

Univerzitet u Beogradu
Fakultet za fizičku hemiju

Jelena I. Krstić

**RADIOLITIČKI SINTETISANI
NANOKOMPOZITNI MATERIJALI NA
BAZI POLI(VINIL ALKOHOLA),
HITAZANA I NANOČESTICA SREBRA
PROJEKTOVANI ZA BIOMEDICINSKU
PRIMENU**

-Doktorska disertacija-



Beograd, 2016

University of Belgrade
Faculty of Physical Chemistry

Jelena I. Krstić

**RADIOLYTICALLY SYNTHESIZED
NANOCOMPOSITE MATERIALS BASED
ON POLY(VINYL ALCOHOL), CHITOSAN
AND SILVER NANOPARTICLES
DESIGNED FOR BIOMEDICAL
APPLICATION**

-Doctoral Dissertation-



Belgrade, 2016

Mentori:

dr Vera Dondur,
redovni profesor, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu

dr Aleksandra Radosavljević,
viši naučni saradnik, Institut za nuklearne nauke "Vinča", Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Zorica Kačarević-Popović,
naučni savetnik, Institut za nuklearne nauke "Vinča", Univerzitet u Beogradu

dr Šćepan Miljanić,
redovni profesor, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu

dr Ljiljana Damjanović,
vanredni profesor, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Doktorska disertacija pod nazivom “Radiolitički sintetisani nanokompozitni materijali na bazi poli(vinil alkohola), hitozana i nanočestica srebra projektovani za biomedicinsku primenu”, urađena je u okviru projekta “Funkcionalni, funkcionalizovani i usavršeni nano materijali“ br. III 45005 finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i u okviru dva koordinisana istraživačka projekta: “Nanoscale Radiation Engineering of Advanced Materials for Potential Biomedical Applications“ F23028 i “Radiation Curing of Composites for Enhancing their Feature and Utility in Healthcare and Industry“ F22051 finansiranih od strane Međunarodne agencije za atomsku energiju.

Ova doktorska disertacija je urađena u sledećim institucijama: Institut za nuklearne nauke “Vinča” Univerziteta u Beogradu; Klinika za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; Institut za mikrobiologiju Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu; Institut za anatomiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu.

Posebnu zahvalnost želim da uputim dr Zorici Kačarević-Popović, naučnom savetniku INN “Vinča” na nesebičnoj pomoći koju mi je pružala tokom izrade doktorske disertacije i korisnim savetima koji su doprineli otvaranju novih naučnih saznanja, mentoru dr Aleksandri Radosavljević, višem naučnom saradniku INN “Vinča” na velikoj stručnoj pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dela i korisnim savetima koji su istakli kvalitet naučnih rezultata ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se dr Šćepanu Miljaniću, redovnom profesoru Fakulteta za fizičku hemiju, mentoru dr Veri Dondur, redovnom profesoru Fakulteta za fizičku hemiju i dr Ljiljani Damjanović, vanrednom profesoru Fakulteta za fizičku hemiju.

Ovom prilikom se zahvaljujem kolegici Jeleni Spasojević, istraživaču saradniku INN “Vinča” na saradnji i podršci tokom izrade ove doktorske disertacije, kao i svim kolegama iz INN “Vinča” koji su mi pomogli u realizaciji eksperimentalnog dela doktorske disertacije.

Najdublju i neizmernu zahvalnost dugujem svojoj porodici, ocu Ivanu, majci Snežani, sestri Jasmini, sestriću Dušanu, i svojim prijateljima, za ljubav, razumevanje i pomoć tokom izrade ove doktorske disertacije.

Rezime

Nanokompozitni hidrogelovi imaju potencijal primene u biomedicini za kontrolisano oslobađanje bioaktivnih komponenata. Razvoj koncepta hidrogel nanokompozita podrazumeva unapređenje fizičko-hemijskih, mehaničkih i antibakterijskih svojstava u cilju rešavanja aktuelnog problema rezistencije na antibiotike.

Za sintezu hidrogel nanokompozita odabrani su poli(vinil alkohol) (PVA) i antibakterijske komponente: nanočestično srebro (Ag) i vodorastvorni hitozan (vr-CS). U ovoj doktorskoj disertaciji težilo se ka unapređenju antibakterijske efikasnosti hidrogel nanokompozita uvođenjem vodorastvornog derivata prirodnog polimera CS dobijenog redukovanjem molarne mase γ -zračenjem. U istraživanju se pošlo od pretpostavke da se pored adekvatnog odabira metode sinteze, poboljšanje farmakokinetičkog odgovora može postići i povećanjem biodostupnosti Ag^+ -jona smanjenjem veličine nanočestica, tj. povećanjem efikasne površine oksidacije bez povećanja ukupne koncentracije srebra. Najveći uticaj na efikasnost oslobađanja antibakterijske komponente tj. na antibakterijsku snagu bi na osnovu ovog koncepta imao potencijal oksidacije odn. Gibsova slobodna energija metalnih nanočestica na granici faza sa biološkim fluidom unutar pora nabubrele polimerne mreže.

U prvoj fazi istraživanja hidrogel nanokompoziti na bazi PVA i Ag-nanočestica sintetisani su kao model sistemi radijaciono-hemijskom metodom, upotrebom γ -zračenja. Primenjen je dvostepeni proces radiolitičke sinteze za inkorporaciju Ag-nanočestica unutar prethodno sintetisane polimerne mreže. Ispitan je uticaj koncentracije i veličine Ag-nanočestica, kao i transportnih svojstava matrice na kinetiku oslobađanja Ag^+ -jona iz hidrogel nanokompozita. Ispitan je potencijal oksidacije promenom ukupne specifične površine Ag-nanočestica i *in vitro* antibakterijske snage na dve vrste bakterija *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* (postignuta je maksimalna Gibsova slobodna energija nanočestica od -234 kJ/mol/g). Ovladano je parametrima projektovanja antibakterijske funkcije u okviru terapijskog prozora za primene u obliku antibakterijskih zavoja za zarastanje rana ili mekotkivnih implanata.

U drugom delu istraživanja akcenat je stavljen na unapređenje polimerne matrice uvođenjem CS i ispitivanje mogućnosti kontrolisanja veličine Ag-nanočestica promenom masenog odnosa PVA/CS blende.

Treći deo istraživanja se sastojao u radijaciono-hemijskoj modifikaciji CS γ -zračenjem. Akcenat je stavljen na povećanje rastvorljivosti CS u fiziološkim uslovima γ -zračenjem, redukovanjem molarne mase raskidanjem glukozičnih veza i Majarovom reakcijom. Molarna masa CS je redukovana sa (95 ± 9) kDa na (22 ± 1) kDa.

U poslednjoj fazi istraživanja sintetisani su hidrogel nanokompoziti na bazi PVA, vr-CS i Ag-nanočestica. Prvo su sintetisani hidrogel nanokompoziti u dvostepenom procesu ozračivanja koji je praćen post-radijacionim ciklusima zamrzavanja/odmrzavanja (Ag/PVA/vr-CS-Z/O). Potom je postupak sveden na jednostepeni proces *in situ* sinteze γ -zračenjem (Ag/PVA/vr-CS-*in situ*). Ispitana su struktura, kao i mehanička svojstva Ag/PVA/vr-CS-Z/O u statičkom i dinamičkom modu. U statičkom modu, dvostruko povećanje udela vr-CS kao komponente matrice hidrogel nanokompozita dovodi do porasta modula kompresibilnosti i Jangovog modula elastičnosti za 6 % i čvrstoće za 9 %. U dinamičkom modu je ispitivan uticaj vr-CS i Ag-nanočestica na gustinu umreženja i viskoelastična svojstva hidrogel nanokompozita. Ispitana su transportna svojstva matrica, odnosno tip difuzije fluida u fiziološkim uslovima, kao i specifična površina Ag-nanočestica, njihov uticaj na brzinu oksidacije odn. antibakterijsku snagu (pri čemu je maksimalna postignuta Gibsova slobodna energija nanočestica -229 kJ/mol/g), kao i na oslobađanje Ag⁺-jona. Ispitana je mogućnost unapređenja antibakterijske aktivnosti sinergijom Ag-nanočestica sa vr-CS, kako u Ag/PVA/vr-CS-Z/O sistemima, tako i u *in situ* sistemima sintetisanim optimizacijom radijaciono-hemijske metode (Ag/PVA/vr-CS-*in situ*).

Ključne reči: nanokompozitni hidrogelovi, nanočestice, biomedicinska primena, sistemi za kontrolisano oslobađanje antibakterijskih agenasa, γ -zračenje

Naučna oblast: Fizička hemija

Uža naučna oblast: Fizička hemija materijala - Fizička hemija makromolekula

UDK broj: 544.23

Radiolytically synthesized nanocomposites based on poly(vinyl alcohol), chitosan and silver nanoparticles designed for biomedical applications

Abstract

Nanocomposite hydrogels have the potential for biomedical applications for the controlled release of bioactive components. The development of the concept of hydrogel nanocomposites involves improving the physicochemical, mechanical and antibacterial properties in order to solve the problem of antibiotic resistance.

Materials that were chosen for the synthesis of the hydrogel nanocomposites are poly(vinyl alcohol) (PVA) and antibacterial components: silver (Ag) nanoparticles and a water-soluble chitosan (ws-CS). This doctoral dissertation was attempted to improve the antibacterial efficacy of hydrogel nanocomposites by introducing a water-soluble derivative of natural polymer CS, obtained by reducing its molar mass by γ -irradiation. The study is based on the assumption that beside the adequate method of synthesis, improving the pharmacokinetic response can be reached by increasing the bioavailability of Ag^+ -ions by reducing the nanoparticles size, increasing the their oxidation effective surface area instead of increasing the overall concentration of silver. Based on this concept, the oxidation potential of the metal nanoparticles, ie. the Gibbs free energy, have the greatest influence on the antibacterial release efficiency, ie. on the antibacterial power at the interface with the biological fluid inside the pores of the swollen polymer networks.

In the first phase of research, hydrogel nanocomposites based on PVA and Ag-nanoparticles were synthesized as model systems by radiation-chemical method using γ -radiation. The two-step radiolytic synthesis was applied for the incorporation of Ag-nanoparticles within the previously synthesized polymer network. The effects of the Ag-nanoparticles concentration and the size as the transport characteristics of the matrices on the Ag^+ -ions release kinetics were investigated. Subsequently, the oxidation potential was investigated by changing the Ag-nanoparticles specific surface area and *in vitro* antibacterial power against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* (the

maximum Gibbs free energy of nanoparticles was achieved -234 kJ/mol/g). It was overmastered the designing of antibacterial function for wound care dressings or soft tissue implants by placing the parameters within the therapeutic window.

In the second phase, the emphasis was placed on improving the polymer matrix by introducing CS and examination the possibility for controlling Ag-nanoparticles size by changing the weight ratio of PVA/CS blends.

The third part of the research included radiation-chemical modification of CS by γ -irradiation with emphasis on increasing the CS solubility in physiological conditions. Molar mass of CS was reduced from $(95 \pm 9) \text{ kDa}$ to $(22 \pm 1) \text{ kDa}$, by γ -irradiation induced glycoside bond cleavage combined with Maillard reaction.

In the last phase, hydrogel nanocomposites based on PVA, ws-CS and Ag-nanoparticles, were synthesized. The first, hydrogel nanocomposites were synthesized in a two-stage process of irradiation, followed by freeze/thawing cycles (Ag/PVA/ws-CS-F/T). Then the procedure was reduced to the one-step *in situ* synthesis by γ -irradiation (Ag/PVA/ws-CS-*in situ*). The structure and mechanical properties of Ag/PVA/ws-CS-F/T were investigated. In the static mode, double increasing of the ws-CS as a component leads to an increase the compressibility and Young's modulus of elasticity for 6% and mechanical strength for 9 %. In the dynamic mode, the influence of ws-CS and Ag-nanoparticles on the crosslinking density and viscoelastic properties were investigated. The matrix transport properties in physiological conditions and the nanoparticle specific surface areas, their influence on the oxidation rate (whereby the maximal attained Gibbs free energy of nanoparticles was -229 kJ/mol/g), and on the Ag^+ -ions release, were determined. The improving of antibacterial activity by synergy effect of Ag-nanoparticles and ws-CS for the Ag/PVA/ws-CS-F/T and the Ag/PVA/ws-CS-*in situ* systems, was investigated.

Keywords: nanocomposite hydrogels; nanoparticles; biomedical applications; drug delivery systems, γ -irradiation

Scientific field: Physical chemistry

Field of Academic Expertise: Physical chemistry of materials - Physical chemistry of macromolecules

UDC Number: 544.23

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DEO.....	2
2.1. ZNAČAJ NANOTEHNOLOGIJE U BIOMEDICINI.....	2
2.2. HIDROGEL NANOKOMPOZITI.....	7
2.2.1. Hidrogelovi.....	8
2.3. SINTEZA HIDROGEL NANOKOMPOZITA γ -ZRAČENJEM.....	11
2.3.1. Radijaciono-hemijska modifikacija materijala γ -zračenjem.....	11
2.3.2. Sinteza hidrogel nanokompozita γ -zračenjem.....	13
3. PREDMET I CILJ RADA.....	26
4. EKSPERIMENTALNI DEO.....	27
4.1. MATERIJALI.....	27
4.1.1. Materijali za sintezu.....	27
4.1.2. Materijali za praćenje oslobađanja antibakterijske komponente....	28
4.1.3. Materijali za <i>in vitro</i> test antibakterijske aktivnosti.....	28
4.2. METODE.....	29
4.2.1. Radijaciono-hemijske sinteze nanokompozita γ -ozračivanjem.....	29
4.2.2. Metode za karakterizaciju hidrogel nanokompozita.....	31
5. REZULTATI I DISKUSIJA.....	36
5.1. SINTEZA, KARAKTERIZACIJA I PRIMENA Ag/PVA HIDROGEL NANOKOMPOZITA.....	37
5.1.1. Sinteza Ag/PVA hidrogel nanokompozita.....	37
5.1.2. Stabilizacija nanočestica srebra u PVA hidrogelu.....	38
5.1.3. Određivanje veličine nanočestica srebra ispitivanjem optičkih i strukturnih svojstava Ag/PVA hidrogel nanokompozita.....	40
5.1.4. Kinetički aspekti i difuzioni modeli procesa bubrenja Ag/PVA hidrogel nanokompozita u fiziološkim uslovima.....	47
5.1.5. Kvantifikacija <i>in vitro</i> oslobađanja jona srebra u fiziološkim uslovima.....	55
5.1.6. Kinetički modeli <i>in vitro</i> oslobađanja jona srebra	

iz Ag/PVA hidrogel nanokompozita.....	60
5.1.7. Antibakterijska aktivnost <i>in vitro</i> oslobođenih jona srebra iz Ag/PVA hidrogel nanokompozita.....	67
5.2. SINTEZA I KARAKTERIZACIJA NEUMREŽENIH BLENDI Ag/PVA/CS NANOKOMPOZITA.....	69
5.2.1. Stabilizacija nanočestica srebra u PVA/CS blendama.....	70
5.3. OPTIMIZACIJA ANTIBAKTERIJSKIH SVOJSTAVA HIDROGEL NANOKOMPOZITA.....	79
5.3.1. Radijaciono-hemijska modifikacija hitozana.....	80
5.3.2. Sinteza Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita.....	84
5.3.3. Određivanje veličine nanočestica srebra ispitivanjem optičkih svojstava Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita.....	89
5.3.4. Kinetički aspekti i difuzioni modeli procesa bubrenja PVA/vr-CS-Z/O hidrogelova i Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita u fiziološkim uslovima.....	91
5.3.5. Mehanička svojstva PVA/vr-CS-Z/O hidrogelova i Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita.....	97
5.3.6. Kvantifikacija <i>in vitro</i> oslobađanja jona srebra u fiziološkim uslovima.....	102
5.3.7. Kinetički modeli <i>in vitro</i> oslobađanja jona srebra iz Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita.....	105
5.3.8. Antibakterijska aktivnost <i>in vitro</i> oslobođenih jona srebra iz Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita.....	109
5.4. OPTIMIZACIJA RADIJACIONO-HEMIJSKE METODE ZA <i>in situ</i> SINTEZU Ag/PVA/vr-CS HIDROGEL NANOKOMPOZITA.....	109
5.4.1. Sinteza i karakterizacija Ag/PVA/vr-CS- <i>in situ</i> hidrogel nanokompozita.....	109
5.4.2. Antibakterijska aktivnost <i>in vitro</i> oslobođenih jona srebra iz Ag/PVA/vr-CS- <i>in situ</i> hidrogel nanokompozita.....	111
6. ZAKLJUČAK.....	113
7. LITERATURA.....	116

8. PRILOZI.....126

1. UVOD

Savremena istraživanja na polju sinteze nanomaterijala kompozitne strukture su veoma aktuelna tematika usmerena ka unapređenju fizičko-hemijskih svojstava, biodostupnosti i farmakološkog odgovora inteligentnih sistema za biomedicinsku primenu. Mogućnost dizajniranja materijala sa atomskom preciznošću prvi je zapazio fizičar Ričard Fajnman (R. Feynman, 1959) uz predviđanje da *"Postoji dosta prostora na dnu"* i time otvorio novu oblast istraživanja multifunkcionalnih materijala. Napredak u sintezi nanočestica u proteklih nekoliko godina otvorio je vrata brojnim primenama u inženjerstvu novih materijala i biomedicini. Ag-nanočestice se sve više koriste u medicinskoj praksi u oblasti biofarmaceutike i implantologije zbog svojih antibakterijskih svojstava. Jedna od korisnih posledica funkcionalnog povezivanja nanočestica sa polimerima je upravo činjenica da se željena svojstva mogu kontrolisati na predvidiv način i kao takva uklopiti u željene zahteve za specifičnu primenu.

Inkorporacija farmakološki aktivnih Ag-nanočestica u hidrogelove omogućava postizanje izuzetnog svojstva produžene antibakterijske aktivnosti, a velika sličnost hidrogelova sa mekim tkivima, njihova biodegradabilnost i biokompatibilnost daju široku mogućnost primene hidrogel nanokompozita u biomedicini. Potrebe za razvojem novih antibakterijskih lekova postaju sve veće usled činjenice da mnoge infekcije postaju rezistentne na antibiotike, međutim sinteza novih antibakterijskih lekova je skupa i dugotrajna. Razvoj sistema za kontrolisano oslobađanje bioaktivnih komponenata sa antibakterijskim svojstvima zahteva jednostavnu sintezu i optimizaciju farmakokinetičkog mehanizma oslobađanja.

Ovim radom su obuhvaćena istraživanja koja su imala za cilj ispitivanje mogućnosti radijaciono-hemijske sinteze nanokompozitnih hidrogelova na bazi Ag-nanočestica, poli(vinil alkohola) i vodorastvornog derivata hitozana dobijenog γ -zračenjem, kao sistema za kontrolisano i održivo oslobađanje inkorporiranih i imobilisanih antibakterijskih agenasa i ovladavanje parametrima projektovanja njihove antibakterijske funkcije. Definisane termodinamičkih i farmakokinetičkih parametara omogućilo je uvid u mehanizam procesa oslobađanja bioaktivne komponente, u cilju dostave bioaktivne supstance kontrolisanom brzinom, u koncentraciji koja je ispod granice toksičnosti, sa specifičnim svojstvom produžene aktivnosti.

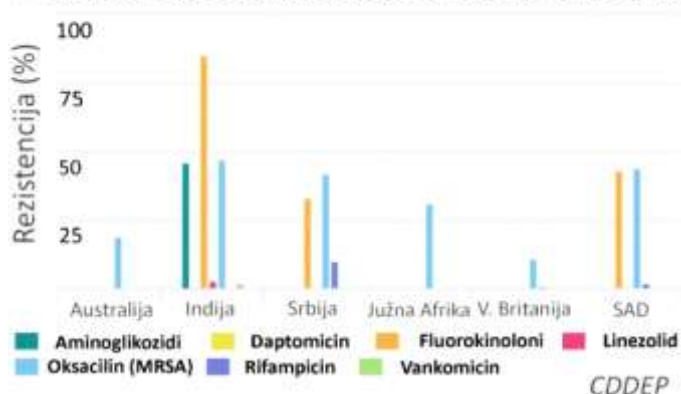
2. TEORIJSKI DEO

2.1. Značaj nanotehnologije u biomedicini

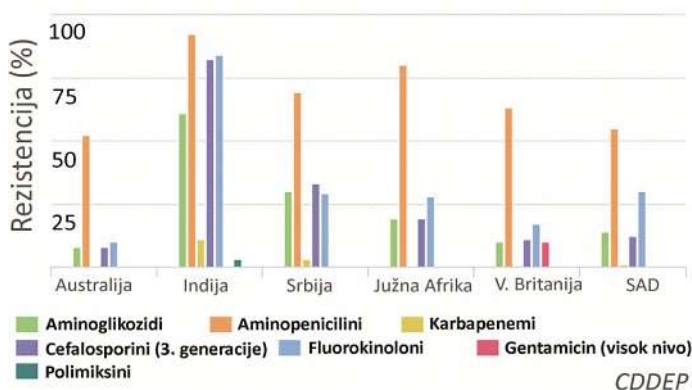
Poslednjih nekoliko decenija, promena ekologije bakterija i širenje rezistencije prema postojećim antibioticima postavila je, i pored napretka moderne medicine, složenije zahteve u pogledu istraživanja novih formulacija antibakterijskog potencijala (G. Franci et al., 2015). U tom pogledu, razvoj nanotehnologije kompozitnih materijala ima veliki značaj u biomedicini kod lečenja bakterijskih infekcija, pre svega zbog kontrolisanog antibakterijskog potencijala nanostrukturnih kompozitnih hidrogelova u dužem vremenskom periodu (Zhao et al., 2015).

Svetski centar za kontrolu i prevenciju bolesti (*Center for Disease Dynamics, Economics & Policy*) analizom podataka iz 49 zemalja navodi da je broj multirezistentnih infekcija na antibiotike značajno porastao u periodu od 1999. do 2015.

(a) Rezistencija *Staphylococcus Aureus* na antibiotike



(b) Rezistencija *Escherichia Coli* na antibiotike



Slika 1. Rezistencija *S. aureus* (a) i *E. coli* (b) na različite vrste antibiotika na svetskom nivou u poslednjih 15 godina. Korišćeni su podaci Svetskog centra za kontrolu i prevenciju bolesti (<http://www.cddep.org>, pristupljeno oktobra 2016.).

godine (slika 1) (<http://www.cddep.org>, pristupljeno oktobra 2016.), pri čemu je broj smrtnih slučajeva samo u Evropi oko 25 000 godišnje. Troškovi lečenja i borbe sa multirezistentnim *S. aureus* (MRSA) mikrobima su visoki i u Evropi premašuju 1,5 milijardu evra. Sinteza novih antibakterijskih lekova je skupa i dugotrajna, te je iz navedenih razloga neophodan potpuno novi pristup koji bi mogao da prati stalne promene rezistencije bakterija na antibiotike. U tom smislu, razvoj sistema za kontrolisano oslobađanje bioaktivnih komponenata sa antibakterijskim svojstvima postavlja nove zahteve koji uključuju jednostavnu sintezu i optimizovan farmakokinetički mehanizam oslobađanja antibakterijskog agensa.

Rasprostranjenost multirezistentnih bakterija se pre svega pripisuje učestaloj i neadekvatnoj upotrebi antibiotika. S druge strane, bakterije sa svojom velikom populacijom i kratkim vremenom reprodukcije, ubrzano razvijaju mehanizme otpornosti na antibiotike. Iz navedenih razloga, neophodan je potpuno novi pristup pomoću nanotehnologije koji bi mogao da prati stalne promene rezistencije bakterija na antibiotike. Različiti specifični mehanizmi antibakterijske aktivnosti nanočestica u odnosu na tradicionalne antibiotike daju ubedljivu prednost razvoju novih antibakterijskih kompozita (Zhao et al., 2015).

Upotreba srebra kao antibakterijskog agensa je nakon otkrića antibiotika značajno smanjena zbog neželjenih efekata izazvanih proizvoljnim doziranjem. Osim argirije, nepovratnog tamnjenja kože i sluzokože, kod akumuliranja velikih količina srebra u telu dolazi do poremećaja čula ukusa, mirisa i cerebralnih grčeva. Neadekvatno doziranje koloidnog srebra je ponovo došlo u fokus javnosti jer i jako niske koncentracije, zavisno od načina upotrebe, mogu pokazati citotoksičan efekat. Prema podacima Američke agencije za zaštitu životne sredine (*EPA, US Environmental Protection Agency*), oralno uzeta količina srebra $< 2 \mu\text{g/ml}$ dnevno po kilogramu telesne mase nema citotoksični efekat, dok količina srebra $> 5 \mu\text{g/ml}$ predstavlja opasnost po zdravlje čoveka (U. S. EPA, 2012, <https://cfpub.epa.gov/ncea/risk/recordisplay.cfm?deid=241665>, pristupljeno oktobra 2016.).

Istraživanja vezana za parenteralnu primenu srebra doprinose sve većem razvoju sistema za lečenje rana. Razvoj tzv. profilaktičke primene ima za cilj da smanji inokulum bakterija u hirurškim ranama i izvrši prevenciju eventualne infekcije. Primena kod lečenja akutnih i hroničnih rana je takođe značajna jer sprečava aktiviranje imunog

sistema bakterija i oštećenja tkiva. Srebro unutar obloga za rane je sastavni deo “visokoupijajućih” materijala, hidrogelova, te u prisustvu vlage, kao što je sekret iz rane, lako oksiduje prelazeći u oblik koji se lakše vezuje za proteine na površini ćelija mikroba. Iako se u prirodi može naći u tri različita oksidaciona stanja, samo je Ag^+ oblik rastvoran u vodi, te srebro u ovakvom oksidacionom stanju pokazuje baktericidno dejstvo na širok spektar bakterija, uključujući i antibiotik-rezistentne sojeve. Specifična mesta antimikrobnog delovanja Ag^+ -jona su raznovrsna, a antibakterijska aktivnost se javlja već pri vrlo niskim koncentracijama i time smanjuje rizik od razvoja rezistentnih sojeva bakterija (Ferreira et al., 2011).

Obloge za rane na bazi srebra, pored toga što štite ranu od prodora bakterija, obezbeđuju ujednačenu vlažnost, temperaturu i odgovarajuću pH vrednost. Srebro je u oblogama za rane prisutno u oblicima koji se razlikuju po mehanizmu oslobađanja zavisno od svojstava i strukture srebra, ali i strukture i stepena propustljivosti polimerne matrice prema okružujućem fluidu, koji je osnovni preduslov za zarastanje, jer se svi fizički i hemijski procesi odvijaju uz pomoć enzima koji su aktivni samo u vlažnoj sredini. Iako je početna cena relativno visoka, previjanje oblogama na bazi srebra smanjuje ukupne troškove lečenja (Ferreira et al., 2011).

S obzirom da su Ag-nanočestice često mnogo toksičnije u poređenju sa ekvivalentnom koncentracijom Ag^+ -jona, posebna pažnja se posvećuje ispitivanju potencijala oksidacije Ag-nanočestica ugrađenih u hidrogelove. Oksidovano srebro na površini nanočestica lakše vezuje ligande (hloride, sulfide, fosfate i dr.) prisutne u biološkom fluidu te se taloženjem srebrnih soli može smanjiti citotoksično dejstvo Ag-nanočestica (Ma et al., 2012). S obzirom da je osnovni nedostatak parenteralne administracije brzo resorbovanje bioaktivne supstance, a oralna administracija nije uspešna zbog brze degradacije bioaktivne komponente putem gastrointestinalnog trakta, u slučaju kada isporuka nije lokalizovana, za terapijski efekat su potrebne visoke doze bioaktivne supstance koje su često toksične. U tom pogledu, administracija terapeutika bi se mogla značajno unaprediti primenom sistema za kontrolisanu dostavu. Za razliku od konvencionalnih metoda, primena hidrogelova omogućava kontinualno i lokalizovano oslobađanje bioaktivne supstance za koju je dovoljno da bude prisutna u malim koncentracijama, te se ovakvi sistemi često nazivaju “inteligentni nosači” (Subbiah et al., 2010; Knetsch et al., 2011; Gaharwar et al., 2014). Literaturni podaci

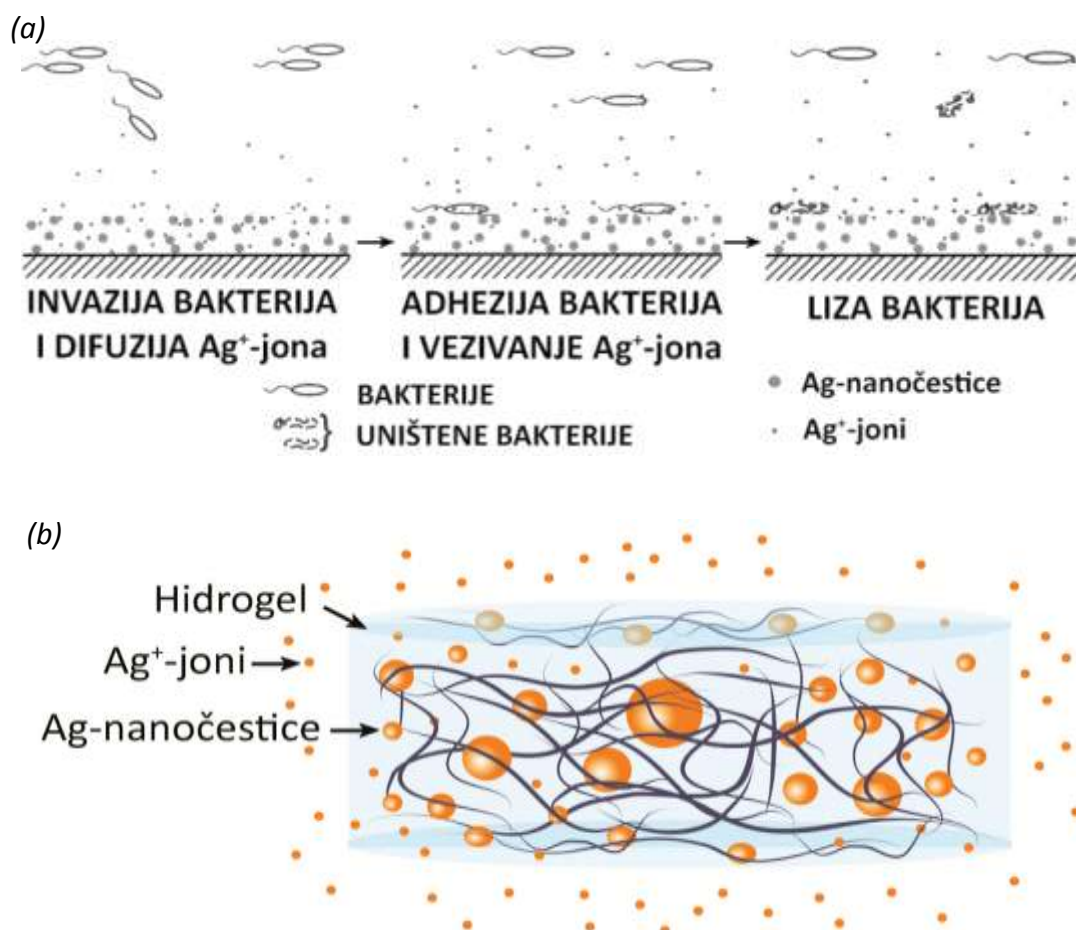
ispitivane antibakterijske aktivnosti za Ag-nanočestice različitih veličina prikazane su u tabeli 1 (G. Franci et al., 2015). Jain je sa saradnicima odredio da su minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) i minimalna baktericidna koncentracija (MBK) protiv standardnih referentnih kultura kao i multirezistentnih organizama u granici od 0,78-6,25 $\mu\text{g/ml}$ i 12,5 $\mu\text{g/ml}$, redom, za lokalnu primenu kod lečenja rana (Jain et al., 2009).

Tabela 1. Pregled literature antibakterijske aktivnosti Ag-nanočestica
(G. Franci et al., 2015).

Bakterije	Prečnik (nm)	Antibakterijski Efekat
<i>S. aureus</i>	5,5	MIK 0,2-4 ppm
<i>E. coli</i>	7-20	MIK 4 ppm
<i>S. aureus</i>		MIK 19 ppm
<i>E. coli</i>	10-15	MIK 25 ppm
<i>S. aureus</i>		MIK 10 ppm
<i>E. coli</i>	21	MIK 75 ppm

Skorija istraživanja ukazuju da Ag-nanočestice ne ispoljavaju antibakterijski efekat direktnom specifičnom interakcijom, već oksidovano srebro koje se oslobađa sa površine nanočestica zapravo dovodi do inhibicije rasta bakterija i drugih mikroorganizama u posmatranom medijumu (Liu et al., 2010; Xiu et al., 2012; Santos et al., 2014). Uz činjenicu da je rezistencija bakterija na srebro izuzetno retka, treba istaći da je antibakterijska aktivnost Ag-nanočestica rezultat više mehanizama koji deluju istovremeno. Ag^+ -joni se vezuju za negativno naelektrisane proteine i nukleinske kiseline, dovodeći do strukturnih promena i deformacija na ćelijskom zidu, membranama i nukleinskim kiselinama ćelija bakterija. Naime, Ag^+ -joni interaguju sa različitim elektron-donor funkcionalnim grupama, kao što su tioli, fosfati, hidroksili, imidazoli i indoli. Santos i saradnici (Santos et al., 2014) su ispitivali različite ćelijske odgovore uzrokovane prisustvom Ag-nanočestica *in vivo*. Mnoge studije su potvrdile da Ag-nanočestice smanjuju ćelijsku vijabilnost (ukupnu aktivnost populacije ćelija) uzrokujući oštećenja na ćelijskoj membrani, ali i unutarćelijsko formiranje reaktivnih oksidujućih vrsta koje pojačavaju antimikrobno dejstvo (slika 2). Povećanjem mitohondrijalne permeabilnosti membrana, ali i oštećenjem intraćelijskih struktura

dolazi do inhibicije sinteze proteina, denaturacije ribozoma i blokiranja translacije i transkripcije vezivanjem za genetski materijal ćelija bakterija (Knetsch et al., 2011; Santos et al., 2014; Zhao et al., 2015).



Slika 2. Mehanizam antibakterijskog delovanja srebra (a) (slika preuzeta iz reference (Knetsch et al., 2011)) i koncept hidrogel nanokompozita (b).

Treba istaći da bi razvoj koncepta termodinamičkog i farmakokinetičkog modelovanja prilikom sinteze sistema za kontrolisanu dostavu antibakterijskih agenasa značajno skratio vreme i obezbedio detaljan uvid u mehanizam nelinearne kinetike oslobađanja antibakterijskih agenasa za potencijalnu biomedicinsku primenu. Ovim konceptom bi Ag-nanočestice uskoro mogle da budu adekvatna zamena antibioticima u prevazilaženju problema rezistencije (Knetsch et al., 2011).

2.2. Hidrogel nanokompoziti

Nanokompozitnu strukturu poseduje širok spektar materijala u kojima je bar jedna komponenta submikronskih dimenzija. Prema restriktivnijoj definiciji, nanokompozitne strukture su izgrađene od ponavljajućih jedinica nanometarskih dimenzija (0,1-100 nm) koje čine posebnu fazu dispegovanu unutar kontinualne faze sa kojom se ne mešaju, niti se u njoj rastvaraju. Homogena raspodela dispegovane faze (punioća) čije fragmente okružuje i zajedno drži kontinualna faza (matrica) daje nove sisteme sa unapređenim svojstvima koja ne poseduju čiste komponente pojedinačno (Zhao et al., 2015).

Hidrogel nanokompoziti predstavljaju posebnu grupu nanomaterijala sa složenom strukturom umreženih polimernih lanaca sposobnih da stabilišu metalne čestice nanometarskih dimenzija i apsorbuju i zadrže velike količine fluida u dužem vremenskom periodu (Gaharwar et al., 2014).

Sinteza metalnih nanočestica i efikasnost polimernih stabilizatora. Prilikom sinteze metalnih nanočestica, za finu kontrolu nanokristalne morfologije neophodno je prisustvo funkcionalnih molekula koji putem hemijske ili fizičke interakcije održavaju čestice na rastojanjima dovoljno velikim da ne dođe do njihove agregacije (Subbiah et al., 2010).

Funkcionalni molekuli odn. stabilizatori (hvatajući agensi, gravirajući agensi, polimerni stabilizatori i pojedini surfaktanti) stupaju u interakciju sa odgovarajućim kristalografskim ravnima i zavisno od položaja atoma na površini nanočestica dolazi do formiranja različitih makroskopskih trodimenzionih struktura. Korišćenjem stabilizatora postiže se adekvatno kontrolisanje morfologije nanokristala, pri čemu redukovanjem površinske energije dolazi do formiranja termodinamički stabilnih struktura putem hemisorpcije. Brzina procesa formiranja redukujućih agenasa ima značajnu ulogu u kontroli nukleacije i rasta nanokristala. Kada se reakcija redukcije odigrava dovoljno velikom brzinom, krajnji produkt nema drugu mogućnost, već da uspostavi termodinamički favorizovan oblik (Xia et al., 2012).

2.2.1. Hidrogelovi

Hidrogelovi (*lat. gelu* - smrzavanje, led; *gelatus* - smrznuto, nepokretno) su trodimenzionalne, hidrofilne polimerne mreže sposobne da apsorbiraju i zadrže velike količine vode ili fiziološkog fluida, pri čemu njihova struktura ostaje nepromenjena. Kao takvi, poseduju kohezivna svojstva čvrstih tela i difuzivno-transportna svojstva tečnosti (Ganji et al., 2010).

Klasifikacija hidrogelova. Hidrogelovi se u zavisnosti od načina umreženja mogu klasifikovati na fizičke (pseudogelove) i hemijske (permanentne) gelove. Fizički gelovi nastaju pri blagim eksperimentalnim uslovima, nepostojani su i mehanički nestabilni, te se promenom spoljašnjih faktora (pH, temperature i jonske jačine) mogu prevesti u neumrežene sisteme. Hemijski gelovi nastaju kovalentnim vezivanjem polimernih lanaca, kada dolazi do formiranja permanentne trodimenzionalne strukture hidrogelova. Struktura mreže kod hemijskih gelova je izuzetno postojana (Ganji et al., 2010).

Na osnovu strukture mreže, hidrogelovi se dele na jednostavne mreže, semi-interpenetrirajuće (semi-IPM), interpenetrirajuće (IPM) i hibridne polimerne mreže (HPM). Semi-IPM nastaju preplitanjem lanaca polimerne mreže i neumreženog polimera, interpenetrirajuće polimerne mreže (IPM) nastaju preplitanjem dva umrežena polimera, a hibridne polimerne mreže (HPM) nastaju umrežavanjem strukturnih jedinica dva različita polimerna lanca (Hoffman et al., 2012).

Na osnovu polarnosti bočnih grupa hidrogelovi mogu biti jonski i neutralni. Jonski hidrogelovi sadrže naelektrisane bočne grupe i u zavisnosti od njihovog naelektrisanja mogu biti: anjonski, katjonski i amfifilni. Neutralni hidrogelovi ne sadrže naelektrisane grupe u svojoj strukturi. Fizičko-hemijska i mehanička svojstva hidrogelova se u zavisnosti od polarnosti bočnih grupa mogu kontrolisati promenama fizioloških uslova kao što su pH vrednost, temperatura, jonska jačina, promena koncentracije biološki aktivnih supstanci, itd (Hoffman et al., 2012).

Struktura mreže hidrogelova. Osnovni strukturni parametri mreže hidrogela su: srednja molarna masa polimernih lanaca između dve susedne tačke umreženja, M_c , udeo zapremine polimera u nabubrelom gelu, v_{2m} , efektivna gustina umreženja, v_e , i srednja

veličina pora (korelaciona dužina), ζ . Hidrogelovi nemaju homogenu strukturu. Oni poseduju područja koja su gušće umrežena i upijaju manje količine fluida, u vidu klastera ili grozdova, koji su dispergovani unutar područja koja imaju manju gustinu umreženja i apsorbuju veliku količinu fluida. Kakvi će umreženi nadmolekulski oblici nastati zavisi od primarne strukture makromolekula, konfiguracije, konformacije i uslova polimerizacije (Ganji et al., 2010; Hoffman et al., 2012).

Hidrogelovi se na osnovu veličine pora mogu podeliti na superporozne (pore veće od 100 μm), makroporozne (pore od 0,1-1 μm), mikroporozne (pore od 0,01-0,1 μm) i neporozne (pore od 0,001-0,01 μm) (Ganji et al., 2010; Hoffman et al., 2012).

Postupci za dobijanje hidrogelova. Fizičkim umreženjem nastaju gelovi kod kojih se vezivanje polimernih lanaca ostvaruje putem lako raskidivih fizičkih interakcija (elektrostatičke, hidrofobne interakcije, Van der Valsove (*eng. Van der Waals*) sile. Fizičko umreženje se postiže procesima asocijacije, agregacije, kristalizacije, kompleksacije, pri čemu nastaju gelovi različite krutosti, počevši od sol stanja ka lepljivom, želiranom i gel stanju (Hoffman et al., 2012).

Hemijski postupci dobijanja hidrogelova (reakcije radikalne polimerizacije, polikondenzacije i reakcije sa enzimima), dovode do vezivanja polimernih lanaca teško raskidivim kovalentnim vezama u prisustvu toksičnih hemijskih agenasa (inicijatora, aktivatora i umreživača) koje je teško ukloniti iz sistema, čak i pri malim koncentracijama (Hoffman et al., 2012).

Radijaciono-hemijsko umrežavanje za razliku od klasičnih hemijskih metoda kao inicijator koristi zračenje. Procesom lančane radikalske polimerizacije dobijaju se hemijski umreženi hidrogelovi. U zavisnosti od oblasti spektra primenjenog zračenja hidrogelovi se mogu dobiti fotopolimerizacijom upotrebom zračenja iz ULj/Vid oblasti spektra ili visoko-energijskim zračenjem kada se kao inicijator koriste α -, β -čestice, γ - ili X- zračenje (Hennink et al., 2012).

Bubrenje hidrogelova. Najvažnije svojstvo hidrogelova je njihova hidrofilnost odn. svojstvo sorpcije vode ili bioloških fluida zavisno od udela hidrofilnih funkcionalnih grupa ($-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{CONH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$), kapilarnih oblasti i razlika u osmotskom pritisku, pri čemu dolazi do kontrolisane promene njihove

zapremine sa vremenom. Sile koje čine hidrogel nerastvornim u vodi ili biološkom fluidu su direktna posledica formiranja kovalentnih veza između polimernih lanaca (Ganji et al., 2010).

Hidrogelovi za biomedicinsku primenu. Zahvaljujući specifičnom svojstvu difuzije molekula aktivnih supstanci unutar i izvan hidrogelova, sve je veće interesovanje za njihovu primenu u biomedicini, posebno za kontrolisano oslobađanje lekovitih supstanci (peroralno, nazalno, transdermalno, oftalmološko ili parenteralno) (Buwalda et al., 2014). Visok sadržaj vode adsorbovan na polimernim lancima duži vremenski period i gumolika priroda čine hidrogelove kompatibilnim sa tkivima i proteinima u živim organizmima. Takođe, zahtevi za dizajniranje hidrogelova za biomedicinsku primenu podrazumevaju eliminisanje imuno/inflamatornog odgovora i pojavu citotoksičnosti (Zhu et al., 2011; Hennink et al., 2012).

Prirodni i sintetski polimeri se podjednako koriste za sintezu hidrogelova za biomedicinsku primenu. Prirodni, biodegradabilni polimeri imaju svojstvo inherentne biokompatibilnosti za razliku od sintetskih polimera, koji pak imaju mnogo širi opseg mehaničkih i hemijskih svojstava. Najčešće korišćeni sintetski hidrogelovi (PVA (poli(vinil alkohol)) i PEG (poli(etilen glikol))), zahvaljujući izrazitoj hidrofilnosti ispoljavaju slabu interakciju sa proteinima, a iz organizma se mogu odstraniti putem urina. Za sintezu amfifilnih blok kopolimera uvode se hidrofobna PLA (mlečna kiselina) i PGA (poliglikolna kiselina). Termoosetljivi PNIPAAm (poli(N-izopropilakrilamid)) hidrogelovi imaju donju kritičnu temperaturu faznog prelaza (*eng. lower critical solution temperature, LCST*), te već pri telesnoj temperaturi dolazi do smanjenja njihove zapremine kontrakcijom (Spasojević et al., 2015a; Spasojević et al., 2015b). Kako bi se postigla brža degradacija hidrogelova na bazi sintetskih polimera (PVA, PEG i PNIPAAm), biodegradabilne sekvence prirodnih polimera se moraju inkorporirati u mrežu sintetskih hidrogelova. Prirodni polimeri (hijaluronska kiselina, fibrin, kolagen, želatin, alginat, dekstran, hitozan) imaju svojstvo inherentne biokompatibilnosti i biodegradabilnosti, ali njihov osnovni nedostatak predstavljaju loša mehanička svojstva i velika brzina degradacije. Prednosti i nedostaci hidrogelova na bazi prirodnih ili sintetskih polimera se mogu nadomestiti sintezom hibridnih hidrogelova baziranih na konstitutivnim jedinicama prirodnih ili sintetskih

polimera, uz mogućnost precizne kontrole svojstava za biomedicinsku primenu (Kamoun et al., 2015; Spasojević et al., 2015a; Spasojević et al., 2015b).

Hidrogelovi kao matrice za kontrolisanu dostavu bioaktivnih supstanci. Hidrogelovi predstavljaju odlične matrice za inkorporaciju metalnih, oksidnih i poluprovodničkih nanočestica, koje sa druge strane pokazuju izrazito dobra optička, električna i magnetna svojstva. Agregaciona stabilnost ovih sistema određena je adsorpcijom polimera na metalnim česticama, koje imaju tendenciju da smanje slobodnu površinsku energiju (Buwalda et al., 2014).

Hidrogelovi u tkivnom inženjerstvu se primenjuju kao novi pristup u lečenju oštećenja/disfunkcije tkiva ili organa, dizajniranjem funkcionalnih trodimenzionih tkiva. Glavni cilj je kreiranje novih tkiva bilo direktno putem transplatacije ćelija iz zdravog tkiva ili rastom tkiva izvan tela (Buwalda et al., 2014).

2.3. Sinteza hidrogel nanokompozita γ -zračenjem

2.3.1. Radijaciono-hemijska modifikacija materijala γ -zračenjem

Radijaciono-hemijska metoda se najčešće koristi za dobijanje nanokompozitnih materijala sa unapređenim fizičko-hemijskim svojstvima. Biološko/mikrobicidno delovanje jonizujućih zračenja osnova je radijacione sterilizacije medicinske opreme i predmeta za jednokratnu upotrebu kao i farmaceutskih preparata (Mostafavi et al., 2008).

γ – *zračenje*. Radioaktivni izvor γ - zračenja $^{60}\text{Co}_{27}$ se najčešće koristi u radijacionoj hemiji koja se primenjuje kao sofisticirana tehnologija sinteze materijala za industrijsku i biomedicinsku primenu. β -raspad ^{60}Co ($t_{1/2} = 5,27$ godina) do stabilnog izotopa $^{60}\text{Ni}_{28}$ je praćen emisijom 2 fotona energije 1,173 MeV i 1,333 MeV. Pored ^{60}Co , u manjoj meri koriste se i drugi radionuklidi kao izvori γ - zračenja: ^{137}Cs ($t_{1/2} = 30,17$ godina i energijom γ - zračenja od 662 keV) i ^{192}Ir ($t_{1/2} = 73,83$ dana i maksimalnom energijom γ - zračenja od 1,378 MeV) (Mostafavi et al., 2008).

