija mikroorganizama što je u slučaju i Gram pozitivnih i Gram negativnih vrsta bakterija bilo dovoljno za baktericidno dejstvo, za razliku od vrste kvasca *C. albicans* koja se pokazala najotpornijom.

- Kompozitne Zn<sub>0,5</sub>/V/PVP-I čestice su ispoljile odličnu antimikrobnu aktivnost u suspenzijama svih ispitivanih vrsta mikroorganizama. Antimikrobni efekat je postignut i u bakterijskim suspenzijama kolekcijskog soja (*E. coli* ATCC 25922) i kod rezistentnih kliničkih sojeva (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* i *P. mirabilis*), kao i u slučaju vrste kvasca *C. albicans*. Antimikrobni efekat je postignut već nakon 1 h izuzev kod dve suspenzije kliničkih sojeva *P. aeruginosa* i *E. faecalis*. S obzirom da su ovi klinički sojevi pokazali različitu osetljivost prema Zn<sup>2+</sup>, brz antibakterijski efekat je najverovatnije posledica brzog otpuštanja AU sa adsorbovanim jodom, dok se u slučaju *C. albicans* pokazao sinergistički efekat Zn<sup>2+</sup>, AU i adsorbovanog joda.
- Joni Zn<sup>2+</sup> otpušteni iz kompozitnih Zn<sub>0,5</sub>/V čestica su ispoljili potpuno različit efekat u suspenzijama kolekcijskog soja i multirezistentnog kliničkog soja *E. coli*. Konkretno, utvrđen je antibakterijski efekat prema kolekcijskom soju dok prema multirezistentnom kliničkom soju *E. coli* nisu pokazali antibakterijski efekat što ukazuje na postojanje ukrštene rezistencije između metalnih jona i antibiotika.
- Čestice AU sa adsorbovanim LMJ nisu ispoljile antimikrobnu aktivnost u ispitivanim suspenzijama što zahteva dalja istraživanja mehanizma adsorpcije ovih jedinjenja, kao i mehanizma njihovog antimikrobnog dejstva.

Rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su pokazali potencijal novih kompozita na bazi alginata i aktivnog uglja (AU) za primenu u medicini i, posebno, terapiji rana. Pokazano je da čestice AU mogu biti efikasni nosači za različite terapeutske aktivne supstance koje iako adsorbovane mogu zadržati svoju aktivnost čime se obezbeđuje njihovo lokalno

dejstvo, a onemogućava sistemska resorpcija i samim tim neželjeni efekti. Takođe, pokazano je da je prilikom ispitivanja novih biomaterijala sa antimikrobnom aktivnošću potrebno koristiti pored kolekcijskih i rezistentne kliničke sojeve mikroorganizama da bi se dobila realna slika o njihovom potencijalnom dejstvu. Kompozitni Ca- i Zn-alginatni hidrogelovi sa sadržanim česticama AU na kojima je adsorbovan PVP-I su posebno atraktivni za primenu u oblogama za rane zbog efikasnosti, dostupnosti i širokog spektra dejstva joda, kao i potencijalnog sinergističkog dejstva sa otpuštenim katjonima koji imaju pozitivan efekat na zarastanje oštećenog tkiva.



## 8. Literatura

1. Aarestrup F. M., Hasman H. (2004) Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. *Veterinary Microbiology* 100: 83–89.
2. Abdelrahman T., Newton H. (2011) Wound dressings: principles and practice. *Wound management* 29 (10): 491-495.
3. Agren M. S., Steenfoss H. H., Dabelsteen S., Hansen J. B., Dabelsteen E. (1999) Proliferation and mitogenic response to PDGF-BB of fibroblasts isolated from chronic leg ulcers is ulcer-dependent. *J Invest Dermatol* 112:463–469.
4. Allegranzi B., Zayed B., Bischoff P., Kubilay N. Z., de Jonge S., de Vries F., Gomes S. M., Gans S., Wallert E. D., Wu X., Abbas M., Boermeester M. A., Dellinger E. P., Egger M., Gastmeier P., Guirao X., Ren J., Pittet D., Solomkin J. S. (2016) WHO Guidelines Development Group, New WHO recommendations on intraoperative and postoperative measures for surgical site infection prevention: an evidence-based global perspective, *Lancet Infect. Dis.* 16: e288-e303.
5. Aminabhavi, T., Patil, M., Bhat, S., Halgeri, A., Vijayalakshmi, R., Kumar, P. (2009). Activated charcoal-loaded composite membranes of sodium alginate in pervaporation separation of water-organic azeotropes. *Journal of Applied Polymer Science*, 113 (2): 966–975.

6. Angeles Argudín M., Butaye P. (2016) Dissemination of metal resistance genes among animal methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci. *Research in Veterinary Science* 105: 192–194.
7. Anđelković Z., Somer Lj., Perović M., Avramović V., Milenkova Lj., Kostovska N., Petrović A. (2001) *Histološka građa organa*, Niš: Bonafides.
8. Atmaca S, Gül K, Cicek R. (1998) The effect of zinc on microbial growth *Turk. J. Med. Sci.*; 28: 595–597.
9. Bajpai A. K., Shukla S. K. Bhanu S., Kankane S. (2008) Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science* 33: 1088-1018.
10. Bajpai S. K., Sharma S. (2004) Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> ions. *Reactive & Functional Polymers* 59: 129–140.
11. Bandosz T. J. (2006) Activated carbon surfaces in environmental remediation, sedmo izdanje. Amsterdam: Elsevier.
12. Baum C. L., Arpey C. J. (2005) Normal cutaneous wound healing: Clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg* 31:674–686.
13. Becerra-Castro C., Machado R. A., Vaz-Moreira I., Manaia C. M. (2015) Assessment of copper and zinc salts as selectors of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Science of the Total Environment* 530–531: 367–372.
14. Below, H., Behrens-Baumann, W., Bernhardt, C., Völzke, H., Kramer, A., Rudolph, P. (2006). Systemic iodine absorption after preoperative antiseptics using povidone-iodine in cataract surgery – An open controlled study. *Dermatology* 212 (1): 41–46.

15. Bigliardi P. L., Latiff Alsagoff S. A., El-Kafrawi H. Y., Pyon J.-K., Cheuk Wa C. T., Villa M. A. (2017) Povidone iodine in wound healing: A review of current concepts and practices. *International Journal of Surgery* 44: 260-268.
16. Boateng J., Matthews K., Stevens H., Eccleston G. (2008) Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *Journal of pharmaceutical sciences* 97(8): 2892-2923.
17. Boateng J. S., Matthews K. H., Stevens H. N., Eccleston G. M. (2008) Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J. Pharm Sci* 97: 2892-2923.
18. Boykin J. V. (1996) Hyperbaric oxygen therapy: a physiological approach to selected problem wound healing. *Wounds* 8:183–198.
19. Browne A. C., Vearncombe M., Sibbald R. G. (2001) High bacterial load in asymptomatic diabetic patients with neurotrophic ulcers retards wound healing after application of Dermagraft. *Ost Wound Mgt* 47:44–49.
20. Cecen F., Aktas O. (2011) Activated carbon for water and wastewater treatment: Integration of adsorption and biological treatment (e-book). Wiley VHC.
21. Chase S. K., Whittemore R., Crosby N., Freney D., Howes P., Phillips T.J. (2000) Living with chronic venous leg ulcers: a descriptive study of knowledge and functional health status. *Journal of Community Health Nursing* 17 (1): 1-13.
22. Chingombe P., Saha B., Wakeman R. J. (2006) Effect of surface modification of an engineered activated carbon on the sorption of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid and benazolin from water. *Journal of Colloid and Interface Science* 297: 434-442.

