

UNIVERZITET U BEOGRADU  
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Jovana S. Zvicer

**PRIMENA BIOMIMIČNIH BIOREAKTORA U  
DIZAJNIRANJU I KARAKTERIZACIJI NOVIH  
BIOMATERIJALA ZA INŽENJERSTVO TKIVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Jovana S. Zvicer

**APPLICATION OF THE BIOMIMETIC  
BIOREACTORS IN DESIGN AND  
CHARACTERIZATION OF NOVEL  
BIOMATERIALS FOR TISSUE ENGINEERING**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020.

**Mentor:**

---

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

**Članovi komisije:**

---

Dr Đorđe Janačković, redovni profesor  
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

Dr Vesna Mišković-Stanković, redovni profesor  
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

Dr Jasmina Stojkowska, naučni saradnik  
Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu

---

Dr Nenad Ignjatović, naučni savetnik  
Institut tehničkih nauka SANU

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

*Veliku zahvalnost na ukazanom poverenju, inspiraciji, nesebičnoj pomoći i savetima prilikom izrade, a posebno na razumevanju i beskrajnom strpljenju prilikom pisanja ove doktorske disertacije, dugujem svojoj mentorki prof. dr Bojani Obradović.*

*Dragim članovima komisije, prof. dr Vesni Mišković-Stanković, prof. dr Đorđu Janačkoviću i dr Nenadu Ignjatoviću zahvaljujem na posvećenosti i merljivom doprinosu koji su pružili prilikom izrade ove disertacije svojim stručnim savetima i komentarima.*

*Dr Jasmini Stojkovskoj posebno hvala na podeljenom znanju, čestim razmenama ideja i sveukupnoj pomoći i podršci tokom izrade i pisanja disertacije.*

*Zahvaljujem:*

*Dr Predragu Petroviću, dr Đorđu Veljoviću, dr Milošu Petroviću, dr Kati Tričković, dr Ivani Jevremović, Katarini Nešović, dr Salji Jevtić na pomoći prilikom sprovođenja analiza.*

*Prof. dr Saši Novak, dr Ani Medič, dr Urški Potočar i dr Lenardu Gironda na znanju i iskustvu koje sam stekla prilikom kratkog boravka u Sloveniji.*

*Saradnicima iz laboratorije: Srđanu Vidoviću, dr Danijeli Kostić, Mii Radonjić, dr Andrei Osmokrović i Jeleni Petrović na pomoći prilikom eksperimentalnog rada.*

*Prof. dr Novaku Blečiću na vremenu koje je posvetio čitanju, komentarima i sigestijama oko pisanja teze.*

*Prijateljima na strpljenju i podršci.*

*Mojim roditeljima i porodici!*

*Hvala na pruženoj ljubavi.*

*Jovana Zvicer*



# PRIMENA BIOMIMIČNIH BIOREAKTORA U DIZAJNIRANJU I KARAKTERIZACIJI NOVIH BIOMATERIJALA ZA INŽENJERSTVO TKIVA

## REZIME

Cilj istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji je bila primena biomimičnih bioreaktora za sveobuhvatnu i fiziološki relevantnu karakterizaciju novih bioaktivnih biomaterijala za potencijalnu primenu u inženjerstvu tkiva, a time i razvoj novih metodologija za pouzdanu evaluaciju biomaterijala. Ispitani su nanokompozitni hidrogelovi alginata sa nanočesticama srebra za inženjerstvo tkiva artikularne hrskavice i hidrogelovi gelanske gume sa nanočesticama bioaktivnog stakla za inženjerstvo tkiva kosti i osteohondralnog tkiva primenom dva biomimična bioreaktora: protočnog i bioreaktora sa dinamičkom kompresijom. Poseban cilj ove disertacije je bio i razvoj novog bioreaktora za inženjerstvo tkiva intervertebralnog diska.

Ispitivanja nanokompozitnih Ag/alginatih hidrogelova baziranih na dve vrste alginata pokazala su da polazni sastav alginata utiče na veličinu i kinetiku otpuštanja nanočestica srebra i mehaničke karakteristike hidrogelova u fiziološki relevantnim bioreaktorskim uslovima, na osnovu kojih je određena njihova potencijalna primena. Kinetika otpuštanja srebra je uspešno modelovana prenosom mase difuzijom i konvekcijom.

Makroporozni hidrogelovi na bazi gelanske gume i bioaktivnog stakla sa otvorenim porama su dobijeni unapređenom procedurom, a u fiziološki relevantnim uslovima u protočnom bioreaktoru došlo je do značajnog formiranja kalcijum fosfata i poboljšanja mehaničkih karakteristika. Razvijena je i jednostavna metoda za dobijanje dvofaznih osteohondralnih implantata sa dobrom integracijom između slojeva.

Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji su potvrdili značaj i široki potencijal primene biomimičnih bioreaktora i sprovedene metodologije u više naučnih oblasti, od razvoja novih biomaterijala i inženjerstva tkiva do nanotoksikologije i biologije ćelija.

**Ključne reči:** biomimični bioreaktori, 3D modeli, fiziološki relevantna karakterizacija, *in vitro* – *in vivo* jaz, nanočestice srebra, nanokompozitni hidrogelovi, kinetika otpuštanja srebra, citotoksičnost u 2D i 3D sistemu, bioaktivno staklo, osteohondralni implantati

**Naučna oblast:** TEHNOLOŠKO INŽENJERSTVO

**Uža naučna oblast:** HEMIJSKO INŽENJERSTVO

**UDK broj:**

# APPLICATION OF THE BIOMIMETIC BIOREACTORS IN DESIGN AND CHARACTERIZATION OF NOVEL BIOMATERIALS FOR TISSUE ENGINEERING

## ABSTRACT

The aim of this doctoral dissertation was application of biomimetic bioreactors for comprehensive and physiologically relevant characterization of novel, bioactive biomaterials intended for tissue engineering (TE), and, consequently development of new methodologies for reliable biomaterial evaluation, as well. The focus was on nanocomposite alginate hydrogels with silver nanoparticles (AgNPs) for articular cartilage TE and gellan gum hydrogels with bioactive glass nanoparticles (GG-BAG) for bone and osteochondral TE, while two biomimetic bioreactors were applied: perfusion and a bioreactor with dynamic compression. The specific goal of this dissertation was also development of a novel bioreactor for intervertebral disc TE.

Investigation of nanocomposite Ag/alginate hydrogels based on two alginate types has shown that the initial alginate composition affects the size and release kinetics of AgNPs, as well as hydrogel mechanical properties under physiologically relevant bioreactor conditions, which indicated the potential use for each alginate hydrogel type. The silver release kinetics was successfully modeled by mass transfer by diffusion and advection-diffusion.

Macroporous GG-BAG hydrogels with open pores were obtained by a novel procedure. Physiologically relevant conditions in perfusion bioreactors enhanced calcium phosphate formation and improved hydrogel mechanical properties. Also, a simple method was developed for obtaining biphasic osteochondral implants with good integration between layers.

The obtained results indicate the significance and vast potentials of biomimetic bioreactors and methodologies developed in this doctoral dissertation for applications in different scientific fields from biomaterials science and TE to nanotoxicology and cell biology.

**Keywords:** biomimetic bioreactors, 3D models, physiologically relevant characterization, *in vitro* – *in vivo* gap, silver nanoparticles, nanocomposite hydrogels, silver release kinetic, cytotoxicity in 2D and 3D systems, bioactive glass, osteochondral implants

**Scientific field:** TECHNOLOGY AND ENGINEERING

**Scientific subfield:** CHEMICAL ENGINEERING

**UDC number:**

# SADRŽAJ

<b>UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1 TEORIJSKE OSNOVE .....</b>	<b>2</b>
1.1 Inženjerstvo tkiva: koncept, mogućnosti i dostignuća .....	2
1.2 Inženjerstvo tkiva hrskavice i kosti .....	4
1.2.1 Artikularna hrskavica: sastav, građa i biomehaničke sile u tkivu .....	4
1.2.2 Inženjerstvo tkiva artikularne hrskavice.....	6
1.2.2.1 Biomaterijali u inženjerstvu tkiva artikularne hrskavice .....	6
1.2.2.1.1 Alginat.....	6
1.2.2.1.2 Nanočestično srebro .....	8
1.2.2.2 Bioreaktori u inženjerstvu tkiva hrskavice.....	9
1.2.3 Kost: sastav, građa i biomehaničke sile u tkivu .....	12
1.2.4 Inženjerstvo tkiva kosti.....	14
1.2.4.1 Biomaterijali u inženjerstvu tkiva kosti .....	14
1.2.4.1.1 Gelanska guma .....	15
1.2.4.1.2 Bioaktivno staklo .....	16
1.2.4.2 Bioreaktori u inženjerstvu tkiva kosti.....	16
1.2.5 Inženjerstvo osteohondralnog tkiva.....	19
1.2.6 Intervertebralni disk: sastav, građa i biomehaničke sile u tkivu .....	20
1.2.7 Inženjerstvo tkiva intervertebralnog diska.....	21
1.2.7.1 Biorektori sa hidrostaičkim pritiskom u inženjerstvu IVD .....	22
1.3 Pristupi u karakterizaciji biomaterijala.....	25
<b>2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>29</b>
<b>3 MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>30</b>
3.1 Materijali i hemikalije.....	30
3.2 Biorektorski sistemi .....	30
3.2.1 Protočni bioreaktor .....	31
3.2.2 Bioreaktor sa dinamičkom kompresijom i protokom medijuma .....	32
3.2.2.1 Određivanje raspodele vremena zadržavanja i distribucije obeležene supstance u komorama za osteohondralne implante.....	33
3.2.3 Bioreaktor sa hidrostatičkim pritiskom .....	34
3.2.3.1 Ispitivanje rada prototipa bioreaktora sa hidrostatičkim pritiskom .....	35
3.3 Elektrohemijska sinteza nanočestica srebra .....	35
3.4 Dobijanje nanokompozitnih Ag/alginatnih hidrogelova .....	36

3.4.1	Dobijanje hidrogelova u obliku diskova.....	36
3.4.2	Dobijanje nanokompozitnih Ag/alginatnih mikročestica .....	36
3.5	Dobijanje PVA/PVP diskova.....	37
3.6	Izolacija eksplantata i hondrocita iz articularne hrskavice.....	37
3.7	Mehanička stabilnost Ag/alginatnih diksova u bioreктору sa dinamičkom kompresijom .....	38
3.8	Određivanje citotoksičnosti Ag/alginatnih nanokompozitnih hidrogelova .....	38
3.8.1	Određivanje citotoksičnosti u 2D sistemima na monosloju ćelija.....	39
3.8.1.1	Ispitivanje citotoksičnosti Ag/alginatnih koloidnih rastvora .....	39
3.8.1.2	Ispitivanje citotoksičnosti Ag/alginatnih diksova u direktnom kontakt testu .....	39
3.8.1.3	Ispitivanje citotoksičnosti Ag/alginatnih diskova u ekstrakcionom testu .....	39
3.8.2	Određivanje citotoksičnosti u 3D sistemu u kulturi tkiva.....	40
3.8.2.1	Ispitivanje citotoksičnosti Ag/alginatnih koloidnih rastvora .....	40
3.8.2.2	Ispitivanje citotoksičnosti Ag/alginatnih mikročestica .....	40
3.8.2.3	Ispitivanje citotoksičnosti Ag/alginatnih diskova .....	40
3.9	Otpuštanje srebra iz Ag/alginatnih diskova u uslovima dinamičke kompresije.....	41
3.9.1	Migracija nanočestica srebra iz Ag/alginatnih diskova u hidrogel u direktnom kontaktu .....	41
3.9.2	Kinetika otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih diskova .....	41
3.10	Dobijanje hidrogelova gelanske gume sa nanočesticama bioaktivnog stakla .....	41
3.11	Karakterizacija hidrogelova gelanske gume sa nanočesticama bioaktivnog stakla .....	42
3.11.1	Određivanje inicijalne poroznosti rehidratiranih hidrogelova .....	42
3.11.2	Ispitivanje formiranja mineralne faze kalcijum fosfata .....	43
3.11.2.1	Procedura za pripremu simulirane telesne tečnosti .....	43
3.11.2.2	Eksperimentalni sistem .....	43
3.11.2.3	Formiranje mineralne faze kalcijum fosfata unutar hidrogelova GG-BAG sa unutrašnjim porama .....	43
3.11.2.4	Formiranje mineralne faze kalcijum fosfata unutar makroporoznih hidrogelova GG-BAG sa otvorenim porama duž akcijalnih strana.....	44
3.12	Dobijanje dvofaznih implantata za inženjerstvo osteohondralnog tkiva .....	44
3.13	Karakterizacija dvofaznih implantata u bioreктору sa dinamičkom kompresijom .....	45
3.14	Fizičko-hemijske metode karakterizacije materijala .....	46
3.14.1	Infracrvena spektrometrijska analiza sa Furijeovom transformacijom (FTIR) .....	46
3.14.2	UV-vidljiva spektroskopija .....	46
3.14.3	Raman spektroskopija .....	46
3.14.4	Atomska apsorpciona spektroskopija (AAS) i optička emisiona spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES) .....	46
3.14.5	Rendgenska difrakcija X-zraka (XRD).....	47

3.14.6	Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) i energodisperzivna spektroskopija X-zracima (EDS) .....	47
3.14.7	Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM) .....	48
3.14.8	Optička mikroskopija .....	48
3.15	Biološka karakterizacija .....	48
3.15.1	MTT test.....	48
3.15.2	Histološka analiza .....	49
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>50</b>
4.1	Karakterizacija Ag/alginatnih nanokompozita u 2D i 3D sistemima .....	50
4.1.1	Dobijanje Ag/alginatnih koloidnih rastvora.....	50
4.1.1.1	TEM analiza koloidnih rastvora .....	51
4.1.2	Dobijanje Ag/alginatnih hidrogelova.....	52
4.1.2.1	TEM analiza rastvorenih Ag/alginatnih diskova .....	52
4.1.3	FTIR analiza alginatnih i koloidnih rastvora i hidrogelova .....	53
4.1.4	Funkcionalna karakterizacija Ag/alginatnih nanokompozita primenom biomimičnog bioreaktora .....	55
4.1.4.1	Mehanička stabilnost <i>MG</i> i <i>VG</i> Ag/alginatnih diskova .....	56
4.1.4.2	Citotoksičnost u 2D sistemima na monosloju ćelija .....	57
4.1.4.2.1	Ag/alginatni koloidni rastvor .....	57
4.1.4.2.2	Ag/alginatni diskovi - direktni kontakt test .....	59
4.1.4.2.3	Ag/alginatni diskovi – indirektni ekstrakcioni test .....	61
4.1.4.3	Citotoksičnost u 3D sistemima u kulturi tkiva .....	62
4.1.4.3.1	Ag/alginatni koloidni rastvor .....	62
4.1.4.3.2	Ag/alginatne mikročestice.....	63
4.1.4.3.3	Ag/alginatni diskovi .....	67
4.1.5	Otpuštanje nanočestica srebra iz Ag/alginatnih diskova u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom.....	68
4.1.5.1	Migracija nanočestica srebra iz Ag/alginatnih diskova u hidrogel u direktnom kontaktu ..	68
4.1.5.2	Kinetika otpuštanja srebra .....	70
4.2	Hidrogelovi gelanske gume sa nanočesticama bioaktivnog stakla .....	72
4.2.1	Hidrogelovi gelanske gume i bioaktivnog stakla sa unutrašnjim porama .....	73
4.2.2	Makroporozni hidrogelovi gelanske gume i bioaktivnog stakla .....	75
4.2.3	Karakterizacija hidrogelova gelanke gume i bioaktivnog stakla.....	77
4.2.3.1	Karakterizacija hidrogelova gelanke gume i bioaktivnog stakla sa unutrašnjim porama ...	77
4.2.3.1.1	SEM analiza.....	77

4.2.3.1.2	EDS analiza.....	83
4.2.3.1.3	Ramanska mikroskopija.....	87
4.2.3.1.4	Mehaničke karakteristike uzoraka u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom .....	89
4.2.3.2	Karakterizacija makroporoznih hidrogelova gelanske gume sa bioaktivnim staklom .....	90
4.2.3.2.1	SEM analiza.....	90
4.2.3.2.2	EDS analiza.....	93
4.2.3.2.3	ICP elementarna analiza.....	94
4.2.3.2.4	FTIR analiza.....	95
4.2.3.2.5	XRD analiza .....	96
4.2.3.2.6	Mehaničke karakteristike .....	98
4.3	Dvofazni implantati za inženjerstvo osteohondralnog tkiva .....	100
4.3.1	Određivanje raspodele vremena zadržavanja i distribucije obeležene supstance u komorama za osteohondralne implante .....	103
4.3.2	Karakterizacija dvofaznih implantata u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom.....	106
4.3.2.1	Formiranje mineralne faze .....	106
4.3.2.2	Mehaničke karakteristike .....	110
4.4	Ispitivanje rada prototipa bioreaktora sa hidrostatičkim pritiskom .....	112
<b>5</b>	<b>DISKUSIJA.....</b>	<b>119</b>
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČAK.....</b>	<b>128</b>
<b>7</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>130</b>
<b>8</b>	<b>PRILOG .....</b>	<b>152</b>
8.1	SPISAK SLIKA .....	152
8.2	SPISAK TABELA.....	160

## UVOD

Biomimični bioreaktori su neizostavan deo strategije *in vitro* razvoja tkivnih ekvivalenata jer obezbeđuju deo neophodnih uslova potrebnih ćelijama da vrše svoju prirodnu funkciju. U prvom redu oni omogućavaju dopremanje nutrijenata i metabolita do centralnih delova 3D *in vitro* ćelijskih konstrukata, prevazilazeći difuziona ograničenja u konvencionalnim statičkim studijama. Takođe, bioreaktori na definisan način oponašaju jedan ili više biofizičkih signala karakterističnih za određeno tkivo ili organ, te omogućavaju sistematsko izučavanje ćelijskog odgovora u odnosu na različite biomehaničke i biohemijske signale, ili njihovo sinergističko dejstvo, u karakterističnom 3D okruženju.