Umrežavanje, degradacija polimernih lanaca, polimerizacija čistih monomera i polimernih blendi, kalemljenje polimera kao i hemijska aktivacija oksidacijom, samo su neki od hemijskih procesa koji se odigravaju ukoliko se polimerni materijal izloži dejstvu jonizujućeg zračenja (Mostafavi et al., 2008).

Generisanje metalnih nanočestica u prisustvu polimera kao stabilizatora rasta klastera, uspešno se postiže primenom radiolitičke “*bottom-up*” metode. Radiolitički generisane vrste, solvatisani elektroni, primarni i sekundarni radikali ispoljavaju jako redukujuće dejstvo, te metalni joni bivaju redukovani pri svakoj interakciji sa redukujućim vrstama. Konačno, formirani atomi zauzimaju homogenu raspodelu kroz čitavu zapreminu rastvora, dok njihova sudarna interakcija postaje ograničena usled prisustva polimernih molekula. Veličina i oblik formiranih klastera u najvećoj meri zavise od vrste polimera i masenog odnosa polimera i metala (Belloni et al., 2006; Saion et al., 2013).

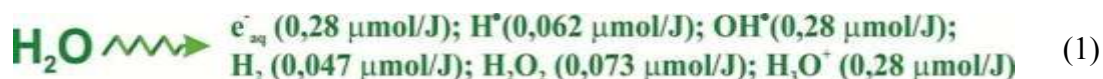
Uopšteno, trajna promena u strukturi polaznih supstanci je posledica specifične interakcije izuzetno reaktivnih slobodnih radikala, jona i ekscitovanih molekula u sistemu. Veličina promene u materijalu pod dejstvom jonizujućeg zračenja zavisi od apsorbovane doze, D , i jačine apsorbovane doze (brzine doze). Apsorbovana doza je količina energije koju apsorbuje jedinična masa ozračenog materijala. U SI sistemu osnovna jedinica za apsorbovanu dozu je grej ($\text{Gy} = \text{J/kg}$), ali je u upotrebi i rad [$1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad}$]. Količina energije koja se apsorbuje po jedinici mase ozračenog materijala u jedinici vremena predstavlja jačinu apsorbovane doze (brzinu doze). Osnovna SI jedinica za jačinu apsorbovane doze je Gy/h (Mostafavi et al., 2008).

G -vrednost ili radijaciono-hemijski prinos je veličina koja daje kvantitativnu meru hemijskih promena koje se odigravaju u reakcionom sistemu pod uticajem γ -zračenja. Ova veličina predstavlja broj nastalih produkata u sistemu pri apsorbovanoj energiji zračenja od 100 eV. Povećanje vrednosti radijaciono-hemijskog prinosa se može postići ukoliko se u reakcionom sistemu dodaje supstanca koja imaju sposobnost da hemijski reaguje sa nepoželjnim vrstama i na taj način ih ukloni iz sistema, učini neaktivnim ili ih prevede u odgovarajuće poželjne radikale. Ove supstance su zbog efikasnog dejstva sa nepoželjnim vrstama u sistemu dobile naziv “hvatala” radikala (skevendžeri) (Mostafavi et al., 2008).

2.3.2. Sinteza hidrogel nanokompozita γ -zračenjem

Istraživanja su pokazala da je radijaciono-hemijska metoda sinteze veoma pogodna za istovremenu modifikaciju i integrisanje polimer/metal konstituenata, te omogućava fino dizajniranje željenih inherentnih svojstava hidrogel nanokompozita, naročito kada je reč o primenama u biomedicini. Poseban izazov u ovoj oblasti istraživanja vezan je za sintezu i karakterizaciju nanočestica u unapređenim strukturama polimernih smeša u kojima je bar jedna komponenta prirodni polimer nastao biosintezom u živim organizmima. U cilju dobijanja biomimetičkih materijala, zahtevi nanotehnologije nisu više usmereni samo na formulisanje terapijskih agenasa nanokompozita, nego i na istraživanja aspekata njihove funkcionalnije primene (Kamoun et al., 2015). Sinteza hidrogel nanokompozita γ -zračenjem se može izvoditi u dvostepenom procesu, najpre sintezom polimerne matrice hidrogela, a potom sintezom metalnih nanočestica u hidrogelu (Krklješ et al., 2007a) ili sintezom hidrogel nanokompozita u jednostepenom procesu (Juby et al., 2012).

Sinteza hidrogelova γ -zračenjem. Početni stupanj sinteze hidrogelova, ozračivanjem vodenog rastvora polimera γ -zračenjem je radioliza vode. Jonizujuće zračenje u vodenim rastvorima izaziva niz fizičkih i hemijskih procesa koji se mogu podeliti u tri grupe: fizički, fizičkohemijski i hemijski stadijum. U procesu radiolize vode nastaje nekoliko primarnih produkata među kojima najveći prinos imaju hidratizani elektroni, e_{aq}^- , H_3O^+ joni i OH^\bullet radikalski produkti. H^\bullet radikali i molekularni produkti, vodonik, H_2 , i vodonik-peroksid, H_2O_2 , nastaju u manjem prinosu. Stanje u vodi 10^{-9} s po prolasku zračenja može se predstaviti jednačinom (1) u kojoj su vrednosti radijaciono-hemijskih prinosa primarnih produkata radiolize vode date u jedinicama $\mu\text{mol/J}$ (Mostafavi et al., 2008).



Nastali produkti mogu biti redukujuće vrste (e_{aq}^- sa standardnim redukcionim potencijalom ($E^0 (H_2O/e_{aq}^-) = -2,87$ V u odnosu na standardnu vodonikovu elektrodu (SHE)) i H_2 sa standardnim redukcionim potencijalom ($E^0 (H^+/H) = -2,3$ V (SHE)) ili

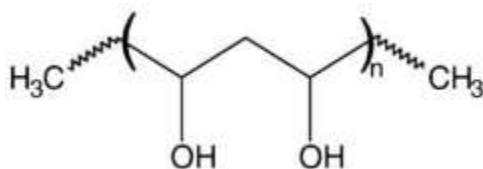
oksidujuće vrste (OH^\bullet radikali sa standardnim redukcionim potencijalom (E^0 ($\text{OH}^\bullet/\text{OH}^-$) = 1,9 V (SHE) u neutralnom rastvoru i E^0 (H^+ , $\text{OH}^\bullet/\text{H}_2\text{O}$) = 2,72 V (SHE) u kiselim rastvorima) i H_2O_2 . H^\bullet radikali nemaju značajnu ulogu u neutralnim ili alkalnim rastvorima, ali postaju značajne redukujuće vrste u kiselim rastvorima (E^0 ($\text{H}^+/\text{H}^\bullet$) = -2,31 V (SHE)) (Mostafavi et al., 2008).

Primarni oksidujući radikali nastali procesom radiolize vode, dovode do formiranja makroradikala koji direktno učestvuju u reakciji umrežavanja polimera. U cilju povećanja efikasnosti dobijanja hidrogelova, ozračivanje polimernih rastvora se vrši u inertnoj atmosferi. Ovaj eksperimentalni uslov sprečava formiranje peroksidnih radikala koji imaju inhibitorni uticaj na proces umrežavanja. Formiranje trodimenzionalne polimerne mreže pod uticajem γ -zračenja je složen proces intermolekulskog povezivanja dugačkih linearnih lanaca koji dovodi do povećanja molekulske mase polimera s jedne strane, ali i intramolekulskog povezivanja koje nema uticaja na molarnu masu polimera i formiranje hidrogela. Kritična tačka pri kojoj dolazi do organizacije makromolekula u beskonačnu trodimenzionalnu umreženu strukturu se naziva "tačka gela". U ovoj tački dolazi do formiranja posebnog tipa umreženih sistema, hidrogelova. Hidrogelovi sintetisani γ -zračenjem se uglavnom dobijaju iz sintetskih polimera koji zavisno od strukture i konformacije imaju svojstvo grananja i umrežavanja u čitavoj reakcionoj zapremini, što rezultuje smanjivanjem rastvorljivosti i povećanjem broja poprečnih veza (Mostafavi et al., 2008).

Radijaciono-umrežavajući polimer - poli(vinil alkohol). U ovoj doktorskoj disertaciji, poli(vinil alkohol) (PVA) je odabran kao sintetski polimer za sintezu hidrogel nanokompozita, zato što ima široku primenu u medicini i farmaciji, zbog svojih biokompatibilnih svojstava. Veoma je pogodan za sintezu predviđenih nanokompozita jer je vodorastvoran i radijaciono-umrežavajući polimer, optički je transparentan i ima strukturu makromolekula koja može da bude donor elektrona pri redukciji metalnih jona (Baker et al., 2012; Buwalda et al., 2014).

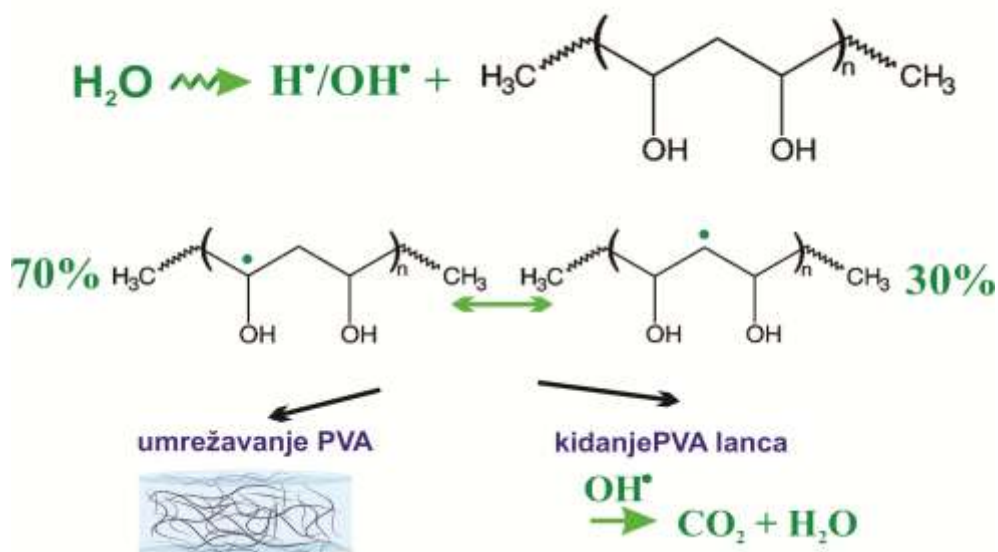
Poli(vinil alkohol) je polimer vinilnog tipa koji nastaje slobodnoradikalskom vinil polimerizacijom monomera vinil acetata. Na slici 3 prikazana je hemijska struktura PVA. Zahvaljujući velikom broju hidroksilnih grupa, PVA se rastvara u vodi, na

povišenoj temperaturi iznad 70 °C, pri čemu se njegova rastvorljivost povećava sa povećanjem stepena hidrolize.



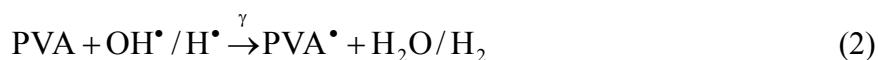
Slika 3. Hemijska struktura PVA sa visokim stepenom hidrolize.

PVA hidrogelovi se radijaciono-hemijskom metodom dobijaju uglavnom ozračivanjem razblaženih vodenih rastvora ($c < 0,1$ M). Proces umrežavanje se odigrava pri interakciji sa primarnim produktima radiolize vode ($\text{OH}^\bullet/\text{H}^\bullet$) koji formiraju radikale na polimernom lancu (slika 4) (Sakurada et al., 1961; Sakurada et al., 1964). $\text{OH}^\bullet/\text{H}^\bullet$ radikali u najvećoj meri vrše izdvajanje vodonika u α -poziciji u odnosu na $-\text{OH}$ grupu, pri čemu nastaje oko 70 % tercijskih radikala. Veća vrednost energije disocijacije vodonika iz $-\text{CH}_2$ grupe doprinosi nastajanju svega 30 % sekundarnih radikala koji nakon prenosa radikalske aktivnosti prelaze u tercijske radikale. Paralelno umrežavanju polimernih radikala odigravaju se reakcije disproporcionisanja i kidanja lanaca. Degradacija PVA do krajnjih produkata CO_2 i H_2O postaje izraženija u prisustvu kiseonika.



Slika 4. Mehanizam radijaciono-hemijskog formiranja PVA[•] radikala pod uticajem γ -zračenja i njihova dekompozicija u rastvoru.

Interakcijom PVA[•] radikala odigrava se proces umrežavanja (PVA–PVA). Ovi polimerni radikali delom nastaju u interakciji polimernih molekula sa primarnim produktima radiolize vode (OH[•] i H[•] radikalima) (jednačina (2)), a delom direktnim raskidanjem C–H veza γ -zračenjem (jednačina (3)) (Krklješ et al., 2007a; Kačarević-Popović et al., 2010). U zavisnosti od moguće pokretljivosti PVA[•] radikala, proces umrežavanja prikazan jednačinom (4) svodi se ili na indirektni efekat koji je dominantan pri nižim koncentracijama polimera (jednačina (2)), ili na direktan efekat dominantan u izuzetno koncentrovanim rastvorima (jednačina (3)) (Sakurada et al., 1961; Sakurada et al., 1964).

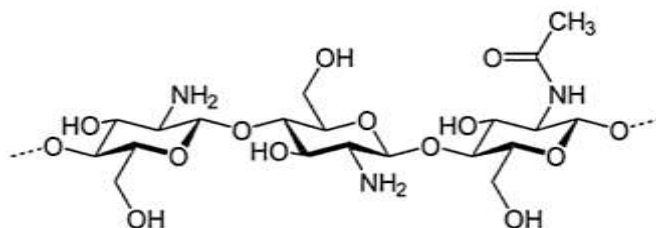


Pregled literature ukazuje da je poli(vinil alkohol) jedan od često korišćenih sintetskih polimera, koji se u obliku hidrogela primenjuje u biomedicini. Obloge za rane (*eng. wound dressings*), sistemi za kontrolisano oslobađanje terapijski aktivnih agenasa (*eng. drug delivery systems*), sistemi za regeneraciju i rekonstrukciju tkiva i organa, mekotivnih implanata, kontaktnih sočiva su samo neke od aktuelnih primena u biomedicini. Sintetisani PVA hidrogelovi spadaju u krute membrane sa izuzetno dobrim mehaničkim svojstvima. Velika gustina –OH grupa doprinosi visokoj hidrofilnosti, biokompatibilnosti i biodegradabilnosti. Međutim, primena PVA hidrogelova u biomedicini je uglavnom ograničena krutošću, kao i potencijalnim razmnožavanjem mikroorganizama u fiziološkim uslovima, te je značajan pristup razvoju primene hidrogelova unapređenje koje se često postiže mešanjem sintetskih sa prirodnim, biokompatibilnim polisaharidima i inkorporacijom metalnih nanočestica (Kamoun et al., 2015).

Degradacija prirodnih polimera γ -zračenjem. Poslednjih nekoliko decenija intenzivno se istražuju različiti pristupi radijaciono-hemijske modifikacije prirodnih polimera kako bi se njihova svojstva prilagodila biomedicinskoj primeni. Radiolitičke metode bazirane na primeni jonizujućih zračenja (γ -zračenje, elektronski snopovi) ili nejonizujućih zračenja (ULj/Vid-zračenje) su se pokazale kao posebno pogodne za sintezu vodorastvornih derivata. Radijaciona procesibilnost se ogleda u mogućnosti da se redukovanjem molarne mase i stepena deacetilacije, kao i potencijalnim pridruživanjem funkcionalnih grupa prirodni polimeri prilagode različitim primenama u biomedicini (Chmielewski et al., 2010).

Radijaciono-degradabilni polimer - hitozan. U ovoj doktorskoj disertaciji, hitozan je odabran kao prirodni polimer za sintezu hidrogel nanokompozita. Redukovanjem molarne mase hitozana povećava mu se rastvorljivost u vodi, te kao takav ima široku primenu u medicini i farmaciji, zbog svojih biokompatibilnih svojstava. Veoma je pogodan za sintezu predviđenih nanokompozita jer je radijaciono-degradabilni polimer. S druge strane, zahvaljujući svojoj strukturi, polimerni molekuli hitozana kao donori elektrona imaju sposobnost da redukuju jone metala putem kompleksirajuće oksidoredukcione reakcije (Choi et al., 2002).

Hitozan je linearan, binaran kopolisaharid, dobijen parcijalnom deacetilacijom hitina ekstrahovanog iz gljiva i oklopa ljuskara. Kao katjonski polisaharid ima veliki potencijal za primenu u različitim oblastima biomedicine i farmacije jer je netoksičan, biokompatibilan i bioaktivan (Jayakumar et al., 2011). Na slici 5 prikazana je hemijska struktura hitozana, kopolimera koji se sastoji od nasumično raspoređenih glukozaminskih i N-acetoglukozaminskih jedinica međusobno povezanih β -(1-4)-glukozidnim vezama.

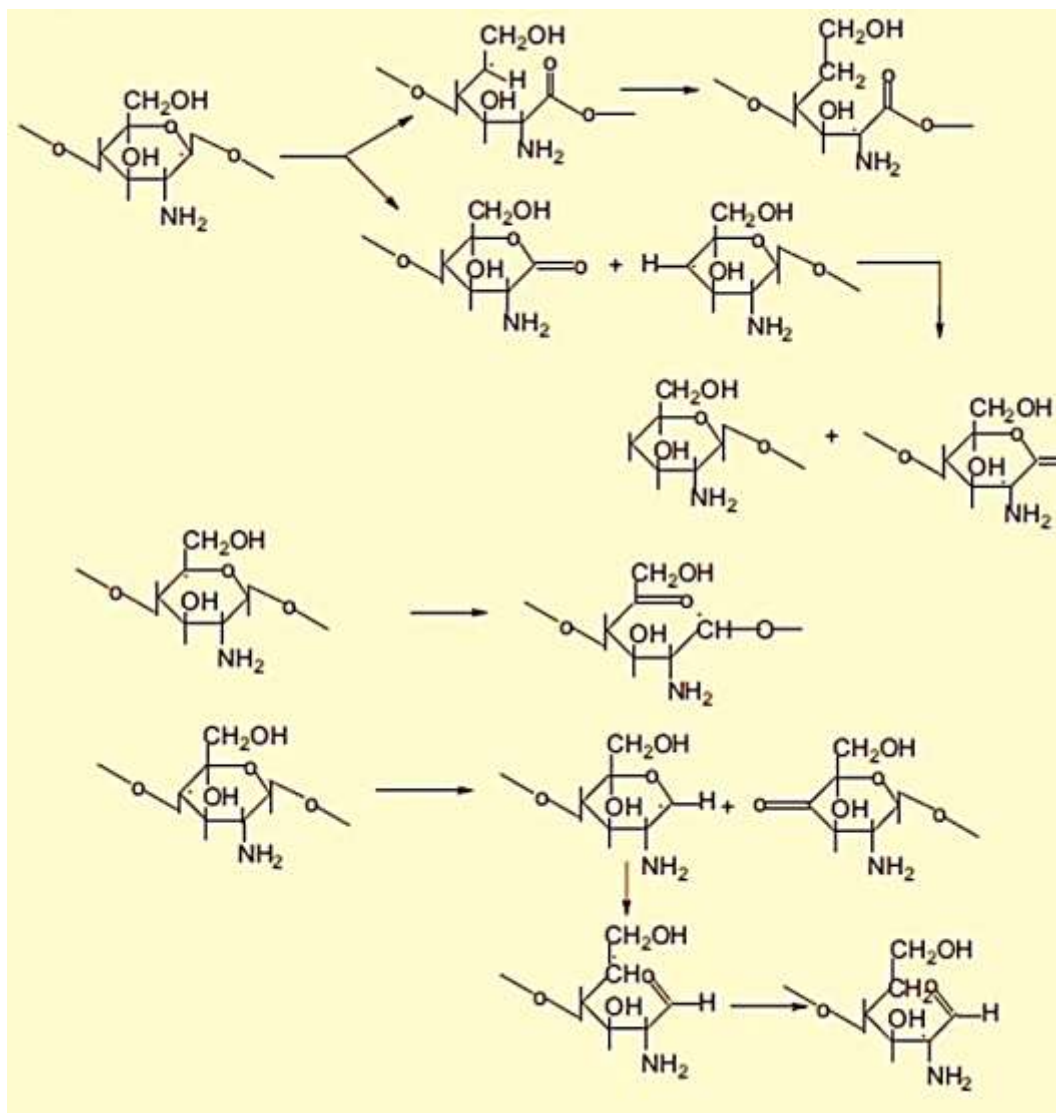


Slika 5. Hemijska struktura hitozana.

Rastvorljivost hitozana zavisi od pH vrednosti rastvora i njegove koncentracije, te se lako rastvara u specifičnim organskim kiselinama (mravlja, sirćetna, propionska, mlečna, limunska i ćilibarna kiselina), kao i u veoma malo neorganskih rastvarača (hlorovodonična, fosforna i azotna kiselina), dok je u neutralnoj ili baznoj sredini slabo rastvoran. Niska rastvorljivost hitozana pri pH vrednostima iznad kiselinske konstante kao i velika viskoznost čak i pri niskim koncentracijama osnovni su faktori koji ograničavaju njegovu primenu.

Mehanizam degradacije hitozana pod uticajem γ -zračenja prikazan je na slici 6 (Gryczka et al., 2009). Primarni produkti radiolize vode (OH^\bullet i H^\bullet radikali) napadaju β -(1-4)-glukozidne veze hitozana redukujući njegovu molarnu masu. Radijaciono-hemijski produkti (ketoni, aldehidi i karboksilni derivati) se uglavnom formiraju kao posledica nestabilnosti radikalske aktivnosti centrirane na C1, C4 i C5 položaje na piranoznom prstenu. Ove vrste dalje dovode do raskidanja β -(1-4)-glukozidne veze sa otvaranjem prstena (C5 radikal) i kidanju lanca (C1 i C4) pri čemu nastaju sekundarni radikali i karbonilne strukture koje aktiviraju $-\text{CH}$ veze.

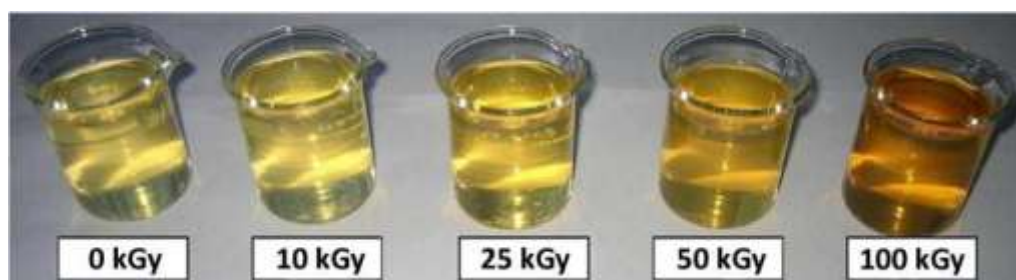
Nadalje reakcije sa H atomima dovode do formiranja stabilnih α -radikala sa karbonilnim grupama na krajevima lanca (Gryczka et al., 2009).



Slika 6. Mehanizam radijaciono-hemijskog formiranja CS^{\bullet} radikala pod uticajem γ -zračenja i njihova dekompozicija u rastvoru (Gryczka et al., 2009).

Efikasnost degradacije hitozana je veća u rastvorima manje viskoznosti, kada je pokretljivost OH^{\bullet} radikala veća. Takođe, udaljenost između dva makroradikala je u ovakvim rastvorima veća, što značajno smanjuje mogućnost njihove rekombinacije (Gryczka et al., 2009). Degradacija hitozana γ -zračenjem je pored

raskidanja β -(1-4)-glukozidne veze praćena i formiranjem redukujućih saharida sa slobodnim aldehidnim ili keto-grupama. Posledica strukturnog “otvaranja“ prstena hitozana pod uticajem γ -zraćenja, dovodi do odigravanja karakteristične Majarove (*franc. Maillard*) reakcije između karbonilnih grupa redukujućih šećera i amino grupa hitozana, pri čemu dolazi do formiranja niskomolarnih vodorastvornih glukozilaminskih produkata braon boje (slika 7) (Zainol et al., 2009).



Slika 7. Efekat γ -zraćenja na fizičko obojenje rastvora hitozana. Slika preuzeta iz reference (Zainol et al., 2009).

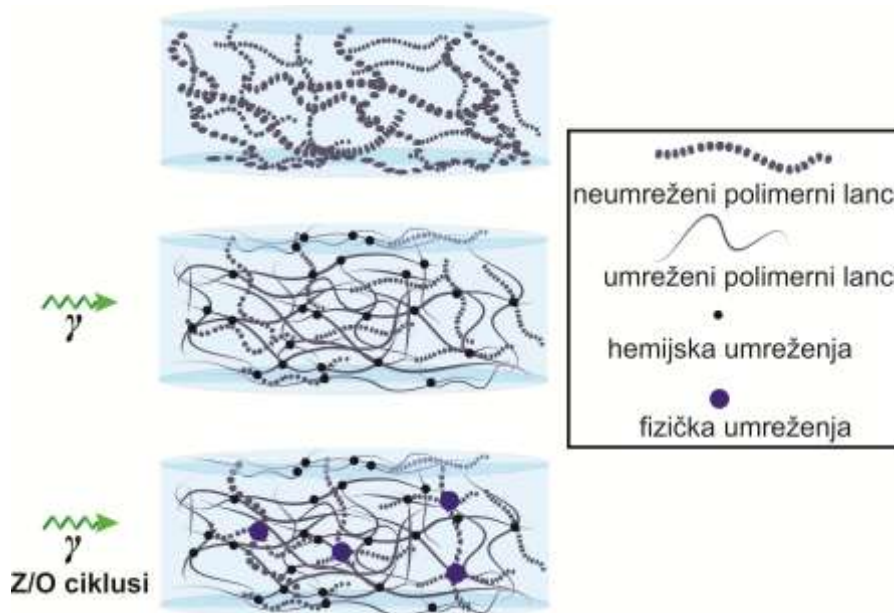
Specifična polikatjonska priroda biopolimera hitozana odgovorna je za njegova brojna biološka svojstva poput mukoadhezivnosti, hemostatičnog, antimikrobnog i hipoholesterolemičnog delovanja. CS i njihovi derivati ulaze u sastav komercijalno dostupnih sredstava za zarastanje rana zahvaljujući stimulaciji proliferacije ćelija i obnavljanju tkiva, homeostatskom i blagom lokalnom analgetičkom delovanju. Posebnu pažnju CS privlači u oblasti tkivnog inženjstva zbog mogućnosti formiranja biokompatibilnih poroznih trodimenzionih mreža čiju je poroznost i brzinu degradacije moguće kontrolisati (Jayakumar et al., 2011). Antibakterijska svojstva CS su izuzetno značajna kada je reč o unapređenju hidrogelova na bazi sintetskih polimera koji nalaze primenu u biomedicini. U protonovanom obliku CS ima veliku gustinu naelektrisanja, te je vrlo efikasan u interakciji sa negativno naelektrisanim biomolekulima i površinama. U literaturi su opisani brojni mehanizmi na kojima se zasniva antimikrobno delovanje CS, zavisno od građe mikroorganizama. Jedan od najbolje istraženih mehanizama je zasnovan na interakciji CS sa negativno naelektrisanim grupama strukturnih molekula lociranih na površini ćelija mikroorganizama (lipopolisaharidi i proteini). Na taj način dolazi do formiranja omotača koji otežava ulazak supstanci iz okruženja u ćeliju.

Antibakterijsko delovanje se može pripisati heliranju jona metala koji su neophodni za normalan ćelijski rast (Strand et al., 2003; Jayakumar et al., 2011).

Umrežavanje blende poli(vinil alkohol)/vodorastvorni hitozan γ -zračenjem.

Blende polimera za biomedicinsku primenu se najčešće definišu kao sistemi čija je osnovna uloga povezivanje sa biološkim tkivima u cilju poboljšanja njihove osnovne funkcije ili zamena tkiva ili organa. Danas se biorazgradive hidrogel matrice intenzivno proizvode za medicinsko tržište, zbog svojstva biokompatibilnosti. U poslednjih nekoliko decenija, potreba proizvodnje polisaharida se intenzivno povećava, posebno u biomedicinske svrhe, jer su polisaharidi biološki polimeri koji se mogu dobiti iz nekoliko prirodnih izvora, kao što su mikrobiološki (npr. dekstran, glukan i alginat), životinjski (npr. hitozan i želatin) i biljni izvori (npr. škrob i celuloza). Za sintezu hidrogelova za lečenje rana izuzetno je važno postići svojstvo biodegradabilnosti, biokompatibilnosti i unaprediti antibakterijsku efikasnost što je moguće više bez upotrebe hemijskih i toksičnih agenasa. Strand i saradnici su ispitivali adsorpciju CS na ćelije *E. Coli* i zaključili da se adsorpcija povećava sa porastom pH vrednosti i sa smanjenjem molarne mase, te je za sintezu blende hidrogela potrebno CS prevesti u vodorastvorni oblik (vr-CS) (Strand et al., 2003; Qin et al., 2006; Goy et al., 2009).

Većina autora sugeriše da je polimerne blende PVA/vr-CS hidrogela moguće dobiti radijaciono-hemijski, upotrebom γ -zračenja, pri čemu su najbolja mehanička svojstva za biomedicinsku primenu dobijena u kombinaciji sa ciklusima zamrzavanja/odmrzavanja (slika 8) (Yang et al., 2008).



Slika 8. Šematski prikaz vrste umreženja PVA/vr-CS hidrogela metodama γ -zračenja i γ -zračenja koje je praćeno ciklusima zamrzavanja/odmrzavanja.

Sinteza nanočestica srebra γ -zračenjem. Formiranje nanočestica prelaznih metala pod dejstvom jonizujućeg zračenja se odigrava putem redukcije metalnih jona pomoću hidratiranih elektrona (jednačina (5)) i sekundarnih redukujućih vrsta nastalih procesom radiolize vode (jednačina (6)). Brze reakcije sjedinjavanja jona sa atomima metala imaju značajnu ulogu u mehanizmu rasta klastera. Brzina nukleacije i rasta metalnih nanočestica je kontrolisana brzinom nastanka redukujućih vrsta. Poznato je da se veličina nanočestica smanjuje sa povećanjem brzine doze zračenja. Pri velikim brzinama doza zračenja, kada je broj događaja nukleacije mnogo veći od broja neredukovanih jona, radiolitičkom metodom se dobijaju manje čestice. S druge strane, pri manjim brzinama doza zračenja, kada je koncentracija nukleusa manja od koncentracije neredukovanih jona, redukcijom jona adsorbovanih na aglomeratima nastaju veće čestice (Saion et al., 2013). Brzina formiranja redukujućih vrsta određuje brzinu redukcije kako slobodnih metalnih jona tako i jona adsorbovanih na površini nanočestica. Takođe, formiranje klastera direktnom redukcijom je dominantno pri većim brzinama doze zračenja kada se kao produkti dobijaju klasteri manjih dimenzija (Belloni et al., 2006; Saion et al., 2013).

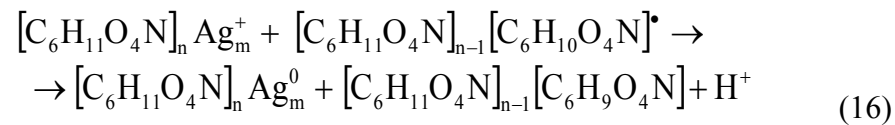
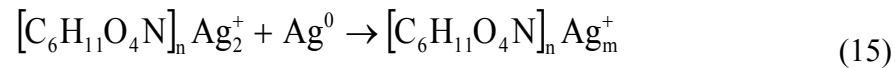
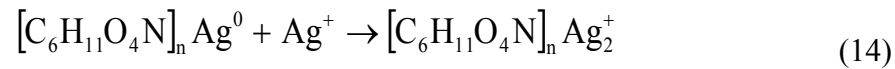
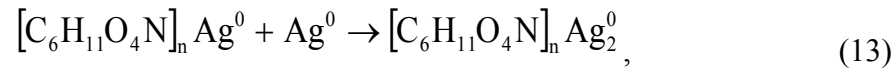
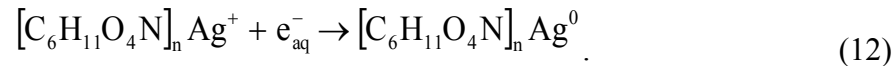
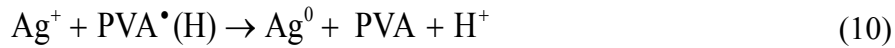
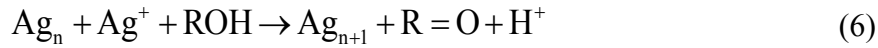
Inkorporacija antibakterijskih agenasa nanometarskih dimenzija (srebro, titanijum-dioksid, zlato, cink-oksidi, magnezijum-oksidi ili bakar) u jako malim, gotovo pikomolarnim ($\sim 10^{-12}$) koncentracijama, u poslednje vreme nalazi široku primenu u biomedicini. Među navedenim nanomaterijalima, nanokristalno srebro se pokazalo kao najefikasniji antimikrobni agens sa širokim biocidnim inhibitornim efektom na mikrobe *in vitro* i *in vivo* (Saion et al., 2013).

Većina autora ukazuje da je radiolitički metod veoma pogodan za sintezu Ag-nanočestica u prisustvu polimernih molekula (Belloni et al., 2006; Saion et al., 2013). U reakcionim sistemima se najčešće dodaju polimerni molekuli sa funkcionalnim grupama koje imaju veliki afinitet prema metalima koji sprečavaju sudarnu interakciju klastera i njihov dalji rast. S druge strane, za efikasniju redukciju metalnih jona i pomeranje ravnoteže reakcije u cilju favorizovanja formiranja nanočestica u sistemima se dodaju ogranske supstance koje imaju veliki afinitet prema oksidujućim vrstama.

Proces formiranja Ag-nanočestica radiolitičkom metodom se sastoji iz dva stupnja. Nakon prvog stupnja - nukleacije, sledi proces agregacije koji dovodi do formiranja nanočestica (Belloni et al., 2006; Saion et al., 2013).

Atomi srebra nastali procesom redukcije predstavljaju centre nukleacije i katalizatore za redukciju preostalih jona metala prisutnih u rastvoru. Ovaj stupanj redukcije ima autokatalitičku prirodu. Sudari atoma dovode do formiranja metalnih klastera koji se mogu efikasno stabilisati ligandima, surfaktantima ili polimerima. Homogena raspodela redukovanih vrsta u prisustvu različitih organskih radikala u najvećoj meri zavisi od redukcionih potencijala radikala i klastera. Oksido-redukciona ravnoteža formiranih nanočestica se može razmatrati po analogiji uspostavljanja ravnoteže na mikroelektrodama za različite vrednosti broja atoma aglomeracionog broja n . Redukcioni potencijal Ag postaje mnogo pozitivniji sa povećanjem broja atoma. Za $n = 1$, $E^0 = -1,8$ V dok je za $n \rightarrow \infty$, $E^0 = 0,799$ V. Formiranje atoma iz metalnih jona je relativno otežano zbog velikog elektropozitivnog redukcionog potencijala $\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}^0$ u vodi ($E^0 = 0,799$ V), te je uspostavljanje ravnoteže $\text{Ag}^+/\text{Ag}_{n+x}^{x+}$ kompleksnih metalnih jona mnogo verovatniji proces (jednačina (7)). Vezivna energija između dva atoma metala jača je od atom-rastvarač ili atom-ligand vezujuće energije, te

nastali atomi interaguju formirajući dimere, a takođe mogu da reaguju sa kompleksnim metalnim česticama i konsektivnim reakcionim mehanizmom prerastaju u veće metalne klustere. Eksperimenti pulsne i γ -radiolize ukazuju da redukcija Ag^+ -jona hidratisanim elektronima vodi ka formiranju dugoživućih Ag_4^{2+} -jona (jednačina (7)). Iz literature (Linnert et al., 1990) je poznato da 2-propanol radikali nemaju potencijal dovoljan za redukciju Ag^+ -jona, ali mogu da redukuju Ag_4^{2+} -jone (jednačina (8)). Ag_4^+ -joni formiraju trimere srebra (jednačina (9)) i nadalje veći klasteri reagujući sa Ag^+ -jonima formiraju sve veće čestice.



U bilo kom stupnju sudarne interakcije, joni adsorbovani na klasterima mogu biti redukovani e_{aq}^- (jednačina (5)), $(\text{CH}_3)_2\text{C}^\bullet\text{OH}$ (jednačina (6)) i PVA^\bullet radikalima (jednačina (10)), ali i stupiti u kompleksirajuće reakcije u prisustvu polisaharida (jednačine (11)-(16)). Ag^+ -joni zbog prisustva velikog broja $-\text{OH}$ grupa na molekulima polisaharida stupaju u kompleksirajuće reakcije, te dolazi do formiranja kompleksnih $[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N}]_n\text{Ag}^+$ -jona (jednačina (11)). Nadalje, ovi kompleksni joni bivaju redukovani hidratizanim elektronima (jednačina (12)) i radikalima polisaharida (jednačina (16)) pri čemu nastaju kompleksni $[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N}]_n\text{Ag}^0$ atomi (Huang et al., 2009).

3. PREDMET I CILJ RADA

Zbog sve veće rezistencije bakterija na antibiotike veoma je važno razviti materijale koji bi svojim unapređenim mehanizmom kontrolisane dostave antibakterijskih agenasa mogli da budu funkcionalnija zamena antibioticima. Iako je razvoj hidrogel nanokompozita koji koriste antibakterijski potencijal nanočestičnog srebra sve veći, do sada nisu dovoljno ispitane specifične prednosti radijaciono-hemijske metode bazirane na biokompatibilnim i ekološki prihvatljivim radiolitičkim produktima vode za prilagođavanje svojstava hitozana biomedicinskoj primeni i sintezu Ag-nanočestica unutar kompleksnih hidrogelova na bazi poli(vinil alkohola) i vodorastvornog hitozana. Bitno je da se biomaterijali sintetišu metodama koje ne zahtevaju toksične agense.

Predmet istraživanja ove disertacije je bio sinteza nanokompozita na bazi poli(vinil alkohola), hitozana i nanočestica srebra, kao i modifikacija rastvorljivosti ovog biopolimera u fiziološkim uslovima, primenom radijaciono-hemijske “*bottom up*” metode **u cilju** dobijanja efikasnijeg antibakterijskog terapijskog sredstva za potencijalnu primenu u kontrolisanoj dostavi antibakterijskih agenasa u biomedicini.

U tom smislu je važno optimizovati parametre γ -zračenja za radijaciono-hemijsku sintezu hidrogel nanokompozita, ispitati njihov antibakterijski potencijal, ulogu srebra u nanočestičnoj formi, kao i sinergijski antibakterijski efekat hitozan/srebro. Sorpciona svojstva hidrogel nanokompozita u fiziološkim uslovima i kinetički i termodinamički parametri se definišu kako bi se usaglasili sa načinom primene, u formi antibakterijskih obloga za rane. Težilo se ka usklađivanju strukturnih svojstava i mehaničke čvrstoće zahtevima biomedicinske primene. Kako bi se skratilo vreme optimizacije sinteze i obezbedio detaljan uvid u mehanizam nelinearne kinetike oslobađanja antibakterijskog srebra primenjuje se po prvi put koncept farmakokinetičkog modelovanja. Važno je sagledati doprinos matrice, svojstava nanočestičnog srebra i termodinamičkih parametara njihove oksidacije kao primarnog mehanizma oslobađanja Ag^+ -jona, da bi se utvrdili parametri projektovanja sistema sa antibakterijskom funkcijom.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

Radijaciona tehnologija sinteze materijala na nanometarskoj skali u okviru fizičke hemije polimera čini posebnu oblast nanotehnologije koja proučava skup operacija i procesa kojima se polimeri planirano izlažu delovanju jonizujućeg zračenja radi postizanja novih kvaliteta. Zavisno od vrste polimera, nov kvalitet je posledica određenog hemijskog ili biološkog dejstva zračenja radi postizanja nekoliko ciljeva - umrežavanja polimera, sinteze nanočestica, radijacione sterilizacije (efektivnog biološkog i mikrobicidnog delovanja jonizujućih zračenja). Nerastvorljivost i postojanost hidrogela potiče od kovalentne trodimenzione mreže polimernih lanaca koja deluje kao "kavez" za molekule vode i druge rastvorene molekule i jone. Nabubrelo stanje hidrogela je rezultat ravnoteže između disperzionih sila koje deluju na hidratisane lance i kohezivnih sila koje ne ometaju prodiranje fluida unutar mreže. Dosadašnja metodologija sinteze hidrogel nanokompozita je uglavnom bila bazirana na višestepenom procesu sinteze, upotrebom zračenja visoke energije (elektronski snopovi, γ -, X - ili ULj -zračenje). Unapređenje radijacione tehnologije u okviru fizičke hemije polimera bi u cilju prevazilaženja jednog od glavnih izazova u ovoj oblasti, istovremene sinteze i sterilizacije nanokompozita, podrazumevalo ispitivanje mogućnosti jednostepenog procesa umrežavanja polimera, redukcije metalnih jona i sterilizacije, bez upotrebe toksičnih umreživača i pomoćnih agenasa u sistemu.

4.1. Materijali

4.1.1. Materijali za sintezu

Sve korišćene hemikalije su najviše dostupne čistoće i upotrebljavane su bez daljeg prečišćavanja. Poli(vinil alkohol), PVA (srednje molarne mase, $M_w = 72$ kDa i stepena hidrolize min. 99 %), srebro nitrat, $AgNO_3$, 2-propanol, $(CH_3)_2CHOH$, su proizvodi Merck-a, Nemačka. Hitozan, CS, niske molarne mase (95 ± 9) kDa i stepena deacetilacije 75-85 % je proizvod Sigma-Aldrich-a, SAD. Sirćetna kiselina, CH_3COOH , je proizvod Zorka Pharma-e, Srbija. Hlorovodonična kiselina, HCl , je proizvod J. T.

Baker-a, SAD. Argon, Ar, visoke čistoće (99,5 %) je proizvod Messer Tehnogas-a, Srbija. Destilovana voda je dobijena prečišćavanjem destilovane vode pomoću Milli-Q Water sistema sa četiri jonoizmenjivačke kolone.

4.1.2. Materijali za praćenje oslobađanja antibakterijske komponente

Simuliranje fizioloških uslova za praćenje oslobađanja Ag^+ -jona vršeno je pomoću simulirane telesne tečnosti (*eng. simulated body fluid, SBF*), sastava i koncentracije neorganskih jona skoro identične ljudskoj plazmi. SBF (pH = 7,4) je pripreman po Kokubo protokolu (Marques et al., 2011). Kalcijum hlorid dihidrat, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, i tris(hidroksimetil)aminometan, $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$, su proizvodi Merck-a, Nemačka. Kalijum dihidrogenfosfat, KH_2PO_4 , i dikalijum hidrogenfosfat, K_2HPO_4 , su proizvodi Kemike, Hrvatska. Natrijum hlorid, NaCl , natrijum sulfat, Na_2SO_4 , i natrijum hidrogen karbonat, NaHCO_3 , su proizvodi Zorka Pharma-e, Srbija. Magnezijum hlorid dihidrat, $\text{MgCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, je proizvod Centrohema, Srbija. Hlorovodonična kiselina, HCl , i azotna kiselina, HNO_3 , su proizvodi J. T. Baker-a, SAD.

4.1.3. Materijali za *in vitro* test antibakterijske aktivnosti

Diskovi hidrogel nanokompozita ($d \leq 6$ mm i $\delta = 4$ mm) su postavljani na čvrstu hranljivu podlogu (2 % agar) na kojoj su prethodno zasejane suspenzije bakterija *E. coli* (ATTC 25922) i *S. aureus* (ATTC 25923).

4.2. Metode

4.2.1. Radijaciono-hemijske sinteze nanokompozita γ -ozračivanjem

Svi napravljeni rastvori su radi uklanjanja kiseonika zasićeni argonom (Ar) u trajanju od 30 min, a zatim razliveni u posebno pripremljene kalupe. Kalupi su sastavljeni od dve staklene ploče koje su međusobno razdvojene gumenim distancerom. Svi sistemi su na sobnoj temperaturi, u zatvorenim ćelijama, izlagani dejstvu γ -zračenja (izvor ^{60}Co).

Sinteza Ag/PVA hidrogel nanokompozita γ -zračenjem. PVA rastvor (5 mas. %) je izložen dejstvu γ -zračenja pri brzini apsorbovane doze od 0,33 kGy/h, do apsorbovane doze od 25 kGy. Nakon umrežavanja, dobijeni PVA hidrogelovi su osušeni do konstantne mase, na sobnoj temperaturi, a potom ekstrahovani u vodi kako bi se uklonio neizreagovali tj. neumreženi deo polimera. Ekstrakcija je izvedena izmenom destilovane vode svaki dan u toku 7 dana. Dobijeni PVA hidrogel diskovi ($d = 10$ mm i $\delta = 4$ mm) su osušeni do konstantne mase kserogela, a zatim ostavljeni da bubre 48 h u smeši vodenog rastvora AgNO_3 i 2-propanola (ukupne zapremine 20 ml). Koncentracija AgNO_3 je varirana (4, 8, 16, 30, 75 i 100 mM), dok je koncentracija 2-propanola konstantna (0,2 M). Nakon uspostavljanja ravnoteže, uzorci su dodatno izloženi dejstvu γ -zračenja, pri brzini apsorbovane doze od 10 kGy/h, do apsorbovane doze dovoljne da se izvrši kompletna redukcija metalnih jona (7, 14, 28, 53, 133 i 177 kGy, redom). Dobijeni hidrogel nanokompoziti su obeleženi oznakama hg1-NK1, hg1-NK2, hg1-NK3, hg1-NK4, hg1-NK5 i hg1-NK6, dok je čist PVA hidrogel obeležen oznakom hg1.

Sinteza neumreženih Ag/PVA/CS NK γ -zračenjem. Rastvor CS u 1 M sirćetnoj kiselini (2,5 mas. %) i vodeni rastvor PVA (5 mas. %) su korišćeni za pripremanje smeša sa različitim masenim odnosima PVA/CS (0/100, 20/80, 40/60, 60/40, 80/20 i 100/0). Nanokompoziti su obeleženi oznakama od S1 do S6, redom. U pripremljene rastvore, dodata je ista koncentracija AgNO_3 (5 mM) i 2-propanola (0,2 M), a zatim su izloženi dejstvu γ -zračenja, pri brzini apsorbovane doze od 6 kGy/h,

do apsorbovane doze od 8,5 kGy dovoljne da se izvrši kompletna redukcija metalnih jona. Nakon isparavanja rastvarača, dobijeni su neumreženi nanokompozitni filmovi Ag/PVA/CS (debljine, $\delta = 10-30 \mu\text{m}$).