23. Choi D. H., Park C. H., Kim I. H., Chun H. J., Park K., Han D. K. (2010) Fabrication of core-shell microcapsules using PLGA and alginate for dual growth factor delivery system. *Journal of Controlled Release* 147 (2): 193-201.
24. Chuanchuen R., Beinlich K., Hoang T. T., Becher A., Karkhoff-Schweizer R. R., Schweizer H. P. (2001) Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-Opr. *J. Antimicrob. Agents Chemother.* 45 428-432.
25. Clark R. A., Nielsen L. D., Welch M. P., McPherson J. M. (1995) Collagen matrices attenuate the collagen-synthetic response of cultured fibroblasts to TGF-beta. *J Cell Sci* 108: 1251-1261.
26. Cole L. (2002). The effect of coupled haemofiltration and adsorption on inflammatory cytokines in an ex vivo model. *Nephrology Dialysis Transplantation* 17(11), 1950–1956.
27. Cooper R. A. (2007) Iodine revisited. *Int. Wound J.* 4: 124-137.
28. De Haan B. B, Ellis H., Wilkes M. (1974) The role of infection in wound healing. *Surgery, Gynecol Obstet* 138: 693–700.
29. De Vos P., Faas M. M., Strand B., Calafiore R. (2006) Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials* 27: 5603-5617.
30. Dela Cruz, F., Harper Brown, D., Leikin, J. B., Franklin, C., Hryhorczuk, D. O. (1987). Iodine absorption after topical administration. *Western Journal of Medicine* 146: 43–45.
31. Delić J., Vučetić Č., Borović S., Milidević S., Jeremić J. (2013) *Vodič za lečenje hroničnih rana*, prvo izdanje. Beograd: Centar za KME Kliničkog Centra Srbije.

32. Ditter B., Urbaschek R., Urbaschek B. (1983) Ability of various adsorbents to bind endotoxins in vitro and to prevent orally induced endotoxemia in mice. *Gastroenterology* 84 (6):1547-1552.
33. Dodevski V. (2017) Sinteza, karakterizacija i primena aktivnih ugljeničnih materijala dobijenih od ploda platana. Doktorska disertacija, Beograd: Tehnološko-metalurški fakultetu u Beogradu.
34. Dow G., Browne A., Sibbald R. G. (1999) Infection in chronic wounds: controversies in diagnosis and treatment. *Ost Wound Mgt* 45:23–40.
35. Dow G., Browne A., Sibbald R. G. (1999) Infection in Chronic Wounds: Controversies in Diagnosis and Treatment. *Ostomy/Wound Management* 45 (8): 23-40.
36. Drobac M., Jeremić V., Kostić N., Vemić A., Vasiljević D., Malenović A. (2013) Konvencionalna medicinska sredstva za obradu rana-osobine i upotreba. *Arh. farm.* 63: 513-527.
37. Drucker M., Goldhar J., Ogra P., Neter E. (1977) The effect of attapulgit and charcoal on enterotoxicity of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins in rabbits. *Infection* 5 (4): 211–213.
38. Drury J. L., Mooney D. J. (2003) Review. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 24: 4337-4351.
39. Edwards R., Harding K. G. (2004) Bacteria and wound healing. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 17: 91-96.
40. Erdogan M., Tatar F., Ünlütürk U., Cin N., Uysal A. (2013) The effect of scrubbing hands with iodine-containing solutions on urinary iodine concentrations of the operating room staff. *Thyroid* 23 (3): 342–345.

41. Findik G., Gezer S., Aydogdu K., Öz G., Kucukbayrak A., Tastepe I. (2010) Effect of intrapleural povidone-iodine lavage on thyroid hormones in thoracic surgery. *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon* 58 (4): 225–228.
42. Fleischer W., Reimer K. (1997) Povidone-iodine in antiseptise state of the art. *Dermatology* 195 (Suppl 2): 3-9.
43. Forster R. E. J., Thurmer F., Wallrapp C., Lloyd A. W., Macfarlane W., Phillips G. J., Boutrand J.-P., Lewis A. L. (2010) Characterisation of physico-mechanical properties and degradation potential of calcium alginate beads for use in embolisation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21 (7): 2243-2251.
44. Fox C. L. Jr, Rao T. N., Azmeth R., Gandhi S. S., Modak S. (1990) Comparative evaluation of zinc sulfadiazine and silver sulfadiazine in burn wound infection. *J Burn Care Rehabil.* 11: 112-117.
45. Gardner S. E., Frantz R. A., Doebbeling B. N. (2001) The validity of the clinical signs and symptoms used to identify localized chronic wound infection. *Wound Rep. Reg.* 9: 178–186.
46. Germain L., Jean A., Auger F. A. (1994) Human wound healing fibroblasts have greater contractile properties than dermal fibroblasts. *J Surg Res* 47: 268-273.
47. Gethin G. (2010) Menaging wound malodour in palliative care. *Wounds UK. Palliative wound care supplement* 12-15.
48. Gilcreast D. M., Stotts N. A., Froelicher E. S., Baker L. L., Moss K. M. (1998) Effect of electrical stimulation on foot skin perfusion in persons with or at risk for diabetes foot ulcers. *Wound Rep. Reg.* 6: 434–441.

49. Gombotz W. R., Wee S. F. (1998) Protein release from alginate matrices. *Advance Drug Delivery Reviews* 3: 267-285.
50. Gottrup F, Leaper D. (2004) Wound healing: historical aspects *EWMA Journal* 4 (2): 21-26.
51. Grant G. T., Morris E. R., Rees D. A., Smith P. J. C., Thom D. (1973) Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *Febs. Letters* 32: 195–198.
52. Grocott P. (2007) Care of patients with fungating malignant wounds. *Nursing standard* 21 (24): 57-62.
53. Guo S., DiPietro L. A. (2010) Factors Affecting Wound Healing. *J. Dent. Res.* 89 (3): 219-229.
54. Gyu Parl H., Won Kim T., Yun Chae M., Yoo I.-K. (2007) Activated carbon-containing alginate adsorbent for the simultaneous removal of heavy metals and toxic organics. *Process Biochemistry* 42: 1371–1377.
55. Harrison J. J., Ceri H., Yerly J., Rabiei M., Hu Y., Martinuzzi R., Turner R. J. (2007) Metal Ions May Suppress or Enhance Cellular Differentiation in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* Biofilms. *App. Environ. Microbiol.* 73 (15): 4940–4949.
56. Hasan A., Murata H., Falabella A., Ochoa S., Zhou L., Badiava E., Falanga V. (1997) Dermal fibroblasts from venous ulcers are unresponsive to action of transforming growth factor-beta I. *J. Dermatol. Sci.* 16: 59–66.
57. Hassan A., Abdel-Mohsen A., Fouda M. (2014). Comparative study of calcium alginate, activated carbon, and their composite beads on methylene blue adsorption. *Carbohydrate Polymers* 102: 192–198.