Pored važnosti i relevantnosti u biološkim ispitivanjima, biomimični bioreaktori omogućavaju dalji razvoj inženjerstva tkiva i biomedicine, pronalazeći mesto i u karakterizaciji potencijalnih biomaterijala u fiziološki-relevantnim uslovima. Biomedicinske nauke poslednjih godina fokus stavljaju na razvoj novih biomaterijala sa unapređenim karakteristikama, sa ciljem da se ovakvi materijali nađu u kliničkoj primeni. Intenzivan razvoj biomaterijala zahteva uspostavljanje adekvatnih metoda i modela u pogledu definisanja osobina biomaterijala, sa ciljem da se sprovede pravilna trijaža, te da se samo najpodobniji kandidati dalje evaluiraju u *in vivo* i kliničkim istraživanjima. Prilikom ispitivanja novi materijali bivaju prvenstveno okarakterisani u pogledu fizičko-hemijskih osobina, a zatim se njihova bezbednost i funkcionalnost ispituju *in vitro* i *in vivo*.

Primena biomimičnih bioreaktora u sveobuhvatnoj karakterizaciji biomaterijala trebalo bi da bude daleko veća, a opravdanost ovog stava zasniva se na relevantnosti evaluacije potencijalnih biomaterijala u dužem vremenskom periodu u uslovima koji blisko imitiraju uslove potencijalne primene. Tako, biomimični bioreaktori mogu dati kompletniji uvid u stabilnost, mehaničke karakteristike, citotoksičnost, bioaktivnost, biokompatibilnost i/ili kinetiku otpuštanja aktivnih komponenti biomaterijala u odnosu na klasične metode ispitivanja u statičkim uslovima i ćelijama u monosloju.

Razvoj novih materijala i tretmana je veoma dugotrajan i skup proces jer više od 90% rezultata u 2D kulturama i ispitivanjima na životinjama nije primenljivo ili se pokaže kao neadekvatno u kliničkim studijama. Razlog tome je postojanje velikog jaza između *in vitro* i *in vivo* ispitivanja. Ispitivanja u 2D ćelijskim kulturama omogućavaju jednostavne i brze studije sa strogo kontrolisanim ćelijskim okruženjem, previše pojednostavljenim u odnosu na fiziološke uslove. *In vivo* studije na životinjskim modelima, pak, ne ostavljaju mogućnost potpune kontrole okruženja, kao ni uvid u trenutne promene do kojih dolazi, dok su rezultati ovih studija najčešće pouzdani i primenljivi u okviru iste vrste. Valja napomenuti da se neretko rezultati *in vivo* ispitivanja pokažu zavisni od primerka do primerka, što dodatno objašnjava kompleksnost živih sistema. Primenom biomimičnih bioreaktora kao adekvatnih *in vitro* modela za fiziološki relevantnu karakterizaciju biomaterijala ovaj jaz bi mogao da se premosti. Dugoročno gledano, na ovaj način brže bi se dolazilo do primenljivih rezultata uz daleko manji broj bespotrebnih studija na životinjama.

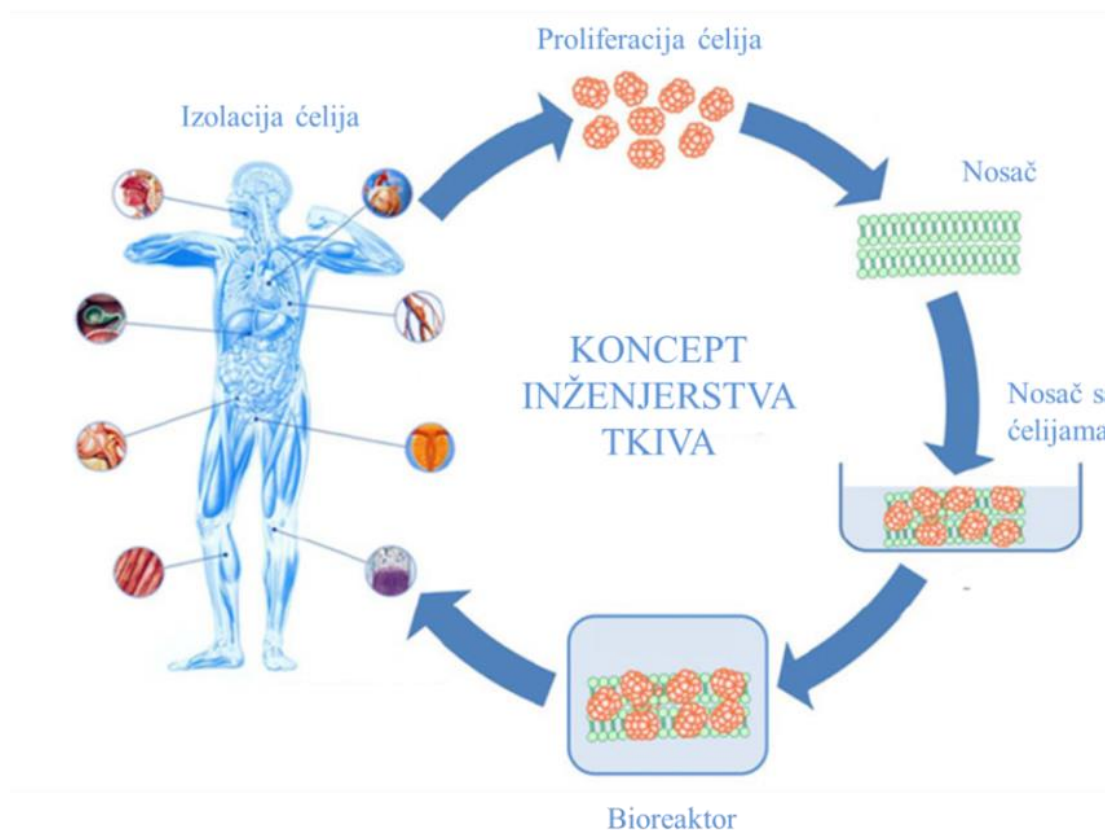
Cilj ove doktorske disertacije je bio primena protočnog bioreaktora i bioreaktora sa dinamičkom kompresijom i protokom medijuma u razvoju i fiziološki relevantnoj karakterizaciji biomaterijala za potencijalnu primenu u inženjerstvu tkiva hrskavice i kosti, kao i rani razvoj bioreaktora sa hidrostatičkim pritiskom za inženjerstvo intervertebralnog diska. U tom smislu, kroz teorijski deo disertacije sumirana je biologija tkiva hrskavice i kosti, kao osnova za razumevanje specifičnih zahteva koje je potrebno ispuniti, aktuelni pristupi kojima se želi doći do funkcionalnih rešenja, kao i zasnovanosti primene protočnog bioreaktora, bioreaktora sa dinamičkom kompresijom i bioreaktora sa hidrostatičkim pritiskom u konkretnoj nameni.

# 1 TEORIJSKE OSNOVE

## 1.1 INŽENJERSTVO TKIVA: KONCEPT, MOGUĆNOSTI I DOSTIGNUĆA

Inženjerstvo tkiva je relativno novo i složeno polje istraživanja, od molekularnog nivoa u oblasti genetike i razvojne biologije, do *in vitro* gajenja funkcionalnih tkivnih ekvivalenata i organa za potencijalnu kliničku upotrebu. Na putu do cilja potrebno je ujediniti različita znanja iz prirodnih, matematičkih i inženjerskih nauka kako bi se obuhvatili različiti aspekti istraživanja. Sa jedne strane, ova istraživanja uključuju rad sa ćelijama, biološki aktivnim molekulima, različitim materijalima (npr. polimerima, keramičkim i metalnim materijalima), a sa druge, uspostavljanje različitih hidrodinamičkih uslova pri kojima se ispitivanja vrše, i na kraju matematičko modelovanje. Osim što je multidisciplinarnan, ovaj pristup je i multidimenzionalan jer prati promene na različitim nivoima – od makro do nano.

Koncept inženjerstva tkiva podrazumeva obezbeđivanje adekvatnih *in vitro* uslova koji oponašaju biohemijske i mehaničke signale odgovorne za regulaciju razvoja i pravilno funkcionisanje tkiva *in vivo* (Freed i Vunjak-Novaković, 2000). Tri osnovne komponente na kojima se zasniva inženjerstvo tkiva su: ćelije, nosači i biomimični bioreaktori, slika 1.1.



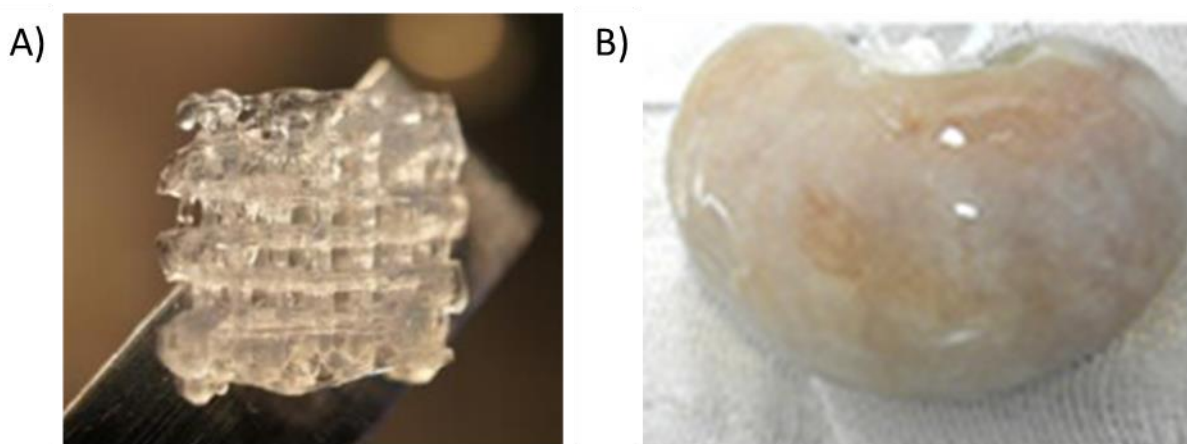
**Slika 1.1** Koncept inženjerstva tkiva uključuje izolaciju adekvatnih ćelija iz pacijenta ili drugog izvora, njihovu proliferaciju, zasejavanje na 3D nosače i gajenje u biomimičnim bioreaktorima sa ciljem da se dobije tkivni ekvivalent za dalju implantaciju (Saxena, 2010)

**Ćelije** prema svom poreklu mogu biti: ksenologne (poreklom od životinja), alogene (poreklom od humanog donora) i autologne (poreklom od samog pacijenta). Pored autolognih, diferentovanih ćelija koje imaju ograničenu dostupnost, u inženjerstvu tkiva sve češću primenu nalaze matične ćelije poreklom iz koštane srži, pupčane vrpce, masnog tkiva i sl. Indukovane pluripotentne matične ćelije, dobijene reprogramiranjem adultnih ćelija iz tkiva zdravih pacijenata



(kože, krvi i drugih) predstavljaju revolucionarno rešenje, brz i siguran izvor matičnih ćelija (Wobma i Vunjak-Novakovic, 2016). Matične ćelije stimulirane faktorima rasta i/ili biomehaničkim stimulansima diferenciraju se u pravcu željenog fenotipa, te predstavljaju lako dostupan izvor ćelija za inostrazivanja.

**Nosači** ćelija koji se koriste u inženjerstvu tkiva predstavljaju 3D strukture koje imitiraju prirodni ekstracelularni matriks (ECM), omogućavaju adheziju i proliferaciju ćelija i mehaničku podršku, tj. biomimetično okruženje za ćelije u cilju ispoljavanja pravilne morfološke i metaboličke funkcije. Idealan nosač bi trebalo da bude biokompatibilan, da ne izaziva inflamatornu ili imunsku reakciju organizma i da se postepeno degradira brzinom kojom ćelije stvaraju novosintetisani ECM. Kao biomaterijali za nosače ispituju se i koriste različiti prirodni i sintetski polimeri, keramika, bioaktivno staklo, metali i razni kompoziti dizajnirani u raznovrsnim oblicima od hidrogelova, tkanina, sušera do precizno dizajniranih nosača. Razvojem tehnologije u centru interesovanja našli su se 3D bioštampani koji su pružili mogućnost razvoja multićelijskih i prostorno kontrolisanih 3D nosača, slika 1.2a (Park i sar., 2018).



**Slika 1.2** Neki primeri nosača: A) alginatni nosač dobijen 3D štampom (Kosik-Kozioł i sar., 2017), B) decelularizovani bubreg (Moghadassali i sar., 2019)

Takođe, kako bi se što više približili prirodnom okruženju u fokusu su jedno vreme bili nosači od decelularizovanih tkiva kao osnova za dobijanje anatomske i strukturno identične celih organa, slika 1.2b (Wobma i Vunjak-Novakovic, 2016). U odnosu na sintetisane nosače, decelularizovani nosači imaju razne prednosti, kao što su: anatomske oblike, sastav, mehanička svojstva, a njihovu širu primenu ograničava potreba za velikim brojem ćelija i razvoj metode za naseljavanje određenih ćelija na targetirano mesto unutar nosača (Tanaka i sar., 2015, Charest i sar., 2015, Wobma i Vunjak-Novakovic, 2016). Stoga, potreba za razvojem adekvatnih nosača koji mogu da ispune zahteve kao što su biološka i potporna funkcija, specifična za svako tkivo ili organ pojedinačno, i dalje postoji.