Sinteza vr-CS γ -zračenjem. Rastvor CS (5 mas. %) je dobijen rastvaranjem CS, niske molarne mase, M_w (95 ± 9) kDa, u 1 M sirćetnoj kiselini, uz stalno mešanje 3 h. Rastvor je izložen dejstvu γ -zračenja, pri brzini apsorbovane doze od 20 kGy/h, do apsorbovane doze od 100 kGy, pri čemu je pomenutom dozom molarna masa redukovana na (22 ± 1) kDa. Nakon neutralizacije rastvora polimera 1 M rastvorom NaOH, dobijen je supernatant (vr-CS) (1,43 mas. %) u prinosu 29 %. Treba napomenuti da je prečišćavanje rastvora od acetata izvršeno pomoću polupropustljive celulozne membrane za dijalizu sa veličinom pora od 3,5 kDa u vremenskom periodu od sedam dana. Na ovaj način dobijen vr-CS je korišćen za sintezu Ag/PVA/vr-CS hidrogel nanokompozita.

Sinteza Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita γ -zračenjem praćeno metodom zamrzavanje/odmrzavanje (Z/O). Mešanjem rastvora PVA i vr-CS (30 min) dobijena je homogena smeša. Koncentracija PVA u smeši je bila konstantna 8 mas. %, dok je koncentracija vr-CS varirana (2 mas. % i 4 mas. %). Rastvori su izloženi dejstvu γ -zračenja, pri brzini apsorbovane doze od 0,33 kGy/h. Hidrogel nanokompoziti obeleženi oznakama hg1-Z/O i hg2-Z/O (8 mas. % PVA/2 mas. % vr-CS i 8 mas. % PVA/4 mas. % vr-CS) ozraćeni su dozom do 75 kGy. Sintetisan je i kontrolni uzorak obeležen oznakom hg0-Z/O (8 mas. % PVA do 25 kGy). Rastvori su izloženi dejstvu γ -zračenja, a nakon toga su naizmenično zamrzavani i odmrzavani primenom 4 uzastopna Z/O-ciklusa (2 h na temperaturi -20°C i 1 h na temperaturi 25°C). Dobijeni hidrogelovi su nabubreni smešom rastvora AgNO_3 (8 mM) i 0,2 M 2-propanola, a potom izloženi dejstvu γ -zračenja, pri brzini apsorbovane doze od 14,6 kGy/h, do apsorbovane doze od 14 kGy, dovoljne za redukciju Ag^+ -jona. Hidrogel nanokompoziti su obeleženi oznakama hg0-NK1-Z/O, hg1-NK1-Z/O, hg2-NK1-Z/O, redom.

Sinteza Ag/PVA/vr-CS hidrogel nanokompozita-in situ γ -zračenjem. Istovremeno umrežavanje polimera i sinteza Ag-nanočestica je izvedena izlaganjem rastvora AgNO_3 /PVA/vr-CS (8mM/8 mas. %/2 mas. % i 8mM/8 mas. %/4 mas. %, obeleženih oznakama hg1-NK1-in situ i hg2-NK1-in situ, redom) dejstvu γ -zračenja do

200 kGy (pri brzini apsorbovane doze od 12,2 kGy/h), podeljenih u nekoliko apsorbovanih porcija (50+40+40+40+30) kGy. Sintetisan je i kontrolni uzorak Ag/PVA, izlaganjem rastvora AgNO₃/PVA (8 mM/8 mas. %, obeležen oznakom hg0-NK1), na isti način i pri istim uslovima.

4.2.2. Metode za karakterizaciju hidrogel nanokompozita

U eksperimentalnom radu korišćene su sledeće metode karakterizacije nanokompozita:

Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIC). Sprečavanje rasta metalnih nanočestica uspešno se postiže dodavanjem polimernih molekula u reakcionu smešu. FTIC spektroskopija omogućava dobijanje informacija o interakciji nanopunioca i polimerne matrice, kao i strukture vr-CS. FTIC spektri umreženih sistema su snimani na spektrofotometru *Thermo Electron Corporation Nicolet 380 FTIC* sa dodatkom za rad u ATR modu (*Attenuated Total Reflection Mode*).

Spektroskopija u ultraljubičastoj i vidljivoj oblasti spektra (ULj/Vid). U cilju određivanja optičkih svojstava uzoraka urađena su ULj/Vid spektrofotometrijska merenja. ULj/Vid apsorpcioni spektri hidrogel nanokompozita su snimani na spektrofotometru *Thermo Fisher Scientific Evolution 600 UV/Vis* u oblasti talasnih dužina, λ od 300-800 nm. Teorijska izračunavanja veličina Ag-nanočestica su rađena korišćenjem softvera "MiePlot v.3.4" (<http://www.philiplaven.com/mieplot.htm>, preuzeto oktobra 2015.).

Difrakcija rendgenskih zraka (XRD). Mikrostrukturna analiza uzoraka izvršena je metodom difrakcije rendgenskih zraka (Cu K_{α1} zračenje, $\lambda = 0,1541$ nm) na difraktometru *Bruker D8 Advance*.

Veličina kristalita je data Šererovom (*franc. Scherrer*) formulom (Huang et al., 2009):

$$D_{hkl} = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (18)$$

pri čemu je D_{hkl} debljina kristalita odn. prosečna dimenzija kristalita u pravcu normalnom na niz ravni sa kojih difraktuju rendgenski zraci; K je konstanta kubne

strukture (0,9); λ je talasna dužina upotrebljenog rendgenskog zračenja; β je širina difrakcione linije na poluisini nastala samo usled strukturnih faktora (veliĉine kristalita i mikronaprezanja); θ je Bragov ugao refleksije. Opšti izraz za kubnu kristalnu rešetku, koji povezuje Bragov ugao refleksije, θ , i Milerove indekse, hkl , predstavljen je jednaĉinom 19 (Huang et al., 2009).

$$\frac{\sin^2 \theta}{h^2 + k^2 + l^2} = \frac{\lambda^2}{4a^2} \quad (19)$$

pri ĉemu je a parametar rešetke. Na osnovu ove jednaĉine moēe se odrediti oblik i veliĉina elementarne ĉelije kristala. Međuravansko rastojanje, d , za kubne kristalne sisteme se moēe izraĉunati iz izraza koji povezuje parametar rešetke, a , i Milerove indekse, hkl (jednaĉina 20) (Huang et al., 2009):

$$\frac{1}{d^2} = \frac{h^2 + k^2 + l^2}{a^2} \quad (20)$$

Fotoelektronska spektroskopija (XPS). Potvrda da je izvršena redukcija Ag^+ -jona i inkorporacija Ag-nanoĉestica u metalnom stanju, izvedena je analizom XPS spektara snimljenih na instrumentu *SPECS Systems*, sa *XP50M* izvorom X-zraĉenja za *Focus 500* i *PHOIBOS 100/150* analizatorom.

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM). U cilju ispitivanja morfologije hidrogelova i hidrogel nanokompozita SEM mikrografi su dobijeni snimanjem na *JEOL JSM-6610LV* instrumentu, pri radnom naponu od 20 kV. Pre snimanja uzorci su ostavljeni da bubre u vodi na 25 °C do ravnoteēe, a potom zamrznuti na -20 °C u trajanju od dva dana. Liofilizacija je rađena na temperaturi od -32 °C, pri vakuumu od 0,310 mbar, u trajanju od 48 h na uređaju *Martin Christ Freeze-dryer Alpha 1-2 LDplus*. Uzorci su zatim neparavani tankim slojem zlata (debljine oko 15 nm) u *LEICA SCD005* neparivaĉu.

Rendgenska trodimenziona mikro-kompjuterizovana tomografija (XR 3D μ -KT). U cilju ispitivanja trodimenzione morfologije, 3D mikrografi su dobijeni snimanjem hidrogelova i hidrogel nanokompozita na brzo-skenirajućem *SkyScan1172 Bruker micro-CT* instrumentu visoke rezolucije $\sim 0,5 \mu\text{m}$. Softverska obrada rezultata omoguĉava dobjanje 3D kvantitativne i kvalitativne analize uzoraka koji su pripremljeni na isti naĉin kao za SEM analizu.

Studija bubrenja. Bubrenje PVA, PVA/vr-CS, Ag/PVA i Ag/PVA/vr-CS hidrogelova je izvedeno u SBF-u na temperaturi $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Kserogel diskovi (dijametra, $d = 3,83 \pm 0,18$ mm i debljine, $\delta = 1,37 \pm 0,13$ mm) su dobijeni sušenjem hidrogel diskova do konstantne mase. Proces bubrenja je praćen gravimetrijski, merenjem mase nabubrelog gela, sve do postizanja ravnotežnog stepena bubrenja (*eng. equilibrium swelling degree, SD_r*) (Ganji et al., 2010).

Gravimetrijska metoda (GM) za određivanje masenog udela gela. Hidrogelovi su osušeni do konstantne mase, a zatim u trajanju od 7 dana ekstrahovani u vodi, na sobnoj temperaturi, uz svakodnevnu izmenu vode. Za PVA/vr-CS -Z/O hidrogelove sintetisane post-radijacionim postupkom zamrzavanja/odmrzavanja, ekstrakcija je rađena do vremenskog intervala koje je potrebno za dostizanje ravnotežnog stepena bubrenja (2 dana) i dužeg vremenskog intervala (7 dana), uz svakodnevnu izmenu vode, kako bi se pratio eventualni gubitak vr-CS. Maseni udeo gela, W , (Krklješ et al., 2007a) je izračunat upotrebom jednačine (21):

$$W(\%) = \frac{m_{ksg}}{m_{ksg0}} \cdot 100 \quad (21)$$

gde je m_{ksg} masa kserogela nakon ekstrakcije, a m_{ksg0} početna masa kserogela.

Metoda statičkog rasejanja laserskih snopova. Molarna masa CS i vr-CS je određena pomoću metode statičkog (elastičnog) rasejanja snimanjem na instrumentu *Zetasizer Nano ZS*. Na osnovu Debajeve (*holand. Debye*) fluktuacione teorije koja prilagođava Rejljevju (*eng. Rayleigh*) teoriju na rastvore, jednačina rasejanja svetlosti ima sledeći oblik (Schatz et al., 2003):

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \left(\frac{1}{M} + 2A_2c \right) \quad (22)$$

pri čemu je R_θ Rejljev odnos intenziteta rasejanog i upadnog zračenja, M molarna masa uzorka, A_2 drugi virijalni koeficijent, c koncentracija i K optička konstanta. Molarna masa je jednaka recipročnoj vrednosti odsečka na ordinati grafika $Kc/R_\theta = f(c)$. Nagib prave $Kc/R_\theta = f(c)$ predstavlja dvostruku vrednost drugog virijalnog koeficijenta A_2 . Veličina A_2 opisuje jačinu interakcije između čestice i rastvarača ili odgovarajućeg disperzionog sredstva. Za uzorke kod kojih je $A_2 > 0$, čestice imaju veći afinitet prema

rastvaraču i nastojće da ostanu u obliku stabilnog rastvora. Kada je $A_2 < 0$, čestice imaju manji afinitet prema rastvaraču usled čega dolazi do agregacije. Kada je $A_2 = 0$ jačina interakcije između čestica i rastvarača je približna jačini međumolekulske interakcije. Za dobijanje Debajevog dijagrama, 3-5 različitih razblaženja u 1 M sirćetnoj kiselini (u opsegu od 0,25-2,0 g/L), su napravljene za svaki analizirani uzorak. Rezultati su korigovani korišćenjem srednje vrednosti parametra veličine, Z_{sr} , prethodno dobijenog u dinamičkom (neelastičnom) modu, i uzimajući za svaki uzorak karakterističan oblik klupka polimernih lanaca. Toluen je korišćen kao standard. Merenje veličina čestica polimera vršeno je metodom dinamičkog rasejanja svetlosti (eng. *Dinamic Light Scattering*).

Fluorescentna spektroskopija (FS). Fluorescentni ekscitacioni i emisioni spektri su dobijeni pomoću spektrometra *Perkin Elmer LS45 Fluorescence*. Ekscitacioni izvor je ksenonska lampa, a detektor fotomultiplikatorska cev *Hamamatsu R928*.

In vitro oslobađanje Ag^+ -jona iz hidrogela. Oslobađanje Ag^+ -jona iz Ag/PVA i Ag/PVA/vr-CS hidrogel nanokompozita je ispitivano na temperaturi od $(37 \pm 1)^\circ C$ u fosfatnom puferu ($pH = 7$) koji sadrži 0,039 M KH_2PO_4 i 0,061 M K_2HPO_4 . Ag/PVA i Ag/PVA/vr-CS diskovi ($d = 4,43 \pm 0,18$ mm i $\delta = 1,31 \pm 0,08$ mm) su uronjeni u 10 ml fosfatnog pufera, koji je periodično menjan nakon 1, 3, 5, 7 i 9 dana, kako bi se obezbedio rad u uslovima maksimalnog gradijenta koncentracije tj. minimalne entropije. U rastvore sa oslobođenim Ag^+ -jonima su dodate po 2 kapi HNO_3 (1:1 v/v), kako bi se reakcija oksidacije Ag-nanočestica odigrala u potpunosti. *Philips PYU UNICAM SP9* atomski apsorpcioni spektrometar je korišćen za merenje oslobođenih Ag^+ -jona iz Ag/PVA hidrogel nanokompozita. Određena je i totalna koncentracija srebra u umreženim nanokompozitima, nakon tretiranja rastvorom HNO_3 (1:1 v/v).

Antibakterijska aktivnost. Antibakterijski potencijal Ag/PVA i Ag/PVA/vr-CS hidrogel nanokompozita je ispitivan pomoću disk difuzione metode antibiograma. Diskovi hidrogel nanokompozita ($d \leq 6$ mm i $\delta = 4$ mm) su postavljeni na čvrstu hranljivu podlogu (2 % agar) na kojoj su prethodno zasejane suspenzije bakterija *E. coli* (ATTC 25922) i *S. aureus* (ATTC 25923). Inkubacija je izvršena u termostatu na $37^\circ C$, u trajanju od 24 h. Praćena je pojava zone inhibicije, pri čemu su uzorci sa većom

inicijalnom koncentracijom srebra ispitivani nakon 2 nedelje i 2 meseca starenja u puferovanom rastvoru (nakon manjeg ili većeg gubitka srebra), na sobnoj temperaturi.

Mehanička svojstva. Mehanička svojstva PVA/vr-CS hg-Z/O i Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita sintetisanih post-radijacionim postupkom zamrzavanja/odmrzavanja, su ispitana na termomehaničkom analizatoru *TA Instruments Thermomechanical Analyzer TMA Q400EM*, pri kompresiji u statičkom (napon/deformacija) i dinamičkom modu na uzorcima u ravnotežno nabubrelom stanju. Modul kompresibilnosti, E_k , i maksimalna statička čvrstoća hidrogelova i hidrogel nanokompozita određeni su primenom linearnog povećanja sile od 0,005-1 N brzinom od 0,1 N/min i uravnotežavanjem temperature na 37 °C. Kvantifikacija sačuvane energije pri kompresiji u statičkom modu određena je izračunavanjem vrednosti Jangovog (*eng. Young*) modula elastičnosti (E_J) pomoću sledeće jednačine (Jovanović et al., 2007):

$$E_J = 3E_k(1 - 2\mu) \quad (23)$$

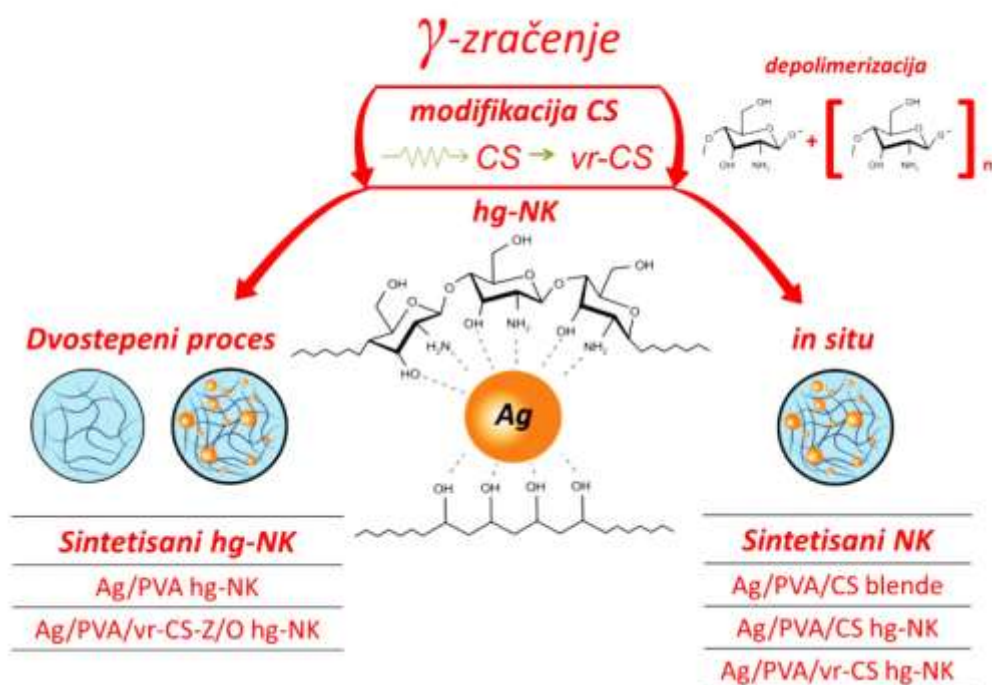
pri čemu je μ Poasonov (*franc. Poisson*) koeficijent odn. mera poprečnog (transferalnog) skupljanja i uzdužnog (aksijalnog) izduženja ($\mu = 0,3$ za hidrogel (Greaves et al., 2011)). Dinamičko-mehanička analiza je izvedena primenom modulisanе sile od 0,05 N pri frekvenciji od 0,1 Hz, u temperaturskom opsegu od -20-45 °C, sa linearnim povećanjem temperature od 3 °C/min. Određeni su moduli sačuvane, E' , i izgubljene energije, E'' , kao i tangens gubitaka, $\tan\delta = E''/E'$, u funkciji temperature. Gustina umreženja, ν_e , broj centara umreženja po jedinici zapremine, je izračunat pomoću jednačine (Jiang et al., 1999):

$$\nu_e = \frac{E'}{3RT} \quad (24)$$

pri čemu je E' vrednost modula sačuvane energije u oblasti platoa, T je temperatura koja odgovara vrednosti modula sačuvane energije, a R je univerzalna gasna konstanta.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

U ovom radu, osnovni plan istraživanja je baziran na sintezi hidrogel nanokompozita, hg-NK, na bazi nanočestica srebra, Ag, poli(vinil alkohola), PVA i vodorastvornog hitozana, vr-CS, γ -zračenjem za potencijalnu primenu u kontrolisanoj dostavi antibakterijskih supstanci u biomedicini (slika 9). U prvoj fazi ispitana je mogućnost radijaciono-hemijske sinteze hidrogel nanokompozita, u dvostepenom procesu, najpre sintezom polimerne matrice hidrogela, a potom redukcijom Ag^+ -jona u hidrogelovima koji su apsorbovali rastvore različite koncentracije AgNO_3 do ravnotežnog stanja. Sintetisani su Ag/PVA, kao model sistemi, i Ag/PVA/vr-CS nakon modifikacije CS γ -zračenjem i redukovanja molarne mase ovog prirodnog polimera, sa ciljem prilagođavanja rastvorljivosti fiziološkim uslovima ($\text{pH} \approx 7$). U drugom delu istraživanja akcenat je stavljen na ispitivanje mogućnosti radijaciono-hemijske *in situ* sinteze hidrogel nanokompozita u jednostepenom procesu.



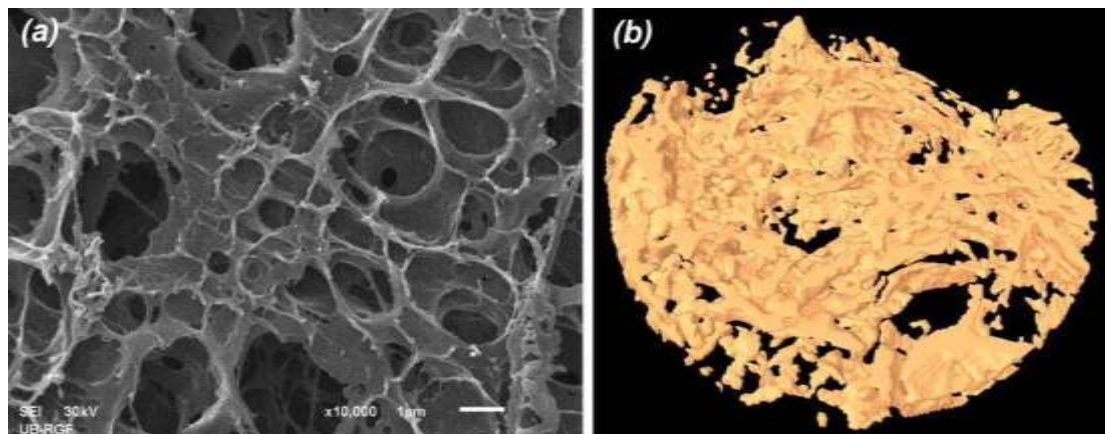
Slika 9. Šematski prikaz osnovnog plana istraživanja: postupci radiolitičke sinteze hidrogel nanokompozita.

5.1. Sinteza, karakterizacija i primena Ag/PVA hidrogel nanokompozita

5.1.1. Sinteza Ag/PVA hidrogel nanokompozita

Radiolitička sinteza Ag/PVA hidrogel nanokompozita započinje pripremom vodenog rastvora poli(vinil alkohola). Nakon ozračivanja pripremljenog rastvora γ -zračenjem, dobijena je struktura nabubrene trodimenzionalne mreže hidrogela. Hidrogelovi su nakon što su osušeni do konstantne mase ekstrahovani u vodi 7 dana na sobnoj temperaturi, uz svakodnevnu izmenu vode. Maseni udio gela od 90 % je određen gravimetrijskom metodom primenom jednačine (21).

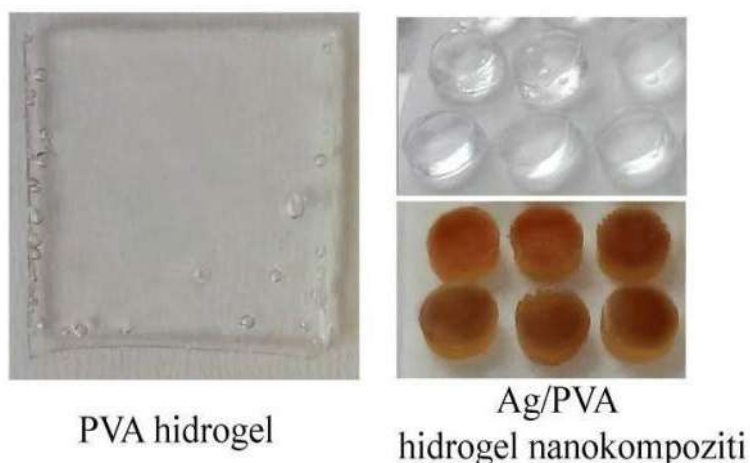
Morfološka svojstva PVA hidrogela ispitana su skenirajućom elektronskom mikroskopijom i rendgenskom 3D mikro-kompjuterizovanom tomografijom. Mikroskopskim ispitivanjem (slika 10 (a)) je pokazana porozna morfologija PVA hidrogela sa mikrometarskom veličinom pora.



Slika 10. SEM mikrograf (a) i XR 3D- μ KT mikrograf (b) PVA hidrogela.

Poroznost PVA hidrogela od 85 % određena je rendgenskom 3D mikro-kompjuterizovanom tomografijom (slika 10 (b)), pri čemu je ovom metodom dobijena raspodela veličina pora u opsegu od 2-22 μ m.

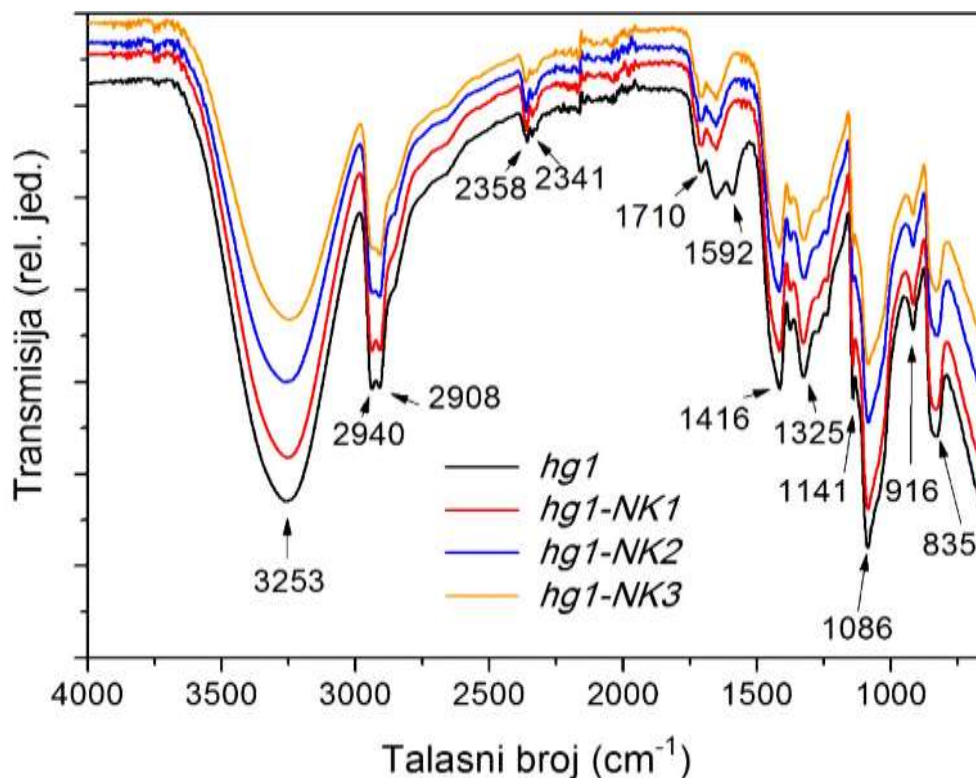
Svojstvo bubrenja PVA hidrogela je iskorišćeno za sintezu Ag-nanočestica, pri čemu su hidrogelovi ostavljeni da bubre 48 h u smeši rastvora AgNO_3 (različitih početnih koncentracija od 4, 8, 16, 30, 75 i 100 mM) i 2-propanola (0,2 M). Organski “hvatač” 2-propanol je dodat u cilju favorizovanja procesa redukcije Ag^+ -jona u prisustvu polimera. Nakon dostizanja ravnoteže, nabubreni hidrogelovi su izloženi dejstvu γ -zračenja do apsorbovane doze potrebne da se izvrši kompletna redukcija jona (7, 14, 28, 53, 133 i 177 kGy, redom). Po završetku procesa ozračivanja, dobijeni su transparentni Ag/PVA hidrogel nanokompoziti žuto-braon boje (slika 11).



Slika 11. Fotografije PVA hidrogela i Ag/PVA hidrogel nanokompozita.

5.1.2. Stabilizacija nanočestica srebra u PVA hidrogelu

Stabilizacija Ag-nanočestica u PVA hidrogelu praćena je spektroskopijom u infracrvenoj oblasti spektra sa Furijeovom transformacijom. FTIC spektri PVA kserogela i Ag/PVA kserogel-nanokompozita su prikazani na slici 12.



Slika 12. FTIC spektri PVA kserogela i Ag/PVA kserogel-nanokompozita.

Karakteristične trake za PVA potiču od vibracija sledećih grupa: O–H, C–H, C–C i C=O grupa, i prisutne su u svim sistemima. Najintenzivniji pikovi se nalaze na 3253 cm^{-1} (O–H istežuće vibracije), 2940 cm^{-1} i 2908 cm^{-1} (C–H istežuće simetrične i asimetrične vibracije, redom), 1710 cm^{-1} (C=O istežuće vibracije), 1416 cm^{-1} (O–H deformacione vibracije), 1325 cm^{-1} (kuplovanje O–H vibracija u ravni sa C–H nižim vibracijama), 1086 cm^{-1} (C–O–H δ -deformaciona vibracija). Simetrična C–C istežanja daju traku na oko 1141 cm^{-1} , čiji intenzitet je mera stepena kristalne faze PVA, odnosno urednosti u sistemu. Prisustvo trake na oko 916 cm^{-1} potiče od C–C istežanja, dok traka na 835 cm^{-1} najverovatnije potiče od istežućih modova $-\text{CH}_2$ vibracija (Krkleš et al., 2007a; Chaturvedi et al., 2015).

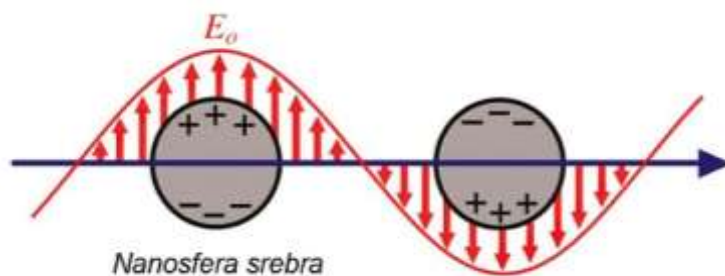
Poređenjem spektara PVA i Ag/PVA, mogu se uočiti promene nakon sinteze Ag-nanočestica u PVA matrici. Najintenzivniji pik u spektru na 3253 cm^{-1} potiče od O–H grupa koje omogućavaju stabilizaciju Ag-nanočestica. Širina pikova na 2940 cm^{-1} i 2908 cm^{-1} (C–H istežuće simetrične i asimetrične vibracije, redom) se smanjuje u spektrima Ag/PVA kserogel nanokompozita sa povećanjem koncentracije

Ag-nanočestica, što bi ukazivalo na smanjenje fleksibilnosti polimernih lanaca kserogel nanokompozita. U prisustvu Ag, atomi kiseonika iz –OH grupa interaguju sa klasterima, što dovodi do suženja traka na 3253 cm^{-1} i 1086 cm^{-1} koje se može pripisati formiranju koordinacione veze između Ag-nanočestica i elektron-donorskih –OH grupa (Krklješ et al., 2007a; Chaturvedi et al., 2015).

Takođe se u spektrima Ag/PVA kserogel nanokompozita zapaža nestanak trake na oko 1592 cm^{-1} . Naime, PVA može da sadrži C=O grupe unutar lanca, koje su pripisane β -diketon grupi, i upravo vibracije unutar ove grupe daju pomenutu traku. U prilog ovome ide i pojava trake na oko 1710 cm^{-1} , koja odgovara istežućim vibracijama C=O grupa, koje potiču od zaostalih vinil acetatnih grupa. Uzimajući u obzir nestanak trake na oko 1592 cm^{-1} , za inhibiciju rasta Ag-nanočestica odgovorno formiranje Ag...OH veza između –OH grupa iz β -diketonske grupe zaostalog PVAc i Ag-nanočestica, što je u saglasnosti sa ranije dobijenim rezultatima u literaturi (Krklješ et al., 2007a; Chaturvedi et al., 2015).

5.1.3. Određivanje veličine nanočestica srebra ispitivanjem optičkih i strukturnih svojstava Ag/PVA hidrogel nanokompozita

ULj/Vid spektroskopska analiza omogućava određivanje veličina Ag-nanočestica i ispitivanje njihove stabilizacije pomoću PVA hidrogela zavisno od povećanja početne koncentracije Ag^+ -jona bez pojave aglomeracije. U literaturi je poznato da nanočestice plemenitih metala ispoljavaju karakteristična optička svojstva u vidljivoj oblasti spektra. Pojava intenzivne apsorpcije je posledica pobuđivanja kolektivnog oscilovanja elektronskih oblaka nanočestica čiji je prečnik manji od talasne dužine upadne svetlosti. Ova pojava je u literaturi poznata kao plazmonska rezonancija (apsorpcija) (*eng. surface plasmon resonance, SPR*) (slika 13) (Rycenga et al., 2011).



Slika 13. Šematski prikaz polarizacije slobodnih elektrona pod uticajem električnog polja upadnog zračenja u odnosu na ostatak katjonske rešetke metalnih nanočestica sfernog oblika. Slika preuzeta iz reference (Rycenga et al., 2011).

Specifična svojstva dipolne plazmonske rezonance Ag-nanočestica se ispoljavaju pobuđivanjem elektrona iz provodne trake ($5S^1$) u vidljivoj i bliskoj infracrvenoj oblasti od (300-1200) nm. U poređenju sa drugim metalima nanometarskih dimenzija (Au, Cu, Li i Al), srebro ima najbolja optička svojstva. Iako je transmisiona elektronska mikroskopija (TEM) jedna od najboljih metoda za karakterizaciju metalnih nanočestica (Rauwel et al., 2015), kada je reč o nanočesticama koje su stabilisane polimernim molekulima, neophodno je primeniti neke druge, manje invazivne metode, koje ne dovode do degradacije nanokompozita.

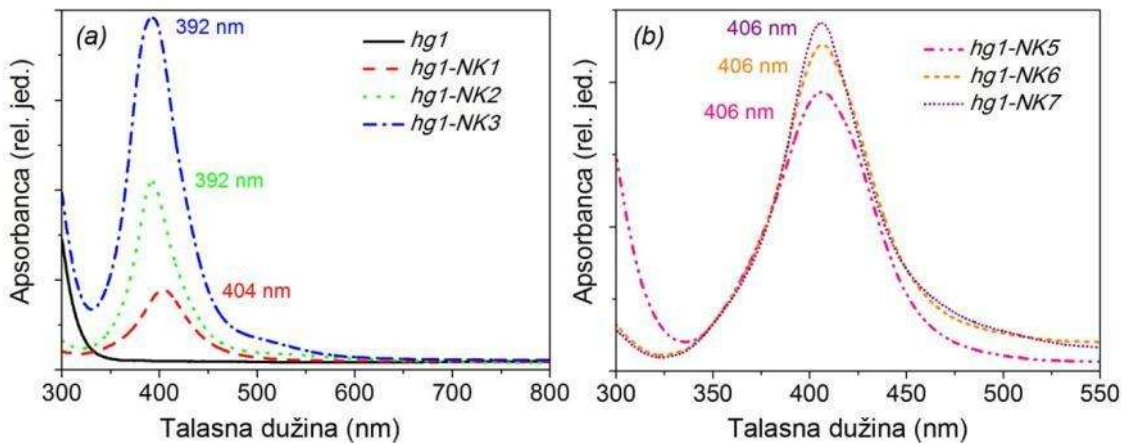
U poslednjih nekoliko decenija razvijeni su sofisticirani modeli, teorije i metode kako bi se jasnije opisala interakcija svetlosnih talasa sa metalnim nanostrukturama. Uklapanjem (*eng. fitting*) eksperimentalnih apsorpcionih spektara sa teorijski izračunatim spektrima koji uzimaju u razmatranje različite oblike nanočestica, može se pomoću teorijskih modela odrediti veličina metalnih nanočestica (Rycenga et al., 2011).

Metalne nanostrukture, čiji je prečnik manji od talasne dužine upadne svetlosti, konvertuju svetlost u lokalizovana električna polja na površini čestica, vodeći svetlosne talase do željenih oblasti u spektru, sa nanometarskom preciznošću (*eng. localized surface plasmon resonance, LSPR*), u zavisnosti od sastava, veličine, geometrije, dielektričnog okruženja i međusobne udaljenosti čestica. Ukupni efekat, razdvajanje naelektrisanja se indukuje isključivo na površini metalnih nanočestica uzrokujući dipolne oscilacije elektronskog oblaka. Kada je frekvencija upadnog zračenja u rezonanci sa koherentnim oscilovanjem elektrona iz provodne zone, dolazi do pojave

gašenja (*eng. extinction*) odn. istovremene apsorpcije i rasejanja upadnog zračenja, koja se u spektru zapaža kao intenzivna površinska plazmonska traka (Rycenga et al., 2011; Xia et al., 2012). Broj apsorpcionih maksimuma je određen brojem modova u kojima data čestica može biti polarizovana.

Mieva teorija se svodi na izračunavanje koeficijenta poprečnog preseka ekstinkcije, odn. zbirnog efekta apsorpcije i rasejanja svetlosti u zavisnosti od poluprečnika metalnih nanosfera u različitim dielektričnim medijumima (Peña et al., 2006; Veenas et al., 2009). Frekvenca oscilovanja tj. talasna dužina maksimuma apsorpcije i širina apsorpcione trake zavise od veličine i oblika metalnih nanočestica, koncentracije slobodnih elektrona, distribucije naelektrisanja u kristalu, dielektrične konstante metala i sredine u kojoj su čestice dispergovane. Pored dipolnih oscilacija, mogu se javiti i viši (multipolni) modovi plazmotskih ekscitacija. Za veće nanočestice (prečnika > 20 nm) apsorpcioni spektar se sastoji od moda apsorpcije i rasejanja, pri čemu doprinos svakog zavisi od veličine čestica. Dipolna aproksimacija se u ovom slučaju ne može primeniti. Modovi višeg reda postaju dominantni u slučaju kada čestice usled morfoloških transformacija formiraju različite oblike (trouglaste, pločaste, štapičaste strukture). Fizičko objašnjenje ove pojave je zasnovano na činjenici da svetlost ne polarizuje veće čestice homogeno i povratni efekat dovodi do ekscitacije modova višeg reda. Kod metalnih sfera prečnika manjih od talasne dužine upadne svetlosti (< 20 nm) i slučajno raspoređenih u izotropnoj sredini određene dielektrične konstante, koja ne apsorbuje, samo dipolne oscilacije daju doprinos u Mievoj jednačini koeficijenta gašenja (*eng. extinction*) (Peña et al., 2006; Krklješ et al., 2009; Veenas et al., 2009).

U ULj/Vid apsorpcionom spektru Ag/PVA hidrogel nanokompozita sa različitom molarnom koncentracijom Ag-nanočestica (slika 14) zapaža se karakteristična intenzivna traka površinskog plazmona srebra u oblasti od 392-406 nm, koja je saglasno literaturi karakteristična za sferne čestice (Krklješ et al., 2009; Jovanović et al., 2011).



Slika 14. ULj/Vid apsorpcioni spektri Ag/PVA hidrogel nanokompozita-model sistema sa različitom molarnom koncentracijom Ag-nanočestica.

Objavljeni rezultati većine autora ukazuju da se za Ag-nanočestice poluprečnika r od 1-10 nm, položaj maksimuma *LSPR* javlja na približno istim talasnim dužinama, te je teško odrediti veličinu čestica na ovaj način. Elektronske oscilacije u metalima koje nastaju pod uticajem električnog polja upadnog zračenja najbolje opisuje Drude-ov model (jednačina 25) (Peña et al., 2006; Veenas et al., 2009):

$$\omega_p = \frac{v_f}{\Gamma} \quad (25)$$

gde je v_f je gustina elektrona na Fermi-jevom novou, a Γ je srednji slobodni put elektrona.

Uvođenjem dielektrične konstante dobijene pomoću Drudeovog modela u Mievu formulaciju i uzimajući u razmatranje veoma male čestice, moguće je širinu rezonantne ekstinkcije, $\Delta\omega_{1/2}$ (*eng. full width at half maximum, FWHM*), aproksimirati prigušenjem plazmonskih oscilacija, ω_p , a srednji slobodni put elektrona, Γ , veličinom poluprečnika metalne čestice, r . U navedenom opsegu veličina važi kvazi-statička aproksimacija Mieve teorije (jednačina 26), na osnovu koje se može izračunati veličina čestica (Peña et al., 2006; Veenas et al., 2009):

$$\Delta\omega_{1/2} = \frac{v_f}{r} \quad (26)$$

Promena obojenja usled mogućih morfoloških transformacija Ag-nanočestica manifestuje se pomeranjem položaja *LSPR* apsorpcionih maksimuma za sferni oblik (žuta, na ≈ 405 nm), za dodekahedron (narandžasta, na ≈ 455 nm), za nanopločaste strukture (šestougao, roza, na ≈ 505 nm; trougao, plava, na ≈ 590 nm/627 nm) i za nanoštapičaste strukture (zelena, na ≈ 720 nm) (Rycenga et al., 2011).

Određivanje molarne koncentracije Ag-nanočestica je pored određivanja veličine, izuzetno značajno za biomedicinsku primenu. Uzimajući u obzir atomsku gustinu Ag ($5,86 \times 10^{22}$ atom/cm³) moguće je odrediti srednji broj Ag-atoma koji pripadaju sfernim nanočesticama u metalnoj fazi, N i gustinu klastera u nanokompozitu, ρ_{Ag} . Molarne koncentracije Ag-nanočestica (tabela 2) u Ag/PVA hidrogel nanokompozitima su određene pomoću sledeće jednačine (Liu et al., 2007):

$$C = \frac{N_{total}}{N_{sr} V N_A} \quad (27)$$

gde je N_{sr} srednji broj atoma po sfernoj čestici (proizvod elektronske gustine srebra, $n_{e-} = 5,86 \times 10^{28}$ m⁻³ i zapremine sferne čestice, $V = 4/3r^3\pi$), N_{total} je početna koncentracija Ag⁺-jona u hidrogel nanokompozitu, V je zapremina fluida koji je apsorbovan i N_A je Avogadrova konstanta, N_{total}/N_{sr} je gustina Ag-nanočestica, ρ_{Ag} .

Tabela 2. Vrednosti masene koncentracije, C_{AAS} , širine apsorpcione trake na poluvisini, $FWHM$, poluprečnika, r , molarne koncentracije, C_{hg-NK} , specifične površine, $S.A.$, i rastvorljivosti, S_r , Ag-nanočestica u PVA hidrogelu.

Uzorak	$C_{AAS} \times 10^6$ (g/cm ³)	$FWHM$ (nm)	r (nm)	$C_{hg-NK} \times 10^{11}$ (mol/cm ³)	$S.A.$ (m ² /g)	S_r (mg/cm ³)
hg1-NK1	117,2	55,9	4,1	6,3	69,4	67,3
hg1-NK2	97,2	44,7	3,3	10,1	86,6	110,9
hg1-NK3	201,1	54,2	4,0	11,8	71,4	71,5
hg1-NK4	2169,4	56,9	4,2	110,4	68,0	64,8
hg1-NK5	5409,7	56,9	4,2	275,6	68,0	64,8
hg1-NK6	5524,5	49,9	3,7	419,3	77,6	85,6

Istraživanja su pokazala da mnoga svojstva nanokompozita vezana za njihovu primenu zavise kako od veličine poluprečnika nanočestica, tako i od specifične površine (*eng. specific surface area, S.A.*). Naime, male nanočestice imaju veću frakciju atoma na ivicama i rogļevima u poređenju sa većim Ag-nanočesticama, što ih čini površinski reaktivnijim. Na osnovu srednjih vrednosti poluprečnika, može se izračunati specifična površina Ag-nanočestica, pomoću sledeće jednačine (Liu et al., 2007; Wani et al., 2011):

$$S.A. = \frac{6}{2r \times \rho_{Ag}} \quad (28)$$

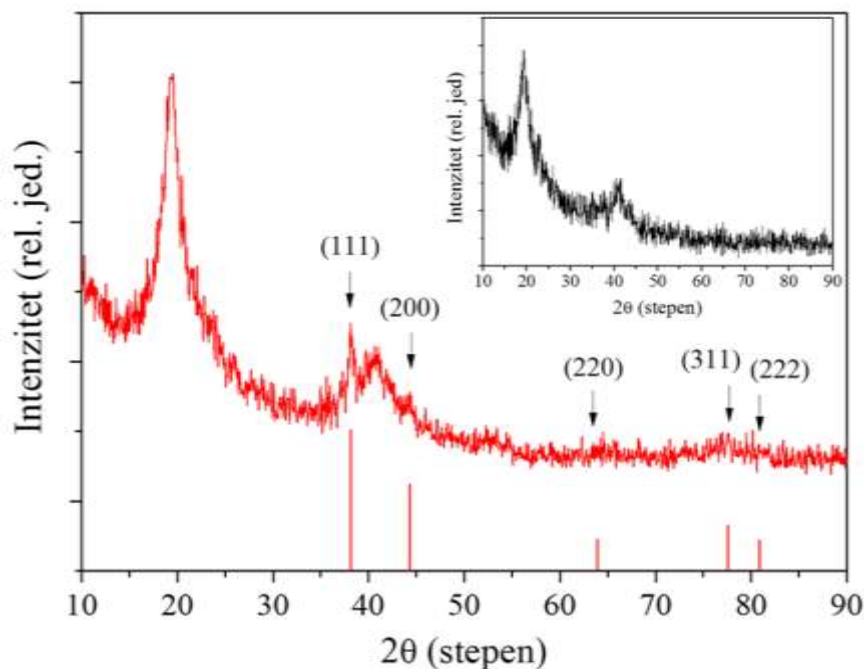
Na osnovu Ostwald-Frojdlihove (*nem. Ostwald-Freundlich*) relacije, dobijene modifikovanjem Kelvinove (*eng. Kelvin*) jednačine pokazano je da je rastvorljivost nanočestica direktno srazmerna njihovom poluprečniku (jednačina (29)) (Ma et al., 2012):

$$S_r = S_{bulk} \times \exp\left(\frac{2\gamma V_m}{RT} \times r\right) \quad (29)$$

gde je S_r rastvorljivost Ag-nanočestica, S_{bulk} je rastvorljivost srebra, γ je površinski napon nanočestica (J/m^2), V_m je molarna zapremina nanočestica (m^3/mol), R je univerzalna gasna konstanta i T je temperatura (K). Parametar rastvorljivosti Ag-nanočestica je prikazan u tabeli 2. Na osnovu dobijenih rezultata pokazano je da manje Ag-nanočestice imaju veću rastvorljivost. Dobijeni rezultati na osnovu ULj/Vid spektroskopije ukazuju da su sintetisane nanočestice veličina u opsegu od 6,5-8,5 nm. U poređenju sa vrednostima koje su do sada zabeležene u literaturi, (Krkļeš et al., 2007a; Kačarević-Popović et al., 2010; Swaroop et al., 2016) može se zakļučiti da su dobijene manje veličine čestica koje leže u užem opsegu veličina. Najmanja srednja vrednost poluprečnika Ag-nanočestica dobijena je za nanokompozit hg1-NK2, što je verovatno posledica najbolje uspostavljene ravnoteže polimer-rastvarač i gubitka konfiguracione entropije usled ograničenja pokretljivosti lanaca na površini nanočestica tokom procesa adsorpcije (Krkļeš et al., 2009).

Mikrostrukturna analiza ispitivanih sistema izvršena je metodom difrakcije X-zračenja (slika 15). Na umetnutoj slici je radi poređenja prikazan i difraktogram X-zračenja umrežene polimerne matrice koji ukazuje na semikristalnu strukturu, pri

čemu relativno široki difrakcioni maksimumi na oko 19° i 41° odgovaraju kristalnim oblastima PVA (Krklješ et al., 2009).



Slika 15. Difraktogram X-zračenja Ag/PVA kserogel nanokompozita.

Umetnuta slika: Difraktogram X-zračenja PVA kserogela.

Difraktogram Ag/PVA kserogel nanokompozita je prikazan na slici 15. Maksimumi difrakcije su pozicionirani na vrednostima ugla 2θ od 38° ; $44,2^\circ$; $64,4^\circ$; $77,6^\circ$ i $81,6^\circ$ koje odgovaraju Bragovim (*eng. Bragg*) refleksijama sa kristalnih ravni (111), (200), (220), (311) i (222). Ovako indeksirane kristalne ravni odgovaraju površinski centriranoj kubnoj (*face-centred cubic, fcc*) kristalnoj strukturi Ag (baza podataka JCPDS kartica br. 04-0783) (Krklješ et al., 2007c). Primenom Šererove jednačine (jednačina (18)) izračunata veličina kristalita Ag-nanočestica iznosi oko 9 nm, što je u saglasnosti sa veličinama čestica koje su dobijene ULj/Vid spektroskopijom.