58. Hinnman C. D., Maibach H. I. (1963) Effect of air exposure and occlusion on experimental human skin wounds. *Nature* 200: 377- 378.
59. Howell C., Sandeman S., Phillips G., Lloyd A., Davies J., Mikhalovsky S. (2006). The *in vitro* adsorption of cytokines by polymer-pyrolysed carbon. *Biomaterials* 27 (30): 5286–5291.
60. Huljev D. (2011) Tipizacija vrste tkiva u kroničnim ranama na temelju digitalne fotografije rane. Doktorska disertacija, Zagreb: Medicinski fakultet u Zagrebu.
61. Huljev D. (2013) Prepreke u cijeljenju rana. *Acta Med Croatica* 67 (Supl. 1): 5-10.
62. Jayaraja Kumar K., Jayachandran E., Hemanth Kumar Reddy C. (2009) Application of broad spectrum antiseptic povidone iodine as powerful action: A review. *J. Pharm. Sci. Technol.* 1: 48-58.
63. Kanagalingam J., Feliciano R., Hah J. H., Labib H., Le T. A., Lin J. C. (2015) Practical use of povidone-iodine antiseptic in the maintenance of oral health and in the prevention and treatment of common oropharyngeal infections. *Int. J. Clin. Pract.* 69: 1247-1256.
64. Kerihuel J. (2010). Effect of activated charcoal dressings on healing outcomes of chronic wounds. *Journal of Wound Care* 19 (5): 208–214.
65. Kerstein M. D. (1997) The scientific basis of healing. *Adv. Wound Care* 10: 30–36.
66. Kirshen C., Woo K., Ayello E. A., Sibbald R. G. (2006) Debridement. A vital component of wound bed preparation. *Adv. Skin Wound Care* 19: 508-511.
67. Kolambkar Y. M., Dupont K. M., Boerckel J. D., Huebsch N., Mooney D. J., Hutmacher D. W., Guldberg R. E. (2011) An alginate-based hybrid system for growth factor delivery in the functional repair of large bone defects. *Biomaterials* 32 (1): 65-74.



68. König B., Reimer K., Fleischer W., König W. (1997) Effects of Betaisodona on parameters of host defense, *Dermatology* 195 (Suppl 2): 42-48.
69. Korsmeyer R. W., Peppas N. A. (1983) Solute and penetrant diffusion in swellable polymers 3. *J. Control Rel.* 1: 89-98.
70. Kouakou U., Ello A. S., Yapo J. A., Trokourey A. (2013) Adsorption of iron and zinc on commercial activated carbon. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology* 5 (6): 168-171.
71. Kučičec-Tepeš N. (2010) Mikrobiološka obrada uzoraka i interpretacija nalaza. *Acta Med Croatica* 64 (1): 89-98.
72. Kučičec-Tepeš N. (2016) Uloga antiseptika i strategija uklanjanja biofilma kronične rane. *Acta Med Croatica* 70: 33-42.
73. Kunisada T., Yamada K., Oda S., Hara O. (1997) Investigation on the efficacy of povidone-iodine against antiseptic-resistant species, *Dermatology* 195 (Suppl 2): 14-18.
74. Lachapelle J.-M., Castel O., Fueyo Casado A. (2013) Antiseptics era Bact. Resist. a focus povidone iodine. *Future Med.* 10: 579-592.
75. Lalević-Vasić B., Medenica Lj., Nikolić M. (1997) *Dermatovenerologija sa dermatovenerološkom propedeutikom*. Beograd: Savremena administracija.
76. Lansdown A. B. G. (2002) Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin. *Wound Rep. Reg.* 10: 271-285.
77. Lansdown, A. B. G., Mirastschijski, U., Stubbs, N., Scanlon, E., Agren, M. S. (2007) Zinc in wound healing: Theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair and Regeneration* 15: 2-16.

78. Lanjri S., Uwingabiye J., Frikh M., Abdellatifi L., Kasouati J., Maleb A., Bait A., Lemnouer A., Elouennass M. (2017) *In vitro* evaluation of the susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolates to antiseptics and disinfectants: comparison between clinical and environmental isolates. *Antimicrob. Resist Infect. Control* 6: 36
79. Lazarus B., Paterson D. L., Mollinger J. L., Rogers B. A. (2015) Do Human Extraintestinal *Escherichia coli* Infections Resistant to Expanded-Spectrum Cephalosporins Originate From Food-Producing Animals? A Systematic Review. *Clinical Infectious Diseases* 60 (3): 439–452.
80. Leaper D. J., Durani P. (2008) Topical antimicrobial therapy of chronic wounds healing by secondary intention using iodine products. *Int. Wound J.* 5: 361-368.
81. Leaper D. J., Schultz G., Carville K., Fletcher J., Swanson T., Drake R. (2012) Extending the TIME concept: what have we learned in the past 10 years. *Int. Wound J.* 9 (Suppl 2): 1-19.
82. Lipsky B. A., Hoey C. (2009) Topical antimicrobial therapy for treating chronic wounds. *Clin. Infect. Dis.* 49: 1541-1549.
83. Lloyd M., Maurice O., Aoyi O., Leswif T. (2015) Sorption characteristics of mixed molecules of glutaraldehyde from water on mesoporous acid-amine modified lowcost activated carbon: Mechanism, isotherm and kinetics. *Journal of Chemistry* 2015: 1–13.
84. Lucas N., Legrand R., Breton J., Déchelotte P., Edwards-Lévy F., Fetissoff S. O. (2015) Chronic delivery of  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone in rat hypothalamus using albumin-alginate microparticles: Effects on food intake and body weight. *Neuroscience* 2 (290): 445-453.

85. Madhava Rao M., Chandra Rao G. P., Seshaiyah K., Choudaraz N. V., Wang M. C.. (2008) Activated carbon from *Ceiba pentandra* hulls, an agricultural waste, as an adsorbent in the removal of lead and zinc from aqueous solutions. *Waste Management* 28: 849-858.
86. Malagurski I., Levic S., Pantic M., Matijasevic D., Mitric M., Pavlovic V., Dimitrijevic Brankovic S. (2017) Synthesis and antimicrobial properties of Zn-mineralized alginate nanocomposites. *Carbohydrate Polymers* 165: 313-321.
87. Mangram A. J., Horan T. C., Pearson M. L., Silver L. C., Jarvis W. R. (1999) Guideline for prevention of surgical site infection. Centers for disease control and prevention (CDC) hospital infection control practices advisory committee. *Am. J. Infect. Control* 27: 97-132.
88. Manojlović D. (1998) *Interna medicina*. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva.
89. Marsh H., Rodríguez Reinoso F. (2006) *Activated carbon* (e-book). Amsterdam: Elsevier.
90. Martinez-Hernandez A. (1994) Repair, regeneration and fibrosis. U: *Pathology*, drugo izdanje. Rubin E., Farber J.L. (eds), Philadelphia: JB Lipincott.
91. Martín M. J., Calpena A. C., Fernández F., Mallandrich M., Gálvez P., Clares B. (2015) Development of alginate microspheres as nystatin carriers for oral mucosa drug delivery. *Carbohydrate Polymers* 117: 140-149.
92. Martin P. (1997) Wound Healing – Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science* 276: 75-81.
93. Martinsen A., Skjak-Braek G., Smidsrod O. (1989) Alginate as immobilization material; I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Bioengineering and Biotechnology* 33: 79–89.

94. McDowell R. H. (1978) Properties of Alginates. London: Alginate Industries Ltd.
95. Mendez M. V., Stanley A., Park H. Y., Shon K., Phillips T., Menzoian J. O. (1998) Fibroblasts cultured from venous ulcers display cellular characteristics of senescence. *J. Vasc. Surg.* 28: 876–883.
96. Miller L. P., McCallan S. E. A. (1957) Toxic action of metal ions to fungus spores. *J. Agric. Food Chem.* 5: 116–122.
97. Mitrovic D., Stojkowska J., Obradovic B. (2010) Ispitivanje mogućnosti kontrolisane razgradnje alginatnih mikročestica. *Hemijska industrija* 64 (4): 253-263.
98. Moe S. T., Draget K. I., Skjak-Braek G., Smidsrod O. (1995) Alginates. U: *Food Polysaccharides and Their Applications*. Stephen A. M. (ed.), NY: Marcel Dekker. 245-286.
99. Momčilović M. (2012) Kinetički i ravnotežni parametri adsorpcionih procesa pri uklanjanju pojedinih štetnih katjonskih sastojaka iz vodenih rastvora aktivnim ugljevima dobijenih hemijsko-termičkom obradom srži ploda divljeg kestena i šišarke crnog bora. Doktorska disertacija, Niš: Prirodno-matematički fakultet u Nišu.
100. Moura L. I., Dias A. M., Carvalho E., de Sousa H. C. (2013) Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment - A review. *Acta biomaterialia* 9: 7093-7114.
101. Naka K., Watarai S., Tana Inoue K., Kodama Y., Oguma K., Yasuda T. (2001) Adsorption effect of activated charcoal on enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Veterinary Medical Science* 63 (3): 281–285.
102. Nedović V. A. (1999). Imobilisani ćelijski sistemi u fermentaciji piva. Monografija, Beograd: Zadužbina Andrejević. ISBN 86-7244-104-4, 1-95.