**Biomimetični bioreaktori** na kontrolisan i ponovljiv način treba da obezbede fizičko-hemijske signale neophodne za proliferaciju, diferenciranje i normalnu metaboličku aktivnost ćelija (Costa i sar., 2014). Pored toga, biomimetični bioreaktori zaduženi su za održavanje željenih uslova u hranljivom medijumu (kao što su temperatura, pH, osmolarnost, optimalne koncentracije kiseonika, nutrijenata, metabolita i regulatornih molekula), uspešno zasejavanje ćelija i efikasan prenos mase unutar nosača, kao i primenu fiziološki relevantnih fizičkih signala (npr. hidrodinamički smicajni naponi, hidrostatički pritisak, kompresija, istezanje). Na svaki organ ili tkivo u organizmu deluje drugačija kombinacija biohemijskih i biomehaničkih signala, zbog čega dizajn bioreaktora treba da bude posebno prilagođen svakom od njih. Projektovanje biomimetičnih bioreaktora je usmereno na kontrolisanu primenu najznačajnijeg fizičkog signala za regeneraciju i funkcionalnost određenog tkiva. Na tkiva u organizmu najčešće deluje više različitih sila istovremeno, ali usled kompleksnosti

sistema i kasnije interpretacije dobijenih rezultata, najčešće se razvijaju sistemi sa jednim, najrelevantnijim fizičkim signalom. Prilikom razvoja biorektorskih sistema potrebno je obratiti pažnju da se koriste bioinertni materijali otporni na vlagu i uslove u inkubatorima, da se delovi koji su u kontaktu sa ćelijskim materijalom i hranljivim medijumom mogu lako sterilisati (poželjno autoklaviranjem) ili dovoljno niske cene da se primenjuju za jednokratnu upotrebu, kao i da rukovanje sa ovim sistemima bude što jednostavnije za korisnike.

Primenom inženjersva tkiva, dobijanjem i implantacijom tkivnih ekvivalenata mnogi problemi, kao što su pronalaženje adekvatnog donora, nedovoljno dobra veza između veštačkog materijala proteze i prirodnog tkiva, imunske reakcije i infekcije, nefunkcionalnost tretiranog organa odmah nakon implantacije i sl. mogli bi se prevazići, čime bi se produžio životni vek i podigao kvalitet života pacijenata.

Nažalost, manji broj funkcionalnih gajenih tkiva dobijenih u laboratorijama podignut je na nivo kliničke primene (*L'Heureux i sar., 2007, Mumme i sar., 2016, Hoffman i sar., 2019*) pa je potrebno nastaviti istraživanja ne samo u pravcu razvoja, već i u pravcu definisanja procedura kako bi se dobijeni rezultati mogli primeniti u kliničkoj praksi. Potrebno je naglasiti da zahvaljujući istraživanjima iz oblasti inženjerstva tkiva otkriveni su novi biomolekuli, ćelijske funkcije i fenotipovi koje je u tradicionalnim 2D sistemima teško bilo identifikovani (*Hutmacher, 2010, Pickup i sar., 2014*). Takođe, učinjen je napredak u razumevanju: i) biokompatibilnosti i biorazgradljivosti materijala koji se koriste za sintezu nosača, ii) biološki funkcionalnih faktora unutar tkiva i iii) patofizioloških promena nastalih usled prisustva mikroorganizama u tkivima (*Rijal i sar., 2018*). Istraživanja u oblasti inženjerstva tkiva i regenerativne medicinu, rezultirala su novim saznanjima pre svega na polju personalizovane medicine, razvojne biologije, kao i na polju ćelijske terapije (*Ingber i sar., 2006, Ma i sar., 2012, Mardones i sar. 2015*). Korak napred napravljen je u oblasti ispitivanja kancer oboljenja gde su razvijeni različiti 3D modeli na bazi sferoida ili organoida koji su dali značajne rezultate (*Thakuri i sar., 2017, Chung, 2018*).

Poslednjih godina primarni fokus u biomedicini je definitivno pomeren ka pronalaženju adekvatnih 3D modela i sistema koji bi omogućili dobijanje što relevantnijih rezultata, uporedivih sa *in vivo* rezultatima. Jedno od izglednih rešenja je primena mikrotkivnih uređaja (*microtissue devices*) koji delimično imitiraju sisteme različitih organa i predstavljaju dobru platformu za ispitivanje potencijalnih lekova (*Wobma i Vunjak-Novakovic, 2016*). Međutim, ovi sistemi se ne mogu primenjivati za 3D ćelijske i tkivne kulture makroskopskih dimenzija, te je njihova primena limitirana. Sa druge strane, biomimetični biorektori pronalaze mesto u fiziološki relevantnim istraživanjima i sve češće se razmatraju kao adekvatni 3D modeli za ispitivanja u 3D tkivnim ili ćelijskim kulturama. Oni obezbeđuju najveću funkcionalnost uz minimalne troškove (*Martin i sar., 2004, Hoffman i sar., 2019*).

## 1.2 INŽENJERSTVO TKIVA HRSKAVICE I KOSTI

Artikularna hrskavica, kost, osteohondralno tkivo i intervertebralni disk predstavljaju delove skeletnog sistema koji se intenzivno ispituju usled velikog broja bolesti i obolelih za koje ne postoje adekvatna i trajna rešenja, kao i zbog sve veće potrebe za zamenom postojećih proteza relativno kratkog veka trajanja. Svako od pomenutih tkiva ima specifičnu građu i funkciju u organizmu, koje ujedno određuju pristup u inženjerstvu tkiva.

### 1.2.1 Artikularna hrskavica: sastav, građa i biomehaničke sile u tkivu

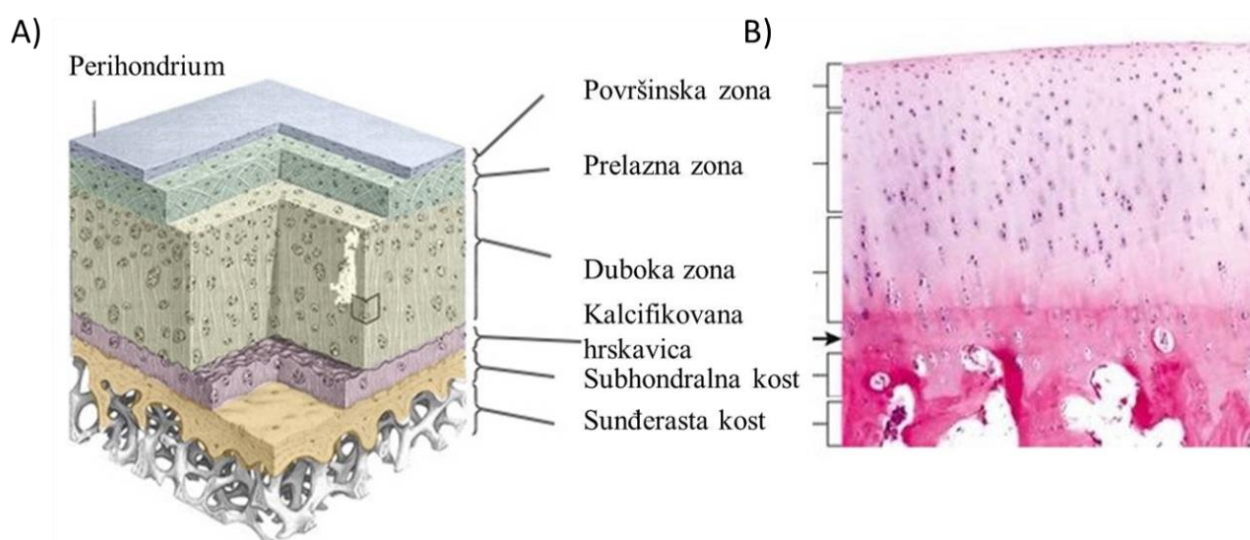
Artikularna hrskavica je oblik vezivnog tkiva koje se nalazi u sinovijalnim zglobovima gornjih i donjih ekstremiteta. Njena uloga je da omogući kretanje bez trenja zglobnih površina kao i da apsorbuje i prenese fiziološko opterećenje na kosti. Artikularna hrskavica je avaskularno i aneuralno tkivo, sa malom gustinom ćelija, svega 1% ukupne zapremine tkiva. Čelije su okružene

gustim ECM, i imaju malu proliferativnu aktivnost i tendenciju dediferentovanja, čime je sposobnost samoregeneracije ovog tkiva veoma ograničena (*Hunziker, 2002, Mow i Huijskes, 2005, Camarero-Espinosa i sar., 2016*).

Tkivo hrskavice je podeljeno u više zona (površinsku, prelaznu, duboku i zonu kalcifikovane hrskavice) u kojima su ćelije: hondrociti i hondroblasti i gradivne komponente ECM različito raspoređene, slika 1.3.

**Hondrociti** su nepokretne ćelije, smeštene u šupljinama ECM koje se nazivaju lakune i njihova glavna uloga je da sintetišu komponente ECM. Hondrociti sintetišu prokolagen, koji ulazi u sastav kolagenih vlakana (najčešće zastupljena su kolagena vlakna tipa II (*Maepa i sar., 2016*)), zatim glikozaminoglikane (GAG) i proteinska tela koja čine glikoproteine i proteoglikane (*Šerban, 1995*). **Hondroblasti** imaju ulogu da sintetišu strukturni glikoprotein koji se naziva hondronektin i koji je zadužen za ostvarivanje veze između vrhova citoplazmatičnih nastavaka ćelija ECM i kolagenih vlakana ECM, čime se ostvaruje veza između ćelija i ECM (*Šerban, 1995*).

Osobine hrskavičastog tkiva da je elastično i da trpi i raspoređuje fiziološki nivo opterećenje bez trajne deformacije potiču od strukture ECM koju čine voda (60–80%), zatim kolagena vlakana (10–15%) i proteoglikani (5–10%) (*Jaffe, 1974, Mayne, 1989, Hardingham i Fosang, 1992, Šerban 1995*). Glavna funkcija vode je hidratacija proteoglikana koji omogućavaju strukturnu raspoređenost kolagenih vnanaka ECM i manju frikciju zglobnih površina i njen sadržaj opada od površine idući prema dubljim slojevima (*Baumann i sar., 2019*).



**Slika 1.3** Struktura artikularne hrskavice: A) organizacija i morfologija zona hrskavice, B) histološki presek (*Karpiński i sar., 2019*)

Na površini artikularne hrskavice nalazi se sloj gustog vezivnog tkiva – perihondrium. Strukturu perihondrijuma u najvećoj meri izgradnju kolagena vlakna i ćelije slične fibroblastima (*Rikimaru-Nishi i sar., 2018, Laor i Jaramillo, 2019*). Odmah ispod perihondriuma smeštena je površinska zona (10 – 20% ukupne debljine hrskavice), zatim prelazna zona (oko 50% ukupne debljine hrskavice) i duboka zona (oko 35% ukupne debljine hrskavice) hrskavice (*Pearle i sar., 2005, Baumann i sar., 2019*).

Zona kalcifikovane hrskavice razdvaja meku artikularnu hrskavicu od subhondralne kosti i predstavlja granicu za razmenu hranljivih materija. Naime, obzirom da je hrskavica avaskularno tkivo, ishrana hondrocita se odvija procesom difuzije i to sa strane sinovijalnog fluida koji se nalazi u zglobu ili sa strane subhondralne kosti. Pored toga, jedan deo razmene hranljivih materija i proizvoda metabolizma se ostvaruje prinudnom konvencijom tokom procesa kompresije i

dekompresije artikularne hrskavice u toku normalnih dnevnih aktivnosti. Tokom kompresije dolazi do mehaničkog istiskivanja molekula vode, koji se tokom procesa dekompresije vraćaju u tkivo čime dolazi do stvaranja jedne vrste pumpe koja pomaže protok materija između ćelija hrskavice i okoline.

Površine artikularne hrskavice su izložene direktnoj kompresiji, smicajnim silama i hidrostatičkom pritisku (*Smith Lane i sar., 2000, Li i sar., 2001, Elder i Athanasiou, 2009*). Hrkavica kod ljudi pri dnevnim aktivnostima može da trpi veoma velika opterećenja koja se kreću i do 18 MPa (*Mow i sar., 1992, Ateshian i sar., 2003*). Pri fiziološkim opterećenjima dolazi do deformacije hrskavice do 13 % svoje debljine (*Chung i Burdick, 2008*). Smatra se da hondrogenezu podstiče fiziološki nivo kompresije pri uslovima cikličnog opterećenja od 1-6 MPa (*Ahmed i Burke, 1983, Brown i Shaw, 1983*), umerene učestalosti 0,01-2 Hz (*Park i sar., 2004*) uz manje vrednosti brzine kompresije (< 1000 MPa/s) (*Milentijevic i Torzilli, 2005*).

## 1.2.2 Inženjerstvo tkiva artikularne hrskavice

Inženjerstvo tkiva hrskavice je u fokusu istraživanja zbog visoke učestalosti oštećenja ovog tkiva ali i male sposobnosti samoregeneracije. Preko 10% svetske populacije starije od 30 godina ima neki od problema sa artikularnom hrskavicom. Čak i mali defekti površine oko 4 mm<sup>2</sup> predstavljaju problem za reparaciju. Iako je hrskavica jedno od prvih tkiva u fokusu inženjerstva tkiva, samo ograničen broj studija je došao do faze kliničkog ispitivanja i većina se oslanja na samoregeneraciju *in situ* bez značajnih rezultata u pogledu dobijanja i implantacije *in vitro* uzgojenog tkivnog implantata (*Camarero-Espinosa i sar., 2016*).

### 1.2.2.1 Biomaterijali u inženjerstvu tkiva artikularne hrskavice

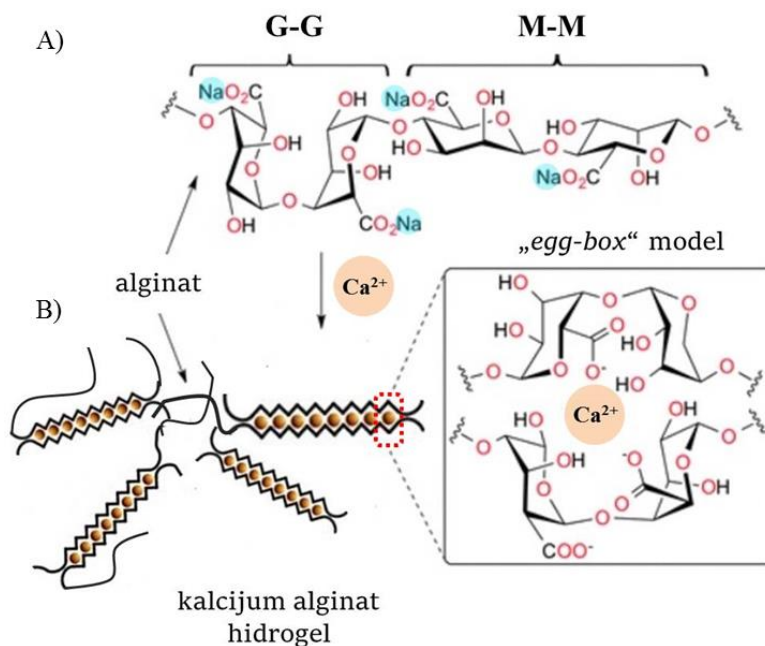
Biomaterijali koji se koriste u inženjerstvu tkiva hrskavice su najčešće hidrogelovi prirodnih polimera kao što su: alginat, hitozan, kolagen, hijeluronska kiselina, svila i želatin (*Hoffman, 2001*), jer zbog visokog sadržaja vode najbliže odgovoraju građi hrskavice. Alginat, usled velike hidrofilitnosti pogoduje da ćelije zadrže vijabilnost i metaboličku aktivnost nakon imobilizacije (*Kundu i sar., 2015*). Posebna mogućnost je poboljšanje funkcionalnosti alginata dodatkom biološki aktivnih agenasa kao što su nanočestice srebra. Nanočestice srebra pokazuju jaku antimikrobnu aktivnost i time potencijalni implantati na bazi nanokompozita Ag/alginatnih hidrogelova mogu da reše problem potencijalnih infekcija bolničkim sojevima bakterija prilikom implantacije. Bakterijska kontaminacija čest je uzročnik neuspelih operativnih procedura, a skoro 7% operisanih pacijenata bude inficirano (*Garibaldi i sar., 1991*). Zajedno sa razvojem potencijalnih implantata koji treba da povrate funkciju oštećenog tkiva, potrebno je razvijati i „mehanizme“ kako da ne dođe do operativnih komplikacija, kao što su infekcije.