Dobijeni rezultati potvrđuju da su kristalni domeni Ag-nanočestica u opsegu od 1-10 nm, za koji važi kvazi-statička aproksimacija Mieve teorije, te da se ULj/Vid spektroskopija pored kvalitativne karakterizacije može primeniti i kao metoda za

kvantifikaciju veličine nanočestica (Peña et al., 2006; Rance et al., 2008; Veenas et al., 2009).

Izvršena analiza veličina čestica u funkciji početne koncentracije Ag^+ -jona je pokazala da je korišćenjem kvazi-statičke aproksimacije Mieville teorije moguće izvršiti pouzdanu procenu veličine čestica. Pored toga, pokazalo se da radijaciono-hemijski umrežene PVA matrice imaju svojstvo stabilizacije nanometarskih veličina čestica, bez obzira na početnu koncentraciju Ag^+ -jona.

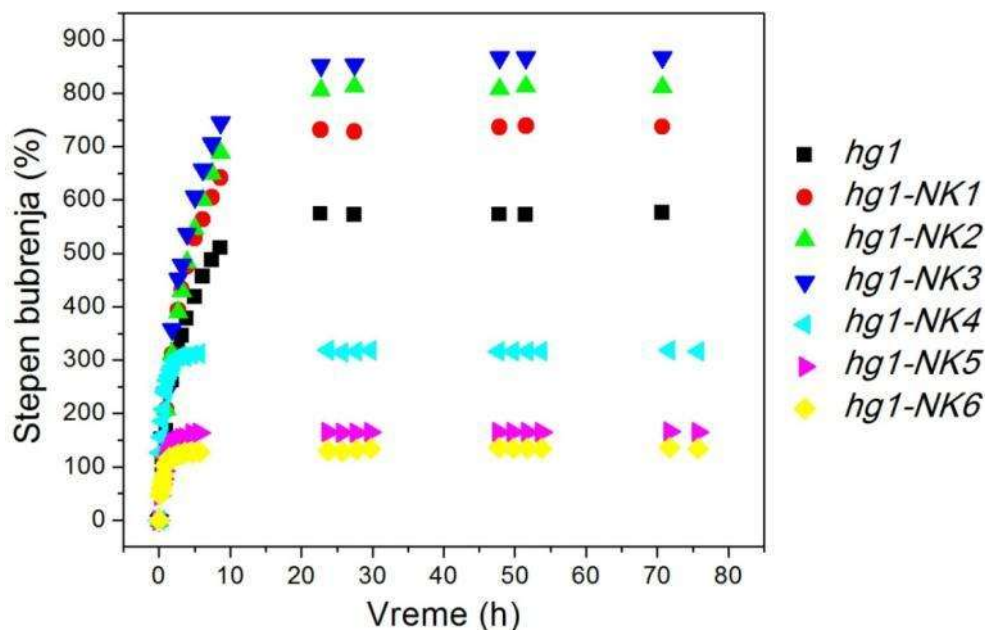
5.1.4. Kinetički aspekti i difuzioni modeli procesa bubrenja Ag/PVA hidrogel nanokompozita u fiziološkim uslovima

U ovom delu istraživanja ispitana je promena stepena bubrenja, SD , umreženih polimera i polimernih nanokompozita sa vremenom, za koje je predviđeno da dolaze u kontakt sa fiziološkim fluidom. Pored toga, ova ispitivanja su izvedena kako bi se odredio ravnotežni stepen bubrenja i izvršila kvantifikacija kinetičkih parametara na osnovu kojih je moguće odrediti mehanizam *in vitro* procesa bubrenja u SBF-u. *In vitro* ispitivanja interakcije hidrogel nanokompozita sa fiziološkim fluidom pružaju uvid u promene koje izaziva jonski sastav krvne plazme čoveka (Jovanović et al., 2011).

Promena stepena bubrenja je praćena gravimetrijskom metodom potapanjem kserogelova u SBF na temperaturi (37 ± 1) °C. Procenat odnosa mase polimerom apsorbovanog fluida i početne mase polimera praćen je u funkciji vremena t , do dostizanja ravnotežnog stanja pomoću sledeće jednačine (Kačarević-Popović et al., 2010):

$$SD(\%) = \frac{m_t - m_0}{m_0} \cdot 100 \quad (30)$$

gde je m_t masa hidrogela u vremenu t , a m_0 masa kserogela. U trenutku kada masa hidrogela dostigne konstantnu vrednost tj. kada $m_t = m_t'$ sistem postiže ravnotežni stepen bubrenja, SD_r . Na slici 16 prikazane su krive bubrenja PVA i Ag/PVA na osnovu kojih se može zaključiti da se kod svih sistema ravnotežni stepen bubrenja postiže nakon ≈ 30 h.



Slika 16. Krive bubrenja u SBF-u na 37 °C PVA hidrogela i Ag/PVA hidrogel nanokompozita.

Ispitivanje mehanizma i kvantifikacija kinetičkih parametara bubrenja izvršena je primenom tri matematička modela: Stepelog modela (linearizacijom početnog dela krive za $SD/SD_r \leq 0,6$), Modela reakcije prvog reda (nelinearnim modelovanjem celokupnog intervala bubrenja) i Modela reakcije drugog reda (linearizacijom celokupnog intervala bubrenja) (Mullarney et al., 2006):

1. Stepeni model,

$$\frac{SD}{SD_r} = kt^n \quad (31)$$

gde je k kinetička konstanta koja zavisi od strukture polimerne mreže i fluida koji difunduje, a n je difuzioni eksponent. Za određivanje difuzionog modela, jednačina 31 se primenjuje u inicijalnom stupnju bubrenja, odnosno u slučaju kada je ($SD/SD_r \leq 0,6$). Vrednosti kinetičkih parametara k i n određene su iz zavisnosti $\ln(SD/SD_r) = f(\ln t)$, linearnim fitovanjem tačaka koje odgovaraju inicijalnom stupnju bubrenja.

2. Model reakcije prvog reda,

$$\frac{SD}{SD_r} = 1 - \exp(-kt) \quad (32)$$

3. Model reakcije drugog reda,

$$\frac{t}{SD} = A + Bt \quad (33)$$

gde je $B=1/SD_r$ recipročna vrednost ravnotežnog stepena bubrenja, $A=1/v_0$ je recipročna vrednost početne brzine bubrenja hidrogela, v_0 .

Mehanizam procesa bubrenja se u zavisnosti od vrednosti difuzionog eksponenta kao osnovnog kinetičkog parametra može klasifikovati na: (a) Slučaj I: Fikova (*eng Fickian*) difuzija ($n \leq 0,5$). Polimerni lanci imaju veću pokretljivost, te omogućavaju lako prodiranje molekula vode unutar šupljina polimerne mreže. U ovom slučaju je brzina difuzije fluida, v_{dif} , značajno manja od brzine relaksacije, v_{rel} , polimernih lanaca, tako da je proces bubrenja kontrolisan brzinom difuzije. (b) Slučaj II: ($n = 1$) difuzija koja se odigrava kada polimerni lanci nisu dovoljno pokretljivi tako da je prodiranje molekula vode unutar šupljina polimerne mreže značajno manje, pa je $v_{dif} \gg v_{rel}$, odnosno proces bubrenja je kontrolisan brzinom relaksacije polimernih lanaca. (c) Granični slučaj između slučaja I i slučaja II: ne-Fikova ili anomalna difuzija ($0,5 < n < 1$) koja se dešava kada je $v_{dif} \approx v_{rel}$ polimernih lanaca, tako da je proces bubrenja istovremeno kontrolisan i brzinom difuzije i brzinom relaksacije polimernih lanaca (Ganji et al., 2010).

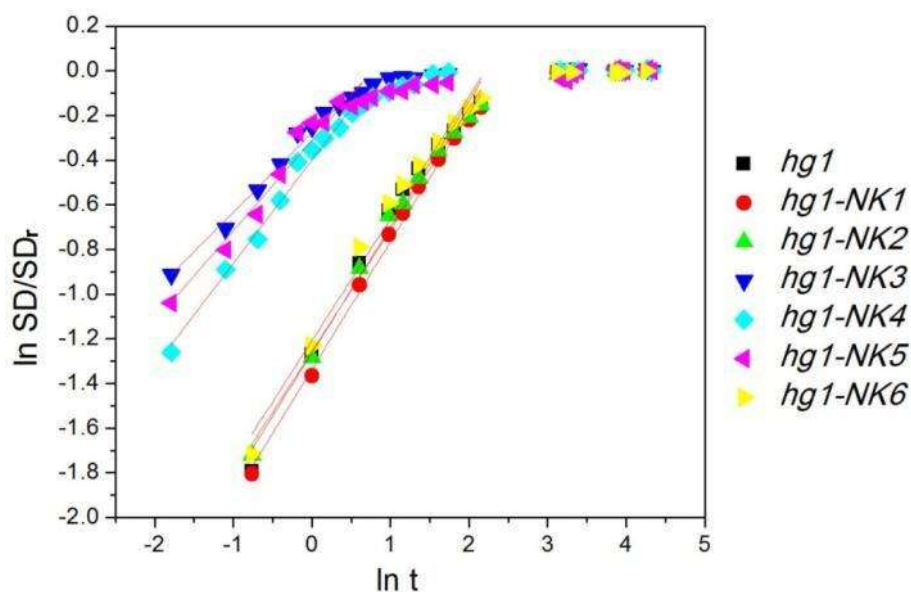
Vrednosti kinetičkih parametara k i n su prikazane se u tabeli 3. Primenom Stepelog modela na krive bubrenja u SBF-u na 37 °C za $SD/SD_r \leq 60$ % dobijen je linearni trend za sve ispitivane sisteme. Vrednosti kinetičkih parametara su određeni linearizacijom eksperimentalnih vrednosti $\ln (SD/SD_r)$ u funkciji $\ln t$ (slika 17).

Tabela 3. Vrednosti ravnotežnog stepena bubrenja, SD_r , kinetičke konstante, k , i difuzionog eksponenta, n , dobijene primenom tri kinetička modela.

Uzorak	SD_r^{eksp} (%)	Pepasov model			Model I-reda		
		k ($1/h^n$)	n	R^2	$SD_r^{rač}$ (%)	$k_{P-R} \times 10^4$ ($1/s$)	R^2
<i>hg1</i>	576	0,299	0,55	0,98	518	0,67	0,99
<i>hg1-NK1</i>	737	0,283	0,56	0,98	654	0,63	0,99
<i>hg1-NK2</i>	811	0,263	0,57	0,99	730	0,59	0,99
<i>hg1-NK3</i>	867	0,285	0,54	0,99	766	0,60	0,99
<i>hg1-NK4</i>	317	0,758	0,35	0,98	300	2,12	0,90
<i>hg1-NK5</i>	165	0,671	0,46	0,99	155	2,26	0,98
<i>hg1-NK6</i>	135	0,733	0,40	0,96	123	1,38	0,79

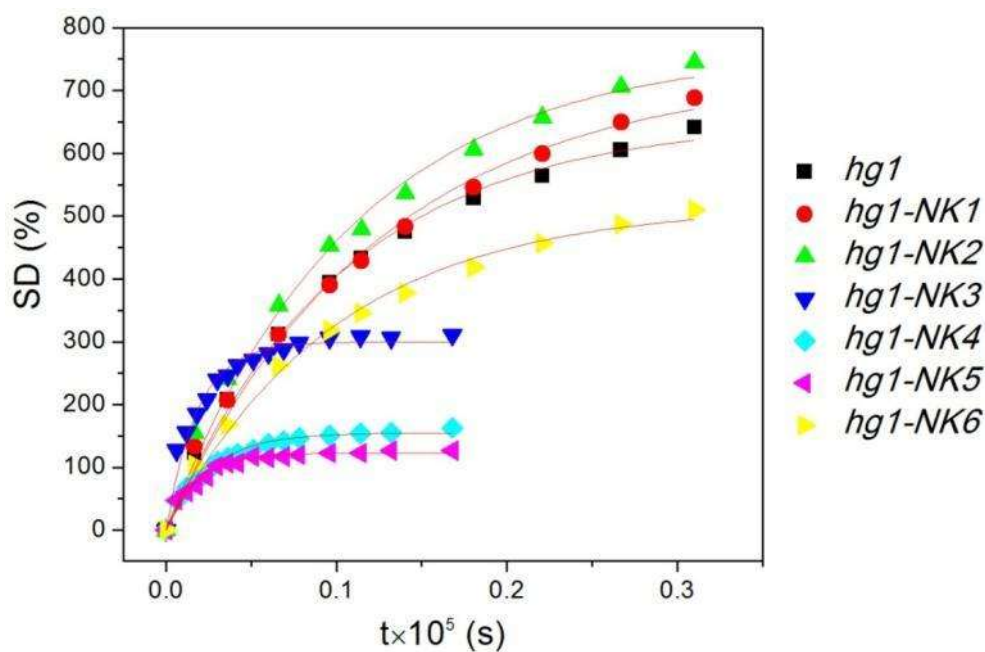
Skotov model

$SD_r^{rač}$ (%)	v_0 (%/min)	R^2
595	4,97	0,99
769	5,74	0,99
855	5,42	0,99
909	6,37	0,99
318	5,14	0,99
167	7,79	0,99
136	5,91	0,99



Slika 17. Primena Pepasovog modela na krive bubrenja u SBF-u na 37 °C.

Na osnovu rezultata dobijenih nelinearnim modelovanjem celokupnog intervala bubrenja primenom Modela reakcije prvog reda dobijene su nešto niže teorijski izračunate vrednosti $SD_r^{rač}$ (slika 18).

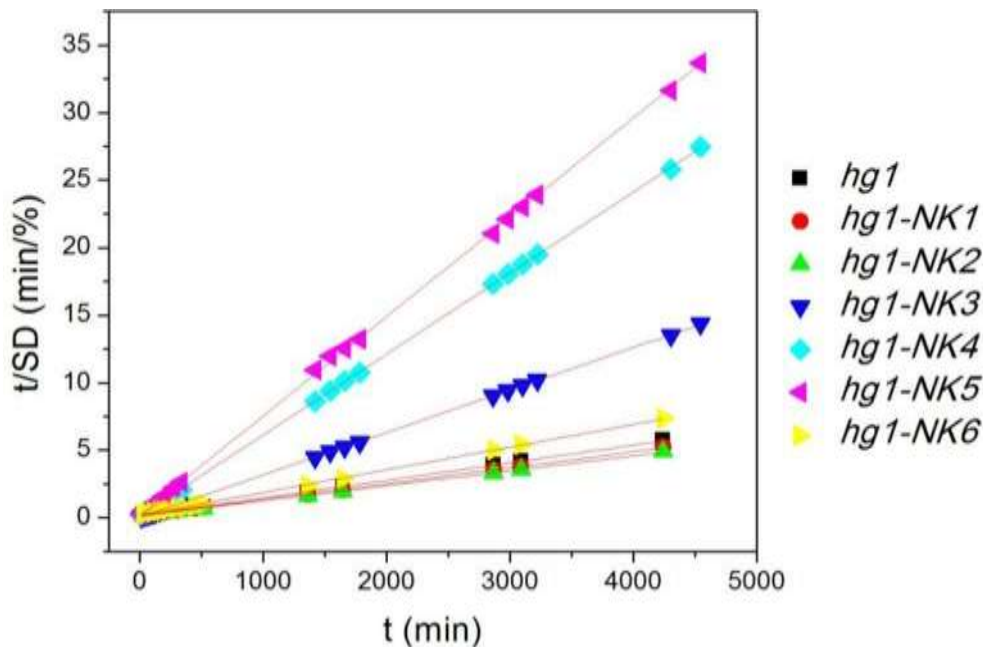


Slika 18. *Primena modela reakcije I reda na krive bubrenja u SBF-u na 37°C.*

Za proces bubrenja u dužim vremenskim intervalima (slika 19), dobijene vrednosti početnih brzina bubrenja, v_0 za sve Ag/PVA hidrogel nanokompozite hg1-(NK1-NK6), su veće u poređenju sa PVA hidrogelom (hg1). Najveća vrednost početne brzine bubrenja dobijena je za hg1-(NK3) sa molarnom koncentracijom srebra 12 mol/cm^3 .

Vrednosti difuzionih eksponenata, n su približno konstantne za PVA hidrogel (hg1) i Ag/PVA hidrogel nanokompozite hg1-(NK1-NK3) u SBF-u na 37 °C, a dobijeni mehanizam bubrenja je ne-Fikova ili anomalna difuzija. Za Ag/PVA hidrogel nanokompozite hg1-(NK4-NK6), dobijene vrednosti difuzionog eksponenta ukazuju da se proces bubrenja za ove sisteme odigrava po zakonu Fikove difuzije. Vrednosti konstante k za Ag/PVA hidrogel nanokompozite, hg1-(NK1-NK3) su približno konstantne što ukazuje na činjenicu da se energija γ -zračenja kod ovih sistema najvećim

delom troši na proces redukcije Ag^+ -jona i nema značajnog uticaja na promenu strukture mreže u smislu dodatnog umrežavanje ili degradacije polimernih lanaca.



Slika 19. Primena Skotovog modela na krive bubrenja u SBF-u na 37°C.

Za redukciju manjih koncentracija Ag^+ -jona, potrebna je manja ukupna apsorbovana doza γ -zračenja, ali je generalno apsorbovana doza podešavana prema koncentraciji Ag^+ -jona. Vrednosti konstante k za Ag/PVA hidrogel nanokompozite hg1-(NK4-NK6), su veće u poređenju sa PVA hidrogelom (hg1), što ukazuje na dve stvari: ili je došlo do promena strukture mreže pod uticajem većih apsorbovanih doza potrebnih za redukciju većih koncentracija Ag^+ -jona; ili je veća molarna koncentracija nanočestica uticala na pokretljivost polimernih lanaca. Moglo bi se zaključiti da je proces bubrenja osetljiv na promenu mehanizma difuzije fluida. Prelaz sistema od ne-Fikove ka Fikovoj difuziji je najverovatnije posledica promena nastalih pod dejstvom većih doza γ -zračenja, ali i povećanja koncentracije Ag-nanočestica iznad kritične vrednosti koja se nalazi negde između $(12-110) \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^3$ (tabela 2), kada ravnotežni stepen bubrenja krene da opada.

Poređenjem dobijenih rezultata prikazanih u tabelama 2 i 3, zapaženo je da sa povećanjem molarne koncentracije Ag-nanočestica iznad kritične vrednosti koja se

nalazi negde između $(12-110) \times 10^{-11}$ mol/cm³ (tabela 2) dolazi do promene mehanizma procesa bubrenja koji prolazeći kroz prevojnu tačku utiče na sve veće smanjenje SD_r (tabela 3). Mogućnost povećanja SD_r je naročito važna za biomedicinsku primenu, kada je reč o unapređenju antibakterijske aktivnosti i ubrzanom zarastanju rana. Izotermni kapaciteti bubrenja za Ag/PVA hidrogel nanokompozite (hg1-(NK1-NK3)) su veći u poređenju sa PVA hidrogelom (hg1) i najverovatnije su posledica prisustva male količine rastvorenih Ag⁺-jona, koja dovodi do promene hemijskog okruženja mreže. Difuzija H₃O⁺-jona u hidrogel indukuje odbojne sile unutar polimerne mreže, koje dovode do relaksacije polimernih lanaca i sorpcije većeg broja molekula vode. S druge strane, manji SD_r kod hg1-(NK4-NK6) u poređenju sa čistim PVA hidrogelom je najverovatnije posledica ograničene pokretljivosti polimernih lanaca (Can et al., 2005; Chaturvedi et al., 2015).

Difuzioni koeficijenti, D , se teorijski određuju primenom nekoliko modela koji se baziraju na Fikovom zakonu. Za slučaj jednodimenzione difuzije sa konstantnim graničnim uslovima, primenjuju se tri aproksimacije (Mullarney et al., 2006):

1. Difuzija medijuma u inicijalnom stupnju bubrenja ($SD/SD_r \leq 60$ %),

$$\frac{SD}{SD_r} = 4 \left[\frac{Dt}{\pi \delta^2} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (34)$$

pri čemu je δ debljina kserogela.

2. Difuzija medijuma u dužem vremenskom intervalu bubrenja ($SD/SD_r \geq 60$ %),

$$\frac{SD}{SD_r} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \exp\left(-\frac{D\pi^2 t}{\delta^2}\right) \quad (35)$$

pri čemu je δ debljina kserogela.

3. Eterova aproksimacija ($0 \leq SD/SD_r \leq 100$ %),

$$\frac{SD}{SD_r} = 1 - \exp\left[-k \left(\frac{Dt}{\delta^2}\right)^{\frac{1}{b}}\right] \quad (36)$$

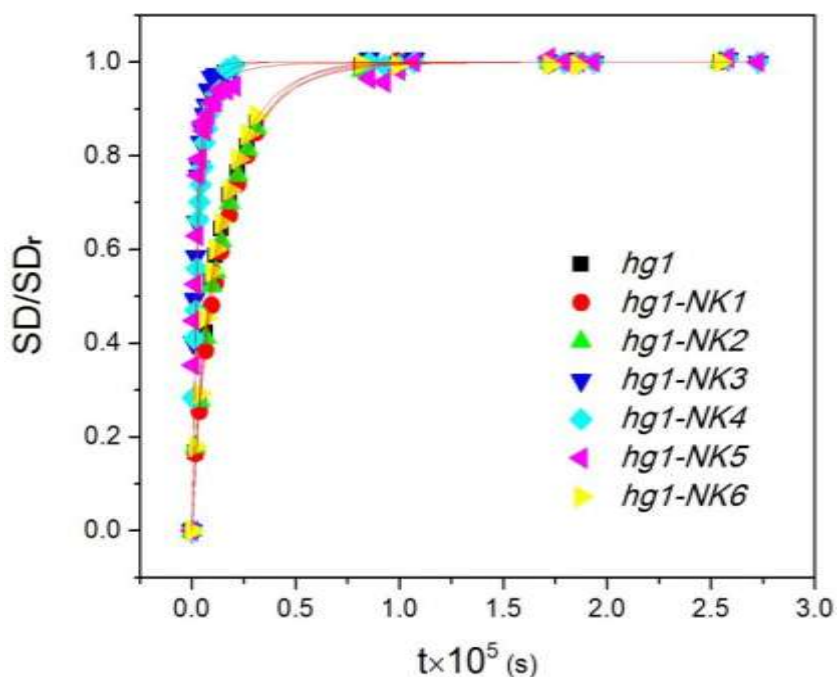
pri čemu je δ debljina kserogela, a a i b su empirijske konstante.

Vrednosti difuzionih koeficijenata primenom tri aproksimacije Fikovog zakona su prikazane u tabeli 4. Brzina difuzije medijuma u inicijalnom stupnju bubrenja ($SD/SD_r \leq 60\%$) i brzina difuzije medijuma u dužem vremenskom intervalu ($SD/SD_r \geq 60\%$) za PVA hidrogel hg1 i Ag/PVA hidrogel nanokompozite hg1-(NK1–NK3) je manja u poređenju sa hg1-(NK4–NK6) hidrogel nanokompozitima. Ova činjenica potvrđuje da je doprinos difuzionog mehanizma brzini dotoka fluida manji u slučaju kada je koncentracija Ag-nanočestica manja od kritične vrednosti koja se nalazi između $(12-110) \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^3$. Najveća vrednost difuzionog koeficijenta primenom ove dve aproksimacije dobijena je za hg1-NK4. U ovom slučaju verovatno je došlo do finog balansa između efekata koji umanjuju pokretljivost lanaca i prisustva nanočestica čija koncentracija nije u tom obimu da umanjuje difuziju. Pokazano je da najveće ograničenje pokretljivosti polimernih lanaca kod ovog sistema dovodi do najbržeg dostizanja ravnotežnog stanja. To ukazuje da γ -zračenje u ovom slučaju utiče na promenu strukture mreže efektom dodatnog umrežavanja, koja zajedno sa velikom koncentracijom Ag-nanočestica gubi konfiguracionu entropiju. Dalje smanjenje koeficijenata difuzije sa povećanjem koncentracije Ag-nanočestica je najverovatnije posledica dodatnog efekta koje ima γ -zračenje na polimernu mrežu, ali i velike molarne koncentracije nanočestica.

Tabela 4. Difuzioni koeficijenti SBF-a dobijeni primenom tri aproksimacije Fikovog zakona.

Uzorak	$SD/SD_r \leq 60\%$		$SD/SD_r \geq 60\%$		$0 \leq SD/SD_r \leq 100\%$	
	$D \times 10^7$ (cm^2/s)	R^2	$D \times 10^7$ (cm^2/s)	R^2	$D \times 10^8$ (cm^2/s)	R^2
hg1	1,49	0,99	1,41	0,99	5,24	0,99
hg1-NK1	1,40	0,98	1,32	0,99	4,66	0,99
hg1-NK2	1,16	0,99	1,19	0,99	7,32	0,99
hg1-NK3	1,25	0,99	1,25	0,99	5,46	0,99
hg1-NK4	8,51	0,98	8,14	0,98	5,33	0,99
hg1-NK5	4,26	0,99	4,49	0,98	4,78	0,99
hg1-NK6	4,81	0,98	5,17	0,85	0,12	0,98

Primenom Eterove (*eng. Eter*) aproksimacije ($0 \leq SD/SD_r \leq 100\%$) prikazane na slici 20, najveća vrednost difuzionog koeficijenta dobijena za hg1-NK2 sa najmanjom veličinom Ag-nanočestica. Velika brzina difuzije H_3O^+ -jona usled veće količine rastvorenih Ag^+ -jona uzrokuje jače odbojne sile koje dovode do širenja polimernih lanaca. Međutim, iako se u ovom istraživanju pošlo od činjenice da je PVA hidrogel dobar stabilizator za sve ispitane početne koncentracije Ag^+ -jona, treba istaći da je doprinos u karakterizaciji nanokompozitnih sistema koji su namenjeni da budu u stalnom kontaktu sa fiziološkim fluidima sagledavanje uloge molarnih koncentracija nanočestica u hidrogelovima koja utiče na kinetičke aspekte i model difuzije procesa bubrenja.



Slika 20. *Primena Eter modela na krive bubrenja u SBF-u na 37°C.*

5.1.5. Kvantifikacija *in vitro* oslobađanja jona srebra iz Ag/PVA hidrogel nanokompozita u fiziološkim uslovima

Kompleksan mehanizam oslobađanja bioaktivne komponente iz sistema za kontrolisanu dostavu u većini slučajeva zahteva adekvatnu kvantifikaciju kako bi se

svojstva ovih sistema prilagodila biomedicinskoj primeni. Poslednjih nekoliko decenija, farmakokinetička analiza oslobađanja bioaktivne komponente svodi se na primenu odgovarajućih matematičkih modela kako bi se što preciznije opisala kontrolisana dostava u fiziološkim uslovima. Matematički modeli kojima se može predvideti količina oslobođene bioaktivne komponente sa vremenom značajno olakšavaju dizajniranje novih sistema za specifičnu primenu u medicini (Lee et al., 2012; Redmond et al., 2005; Jamuna-Thevi et al., 2011; Aydin et al., 2012; Khamanga et al., 2012).

S obzirom da je osnovni cilj ovog dela istraživanja kvantifikacija *in vitro* stepena oslobađanja Ag⁺-jona iz Ag/PVA hidrogel nanokompozita i predviđanje performansi ovih sistema tj. ovladavanje parametrima projektovanja njihove antibakterijske funkcije za bezbednu primenu u medicini, primenom atomske apsorpcione spektrometrije određeni su kumulativni profili oslobađanja Ag⁺-jona iz umreženih nanokompozita u vremenu optimalnom za primenu u kliničkoj praksi (oko 9 dana) (tabela 5). Treba napomenuti da optimizacija stepena oslobađanja Ag⁺-jona iz Ag/PVA hidrogel nanokompozita upotrebom farmakokinetičkih modela do sada nije zabeležena u literaturi.

Rezultati *in vitro* kumulativnog stepena oslobađanja Ag⁺-jona iz hidrogel nanokompozita (potpoglavlje 4.2.2.) prikazani su u tabeli 5.

Tabela 5. Kumulativno *in vitro* oslobađanje Ag⁺-jona iz Ag/PVA hidrogel nanokompozita.

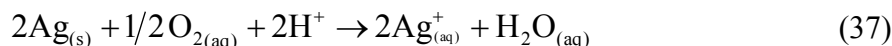
<i>Kumulativno oslobođeni Ag⁺-joni / masa hg-NK (ppm/g)</i>						
<i>t (dani)</i>	<i>hg1-NK1</i>	<i>hg1-NK2</i>	<i>hg1-NK3</i>	<i>hg1-NK4</i>	<i>hg1-NK5</i>	<i>hg1-NK6</i>
1	5,8	6,6	5,4	29,8	95,0	212,1
3	9,5	10,0	11,1	47,6	183,7	336,9
5	12,4	12,5	15,1	59,1	193,6	356,3
7	15,5	15,4	18,7	70,6	199,6	364,8
9	18,9	18,5	22,3	80,4	206,1	377,9
<i>%/g</i>	16	19	11	4	4	7

Za predviđanje antibakterijske efikasnosti i potencijalnu primenu u kliničkoj praksi, interesantno je prikazati kako stepen oslobađanja Ag^+ -jona izražen u ppm varira za ispitivane sisteme prosečne mase oko 0,113 g posle 24 h: 0,66 (hg1-NK1), 0,74 (hg1-NK2), 0,61 (hg1-NK3), 3,37 (hg1-NK4), 10,74 (hg1-NK5), i 23,96 (hg1-NK6). Na osnovu dobijenih rezultata pokazano je da se hidrogel nanokompoziti hg1-(NK1-NK3) nalaze na donjoj teorijskoj granici MIK, dok su hg1-(NK4 i NK5) ispod teorijske granice MBK. Predviđena su antibakterijska svojstva, što je osnovni element projektovanja antibakterijske funkcije, kao i njihovog potencijalno bezbednog korišćenja bez pojave citotoksičnog efekta (Jamuna-Thevi et al., 2011).

Iako se na početku ovog istraživanja pošlo od pretpostavke da je stepen oslobađanja vezan samo za ukupnu koncentraciju Ag-nanočestica, poređenjem količina oslobođenih jona iz hidrogel nanokompozita hg1-(NK1-NK3) u toku 24 h može se zaključiti da na veću brzinu oslobađanja Ag^+ -jona utiče i smanjenje veličina čestica, što se vidi iz tabele 5 za uzorak hg1-NK2 u poredjenju sa uzorkom hg1-NK3. Za veće početne koncentracije Ag-nanočestica kod hidrogel nanokompozita hg1-(NK4-NK6) dobijena je veća brzina oslobađanja i pored toga što ovi sistemi imaju manji stepen bubrenja u poređenju sa hidrogel nanokompozitima hg1-(NK1-NK3), što je u skladu sa porastom molarnih koncentracija nanočestica.

Da bi se ispitala zavisnost stepena oslobađanja Ag^+ -jona od veličine Ag-nanočestica pošlo se od pretpostavke da bi se antibakterijska snaga ovih nanosistema mogla predvideti primenom unapređenog pristupa određivanja elektrodnog potencijala i Gibsove (*eng. Gibbs*) slobodne energije, za slučaj kada su dimenzije čestica nanometarske (Brainina et al., 2012). Treba napomenuti da u literaturi nije zabeležen ovakav pristup ispitivanja antibakterijskog potencijala hidrogel nanokompozita.

Poznato je da Ag-nanočestice u fiziološkim uslovima menjaju naelektrisanje i postaju nestabilne usled prisustva jona različitog naelektrisanja. Međutim, pošto su u hidrogelovima Ag-nanočestice u stalnom kontaktu sa rastvorenim kiseonikom, studije pokazuju da većina Ag^+ -jona nastaje oksidacijom metalnih nanočestica u okružujućem medijumu usled prenosa naelektrisanja (Liu et al., 2010; Lee et al., 2012; Xiu et al., 2012). Ag-nanočestice podležu redoks reakciji (jednačina 37):



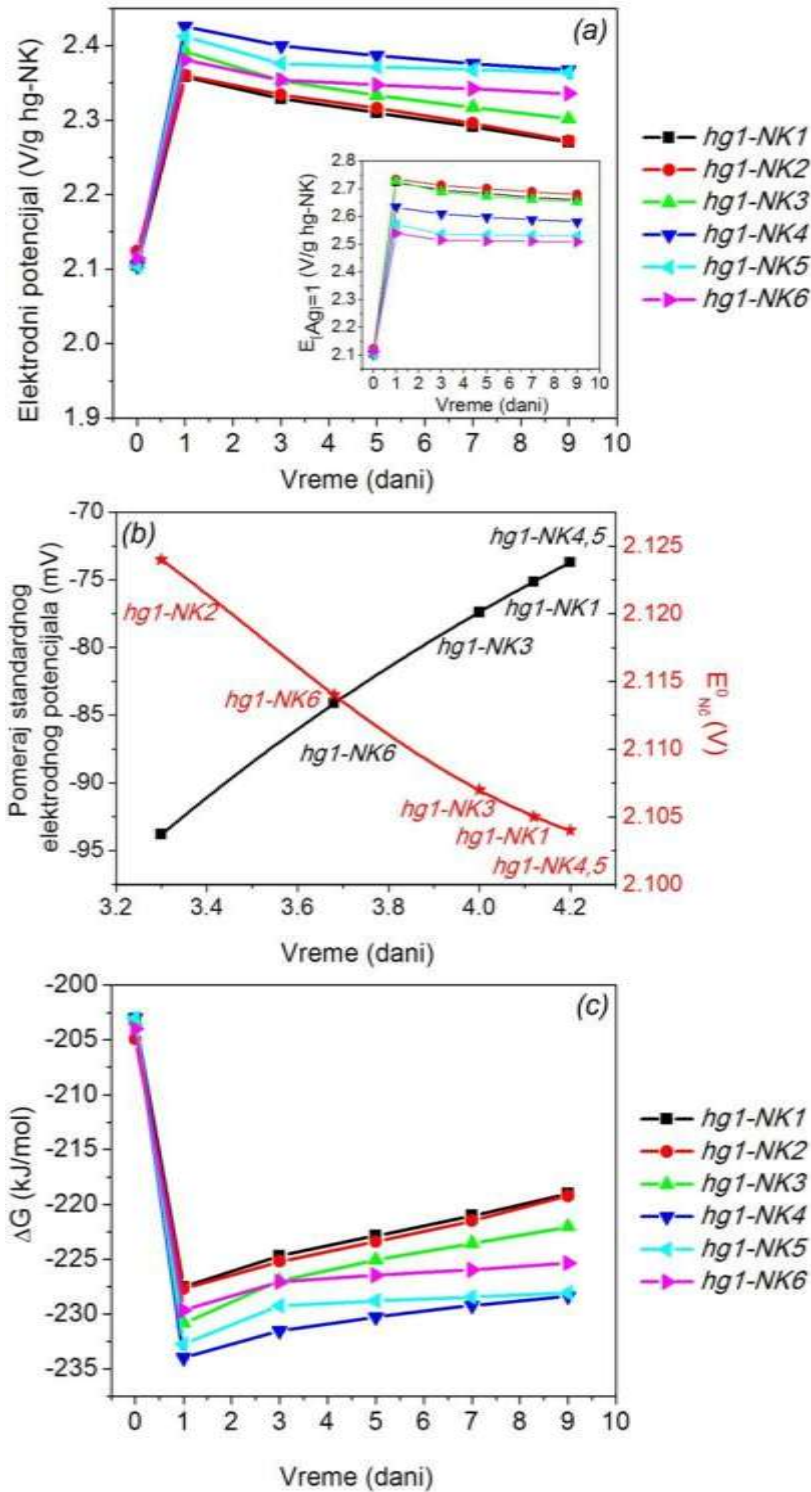
Na ovaj način nastali Ag^+ -joni usled delovanja odbojnih sila unutar hidrogela, šire mrežu polimernih lanaca, što rezultuje povećanjem brzine difuzije fiziološkog fluida i brzine oslobađanja Ag^+ -jona iz hidrogela.

S obzirom da su eksperimenti vršeni u fiziološkim uslovima, to je omogućilo predviđanje antibakterijske snage izračunavanjem elektrodnog potencijala i Gibsove slobodne energije saglasno Nernst-ovoj jednačini (jednačina (38)):

$$E = \left(E_{\text{O}_2/\text{O}_2^-}^\circ - E_{\text{Nc}}^\circ \right) - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Ag}^+]^2 \cdot [\text{H}_2\text{O}]}{[\text{Ag}]^2 \cdot [\text{O}_2]^{1/2} \cdot [\text{H}^+]^2} \quad (38)$$

gde je $E_{\text{O}_2/\text{O}_2^-}^\circ = E_c^\circ = 1,23 \text{ V}$ i $E_{\text{Ag}/\text{Ag}^+}^\circ = E_a^\circ = -0,799 \text{ V}$; $E_{\text{Nc}}^\circ = E_{\text{Ag}/\text{Ag}^+}^\circ - E_{\text{Plieth}}^\circ$; $E^\circ = E_{\text{O}_2/\text{O}_2^-}^\circ - E_{\text{Nc}}^\circ$; R je univerzalna gasna konstanta; T je temperatura (K); n je broj elektrona; F je Faradejeva (*eng. Faraday*) konstanta. Standardni elektrodni potencijal za reakciju oksidacije nanočestica je dat izrazom: $E_{\text{Plieth}}^\circ = 2\gamma v_M / zFr$, pri čemu je γ površinski napon, v_M je molarna zapremina srebra, z je najniže valentno stanje, r je poluprečnik nanočestica (Redmond et al., 2005). Parametar rastvorljivosti kiseonika u jednačini (38) je dobijen primenom Henrijevog (*eng Henry*) zakona, $[\text{H}_2\text{O}]/([\text{O}_2]^{1/2} \cdot [\text{H}^+]^2) = k_H = 3,181 \times 10^{-2}$. Kada se koncentracije oslobođenih Ag^+ -jona, $[\text{Ag}^+]$, predstave kao kumulativne vrednosti, a odgovarajuće ukupne koncentracije Ag-nanočestica, $[\text{Ag}]$, svedu na ukupne koncentracije u posmatranim vremenskim intervalima, moguće je predvideti promenu potencijala oksidacije sa povećanjem početne koncentracije Ag-nanočestica i ispitati kako veličina čestica utiče na ovu promenu (slika 21 (a)) (Krstić et al., 2014b).

Pliet (*eng. Plieth*) je predvideo negativno pomeranje standardnog elektrodnog potencijala kao i smanjenje radne funkcije za metalne nanočestice prečnika manjeg od 25 nm (slika 21 (b)) (Redmond et al., 2005).



Slika 21. (a) Elektrodni potencijal hidrogel nanokompozita, E ; Dodatak: Elektrodni potencijal hidrogel nanokompozita pri normiranoj jediničnoj koncentraciji makroskopske faze srebra, $[Ag]=1$, (b) Plietov standardni elektrodni potencijal i odgovarajući standardni elektrodni potencijal Ag-nanočestica, E° , i (c) Gibbsova slobodna energija, ΔG .

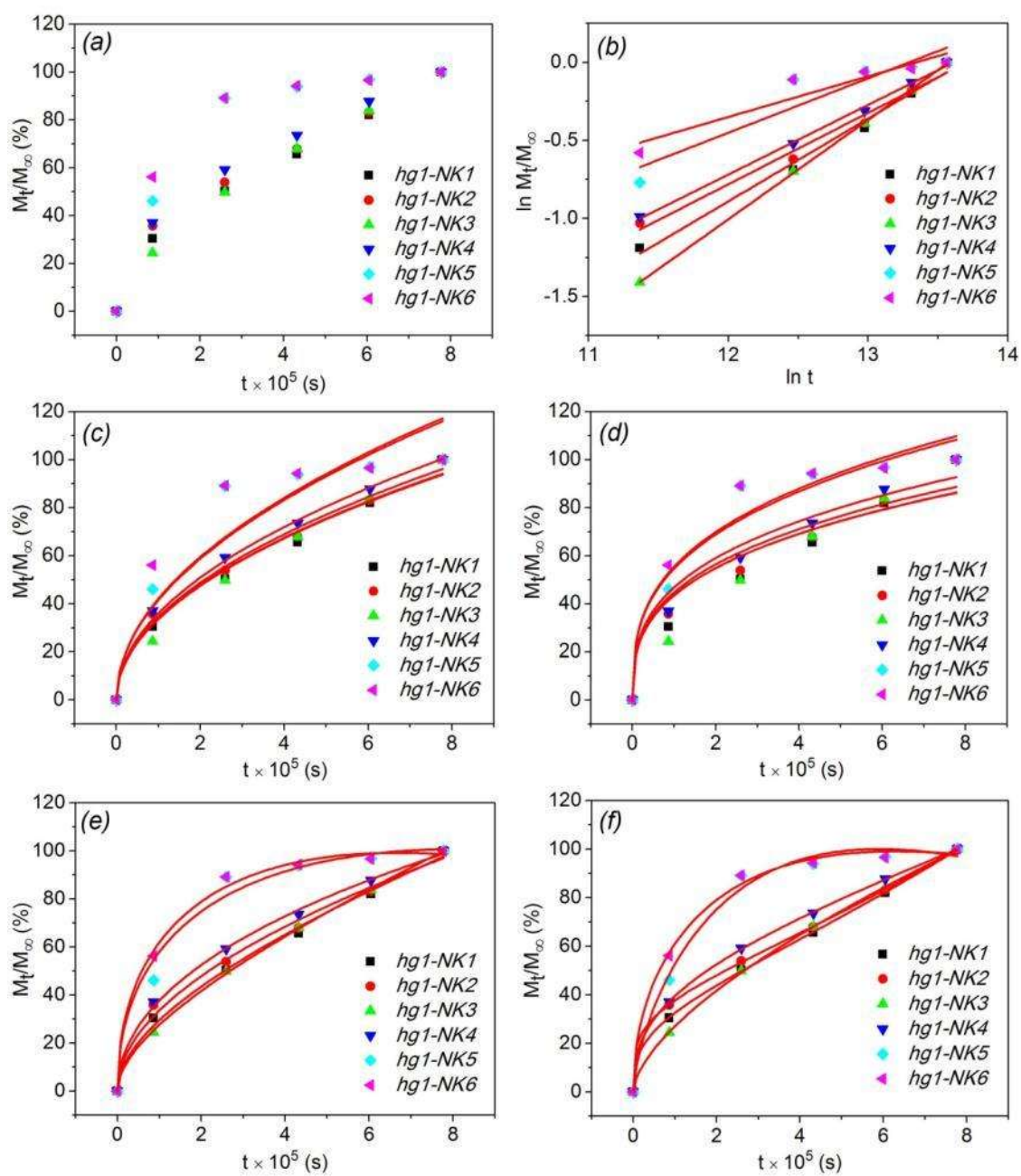
Ova činjenica ukazuje da metalne nanočestice manjih dimenzija mnogo lakše oksiduju u poređenju sa makroskopskom fazom metala. Razlika u standardnom elektrodnom potencijalu uzrokuje razlike u ravnotežnoj koncentraciji Ag^+ -jona oko svake čestice (slika 21 (b)). Dobijeni rezultati Gibsove slobodne energije (slika 21 (c)) ukazuju da se pokretačka sila oksidacije povećava sa porastom početne koncentracije Ag-nanočestica i povećanjem brzine difuzije fluida (tabele 2 i 4). Najveća vrednost Gibsove slobodne energije je dobijena za hidrogel nanokompozit hg1-NK4, za koji je izračunat i najveći koeficijent difuzije (tabela 4). Ovim rezultatom je pokazano da manji ravnotežni stepen bubrenja ovog sistema, u poređenju sa hidrogel nanokompozitima hg1-(NK1-NK3), nema uticaja na brzinu oslobađanja već da glavnu ulogu preuzima brzina difuzije fluida u kome je rastvoren kiseonik.

Studija *in vitro* oslobađanja Ag^+ -jona praćena u dužem vremenskom intervalu, ukazuje da procenat oslobođenih Ag^+ -jona opada sa porastom početne koncentracije Ag-nanočestica (tabela 5). Oslobađanje Ag^+ -jona iz Ag/PVA hidrogel nanokompozita je najverovatnije inhibirano potrošnjom kiseonika ili većom koncentracijom slobodnih Ag^+ -jona koji se vezuju za površinu Ag-nanočestica i tako inhibiraju heterogenu oksidaciju (Liu et al., 2010; Krstić et al., 2014b).

Nadalje je utvrđeno je da su *in vitro* profili oslobađanja Ag^+ -jona slični profilima oslobađanja lekova, te je bilo moguće primeniti farmakokinetičke modele za analizu mehanizma oslobađanja (Aydın et al., 2012; Khamanga et al., 2012).

5.1.6. Kinetički modeli *in vitro* oslobađanja jona srebra iz Ag/PVA hidrogel nanokompozita

Za opisivanje kinetike oslobađanja Ag^+ -jona iz Ag/PVA hidrogel nanokompozita u vremenu optimalnom za biomedicinsku primenu (oko 9 dana) (slika 22 (a)), po prvi put su primenjeni farmakokinetički modeli pomoću kojih se mogu opisati dobijene složene nelinearne zavisnosti: Korsmejer-Pepas (eng. *Korsmeyer-Peppas*), Hinući (jap. *Higuchi*), Hikson-Krovel (eng. *Hixson-Crowell*), Kopča (eng. *Kopcha*) i Makoid-Banakar (eng. *Makoid-Banakar*) (slika 22 (b)-(f)) (Aydın et al., 2012; Khamanga et al., 2012).



Slika 22. Matematičko modelovanje oslobađanja Ag^+ -jona iz Ag/PVA hidrogel nanokompozita: (a) kumulativno oslobođeni Ag^+ -joni, (b) Korsmejer-Pepas, (c) Hinući, (d) Hikson-Krovel, (e) Kopča, (f) Makoid-Banakar.

1. Korsmejer-Pepas model:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{KP} t^n \quad (39)$$

opisuje oslobađanje bioaktivne komponente iz polimernog sistema pomoću jednostavne relacije u kojoj je M_t količina oslobođene komponente u vremenu t , M_∞ je ukupna masa bioaktivne komponente u sistemu u ravnotežnom stanju, k_{KP} je Korsmejer-Pepasova konstanta brzine oslobađanja bioaktivne komponente, a n je parametar koji opisuje transportni mehanizam oslobađanja iz hidrogela cilindričnog oblika.

2. Hinući model opisuje oslobađanje bioaktivne komponente iz nerastvorne matrice kao kvadratni koren vremenske zavisnosti procesa baziranog na Fikovoj difuziji:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H t^{1/2} \quad (40)$$

gde je k_H Hinućijeva konstanta koja za planarne heterogene sisteme matrica zavisi od poroznosti matrice i difuzionog koeficijenta bioaktivne komponente. Ovaj model se primenjuje na sisteme u slučajevima kada je: koncentracija bioaktivne komponente u matrici mnogo veća od njene rastvorljivosti; za proces difuzije po jednoj dimenziji, pri čemu se efekti ivica mogu zanemariti; veličina čestica zanemarljiva u odnosu na debljinu matrice; efekat bubrenja i rastvaranja matrice zanemarljiv, a difuziona svojstva bioaktivne komponente konstantna; zapremina medijuma dovoljna za potpuno rastvaranje bioaktivne komponente.