103. Nelson J. L., Alexander J. W., Gianotti L., Chalk C. L., Pyles T. (1994) Influence of dietary fiber on microbial growth *in vitro* and bacterial translocation after burn injury in mice. *Nutrition* 10: 32–36.
104. Nesvadbova M., Crosera M., Maina G., Larese Filon F. (2015) Povidone iodine skin absorption: An *ex-vivo* study. *Toxicology Letters* 235 (3): 155–160.
105. Nikolić T. (2017) Molekularne osnove odgovora medonosne pčele (*Apis mellifera*, L.) na stres izazvan jonima teških metala. Doktorska disertacija, Novi Sad: Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu.
106. Nolan J., McDevitt J., Goldmann G. (1975) Endotoxin binding by charged and uncharged resins. *Experimental Biology and Medicine* 149 (3): 766–770.
107. Osmokrović A., Obradović B. Polimerni kompoziti na bazi alginata i aktivnog uglja, P-2015/0403, Zavod za intelektualnu svojinu Republike Srbije, od 12.06.2015.
108. Osmokrović A., Jančić I., Vunduk J., Petrović P., Milenković M., Obradović B. (2018) Achieving high antimicrobial activity: Composite alginate hydrogel beads releasing activated charcoal with an immobilized active agent. *Carbohydrate Polymers* 196: 279–288.
109. Ovington L. G. (2007) Advances in wound dressings. *Clinics in Dermatology* 25: 33–38.
110. Ovington L. G. (2002) Overview of matrix metalloprotease modulation and growth factor protection in wound healing. Part 1. *Ostomy Wound Manage* 48 (6 Suppl): 3-7.
111. Padmavathy N., Vijayaraghavan R. (2008) Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles— an antimicrobial study. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 9 (3): 1-7.

112. Park H., Kim T., Chae M., Yoo I. (2007) Activated carbon-containing alginate adsorbent for the simultaneous removal of heavy metals and toxic organics. *Process Biochemistry* 42 (10): 1371–1377.
113. Paul W., Sharma C. P. (2004). Chitosan and alginate wound dressings: A short review. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs* 18: 18-23.
114. Pollack S. V. (1984) The wound healing process. *Clin. Dermatol.* 2: 8–16.
115. Poole K. (2017) At the Nexus of Antibiotics and Metals: The Impact of Cu and Zn on Antibiotic Activity and Resistance. *Trends Microbiol.* 25 (10): 820-832.
116. Probst S., Arber A., Faithfull S. (2009) Malignant fungating wounds: a survey of nurses' clinical practice in Switzerland. *European journal of oncology nursing* 13 (4): 295-298.
117. Qin Y. (2007) Alginate fibres: An overview of the production processes and applications in wound management. *Polymer International* 57 (2): 171–180.
118. Queen D., Orsted H., Sanada H., Sussman G. (2004) A dressing history. *International Wound Journal* 1: 59–77.
119. Rackur H. (1985) New aspects of mechanism of action of povidone-iodine. *J. Hosp. Infect.* 6 (Suppl A): 13-23.
120. Radotić K., Mičić M., Jeremić M. (2005) New insights into the structural organization of the plant polymer lignin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1048: 215-229.
121. Radotić K., Todorović S., Zakrzewska J., Jeremić M. (1998) Study of photochemical reactions of coniferyl alcohol. II. Comparative structural study of a photochemical and enzymatic polymer of coniferyl alcohol. *Photochemistry and Photobiology* 68 (5): 703-709.

122. Raffetto J. D., Mendez M. V., Marien B. J. (2001) Changes in cellular motility and cytoskeletal actin in fibroblasts from patients with chronic venous insufficiency and in neonatal fibroblasts in the presence of chronic wound fluid. *J. Vasc. Surg.* 33: 1233-1241.
123. Rahim S. N. A, Sulaiman A., Hamzah F., Hamid K. H. K, Rodhi M. N. M, Musa M., Edama N. A. (2013) Enzymes Encapsulation within Calcium Alginate-clay Beads: Characterization and Application for Cassava Slurry Saccharification. *Procedia Engineering* 68: 411-417.
124. Riddel J. P. Jr., Aouizerat B. E., Miaskowski C., Lillicrap D. P. (2007) Theories of blood coagulation. *Journal of Pediatric Oncology Nursing* 24: 123–131.
125. Ripa S., Bruno R., Reder R. (2002) Clinical applications of Povidone-Iodine as a topical antimicrobial. U: *Handbook of Topical Antimicrobials: Industrial applications in consumer products and Pharmaceuticals*. Paulson D.S. (ed.), Boca Raton: CRC Press.
126. Sabry S. A., Ghozlan H. A., Abou-Zeid D.-M. (1997) Metal tolerance and antibiotic resistance patterns of a bacterial population isolated from sea water. *Journal of Applied Microbiology* 82: 245-252.
127. Sandeman S., Howell C., Mikhalovsky S., Phillips G., Lloyd A., Davies J. (2008) Inflammatory cytokine removal by an activated carbon device in a flowing system. *Biomaterials* 29 (11): 1638–1644.
128. Schreier H., Erdos G., Reimer K., Konig B., Konig W., Fleischer W. (1997) Molecular effects of povidone-iodine on relevant microorganisms: an electronmicroscopic and biochemical study. *Dermatology* 195 (Suppl 2): 111-116.

129. Schultz G. S., Sibbald R. G., Falanga V., Ayello E. A., Dowsett C., Harding K., Romanelli M., Stacey M. C., Teot L., Vanscheidt W. (2003) Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound Repair and Regeneration* 11: 1–28.
130. Scrimshaw N. S., Young V. R. (1976) The requirements of human nutrition. *Sci. Am.* 235: 50–64.
131. Selig H. F., Lumenta D. B., Giretzlehner M., Jeschke M. G., Upton D., Kamolz L. P. (2012) The properties of an "ideal" burn wound dressing - What do we need in daily clinical practice? Results of a worldwide online survey among burn care specialists, *Burns* 38: 960-966.
132. Sibbald R. G., Browne A. C., Coutts P., Queen D. (2001) Screening evaluation of an ionized nanocrystalline silver dressing in chronic wound care. *Ost Wound Mgt* 47: 38-43.
133. Siepmann J., Siepmann F. (2012) Modeling of diffusion controlled drug delivery. *Journal of Controlled Release* 161 (2): 351–362.
134. Siepmann J., Siepmann F. (2012) Modeling of diffusion controlled drug delivery. *Journal of Controlled Release* 161 (2): 351–362.
135. Skorkowska-Telichowska K., Czemplik M., Kulma A., Szopa J. (2013) The local treatment and available dressings designed for chronic wounds. *Journal of American Academy of Dermatology* 68: 117-126.
136. Slavikova E., Kosikova B. (1994) Inhibitory effect of lignin by-products of pulping on yeast growth. *Folia Microbiol* 39: 241–243.
137. Slavin J. (1996) The Role of Cytokines in Wound Healing. *J. Pathol.* 178: 5-10.
138. Smidrod O., Skjak-Bræk G. (1990) Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology* 8: 71–78.