#### 1.2.2.1.1 Alginat

Alginat je prirodni, linearni polisaharid koji se često primenjuje u biomedicini zbog velike biokompatibilnosti i mogućnosti da formira hidrogelove sa velikim sorpcionim kapacitetom što ga čini atraktivnim za primenu u inženjerstvu mekih tkiva ili u tretmanu rana. Dobija se preradom ćelijskog zida smeđih algi ili kao sekrecija dva roda bakterija (*Pseudomonas* i *Azotobacter*). Polimerni lanci alginata sastoje se iz jedinica  $\beta$ -D-manuronske (M) i  $\alpha$ -L-guluronske kiseline (G) koje mogu biti povezane u homopolimerne GG i MM blokove ili naizmenično raspoređene u GM blokove, slika 1.4a. U zavisnosti od vrste i starosti algi, njihovog geografskog porekla i perioda godine u kome su sakupljene, sastav (odnos G/M jedinica i njihov međusobni raspored) i karakteristike alginata (npr. molekulska težina) mogu u značajnoj meri da variraju (*Haug i sar., 1974, Jørgensen i sar., 2007, Sari-Chmayssem i sar., 2015*). To je jedan od praktično najvećih problema rada sa alginatom i uopšteno sa polimerima prirodnog porekla, koji zahteva detaljnu karakterizaciju svake šarže proizvoda posebno. Biosintezom pomoću bakterija se dobijaju alginati

nešto homogenijeg sastava, ali generalno i kod njih mogu postojati određene razlike u sastavu, a time i u karakteristikama dobijenih materijala (Lee i Mooney, 2012, Hay i sar., 2013).

Alginat je komercijalno dostupan kao natrijumova so (slika 1.4a). Proces geliranja i formiranja hidrogelova je opisan modelom kutije za jaja „egg-box“ (Grant i sar., 1973). Ovaj model podrazumeva izmenu jona natrijuma sa viševalentnim katjonima iz rastvora za geliranje, pri čemu se katjoni najpre vezuju za G jedinice stvarajući jake veze, a potom se vezuju jonskim interakcijama za karboksilne grupe ((-COO)) M jedinica (slika 1.4b). Veze između katjona i M jedinica su znatno slabije i lako raskidive u prisustvu jona iz fiziološke sredine (Stojkowska i sar., 2010, Draget i Taylor, 2011). Stoga su reaktivnost sa katjonima i kapacitet obrazovanja gela direktna funkcija prosečne dužine lanca i udela i rasporeda GG blokova.



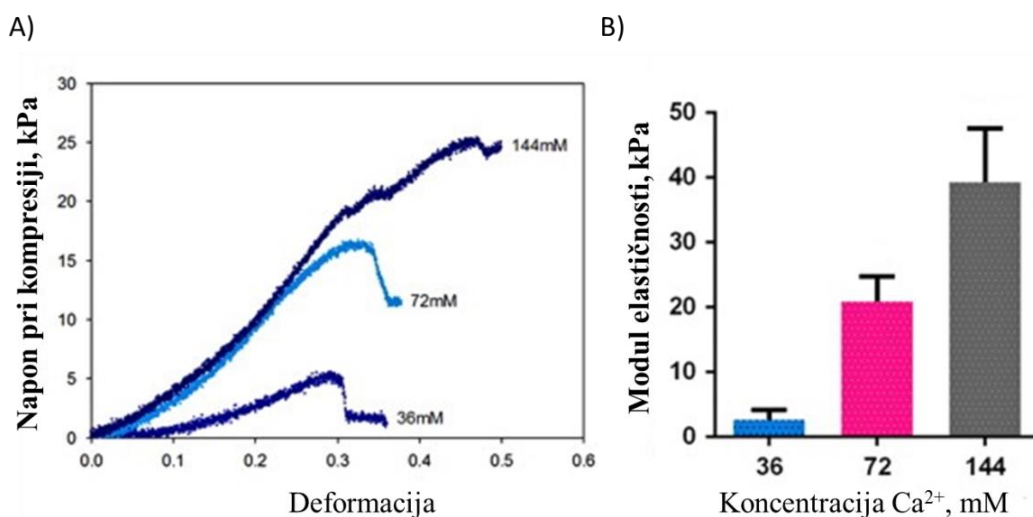
**Slika 1.4** Geliranje natrijum-alginata u prisustvu jona kalcijuma i formiranje hidrogela kalcijum-alginata; A) prikaz strukturnih formula β-D-manuronske kiseline (M jedinica), α-L-guluronske kiseline (G jedinica) organizovanih u GG i MM blokove, B) model kutije za jaje (prilagođeno u odnosu na Kühbeck i sar., 2015)

U biomedicinskim istraživanjima najčešće se koriste kalcijum-alginatni hidrogelovi koji se formiraju pod izuzetno blagim uslovima, na sobnoj ili telesnoj temperaturi i fiziološkim uslovima pH vrednosti (de Vos i sar., 2006). Kalcijum ima posebno bitnu ulogu u procesu zarastanja rana, što je interesantno sa stanovišta primene ovih hidrogelova kao obloga za rane (Stojkowska i sar., 2018).

U fiziološkim uslovima, gde su natrijumovi, kalijumovi i magnezijumovi joni prisutni u velikom višku u odnosu na kalcijumove jone, dolazi do reverzne reakcije relaksacije polimerne matrice i njenog bubrenja (Bajpai i Sharma, 2004), a proces počinje od M jedinica. Kapacitet bubrenja i brzina degradacije zavise od uslova pod kojima se odigravaju, ali ponovo direktno zavise i od odnosa G/M jedinica, njihovog rasporeda i dužine polimernih lanaca.

Alginatni hidrogelovi pokazuju viskoelastično ponašanje (Junter i Vinet, 2009) sa linearno elastičnim delom do 8% deformacije (Mancini i sar., 1999). Vrednosti dinamičkog i ravnotežnog Jungovog modula elastičnosti zavise od sastava i koncentracije alginata, stepena umreženosti (koncentracije umreživača), vremenskog intervala i uslova pod kojima se vrši merenje (npr. okolni medijum, frekvencija i sl), slika 1.5. Stoga, dinamički modul elastičnosti alginatnih hidrogelova može da varira od nekoliko do par hiljada kPa.

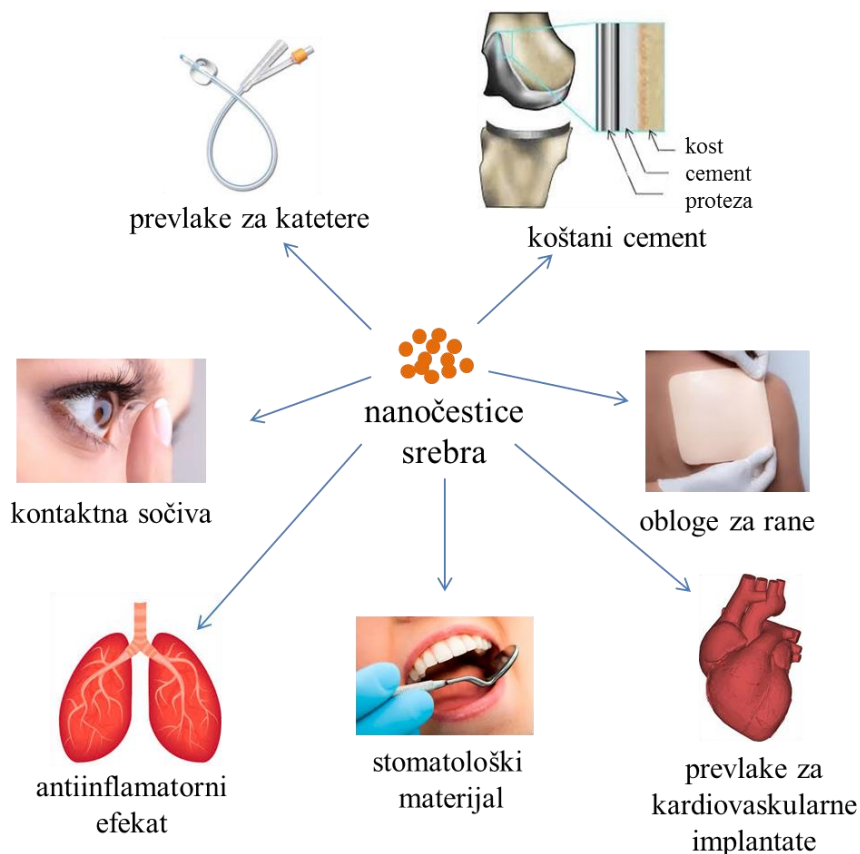




**Slika 1.5** Reprezentativni primer mehaničkih karakteristika alginata: A) zavisnost napona od primenjene deformacije za 2 mas.% alginatne hidrogelove umrežene sa različitom koncentracijom CaCO<sub>3</sub> (36, 72 i 144 mM; B) modul elastičnosti za dobijene hidrogelove (*Jang i sar., 2014*)

### 1.2.2.1.2 Nanočestično srebro

Nanočestice srebra predmet su istraživanja u različitim poljima nauke, za različite potencijalne primene. Zahvaljujući snažnoj antimikrobnoj aktivnosti koju poseduju usled velike specifične površine, a usled toga visoke reaktivnosti, potentnosti, kao i kristolografije površine, sve širu primenu nalaze i u biomedicini i to kao: prevlake za medicinske katetere, deo koštanog cementa, u kontrolisanom otpuštanju lekova, oblogama za rane i sl, slika 1.6 (*Naidi i sar., 2015, Kumar i sar., 2018*).



**Slika 1.6** Primena nanočestica srebra u biomedicini (prilagođeno u odnosu na *Khatoon i sar., 2017*)

Mehanizam dejstva nanočestica srebra na bakterije nije u potpunosti poznat, i u literaturi se najčešće opisuje u nekoliko koraka. Smatra se da nanočestice prvo interaguju sa površinom bakterija, gde dovode do promena na nivou membrane. Zatim, unutar bakterijske ćelije dovode do promena na nivou DNK posredstvom slobodnih radikala kiseonika (*Durán i sar., 2016*). Na osnovu urađenih studija pretpostavlja se da nanočestice srebra lakše prolaze ćelijsku membranu u odnosu na jone srebra, kao i da se kod nanočestica manjih od 10 nm mehanizam dejstva odvija putem samih nanočestica, dok kod većih on ide preko otpuštenih jona srebra (*Durán i sar., 2016*). Brzina oksidacije, a time i antimikrobna aktivnost u velikoj meri zavise od hemijskih karakteristika i veličine nanočestica, ali i od karakteristika samog mesta primene (*Molleman i Hiemstra, 2017*). Tako na primer, nanočestice srebra koje se oralno administriraju veoma brzo se prevode u njihov jonski oblik usled niske vrednosti pH u želudcu.

Antimikrobna aktivnost nanočestica srebra praćena je potencijalnim citotoksičnim efektom na eukariotke ćelije. Mehanizam dejstva nanočestica srebra na ćelije organizma odvija se na nivou mitohondrija kod kojih nanočestice srebra izazivaju promene u njihovoj funkcije (*Akter i sar., 2018*). Park i saradnici pokazali su na ćelijskoj liniji životinjskih makrofaga (RAW264.7) da nanočestice srebra (veličine ~ 70 nm) izazivaju apoptozu u zavisnosti od aplicirane koncentracije i vremena izloženosti, i to tako što dolazi do njihove oksidacije unutar ćelija (*Park i sar., 2010*). Studija koju su sprovedi Piao i saradnici na humanim ćelijama jetre potvrdila je zavisnost nivou citotoksičnosti od koncentracije nanočestica srebra, kao i da je polovina maksimalne inhibicione koncentracije (IC<sub>50</sub>) za ove ćelije 4 µg/ml (*Piao i sar., 2011*). Interesantno je da citotoksičnost i IC<sub>50</sub> u značajnoj meri variraju u odnosu na ćelijske linije, te je tako npr. za humane ćelije hondrocyte utvrđeno da IC<sub>50</sub> iznosi 37,35 µg/mL (*Yang i sar., 2016*).

Osnovni problem sinteze nanočestica srebra jeste njihova tendencija da formiraju agregate, čime se smanjuju i gube antimikrobna svojstva. U cilju stabilizacije nanočestica, tj. prevencije njihovog rasta, koriste se polimeri. Stabilizacija nanočestica srebra polimerima se objašnjava elektronskom interakcijom između funkcionalnih grupa polimera i nanočestica metala.

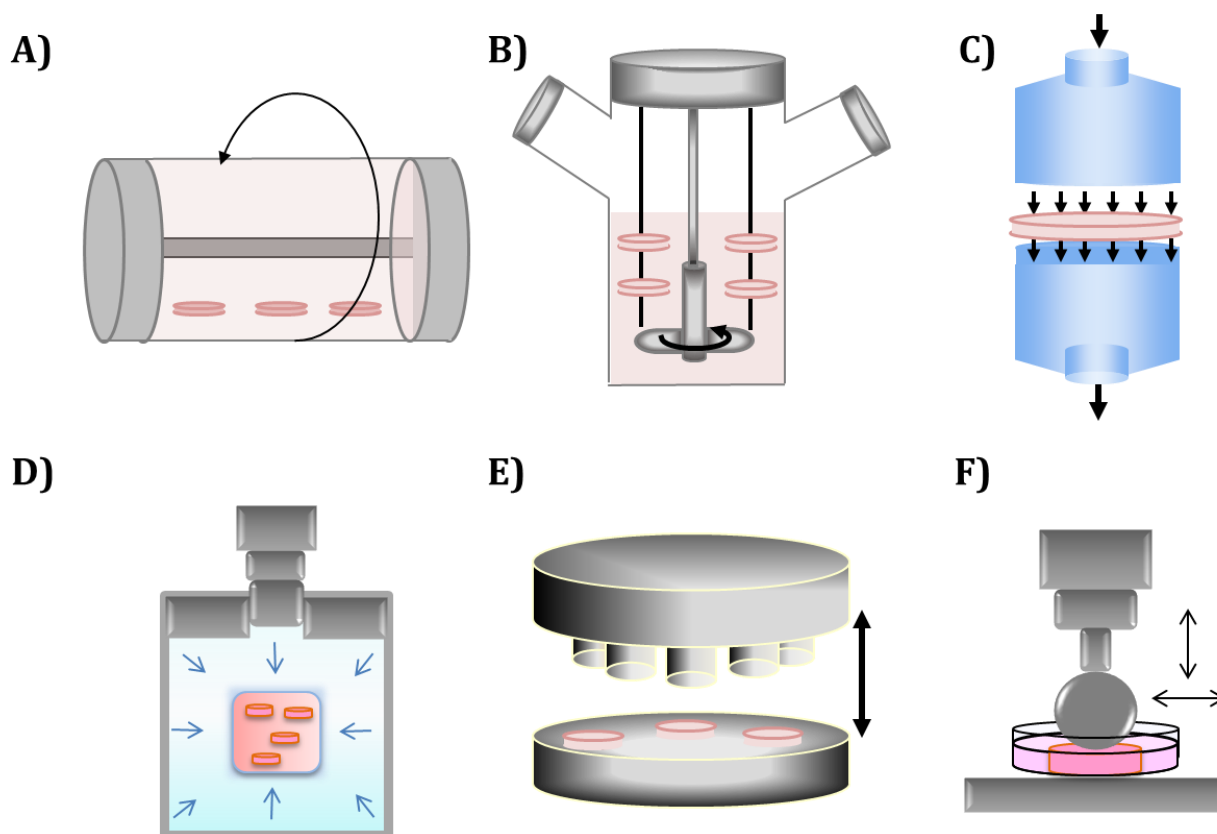
Elektrohemijska sinteza može biti atraktivna metoda za kontrolisano dobijanje nanočestica srebra uniformne raspodele veličina u polimernom rastvoru (*Jovanović i sar., 2012*). Bez dodatka hemijskih redukcionih sredstava, ova metoda se svrstava u zelene postupke sinteze a kao proizvod se dobijaju nanočestice visoke čistoće, pogodne za primenu u biomedicini (*Ma i sar., 2004*).