3. Hikson-Krovel model opisuje oslobađanje bioaktivne komponente iz sistema rastvaranjem. Ovaj model opisuje zavisnost oslobađanja bioaktivne komponente od specifične površine inkorporiranih čestica srazmerno trećem korenu njihove zapremine:

$$(M_t - M_\infty)^{1/3} = k_{HC} t \quad (41)$$

gde je k_{HC} Hikson-Krovelova konstanta koja zavisi od odnosa površina/zapremina inkorporiranih nanočestica.

4. Kopča model opisuje mogućnost kvantifikacije doprinosa difuzije bioaktivne komponente i relaksacije polimernih lanaca:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = At^{1/2} + Bt \quad (42)$$

pri čemu su A i B konstante.

5. **Makoid-Banakar** farmakokinetički model rastvaranja:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{MB} t^n e^{-ct} \quad (43)$$

gde je k_{MB} Makoid-Banakarova konstanta.

Primenom Korsmejer-Pepasovog modela, određen je tip difuzije jona iz hidrogel nanokompozita i klasifikacija procesa oslobađanja bioaktivne komponente iz polimerne matrice (slika 22 (b)). Dobijene vrednosti Korsmejer-Pepasovog eksponenta ($n < 0,5$) za hg1-(NK2 i NK4-NK6) (tabela 6) ukazuju da se oslobađanje Ag^+ -jona odigrava prema mehanizmu Fikove difuzije. Visoke vrednosti koeficijenata korelacije ($R^2 = 0,85-0,99$) dobijene primenom Hinućijevog modela (slika 22 (c)), potvrđuju da se oslobađanje Ag^+ -jona odigrava prema mehanizmu Fikove difuzije. Hikson-Krovel model (slika 22 (d)) opisuje zavisnost brzine oslobađanja Ag^+ -jona od specifične površine Ag-nanočestica, a eksperimentalno dobijene vrednosti imaju visok koeficijent korelacije.

Tabela 6. Kinetički parametri dobijeni modelovanjem oslobađanja Ag^+ -jona.

Uzorak	Korsmejer-Pepas			Hinući		Hikson-Krovel	
	k_{KP} (%/s ⁿ)	n	R^2	k_H (%/s ^{1/2})	R^2	k_{HC} (%/s ^{1/3})	R^2
hg1-NK1	0,071	0,53	0,98	0,106	0,99	0,942	0,93
hg1-NK2	0,189	0,46	0,98	0,109	0,99	0,969	0,96
hg1-NK3	0,018	0,64	0,99	0,107	0,98	0,943	0,91
hg1-NK4	0,231	0,45	0,99	0,114	0,99	1,014	0,98
hg1-NK5	0,975	0,35	0,83	0,132	0,89	1,183	0,96
hg1-NK6	3,099	0,26	0,86	0,133	0,85	1,199	0,96

Uzorak	Kopča			Makoid-Banakar			
	A (%/s ^{1/2})	$B \times 10^5$ (%/s)	R^2	k_{MB} (%/s)	n	$c \times 10^7$	R^2
hg1-NK1	0,083	3,09	0,99	0,597	0,34	-6,22	0,99
hg1-NK2	0,104	0,68	0,99	1,899	0,25	-6,71	0,99
hg1-NK3	0,072	4,63	0,99	0,022	0,62	-0,55	0,99
hg1-NK4	0,123	-1,24	0,99	0,483	0,38	-2,20	0,99
hg1-NK5	0,222	-12,2	0,98	0,023	0,68	11,50	0,99
hg1-NK6	0,243	-14,8	0,99	0,245	0,49	7,71	0,99

Modeli koji najbolje opisuju kinetiku oslobađanja Ag^+ -jona (koeficijent korelacije ($R^2 = 0,99$)) su Kopča i Makoid-Banakar modeli (slika 22 (e) i (f) i tabela 6). Rezultate dobijene primenom prethodnih modela potvrđuje i Kopča model na osnovu kojeg je moguće izvršiti kvantifikaciju odnosa konstanti A i B , odn. doprinosa difuzije bioaktivne komponente i relaksacije polimernih lanaca.

Primenom Kopča modela, za sve ispitivane hidrogel nanokompozite, parametar A ima daleko veću vrednost u odnosu na parametar B , što ukazuje na činjenicu da je proces oslobađanja Ag^+ -jona iz Ag/PVA hidrogel nanokompozita difuziono kontrolisan (tabela 6) (Aydın et al., 2012; Khamanga et al., 2012). Takođe je primenom ovog modela pretpostavljeno da će sistemi kod kojih je razlika između vrednosti parametara A i B izražena (hg1-(NK4-NK6)) pokazati antimikrobnu efikasnost.

Poređenjem vrednosti Makoid-Banakar parametara n_{MB} za hidrogel nanokompozite hg1-(NK1-NK3) sa nižom koncentracijom Ag-nanočestica dobijeno je da hg1-NK2 ima najmanju vrednost, što ukazuje na brži porast Makoid-Banakar funkcije za sistem sa najmanjom veličinom Ag-nanočestica. Međutim, na osnovu prethodnog ispitivanja za ovaj sistem je pretpostavljeno da ne bi pokazao antibakterijska svojstva jer se koncentracija oslobođenih jona nalazi na donjoj granici MIK. Poređenjem vrednosti istog parametra za hidrogel nanokompozite hg1-(NK4-NK6) sa većom koncentracijom Ag-nanočestica dobijeno je da Makoid-Banakar parametar n_{MB} ima najmanju vrednost za hidrogel nanokompozit sa najvećim koeficijentom difuzije fluida hg1-NK4 (tabela 6) Kod ovih sistema je uticaj veličine čestica maskiran početnom koncentracijom Ag-nanočestica, te difuzija preuzima dominantan uticaj na brzinu oslobađanja bioaktivne komponente. Primenom ovog modela pretpostavljeno je da će sistemi za koje Makoid-Banakar parametri n_{MB} imaju malu vrednost (hg1-(NK4-NK6)) pokazati izraženiju antimikrobnu efikasnost. Oslobođene koncentracije Ag^+ -jona za (hg1-(NK4 i NK5)) su ispod granice MBK čime je omogućeno njihovo bezbedno korišćenje bez pojave citotoksicnog efekta.

S obzirom da je oslobađanje jona putem površinske oksidacije nanočestica mehanizam kojim se obezbeđuju antibakterijski Ag^+ -agensi, on zavisi kako od veličine i koncentracije Ag-nanočestica, tj njihove ukupne površine, kao rezervoara

antibakterijskih Ag^+ -jona, tako i od transportnih svojstava matrice koje određuju brzinu dotoka kiseonika potrebnog za površinsku oksidaciju.

Predviđanje efikasnosti ispitivanih sistema za biomedicinsku primenu.
Farmakokinetički modeli se pored određivanja faktora koji utiču na kinetiku oslobađanja bioaktivne komponente mogu primeniti i za predviđanje oslobađanja bioaktivne komponente u dužem vremenskom intervalu za različite primene u biomedicini. Osim primene za zarastanje rana, Ag/hidrogel nanokompoziti se mogu primeniti i kao ortopedski implantati (veštačke hrskavice ili veštački meniskus) (Kobayashi et al., 2010; Baker et al., 2012).

Iz literature je poznato da Ag^+ -joni pokazuju antibakterijsku aktivnost već pri koncentracijama 0,035 ppm, bez pojave citotoksičnih efekata na ćelije sisara (Hardes et al., 2007). Takođe većina autora sugeriše da koncentracije iznad 1,2 ppm ne pokazuju citotoksičan efekat na fibroblaste koji igraju značajnu ulogu u zarastanju rana (Jovanović et al., 2013), dok je maksimalna toksična koncentracija za ljudske ćelije oko 10 ppm (Jamuna-Thevi et al., 2011). Neki autori sugerišu da Ag^+ -joni indukuju apoptozu pri koncentracijama većim od 250 ppm (Jain et al., 2009). Ovi literaturni podaci su naročito značajni za optimizaciju stepena oslobođene koncentracije Ag^+ -jona iz Ag/PVA hidrogel nanokompozita u cilju dobijanja terapijske doze koja se ogleda u postizanju efikasnog antibakterijskog efekta bez pojave citotoksičnosti.

Za primenu Ag/PVA hidrogel nanokompozita kao antibakterijskih agenasa, moraju se uzeti u razmatranje i literaturni podaci antibakterijske efikasnosti Ag^+ -jona na standardne bakterijske kulture (*E. coli* i *S. aureus*) kao i većinu rezistentnih organizama. Ovi podaci ukazuju da se MIK za Ag^+ -jone nalazi u opsegu od 0,78-6,25 ppm, dok MBK iznosi oko 12,5 ppm (Jain et al., 2009).

U tabeli 7 prikazane su korelirane vrednosti kumulativno oslobođenih Ag^+ -jona po jediničnoj masi hidrogel nanokompozita ukoliko bi se oni koristili kao zavoji za zarastanje rana ili kao mekotivni implantati. U kliničkoj praksi antibakterijski zavoji za rane se menjaju najčešće u toku prve dve nedelje, na svakih 48 h ili 72 h (Li et al., 2010; Jamuna-Thevi et al., 2011). Koncentracija oslobođenih Ag^+ -jona, nakon 48 h, iz uzoraka hidrogel nanokompozita srednje mase ($m_{sr} = 0,0819$ g) (hg1-(NK1-NK3)) ulazi u opseg MIK, dok je za uzorke hidrogel nanokompozita iste

srednje mase hg1-(NK4-NK6) u oblasti MBK. Nakon 72 h svi ispitivani sistemi su pokazali MBK aktivnost. U skladu sa rezultatima oslobađanja, utvrđeno je da se hidrogel nanokompoziti hg1-(NK1-NK3) mogu bezbedno koristiti kao antibakterijski zavoji u trajanju od 15 dana. Iako uzorak hg1-NK4 ima značajno veću početnu koncentraciju Ag-nanočestica, mehanizam i nelinearna brzina oslobađanja Ag⁺-jona zadovoljava uslove bezbednog korišćenja kod zarastanja rana.

Farmakokinetičko modelovanje koncentracionih profila oslobođenih Ag⁺-jona u fiziološkim uslovima omogućilo je da se izvrši projektovanje materijala za primene u obliku zavoja za zarastanje rana ili mekotivnih implanata (meniskusa (*lat. meniscus articularis*)). Primenom Makoid-Banakar modela koji daje najbolje slaganje sa eksperimentalnim vrednostima izvršeno je projektovanje oslobađanja Ag⁺-jona iz Ag/PVA hidrogel nanokompozita u srednjoj zapremini sinovijalne tečnosti kolena od 3,048 ml (Kraus et al., 2007), posle 48 h, 72 h ukoliko bi se koristili kao antibakterijski zavoji za rane ili posle 2 h ukoliko bi se koristili kao mekotivni implantati (tabela 7).

Tabela 7. Korelacija između vrednosti kumulativno oslobođenih Ag⁺-jona po jediničnoj masi hidrogel nanokompozita za biomedicinsku primenu.

Uzorak	Kumulativno oslobođeni Ag ⁺ joni / masa hg-NK (ppm/g)		
	Antibakterijski zavoji za rane		Mekotivni implantati
	Posle 48 h	Posle 72 h	Posle 2 h
hg1-NK1	7,7	9,5	3,4
hg1-NK2	8,4	10,0	4,6
hg1-NK3	8,5	10,9	1,9
hg1-NK4	39,7	47,5	16,8
hg1-NK5	144,6	172,6	33,0
hg1-NK6	284,0	324,3	107,0

Dobijeni rezultati (Krstić et al., 2014b) ukazuju da bi količina oslobođenih Ag⁺-jona iz hidrogel nanokompozita hg1-(NK1-NK3) srednje mase ($m_{sr} = 0,0819$ g) u pomenutoj zapremini fluida, nakon potpune izmene kroz limfne sudove (oko 2 h i manje), bila dovoljna da održi post-operacionu sterilnost implanata ispod maksimalne

toksične koncentracije (oko 10 ppm) (Jamuna-Thevi et al., 2011). Ovakva analiza potencijalne primene sintetisanih nanosistema kao mekotkivnih implantata koji održavaju postoperativnu sterilnost do sada nije zabeležena u literaturi.

5.1.7. Antibakterijska aktivnost *in vitro* oslobođenih jona srebra iz Ag/PVA hidrogel nanokompozita

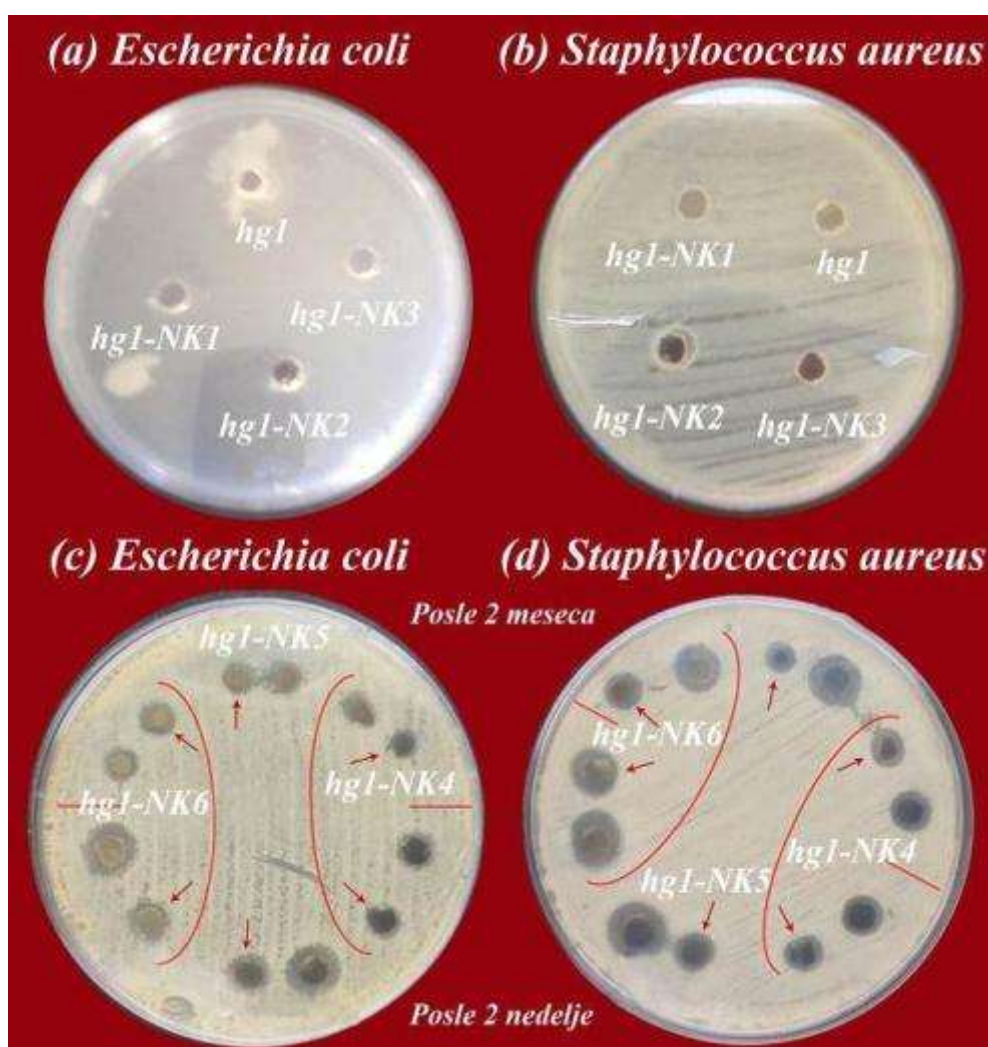
Antibakterijski potencijal Ag/PVA hidrogel nanokompozita je ispitan na gram-pozitivne *S. aureus* i gram-negativne *E. coli* bakterije (slika 23). Na slici 23 strelicama su označeni longitudinalno sečeni diskovi za koje je takođe dobijena antibakterijska aktivnost. U ovom slučaju nešto manje zone inhibicije potvrđuju pretpostavku da antibakterijska aktivnost zavisi i od početne mase hidrogel nanokompozita, te se za dobijanje potrebne terapijske doze mogu varirati oba parametra.

Dobijeni rezultati ukazuju da koncentracioni nivo i uslovi za postizanje antibakterijske aktivnosti nisu dobijeni u izvedenom ispitivanju u toku 24 h za hidrogel nanokompozite hg1-(NK1-NK3) sa nižom koncentracijom Ag-nanočestica u opsegu od $(6-12) \times 10^{-11}$ mol/cm³ koje u posmatranom vremenu oslobode koncentraciju Ag⁺-jona od 0,61-0,74 ppm. Antibakterijska aktivnost je dobijena za hidrogel nanokompozite hg1-(NK4-NK6) sa većom koncentracijom Ag-nanočestica u opsegu od $(110-419) \times 10^{-11}$ mol/cm³ koje u posmatranom vremenu oslobode koncentraciju Ag⁺-jona od 3,37-23,96 ppm. Za ove sisteme u obliku diskova prečnika 4 mm je zapažena pojava zona inhibicije na *E. coli* bakterije od oko 5 mm i nešto veća zona inhibicije na *S. aureus* bakterije od oko 8 mm. Promenom početne koncentracije Ag-nanočestica $(110-419) \times 10^{-11}$ mol/cm³ sa veličinom u opsegu od 6,5–8,5 nm dobijena je *in vitro* antibakterijska aktivnost na *S. aureus* i *E. coli* bakterije, u saglasnosti sa literaturom (G. Franci et al., 2015).

Skorija istraživanja antibakterijske efikasnosti Ag/PVA hidrogel nanokompozita sintetisanih γ -zračenjem (Swarrop et al., 2016) su pokazala veću zonu inhibicije na gram-negativne *E. coli* bakterije. Unapređenje Ag/PVA nanosistema u ovoj doktorskoj studiji je postignuto obezbeđivanjem veće brzine difuzije Ag⁺-jona kroz PVA hidrogel,

pa je bolja antibakterijska aktivnost postignuta na *S. aureus* bakterije. Ovo je veoma značajno posto su *S. Aureus* bakterije najčešći uzročnik infekcija kože. Takođe treba napomenuti da se kod ovih bakterija ćelijski zid sastoji iz debelog sloja peptidoglikana, pa je samim tim teže postići antibakterijsku efikasnost.

U cilju ispitivanja stabilnosti antibakterijskih hidrogel nanokompozita hg1-(NK4-NK6), test antibakterijske aktivnosti je urađen nakon starenja sistema u puferovanom rastvoru u trajanju od dve nedelje i dva meseca. Dobijeni rezultati su pokazali da i pored manjeg gubitka srebra ovi sistemi zadržavaju antibakterijska svojstva.



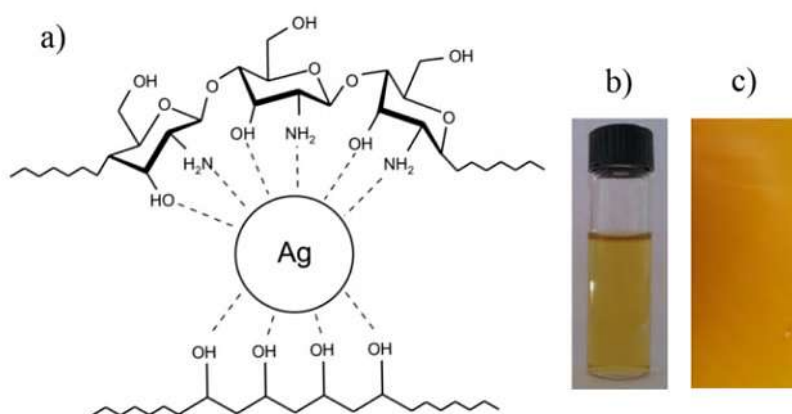
Slika 23. Test antibakterijske aktivnosti na bakterije: *E. coli* (a), (c) i *S. aureus* (b), (d).

Longitudinalno sečeni diskovi hidrogel nanokompozita su označeni strelicama.

Saglasno dobijenim rezultatima, utvrđeno je da se matematički modeli mogu rutinski primeniti kako bi potpomogli optimizaciju novih Ag/hidrogel nanokompozita u pogledu određivanja mase hidrogel nanokompozita i početne koncentracije Ag-nanočestica koje će zavisno od mehanizma oslobađanja ispoljiti antibakterijsku aktivnost u granicama terapijske doze bez pojave citotoksičnosti.

5.2. Sinteza i karakterizacija neumreženih blendi Ag/PVA/CS nanokompozita

U ovom delu rada su prikazani rezultati vezani za unapređenje Ag/PVA nanokompozita uvođenjem prirodnog polimera hitozana, CS, koji je rastvoran u kiseloj sredini. Ispitana je mogućnosti kontrolisanja veličine Ag-nanočestica neumreženim PVA/CS blendama u kojima je variran maseni odnos PVA i CS. Detaljna analiza veličina čestica je izvršena primenom ULj/Vid spektroskopije, modelovanjem dobijenih spektara primenom Mieve (*eng. Gustav Mie*) teorije kao i njene kvazi-statičke aproksimacije, i difrakcijom X-zračenja, a raspodela veličina čestica je dobijena skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Pretpostavlja se da su Ag-nanočestice u neumreženim PVA/CS polimernim blendama stabilisane elektrostatičkim interakcijama sa $-OH$ i $-NH_2$ funkcionalnim grupama ($Ag...OH$ i $Ag...NH_2$) (Elbarbary et al., 2016) (slika 24 (a)).



Slika 24. Stabilizacija Ag-nanočestica u neumreženoj polimernoj blendi PVA/CS (a), Ag/PVA/CS koloidni rastvor (b), Ag/PVA/CS nanokompozitni film (c).

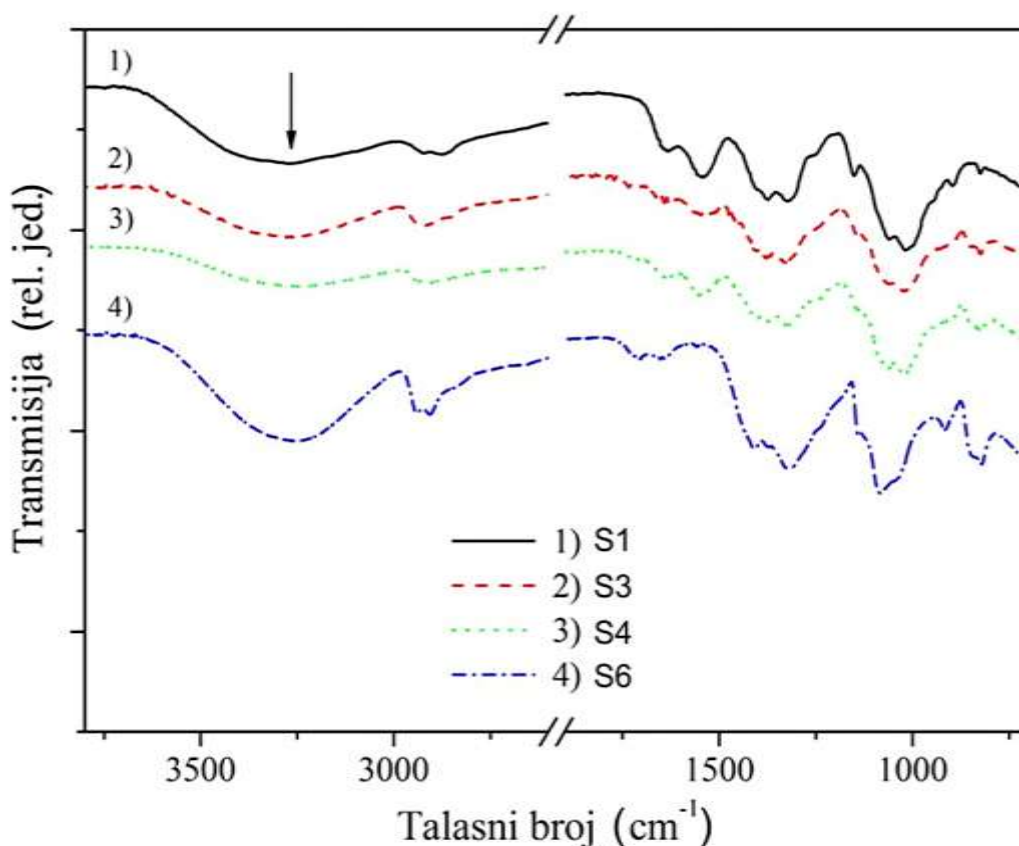
Radijaciono-hemijska sinteza Ag-nanočestica u prisustvu PVA/CS polimernog rastvora je omogućila da se ispita potencijal polimerne smeše za stabilizaciju Ag-nanočestica konstantne početne koncentracije AgNO_3 (5 mM), variranjem masenih odnosa PVA i CS (0/100 (S1); 20/80 (S2); 40/60 (S3); 60/40 (S4); 80/20 (S5) i 100/0 (S6)). Nakon izlaganja γ -zračenju do apsorbirane doze potrebne da se izvrši kompletna redukcija jona (8,5 kGy), dobijeni su transparentni Ag/PVA/CS koloidni rastvori intenzivno žute boje (slika 24 (b)). Treba napomenuti da je nakon uparavanja rastvarača zapaženo da su filmovi zadržali intenzivno žutu boju što je saglasno literaturi (Pacioni et al., 2005; Krklješ et al., 2009; Jovanović et al., 2011) ukazivalo da su Ag-nanočestice zadržale nanometarske dimenzije (slika 24 (c)).

5.2.1. Stabilizacija nanočestica srebra u PVA/CS blendama

Iz literature (Subbiah et al., 2010; Abedini et al., 2013) je poznato da je za finu kontrolu nanokristalne morfologije neophodno prisustvo funkcionalnih molekula koji putem hemijske ili fizičke interakcije održavaju čestice na rastojanjima koja su određena uspostavljenom ravnotežom između privlačnih Van der Valsovih (*eng. Van der Waals*), odbojnih sila elektrostatičke prirode i steričkih faktora. Funkcionalni molekuli (stabilizatori) stupaju u interakciju sa odgovarajućim kristalografskim ravnima, te zavisno od položaja atoma na površini nanočestica dolazi do formiranja različitih makroskopskih struktura.

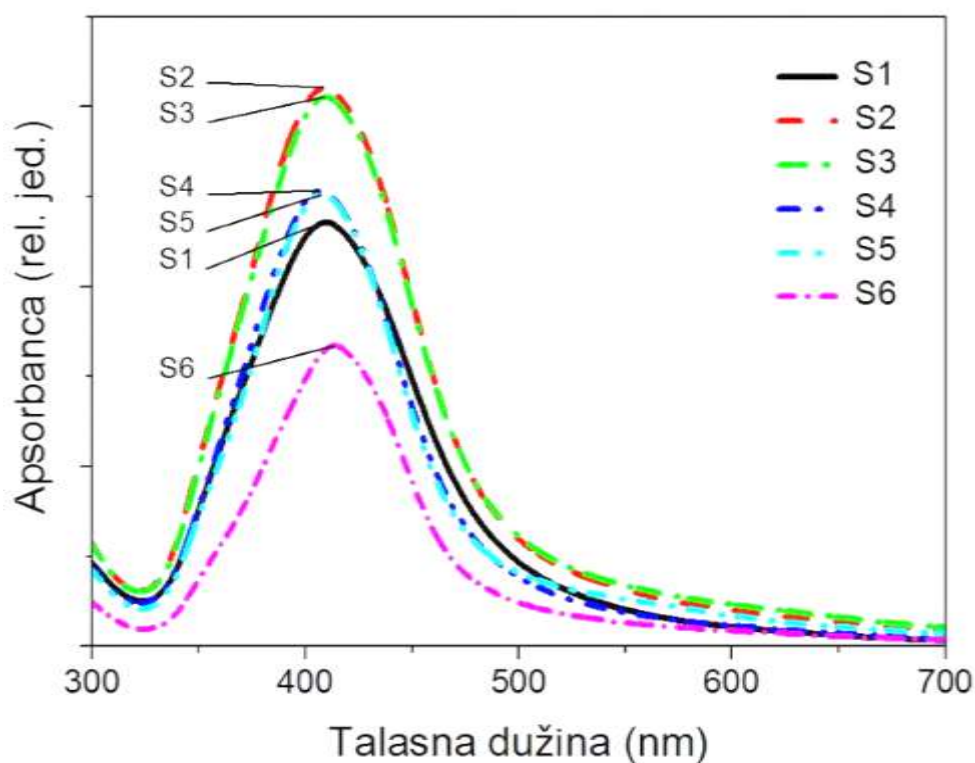
Interakcija polimernih molekula sa Ag-nanočesticama je ispitana na Ag/PVA/CS nanokompozitnim filmovima infracrvenom spektroskopijom sa Furijeovom transformacijom. FTIC spektri sistema u kojima je uparavanjem rastvarača favorizovana interakcija polimera i metalnih nanočestica su prikazani na slici 25. Za sve ispitivane sisteme, u infracrvenom spektru nije uočena pojava novih traka, što ukazuje da nije došlo do strukturnih promena polimerne blende nakon vezivanja Ag-nanočestica. U spektrima se zapažaju trake karakteristične za PVA i CS koje odgovaraju podacima iz literature (Qian et al., 2001; Mansur et al., 2008; Kumar et al., 2010). U oblasti od $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ trake koje potiču od CS: $3445\text{-}3455\text{ cm}^{-1}$ –OH istežuće vibracije u vodoničnoj vezi; $3380\text{-}3420\text{ cm}^{-1}$ intermolekulske OH...3 i CH_2OH vodonične veze;

3250-3260 cm^{-1} intermolekulske $\text{C}(2_1)\text{NH}\dots\text{O}=\text{C}(7_3)$ vodonične veze; 3140-3150 cm^{-1} intermolekulske $\text{C}(6_1)\text{OH}\dots\text{HOC}(6_2)$ vodonične veze; 3270-3290 cm^{-1} N–H istežuće vibracije. U istoj oblasti se nalazi i traka koja potiče od PVA: 3250 cm^{-1} istežuće vibracije –OH grupa vezanih vodoničnim vezama. Širenje apsorpcione trake u ovoj oblasti ukazuje da Ag-nanočestice dovode do delimičnog raskidanja vodoničnih veza tokom formiranja nanokompozita. S obzirom da je širenje posmatrane trake veće za sastav blende S4 u odnosu na S3, može se zaključiti da je interakcija polimera sa metalnim nanočesticama u tom slučaju intenzivnija. Na osnovu dobijenih spektara potvrđeno je da se sa povećanjem udela PVA u blendi postiže bolja stabilizacija Ag-nanočestica, kao i da stabilizacija nanočestica u najvećoj meri potiče od elektrostatičke Ag...OH interakcije (Krklješ et al., 2007c). Ovakva zapažanja su u skladu sa ranijim istraživanjima u kojima je utvrđeno da interakcija između polimernog stabilizatora i nanočestica raste sa smanjenjem dimenzija nanočestica (Krklješ et al., 2007b).



Slika 25. FTIC spektri Ag/PVA/CS različitog masenog udela PVA/CS blende.

Da bi se ispitano u kojoj meri maseni odnos PVA i CS utiče na veličinu Ag-nanočestica, pomoću ULj/Vid spektroskopske analize, primenom kvazi-statičke aproksimacije Mieove teorije, po analogiji sa Ag/PVA hidrogel nanokompozitom kao model sistemom (poglavlje 5.1.3., tabela 2), određena je veličina Ag-nanočestica i potencijal PVA/CS blende za njihovu stabilizaciju bez pojave aglomeracije. U ULj/Vid spektrima Ag/PVA/CS koloidnih rastvora (slika 26) uočena je intenzivna apsorpciona traka površinskog plazmona sa položajem maksimumima na oko 410 nm koja prema literaturi (Pacioni et al., 2005; Krklješ et al., 2009; Jovanović et al., 2011) potiče od Ag-nanočestica sfernog oblika. U tabeli 8 prikazane su dobijene vrednosti poluprečnika Ag-nanočestica, r , srednji broj atoma, N_{av} , gustina nanočestica, ρ_{Ag} , njihova molarna koncentracija, C , i efektivna specifična površina, $S.A.$. Na osnovu dobijenih vrednosti poluprečnika Ag-nanočestica može se zaključiti da su manje čestice dobijene u slučaju kada je maseni udeo PVA veći od 50%, te se veličina Ag-nanočestica može kontrolisati promenom masenog odnosa PVA i CS.



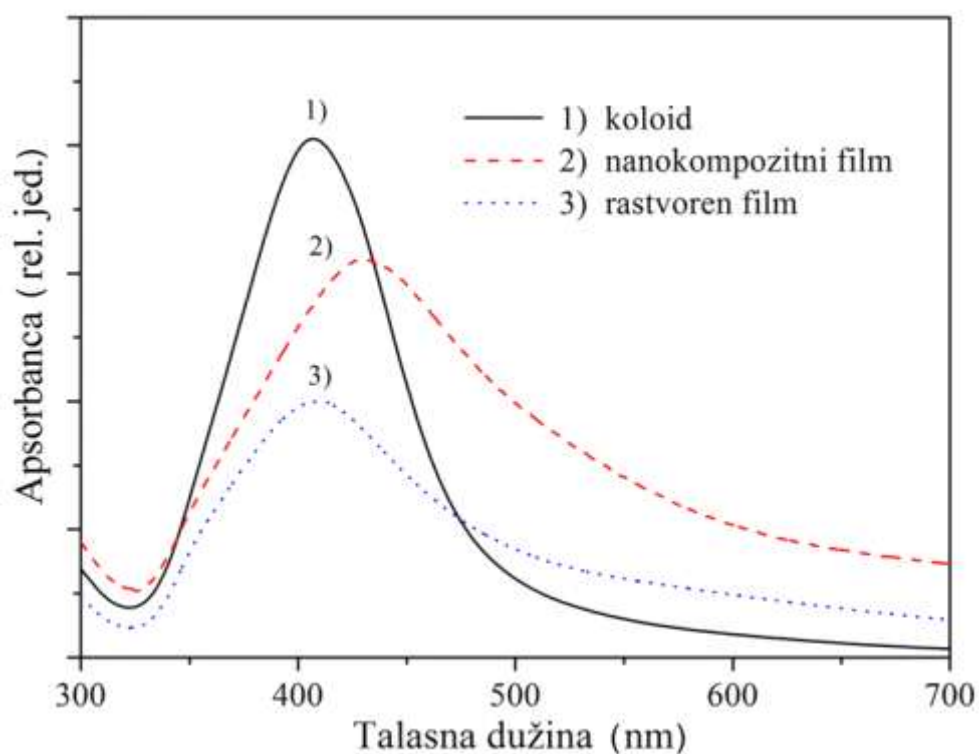
Slika 26. ULj/Vid apsorpcioni spektri Ag/PVA/CS koloidnih rastvora.

Tabela 8. Vrednosti parametara Ag-nanočestica stabilisanih PVA/CS blendama: poluprečnik, r , srednji broj atoma, N_{av} , gustina nanočestica, ρ , molarna koncentracija u koloidu, C , i teorijska efektivna specifična površina, $S.A.$.

Uzorak	$FWHM$ (nm)	r (nm)	N_{av}	$\rho \times 10^{-12}$ (nanočestica/cm ³)	$C \times 10^9$ (mol/dm ³)	$S.A.$ (m ² /g)
S1	91,3	6,7	74961	4,0	6,7	42,4
S2	91,2	6,7	74666	4,0	6,7	42,4
S3	90,8	6,7	73858	4,1	6,8	42,6
S4	83,8	6,2	58024	5,2	8,6	46,2
S5	80,1	5,9	50694	5,9	9,9	48,3
S6	74,8	5,5	41203	7,3	12,1	51,8

U literaturi je poznato da položaj, intenzitet i širina trake površinskog plazmona metalnih nanočestica zavise od velikog broja faktora: veličine i oblika nanočestica, njihove površinske strukture, dielektrične konstante metala i sredine u kojoj su čestice dispergovane, indeksa refrakcije i dr. (Pacioni et al., 2005; Krklješ et al., 2009; Jovanović et al., 2011). U slučaju čvrstih kompozita, čestice se mogu naći na međusobnim rastojanjima pri kojima njihova interakcija više nije zanemarljiva. Međusobna interakcija bliskih čestica menja optička svojstva nanočestičnih kompozitnih filmova, što se u ULj/Vid spektru manifestuje batohromnim pomerajem maksimuma apsorpcije. Uticaj međusobne interakcija nanočestica na optička svojstva kompozita može se objasniti Maksvel-Garnetovom (eng. *Maxwell-Garnett*) teorijom. Prema ovoj teoriji, kompozit se posmatra kao homogen materijal u kojem su nanočestice izolovane jedna od druge dielektričnim slojem.

Da bi se ispitalo da li i u kojoj meri promene indeksa refrakcije i dielektrične konstante sredine utiču na stabilizaciju Ag-nanočestica u PVA/CS blendama, snimljeni su ULj/Vid apsorpcioni spektri koloidnih rastvora, filmova dobijenih uparavanjem rastvarača i filmova rastvorenih u vodi (slika 27).



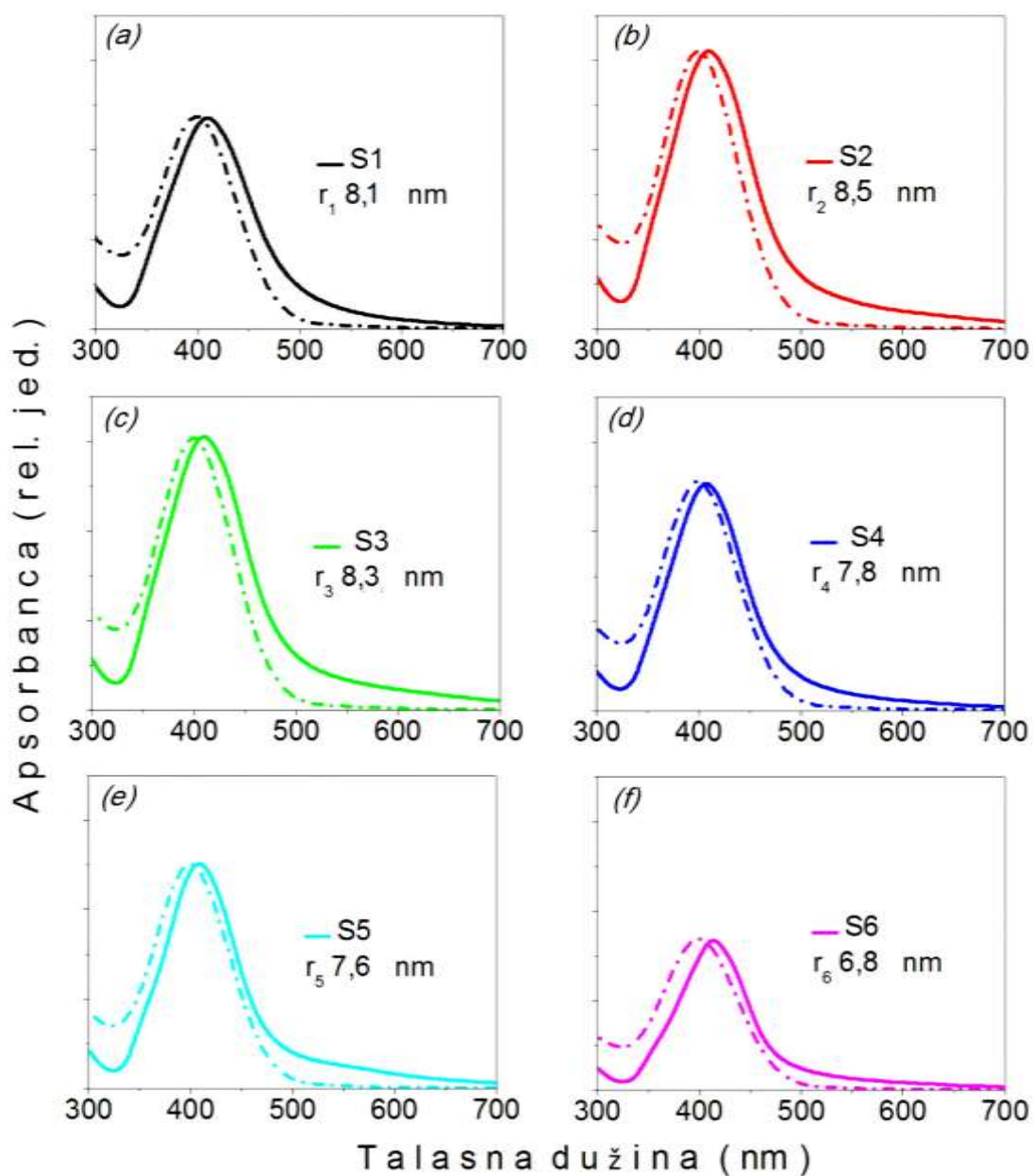
Slika 27. U $_{Lj}$ /Vid apsorpcioni spektri nanokompozita (S3): koloidnog rastvora, nanokompozitnog filma i koloidnog rastvora nakon rastvaranja nanokompozita.

U U $_{Lj}$ /Vid apsorpcionim spektrima, za sve ispitivane sisteme je uočen batohromni pomeraj apsorpcionih maksimuma koji je u literaturi opisan kao posledica promene dielektrične konstante sredine u kojoj su čestice dispergovane (Krklješ et al, 2007c). Takođe, povećanje indeksa refrakcije sredine direktno utiče na pomeranje položaja maksimuma ka većim talasnim dužinama (Krklješ et al, 2007c). U slučaju koloidnog rastvora, Ag-nanočestice su dispergovane u vodi ($n_{H_2O} = 1,33$), dok su nakon uparavanja rastvarača čestice dispergovane u polimernom filmu PVA/CS ($n_{PVA} = 1,53$; $n_{CS} = 1,55$). Nakon rastvaranja filma u vodi položaji apsorpcionih maksimuma se vraćaju na približno istu vrednost od oko 410 nm, što potvrđuje činjenicu da nije došlo do povećanja dimenzija Ag-nanočestica i njihovog spajanja u veće aglomerate (Pacioni et al., 2005; Krklješ et al, 2007c; Krklješ et al., 2009; Jovanović et al., 2011). Treba napomenuti da je u ovom delu istraživanja zapaženo povećanje rastvorljivosti CS u vodi primenom γ -zračenja, kao što je poznato iz literature

(Qin et al., 2006). Nadalje će u ovoj doktorskoj disertaciji biti ispitana mogućnost unapređenja antibakterijskih svojstava CS u fiziološkim uslovima γ -zračenjem.

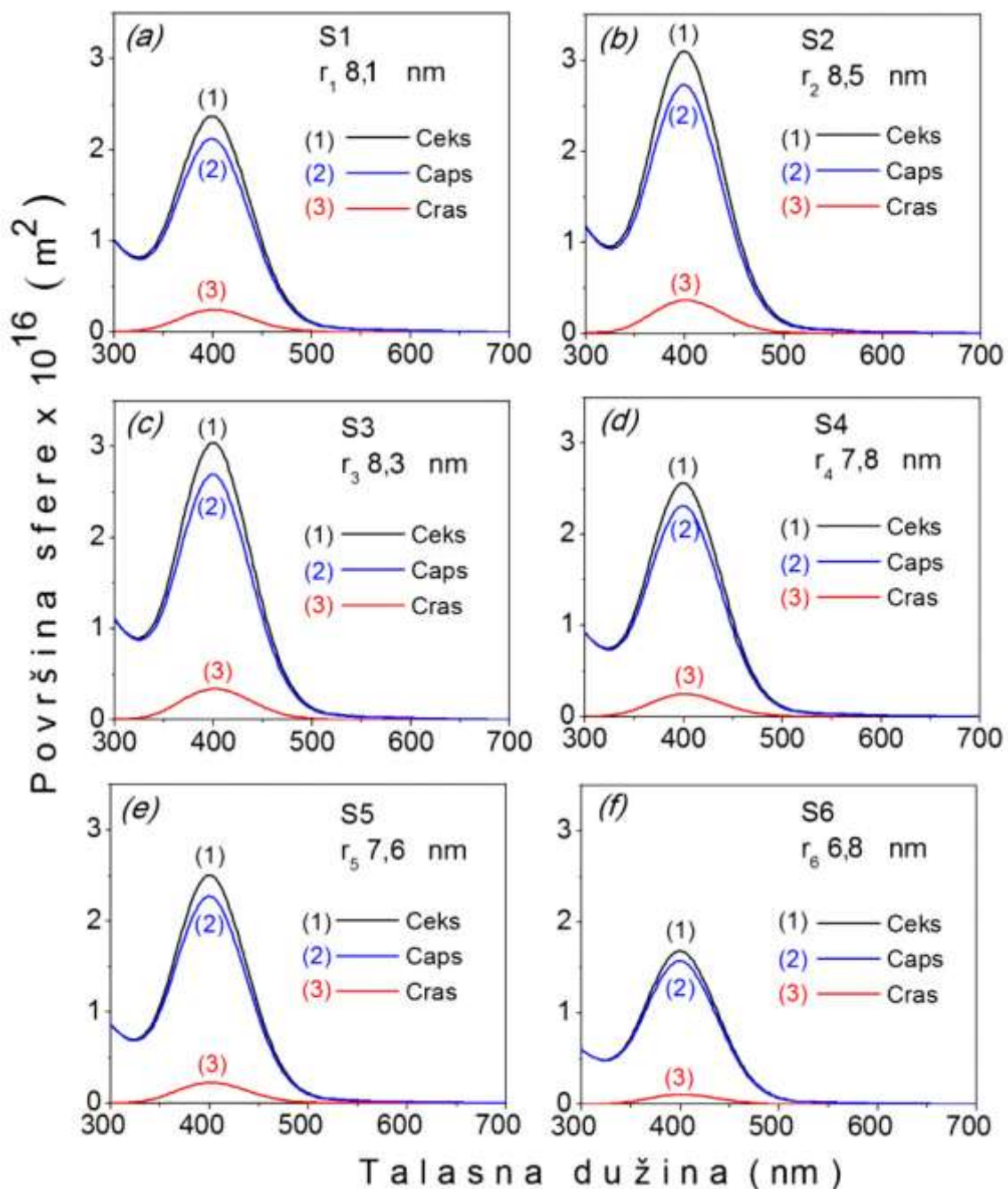
Provera stabilnosti ovih sistema u dužem vremenskom periodu ispitana je ULj/Vid apsorpcionom spektroskopijom. Dobijeni rezultati su pokazali da su sintetisane Ag-nanočestice stabilne u vremenskom periodu do 9 meseci, što nedvosmisleno ukazuje da Ag-nanočestice do ovog perioda ne podležu procesu aglomeracije.