139. Soderberg T., Agren M., Tengrup I., Hallmans G., Banck G. (1989) The effects of an occlusive zinc medicated dressing on the bacterial flora in excised wounds in the rat. *Infection* 17: 81-85.
140. Sojkovska J. (2015) Dobijanje i karakterisanje nanokompozitnih hidrogelova na bazi alginata i nanočestica srebra za primenu u medicini. Doktorska disertacija, Beograd: Tehnološko-metalurški fakultet.
141. Spasojević D. (2017) Modifikacija alginata, celuloze i ksilana iz ćelijskog zida biljaka, fenolnim jedinjenjima i aminima za dobijanje hidrogelova. Doktorska disertacija, Beograd: Hemijski fakultet u Beogradu.
142. Spasojević D., Zmejski D., Glamočlija J., Nikolić M., Soković M., Milošević V., Jarić I., Stojanović M., Marinković E., Barisani-Asenbauer T., Prodanović R., Jovanović M., Radotić K. (2016) Lignin model compound in alginate hydrogel: a strong antimicrobial agent with high potential in wound treatment. *International Journal of Antimicrobial Agents* 48: 732–735.
143. Spellberg B., Guidos R., Gilbert D., Bradley J., Boucher H. W., Scheld W. M., Bartlett J. G., Edwards Jr. J. (2008) The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 46: 155–164.
144. Stanley A. C., Park H. Y., Phillips T. J., Russakovsky V., Menzoian J. O. (1997) Reduced growth of dermal fibroblasts from chronic venous ulcers can be stimulated with growth factors. *J. Vasc. Surg.* 26: 994–999.

145. Starek J., Zukal A., Rathousky J. (1994) Comparison of the adsorption of humic acids from aqueous solutions on active carbon and activated charcoal cloths. *Carbon* 32 (2): 207-211.
146. Steen M. (1993). Review of the use of povidone-iodine (PVP-I) in the treatment of burns. *Postgraduate Medical Journal* 69: 84–92.
147. Stevović D. (2000) *Hirurgija za studente i lekare*. Beograd: Savremena administracija.
148. Stojanović S., Tijanić M., Jovanović G., Spasić M., Stojković B., Petrović M., Denčić T. (2015) Uloga faktora rasta u zarastanju ekstrakcione rane. *Acta Stomatologica Naissi* 31 (72): 1524-1537.
149. Stojkovska J., Djurdjevic Z., Jancic I., Bufan B., Milenkovic M., Jankovic R., Miskovic-Stankovic V., Obradovic B. (2018) Comparative *in vivo* evaluation of novel formulations based on alginate and silver nanoparticles for wound treatments. *J. Biomater. Appl.* 32 (9): 1197-1211.
150. Stone L. L. (1980) Bacterial debridement of the burn eschar: the *in vivo* activity of selected organisms. *J Surg Res* 29: 83–92.
151. Švabić-Vlahović Milena (2008) *Medicinska bakteriologija za studente medicine*, Beograd: Savremena administracija.
152. Taqieddin E., Amiji M. (2004) Enzyme immobilization in novel alginate–chitosan core-shell microcapsules. *Biomaterials* 25 (10): 1937-1945.
153. Tarnuzzer R. W., Schultz G. S. (1996) Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Repair Regen.* 4: 310-325.
154. Teitzel G. M., Parsek M. R. (2003) Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *App. Environmental Microbiology* 69 (4): 2313–2320.

155. Thomas A., Harding K. G., Moore K. (2000) Alginates from wound dressings activate human macrophages to secrete tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Biomaterials* 21: 1797-1802.
156. Thomas S., Fear M., Humphreys J., Disley L., Waring M. (1996) The effect of dressings on the production of exudate from venous leg ulcers. *Wounds* 8 (5): 145-149.
157. Tibbles P. M., Edelsberg J. S. (1996) Hyperbaric oxygen therapy. *N Engl J Med* 334:1642–1648.
158. Todar K. Online textbook of bacteriology. (e-book). <http://textbookofbacteriology.net>
159. Trevisan, R., Flesch, S., Mattos, J. J., Milani, M. R., Dias bainya, A. C., Dafre, A. L. (2014) Zinc causes acute impairment of glutathione metabolism followed by coordinated antioxidant defenses amplification in gills of brown mussels *Perna perna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 159: 22-30.
160. Tubek S., Grzanka P., Tubek I. (2008) Role of zinc in hemostasis: a review. *Biological Trace Elem. Res.* 121 (1): 1-8.
161. Van Alen S., Kaspar U., Idelevich E. A., Köck R., Becker K. (2018) Increase of zinc resistance in German human derived livestock-associated MRSA between 2000 and 2014. *Veterinary Microbiology* 214: 7–12.
162. Van Paemel M., Dierick N., Janssens G., Fievez V., De Smet S. (2010) Technical report submitted to EFSA: Selected trace and ultratrace elements: Biological role, content in feed and requirements in animal nutrition-elements for risk assessment. European Food Safety Authority.
163. Vande Berg J. S., Rudolph R., Hollan C., Haywood-Reid P. L. (1998) Fibroblast senescence in pressure ulcers. *Wound Rep. Reg.* 6: 38–49.

164. Vanhome R., Demedts B., Morreel K., Ralph J., Boerjan W. (2010) Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology* 153 (3): 895-905.
165. Varagić V., Milošević M. (1999) *Farmakologija*, XV prerađeno i dopunjeno izdanje. Beograd: Elit Medica.
166. Velings N. M., Mestdagh M. M. (1995). Physico-Chemical Properties of Alginate Gel Beads. *Polymer Gels and Networks* 3 (3): 311-330.
167. Wales A. D., Davies R. H. (2015) Co-Selection of Resistance to Antibiotics, Biocides and Heavy Metals, and Its Relevance to Foodborne Pathogens- Review. *Antibiotics* 4: 567-604.
168. Wang Y., Li Y., Yang S., Zhang G., An D., Wang C., Yang Q., Chen X., Jing X., Wei Y. (2006). A convenient route to polyvinyl pyrrolidone/silver nanocomposite by electrospinning. *Nanotechnology* 17 (13): 3304-3307.
169. Watkins D., Nuruddin M., Hosur M., Tcherbi-Narteh A., Jeelani S. (2015) Extraction and characterization of lignin from different biomass resources. *Journal of Materials Research and Technology* 4 (1): 26-32.
170. Welch M. P., Odland G. F., Clark R. A. (1990) Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. *J. Cell Biol.* 110: 133-145.
171. Whaley K, Burt AD. (1995) Inflammation, Healing and Repair. U: *Textbook of Pathology*, XIII izdanje. MacSweeney R.N.M., Whaley K. (eds.), London: Edward Arnold.
172. WHO (2016) Global Guidelines for the Prevention of Surgical Site Infection, ISBN 97892 4 154988 2, World Health Organization.

173. Winter G. D. (1962) Formation of scab and the rate of epithelialization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature* 193: 293 -294.
174. Wong M. (2004) Alginates in Tissue Engineering. U: *Methods in Molecular Biology, Vol.238: Biopolymer Methods in Tissue Engineering*. Hollander A.P., Hatton P.V. (eds.), NY: Humana Press Inc. 77-86.
175. Xu, F. F., Imlay, J. A. (2012) Silver (I), mercury (II), cadmium (II) and zinc (II) target exposed enzymic iron-sulfur clusters when they toxify *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 3614-3621.
176. Yang J., Chen J., Pan D., Wan Y., Wang Z. (2013) pH-sensitive interpenetrating network hydrogels based on chitosan derivatives and alginate for oral drug delivery. *Carbohydrate Polymers* 92 (1): 719-725.
177. Yasuda T., Yoshimura Y., Takada H., Kawaguchi S., Ito M., Yamazaki F., Iriyama J., Ishigo S., Asano Y. (1997) Comparison of bactericidal effects of commonly used antiseptics against pathogens causing nosocomial infections. Part 2, *Dermatology* 195 (Suppl 2): 19-28.
178. Zhang L., Jiang Y., Ding Y., Daskalakis N., Jeuken L., Povey M., O'Neill A. J., York D. W. (2010) Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against *E. coli*. *J. Nanopart. Res.* 12: 1625–1636.