Nanočestice srebra uspešno su dobijene u rastvoru alginata elektrohemijskom redukcijom (*Obradović i sar., 2015*). Od nastalog koloidnog rastvora moguće je dobiti hidrogelove različitih oblika, kao što su mikročestice, mikrovlakna, filmovi i diskovi (*Stojkowska i sar., 2012, Vidović i sar., 2014, Kostić i sar., 2016*).

### 1.2.2.2 Bioreaktori u inženjerstvu tkiva hrskavice

Mehanički stimuli imaju važnu ulogu u razvoju tkiva hrskavice, njenom održavanju i svakako u procesu integracije implantirane hrskavice sa prirodnom hrskavicom domaćina (*Li i sar. 2017*). Bez mehaničkih opterećenja sastav tkiva hrskavica veoma brzo bi se izmenio, a ECM izgubio svoju mehaničku čvrstoću (*Mankin i sar., 2010*). Već je navedeno da je tkivo hrskavice tokom dnevnih aktivnosti izloženo različitim mehaničkim opterećenjima: hidrostatičkom pritisku, kompresiji, smicajnom naponu i dr. Takođe, različite zone tkiva hrskavice zbog svog sastava ili uloge nalaze se pod različitim opterećenjima. Direktna kompresija tako najbolje oponaša opterećenja koja se javljaju u gornjoj zoni hrskavice, gde je najznačajniji i protok fluida i deformacija. Kako se ide ka dubljim slojevima hrskavice, ovi mehanički signali su sve manje izraženi, a hidrostatički pritisak sve značajniji. Stoga se u inženjerstvu tkiva hrskavice koriste različiti bioreaktori koji simuliraju jedan ili više pomenutih mehaničkih signala i to: *i*) rotirajući bioreaktori, *ii*) sudovi sa mešanjem, *iii*) protočni bioreaktori, *iv*) bioreaktori sa hidrostatičkim

pritiskom, v) bioreaktori sa dinamičkom kompresijom i vi) bioreaktori sa kombinovanim mehaničkim opterećenjima (Zhao i sar., 2016), slika 1.7.



**Slika 1.7** Tipovi bioreaktora koji se najčešće koriste u inženjerstvu tkiva hrskavice: A) rotirajući bioreaktor, B) sud sa mešanjem, C) protočni bioreaktor, D) bioreaktor sa hidrostatičkim pritiskom, E) bioreaktor sa dinamičkom kompresijom i F) bioreaktor sa kombinovanim mehaničkim opterećenjima (prilagođeno u odnosu na Stojkowska, 2015)

Smicajni naponi kojima su izložene ćelije u rotirajućim i protočnim bioreaktorima, kao i kod sudova sa mešanjem, pokazalo se da pozitivno utiču na diferentovanje matičnih ćelija u pravcu hondrocita (Marlovits i sar., 2003, Yoon i sar., 2012), ali i na ravnomernije i značajnije stvaranje GAG unutar konstrukata (Santoro i sar., 2010, Shahin i Doran, 2011). Sa druge strane, hidrostatički pritisak se u različitim studijama pokazao takođe kao relevantan biomehanički signal koji utiče na hondrogenezu, dok uspostavljanje pogodnog režima i dalje nije najjasnije definisano, pošto postoje oprečni rezultati koje ukazuju na prednost dinamičkog u odnosu na statičko opterećenje i obratno (Zvicer i Obradović, 2018).

Primena bioreaktora sa dinamičkom kompresijom u inženjerstvu tkiva hrskavice sve je zastupljenija i direktno opravdana fiziološkom ulogom dinamičke kompresije na očuvanje i funkciju artikularne hrskavice, a posebno za regeneraciju površinske zone hrskavice. Sistemi sa dinamičkom kompresijom najčešće se sastoje od komore za smeštanje uzorka, aktuatora koji omogućava dinamičku kompresiju uzorka na kontrolisan način, a time i senzora opterećenja ili senzora pomeraja, koji pomoću eksterne kompjuterske jedinice omogućavaju preciznu kontrolu nivoa opterećenja. Značaj ovih sistema, pored toga što omogućavaju kreiranje fiziološki relevantnog okruženja za ćelije ili tkivo hrskavice, je u tome što dodatno omogućavaju i praćenje uticaja određenih parametara ili režima ispitivanja na aktivnost ćelija u realnom vremenu (Li i sar. 2017). Mogu biti konstruisani kao sistemi sa periodičnom zamenom medijuma (Correia i sar., 2016) ili kao sistemi sa kontinualnim protokom (Lovecchio i sar., 2019). Sa stanovišta adekvatnog prenošenja pritiska, jedan od glavnih problema kod oba sistema je mogućnost pojave mehurova,



usled promene temperature medijuma ili metabolizma ćelija, u zoni neposrednog kontakta između uzoraka i dela sistema koji vrši kompresiju uzoraka. U tom slučaju, usled osobine gasa da je stišljiv, može doći do neadekvatnog prenošenja pritiska na uzorke i potrebe da se mehurovi odstrane iz sistema, što onemogućava da ovi sistemi funkcionišu u potpunosti automatski.

Uloga dinamičke kompresije na formiranje i/ili očuvanje tkiva hrskavice potvrđena je u različitim studijama. Pokazano je da dinamička kompresija dovodi do porasta modula elastičnosti prilikom gajenja tkivnih ekvivalenata, kao i da utiče na sintezu proteina ECM i kolagena (*Ng i sar., 2009*). Nakon 4 nedelje u režimu 10% deformacije pri frekvenciji od 1 Hz tokom 1 h/ 3 puta dnevno, 5 dana/nedelji, dinamička kompresija dovela je i do značajnog porasta ravnotežnog modula elastičnosti agaroznih hidrogelova sa imobilisanim hondrocitima ( $22 \times 10^6$  ćel/ml) u odnosu na kontrolnu studiju u statičkim uslovima ( $100 \pm 16$  kPa vs.  $15 \pm 8$  kPa) (*Mauck i sar., 2000*). Takođe, primena dinamičke kompresije brzinom 0,05 mm/s na alginatne hidrogelove sa imobilisanim mezenhimalnim matičnim ćelijama ( $2 \times 10^7$  ćel/ml) pri koncentraciji od 3% O<sub>2</sub> dovela je do porasta i bolje distribucije GAG i kolagena II (*Daly i sar., 2018*). Značajna hondrogeneza i biosinteza komponenti ECM pri dinamičkoj kompresiji (deformacija od 10%, frekvencija 1 Hz, 1 sat/danu, tokom 2 nedelje) primećena je u studiji Sawatjui i saradnici kod nosača na bazi fibroin/hondroitin-sulfat/hijelouronata zasejanih sa hondrocitima i mezenhimalnim matičnim ćelijama poreklom iz koštane srži (*Sawatjui i sar., 2018*). Veza između hondrogeneze i dinamičke kompresije objašnjena je u radu Gađanski i Vunjak-Novaković, koji navodi da dinamička kompresija utiče na oslobađanje adenozin trifosfata (ATP), koji preko P2 receptora na humanim mezenhimalnim matičnim ćelijama, aktivira diferentovanje ćelija u pravcu hondrocita posredstvom kalcijuma (*Gađanski and Vunjak-Novakovic, 2013*). U drugom radu, Li i saradnici su ispitivali uticaj deformacije na proliferaciju humanih embrionih ćelija hrskavice zasejanih na 3D nosaču na bazi kolagena, pri cikličnoj kompresiji i frekvenciji od 0,1 Hz i pokazali da je fiziološki relevantna deformacija u opsegu 0-10 % dala najbolje rezultate u pogledu debljine i morfologije novosintetisane hrskavice (*Li i sar., 2010*). Interesantno je pomenuti da je u studiji sa telećim hondrocitima imobilisanim u alginatni nosač, dinamička kompresija podstakla sintezu GAG i kolagena kod adultnih hondrocita (*Gharravi i sar., 2012*).

Za inženjerstvo površinskog sloja tkiva hrskavice posebno je interesantna primena bioreaktora sa kombinovanim mehaničkim opterećenjima. Usled kretanja artikularna hrskavica je izložena kombinaciji dva mehanička opterećenja: kompresije, koja nastaje usled kontakta između zglobnih površina; i smicanog napona, koji se javlja usled pritiska zglobove površine hrskavice od strane sinovijalne tečnosti (*Santoro i sar., 2010, Naing i sar., 2014, Choi i sar., 2017*). Primena dinamičke kompresije u kombinaciji sa smicajnim naponom pokazala je sinergetsko dejstvo na diferentovanje mezenhimalnim matičnih ćelija u pravcu hondrocita, sintezu GAG, kao i na endogenu proizvodnju faktora rasta TGF- $\beta$ , koji ima pozitivno dejstvo na stabilizaciju hondrogenog fenotipa (*Schatti i sar., 2011, Gardner i sar., 2016*). Rezultate ove studije je posebno interesantno analizirati sa aspekta važnosti primene što fiziološki relevantnijih uslova za određeno tkivo, koji obično podrazumevaju primenu više različitih biomehaničkih signala. U tom smislu, prethodno je pokazano da dimanička kompresija, kada se ostvaruje samostalno, ima privremen uticaj na ekspresiju hondrogenih markera tokom perioda od 14 dana, nakon čega je uticaj minimalan (*Huang i sar., 2010, O'Conor i sar., 2013*), te da TGF- $\beta$  utiče na stvaranje GAG i kolagena, značajnije od dinamičke kompresije (*Mauck i sar., 2007*). Kombinacijom fiziološki relevantnih signala osim što je ostvareno diferentovanje u pravcu hondrogenoze putem biomehaničkih stimulanca, došlo je i to sinteze biohemijskih signala, što jasno ukazuje na važnost biomimetičkog pristupa u inženjerstvu tkiva. Sa druge strane, tumačenje rezultata i rukovanje sa ovakvim sistemima je dodatno komplikovano, što u određenoj meri limitira njihovu širu primenu i otežava put dolaženja do rezultata.

### 1.2.3 Kost: sastav, građa i biomehaničke sile u tkivu

Kosti predstavljaju deo skeletnog sistema koji pruža potporu i zaštitu mekim tkivima, ima lokomotornu funkciju, ali i značajnu metaboličku i odbrambenu ulogu u organizmu jer predstavlja rezervoar matičnih ćelija, kao i različitih jona, pre svih jona kalcijuma i fosfora. Pored hrskavičavog tkiva, koštano tkivo spada u red potpornih vezivnih tkiva. Ovo tkivo je izgrađeno od ćelija i ECM, pri čemu postoje tri vrste specijalizovanih ćelija: osteoblasti, osteociti i osteoklasti.

**Osteoblasti** su delimično diferentovane, ćelije veličine 15-30  $\mu\text{m}$ , koje se nalaze na površini koštanog matriksa i čine 4-6% ukupnog broja ćelija kosti (Šerban, 1995; Florencio-Silva i sar., 2015). Osteoblasti imaju veoma važnu ulogu u formiranju nove kosti jer su zaduženi za sintezu svih organskih komponenti koštanog matriksa, a zatim i za njegovu mineralizaciju. U prvoj fazi, osteoblasti stvaraju kolagen (najčešće tip I), osteopontin, osteokalcin i druge strukturne glikoproteine, koji zajedno čine organski matriks (Florencio-Silva i sar., 2015). U drugoj fazi, proizvodnjom enzima alkalne fosfataze koji učestvuje u procesu vezivanja kalcijuma i fosfora i u formiranju hidroksiapatita (HAp) i amorfnog kalcijum – fosfata, osteoblasti regulišu proces mineralizacije kosti (Florencio-Silva i sar., 2015).

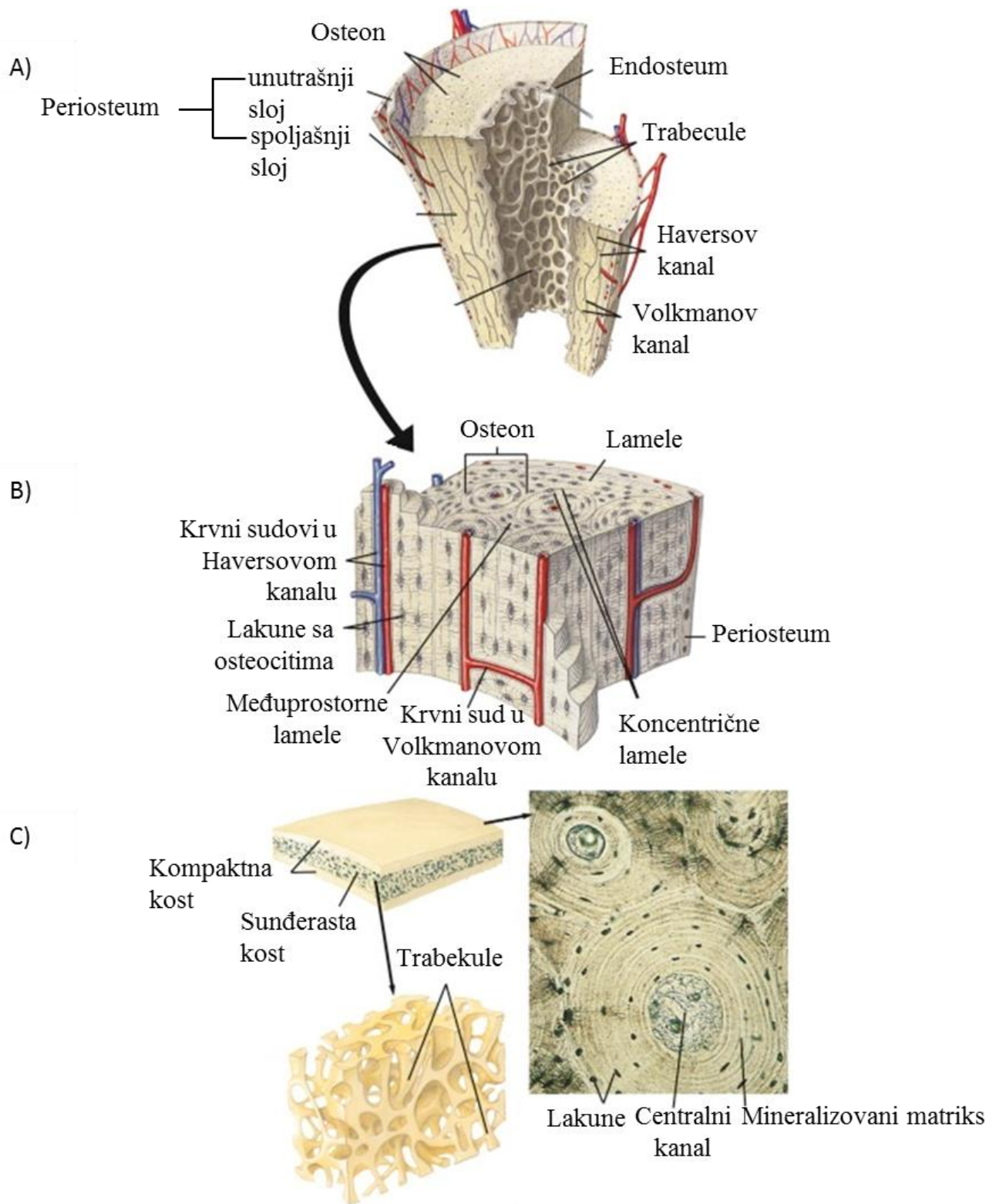
**Osteociti** su smešteni u lakunama, potpuno okruženi mineralizovanim matriksom, i čine 90-95% ukupnog broja ćelija kosti (Franz-Odenaal i sar., 2006). Ove ćelije funkcionišu kao mehanosenzori i u mogućnosti su da detektuju mehanička naprezanja i pritiske unutar kosti izazvane dnevnim aktivnostima, te da prilagode aktivnost osteoblasta i osteoklasta u pravcu adekvatnog odgovora na spoljne impulse (Bonewald, 2007, Rochefort i sar., 2010, Dallas i sar., 2013).