U literaturi (Jawalkar et al., 2007) je pokazano da je kompatibilnost PVA/CS blende veća u sistemima sa udelom PVA manjim od 50 %. Verovatno je nešto bolja povezanost konstituenata blende u slučaju veće kompatibilnosti prouzrokovala slabiju stabilizaciju Ag-nanočestica u toku sinteze i veću aglomeraciju klastera. Uzimajući u obzir izračunate vrednosti za poluprečnik Ag-nanočestica, odgovarajući teorijski optički ekstinkcioni spektri su izračunati korišćenjem računskog programa "MiePlot v.3.4" (<http://www.philiplaven.com/mieplot.htm>, preuzeto oktobra 2015.), čiji je algoritam baziran na Mievoj teoriji apsorpcije i rasejanja svetlosti sa sfernih nanočestica koje međusobno ne interaguju. Na slici 28 su uporedno prikazani eksperimentalno dobijeni (puna linija) i simulirani (isprekidana linija) optički ekstinkcioni spektri za koje je postignuto najbolje slaganje. Na spektrima su dati i poluprečnici Ag-nanočestica izračunati iz simulacija, korišćenjem Mievog modela, kao provera rezultata dobijenih njegovom kvazi-statičkom aproksimacijom (tabela 8). Generalno, prikazani spektri pokazuju dobro slaganje između eksperimenata i teorije, pri čemu je bolje slaganje postignuto za nešto veće čestice. Crveni pomeraj ka većim talasnim dužinama tj. manjim energijama eksperimentalnih u odnosu na teorijske spektre (Peña et al., 2006) (veličina pomeraja od 7 do 15 nm), su najverovatnije posledica rasta koncentracije tj. gustine nanočestica (ρ) sa smanjenjem dimenzija čestica, od $4,02 \cdot 10^{12}$ nanočestica/cm³ za čestice u nanokompozitu S1 ($r = 6,7$ nm) do $7,31 \cdot 10^{12}$ nanočestica/cm³ za čestice u naokompozitu S6 ($r = 5,5$ nm) (tabela 8). Na pomeranje položaja apsorpcionih maksimuma mogu da utiču i promene atomskih parametara u slučaju kada se dimenzije čestica smanjuju na nanometarske veličine, koje u ovim proračunima nisu uzete u razmatranje. Osim toga, proračuni bazirani na Mievoj teoriji zavise kako od poluprečnika čestica i njihovih atomskih parametara tako i od indeksa refrakcije matrice i promene dielektrične konstante sredine u kojoj su čestice dispergovane (Peña et al., 2006).



Slika 28. Eksperimentalno dobijeni (puna linija) i simulirani (isprekidana linija) apsorpcioni spektri Ag/PVA/CS koloidnih rastvora.

Iako je za vrlo male čestice apsorpcija znatno veća u odnosu na rasejanje, na osnovu dobijenih rezultata simulacije prikazanih na slici 29 se vidi kako rasejanje raste sa porastom dimenzija čestica i povećava koeficijent ekstinkcije, C_{eks} .

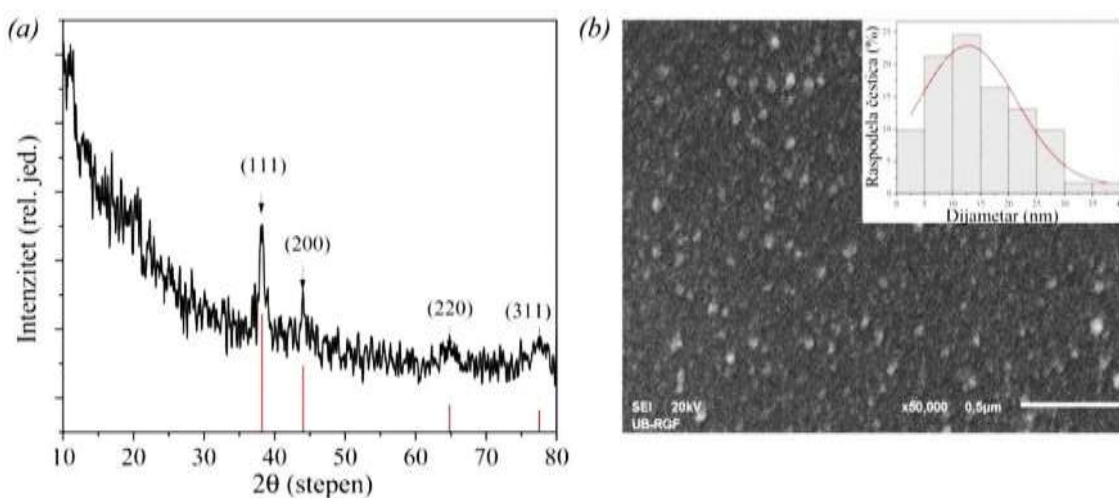


Slika 29. Udeo apsorpcije (plava linija) i rasejanja (crvena linija) na simuliranim optičkim ekstinkcionim spektrima Ag/PVA/CS koloidnih rastvora.

Rendgenskom analizom Ag/PVA/CS nanokompozita, dobijeni difraktogram za uzorak S4 prikazan je na slici 30 (a). Maksimumi difrakcije na vrednostima ugla 2θ od 38° ; $44,2^\circ$; $64,4^\circ$ i $77,6^\circ$ odgovaraju Bragovim refleksijama sa kristalnih ravni (111), (200), (220) i (311), a karakteristika su površinski centrirane kubne kristalne strukture

Ag (baza podataka JCPDS kartica br. 04-0783). Širina na poluvisini najintenzivnijeg pika (111) ($FWHM = 0,72^\circ$) ukazuje da su veličine domena uredenosti kristalita srebra nanometarskih dimenzija. Na osnovu Šererove formule dobijena veličina kristalnih domena od 11,7 nm je u saglasnosti sa srednjom vrednošću poluprečnika Ag-nanočestica dobijenih analizom apsorpcionih ULj/Vid spektara (Krstić et al., 2014a). Konstanta rešetke, a izračunata za međuravansko rastojanje d_{111} na osnovu jednačine (20) ($a = 0,4079$ nm) je u saglasnosti sa literaturnom vrednošću $a_{lit} = 0,4086$ nm (Huang et al., 2009).

Morfološka svojstva Ag/PVA/CS nanokompozita ispitana su metodom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM). Mikrograf Ag/PVA/CS nanokompozita S4 i dobijeni histogram raspodele veličina Ag-nanočestica prikazani su na slici 30 (b). Sintetisane Ag-nanočestice imaju približno sferni oblik sa prosečnom veličinom od oko 13 nm (veličina dobijena oduzimanjem sloja zlata od 15 nm) (Krstić et al., 2014a).



Slika 30. Difraktogram X-zračenja (a) i SEM mikrograf (b) S4 nanokompozita.

Dobijeni rezultati ukazuju da su Ag-nanočestice sfernog oblika, sa površinski centriranom kubnom rešetkom prečnika ($2r = 11-14$ nm) tj. da su u tzv. unutrašnjem opsegu dimenzija ispod 20 nm (Peña et al., 2006; Veenas et al., 2009).

5.3. Optimizacija antibakterijskih svojstava hidrogel nanokompozita

Nakon uspešne sinteze Ag-nanočestica stabilisanih PVA/CS blendama, sledeći korak u istraživanju imao je za cilj ispitivanje mogućnosti radijaciono-hemijske sinteze Ag/PVA/CS hidrogel nanokompozita γ -zračenjem. El-Salmawi i saradnici (El-Salmawi et al., 2007) ukazuju da PVA/CS gelovi stepena bubrenja do 60 %, sintetisani γ -zračenjem imaju antibakterijska svojstva. Rezultati pokazuju da se gel frakcija povećava sa porastom koncentracije PVA i doze zračenja.

Kako bi se ispitala mogućnost umrežavanja PVA/CS hidrogelova γ -zračenjem, napravljeni su različiti maseni odnosi PVA i CS (0/100; 3/97; 5/95; 7/93 i 10/90). Umrežavanje ispitivanih sistema je postignuto u određenoj meri usled prisustva PVA, međutim mehanička svojstva koja su preduslov za njihovu predviđenu antibakterijsku primenu nisu bila zadovoljavajuća, te je ovakav tip sistema isključen iz daljeg istraživanja.

U ovom delu istraživanja krajnji cilj je bio unapređenje antibakterijskih svojstava Ag/PVA hidrogel nanokompozita uvođenjem vodorastvornog derivata CS koji je dobijen redukovanjem molarne mase CS radijaciono-hemijskom metodom, zato što CS rastvoran u kiseloj sredini nije dao zadovoljavajuće rezultate u procesu radijaciono-hemijskog umrežavanja.

Iz literature (Qin et al., 2006; Kong et al., 2010) je poznato da CS pokazuje antibakterijsko dejstvo samo u kiseloj sredini, što se obično pripisuje slaboj rastvorljivosti hitozana na visokom pH vrednostima. CS na niskim pH vrednostima, zavisno od molarne mase ubrzava zarastanje rana (80 kDa), sprečava progresiju dijabetesa (20 kDa) i pokazuje antibakterijsku aktivnost (5-10 kDa) (Pasanphan et al., 2010). Do sada je u literaturi antibakterijsko delovanje oligomera uglavnom ispitivano u kiseloj sredini, a samo je nekoliko radova objavljeno na temu korelacije rastvorljivosti CS u vodi i antimikrobne aktivnosti. Teorijska predviđanja jake interakcije između mikrobioloških proteina i CS na niskim pH vrednostima se uglavnom ne podudaraju sa eksperimentalnim ispitivanjima u literaturi. Naime, Strand je eksperimentalno pokazao da se adsorpcija hitozana na ćelije *E. coli* bakterija povećava sa porastom pH vrednosti. Iako poseduju nisku gustinu naelektrisanja,

polimerni lanci hitozana sa nižim stepenom deacetilacije se u većoj meri adsorbuju i efikasno menjaju površinsko naelektrisanje ćelija. Hitozan sa niskom molarnom masom se adsorbuje u većoj meri (Strand et al., 2003). Međutim, mnogi rezultati istraživanja pokazuju da oligomeri hitozana imaju slabo ili uopšte ne pokazuju antimikrobno dejstvo iako se dobro rastvaraju u vodi. S druge strane, zahtevi biomedicinske primene su okrenuti ka sintezi hitozana rastvornog pri fiziološkoj pH vrednosti u ćeliji, dovoljno velike molarne mase da spreči transport esencijalnih supstanci i time destabilizuje ćelijski zid bakterija, uzrokujući curenje sastojaka i na kraju ćelijsku smrt (Kim et al., 2011).

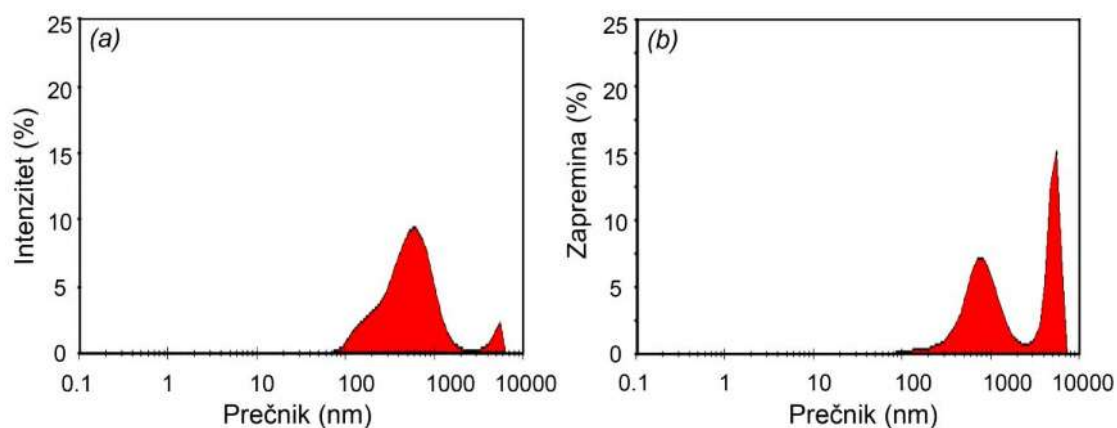
5.3.1. Radijaciono-hemijska modifikacija hitozana

Radijaciono-hemijska modifikacija CS pod uticajem γ -zračenja izvedena je izlaganjem rastvora CS u sirćetnoj kiselini γ -zračenju pri apsorbovanoj dozi od 100 kGy (Ulanski et al., 2000). Da bi se ispitala promena molarne mase CS, dobijeni vodeni rastvor CS u sirćetnoj kiselini je analiziran metodom rasejanja svetlosti (Schatz et al., 2003; Zainol et al., 2009), pre i posle ozračivanja. Na osnovu rezultata optičke heterogenosti rastvora, prvo je isptana srednja vrednost molarne mase polaznog CS za koji je bilo poznato da ima nisku molarnu masu i stepen deacetilacije 75-85 %. Potom su ispitane i srednje vrednosti molarnih masa CS nakon ozračivanja i nakon neutralizacije sa natrijum-hidroksidom. U tabeli 9 su prikazane izmerene srednje vrednosti molarnih masa, M_w , i virijalnih koeficijenata, A_2 , sa greškama merenja, kao i vrednosti srednjih prečnika, Z_{sr} , i koeficijenata korelacije, R^2 . Dobijeno je da je nakon ozračivanja molarna masa CS od (95 ± 9) kDa redukovana na (22 ± 1) kDa. Optimalna svojstva za primenu su dobijena neutralizacijom rastvora CS natrijum hidroksidom nakon ozračivanja.

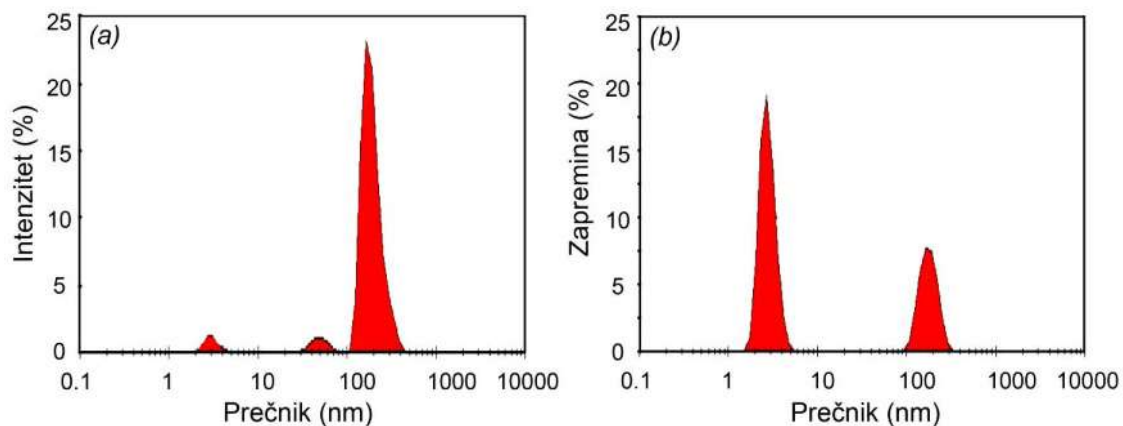
Tabela 9. Eksperimentalno dobijene vrednosti molarne mase, M_w , i drugi virijalni koeficijent, A_2 , sa greškama merenja, vrednost srednjeg prečnika, Z_{sr} , i koeficijent korelacije, R^2 .

Uzorak	Z_{sr} (nm)	M_w (kDa)	ΔM_w (kDa)	A_2 (ml×mol/g)	ΔA_2 (ml×mol/g)	R^2
CS	426	95	9	0,00129	0,00044	0,745
vr-CS	246	22	1	0,00540	0,00112	0,959

Razmatranjem literature koja se bavi uticajem γ -zračenja na degradaciju CS, može se zaključiti da je potencijalni mehanizam degradacije baziran na raskidanju glukozidne veze osnovnog lanca polisaharida koja je praćena Majarovom reakcijom sa produktima braon boje (Ulanski et al., 2000; Szymańska et al., 2015). Naime, CS u svojoj strukturi poseduje amino grupe ($-\text{NH}_2$) koje pod uticajem γ -zračenja mogu reagovati sa karbonilnim grupama ($\text{C}=\text{O}$) redukujućih šećera nastalim u toku procesa ozračivanja, a koje dovode do formiranja niskomolarnih produkata Majarove reakcije koji doprinose povećanju njegove rastvorljivosti u vodi i antibakterijske aktivnosti. Dobijeni proizvod je istovremeno čist i sterilisan, bez prisustva toksičnih hemikalija koje je teško ukloniti iz sistema (Pasanphan et al., 2010). Da bi se ispitaio pretpostavljeni mehanizam degradacije, izvršena je karakterizacija raspodele veličina čestica pre i posle modifikacije CS γ -zračenjem (slika 31 i 32, redom), po intenzitetu i po zapremini ((a) i (b), redom).



Slika 31. Raspodela veličina čestica CS po intenzitetu (a) i po zapremini (b).



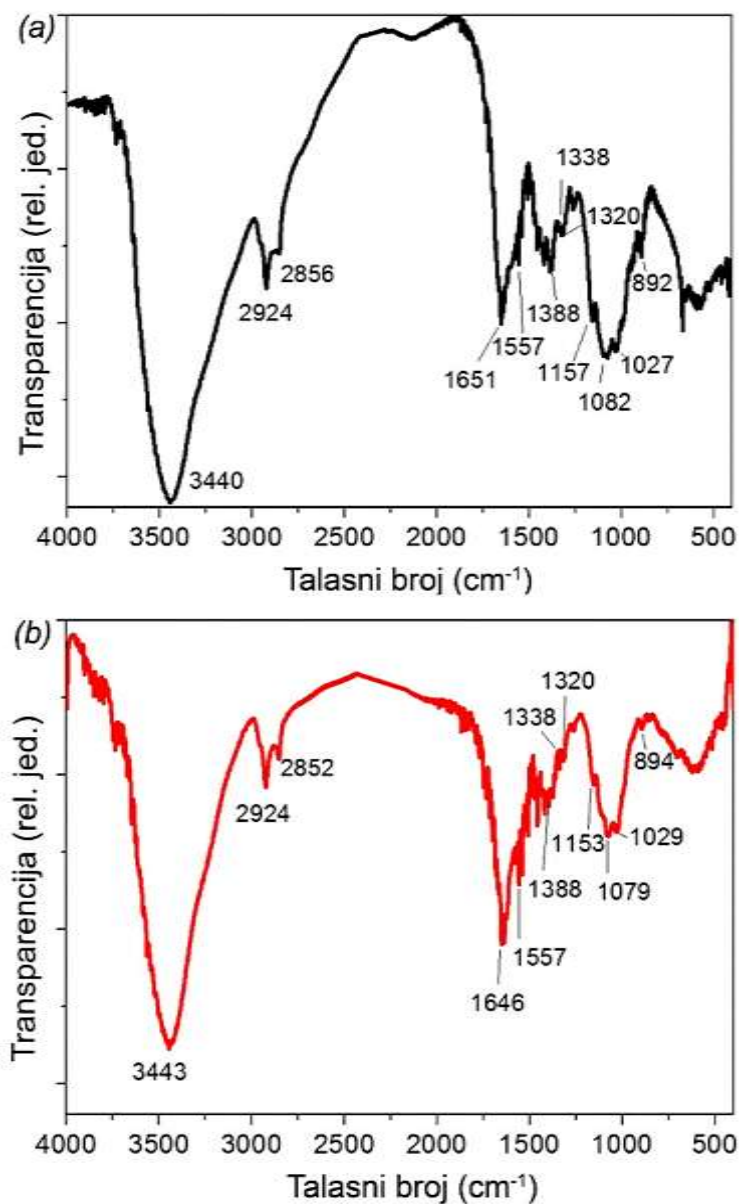
Slika 32. Raspodela veličina čestica vr-CS po intenzitetu (a) i po zapremini (b).

Analizom dobijenih intenziteta raspodele veličina čestica nakon degradacije γ -zračenjem, pokazano je da je u najvećoj meri došlo do degradacije polimernih lanaca kidanjem glukozidne veze sa srednjom veličinom lanca iznad 100 nm, a manjim delom i do odigravanja Majarove reakcije i formiranja niskomolarnih derivata CS sa česticama ispod 100 nm. Dobijene vrednosti A_2 kod radijaciono modifikovanog vr-CS su pozitivne, što potvrđuje da čestice imaju veći afinitet prema rastvaraču, te nastoje da ostanu u obliku stabilnog rastvora u vodi bez taloženja (Schatz et al., 2003).

Raspodela veličina čestica po zapremini ($\sim 4/3\pi r^3$) (slike 31 (b) i 32 (b)) je pogodnija za posmatranje polidisperznih sistema. U slučaju vodorastvornog derivata CS, na osnovu dijagrama raspodele po zapremini uočava se veći udeo čestica prečnika $2r < 10$ nm, dok su u slučaju vodonerastvornog CS sve čestice > 100 nm. Zbog velike vrednosti indeksa polidisperznosti ispitivanih sistema ($IP \sim 0,5$), određivanje raspodele molarnih masa primenom parametara Mark-Houwnik-Sakurada (eng. *Mark-Houwink-Sakurada*) jednačine na dijagram raspodele veličina čestica daje izuzetno složenu zavisnost, te nije dalje razmatrana (Taşkin et al., 2014).

Kako bi se ispitalo u kojoj meri modifikacija CS pod uticajem apsorbovane doze γ -zračenja od 100 kGy utiče na njegova strukturna svojstva, urađena je infracrvena spektroskopska analiza CS pre i posle modifikacije (slika 33 (a) i (b)), redom. U infracrvenim spektrima nemodifikovanog i modifikovanog CS zapaža se karakteristična traka na oko 3440 cm^{-1} koja potiče od vibracija $-\text{OH}$ grupa na ugljenikovim atomima C3-OH i C6-CH₂OH, kao i jakih inter- i intramolekulskih interakcija. Pojava širenja

trake na oko 3260–3270 cm^{-1} potiče od vibracija –NH grupa i njihovog kuplovanja sa –OH grupama. Trake na oko 2924 i 2856 cm^{-1} potiču od simetričnih i asimetričnih vibracija –CH₂ grupa u prstenu polisaharida, redom (Gullón et al., 2016; Modrzejewska et al., 2009).



Slika 33. FTIC spektri: CS (a) i vr-CS (b).

Poređenjem oba spektra jasno se uočava da je pomeranje trake sa 1651 cm^{-1} ka manjoj vrednosti talasnog broja na oko 1646 cm^{-1} , a koja potiče od primarne amino grupe, praćeno suženjem pika što ukazuje da je došlo do formiranja karbonilne ili karboksilne grupe kod radijaciono degradiranog CS (Kang et al., 2007). Uzimajući u razmatranje literaturne podatke karakterističnih traka koje se javljaju kod radijaciono degradiranog CS (Kang et al., 2007), kao posledica odigravanja Majarove reakcije, prisustvo trake na 1646 cm^{-1} potvrđuje pobuđivanje C=N vibracija Šifove baze (*eng. Schiff*) (Gullón et al., 2016). Ova traka se preklapa sa trakama koje nastaju pobuđivanjem primarne amino i C=O grupe. Amino grupe CS se tokom odigravanja Majarove reakcije delimično raskidaju, pri čemu dolazi do formiranja sekundarnih i tercijernih amina. Širenje trake na 1557 cm^{-1} se može pripisati formiranju sekundarnih amina ili amidne II grupe. Traka na 1388 cm^{-1} potiče od metil grupe tj. C-CH₃ deformacije u amidnoj grupi (Modrzejewska et al., 2009; Gullón et al., 2016).

Raskidanje glukozidne veze tokom degradacije osnovnog lanca polisaharida se može pratiti razmatranjem traka na 1157 cm^{-1} i 1082 cm^{-1} koje potiču od rigidne strukture polisaharida, uključujući vibracije glukozidne veze, C–O i C–O–C asimetričnog istezanja. Takođe, trake na 1082 cm^{-1} i 1027 cm^{-1} potiču od C–C i C–O skeletnih vibracija karakterističnih za polisaharide. Iako se intenziteti ovih traka smanjuju, njihovo prisustvo ukazuje da se degradacija CS γ -zračenjem u najvećoj meri bazira na raskidanju glukozidnih veza, pri čemu monomerne jedinice ostaju nepromenjene. Literaturni podaci ukazuju da pri interakciji polisaharida CS sa D-glukozamin-oligosaharidima (GlcN) dolazi do promene položaja i širine ovih traka (sužavanje i pomeranje trake na 1082 cm^{-1} i posledično pomeranje trake na 1029 cm^{-1} (koje odgovara C–O istezanju). Traka na 892 cm^{-1} se odnosi na β -D-konfiguraciju CS (Umemura et al., 2008; Yue et al., 2014).

5.3.2. Sinteza Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogelova

Iako je iz literature (Mathews et al., 2008; Chmielewski et al., 2010) poznato da je pod dejstvom γ -zračenja moguće izvršiti modifikaciju CS u cilju poboljšanja njegovih svojstava za biomedicinsku primenu, do sada je objavljen mali broj radova u kojima su

rađena ispitivanja vezana za sintezu metalnih nanočestica u hidrogelovima na bazi vr-CS za biomedicinsku primenu.

U cilju ispitivanja mogućnosti dobijanja hidrogela sa unapređenim antibakterijskim svojstvima za biomedicinsku primenu, najpre se pristupilo sintezi PVA/vr-CS hidrogelova sa različitim masenim udelima vr-CS. Nakon ozračivanja pripremljenih rastvora γ -zračenjem, primenom post-radijacionog postupka zamrzavanja/odmrzavanja sa 4 uzastopna ciklusa (2 h na temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 1 h na temperaturi $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) dobijene su trodimenzione nabubrene mreže hidrogelova (slika 34).



Slika 34. Fotografije PVA/vr-CS-Z/O hidrogelova: (a) hg1-Z/O i (b) hg2-Z/O.

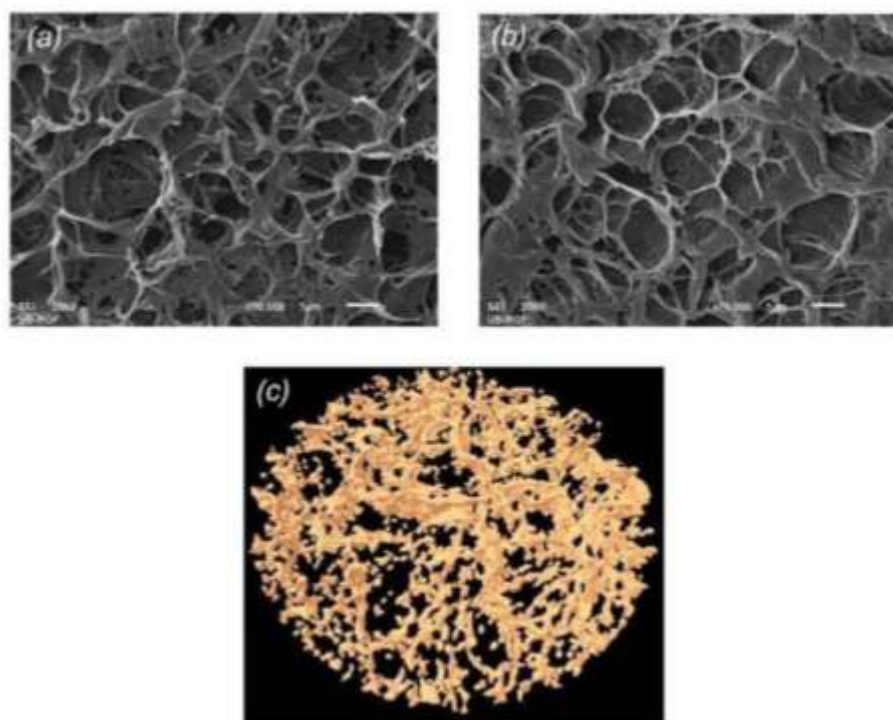
Nakon ekstrakcije hidrogelova u vodi u trajanju od 7 dana na sobnoj temperaturi uz svakodnevnu izmenu vode, maseni udeli gelova su ispitivani gravimetrijskom metodom primenom jednačine (21) (tabela 10).

Tabela 10. Vrednosti masenog udela gela PVA/vr-CS-Z/O hidrogelova.

Uzorak	Udeo gela (%)	
	2 dana	5 dana
	ekstrakcije ekstrakcije	
hg0-Z/O	94	94
hg1-Z/O	54	52
hg2-Z/O	55	53

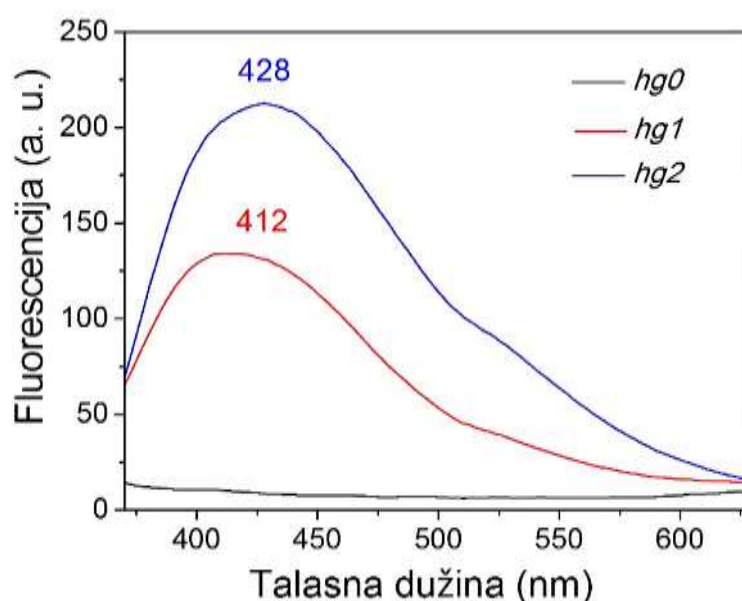
Na osnovu dobijenih rezultata, zapaženo je da sa uvođenjem vr-CS dolazi do smanjenja udela gela sa 94 % na 52 %, pri čemu sa povećanjem masenog udela vr-CS dolazi do neznatnog povećanja udela gela saglasno literaturi (Nho et al., 2001).

Nadalje je ispitana porozna morfologija PVA/vr-CS-Z/O liofiliziranih gelova skenirajućom elektronskom mikroskopijom i rendgenskom 3D mikro-kompjuterizovanom tomografijom (slika 35). Na slici 35 (a) i (b) prikazani su reprezentativni SEM mikrografi PVA/vr-CS, sa mikrometarskom veličinom pora, dok je na slici 35 (c) prikazana reprezentativna 3D rekonstrukcija porozne strukture hg2-Z/O. Rendgenska 3D mikro-kompjuterizovana tomografija daje uvid u promenu poroznosti gelova i veličine pora. Zapaženo je da poroznost opada sa porastom masenog udela vr-CS sa 98 % na 89 %, dok veličina pora ulazi u opseg od 2-27 μm . Na osnovu dobijenih rezultata potvrđena je pretpostavka od koje se pošlo, da je modifikacija CS do vodorastvornog derivata vr-CS omogućila sintezu trodimenzione polimerne mreže hidrogela.



Slika 35. SEM (a) hg1-Z/O i (b) hg2-Z/O i (c) XR 3D μ -KT hg2-Z/O mikrografi.

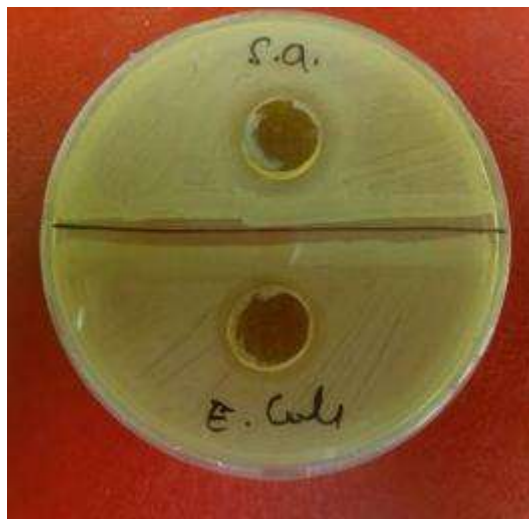
Iz literature (Mostafavi et al., 2008; Yang et al., 2008) je poznato da pod dejstvom γ -zračenja u vodenom rastvoru polimera najpre dolazi do stvaranja primarnih produkata radiolize vode koji svoju radikalsku aktivnost prenose na polimerne radikale, koji se nadalje zavisno od njihove pokretljivosti rekombinuju na različite načine formirajući hemijske ili fizičke veze. Kada je reč o sinergijskom efektu γ -zračenja i post-radijacionom postupku zamrzavanja/odmrzavanja, može se reći da delom dolazi do formiranja hemijskih veza između polimernih molekula, a delom se vrši dodatno umrežavanje povezivanjem vodoničnim vezama. Kako bi se ispitala stabilnost sintetisanih hidrogelova, fluorescentnom spektroskopijom je praćeno prisustvo vr-CS (Xu et al., 2010; Rao et al., 2011) nakon ekstrakcije neumreženih polimernih molekula. Na fluorescentnim spektrima (slika 36) je zapaženo da sa povećanjem masenog udela vr-CS dolazi do povećanja intenziteta emisije karakterističnih fluorofora i pomeranja položaja maksimuma ka većim talasnim dužinama od 412 nm na 428 nm usled različite gustine amidnih i amino grupa (Meunier et al., 2002) duž polimernog lanca.



Slika 36. Fluorescentna emisija vr-CS u PVA/vr-CS-Z/O hidrogelovima.

Nakon što je ustanovljeno da su sintetisani hidrogelovi stabilni, pristupljeno je analizi antibakterijskih svojstava. Test antibakterijske aktivnosti prikazan na slici 37 pokazuje da hg2-Z/O hidrogel, oblika diska prečnika 12 mm, ima zonu inhibicije od oko

18 mm na *E. coli* i *S. aureus* bakterije tj. blagu antibakterijsku aktivnost. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da biokompatibilni i ekološki prihvatljivi radiolitički produkti vode mogu da izvrše ne samo modifikaciju hitozana već i sintezu antibakterijskih hidrogelova za biomedicinsku primenu. Treba naglasiti da ovakav rezultat do sada nije zabeležen u literaturi.

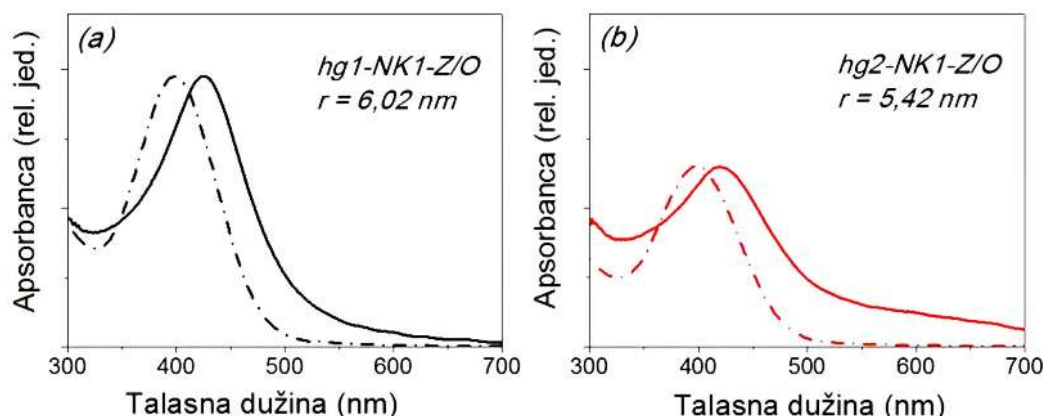


Slika 37. Test antibakterijske aktivnosti na bakterije: *E. coli* i *S. aureus* za hg2-Z/O.

Nakon uspešne sinteze antibakterijskih PVA/vr-CS-Z/O hidrogelova, pristupilo se sintezi Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita. PVA/vr-CS-Z/O hidrogelovi su ostavljeni da bubre 48 h u smeši rastvora AgNO_3 (iste početne koncentracije od 8 mM) i 2-propanola (0,2 M). Nakon dostizanja ravnoteže, nabubreni hidrogelovi su izloženi dejstvu γ -zračenja do apsorbovane doze potrebne da se izvrši kompletna redukcija Ag^+ -jona (14 kGy). Po završetku procesa ozračivanja, dobijeni su Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompoziti tamno braon boje.

5.3.3. Određivanje veličine nanočestica srebra ispitivanjem optičkih svojstava Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita

Da bi se ispitaio uticaj povećanja masenog udela vr-CS u PVA/vr-CS-Z/O hidrogelu na stabilizaciju i mogućnost kontrolisanja veličine Ag-nanočestica bez pojave aglomeracija, sintetisani hidrogelovi su analizirani ULj/Vid spektroskopijom. Na slici 38 prikazani su dobijeni ULj/Vid apsorpcioni spektri Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita. U spektrima se zapaža pojava apsorpcione trake površinskog plazmona srebra na oko 410 nm što saglasno literaturi (Pacioni et al., 2005; Krklješ et al., 2009; Jovanović et al., 2011) ukazuje da su dobijene Ag-nanočestice sfernog oblika. Za određivanje njihove veličine pomoću ULj/Vid spektroskopije primenjena je teorijska simulacija optičkih ekstinkcionih spektara pomoću programa "MiePlot v.3.4" (<http://www.philiplaven.com/mieplot.htm>, preuzeto oktobra 2015.) i dobijanja najboljeg poklapanja računski dobijenih spektara (isprekidane linije) sa eksperimentalnim spektrima (pune linije). Dobijene srednje veličine poluprečnika ukazuju da su PVA/vr-CS-Z/O hidrogelovi dobri stabilizatori i u slučaju dvostrukog povećanja masenog udela vr-CS. Za procenu uticaja udela vr-CS na stabilizaciju čestica, srednje vrednosti poluprečnika Ag-nanočestica su izračunate i primenom kvazi-statičke aproksimacije Mieve teorije koja je adekvatnija jer primena vrednosti širine na poluvisni, *FWHM*, eksperimentalno dobijenih spektara po analogiji sa Ag/PVA model sistemom (poglavlje 5.1.3., tabela 2) ima bolju osetljivost za proračun veličina čestica (Peña et al., 2006; Veenas et al., 2009). Dobijene srednje vrednosti poluprečnika prikazane su u tabeli 11. Može se zaključiti da su manje nanočestice dobijene u hidrogelu sa manjim masenim udelom vr-CS. Ovi rezultati su u saglasnosti sa diskutovanim rezultatima za neumrežene blende Ag/PVA/CS nanokompozita da bolja kompatibilnost polimerne blende dovodi do formiranja većih čestica (Jawalkar et al., 2007). Takođe treba napomenuti da sa smanjenjem veličine Ag-nanočestica dolazi do povećanja njihove molarne koncentracije, specifične površine i rastvorljivosti (tabela 11).

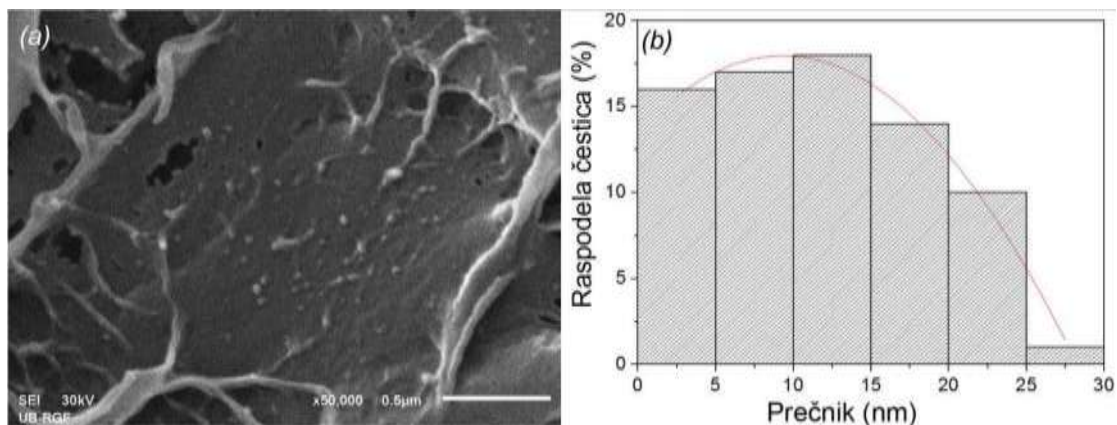


Slika 38. ULj/Vid spektri Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita: (a) hg1-NK1-Z/O, (c) hg2-NK1-Z/O.

Tabela 11. Vrednosti masene koncentracije, C_{AAS} , širine apsorpcione trake na poluvisini, $FWHM$, poluprečnika, r , molarne koncentracije, C_{hg-NK} , specifične površine, $S.A.$, i rastvorljivosti, S_r , Ag-nanočestica u PVA/vr-CS hidrogelu.

Uzorak	$C_{AAS} \times 10^6$ (g/cm^3)	$FWHM$ (nm)	r (nm)	$C_{hg-NK} \times 10^{11}$ (mol/cm^3)	$S.A.$ (m^2/g)	S_r (mg/cm^3)
hg1-NK1-Z/O	846,9	78,8	5,8	16,3	49,2	37,5
hg1-NK2-Z/O	1036,2	87,2	6,4	14,7	44,4	32,6

U cilju određivanja veličine čestica, ispitana je morfologija Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM). Reprezentativni SEM mikrograf i histogram raspodele veličina čestica za hg1-NK1-Z/O, prikazani su na slici 39 (a) i (b), redom. Dobijeni rezultati potvrđuju da su sintetisane Ag-nanočestice sfernog oblika, pri čemu su najzastupljenije čestice sa srednjom vrednošću prečnika oko 10 nm.



Slika 39. SEM mikrograf hidrogel nanokompozita (a) i odgovarajući histogram raspodele veličina čestica (b) za hgl-NK1-Z/O.

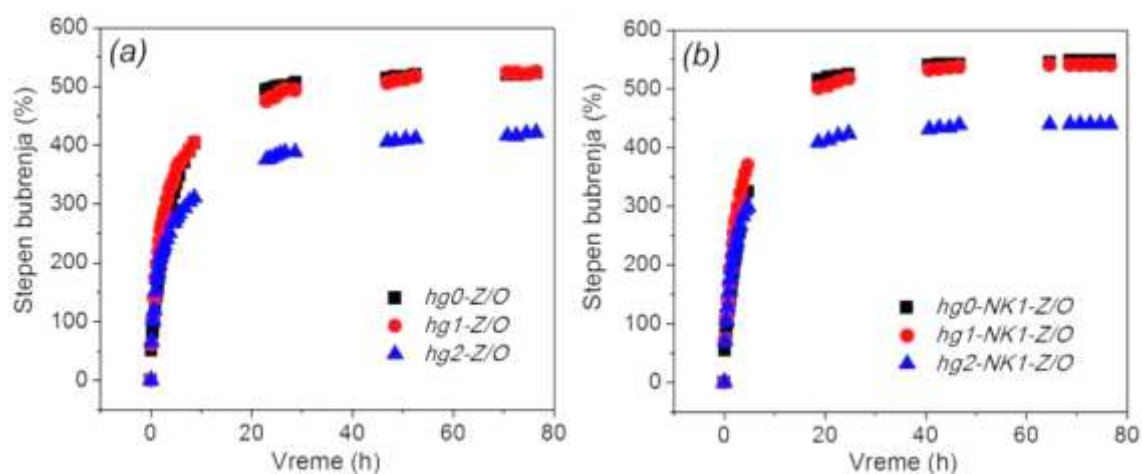
5.3.4. Kinetički aspekti i difuzioni modeli procesa bubrenja PVA/vr-CS-Z/O hidrogelova i Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita u fiziološkim uslovima

Da bi Ag/hidrogel nanokompoziti imali što efikasnija svojstva za biomedicinsku primenu, neophodno je ispitati uticaj vr-CS na bubrenje hidrogelova i hidrogel nanokompozita u fiziološkom fluidu, kao i uticaj post-radijacionih ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja. U tom smislu, optimizacija sastava i strukture hidrogel nanokompozita podrazumeva da se maksimalnim smanjenjem koncentracije Ag-nanočestica, smanjenjem njihove veličine, zajedno sa povećanjem udela antibakterijskog biopolimera u hidrogel nanokompozitu postigne veći kapacitet bubrenja u odnosu na prethodno sintetisane Ag/PVA model sisteme.

Do sada u literaturi postoji samo jedan podatak o radijacio-hemijskoj sintezi hidrogelova koji sadrže vr-CS praćenju postupkom zamrzavanja/odmrzavanja. Nho i saradnici (Nho et al., 2001) su ispitivali apsorpciona svojstva PVA/PVP/vr-CS hidrogelova u vodi. Pokazano je da stepen bubrenja njihovih hidrogelova opada sa povećanjem doze zračenja od 25-70 kGy i sa povećanjem broja ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja od 1-4. Iako bi ovi rezultati mogli da ukažu na ponašanje njihovih hidrogelova u fiziološkim uslovima, neophodno je ispitati proces bubrenja u fiziološkim uslovima, u slučaju biomedicinske primene. Naime, za razliku od

razmatranja bubrenja u vodi, simuliranje fizioloških uslova uključuje razmatranje doprinosa negativnih jona prisutnih u simuliranoj telesnoj tečnosti, koji usled odbojnih sila doprinose drugačijoj sorpciji fluida u odnosu na sorpciju vode. Ispitivanje procesa bubrenja PVA/vr-CS-Z/O hidrogelova i Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita značajna za primenu u biomedicini nisu do sada zabeležena u literaturi.

U ovom delu istraživanja, ispitana je kinetika bubrenja PVA/vr-CS hidrogelova i Ag/PVA/vr-CS hidrogel nanokompozita u SBF-u, na temperaturi (37 ± 1) °C. Masa fluida apsorbovana kserogelom praćena je u vremenskom periodu od ~ 80 h (slika 40 (a) i (b)), za koje je predviđeno da budu u kontaktu sa fiziološkim fluidom.

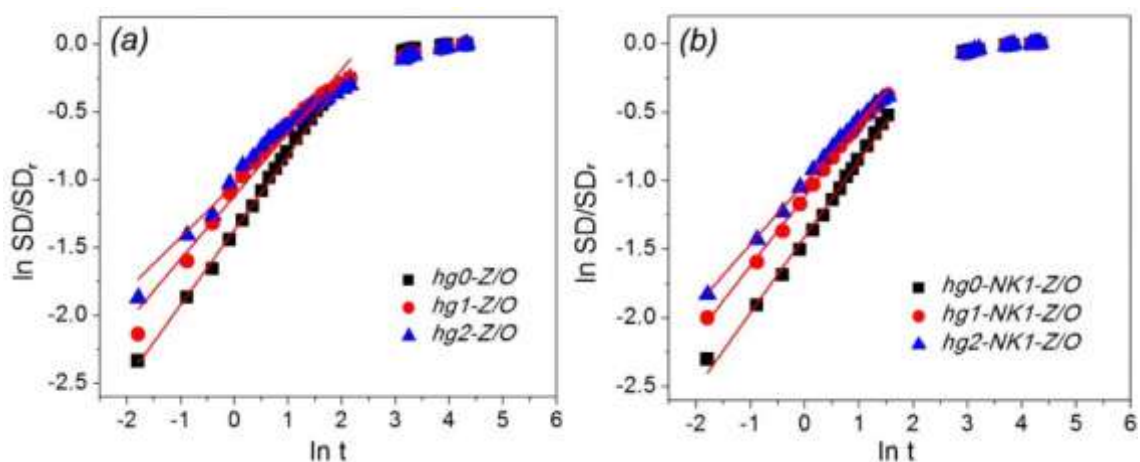


Slika 40. Krive bubrenja u SBF-u na 37 °C (a) PVA/vr-CS-Z/O hidrogela i (b) Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita.