## **PRILOG**

## Spisak slika

**Slika 1.1.** Crtež „čovjek sa ranama“ (*Gottrup i Leaper, 2004*)

**Slika 2.1.** Šematski prikaz poprečnog preseka kože (<https://lcsdanatomyphysiology.com>)

**Slika 2.2.** Faze zarastanja rane

**Slika 2.3.** Šematski prikaz podele hroničnih rana (<http://ordinacija.lekarinfo.com>)

**Slika 2.4.** Potkolenični ulkus u kome su zastupljena sve tri vrste tkiva (granulaciono-crvene boje, fibrin i fibrinske naslage-beličaste i žute boje, i nekrotično tkivo-crne boje) (*Huljev, 2011*)

**Slika 2.5.** Šematski prikaz mikrobiološkog statusa rane

**Slika 2.6.** Mehanizam delovanja PVP-I (*Bigliardi i sar., 2017*)

**Slika 2.7** Strukturni prikaz osnovnih gradivnih jedinica lignina: p-kumaril-, koniferil- i sinapil-alkohola (*Watkins i sar., 2015*)

**Slika 2.8** Šematski prikaz strukture fragmenta lignina (*Watkins i sar., 2015*)

**Slika 2.9** Strukturna formula jedinice lanca alginata (G-guluronska kiselina; M-manuronska kiselina)

**Slika 2.10** „Egg-box“ model (model kutije za jaja) vezivanja jona kalcijuma u šupljine između GG segmenata (*Bajpai i Sharma, 2004*)

**Slika 2.11** Oksidativna oštećenja biomolekula (ROS-reaktivne kiseonične vrste) (Nikolić, 2017)

**Slika 2.12** Uloge metalotioneina (Nikolić, 2017)

**Slika 2.13** Prikaz turbostratične strukture prisutne u AU i grafitne strukture (Dodevski, 2017)

**Slika 2.14** Šematski prikaz strukture AU: mikropore, mezopore i makropore

**Slika 4.1.** Šematski prikaz aparature za izvođenje ekstruzije i dobijanje A/AU čestica

**Slika 5.1** Različiti oblici kompozitnih čestica dobijeni iz smeša A/AU sa povećanjem koncentracija alginata i/ili AU

**Slika 5.2.** Apsorpcioni spektar AU

**Slika 5.3.** Kalibraciona prava zavisnosti apsorbanca na 600 nm od koncentracije AU u smešama sa Na-alginatom različitih koncentracija (0,5-2 mas. %), AU<sub>1</sub>; eksperimentalni podaci su srednje vrednosti minimum 12 merenja

**Slika 5.4.** Kalibraciona prava zavisnosti apsorbanca na 600 nm od koncentracije AU u različitim vodenim medijumima, AU<sub>2</sub>; eksperimentalni podaci su srednje vrednosti minimum 24 merenja

**Slika 5.5.** Koncentracije AU u česticama, AU<sub>č</sub>, kao funkcija nominalne koncentracije AU u odgovarajućim početnim A/AU smešama, AU<sub>S</sub>; A/AU čestice su prikazane u četiri grupe (0,5, 1, 1,5 i 2) u odnosu na sadržaj alginata (mas. %); eksperimentalni podaci su srednje vrednosti najmanje 6 merenja, SD ( $\leq 10\%$ ) su izostavljene kako bi podaci bili uočljiviji



**Slika 5.6.** FE-SEM mikrofotografije spoljašnjih površina (inserti) i poprečnih preseka suvih čestica: (a) 0.5/V; (b) 1.5/M; (c) AU; (d) 1,5 mas. % CaA; (razmernik: 500  $\mu\text{m}$  (inserti) i 10  $\mu\text{m}$ )

**Slika 5.7.** FT-IR spektri (a) AU, CaA i kompozitnih 0,5/M i 0,5/V CaA/AU čestica; (b) AU, CaA i kompozitnih 1,5/M i 1,5/V CaA/AU čestica

**Slika 5.8.** Zapreminski stepeni bubrenja,  $q_v$ , suvih 0.5/M, 0.5/S i 0.5/V CaA/AU čestica tokom perioda od 5 dana (insert) i tokom inicijalnih 6 h

**Slika 5.9.** Zapreminski stepeni bubrenja,  $q_v$ , suvih 1/M, 1/S i 1/V CaA/AU čestica tokom perioda od 5 dana (insert) i tokom inicijalnih 6 h

**Slika 5.10.** Zapreminski stepeni bubrenja,  $q_v$ , suvih 1,5/M, 1,5/S i 1,5/V CaA/AU čestica tokom perioda od 5 dana (insert) i tokom inicijalnih 6 h

**Slika 5.11.** Zapreminski stepeni bubrenja,  $q_v$ , suvih 2/M, 2/S i 2/V CaA/AU čestica tokom perioda od 5 dana (insert) i tokom inicijalnih 6 h

**Slika 5.12.** Otpuštanje AU iz kompozitnih 0.5/M, 0.5/S, 0.5/V CaA/AU čestica normalizovano u odnosu na početni sadržaj AU tokom perioda od 5 dana u fiziološkom rastvoru; prikazani su eksperimentalni podaci (simboli) i predviđanja modela unutrašnje difuzije osim za Ca0.5/V čestice kod kojih su prikazana predviđanja Korsmejer-Pepasovog model (linije); eksperimentalni podaci su prikazani kao srednje vrednosti 3 merenja  $\pm$  SD

**Slika 5.13.** Otpuštanje AU iz kompozitnih 1/M, 1/S, 1/V CaA/AU čestica normalizovano u odnosu na početni sadržaj AU tokom perioda od 5 dana u fiziološkom rastvoru; prikazani su

eksperimentalni podaci (simboli) i predviđanja modela unutrašnje difuzije (linije); eksperimentalni podaci su prikazani kao srednje vrednosti 3 merenja  $\pm$  SD

**Slika 5.14.** Otpuštanje AU iz kompozitnih 1,5/M, 1,5/S, 1,5/V CaA/AU čestica normalizovano u odnosu na početni sadržaj AU tokom perioda od 5 dana u fiziološkom rastvoru; prikazani su eksperimentalni podaci (simboli) i predviđanja modela unutrašnje difuzije (linije); eksperimentalni podaci su prikazani kao srednje vrednosti 3 merenja  $\pm$  SD

**Slika 5.15.** Otpuštanje AU iz kompozitnih 2/M, 2/S, 2/V CaA/AU čestica normalizovano u odnosu na početni sadržaj AU tokom perioda od 5 dana u fiziološkom rastvoru; prikazani su eksperimentalni podaci (simboli) i predviđanja modela unutrašnje difuzije (linije); eksperimentalni podaci su prikazani kao srednje vrednosti 3 merenja  $\pm$  SD

**Slika 5.16.** Optičke mikrofotografije površina 0,5/M, 0,5/S i 0,5/V CaA/AU čestica tokom trajanja eksperimenta (razmernik: 0.5 mm)

**Slika 5.17.** Optičke mikrofotografije površina 1/M, 1/S i 1/V CaA/AU čestica tokom trajanja eksperimenta (razmernik: 0.5 mm)

**Slika 5.18.** Optičke mikrofotografije površina 1,5/M, 1,5/S i 1,5/V CaA/AU čestica tokom trajanja eksperimenta (razmernik: 0.5 mm)