**Osteoklasti** su pokretne ćelije prečnika do 400  $\mu\text{m}$  smeštene na površini koštanog matriksa u Haušipovim lakunama (Šerban, 1995). Zaduzeni su za sintezu brojnih enzima (npr. kolagenazu) koji razlažu delove koštanog matriksa, a zatim ih fagocitiraju.

Koštano tkivo predstavlja veoma dinamičan sistem koji se kontinualno remodeluje pod spoljnim uticajima, gde osteoklasti imaju ulogu u resorpciji, osteociti u transdukciji, a osteoblasti u formiranju nove kosti.

ECM kosti je specifičan po tome što je mineralizovan. Pored organskog dela izgrađuju ga i neorganske soli. Organski deo sastoji se od oko 90% vlakana kolagena tipa I veoma uređene orijentacije. Neorganski deo matriksa zauzima oko 50% koštanog matriksa i u njemu su dominantno zastupljeni joni kalcijuma i fosfora, a u manjoj meri magnezijuma, kalijuma, natrijuma, bikarbonata i citrata. Joni kalcijuma i fosfora učestvuju u nastajanju kristala hidroksiapatita (HAp) u vidu tankih pločica ili štapića, koji se formiranju paralelno sa kolagenim vlaknima. Kolagena mreža i ostatak organskog matriksa praktično formiraju nosač unutar koga dolazi do taloženja HAp, čime se dobija na mehaničkoj čvrstoći i otpornosti kosti (Florencio-Silva i sar., 2015).

Sva tri tipa ćelija i ECM formiraju gradivnu strukturu kosti od koncentrično raspoređenih lamela koja se naziva osteon (slika 1.8).



**Slika 1.8** Struktura i građa kosti: A) poprečni presek kompaktnog dela kosti, B) gradivna struktura kompaktne kosti, C) razlika između gradivne jedinice kompaktne i sunderaste kosti (*Olson i Charlson, 2017*)

Prenos hranljivih materija i metabolita odvija se posredno od krvnih sudova u sredini osteona, ka svim ćelijama koje izgrađuju osteon, međusobnim povezivanjem ćelija putem ćelijskih nastavaka. U formiranoj kosti nalazi se veliki broj osteona i to različitog oblika i veličine, za koje je pokazano da se mogu razlikovati i u mehaničkim karakteristikama (*Currey, 2016*).

Kod kostiju razlikuje se kompaktno i sunderasto koštano tkivo, (slika 1.8). Kompaktno koštano tkivo izgrađuje površinske delove kosti i čini oko 90% koštanog tkiva, dok se u unutrašnjosti nalazi sunderasto koštano tkivo. Sunderasto koštano tkivo dobilo je naziv po karakterističnom poroznom izgledu koga formiraju koštane trabekule ispresecane velikim brojem kanala u kojima je smeštena koštana srž. Ovo tkivo ima daleko veću sposobnost regeneracije od kompaktnog koštanog tkiva, a podaci govore da se godišnje oko 25% sunderastog tkiva kosti obnovi nasuprot 4% kompaktnog tkiva (*Serban, 1995*).

Generalno, kosti se ponašaju anizotropno, te čvrstoća i krutost zavise od pravca primenjenog napona (*Hall, 2018*). Oko 20-25% ukupne težine kosti čini voda koja pored mineralne faze ECM doprinosi mehaničkoj čvrstoći kostiju (*Hall, 2018*). Sa druge strane kolagena vlakna daju kostima fleksibilnost i utiču na zateznu čvrstoću (*Tranquilli Leali i sar., 2009*). Stoga, na mestima gde je izraženija mineralizacija kosti, kao u slučaju kompaktne kosti, ona je čvršća, ali ujedno i krhija i podložnija lomu (*Turner, 2006*). Kod ljudi kompaktne kosti mogu da izdrže kompresiju između 90 i 230 MPa, dok je vrednost zatezne čvrstoće u opsegu 90 – 190 MPa (*Hannink i Arts, 2011*).

Kod sunderastog tipa kosti, velika poroznost dovodi do manje krutosti, te ove kosti mogu da izdrže značajno manje kompresione napone, 2 - 45 MPa (*Hannink i Arts, 2011*).

## 1.2.4 Inženjerstvo tkiva kosti

Povrede koštanog tkiva i potreba za njihovim saniranjem je jedan od najvećih zdravstvenih problem u svetu zbog čega su kosti drugi najčešće transplantirani organ posle krvi (*Frohlich i sar., 2010, Venkatesan i sar., 2014, Oryan i sar., 2014*). Više miliona pacijenata pati od gubitka ili oštećenja koštanog tkiva uzrokovanih pojavom degenerativnih bolesti, operativnim zahvatima, traumama i sl. (*Marsell i Einhorn, 2011, Martino i sar., 2015*). Samo u 2019. godini vrednost tržišta koštanih implantata i supstituenata procenjuje se na 3,6 milijardi američkih dolara (*Dang i sar., 2018*).

Kosti poseduju značajnu sposobnost regeneracije *in vivo*, međutim sam regenerativni proces je složen i zahteva određene uslove koji bi omogućili uspešnu regeneraciju. Posebno problematična je regeneracija koštanih defekata kritične veličine. Tradicionalni pristupi u tretiranju koštanih defekata kao što su transplantacija autolognih ili alogenih graftova ograničeni su usled dostupnosti koštanog tkiva u organizmu, odnosno donora, duge rehabilitacije, infekcija, prenosivih bolesti, imunskog odgovora i troškova same procedure (*Chen i sar., 2014, Euler i sar., 2015*). Potencijalno rešenje može biti *in vitro* regeneracija za koju je potrebno obezbediti prisustvo osteogenih ćelije, osteokonduktivno i osteoinduktivno okruženje, postojanje određene mehaničke stabilnosti i vaskularizacija (*Hannink i Arts, 2011, Vo i sar., 2012*).

Dosadašnja istraživanja u oblasti inženjerstva tkiva kosti dovele su do značajnih otkrića na celularnom nivou u pogledu izbora adekvatnih ćelija, biokompatibilnosti i biorazgradljivosti potencijalnih materijala, njihovim osteoinduktivnim, osteokonduktivnim i fizičko-hemijskim karakteristikama, ali bez uspeha da se dobije funkcionalan tkivni graft pogodan za implantaciju. Glavni izazovi su dobijanje adekvatnog biomaterijala koji će moći da ispuni biološku i mehaničku ulogu prirodne kosti, i razvoj biomimičnih bioreaktora koji će omogućiti *in vitro* uzgoj tkiva.

### 1.2.4.1 Biomaterijali u inženjerstvu tkiva kosti

Nosači u inženjerstvu tkiva kosti polaze od različitih materijala na bazi metala, keramike, prirodnih i sintetskih polimera i njihovih kompozita (*Kashte i sar., 2017*). Najčešću primenu pronalaze kompozitni nosači na bazi prirodnih polimera i kalcijum fosfatnih jedinjenja zbog svojih povoljnih karakteristika koje obezbeđuju dobro vezivanje ćelija, njihovu proliferaciju, diferentovanje i rast nove kosti (*Dang i sar., 2018*). Nedostatak ovih nosača je što obično imaju nedovoljno dobre mehaničke karakteristike u odnosu na prirodnu kost, nekontrolisano se

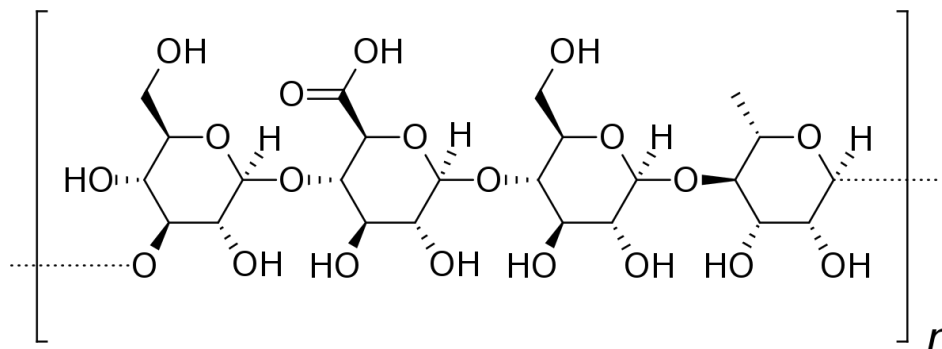
razgrađuju, a usled prirodnog porekla polimera mogu se javiti značajne razlike u polaznom materijalu od serije do serije proizvoda (*Sanosh i sar., 2013*). Tim pre, neophodna je sveobuhvatna karakterizacija koja pruža informacije od relevantnosti za potencijalnu primenu.

Nedovoljno dobra mehanička čvrstoća posledica je velike poroznost (oko 80% za sunderastu kost, *Velioglu i sar., 2018*) koju je potrebno obezbediti radi dobijanja adekvatne arhitekture koštanog supstituenta. Makroporoznost ima posebno značajnu ulogu u osteokondukciji (*LeGeros, 2002, 2008*) i pokazano je da kod nosača ćelija sa porama većim od 300  $\mu\text{m}$  dolazi do bolje osteogeneza (*Kuboki i sar., 2002, Karageorgiou i Kaplan, 2005*). Sa druge strane, postojanje pora otvorenog tipa na spoljnim ivicama nosača i njihova međupovezanost sa porama unutar nosača od izuzetnog je značaja za ravnomerno zasejavanje ćelija, ali i sa stanovišta mehanizma razmene nutrijenata i proizvoda metabolizma. *In vivo* studije su potvrdile da upravo velika poroznost i makropore podstiču osifikaciju, stvaranje i povezivanje nove kosti sa biomaterijalom nakon implantacije i bolje mehaničke karakteristike na kontaktnoj površini kost - implantat (*Karageorgiou i Kaplan, 2005*).

Visoko porozne nosače na bazi polimera i mineralne komponente moguće je dobiti procesom liofilizacije kompozitnih hidrogelova. Gelanska guma jedan je od prirodnih polimera koji se lako kombinuje sa keramičkim ili drugim bioaktivnim puniocima kao što je bioaktivno staklo (npr. *Gantar i sar., 2014, Maia i sar., 2018, Santos i sar. 2019*). U prisustvu bioloških fluida bioaktivno staklo se prevodi u hidroksiapatit čime ovi nosači postaju interesantni za potencijalnu primenu u inženjerstvu tkiva kosti.

#### 1.2.4.1.1 Gelanska guma

Gelanska guma je prirodni linearni polisaharid koji nastaje kao sekrecija bakterija *Pseudomonas elodea* (*Zia i sar., 2018*). Izgrađen je od ponavljajućih jedinica koje čine 2 jedinice D-glukoze, zatim D-glukuronska kiselina i L-ramnoza, slika 1.9.



**Slika 1.9** Strukturna formula gelanske gume

Prisustvo ostataka glukuronske kiseline čini ovaj polisaharid strukturno sličnim sa prirodnim glikozaminoglikanima, komponentama ECM, što obezbeđuje njegovu široku primenu u inženjerstvu tkiva. Priprema hidrogelova gelanske gume počinje rastvaranjem u vrućoj vodi što dovodi do formiranja viskoznog rastvora. Geliranje uključuje dvostepeni proces u kome se nasumično orjentisani lanci polimera organizuju u dvostruku spiralnu, a zatim dolazi do agregacije spirala. Temperatura na kojoj dolazi do formiranja hidrogelova zavisi od koncentracije polimera, stepena acetilovanja i prisustva katjona (*Bacelar i sar., 2016*). U prisustvu jednovalentnih i dvovalentnih katjona (npr. natrijuma, kalcijuma, magnezijuma) dolazi do dodatnog jonskog umrežavanja sa karboksilnim grupama, čime se formiraju jake i stabilne veze (*Costa i sar., 2018*). Pokazano je da joni natrijuma imaju veći uticaj na temperaturu geliranja, dok joni kalcijuma dovode do formiranja jačih hidrogelova proporcionalno sa koncentracijom dostupnih jona kalcijuma (*L'Heureux i sar., 2007*).

Hidrogelovi gelanske gume najčešće se dobijaju jednostavnim izlivanjem u posude adekvatnog oblika i zapremine, čime je moguće dobiti specifične anatomske strukture. Za inženjerstvo tkiva veoma je atraktivan period biorazgradivosti koji varira od nekoliko nedelja do nekoliko meseci (*Stevens i sar., 2016*). Takođe, hidrogelovi gelanske gume ispoljili su pozitivan uticaj na osteogenezu (*Raquel Maia i sar., 2019*).

Zbog jednostavnosti dobijanja željenog oblika, vremena biorazgradnje i zapaženog uticaja na osteogenezu, gelanska guma se prepoznaje kao posebno interesantna za primenu u inženjerstvu tkiva kosti.

#### 1.2.4.1.2 Bioaktivno staklo

Bioaktivno staklo (*bioactive glass* – BAG) je amorfni materijal na bazi silikatnih i/ili fosfatnih jona, koji nalazi kliničku primenu zbog svojih karakteristika da se vezuje za kost na mestu primene i omogućava stvaranje nove kosti (*Hench i sar., 2004*). BAG je površinski bioaktivan, potpuno resorbibilan materijal, koji ostvaruje povezivanje sa kostima stvaranjem hidroksiapatita (HAp) u prisustvu bioloških tečnosti (*Alves i sar., 2010*). Proces formiranja HAp u prisustvu simulirane telesne tečnosti (*simulated body fluid* - SBF) počinje reakcijom molekula vode sa Si – O – Si vezama, čime se formiraju Si – OH grupe, koje predstavljaju centre nukleacije (*Tanahashi i sar., 1994, Kokubo i sar., 2003, Kim i sar., 2003a*). Zatim, difuzijom jona kalcijuma i fosfatnih jona na površinu BAG formira se amorfni sloj kalcijum-fosfata, koji potom kristališe u biomimičan HAp inkorporiranjem hidroksilnih i karbonatnih jona iz SBF (*Hench, 1991, Gunawidjaja i sar., 2010*). Primećeno je da joni koji nastaju rastvaranjem BAG na bazi silikata (npr. joni silicijuma, kalcijuma, fosfora) stimulišu ekspresiju gena u osteoblastima (*Xynos i sar., 2001*). Posebno interesovanje istraživača za BAG dolazi od karakteristike ovog materijala da joni koji nastaju rastvaranjem BAG pospešuju angiogenezu *in vitro* i *in vivo* (*Day i sar., 2005, Leu i sar., 2008, Gorustovich i sar., 2009*). Takođe, ovaj materijal je pokazao da ima osteokonduktivna i osteoinduktivna svojstva, te osim što formira dobre veze sa okolnim tkivom, podstiče i ćelije da se regenerišu, čime se ubrzava proces regeneracije (*Baino i sar., 2018*). U studiji koju su sprovedi Zeng i saradnici bioaktivno staklo dopirano stroncijumom sa jedne strane dovelo je do formiranja sloja apatita na površini mezoporoznog nosača, a sa druge strane pospešilo je proliferaciju i diferentovanje mišijih ćelija MC3T3-E1 sličnih fibroblastima u pravcu osteoblasta (*Zhang i sar., 2014*). Interesantni rezultati dobijeni su u studiji sa komercijalno dostupnim bioaktivnim staklom *Bioglass 45S5* (*US Biomaterials Corp, SAD*) gde je transformacijom ovog stakla došlo do formiranja kalcifikovanog ECM i stvaranja nodusa kalcifikovane kosti (*Fan i sar., 2014, Xynos i sar., 2000*).