Ravnotežni stepen bubrenja hidrogelova opada sa povećanjem masenog udela vr-CS što je verovatno posledica manje poroznosti hg2-Z/O u odnosu na hg1-Z/O za oko 10 %. Nadalje, uvođenjem Ag-nanočestica zapaženo je da niske molarne koncentracije Ag-nanočestica u opsegu od $(15 \text{ i } 16) \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^3$ dovode do povećanja ravnotežnog stepena bubrenja. Naime, dobijene vrednosti ravnotežnog stepena bubrenja hidrogel nanokompozita (hg1-hg2)-NK1-Z/O su u poređenju sa hidrogelovima (hg1-hg2) veće za oko 5 % usled prisustva male količine rastvorenih Ag^+ -jona. Doprinos ovog istraživanja je očigledan ukoliko se ovi rezultati uporede sa prethodno sintetisanim Ag/PVA model sistemima (hg1-(NK4-NK6)) koji su pokazali antibakterijsku aktivnost. Stepenn bubrenja

je kod hidrogel naokompozita sa većim udelom biopolimera i koncentracijom Ag-nanočestica (15×10^{-11} mol/cm³) (tabela 11) i pored post-radijacionih ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja čak četiri puta veći nego kog Ag/PVA model sistema, za hidrogel nanokompozit sa najvećom koncentracijom Ag-nanočestica (110×10^{-11} mol/cm³) (tabela 2). Antibakterijski sistemi sa boljim sorpcionim svojstvima su bolji za bimedcinsku praksu razmatranu u ovoj doktorskoj disertaciji, pa ovaj sistem predstavlja unapređenje u odnosu na pomenuti model sistem. Naime, izloženost manjih koncentracija nanočestica većoj količini fluida obezbeđuje njihovu bolju biodostupnost i veću sorpciju eksudata iz rana.

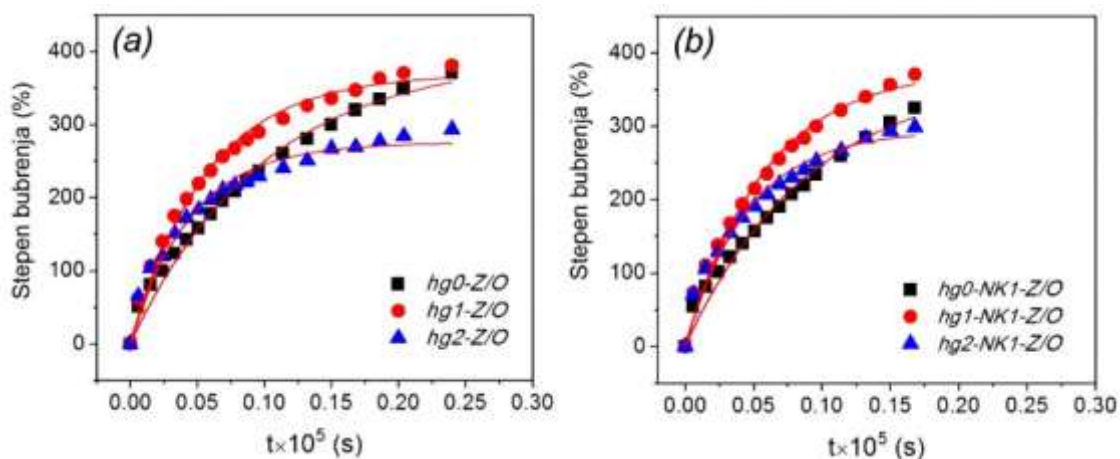
Teorijske vredosti ravnotežnog stepena bubrenja (tabela 12) dobijene su primenom stepenog modela na krive bubrenja u *SBF*-u na 37 °C, u inicijalnom stupnju bubrenja ($SD/SD_r \leq 60$ %) (slika 41), a zatim i primenom modela reakcije prvog ($0 \leq SD/SD_r \leq 100$ %) (slika 42) i drugog reda ($0 \leq SD/SD_r \leq 100$ %) (slika 43).



Slika 41. *Primena stepenog modela na krive bubrenja u SBF-u na 37°C:*
 (a) *PVA/vr-CS-Z/O hidrogelova* (b) *Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita.*

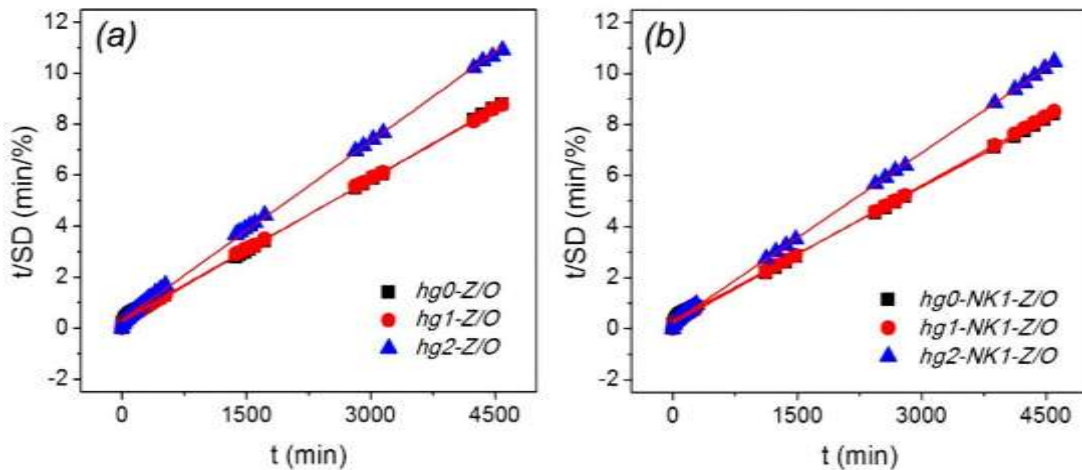
Detaljnija analiza kinetike bubrenja primenom modela reakcije prvog reda (slika 42) ukazuje da sa uvođenjem vr-CS, vrednosti konstante k (tabela 12) opadaju zbog manje poroznosti sistema sa vr-CS. Uvođenjem Ag-nanočestica vrednosti konstante k rastu, pri čemu ovi rezultati ukazuju na činjenicu da se kod hidrogel nanokompozita energija γ -zračenja većim delom troši na redukciju Ag⁺-jona, i

verovatno delimično na umrežavanje polimernih lanaca PVA/vr-CS unutar mreže, pri čemu je ovaj efekat još izraženiji zbog primene postupka zamrzavanja/odmrzavanja. Za ispitivane sisteme sa vr-CS, uočeno je da za odgovarajuće parove hidrogelova i hidrogel nanokompozita, uvođenje Ag-nanočestica povećava vrednost parametra n (tabela 12) i samim tim dovodi do promene mehanizma procesa bubrenja u početnom stupnju od Fikove ka ne-Fikovoj difuziji fluida.



Slika 42. Primena modela reakcije prvog reda na krive bubrenja u SBF-u na 37°C: (a) PVA/vr-CS-Z/O hidrogelova (b) Ag/PVA/vr-CS hg-Z/O hidrogel nanokompozita.

Kinetika bubrenja u dužem vremenskom intervalu ostaje nepromenjena i odigrava se po zakonu reakcije drugog reda. S druge strane, jednake vrednosti konstante k za odgovarajuće parove hidrogelova i hidrogel nanokompozita dobijene primenom Pepasovog modela ukazuju da se energija γ -zračenja kod ovih sistema najvećim delom troši na proces redukcije Ag^+ -jona. Vrednosti konstante k za (hg2 i hg2-NK1)-Z/O su manje u poređenju sa (hg1 i hg1-NK1)-Z/O, verovatno zbog različite poroznosti.



Slika 43. *Primena modela reakcije drugog reda na krive bubrenja u SBF-u na 37 °C: (a) PVA/vr-CS-Z/O hidrogelova (b) Ag/PVA/vr-CS hg-Z/O hidrogel nanokompozita.*

Difuzioni koeficijenti hidrogelova i hidrogel nanokompozita su dobijeni primenom tri aproksimacije Fikovog zakona (za $SD/SD_r \leq 60\%$, $SD/SD_r \geq 60\%$ i $0 \leq SD/SD_r \leq 100\%$) (tabela 13). Na slici 44 prikazano je modelovanje difuzije SBF-a, pri čemu su u razmatranje uzete eksperimentalno dobijene vrednosti duž celog vremenskog intervala (Eter model, $0 \leq SD/SD_r \leq 100\%$) u kojem je praćen proces bubrenja.

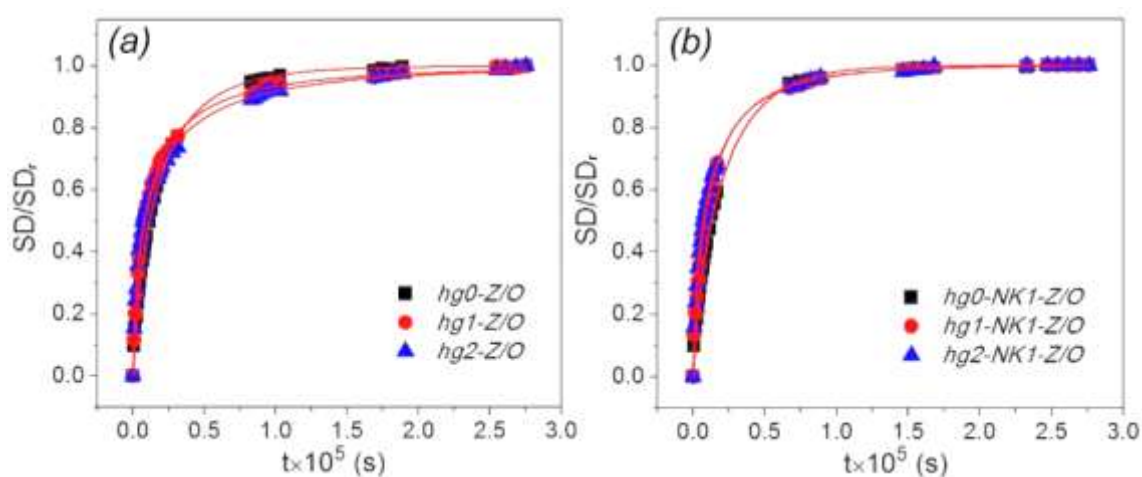
Primenom sve tri aproksimacije difuzije medijuma zapaža se da je prisustvo vr-CS u matrici kao i post-radijacioni postupak zamrzavanja/odmrzavanja doveo do umanjnja difuzionih koeficijenata za red veličine u poređenju sa Ag/PVA model sistemima, iako je bilo očekivano da budu veći s obzirom da je udeo gela posmatranih sistema za 37 % manji (tabela 10).

Vrednosti difuzionih koeficijenata fluida rastu sa uvođenjem vr-CS, dok se sa uvođenjem Ag-nanočestica u ove sisteme oni umanjuju (tabela 13). Difuzija fluida za celokupni posmatrani vremenski interval bubrenja ($0 \leq SD/SD_r \leq 100\%$) daje najbolje slaganje sa eksperimentalnim vrednostima ($R^2 = 0,99$). Primenom sve tri aproksimacije Fikovog zakona na hidrogel nanokompozite sa vr-CS (Ag/PVA/vr-CS-Z/O) veća vrednost difuzionog koeficijenta dobijena je za hg1-NK1-Z/O sa manjom veličinom Ag-nanočestica.

Tabela 12. Vrednosti ravnotežnog stepena bubrenja, SD_r , kinetičke konstante, k , i difuzionog eksponenta, n , dobijene primenom tri kinetička modela.

Uzorak	SD_r^{eksp} (%)	Pepasov model			Model I-reda		
		k ($1/h^n$)	n	R^2	$SD_r^{rač}$ (%)	$k_{P-R} \times 10^5$ ($1/s$)	R^2
hg0-Z/O	523	0,554	0,55	0,99	275	4,67	0,99
hg1-Z/O	525	0,508	0,47	0,97	393	4,49	0,93
hg2-Z/O	421	0,448	0,39	0,97	369	3,85	0,89
hg0-NK1-Z/O	548	0,554	0,56	0,99	295	5,01	0,99
hg1-NK1-Z/O	540	0,508	0,57	0,99	370	6,56	0,97
hg2-NK1-Z/O	440	0,448	0,54	0,99	379	6,38	0,95

Uzorak	Model II-reda		
	$SD_r^{rač}$ (%)	v_0 (%/min)	R^2
hg0-Z/O	543	3,16	0,99
hg1-Z/O	538	4,03	0,99
hg2-Z/O	429	3,11	0,99
hg0-NK1-Z/O	571	3,15	0,99
hg1-NK1-Z/O	556	4,70	0,99
hg2-NK1-Z/O	450	4,22	0,99



Slika 44. Primena Eter modela na krive bubrenja u SBF-u na 37°C: (a) PVA/vr-CS-Z/O hidrogelove i (b) Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozite.

Tabela 13. Difuzioni koeficijenti SBF-a dobijeni primenom tri aproksimacije Fikovog zakona.

Uzorak	$SD/SD_r \leq 60 \%$		$SD/SD_r \geq 60 \%$		$0 \leq SD/SD_r \leq 100 \%$	
	$D \times 10^8$ (cm^2/s)	R^2	$D \times 10^8$ (cm^2/s)	R^2	$D \times 10^7$ (cm^2/s)	R^2
hg0-Z/O	9,63	0,99	9,54	0,99	5,66	0,99
hg1-Z/O	14,45	0,99	10,85	0,90	9,89	0,99
hg2-Z/O	14,50	0,98	9,37	0,87	6,44	0,99
hg0-NK1-Z/O	9,63	0,99	8,30	0,92	3,59	0,99
hg1-NK1-Z/O	1,09	0,99	9,56	0,96	3,96	0,99
hg2-NK1-Z/O	1,01	0,99	9,26	0,97	3,70	0,98

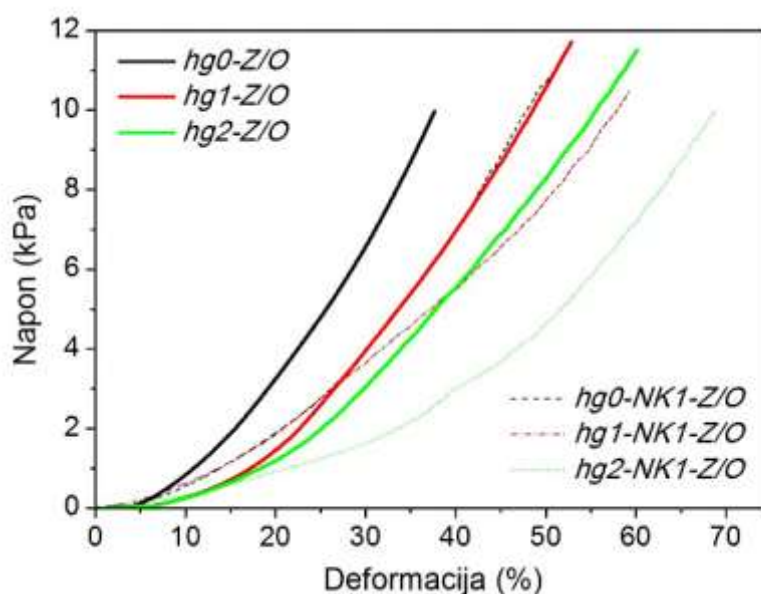
Za sisteme koji su namenjeni da budu u stalnom kontaktu sa fiziološkim fluidom važno je unaprediti sorpciona svojstva, što je postignuto u ovoj doktorskoj disertaciji uvođenjem vr-CS. Analizom kinetičkih aspekata i difuzionih modela bubrenja ispitivanih nanosistema sagledan je uticaj masenog udela vr-CS kao i molane koncentracije i veličine nanočestica. Kod sistema bez čestica mehanizam difuzije je Fikov, a vrednosti difuzionih koeficijenata rastu sa uvođenjem vr-CS. U sistemima sa nanočesticama, mehanizam difuzije je ne-Fikov (za prvih 60 %), a vrednosti difuzionih koeficijenata su manje sa uvođenjem vr-CS u matricu (tabela 13).

5.3.5. Mehanička svojstva PVA/vr-CS-Z/O hidrogelova i Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita

Primena hidrogelova na bazi biopolimera je uglavnom ograničena njihovim lošim mehaničkim svojstvima. Pored strukture, način umreženja polimernih lanaca u najvećoj meri određuje njihova mehanička svojstva. Iz literature je poznato da PVA hidrogelovi spadaju u krute membrane sa izuzetno dobrim mehaničkim svojstvima, pa se prilagođavanje svojstava potencijalnoj primeni za lečenje rana, svodi na postupak

mešanja sa prirodnim polimerima pri čemu se postiže veća elastičnost nakon njihovog umrežavanja (Kamoun et al., 2015).

Iz literature (Lee et al., 2009) je poznato da ispitivanje mehaničkih svojstava pri kompresiji hidrogelova i hidrogel nanokompozita na temperaturi od 37 °C omogućava praćenje stepena deformacije sa linearnim povećanjem sile. Na slici 45 prikazane su dobijene napon/deformacija krive za PVA/vr-CS-Z/O hidrogelove (pune linije) i Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozite (isprekidane linije) na kojima su zapažene tri karakteristične oblasti. Zavisnost deformacije od napona u početnom stupnju je tzv. Toe-ova oblast u kojoj ispitivani sistemi ispoljavaju najveću deformaciju za najmanju primenjenu silu. U ovoj oblasti svi ispitivani sistemi trpe deformaciju u opsegu od 2–5 %. Nadalje, usled ujednačenog trenja pri intramolekulskom klizanju polimernih lanaca dolazi do deformacije ispitivanih sistema na linearan način do oko 15 % deformacije. Vrednosti modula kompresibilnosti su izračunate iz nagiba linearnog dela napon/deformacija krivih za vrednosti do 15 % deformacije. U ovoj oblasti po prestanku delovanja sile ispitivani sistemi dobijaju ponovo svoje početne dimenzije, pa se ova oblast naziva oblast elastičnih deformacija. Nelinearni deo krive sa izraženim brzim porastom naprezanja je oblast plastičnih deformacija. U ovoj oblasti dolazi do trajne deformacije koja definiše statičku čvrstoću, a u primenjenoj mehaničkoj analizi je određena kao poslednja tačka napon/deformacija krive pri dostignutoj sili od 1 N. U tabeli 14 prikazan je uticaj masenog udela vr-CS na vrednost modula kompresibilnosti, čvrstoće i Jangovog modula elastičnosti za sve ispitivane sisteme na 37 °C. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da dvostruko povećanje udela vr-CS kao komponente matrice hidrogela hg2-Z/O u poređenju sa hg1-Z/O dovodi do povećanja: modula kompresibilnosti za 93 %, Jangovog modula elastičnosti za 37 % i čvrstoće za 94 %; dok se kod hidrogel nanokompozita hg2-NK-Z/O u poređenju sa hg1-NK-Z/O modul kompresibilnosti i Jangov modul elastičnosti povećavaju za 6 %, a čvrstoća za 9 %.



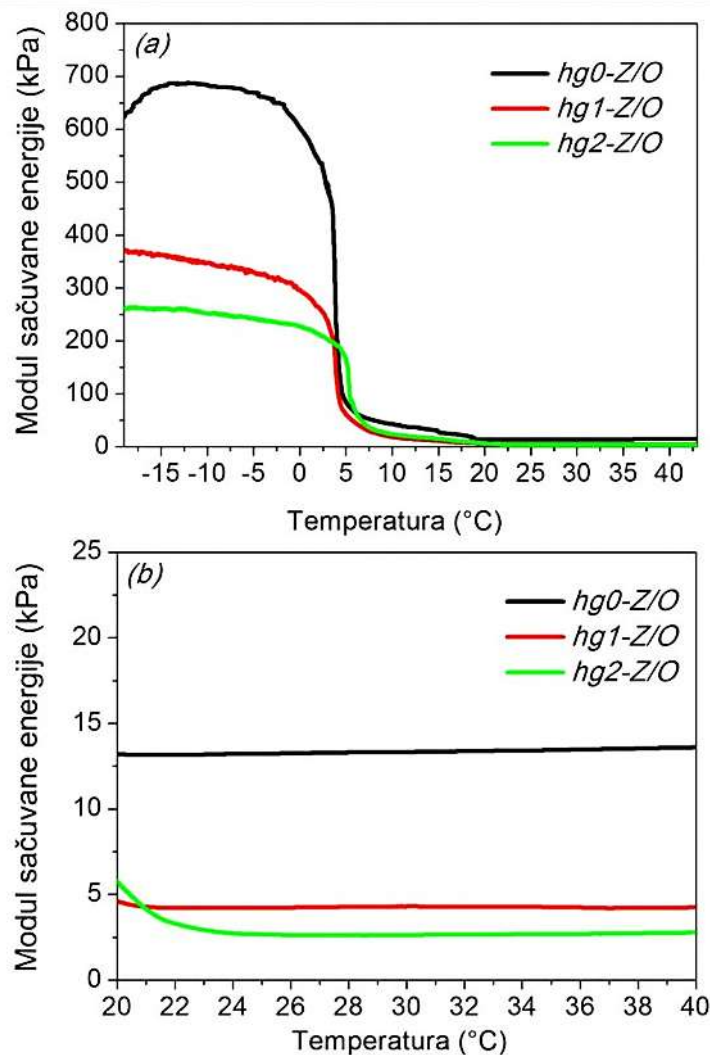
Slika 45. Napon/deformacija krive PVA/vr-CS-Z/O hidrogelova i Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita na 37 °C.

Tabela 14. Modul kompresibilnosti, čvrstoća i Jangov modul za PVA/vr-CS-Z/O hidrogelove i Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozite.

Uzorak	Modul kompresibilnosti (kPa)	Čvrstoća (kPa)	Jangov modul (kPa)
hg0-Z/O	12,53	9,98	7,52
hg1-Z/O	2,24	8,41	1,34
hg2-Z/O	4,33	11,52	2,60
hg0-NK1-Z/O	7,65	10,95	4,59
hg1-NK1-Z/O	3,85	9,13	2,31
hg2-NK1-Z/O	4,10	9,96	2,46

Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da svi ispitivani Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompoziti imaju zadovoljavajuću statičku čvrstoću za biomedicinsku primenu koja je, u poređenju sa vrednostima iz literature (Lee et al., 2009), čak za četiri reda veličine veća nakon sorpcije fluida u fiziološkim uslovima u trajanju od nedelju dana.

Dinamička merenja (slika 46 (a) i (b)) su izvedena za PVA/vr-CS-Z/O hidrogelove primenom modulisanе sile od 0,05 N pri frekvenciji od 0,1 Hz, uz povećanje temperature od -20 °C do 45 °C, brzinom od 3 °C/min.

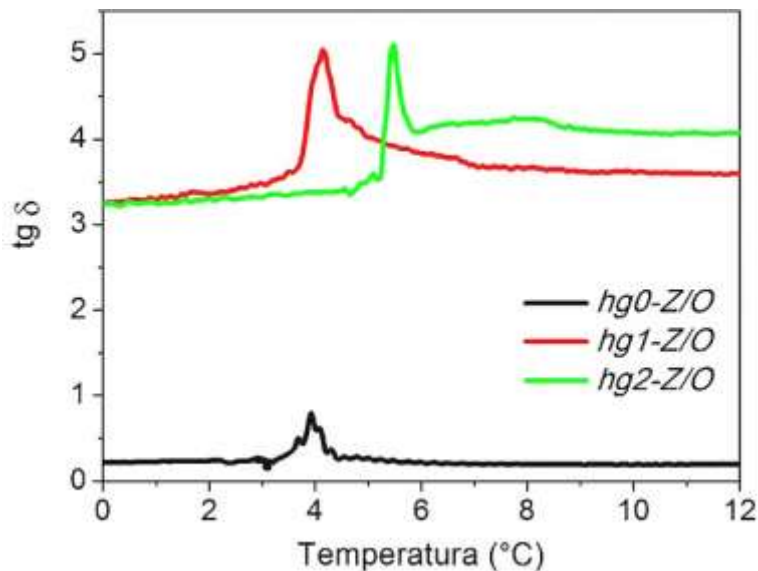


Slika 46. Temperaturna zavisnost modula sačuvane energije tokom zagrevanja PVA/vr-CS-Z/O hidrogelova (a) i oblast platoa modula sačuvane energije pri fiziološkim uslovima (25-37 °C) (b).

Ova merenja omogućavaju ispitivanje faznog prelaza vode i stepena umreženja PVA/vr-CS-Z/O hidrogelova. Iz literature je poznato da su viskoelastična svojstva hidrogelova usko povezana sa stanjem vode i pokretljivošću polimernih lanaca (Jiang et al., 1999). Na osnovu dijagrama zavisnosti modula sačuvane energije od temperature (slika 46 (a)) utvrđeno je da moduli sačuvane energije imaju veće vrednosti za hidrogelove sa većim stepenom umreženja.

Nakon uvođenja vr-CS, veću vrednost modula sačuvane energije pokazuje hidrogel (hg1-Z/O). Za sve ispitivane sisteme na temperaturama iznad 0 °C koja

odgovara temperaturi topljenja leda, T_{TL} , dolazi do izrazite relaksacije polimernih lanaca i faznog prelaza vode.



Slika 47. Temperaturna zavisnost tangensa gubitka energije PVA/vr-CS-Z/O hidrogelova.

Vrednosti modula sačuvane energije se za hidrogelove naglo smanjuju sa vrednosti od 13,5 kPa na 2,7 kPa, koje su karakteristične za meke, nabubrele polimerne mreže. Za hidrogel nanokompozite, temperatura topljenja kristalnih domena vode se povećava zbog prisustva čestica (tabela 15).

Tabela 15. Gustina umreženja, v_e , modul sačuvane energije, E' , tangens gubitka energije za fazni prelaz vode, $\tan \delta$, i temperature topljenja leda, T_{mw} , za PVA/vr-CS-Z/O hidrogelove i Ag-PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozite.

Uzorak	$v_e \times 10^{-7}$ (mol/cm ³)	E' (kPa)	$\tan \delta$	T_{TL} (°C)
hg0-Z/O	17,40	13,49	0,76	3,91
hg1-Z/O	5,42	4,19	5,02	4,14
hg2-Z/O	3,49	2,70	5,08	5,47
hg0-NK1-Z/O	5,18	4,01	7,88	5,18
hg1-NK1-Z/O	4,96	3,84	7,19	8,41
hg2-NK1-Z/O	7,42	5,74	0,80	8,29

S druge strane, stanje vode u matrici bez čestica zavisi od gustine umreženja, što direktno utiče na modul sačuvane energije (Jiang et al., 1999). Na slici 47 prikazana je temperaturna zavisnost tangensa gubitka, $\tan\delta = E''/E'$ za PVA/vr-CS-Z/O hidrogelove. Najintenzivniji pik je dobijen za uzorak sa najmanjim stepenom umreženja hg2-Z/O ($\tan\delta = 5,08$).

Dobijene vrednosti gustine umreženja ulaze u opseg od $17,40 \times 10^{-7}$ mol/cm³ za veoma umrežen PVA hidrogel (hg0-Z/O) do $3,49 \times 10^{-7}$ mol/cm³ za veoma slabo umrežen PVA/vr-CS hidrogel (hg2-Z/O).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da dvostruko povećanje udela vr-CS kao komponente matrice hidrogela hg2-Z/O u poređenju sa hg1-Z/O dovodi do smanjenja stepena umreženja i modula sačuvane energije za 36 %, dok se $\tan\delta$ povećava za 1 %. Kod hidrogel nanokompozita hg2-NK-Z/O u poređenju sa hg1-NK-Z/O zapaženo je da stepen umreženja i modul sačuvane energije rastu za 50 %, dok se $\tan\delta$ smanjuje za 90 %. Ovaj rezultat ukazuje na značajno poboljšanje mehaničkih svojstava hidrogel nanokompozita sa dvostrukim povećanjem udela vr-CS (Jiang et al., 1999).

5.3.6. Kvantifikacija *in vitro* oslobađanja jona srebra Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita u fiziološkim uslovima

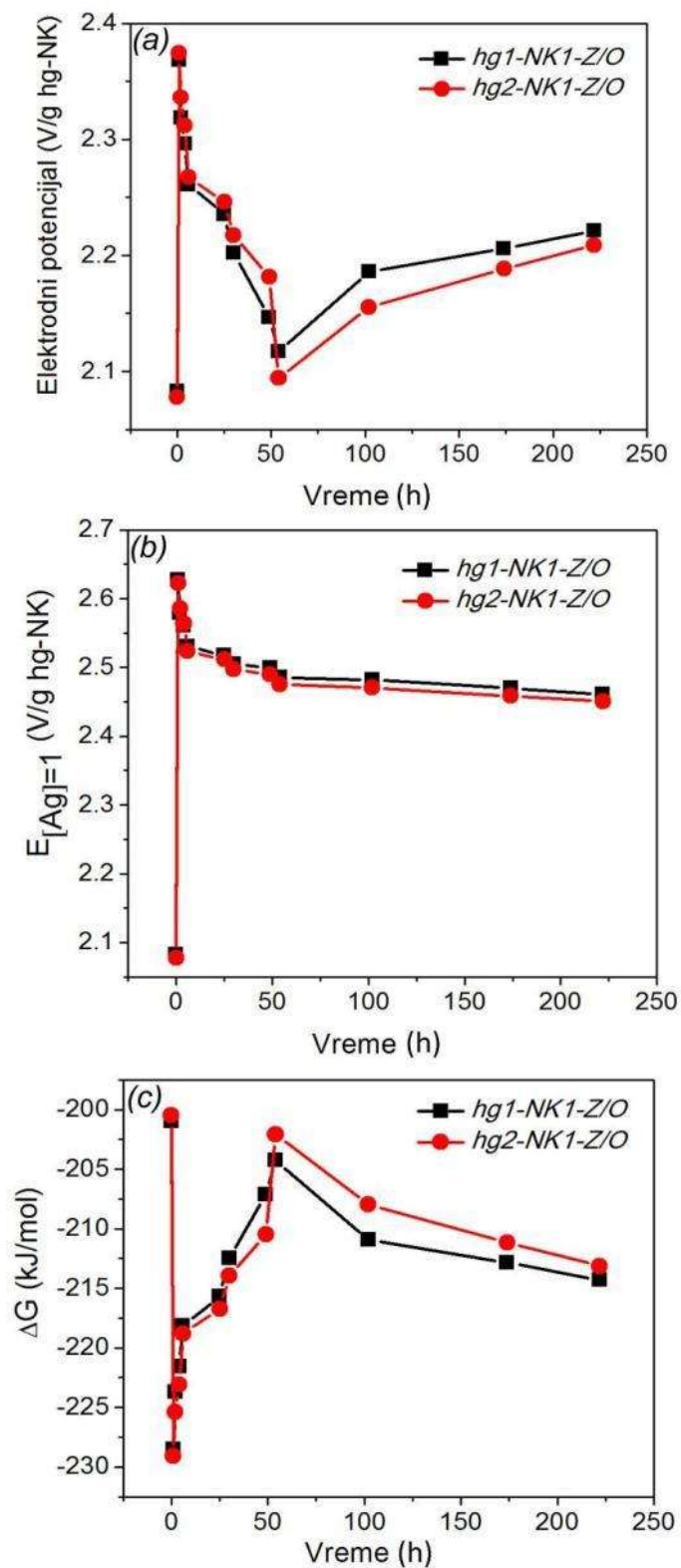
S obzirom da je na osnovu prethodnih ispitivanja u ovom radu pokazano da su PVA/vr-CS-Z/O hidrogelovi dobri stabilizatori Ag-nanočestica, i da dobijeni hidrogel nanokompoziti i pored prisustva vr-CS imaju zadovoljavajuća mehanička svojstva za biomedicinsku primenu, ispitana je kinetika oslobađanja Ag⁺-jona u fiziološkim uslovima. Primenom atomske apsorpcione spektrometrije dobijene su kumulativne količine oslobođenih Ag⁺-jona (tabela 16) u vremenu optimalnom za primenu u kliničkoj praksi (oko 9 dana). Aspekt kvantifikacije Ag⁺-jona oslobođenih iz Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita sintetisanih γ -zračenjem i post-radijacionim ciklusima zamrzavanja/odmrzavanja do sada nije zabeležen u literaturi. Za koncentracije Ag-nanočestica $(15 \text{ i } 16) \times 10^{-11}$ mol/cm³ i veličine čestica u

opsegu od 5,8-6,4 nm je pokazano da je uspešno postignuta veća brzina oslobađanje Ag^+ -jona iz Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita u odnosu na Ag/PVA model sistem. Procenat oslobođenih jona posle 9 dana je oko 14 puta veći u poređenju sa prethodno sintetisanim Ag/PVA hidrogel nanokompozitima (hg1-(NK4-NK6)) koji su pokazali antibakterijska svojstva. Može se zaključiti da dodatak vr-CS utiče na kinetiku oslobađanja i značajno povećava efikasnost procesa u fiziološkim uslovima.

Tabela 16. Kumulativno in vitro oslobađanje Ag^+ -jona iz Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita.

<i>Kumulativno oslobođeni Ag^+-joni / masa hg-NK (ppm/g)</i>		
<i>t (dani)</i>	<i>hg1-NK1</i>	<i>hg2-NK1</i>
1	174,8	182,5
3	290,4	374,7
5	364,4	415,5
7	425,8	471,8
9	497,3	553,5
<i>%/g</i>	59	53

Kako bi se izvršila procena antibakterijske snage u funkciji masenog udela vr-CS izračunate su vrednosti elektrodnog potencijala (slika 48 (a)) i Gibsove slobodne energije (slika 48 (c)) za slučaj kada se veličine metalnih čestica nanometarskih dimenzija (Brainina et al., 2012). Kod hidrogel nanokompozita sa većim udelom vr-CS (hg2-NK1-Z/O) u toku prva 2 dana dobijena je veća vrednost elektrodnog potencijala, što je najverovatnije rezultat dominantnog uticaja smanjenja veličine čestica da bi nadalje do 9-og dana ova vrednost bila nešto niža u poređenju sa hg1-NK1-Z/O. Na slici 48 (b) nakon normalizacije ukupne koncentracije Ag-nanočestica na jediničnu vrednost ($[Ag]=1$), veća vrednost elektrodnog potencijala dobijena je za hg1-NK1-Z/O u posmatranom vremenskom intervalu oslobađanja.



Slika 48. Elektroдни potencijal (E) (a); Elektroдни potencijal pri $[Ag]=1$ (b) i Gibsova slobodna energija (ΔG) (c).

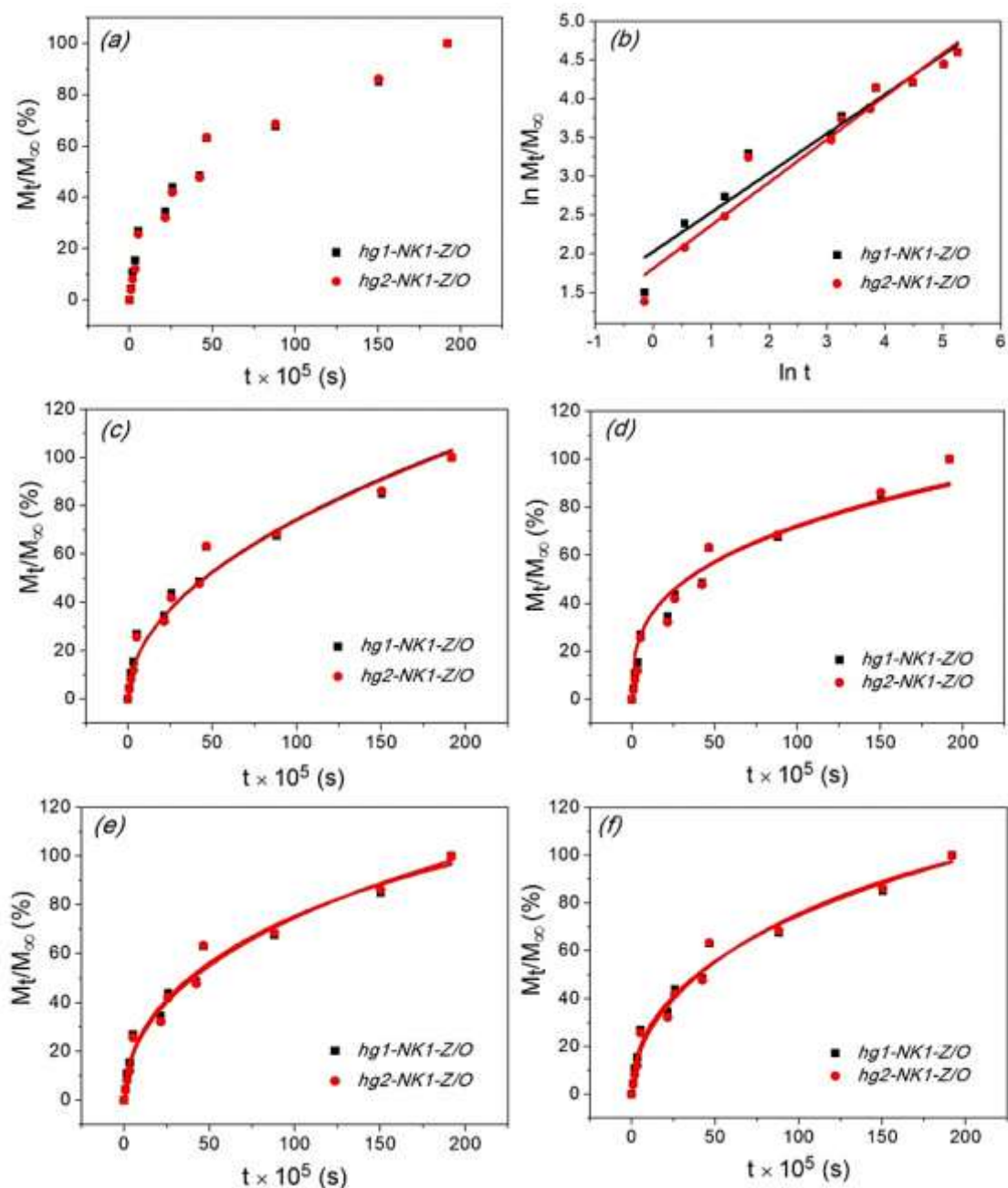
Poređenjem dobijenih vrednosti difuzionih koeficijenta fluida iz studije bubrenja hidrogel nanokompozita primenom aproksimacije za ceo vremenski interval ($0 \leq SD/SD_r \leq 100$ %) (poglavlje 5.3.4., tabela 13) može se zaključiti da je veća vrednost elektrodnog potencijala za hg1-NK1-Z/O hidrogel nanokompozit verovatno posledica veće vrednosti difuzionog koeficijenta fluida u kojem je rastvoren kiseonik. Izračunate vrednosti Gibsove slobodne energije (slika 48 (c)) potvrđuju da brzina reakcije oksidacije u inicijalnom stupnju ima nagli porast koji je izraženiji kod sistema sa manjom veličinom čestica, te se može zaključiti da je ovaj efekat tj. uticaj veličine površine dostupne za oksidaciju, dominantan u inicijalnom stupnju. Potencijal oksidacije u dužem vremenskom intervalu zavisi i od brzine difuzije fluida te srazmerno smanjenju brzine difuzije opada i potencijal oksidacije. Veća vrednost Gibsove slobodne energije je dobijena za hg2-NK1-Z/O hidrogel nanokompozit nakon drugog dana oslobađanja (slika 48).

5.3.7. Kinetički modeli *in vitro* oslobađanja jona srebra iz Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita

Primenom farmakokinetičkih modela izvršena je klasifikacija procesa oslobađanja bioaktivne komponente iz hidrogel nanokompozita. Parametri *in vitro* oslobađanja Ag^+ -jona iz Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita (hg1- i hg2-)NK1-Z/O prikazani su u tabeli 17. Na slici 49 (a) eksperimentalno dobijena nelinearna zavisnost oslobođenih Ag^+ -jona je analizirana primenom odgovarajućih farmakokinetičkih modela. Na osnovu ovih modela moguće je odrediti uticaj veličine Ag-nanočestica, potvrditi tip difuzije bioaktivnih jona kao i doprinos difuzije u odnosu na relaksaciju polimernih lanaca.

Korsmejer-Pepasov model prikazan na slici 49 (b), potvrđuje da sa uvođenjem vr-CS dolazi do promene kinetike oslobađanja Ag^+ -jona. Na osnovu vrednosti Korsmejer-Pepasovog eksponenta ($n > 0,5$) (tabela 17) za (hg1- i hg2-)NK1-Z/O uočeno je da je proces oslobađanja složen jer je istovremeno kontrolisan i brzinom difuzije i brzinom relaksacije polimernih lanaca. Hinući model (slika 49 (c)) za hidrogel nanokompozite sa vr-CS daje nešto manje slaganje sa eksperimentano dobijenim vrednostima ($R^2 = 0,97$) u poređenju sa Ag/PVA model sistemima ($R^2 = 0,99$), na

osnovu čega proističe da brzina difuzije fluida kroz hidrogel nanokompozit, kao i relaksacija polimernih lanaca nisu zanemarljive. Ovaj vremenski zavisni doprinos rezultuje činjenicom da difuzija bioaktivne komponente u posmatranom vremenskom intervalu ima složenu nelinearnu zavisnost.



Slika 49. Matematičko modelovanje oslobađanja Ag^+ -jona iz $Ag/PVA/vr-CS-Z/O$ hidrogel nanokompozita: (a) kumulativno oslobođeni Ag^+ -joni, (b) Korsmejer-Pepas, (c) Hinući, (d) Hikson-Krovel, (e) Kopča, (f) Makoid-Banakar.

Dobijene vrednosti k_H za oba sistema sa vr-CS su konstantne i nalaze se na granici vrednosti k_H dobijenih za Ag/PVA model sisteme između manjih hg1-(NK1-NK3) i većih koncentracija Ag-nanočestica hg1-(NK4-NK6). Ovaj rezultat ukazuje na činjenicu da inicijalno veća masena koncentracija Ag-nanočestica u hidrogel nanokompozitima (hg1- i hg2-)NK1-Z/O daje veći koeficijent difuzije bioaktivne komponente u poređenju sa Ag/PVA model sistemima.

Tabela 17. Rezultati modelovanja oslobađanja Ag^+ -jona.

Uzorak	Korsmejer-Pepas			Hinuci		Hikson-Krovel	
	k_{KP} (%/s ⁿ)	n	R^2	k_H (%/s ^{1/2})	R^2	k_{HC} (%/s ^{1/3})	R^2
hg1-NK1-Z/O	10,98	0,51	0,94	0,115	0,97	0,975	0,96
hg2-NK2-Z/O	5,95	0,56	0,95	0,115	0,97	0,967	0,94
Uzorak	Kopča			Makoid-Banakar			
	A (%/s ^{1/2})	$B \times 10^5$ (%/s)	R^2	k_{MB} (%/s)	n	$c \times 10^7$	R^2
hg1-NK1-Z/O	0,140	-3,52	0,98	0,234	0,45	0,75	0,98
hg2-NK2-Z/O	0,132	-2,49	0,98	0,114	0,51	2,00	0,98

Hikson-Krovel model (slika 49 (d)) opisuje zavisnost brzine oslobađanja Ag^+ -jona od specifične površine Ag-nanočestica. Dobijene vrednosti koeficijenata korelacije ($R^2 = 0,94$ i $0,96$) su relativno niske u poređenju sa ostalim modelima, te potvrđuju činjenicu da je ova zavisnost izražena u inicijalnom stupnju, a da u dužem vremenskom intervalu dominantan uticaj imaju difuzija fluida i relaksacija polimernih lanaca.

Kopča i Makoid-Banakar modeli (slika 49 (e) i (f)) daju najbolje slaganje sa eksperimentalno dobijenim vrednostima ($R^2 = 0,98$). Rezultati dobijeni primenom Kopča modela, za sve ispitivane hidrogel nanokompozite, ukazuju da je parametar $A \gg B$, odn. da je proces oslobađanja Ag^+ -jona iz Ag/PVA/vr-CS hidrogel nanokompozita difuziono kontrolisan. Kopča modelom je takođe potvrđena prethodno izračunata zavisnost potencijala oksidacije od brzine dotoka kiseonika fluidom, kojim se uspostavlja veći gradijent koncentracije Ag^+ -jona. Vrednost Makoid-Banakar parametra

n_{MB} manja je za uzorak hg1-NK1-Z/O. Ovako dobijena vrednost parametra n_{MB} daje brži porast Makoid-Banakar funkcije i samim tim brže oslobađanje Ag^+ -jona. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim primenom Eterove aproksimacije Fikovog zakona na ceo interval procesa bubrenja hidrogel nanokompozita (tabela 13) koji sadrže vr-CS (Ag/PVA/vr-CS-Z/O) na osnovu kojih je veća vrednost difuzionog koeficijenta dobijena za hg1-NK1-Z/O.

U tabeli 18 prikazane su korelirane vrednosti kumulativno oslobođenih Ag^+ -jona po jediničnoj masi hidrogel nanokompozita za biomedicinsku primenu, koji bi se koristili kao zavoji za zarastanje rana ili kao mekotkivni implantati.

Tabela 18. Korelacija vrednosti kumulativno oslobođenih Ag^+ -jona po jediničnoj masi hidrogel nanokompozita sa primenom u kliničkoj praksi.

Uzorak	Kumulativno oslobođeni Ag^+ -joni / masa hg-NK (ppm/g)		
	Antibakterijski zavoji za rane		Mekotkivni implanti
	Posle 48h	Posle 72h	Posle 2h
hg1-NK1	249,5	331,0	57,3
hg2-NK1	272,4	372,5	44,5

Izračunavanje potencijala oksidacije Ag-nanočestica u sistemima sa vr-CS (Ag/PVA/vr-CS) pokazala su da je kinetika oslobađanja Ag^+ -jona u fiziološkim uslovima povezana sa veličinom Ag-nanočestica u toku prva 2 dana. Ova ispitivanja daju mogućnost uspostavljanja korelacije dobijenih vrednosti kumulativno oslobođenih Ag^+ -jona po masi hidrogel nanokompozita sa vremenskim intervalom primene u kliničkoj praksi (na svakih 48 h ili 72 h (Jamuna-Thevi et al., 2011)).

5.3.8. Antibakterijska aktivnost *in vitro* oslobođenih jona srebra iz Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita

Test antibakterijske aktivnosti na bakterije *E. coli* i *S. aureus* za Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozit (hg2-NK1-Z/O) prikazan je na slici 50. Hidrogel nanokompozit (hg2-NK1-Z/O) ima antibakterijska svojstva koja su izraženija na bakterije *S. aureus* pri čemu je dobijena primetna zona inhibicije od oko 14 mm za veličinu diska prečnika 6 mm.



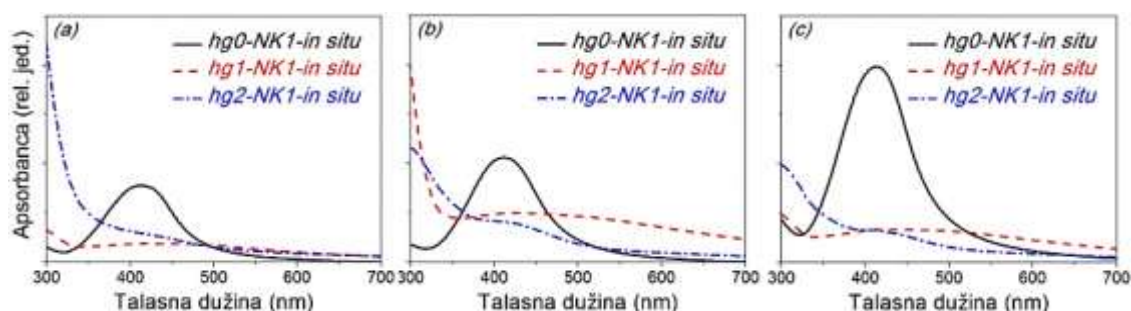
Slika 50. Test antibakterijske aktivnosti na *E. coli* i *S. aureus* bakterije za hg2-NK1-Z/O.