**Slika 5.19.** Optičke mikrofotografije površina 2/M, 2/S i 2/V CaA/AU čestica tokom trajanja eksperimenta (razmernik: 0.5 mm)

**Slika 5.20.** FE-SEM mikrofotografije poprečnih preseka suvih čestica: (a) ZnA; (b) Zn<sub>0,5</sub>/V; (razmernik: 5  $\mu$ m)

**Slika 5.21.** FT-IR spektri ZnA čestica, AU i Zn<sub>0,5</sub>/V kompozitnih čestica

**Slika 5.22.** Optičke mikrofotografije površina kompozitnih Zn<sub>0,5</sub>/H čestica slikane u fiziološkom rastvoru: (a) početni trenutak; (b) 24 h; (c) 48 h; (d) 5 dana; (razmernik: 0.5 mm)

**Slika 5.23.** Otpuštena masa AU u fiziološkom rastvoru iz Zn<sub>0,5</sub>/V kompozitnih čestica ( $M_t$ ) normalizovana u odnosu na početni sadržaj AU u česticama ( $M_\infty$ ) tokom perioda od 5 dana u fiziološkom rastvoru: prikazani su eksperimentalni podaci (simboli) i predviđanja modela unutrašnje difuzije tokom perioda od 48 h (linije); insert: primena modela unutrašnje difuzije u početnom periodu otpuštanja ( $M_t/M_\infty < 0,4$ ) kao funkcija  $M_t/M_\infty$  od  $t^{0.5}$ ; eksperimentalni podaci su prikazani kao srednje vrednosti 3 merenja  $\pm$  SD

**Slika 5.24.** Otpuštena količina Zn<sup>2+</sup> u fiziološkom rastvoru iz ZnA i Zn<sub>0,5</sub>/V čestica ( $M_t$ ) normalizovana u odnosu na vlažnu masu alginata u česticama i početnu količinu Zn<sup>2+</sup> ( $M_0$ ); insert: otpuštena količina  $M_t/M_0$  Zn<sup>2+</sup> tokom početnog perioda od 8 h (eksperimentalni podaci su prikazani kao srednje vrednosti 3 merenja  $\pm$  SD; SD < 5 %)

**Slika 5.25.** Optičke mikrofotografije površina ZnA čestica slikane u fiziološkom rastvoru: (a) početni trenutak; (b) 24 h; (c) 48 h; (d) 5 dana; (razmernik: 0.5 mm)

**Slika 5.26.** UV-vidljivi spektar (200-500 nm) 10 mas. % vodenog rastvora PVP-I pre i nakon imobilizacije na čestice Ca<sub>0,5</sub>/V

**Slika 5.27.** FT-IR spektri kompozitnih Ca-alginatnih čestica (Ca<sub>0,5</sub>/V), PVP-I i kompozitnih Ca-alginatnih čestica impregniranih sa PVP-I (Ca<sub>0,5</sub>/V/PVP-I)

**Slika 5.28.** FE-SEM mikrofotografije spoljašnjih površina (inserti) i poprečnih preseka suvih čestica: (a) Ca<sub>0.5</sub>/V/PVP-I; (b) Zn<sub>0.5</sub>/V/PVP-I; (razmernik: 500 μm (inserti) i 10 μm);

**Slika 5.29.** UV-vidljivi spektri u eksperimentu desorpcije joda nakon 48 h: (a) fiziološki rastvor; (b) rastvorene čestice;

**Slika 5.30.** Otpuštena količina AU u fiziološkom rastvoru iz kompozitnih Zn<sub>0.5</sub>/V/PVP-I i Zn<sub>0.5</sub>/V čestica ( $M_0$ ) normalizovana u odnosu na početni sadržaj AU u česticama ( $M_0$ ) tokom perioda od pet dana u fiziološkom rastvoru;

**Slika 5.31.** Optičke mikrofotografije površina kompozitnih Zn<sub>0.5</sub>/V/PVP-I čestica u fiziološkom rastvoru: (a) početni trenutak; (b) 24 h; (c) 48 h; (d) 5 dana; (razmernik: 0.5 mm);

**Slika 5.32.** Otpuštena količina Zn<sup>2+</sup> u fiziološkom rastvoru iz Zn<sub>0.5</sub>/V/PVP-I čestica ( $M_t$ ) normalizovana u odnosu na vlažnu masu alginata u česticama i početnu količinu Zn<sup>2+</sup> ( $M_0$ ); insert: otpuštena količina  $M_t/M_0$  Zn<sup>2+</sup> tokom početnog perioda od 8 h (eksperimentalni podaci su prikazani kao srednje vrednosti 3 merenja ± SD)

**Slika 5.33.** Rezultati UV-vidljive spektroskopije: (a) apsorpcioni spektar rastvora LMJ u 5 mas. % rastvoru DMSO; (b) kalibraciona prava zavisnosti maksimalne apsorbanace na 272 nm od koncentracije LMJ u 5 mas. % rastvoru DMSO; eksperimentalni podaci su srednje vrednosti 3 merenja

**Slika 5.34.** Kinetika adsorbovane količine LMJ na čestice AU ( $q_e$ ) za tri različite početne koncentracije LMJ u 5 mas. % rastvoru DMSO tokom: (a) 72 h; (b) prvih 6 h; eksperimentalni podaci su srednja vrednost 3 merenja ± SD

**Slika 5.35.** FT-IR spektri AU u prahu, LMJ, čestica AU sa adsorbovanim LMJ iz rastvora koncentracije 0,1 mg/ml i čestica AU sa adsorbovanim LMJ iz rastvora koncentracije 1 mg/ml

**Slika 5.36.** UV-vidljivi spektri rastvora LMJ/DMSO pre adsorpcije i fiziološkog rastvora nakon 72 h desorpcije LMJ sa čestica AU sa adsorbovanom LMJ iz rastvora početne koncentracije 1 mg/ml

**Slika 5.37.** Ukupan broj ćelija bakterije *E. coli* ATCC 25922 u suspenziji i u suspenziji u prisustvu AU u prahu; (-) označava kontrolno zasejavanje na ploče direktno iz suspenzija bez prethodnog centrifugiranja uzoraka; (+) označava zasejavanje na ploče iz supernatanta centrifugiranih uzoraka na 600 ×g tokom 10 min; rezultati su prikazani kao log<sub>10</sub> CFU/ml i predstavljaju srednje vrednosti 2 merenja ± SD

**Slika 5.38.** Određivanje MBK za kompozitne Ca<sub>0,5</sub>/V/PVP-I čestice u suspenziji *E. coli* ATCC 25922: (a) 0,1 g/ml; (b) 0,2 g/ml; (c) 0,3 g/ml; (d) 0,4 g/ml

**Slika 5.39.** Antibakterijska aktivnost Ca<sub>0,5</sub>/V čestica sa PVP-I u suspenziji: (a) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i (b) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; kontrole su bile bakterijske suspenzije (+ kontrola), AU u prahu, Ca-alginatne čestice (CaA) i Ca<sub>0,5</sub>/V čestice; početni broj ćelija bakterija je bio 10<sup>5</sup> CFU/ml; rezultati su prikazani kao log<sub>10</sub> CFU/ml i predstavljaju srednje vrednosti 2 merenja ± SD

**Slika 5.40.** Antimikrobna aktivnost Ca<sub>0,5</sub>/V čestica sa PVP-I ispitivana u suspenzijama: (a) MRSA, (b) *E. coli*, (c) *P. aeruginosa*, (d) *E. faecalis*, (e) *P. mirabilis*, (f) *C. albicans*; kontrole su bile suspenzije mikroorganizama (+ kontrola), AU u prahu i Ca<sub>0,5</sub>/V čestice; početni broj ćelija

je bio  $10^5$  CFU/ml za vrste bakterija i  $10^6$  CFU/ml za ispitivanu vrstu kvasca; rezultati su prikazani kao  $\log_{10}$  CFU/ml i predstavljaju srednje vrednosti 2 merenja  $\pm$  SD