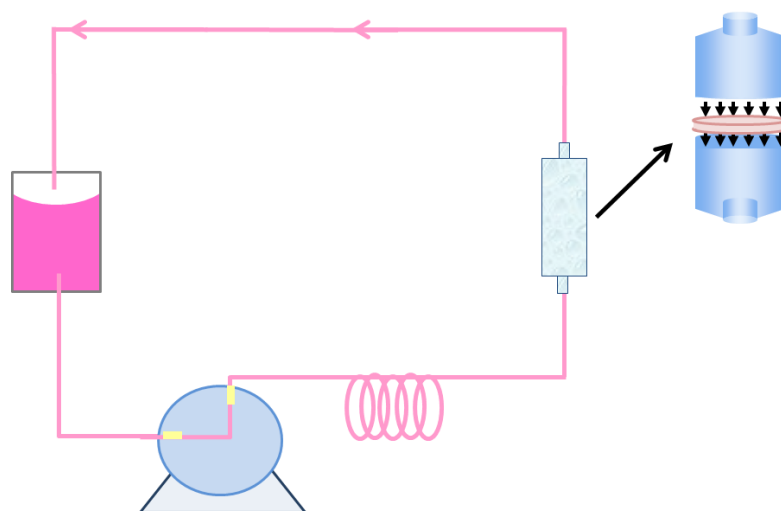
Posebno je interesantna primena nanočestičnog BAG jer omogućava dobro umešavanje i ravnomerno formiranje neorganske faze unutar kompozitnog hidrogela, a topografija nosača nano dimenzija podstiče interakciju na ćelijskom nivou i brže prijanjanje ćelija na površinu materijala (*Martín i sar., 2005*).

Mehaničke karakteristike BAG jedno su od ograničenja primene ovog materijala na mestima većih defekata koja su izložena mehaničkim opterećenjima. Makroporozni nosači dobijeni sinterovanjem BAG pokazali su veoma male kompresione module 0,3-0,4 MPa, koji su nedovoljni za samostalnu implantaciju (*Chen i sar., 2006*). Stoga je predmet aktuelnih istraživanja razvoj adekvatnog kompozita koji bi u potpunosti zadovoljili biološke karakteristike kosti i omogućili adekvatnu i brzu reparaciju.

#### 1.2.4.2 Bioreaktori u inženjerstvu tkiva kosti

U inženjerstvu tkiva kosti najčešće su korišćena 4 tipa bioreaktora: a) rotirajući bioreaktor, b) sud sa mešanjem, c) bioreaktori sa dinamičkom kompresijom i d) protočni bioreaktori (*Vetsch i sar., 2013*).

Protočni bioreaktori imaju najčešću primenu jer pokušavaju da imitiraju mikro mehanička opterećenja prisutna u kostima *in vivo*, tj. izazivaju hidrodinamičke smicajne napone na ćelijama (Vetsch i sar., 2013, Kashte i sar., 2017). Hidrodinamički smicajni napon odgovara tangencijalnoj sili koju tečnost ostvaruje kretanjem duž čvrste površine. Ovi prilično jednostavni bioreaktorski sistemi sastoje se od protočne komore u koju se smešta uzorak i od sistema za recirkulaciju medijuma kontinualnim, oscilatornim ili pulsativnim tokom, pomoću npr. peristaltičke pumpe, slika 1.10. Najčešće su dizajnirani kao zatvoreni sistem, kod kojih se medijum, nakon prolaza kroz komoru bioreaktora, vraća u rezervoar, slika 1.10. Kod drugog tipa protočnih bioreaktorskih sistema – otvorenih sistema, u odnosu na zatvorene sisteme, medijum se nakon protočne komore odvodi u poseban rezervoar za otpad, dok se sveži medijum konstantno dovodi u sistem, što značajno povećava upotrebu potrebnih reaktanata i troškova rada.



**Slika 1.10** Šematski prikaz zatvorenog protočnog bioreaktorskog sistema. Medijum iz rezervoara pomoću pumpe se potiskuje kroz komoru protočnog bioreaktora u kojoj je smešten uzorak. Na putu ka komori prolazi kroz dugo crevo za razmenu gasova gde dolazi do oksigenacije medijuma.

Iako protočni bioreaktori važe za najjednostavnije bioreaktorske sisteme, posmatrano sa stanovišta konstrukcije, prvi izazov prilikom razvoja ovih sistema je razvoj protočne komore bioreaktora koja će obezbediti dobro zaptivanje između uzorka i unutrašnjeg zida komore, tj. direktan protok medijuma ravnomerno kroz uzorak. Razlog tome je što kod većine sistema se komora izgrađuju od čvrstih materijala (npr. polikarbonata), zahtevajući upotrebu uzoraka precizno definisane geometrije i dimenzija. Proizvođači nastoje rešiti ovaj problem razvojem komora koje su npr. podesive po visini i u koje se mogu smestiti cilindrični uzorci visine 1 do 13 mm („P3D“ komora, Ebers Medical Technologies, Španija), ili upotrebom zaptivnih prstenova, najčešće od nekog gumenog materijala, koji treba da spreče opstrujavanje uzorka i tok tečnosti u zoni između uzorka i zida komore (3D Biotek, SAD).

Direktnim protokom medijuma po celoj površini uzorka - nosača, bez intenzivnog mešanja, ostvaruje se konvektivni prenos mase unutar celog nosača, ne samo po spoljašnjim površinama, bolja i ravnomernija razmena kiseonika i hranljivih materija, što je izuzetno važno za implantate kritične veličine (Kleinhans i sar., 2015). Laminarno strujanje unutar protočnog bioreaktora utiče i na bolju raspodelu ćelija i na ravnomerno formiranje novostvorenog ECM unutar nosača (Meinel i sar. 2004), a ne samo po spoljnim ivicama, kao što je slučaj kod suda sa mešanjem i rotirajućeg bioreaktora (Sikavitsas i sar., 2002, Gaspar i sar., 2012). Brzina strujanja medijuma od 5 mm/s pokazala se kao poželjna za ravnomerno zasejavanje ćelija sličnih osteoblastima (MG63) unutar visoko poroznog nosača na bazi polilaktične kiseline (PLA) i kalcijum fosfatna (Koch i sar., 2010). Interesantno je da u ovoj studiji je pokazano da na efikasnost zasejavanja ćelija, osim brzine protoka tečnosti, utiče i broj ciklusa, pri čemu je veća efikasnost ostvarena pri manjem broju



ciklusa. U ovoj studiji brzina strujanja tečnosti uticala je na smanjenu vijabilnost ćelija i njihovu apoptozu u površinskim delovima nosača (*Koch i sar., 2010*).

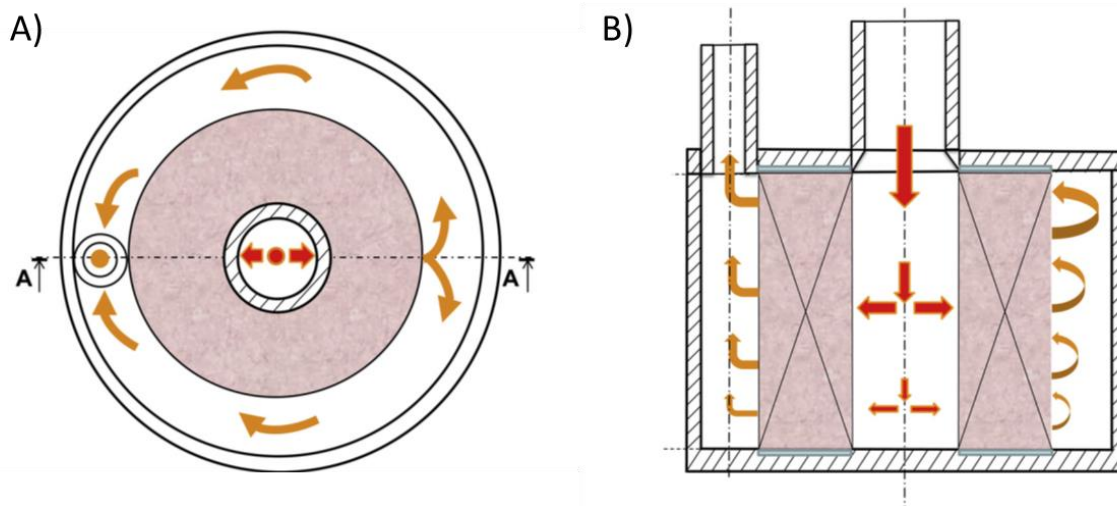
Drugi izazov prilikom razvoja ovih sistema je prevencija formiranja mehurova gasovite faze unutar komore. Formiranje mehurova gasa dovodi do sličnih efekata neravnomerne raspodele nutrijenata, novostvorenog ECM, ali i npr. neželjenih efekata veće brzine protoka medijuma na ćelije. Naime, mehurovi gasa blokiraju strujanje medijuma, dovodeći do porasta lokalne brzine protoka medijuma u određenim delovima komore. Tokom bioloških eksperimenata mehurovi gasa nastaju kao proizvod metaboličke aktivnosti ćelija, te ih je potrebno redovno uklanjati. Jedan od načina je ručno uklanjanje pomoću špriceva povezanih sa obe strane protočne komore, što zahteva posebnu utreniranost eksperimentatora, ali i onemogućava potpunu automatizaciju sistema.

I pored izazova u razvoju efikasnih protočnih sistema sa stanovišta konstrukcije i direktnog i ravnomernog protoka medijuma, određene studije ukazale su na pozitivan efekat protoka na osteogenezu i formiranje mineralne faze, a time i na opravdanost primene ovih sistema u inženjerstvu tkiva kosti.

Pokazano je da smicajni napon podstiče diferentovanje matičnih ćelija u pravcu osteoblasta (*Bjerre i sar., 2011*). U studiji na humanih mezenhimalnim matičnim ćelijama (hMSC) zasejanih na nosačima od poli(L-laktid-ko-kaprolakton) i gajenih u protočnom bioreaktoru primećena je ekspresiju osteogenih gena, diferentovanje u pravcu osteogeneze i formiranje kalcifikata (*Kleinhans i sar., 2015*). Takođe, kod mezenhimalnih matičnih ćelija pod uticajem oscilatornog protoka došlo je do intracelularnog vezivanja jona kalcijuma, proliferacije ćelija i značajnog porasta u sintezi mRNA gena osteokalcina i osteopontina (*Li i sar. 2004*). Porast osteokalcina i osteopontina primećen je i u studiji sa hMSC nakon 28 dana u protočnom bioreaktoru kao funkcija porasta smicajnog napona i brzine protoka medijuma do 9 ml/min, koja je pokazala inhibitorno dejstvo na sintezu pomenutih osteoblastnih markera (*Li i sar., 2009*). Oscilatorni tok imao je pozitivan efekat na sintezu jona kalcijuma i kod ćelija sličnih osteoblastima (M63) (*Koch i sar. 2010*). Sa druge strane, pulsatilni tok pokazao se kao najefikasniji u procesu formiranja mineralnog matriksa unutar vlaknastog nosača na bazi titanijuma zasejanog mišjim osteoblastima poreklom iz koštane srži, pri čemu je sa porastom brzine strujanja sa 0,3 ml/min na 1 ml/min primećena veća biološka aktivnost ćelija i 6 puta značajnije formiranje mineralne komponente ECM (*Bancroft i sar. 2002*). To je na neki način potvrđeno i u studiji sprovedenoj sa humanim mezenhimalnim matičnim ćelijama pri različitim brzinama strujanja (80–1800  $\mu\text{m/s}$ ), gde je utvrđeno da je optimalna brzina od 400–800  $\mu\text{m/s}$  uzrokovala značajno formiranje ECM (*Grayson i sar., 2011*). Povećanjem površinske brzine strujanja medijuma moguće je poboljšati razmenu kiseonika i hranljivih materija, ali sa stanovišta povećavanja smicajnog napona i njegovog uticaja na aktivnost ćelija i njihovo odvajanje od nosača, kao i ispiranje novostvorenog matriksa (*Singh i sar., 2007*).

Protočni bioreaktori sa radijalnim tokom predstavljaju generaciju protočnih bioreaktora namenjenju za gajenje velikih implantata za duge kosti (*Xie i sar., 2006, Olivier i sar., 2007, Arano i sar., 2010, Katayama i sar., 2013*). Kod protočnog bioreaktora sa radijalnim tokom anularni porozni nosač je smešten između dve cilindrične komore (slika 1.11) pri čemu hranljivi medijum struji od unutrašnje komore kroz nosač do spoljne, odakle se odvodi iz sistema. Radijalni tok kroz anularne porozne nosače obezbeđuje manji gradijent koncentracija duž nosača, čime se ćelijska kultura održava pri manjim brzinama strujanja i manjem smicajnom naponu u odnosu na aksijalni protočni bioreaktor (*Kino-Oka i Taya, 2005, Donato i sar., 2014*). Širu upotrebu ovih bioreaktorskih sistema ograničava značajno složenija konstrukcija i način rukovanja.





**Slika 1.11** Protočni bioreaktor sa radijalnim tokom, izgled komore i uzorka i način strujanja: A) pogled odozgo, B) uzdužni poprečni presek (Fragomeni i sar., 2019)

Na intenzitet smicajnog napona ne utiče samo brzina strujanja, već i arhitektura i poroznost nosača. U cilju povezivanja njegovog uticaja na ćelije moguće je odrediti intenzitet smicajnog napona na osnovu poznavanja viskoznosti i brzine protoka medijuma, veličine nosača, poroznosti i veličine pora (Hadida i Marchat, 2020). Međutim, određivanje tačne geometrije, oblika i veličine pora unutar nosača, posebno u vlažnom stanju kada dolazi do smanjenja veličine pora usled rehidracije polimera, izazov je za sebe. U tom smislu, paralelno sa razvojem protočnih bioreaktora potrebno je razviti metodologiju koja bi omogućila korelaciju između efekata protoka medijuma tj. smicajnih napona i različitih geometrija nosača (Hadida i Marchat, 2020).

### 1.2.5 Inženjerstvo osteohondralnog tkiva

Progresijom oštećenja artikularne hrskavice na dublje slojeve, neretko dolazi do oštećenja i subhondralne kosti, čime nastaju osteohondralni defekti. Alternativa za dostupne ali skupe kliničke tretmane je razvoj uzgojenog osteohondralnog implantata, što predstavlja poseban izazov usled složenosti ovog tkiva. Zahtev pred inženjerstvom osteohondralnog tkiva je da se u jednom sistemu oponašanju fiziološka svojstva i struktura dva različita tkiva (hrskavice i kosti) koristeći posebno dizajnirane biomimetične i bioaktivne nosače na bazi polimera, neorganskih komponenti ili kombinacije ovih materijala i bioreaktora.

Glavni izazov je u hondralnom delu dobiti strukturu sličnu hidrogelovima koja se dominantno sastoji od kolagenih vlakana tipa II i GAG, dok u koštanom delu treba obezbediti veliku poroznost i čvrstu strukturu sa mineralizovanim ECM prožetim kolagenim vlaknima tipa I (Oliveira i sar., 2006). Kako bi se zadovoljili navedeni zahtevi, najčešće se pristupa razvoju dvoslojnih (npr. Zhou i sar., 2011), višeslojnih (npr. Kang i sar., 2018) ili gradijentnih nosača (npr. Khorshidi i Karkhaneh, 2018).

Primenom naprednih tehnika kao što su elektrospining i elektrodepozicija, moguće je dobiti višefazne ili gradijentne nosače, međutim ove tehnike ne pružaju potpunu kontrolu parametara kao što su veličina pora, njihova orijentacija i međupovezanost (Khorshidi i sar., 2016). Jednostavniji pristup je razvoj odvojenih delova nosača koji se kasnije lepljenjem ili presovanjem mogu spojiti u jedan (npr. Swieszkowski i sar., 2007). U jednoj studiji sintetisana su dva odvojena nosača na bazi fibrina i polikarprolaktona (PCL), odnosno na bazi PCL i tri kalcijum-fosfata (Swieszkowski i sar., 2007). Dobijeni nosači su zasejani ćelijama i odvojeno uzgajani u hondrogenom, odnosno osteogenom medijumu, da bi na kraju pomoću biokompatibilnog lepka bili spojeni u jedinstven nosač.