5.4. Optimizacija radijaciono-hemijske metode za *in situ* sintezu Ag/PVA/vr-CS hidrogel nanokompozita

5.4.1. Sinteza i karakterizacija Ag/PVA/vr-CS-*in situ* hidrogel nanokompozita

Ispitivanje mogućnosti sinteze Ag/PVA/vr-CS-*in situ* hidrogel nanokompozita odnosi se na optimizaciju radijaciono-hemijske metode za dobijanje hidrogel nanokompozita u jednostepenom tehnološkom koraku. Ovaj napredan način sinteze omogućava istovremeno formiranje polimerne mreže i inkorporaciju Ag-nanočestica, ali i sterilizaciju dobijenog materijala, što je veoma bitno sa stanovišta njegove potencijalne biomedicinske primene.

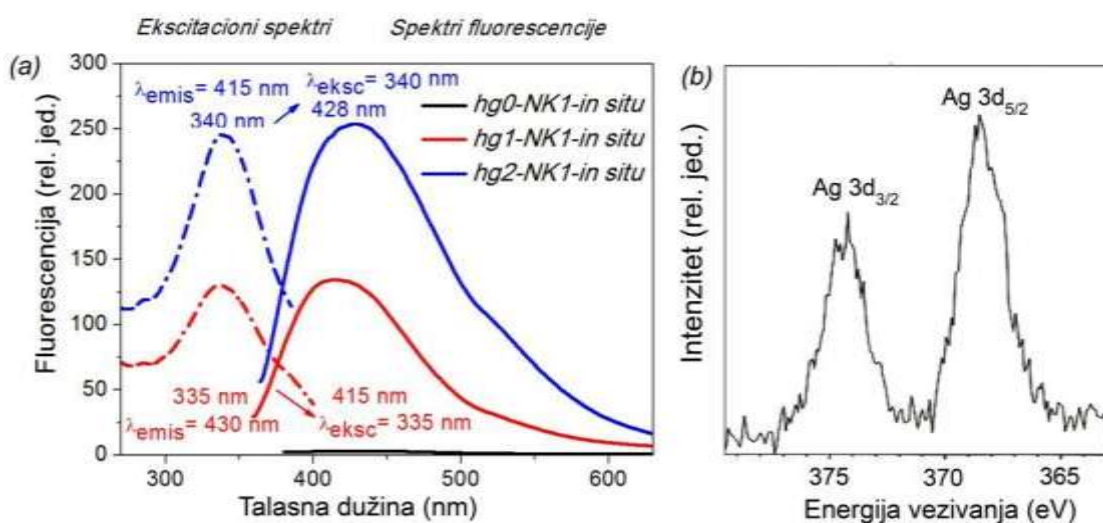
ULj/Vid spektroskopskom analizom je praćena sinteza Ag-nanočestica jednostepenim procesom (slika 51). Za kontrolni uzorak bez vr-CS (hg0-NK1-*in situ*) (crna kriva) zapaža se karakteristična intenzivna traka površinskog plazmona srebra u oblasti od 392-406 nm, koja je saglasno literaturi karakteristično za sferne čestice, pri čemu povećanje apsorbovane doze indukuje povećanje intenziteta apsorpcije tj sužava raspodelu veličina čestica (Pacioni et al., 2005; Krklješ et al., 2009; Jovanović et al., 2011).



Slika 51. ULj/Vid spektri Ag/PVA/vr-CS-*in situ* hidrogel nanokompozita, dobijeni simultanim umrežavanjem polimera i sintezom Ag-nanočestica, nakon apsorbovane doze od: (a) $D1 = 130$, (b) $D2 = 170$ i (c) $D3 = 200$ kGy.

U prisustvu vr-CS (hg1-NK1-*in situ* (crvena kriva) i hg2-NK1-*in situ* (plava kriva)) može se primetiti veoma slaba apsorpcija u oblasti od 400-500 nm. Zbog činjenice da svi uzorci imaju istu početnu koncentraciju srebra, saglasno literaturi je pretpostavljeno da prisustvo vr-CS dovodi do kompleksiranja manjih klastera srebra, kao što je pokazano jednačinama ((11)-(16)) (poglavlje 2.3.2.), koji se ne mogu pratiti apsorpcijom u ULj/Vid oblasti spektra (Wang et al., 2011).

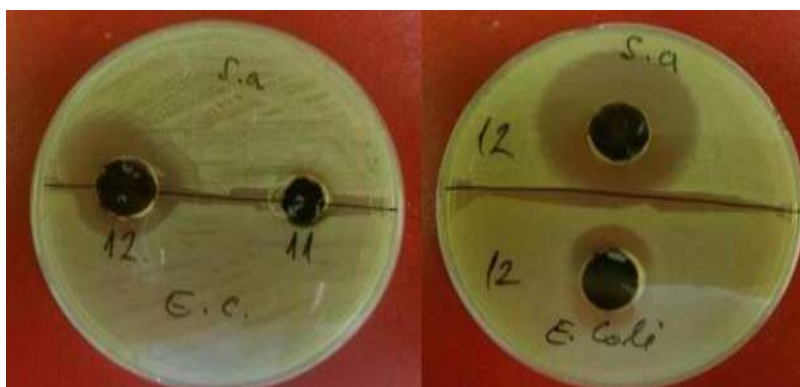
Hidrogel nanokompoziti su analizirani fluorescentnom i fotoelektronskom spektroskopijom X-zracima (XPS). Intenzivna emisija na fluorescentnim spektrima (slika 52 (a)) je najverovatnije posledica kuplovanja emisije Ag-klastera i vr-CS u istoj oblasti spektra, te se na osnovu samo ovih ispitivanja ne može nedvosmisleno utvrditi prisustvo čestica manjih od 2 nm (Wang et al., 2011). S druge strane, XPS analiza (slika 52 (b)) jasno ukazuje da su inkorporirani klasteri srebra u metalnom stanju, sa karakterističnim energijama vezivanja dubleta na 368 eV i 374 eV za Ag 3d_{3/2} i Ag 3d_{5/2}, redom.



Slika 52. Fluorescentni spektri Ag/PVA/vr-CS-*in situ* hidrogel nanokompozita (a) i visoko rezolucioni XPS spektri Ag 3d_{3/2} i 3d_{5/2} nivoa za hg1-NK1-*in situ* (b).

5.4.2. Antibakterijska aktivnost *in vitro* oslobođenih jona srebra iz Ag/PVA/vr-CS-*in situ* hidrogel nanokompozita

Na slici 53 prikazan je reprezentativni test antibakterijske aktivnosti Ag/PVA-*in situ* (kontrolni uzorak br. 11) i Ag/PVA/vr-CS-*in situ* (hg2-NK1-*in situ* br. 12) na gram-pozitivne *S. aureus* i gram-negativne *E. coli* bakterije. Za hidrogel nanokompozit sa većim udelom vr-CS (disk prečnika 12 mm) zapaža se pojava zone inhibicije na *E. coli* bakterije od oko 22 mm i nešto veća zona inhibicije na *S. aureus* bakterije od oko 31 mm. Smanjenjem veličine Ag-nanočestica do klastera ispod 2 nm, ali i većim antibakterijskim dejstvom vr-CS, dobijen je srebro/hitozan sinergijski efekat *in vitro* antibakterijske aktivnosti na *S. aureus* i *E. coli* bakterije, saglasno literaturi (Strand et al., 2003).



Slika 53. Test antibakterijske aktivnosti na bakterije *E. coli* i *S. aureus*: hg0-NK1-*in situ* (br. 11) i hg2-NK1-*in situ* (br. 12).

Ovi obećavajući rezultati pružaju mogućnost razvoja i optimizacije kako jednostavnog jednostepenog radijaciono-tehnološkog procesa sinteze, tako i svojstava Ag/PVA/vr-CS hidrogel nanokompozita kao biomaterijala za isporuku antibakterijskih agenasa unutar bezbednih terapijskih doza.

6. ZAKLJUČAK

Razvijena je jednostavna metoda sinteze korišćenjem prednosti radijaciono-hemijske nanotehnologije i ovladano je elementima projektovanja antibakterijske funkcije. U tom smislu su prvo sintetisani Ag/PVA hidrogel nanokompoziti kao model sistemi koji su omogućili da se stekne uvid u kontrolu i održivost oslobađanja Ag^+ -jona u vremenu i koncentraciji koja je optimalna za primenu u medicinskoj praksi. Utvrđeno je da su *in vitro* profili oslobađanja Ag^+ -jona slični profilima oslobađanja lekova, te je bilo moguće primeniti farmakokinetičke modele za analizu kinetike oslobađanja. Utvrđeno je da je apsolutna vrednost koncentracije Ag^+ -jona oslobođena iz model sistema u opsegu antibakterijskih terapijskih ppm koncentracija, kao i da je održiva u vremenu potrebnom u biomedicinskoj praksi. Modeli koji daju najbolja poklapanja sa eksperimentalno dobijenim vrednostima su farmakokinetički modeli Kopča i Makoid-Banakar. Iz odnosa parametara dobijenih primenom modela Kopča, utvrđeno je da je oslobađanje Ag^+ -jona difuziono kontrolisan proces (Fikova difuzija), i zavisi ne samo od molarne koncentracije već i od veličine Ag-nanočestica, dobijenih prečnika u opsegu od 6,5-8,5 nm. Ovaj rezultat je u skladu sa većom specifičnom površinom oksidacije i većom rastvorljivošću manjih Ag-nanočestica dobijenom primenom Ostvald-Frojnlihove jednačine. Međutim, pokazalo se da oksidacioni potencijal Ag-nanočestica zavisi i od difuzionih svojstava fiziološkog fluida, dobijenih analizom kinetičkih aspekata bubrenja. Sa povećanjem difuzionog koeficijenta brži je dotok rastvorenog kiseonika potrebnog za oksidaciju. Test antibakterijske aktivnosti na gram-pozitivne *S. aureus* i gram-negativne *E. coli* bakterije je pokazao da koncentracija oslobođenih Ag^+ -jona mora da bude iznad minimalne inhibitorne koncentracije koja se za Ag^+ -jone (MIK_{Ag^+}) nalazi u opsegu od 0,78-6,25 ppm. Model sistemi sa koncentracijama oslobođenih jona iznad MIK_{Ag^+} vrednosti su pokazali antibakterijska svojstva na *S. aureus* i *E. coli*. Na osnovu analize model sistema utvrđeno je da se pri projektovanju antibakterijske funkcije Ag/hidrogel nanokompozita mora ovladati parametrima koji je određuju, a to su veličina čestica, njihova molarna koncentracija, ali i difuzionim svojstvima fluida.

Prelaskom sa model sistema na sisteme koji sadrže CS utvrđeno je da se uvođenjem CS i variranjem odnosa polimera u PVA/CS blendama dobijaju nanočestice manjih dimenzija u slučaju kada je sadržaj PVA u blendi veći od 50 %, te da je moguće kontrolisati veličinu čestica variranjem odnosa PVA/CS komponenti. S druge strane, radijaciono-hemijska metoda degradacije CS se pokazala kao adekvatna i jednostavna metoda za povećanje rastvorljivosti CS do fizioloških pH vrednosti (pH=7,4), raskidanjem glukozidnih veza i iniciranjem Majarove reakcije čiji produkti doprinose povećanju antibakterijskih svojstava.

Potvrđeno je da je modifikacija CS do vodorastvornog derivata (vr-CS) omogućila sintezu trodimenzionalne polimerne mreže hidrogela. Kombinovanje radijaciono-hemijske metode umrežavanja PVA i vr-CS sa post-radijacionim postupkom zamrzavanja/odmrzavanja je dalo dobre rezultate u smislu stabilnosti matrice u kojoj je CS inkorporiran putem kovalentnog i vodoničnog vezivanja u kristalnim domenima. PVA/vr-CS-Z/O matrica je adekvatna za sintezu i stabilizaciju nanočestica sfernog oblika, sa prečnikom od oko 10 nm. Rezultati mehaničke karakterizacije pokazali su da Ag/PVA/vr-CS-Z/O imaju zadovoljavajuću mehaničku čvrstoću za biomedicinsku primenu. Dvostruko povećanje udela vr-CS kao komponente matrice hidrogela dovodi do porasta modula kompresibilnosti za 93 %, Jangovog modula elastičnosti za 37 %, kao i čvrstoće za 94 %, dok se kod hidrogel nanokompozita modul kompresibilnosti i Jangov modul elastičnosti povećavaju za 6 %, a čvrstoća za 9 %, dobijeno analizom u statičkom modu. Potvrđeno je da su viskoelastična svojstva hidrogelova i hidrogel nanokompozita usko povezana sa stanjem vode i pokretljivošću polimernih lanaca, što je dobijeno analizom u dinamičkom modu. Dvostruko povećanje udela vr-CS kao komponente matrice hidrogel nanokompozita dovodi do porasta stepena umreženja i modula sačuvane energije za 50 %, dok se $tg \delta$ smanjuje za 90 %. Dobijeni rezultati su pokazali značajno poboljšanje mehaničkih svojstava hidrogel nanokompozita, namenjenih za primenu u obliku antibakterijskih obloga za lečenje rana. Transportna svojstva matrica bez prisustva čestica imaju Fikov tip difuzije fluida i rastu sa uvođenjem vr-CS u matricu. Sa uvođenjem nanočestica, tip difuzije je ne-Fikov, a vrednosti difuzionih koeficijenata su manje sa uvođenjem vr-CS u matricu. Farmakokinetički modeli oslobađanja Ag^+ -jona su pokazali da je brzina oslobađanja jona kontrolisana difuzijom jona i brzinom relaksacije polimernih lanaca (ne-Fikova

difuzija) za razliku od Ag/PVA model sistema, a da oslobađanje Ag^+ -jona ne zavisi samo od ukupne molarne koncentracije, već je rezultat i veličine Ag-nanočestica. Utvrđeno je da oksidacioni elektrodni potencijal i Gibsova slobodna energija odn., antibakterijska snaga ovih sistema zavise kako od veličine Ag-nanočestica, tako i od difuzionih svojstava fluida utvrđenih analizom kinetičkih aspekata bubrenja. Ustanovljeno je da se Ag/PVA model sistem pokazao adekvatnim za analizu elemenata potrebnih za projektovanje antibakterijske funkcije, s obzirom da su i u Ag/PVA/vr-CS-Z/O sistemima uočene zavisnosti oslobađanja Ag^+ -jona od veličine čestica i difuzionih svojstava fluida.

Unapređenje antibakterijske aktivnosti Ag/PVA/vr-CS-Z/O postignuto je sinergijom Ag-nanočestica sa vr-CS, pa su se za red veličine niže molarne koncentracije Ag-nanočestica u poređenju sa Ag/PVA hidrogel nanokompozitima pokazale efikasnijim na *S. aureus* bakterije. Ovaj efekat je još izraženiji kod sistema koji su sintetisani u jednostepenom procesu radijaciono-hemijske sinteze (Ag/PVA/vr-CS-*in situ*). Potvrđeno je da je putem uvođenja radijaciono-modifikovanog prirodnog polimera CS, kao i optimizacijom radijaciono-hemijske metode, moguće postići jednostavan postupak sinteze terapijskog sredstva sa efikasnijom antibakterijskom funkcijom.

Na kraju se može zaključiti da zavisnosti oslobađanja antibakterijskih Ag^+ -jona od molarne koncentracije čestica i njihove veličine odn. specifične površine, kao i od njihovih fizičko-hemijskih i termodinamičkih svojstava, ali i od difuzionih svojstava fluida, čine elemente koji su neophodni za adekvatno projektovanje održive i kontrolisane antibakterijske funkcije hidrogel nanokompozita. Koncept projektovanja antibakterijske funkcije na osnovu utvrđenih elemenata do sada nije zabeležen u literaturi. Antibakterijska sredstva na bazi Ag-nanočestica i biopolimera CS, sa većom biodostupnošću koja je obezbeđena adekvatnim projektovanjem materijala, kao i inovativno kombinovanje ovih komponenata jednostavnim postupkom sinteze, primenjeno u ovoj doktorskoj disertaciji, može doprineti rešavanju aktuelnog problema rezistencije u odnosu na antibiotike.

7. LITERATURA

- Abedini A., Daud A.R., Hamid M.A.A., Othman N.K., Saion E., A review on radiation-induced nucleation and growth of colloidal metallic nanoparticles, *Nanoscale Research Letters* 8 (2013) 474 (1-10).
- Aydm R.S.T., Pulat M., 5-Fluorouracil encapsulated chitosan nanoparticles for pH-stimulated drug delivery: Evaluation of controlled release kinetics, *Journal of Nanomaterials* 2012 (2012) 313961 (1-10).
- Baker M.I., Walsh S.P., Schwartz Z., Boyan B.D., A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 100 (2012) 1451-1457.
- Belloni J., Nucleation, growth and properties of nanoclusters studied by radiation chemistry: Application to catalysis, *Catalysis Today* 113 (2006) 141-156.
- Brainina K.Z., Galperin L.G., Kiryuhina T.Y., Galperin A.L., Stozhko N.Y., Murzakaev A.M., Timoshenkova O.R., Silver nanoparticles electrooxidation: theory and experiment, *Journal of Solid State Electrochemistry* 16 (2012) 2365-2372.
- Buwalda S.J., Boere K.W.M., Dijkstra P.J., Feijen J., Vermonden T., Hennink W.E., Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials, *Journal of Controlled Release* 190 (2014) 254-273.
- Can H.K., Denizli B.K., Kavlak S., Guner A., Preparation and swelling studies of biocompatible hydrogel systems by using gamma radiation-induced polymerization, *Radiation Physics and Chemistry* 72 (2005) 483-488.
- Chaturvedi A., Bajpai A.K., Bajpai J., Preparation and characterization of poly(vinyl alcohol) cryogel-silver nanocomposites and evaluation of blood compatibility, cytotoxicity, and antimicrobial behaviors, *Polymer Composites* 36 (2015) 1983-1997.
- Chmielewski A.G., Chitosan and radiation chemistry, *Radiation Physics and Chemistry* 79 (2010) 272-275.
- Choi W.S., Ahn K.J., Lee D.W., Byun M.W., Park H.J., Preparation of chitosan oligomers by irradiation, *Polymer Degradation and Stability* 78 (2002) 533-538.
- Elbarbary A.M., El-Sawy N.M., Radiation synthesis and characterization of polyvinyl alcohol/chitosan/silver nanocomposite membranes: Antimicrobial and blood

compatibility studies, *Polymer Bulletin* (2016) 1-18, DOI 10.1007/s00289-016-1708-1.

El-Salmawi K.M., Gamma radiation-induced crosslinked PVA/Chitosan blends for wound dressing, *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry* 44 (2007) 541-545.

Ferreira P., Coelho J.F.J., Almeida J.F., Gil M.H., Photocrosslinkable polymers for biomedical applications, *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges*, Prof. Reza Fazel-Rezai, In Tech, Croatia (2011).

Feynman R., Plenty of Room at the Bottom, Transcript of a talk presented by Richard Feynman to the American Physical Society in Pasadena (1959) 1-7.

Dostupno na: https://www.pa.msu.edu/~yang/RFeynman_plentySpace.pdf
(pristupljeno oktobra 2016.).

Franci G., Falanga A., Galdiero S., Palomba L., Rai M., Morelli G., Galdiero M., Silver nanoparticles as potential antibacterial agents, *Molecules* 20 (2015) 8856-8874.

Gaharwar A.K., Peppas N.A., Khademhosseini A., Nanocomposite hydrogels for biomedical applications, *Biotechnology and Bioengineering* 111 (2014) 441-453.

Ganji F., Vasheghani-Farahani S., Vasheghani-Farahani E., Theoretical description of hydrogel swelling: A review, *Iranian Polymer Journal* 19 (2010) 375-398.

Ghanipour M., Dorrnian D., Effect of Ag-nanoparticles doped in polyvinyl alcohol on the structural and optical properties of PVA films, *Journal of Nanomaterials* 2013 (2013) 897043 (1-10).

Goy R.C., De Britto D., Assis O.B.G., A review of the antimicrobial activity of chitosan, *Polímeros* 19 (2009) 241-247.

Greaves G.N., Greer A.L., Lakes R.S., Rouxel T., Poisson's ratio and modern materials, *Nature Materials* 10 (2011) 823-837.

Gryczka U., Dondi D., Chmielewski A.G., Migdal W., Buttafava A., Faucitano A., The mechanism of chitosan degradation by gamma and e-beam irradiation, *Radiation Physics and Chemistry* 78 (2009) 543-548.

Gullón B., Montenegro M.I., Ruiz-Matute A.I., Cardelle-Cobas A., Corzo N., Pintado M.E., Synthesis, optimization and structural characterization of a chitosan-glucose derivative obtained by the Maillard reaction, *Carbohydrate Polymers* 137 (2016) 382-389.

- Hardes J., Ahrens H., Gebert C., Streitbuerger A., Buerger H., Erren M., Gonsel A., Wedemeyer C., Saxler G., Winkelmann W., Gosheger G., Lack of toxicological side-effects in silver-coated megaprotheses in humans, *Biomaterials* 28 (2007) 2869-2875.
- Hennink W.E., van Nostrum C.F., Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (2012) 223-236.
- Hoffman A.S., Hydrogels for biomedical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (2012) 18-23.
- Huang N.M., Radiman S., Lim H.N., Khiew P.S., Chiu W.S., Lee K.H., Syahida A., Hashim R., Chia C.H., γ -ray assisted synthesis of silver nanoparticles in chitosan solution and the antimicrobial properties, *Chemical Engineering Journal* 155 (2009) 499-507.
- Jain J., Arora S., Rajwade J.M., Omay P., Khandelwal S., Paknikar K.M., Silver nanoparticles in therapeutics: Development of an antimicrobial gel formulation for topical use, *Molecular Pharmaceutics* 6 (2009) 1388-1401.
- Jamuna-Thevi K., Bakar S.A., Ibrahim S., Shahab N., Toff M.R.M., Quantification of silver ion release, *in vitro* cytotoxicity and antibacterial properties of nanostructured Ag doped TiO₂ coatings on stainless steel deposited by RF magnetron sputtering, *Vacuum* 86 (2011) 235-241.
- Jawalkar S.S., Raju K.V.S.N., Halligudi S.B., Sairam M., Aminabhavi T.M., Molecular modeling simulations to predict compatibility of poly(vinyl alcohol) and chitosan blends: A comparison with experiments, *Journal of Physical Chemistry B* 111 (2007) 2431-2439.
- Jayakumar R., Prabakaran M., Sudheesh Kumar P. T., Nair S. V., Tamura H., Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications, *Biotechnology Advances* 29 (2011) 322-337.
- Jiang H., Su W., Mather P.T., Bunning T.J., Rheology of highly swollen chitosan/polyacrylate hydrogels, *Polymer* 40 (1999) 4593-4602.
- Jovanović S., Jeremić K., Karakterisanje polimera, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu (2007).
- Jovanović Ž., Krklješ A., Stojkowska J., Tomić S., Obradović B., Mišković-Stanković V., Kačarević-Popović Z., Synthesis and characterization of silver/poly(N-vinyl-

- 2-pyrrolidone) hydrogel nanocomposite obtained by *in situ* radiolytic method, Radiation Physics and Chemistry 80 (2011) 1208-1215.
- Juby K.A., Dwivedi C., Kumar M., Kota S., Misra H.S., Bajaj P.N., Silver nanoparticle-loaded PVA/gum acacia hydrogel: Synthesis, characterization and antibacterial study, Carbohydrate Polymers 89 (2012) 906-913.
- Kačarević-Popović Z., Dragašević M., Krklješ A., Popović S., Jovanović Ž., Tomić S., Mišković-Stanković V., On the use of radiation technology for nanoscale engineering of silver/hydrogel based nanocomposites for potential biomedical application, The Open Conference Proceedings Journal 1 (2010) 200-206.
- Kamoun E.A., Chen X., Eldin M.S.M., Kenawy E.R.S., Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers, Arabian Journal of Chemistry 8 (2015) 1-14.
- Kang B., Dai Y.D., Zhang H.Q, Chen D., Synergetic degradation of chitosan with gamma radiation and hydrogen peroxide, Polymer Degradation and Stability 92 (2007) 359-362.
- Khamanga S.M., Walker R.B., *In vitro* dissolution kinetics of captopril from microspheres manufactured by solvent evaporation, Dissolution Technologies 19 (2012) 42-51.
- Kim S.K., Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: Biological activities and applications, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, SAD (2011) 159-162.
- Knetsch M.L.W., Koole L.H., New strategies in the development of antimicrobial coatings: The example of increasing usage of silver and silver nanoparticles, Polymers 3 (2011) 340-366.
- Kobayashi M., Hyu H.S., Development and evaluation of polyvinyl alcohol-hydrogels as an artificial articular cartilage for orthopedic implants, Materials 3 (2010) 2753-2771.
- Kong M., Chen X.G., Xing K., Park H.J., Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review, International Journal of Food Microbiology 144 (2010) 51-63.
- Kraus V.B., Stabler T.V., Kong S.Y., Varju G., McDaniel G., Measurement of synovial fluid volume using urea, Osteoarthritis and Cartilage 15 (2007) 1217-1220.

- Krklješ A., Nedeljković J., Kačarević-Popović Z., Fabrication of Ag-PVA hydrogel nanocomposite by γ -irradiation, *Polymer Bulletin* 58 (2007a) 271-279.
- Krklješ A., Marinović-Cincović M., Kačarević-Popović Z., Nedeljković J., Dynamic thermogravimetric degradation of gamma radiolytically synthesized Ag-PVA nanocomposites, *Thermochimica Acta* 460 (2007b) 28-34.
- Krklješ A., Marinović-Cincović M., Kačarević-Popović Z., Nedeljković J., Radiolytic synthesis and characterization of Ag-PVA nanocomposites, *European Polymer Journal* 43 (2007c) 2171-2176.
- Krklješ A., Radiolitička sinteza i karakterizacija polimernih nanokompozita na bazi polivinil alkohola i nanočestica srebra i zlata, Doktorska disertacija, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu (2009).
- Krstić J., Spasojević J., Radosavljević A., Šiljegović M., Kačarević-Popović Z., Optical and structural properties of radiolytically *in situ* synthesized silver nanoparticles stabilized by chitosan/poly(vinyl alcohol) blends, *Radiation Physics and Chemistry* 96 (2014a) 158-166.
- Krstić J., Spasojević J., Radosavljević A., Perić-Grujić A., Đurić M., Kačarević-Popović Z., Popović S., *In vitro* silver ion release kinetics from nanosilver/poly(vinyl alcohol) hydrogels synthesized by gamma irradiation, *Journal of Applied Polymer Science* 131 (2014b) 40321 (1-14).
- Kumar H.M.P.N., Prabhakar M.N., Prasad C.V., Rao K.M., Reddy T.V.A.K., Rao K.C., Subha M.C.S., Compatibility studies of chitosan/PVA blend in 2 % aqueous acetic acid solution at 30 °C, *Carbohydrate Polymers* 82 (2010) 251-255.
- Lee S.Y., Pereira B.P., Yusof N., Selvaratnam L., Yu Z., Abbas A.A., Kamarul T., Unconfined compression properties of a porous poly(vinyl alcohol)-chitosan-based hydrogel after hydration, *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 1919–1925.
- Lee Y.J., Kim J., Oh J., Bae S., Lee S., Hong I.S., Kim S.H., Ion-release kinetics and ecotoxicity effects of silver nanoparticles, *Environmental Toxicology and Chemistry* 31 (2012) 155-159.
- Li F., Su Y., Wang J., Wu G., Wang C., Influence of dynamic load on friction behavior of human articular cartilage, stainless steel and polyvinyl alcohol hydrogel as artificial cartilage, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21 (2010) 147-154.

- Linnert T., Mulvaney P., Henglein A., Weller H., Long-lived nonmetallic silver clusters in aqueous solution: preparation and photolysis, *Journal of the American Chemical Society* 112 (1990) 4657-4664.
- Liu J., Sonshine D.A., Shervani S., Hurt R.H., Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces, *ACS Nano* 4 (2010) 6903-6913.
- Liu X., Atwater M., Wang J., Huo Q., Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 58 (2007) 3-7.
- Ma R., Levard C., Marinakos S.M., Cheng Y., Liu J., Michel F.M., Brown G.E., Lowry G.V., Size-controlled dissolution of organic-coated silver nanoparticles, *Environmental Science & Technology* 46 (2012) 752-759.
- Mansur H.S., Sadahira C.M., Souza A.N., Mansur A.A.P., FTIR spectroscopy characterization of poly(vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde, *Materials Science and Engineering: C* 28 (2008) 539-548.
- Marques M.R.C., Löbenberg R., Almukainzi M., Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing, *Dissolution Technologies* 18 (2011) 15-28.
- Mathews D.T., Birney Y.A., Cahill P.A., McGuinness G.B., Mechanical and morphological characteristics of poly(vinyl alcohol)/chitosan hydrogels, *Journal of Applied Polymer Science* 109 (2008) 1129-1137.
- Meunier F., Wilkinson K.J., Nonperturbing fluorescent labeling of polysaccharides, *Biomacromolecules* 3 (2002) 857-864.
- MiePlot v.3.4, <http://www.philiplaven.com/mieplot.htm> (preuzeto oktobra 2015.).
- Modrzejewska Z., Dorabialska M., Zarzycki R., Wojtasz-Pajak A., The mechanism of sorption of Ag⁺ ions on chitosan microgranules: IR and NMR studies, *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives XIV* (2009) 49-64.
- Mostafavi M., Douki T., *Radiation chemistry: from basics to applications in material and life sciences*, Mélanie Spothem-Maurizot, EDP Sciences, France (2008).
- Mullarney M.P., Seery T.A.P., Weiss R.A., Drug diffusion in hydrophobically modified N,N-dimethylacrylamide hydrogels, *Polymer* 47 (2006) 3845-3855.

- Nho Y.C., Park K.R., Preparation and properties of PVA/PVP hydrogels containing chitosan by radiation, *Journal of Applied Polymer Science* 85 (2002) 1787–1794.
- Pasanphan W., Rimdusit P., Choofong S., Piroonpan T., Nilsuwankosit S., Systematic fabrication of chitosan nanoparticle by gamma irradiation, *Radiation Physics and Chemistry* 79 (2010) 1095-1102.
- Peña O., Rodríguez-Fernández L., Roiz J., Cheang-Wong J.C., Arenas-Alatorre J., Crespo-Sosa A., Oliver A., Average size of Ag nanoclusters in silica determined by optical light absorption measurements, *Revista Mexicana de Física S* 53 (2006) 62-66.
- Qian X.F., Yin J., Huang J.C., Yang Y.F., Guo X.X., Zhu Z.K., The preparation and characterization of PVA/Ag₂S nanocomposite, *Materials Chemistry and Physics* 68 (2001) 95-97.
- Qin C., Li H., Xiao Q., Liu Y., Zhu J., Du Y., Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity, *Carbohydrate Polymers* 63 (2006) 367-374.
- Rance G.A., Marsh D.H., Khlobystov A.N., Extinction coefficient analysis of small alkanethiolate-stabilised gold nanoparticles, *Chemical Physics Letters* 460 (2008) 230-236.
- Rao M.S., Chawla S.P., Chander R., Sharma A., Antioxidant potential of Maillard reaction products formed by irradiation of chitosan–glucose solution, *Carbohydrate Polymers* 83 (2011) 714-719.
- Rauwel P., Küünal S., Ferdov S., Rauwel E., A review on the green synthesis of silver nanoparticles and their morphologies studied via TEM, *Advances in Materials Science and Engineering* 2015 (2015) 1-9.
- Redmond P.L., Hallock A.J., Brus L.E., Electrochemical Ostwald Ripening of colloidal Ag particles on conductive substrates, *Nano Letters* 5 (2005) 131-135.
- Rycenga M., Cogley C.M., Zeng J., Li W., Moran C.H., Zhang Q., Qin D., Xia Y., Controlling the synthesis and assembly of silver nanostructures for plasmonic applications, *Chemical Reviews* 111 (2011) 3669-3712.
- Saion E., Gharibshahi E., Naghavi K., Size-controlled and optical properties of monodispersed silver nanoparticles synthesized by the radiolytic reduction method, *International Journal of Molecular Sciences* 14 (2013) 7880-7896.

- Sakurada I., Ikada Y., Effects of cobalt-60 gamma radiation on poly(vinyl alcohol) (III): Effects of gamma radiation on water-swollen films and aqueous solutions (special issue on physical, chemical and biological effects of gamma radiation, II), *Bulletin of the Institute for Chemical Research* 39 (1961) 99-111.
- Sakurada I., Ikada Y., Effects of gamma radiation on polymers in solutions. (VII): Effects of degree of polymerization on crosslinking of poly(vinyl alcohol) in aqueous solutions (special issue on physical, chemical and biological effects of gamma radiation, V), *Bulletin of the Institute for Chemical Research* 42 (1964) 22-31.
- Santos C.A.D., Seckler M.M., Ingle A.P., Gupta I., Galdiero S., Galdiero M., Gade A., Rai M., Silver nanoparticles: Therapeutical uses, toxicity, and safety issues, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 103 (2014) 1931-1944.
- Schatz C., Pichot C., Delair T., Viton C., Domard A., Static light scattering studies on chitosan solutions: From macromolecular chains to colloidal dispersions, *Langmuir* 19 (2003) 9896-9903.
- Spasojević J., Radosavljević A., Krstić J., Jovanović D., Spasojević V., Kalagasidis-Krušić M., Kačarević-Popović Z., Dual responsive antibacterial Ag-poly(N-isopropylacrylamide/itaconic acid) hydrogel nanocomposites synthesized by gamma irradiation, *European Polymer Journal* 69 (2015a) 168-185.
- Spasojević J., Radosavljević A., Krstić J., Mitrić M., Popović M., Rakočević Z., Kalagasidis-Krušić M., Kačarević-Popović Z., Structural characteristics and bonding environment of Ag nanoparticles synthesized by gamma irradiation within thermo-responsive poly(N-isopropylacrylamide) hydrogel, *Polymer Composites* (2015b) DOI: 10.1002/pc.23665.
- Strand S.P., Vårum K.M., Østgaard K., Interactions between chitosans and bacterial suspensions: Adsorption and flocculation, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 27 (2003) 71-81.
- Subbiah R., Veerapandian M., Yun K.S., Nanoparticles: Functionalization and multifunctional applications in biomedical sciences, *Current Medicinal Chemistry* 17 (2010) 4559-4577.

- Swaroop K., Francis S., Somashekarappa H.M., Gamma irradiation synthesis of Ag/PVA hydrogels and its antibacterial activity, *Materials Today: Proceedings* 3 (2016) 1792-1798.
- Szymańska E., Winnicka K., Stability of chitosan - A challenge for pharmaceutical and biomedical applications, *Marine Drugs* 13 (2015) 1819-1846.
- Taşkın P., Canisağ H., Şen M., The effect of degree of deacetylation on the radiation induced degradation of chitosan, *Radiation Physics and Chemistry* 94 (2014) 236–239.
- The Center for Disease Dynamics, Economics & Policy (CDDEP), <http://www.cddep.org>.
(pristupljeno oktobra 2016.).
- U.S. EPA, Nanomaterial case study: Nanoscale silver in disinfectant spray (Final Report), U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/600/R-10/081F (2012) 423.
Dostupno na: <https://cfpub.epa.gov/ncea/risk/recorddisplay.cfm?deid=241665>
(pristupljeno oktobra 2016.).
- Ulanski P., Sonntag C.V., OH-Radical-induced chain scission of chitosan in the absence and presence of dioxygen, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* (2000) 2022–2028.
- Umemura K., Kawai S., Preparation and characterization of Maillard reacted chitosan films with hemicellulose model compounds, *Journal of Applied Polymer Science* 108 (2008) 2481-2487.
- Veenas C.L., Nissamudeen K.M., Smitha S.L., Biju V., Gopchandran K.G., Off-axis PLD: A novel technique for plasmonic engineering of silver nanoparticles, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* 11 (2009) 114-122.
- Wang X., Xu S., Xu W., Synthesis of highly stable fluorescent Ag nanocluster @ polymer nanoparticles in aqueous solution, *Nanoscale* 3 (2011) 4670-4675.
- Wani I.A., Ganguly A., Ahmed J., Ahmad T., Silver nanoparticles: ultrasonic wave assisted synthesis, optical characterization and surface area studies, *Materials Letters* 65 (2011) 520-522.
- Wu Y., Prevention of browning of depolymerized chitosan obtained by gamma irradiation, *Carbohydrate Polymers* 101 (2014) 857-863.

- Xia X., Zeng J., Zhang Q., Moran C.H., Xia Y., Recent developments in shape-controlled synthesis of silver nanocrystals, *Journal of Physical Chemistry C* 116 (2012) 21647-21656.
- Xiu Z.M., Zhang Q.B., Puppala H.L., Colvin V.L., Alvarez P.J.J., Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles, *Nano Letters* 12 (2012) 4271-4275.
- Xu H., Suslick K.S., Water-soluble fluorescent silver nanoclusters, *Advanced Materials* 22 (2010) 1078-1082.
- Yang X., Liu Q., Chen X., Yu F., Zhu Z., Investigation of PVA/ws-chitosan hydrogels prepared by combined γ -irradiation and freeze-thawing, *Carbohydrate Polymers* 73 (2008) 401-408.
- Zainol I., Akil H.M., Mastor A., Effect of γ -irradiation on the physical and mechanical properties of chitosan powder, *Materials Science and Engineering C* 29 (2009) 292-297.
- Zhang S.J., Yu H.Q., Radiation-induced degradation of polyvinyl alcohol in aqueous solutions, *Water Research* 38 (2004) 309-316.
- Zhao F., Yao D., Guo R., Deng L., Dong A., Zhang J., Composites of polymer hydrogels and nanoparticulate systems for biomedical and pharmaceutical applications, *Nanomaterials* 5 (2015) 2054-2130.
- Zhu J., Marchant R.E., Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds, *Expert Review of Medical Devices* 8 (2011) 607-626.

8. PRILOZI

ANEKS

Naučni radovi i saopštenja u kojima su publikovani rezultati iz doktorske disertacije

M14 - Monografska studija/poglavlje u knjizi M12 (Monografija međunarodnog značaja) ili rad u tematskom zborniku međunarodnog značaja

1. A. Radosavljević, **J. Krstić**, J. Spasojević, Z. Kačarević-Popović: **Radiolytic synthesis of nanocomposites based on noble metal nanoparticles and natural polymer, and their application as biomaterial**, in "Radiation Curing of Composites for Enhancing Their Features and Utility in Health Care and Industry", Chapter 11, pp. 167-184, (2015) (IAEA-TECDOC-1764, ISBN 978-92-0-103815-9), International Atomic Energy Agency (IAEA).

M21 – Rad objavljen u vrhunskom međunarodnom časopisu

1. **J. Krstić**, J. Spasojević, A. Radosavljević, M. Šiljegović, Z. Kačarević-Popović, **Optical and structural properties of radiolytically *in situ* synthesized silver nanoparticles stabilized by chitosan/poly(vinyl alcohol) blends**, *Radiation Physics and Chemistry*, 96 (2014) 158-166.

M22 - Rad u istaknutom međunarodnom časopisu

1. **J. Krstić**, J. Spasojević, A. Radosavljević, A. Perić-Grujić, M. Đurić, Z. Kačarević-Popović, S. Popović, **In vitro silver ion release kinetics from nanosilver/poly(vinyl alcohol) hydrogels synthesized by gamma irradiation**, *Journal of Applied Polymer Science*, 131 (2014) 40321.

M33 –Saopštenja sa međunarodnih naučnih skupova štampana u celini

1. **J. Krstić**, A. Krklješ, Z. Kačarević-Popović, **Swelling behavior of Ag/PVA hydrogel nanocomposite synthesized by γ -irradiation**, 10th International Conference of Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, PHYSICAL

CHEMISTRY 2010, September 21-24 (2010) Belgrade, Serbia, Proceedings, p. 110-112.

2. **J. Krstić**, J. Spasojević, A. Radosavljević, N. Abazović, U. Jovanović, Z. Kačarević-Popović, **Ag-PVA/wsCS blend hydrogel nanocomposite synthesized by γ -irradiation followed by freeze/thawing method**, 12th International Conference of Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, PHYSICAL CHEMISTRY 2014, September 22-26 (2014) Belgrade, Serbia, Proceedings, p.566-569.

M34 – Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu

1. **J. Krstić**, A. Krklješ, A. Perić-Grujić, M. Mitrić, Z. Kačarević-Popović, **Hybrid Ag/PVA hydrogel nanocomposites for potential biomedical application synthesized by gamma irradiation**, X International Conference on Nanostructured Materials NANO 2010, Rome, Italy, September 13-17 (2010) Abstracts book, Poster-Th-98, p.191.

2. **J. Krstić**, A. Krklješ, M. Mitrić, Z. Kačarević-Popović, **Characterization and swelling kinetics of Ag/PVA hydrogel nanocomposite synthesized by γ -irradiation**, International Workshop on Processing of Nanostructured Ceramics, Polymers and Composites, Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia, November 29-30 (2010) Book of Abstracts, Poster-P4, p.48.

3. **J. Krstić**, J. Spasojević, A. Krklješ, Z. Kačarević-Popović, **Swelling kinetics and antimicrobial activity of radiolytically synthesized nano-Ag/PVA hydrogels**, 12th Tihany Symposium on Radiation Chemistry, Zalakaros, Hungary, August 27 - September 1 (2011) Program and Abstracts, p.110.

4. **J. Krstić**, J. Spasojević, A. Radosavljević, M. Mitrić, Z. Kačarević-Popović, **Chitosan/poly(vinyl alcohol) blend as a capping agent for gamma irradiation induced *in situ* synthesis of silver nanoparticles**, 10th Young Researchers' Conference - Materials Science and Engineering, Serbian Academy of Sciences and Arts (SASA), Belgrade, Serbia, December 21-23 (2011) Program and the Book of Abstracts, XI/3, p.45.

5. **J. Krstić**, J. Spasojević, A. Radosavljević, Z. Kačarević-Popović, **Gamma irradiation technique for plasmonic nanoengineering of Ag/hydrogel**

nanocomposites, The 3rd International Conference of the Physics of Optical Materials and Devices ICOM 2012, Belgrade, Serbia, September 3-6 (2012) Book of Abstracts, p.240.

6. **J. Krstić**, J. Spasojević, A. Radosavljević, M. Šiljegović, Z. Kačarević-Popović, **Silver-chitosan/poly(vinyl alcohol) nanocomposites obtained by gamma irradiation induced *in situ* synthesis**, First International Conference Processing, Characterisation and Application of Nanostructured Materials and Nanotechnology NanoBelgrade 2012, Belgrade, Serbia, September 26-28 (2012) Book of Abstracts, PP17, (ISBN 978-86-7401-285-7) p.95.

7. **J. Krstić**, J. Spasojević, A. Radosavljević, Z. Kačarević-Popović, **Drug delivery paradigm of silver ions released from Ag/PVA hydrogel nanocomposites obtained by radiation chemistry nanoreactor method**, 11th Young Researchers' Conference - Materials Science and Engineering 2012 & 1st European Early Stage Researchers' Conference on Hydrogen Storage, Serbian Academy of Sciences and Arts (SASA), Belgrade, Serbia, December 3-5 (2012) Program and the Book of Abstracts, Y19, p.107.

8. Z. Kačarević-Popović, A. Radosavljević, **J. Krstić**, J. Spasojević, **On the use of gamma irradiation for the nanoengineering of the Ag and Au/hydrogel based nanosystems for the potential biomedical applications**, 28th Miller Conference On Radiation Chemistry, Dead Sea, Israel, March 14-19 (2013) Scientific Programme and Abstracts, S5-2, p.25.

9. **J. Krstić**, J. Spasojević, A. Radosavljević, A. Perić-Grujić, Z. Kačarević-Popović, S. Popović, **Pharmacokinetic studies of controlled Ag⁺ ions released from hydrogel nanocomposites obtained by gamma irradiation**, 1st International Symposium on Nanoparticles/Nanomaterials and Applications, ISN2A, Caparica, Portugal, January 20-22 (2014) Book of abstracts, P46, p.361-362.

10. **J. Krstić**, J. Spasojević, A. Radosavljević, A. Perić-Grujić, M. Đurić, S. Popović, Z. Kačarević-Popović, **Kinetic aspects of Ag⁺-ions releasing mechanism from nano-Ag/hydrogels synthesized by γ -irradiation**, Joint Meeting of WG3 and WG4 COST Action CM1101, June 30-July 1 (2014) Belgrade, Serbia, Program and Abstracts, ST13, p.24.

11. **J. Krstić**, A. Radosavljević, J. Spasojević, N. Abazović, M. Popović, Z. Rakočević, U. Jovanović, Z. Kačarević-Popović, **Optical properties of Ag/PVA/CM-CS hydrogel nanocomposites obtained by gamma-irradiation**, Fourth International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, Sitges, Spain, March 9-13 (2015) Abstracts Book (online version), P2.329.

12. **J. Krstić**, A. Radosavljević, J. Spasojević, M. Djurić, D. Jovanović, S. Popović, Z. Kačarević-Popović, **Antibacterial Ag-poly(vinl alcohol)/ws chitosan hydrogel synthesized by gamma irradiation**, Fourth International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research (RAD 2016), Niš, Serbia, May 23-27 (2016) Book of Abstracts, p.396.

BIOGRAFIJA AUTORA

Jelena Krstić je rođena 30.07.1982. godine u Beogradu.

Obrazovanje

Septembar 2010: **Doktorske studije.**

Fakultet za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu.

Septembar 2010: **Diplomirani fizikohemičar-Master**

Fakultet za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu.

Tema master rada: *Fizičkohemijska svojstva srebro/poli(vinil alkohol) hidrogel nanokompozita sintetisanog gama zračenjem.*

Avgust 2009: **Diplomirani fizikohemičar.**

Fakultet za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu.

Tema diplomskog rada: *Uticaj parametara sinteze na kinetiku formiranja fullerola.*

Profesionalno iskustvo

Februar 2011.: Kandidat je zaposlena na Institutu za nuklearne nauke "Vinča"; angažovana na projektu III 45005 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja RS; i na dva međunarodna koordinisana istraživačka projekta (Coordinated Research Projects, CRP) čiji je organizator Međunarodna agencija za atomsku energiju (MAAE): (i) Projekat F23028 - "Nanoscale Radiation Engineering of Advanced Materials for Potential Biomedical Applications" i (ii) Projekat F22051 - "Radiation Curing of Composites for Enhancing their Feature and Utility in Healthcare and Industry".

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Јелена Крстић _____

број индекса _____ 311/10 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Радиолитички синтетисани нанокомполитни материјали на бази
поли(винил алкохола), хитозана и наночестица сребра пројектовани за
биомедицинску примену

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

Потпис докторанда

У Београду, _____ 01.12.2016. _____


_____ Јелена Крстић _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Јелена Крстић _____

Број индекса _____ 311/10 _____

Студијски програм _____

Насловрада _____ Радиолитички синтетисани нанокомполитни материјали на бази
поли(винил алкохола), хитозана и наночестица сребра
_____ пројектовани за биомедицинску примену _____

Ментор _____ проф. др Вера Дондур и др Александра Радосављевић _____

Потписани/а _____ Јелена Крстић _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____ 01.12.2016. _____


_____ Јелена Крстић _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Радиолитички синтетисани нанокмпозитни материјали на бази
поли(винил алкохола), хитозана и наночестица сребра пројектовани
за биомедицинску примену

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____ 01.12.2016. _____



Јелена Крстић

1. Ауторство - Дозвољавање 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. Дозвољавање 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 прераде. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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 прераде. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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.