**Slika 5.41.** Uticaj kompozitnih čestica Ca0,5/V sa PVP-I na rast vrsta bakterija u suspenzijama: (a) *E. coli*, (b) *E. faecalis*, (c) *P. mirabilis*. Kao kontrole su korišćene Ca-alginatne čestice (CaA), Ca0,5/V čestice, AU u prahu i bakterijska suspenzija (pozitivna kontrola); početni broj ćelija bakterija je bio  $10^6$ - $10^7$  CFU/ml; rezultati su prikazani kao  $\log_{10}$  CFU/ml i predstavljaju srednje vrednosti 2 merenja  $\pm$  SD

**Slika 5.42.** Uticaj kompozitnih čestica Ca0,5/V sa PVP-I na rast bakterija u suspenziji MRSA. Kao kontrole su korišćene Ca-alginatne čestice (CaA), Ca0,5/V čestice, AU u prahu i bakterijska suspenzija (pozitivna kontrola); početni broj ćelija bakterije je bio  $10^3$  CFU/ml; rezultati su prikazani kao  $\log_{10}$  CFU/ml i predstavljaju srednje vrednosti 2 merenja  $\pm$  SD

**Slika 5.43.** Antibakterijska aktivnost Zn0,5/V čestica sa PVP-I ispitivana u suspenziji *E. coli* ATCC 25922; kontrole su bile suspenzije mikroorganizama (+ kontrola), AU u prahu, ZnA i Zn0,5/V čestice; početni broj ćelija bakterija je bio  $10^5$  CFU/ml; rezultati su prikazani kao  $\log_{10}$  CFU/ml i predstavljaju srednje vrednosti 2 merenja  $\pm$  SD

**Slika 5.44.** Antimikrobna aktivnost Zn0,5/V čestica sa PVP-I ispitivana u suspenzijama (a) MRSA, (b) *E. coli*, (c) *P. aeruginosa*, (d) *E. faecalis*, (e) *P. mirabilis*, (f) *C. albicans*; kontrole su bile suspenzije mikroorganizama (+ kontrola), AU u prahu, ZnA i Zn0,5/V čestice; početni broj ćelija je bio  $10^5$  CFU/ml za vrste bakterija i  $10^6$  CFU/ml za ispitivanu vrstu kvasca; rezultati su prikazani kao  $\log_{10}$  CFU/ml i predstavljaju srednje vrednosti 2 merenja  $\pm$  SD

**Slika 5.45.** Otpuštanje  $Zn^{2+}$  u TS bujonu iz ZnA, Zn0,5/V i Zn0,5/V/PVP-I čestica: (a) otpuštena količina  $Zn^{2+}$  ( $M_t$ ) normalizovana u odnosu na vlažnu masu alginata i početnu količinu  $Zn^{2+}$  u česticama ( $M_0$ ), u toku vremena; (b) koncentracija  $Zn^{2+}$  u TS bujonu; eksperimentalni podaci su prikazani kao srednje vrednosti 3 merenja  $\pm$  SD;

**Slika 5.46.** Optičke mikrofotografije površina ZnA, Zn0,5/V i Zn0,5/V/PVP-I čestica u TS bujonu: u početnom trenutku (a, d, g redom); nakon 1 h (b, e, h redom); nakon 24 h (c, f, i redom); (razmernik = 0.5 mm)

**Slika 5.47.** Antimikrobna aktivnost čestica AU sa adsorbovanim LMJ ispitivana u suspenzijama: (a) *E. coli*; (b) *C. albicans*; (c) MRSA; (e) *E. faecalis*; (f) *P. aeruginosa*; (g) *P. mirabilis*

## Spisak tabela

**Tabela 4.1.** Rezultati antibiograma kliničkih sojeva korišćenih u ovom radu

**Tabela 4.2.** Sastavi početnih smeša alginata i AU, i odgovarajuće šifre dobijenih CaA/AU čestica

**Tabela 5.1.** Koncentracije AU u česticama ( $AU_{\delta}$ ) dobijenih geliranjem u rastvorima  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  različitih koncentracija

**Tabela 5.2.** Vrednosti prečnika vlažnih ( $d_v$ ) i suvih ( $d_s$ ) kompozitnih CaA/AU čestica

**Tabela 5.3.** Teksturalne karakteristike 0,5/M, 0,5/V, 1,5/M i 1,5/V CaA/AU čestica, i AU praha

**Tabela 5.4.** Vrednosti prividnog koeficijenta difuzije,  $D$

**Tabela 5.5.** Teksturalne karakteristike kompozitnih Zn0,5/V čestica i AU u prahu

**Tabela 5.6.** Elementarna analiza kompozitnih čestica Ca0,5/V/PVP-I i Zn0,5/V/PVP-I pomoću SEM/EDS tehnike



## **Biografija**

Andrea Osmokrović je rođena 18. 08. 1978. g. u Somboru, Republika Srbija. Osnovno i srednje obrazovanje završila je u Beogradu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu završila je sa prosečnom ocenom 8,86, i time stekla stručni naziv doktor medicine. Poslediplomske studije je upisala na Univerzitetu u Beogradu, smer Biomedicinsko inženjerstvo i tehnologije, a magistarsku tezu je radila pod rukovodstvom prof. dr Bojane Obradović na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Magistarsku tezu pod naslovom “Razvoj bioreaktorskog sistema sa pakovanim slojem alginatnih mikročestica za bioinženjering tkiva hrskavice” je odbranila 2009. g. i stekla zvanje magistra biomedicinskog inženjerstva. Školske 2008/09. g. je dobila stipendiju Švajcarske državne komisije za stipendiranje stranih studenata (Scholarship for Postgraduate Students for the Academic Year 2008/09, Swiss Federal Commission for Scholarships for Foreign Students, Speciall Allocation Programme for Central and East European Countries) u okviru koje je učestvovala u naučno-istraživačkom radu u Univerzitetskoj bolnici Univerziteta u Bazelu u istraživačkoj grupi dr Ivana Martina. Od 2013. godine ponovo je angažovana na projektima integralnih i interdisciplinarnih istraživanja Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (III45019 i III46010).

Do sada je objavila tri rada u međunarodnim časopisima (1 M21a, 1 M21, 1 M23), jedan rad u časopisu nacionalnog značaja (M52), dva saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu i dva saopštenja sa nacionalnih skupova štampana u izvodu. Takođe, koautor je pronalaska zaštićenog patentnom prijavom (M87) koji je nagrađen na Međunarodnoj izložbi pronalazaka, novih tehnologija i industrijskog dizajna „Pronalazaštvo-Beograd 2018“ Srebrnom medaljom sa likom Nikole Tesle.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Andrea Osmokrović

Број индекса \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

RAZVOJ NOVIH ANTIMIKROBNIH BIOAKTIVNIH KOMPOZITA ZA MEDICINSKU  
PRIMENU U TERAPIJI RANA

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

Потпис аутора

У Београду,

\_\_\_\_\_

## **Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора: Andrea Osmokrović

Број индекса:

Студијски програм: Biomedicinsko inženjerstvo i tehnologije

Наслов рада: RAZVOJ NOVIH ANTIMIKROBNIH BIOAKTIVNIH KOMPOZITA ZA  
MEDICINSKU PRIMENU U TERAPIJI RANA

Ментор: Prof. Dr. Bojana Obradović

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду,

## Изјава о коришћењу

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

RAZVOJ NOVIH ANTIMIKROBNIH BIOAKTIVNIH KOMPOZITA ZA MEDICINSKU PRIMENU U TERAPIJI RANA

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду,

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.