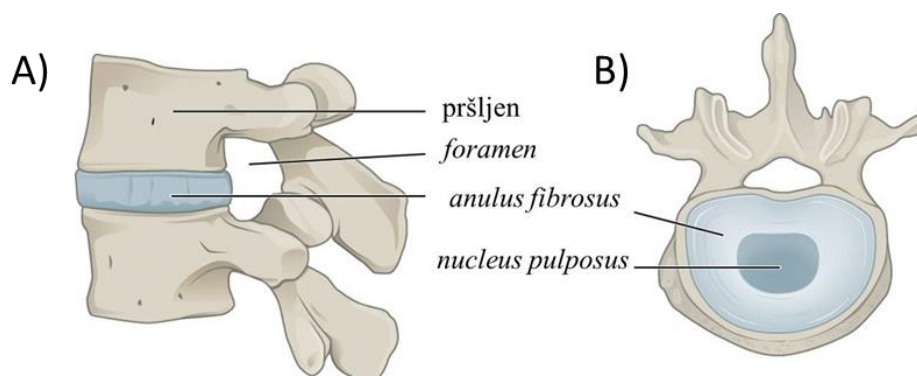
Regeneracija prelazne zone između hondralnog i subhondralnog dela ima poseban značaj u inženjerstvu tkiva osteohondralnih implantata (Cheng i sar., 2011). Stoga, razvoj potencijalnih nosača za inženjerstvo osteohondralnog tkiva trebalo bi da obezbedi dobru integraciju između slojeva u vidu tanke prelazne zone.

Jedan od načina da se to ostvari je izlivanje gornjeg sloja hidrogela preko poroznog donjeg sloja. Upravo ta ideja je primenjena u jednoj studiji gde je agarozni hidrogel izliven preko decelularizovanog nosača koji je izabran za koštani deo (Grayson i sar., 2010). Formirana je prelazna zona debljine oko 500  $\mu\text{m}$ , koja je nakon gajenja u bioreaktoru ispoljila karakteristike u mnogome različite od onih kod prirodnog tkiva. Rezultati ove studije ukazali su na potrebu optimizacije dobijanja prelazne zone na način koji će omogućiti što bolju replikaciju prelazne zone kao kod prirodnog tkiva. Takođe, rezultati su ukazali na potrebu daljih istraživanja u pravcu razumevanja odnosa između različitih ćelija u prelaznoj zoni (Grayson i sar., 2010).

Iako su različiti pristupi pružili značajne informacije i dali dalje smernice za razvoj adekvatnih implantata za osteohondralne defekte, zadovoljavajuća kombinacija ćelija, materijala i tehnika dobijanja, kao i sveobuhvatna karakterizacija implantata još uvek nije utvrđena.

### 1.2.6 Intervertebralni disk: sastav, građa i biomehaničke sile u tkivu

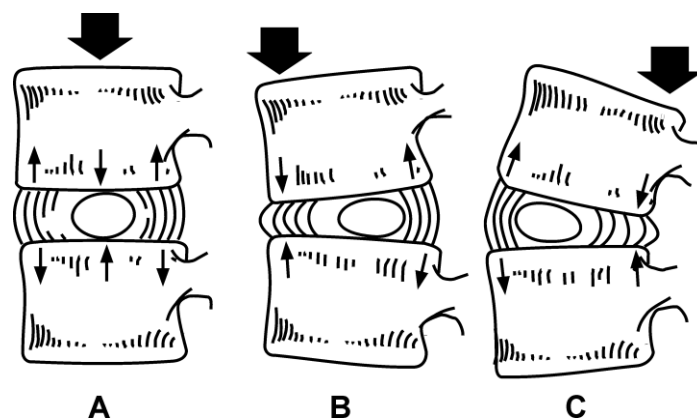
Intervertebralni disk (IVD) je hrskavičasta struktura, smeštena između susednih pršljenova kičmenog stuba vertebrata, čija je uloga da omogući uspravan položaj tela, pokrete, kao i različite položaje tela, savijanje ili okretanje (Chan i sar., 2011). IVD se sastoji od *nucleus pulposus* (NP) i *anulus fibrosus* (AF), koji imaju različitu morfološku strukturu, sastav i funkciju (slika 1.12).



**Slika 1.12** Građa intervertebralnog diska: A) bočni prikaz susednih pršljenova sa intervertebralnog diska, B) normalan prikaz (preuzeto iz *Anatomy and Physiology, Openstax, 2013, online book*)

Jezgro - *nucleus pulposus* (NP) je centralni deo IVD koga karakteriše visoka elastičnost, viskoznost i želatinasta struktura. Ove karakteristike NP posledica su velikog sadržaja intermolekularne slobodne vode od oko 80% (Hirsh i sar., 1952, Nagae i sar., 2007, Bibby i sar., 2001) kao i velikog sadržaja proteoglikana u odnosu na kolagen (Mwale i sar., 2004).

Pokreti tela, kao što su istezanje, savijanje i torzija, prouzrokuju različite vrste i jačine naprezanja, kao što su kompresija, istezanje, smicajni napon, slika 1.13 (Jensen, 1980, Cinotti i Postacchini, 1999, Izzo i sar., 2013, Long i sar., 2016). Usled uspravnog držanja tela, IVD je direktno podvrgnut kompresiji koja dovodi do povećanja hidrostatičkog pritiska unutar NP, koji prvi apsorbuje opterećenje.



**Slika 1.13** Mehanička napreznja unutar intervertebralnog diska tokom aksijalne kompresije i savijanja: A) aksijalna kompresija izaziva pritisak unutar *nucleus pulposus*, pri čemu dolazi do napreznja *anulus fibrosus*, B) savijanje generiše pritisak unutar *nucleus pulposus* dok kod *anulus fibrosus* dolazi do nabijanja ili C) istežanje vlanaka (Cinotti i Postacchini, 1999)

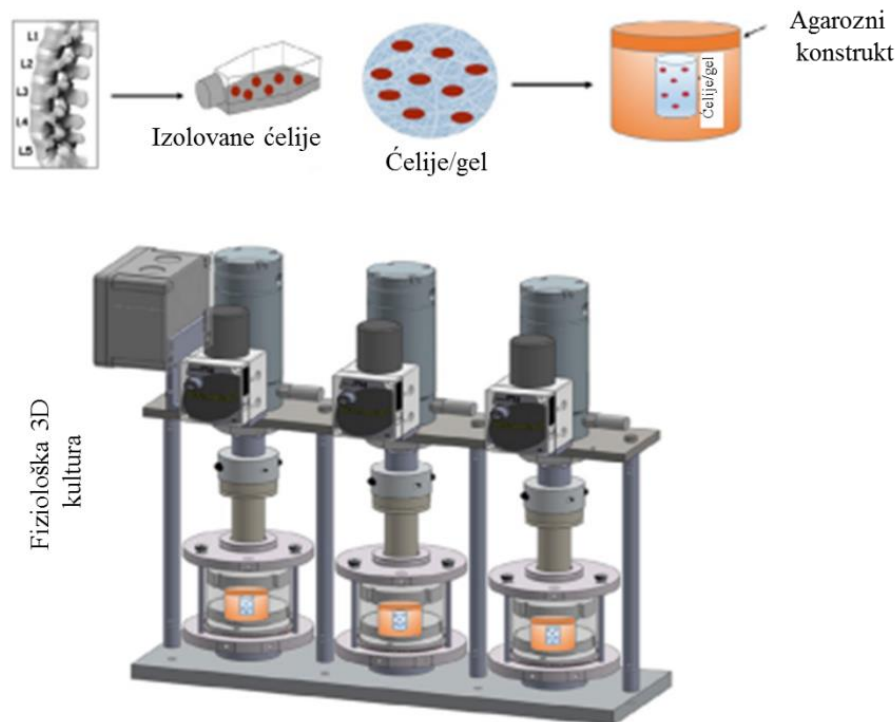
Tokom kompresije takođe dolazi do malog smanjenja zapremine NP, a time do značajnijeg porasta hidrostatičkog pritiska (HP) (Nachemson, 1981, Setton i Chen, 2006). Na osnovu te činjenice izvedena je hipoteza da je HP dominantni biomehanički signal značajan za inženjerstvo tkiva IVD. Osim kompresije, pokazano je da i torzija indirektno dovodi do porasta HP pritisak unutar NP (Barbir, 2011), ukazujući na to da su ćelije NP podvrgnute uticaju HP, bez obzira na mehanički stimulans. Tokom dnevnih aktivnosti kičma doživljava opterećenja u širokom rasponu amplituda i frekvencija (Walter i sar., 2014). Izmereno je da se unutar IVD mogu razviti pritisci i do 2,3 MPa, koji nastaju prilikom podizanja teških predmeta.

### 1.2.7 Inženjerstvo tkiva intervertebralnog diska

Povremeni ili hronični bolovi koji se povezuju sa degenerativnim promenama ili povredama IVD predstavljaju ozbiljan socio-ekonomski problem u zapadnim zemljama, jer skoro 80% populacije u nekoj životnoj dobi bude pogođeno ovim stanjem (Frauchiger i sar., 2017, Hartvigsen i sar., 2018). Više različitih kliničkih pristupa je razvijeno u tretmanu ozbiljnih oštećenja IVD, a neki od njih uključuju operativne zahvate koji podrazumevaju spinalnu fuziju ili disektomiju kod teških *diskus hernija* (Illien-Jünger i sar., 2014, Natarajan i Andersson, 2017).

Jedan deo naučne javnosti smatra da primena injekcionih materijala koji imaju sposobnost da geliraju na mestu primene, kao što su hidrogelovi, iz praktičnih razloga i minimalno invazivnih zahvata, imaju najveći potencijal za kliničku primenu u tretmanu NP (Buckley i sar., 2018). Drugi pak smatraju da se ovim pristupom može nadomestiti izgubljeni volumen i visina IVD, ali dugoročno ovi materijali nemaju sposobnost da preuzmu kompleksnu funkciju IVD (Frauchiger i sar., 2017). Od hidrogelova koji vode poreklo od prirodnih polimera za ovu namenu najčešće se koriste hijaluronska kiselina, kolagen tipa I, kolagen tipa II, fibrin, želatin, alginat, hitozan i gelanska guma (Pereira i sar., 2013, Bowles i Setton 2017). Među sintetskim hidrogelovima izdvajaju se polietilen glikol (PEG), polivinil alkohol (PVA), polivinil pirolidon (PVP) i poliuretan (Buckley i sar., 2018). Glavni nedostatak primene hidrogelova na mestu oštećenog NP je njihova nedovoljna mehanička čvrstoća. U cilju prevazilaženja ovih ograničenja ide se ka primeni kompleksnijih sistema koji uključuju ćelije, kao što su mezenhimalne matične ćelije, ćelije IVD ili progenitorske ćelije (Frauchiger i sar., 2017, Johnstone i sar., 2013). Za hondrogenezu matičnih ćelija kao potencijalnog izvora ćelija za regeneraciju IVD (npr. matične ćelije koštane srži (*bone marrow stem cell* – BMSC), ili matične ćelije masnog tkiva (*adipose stem cell* - ASC) potrebno je primeniti veće hidrostatičke pritiske od onih za koje se pokazalo da deluju pozitivno na NP ćelije (5–10 MPa; npr. Miyaniishi i sar., 2006a, b; Finger i sar., 2007; Correia i sar., 2012; Puetzer i sar., 2013).

Veliki potencijal na ovom polju predstavlja inženjerstvo tkiva koje istražuje mogućnosti *ex vivo* uzgoja IVD. U nedavnoj studiji koju su sproveli Rozencvajg (Rosenzweig) i saradnici, pokazano je da primena hidrogelova na bazi hijalurona i poli(N-izopropilakril amida) – HA-pNIPAM sa imobilisanim autolognim ćelijama poreklom iz NP ima visok potencijal za kliničku primenu u tretmanu ranih degenerativnih promena (Rosenzweig i sar., 2018). Naime u ovoj studiji je pokazano da se nakon 3 nedelje ispitivanja u fiziološki-relevantnim uslovima (do 10% deformacije), oko ćelija unutar hidrogela formirao novi ECM, slika 1.14.



**Slika 1.14** Eksperimentalni biomimetički sistem za ispitivanje ćelijskog odgovora u 3D ćelijskoj kulturi. Autologne ćelije poreklom iz *nucleus pulposus* lumbalnog dela kičme pacijenta umnožene su u monosloju, a zatim imobilisane u hidrogelove na bazi hijalurona i poli(N-izopropilakril amida) i smeštene unutar silikonskih modli uz pomoć agaroznih gelova. Proliferacija, formiranje ekstracelularnog matriksa i vijabilnost su ispitivani nakon 3 nedelje u fiziološki-relevantnim uslovima (Rosenzweig i sar., 2018)

Značaj HP u fiziološkom opsegu i dužem vremenskom periodu na sintezu komponenti ECM IVD potvrđen je u više različitih studija (npr. Ishihara i sar., 1996; Le Maitre i sar., 2009). Ishihara i saradnici u studiji sa goveđim i humanim eksplantatima IVD su pokazali da HP od 2,5 MPa, primenjen tokom samo 20 s utiče na porast sinteze proteoglikana (Ishihara i sar., 1996). Pozitivan efekat HP (0,1 – 0,95 MPa) na očuvanje integriteta tkiva, zadržavanje proteoglikana, ćelijskog fenotipa i metaboličke aktivnosti ćelija pokazan je i u studiji u trajanju od 2 nedelje na goveđim eksplantatima NP (Le Maitre i sar., 2009).

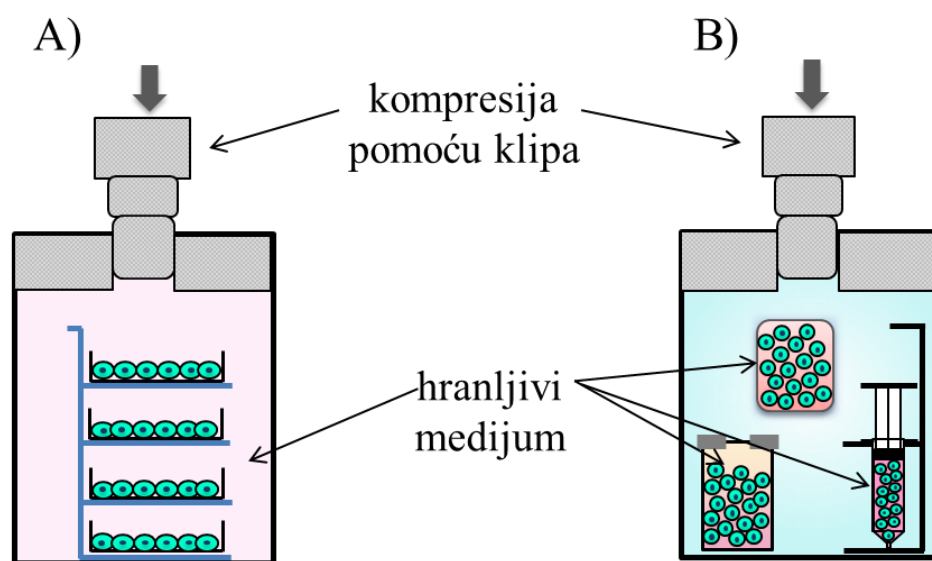
#### 1.2.7.1 Biorektori sa hidrostatičkim pritiskom u inženjerstvu IVD<sup>1</sup>

U inženjerstvu tkiva IVD najčešće se koriste biorektori sa hidrostatičkim pritiskom, pošto je pokazano da HP predstavlja dominantan biomehanički signal za IVD. Biorektori sa hidrostatičkim pritiskom mogu biti dizajnirani kao diskontinualni sistemi kod kojih se ćelije, nosači

<sup>1</sup> Ovo poglavlje je publikovano u radu Zvicer i Obradović, 2018.

zasejani ćelijama ili delovi tkiva gaje u statičkim uslovima na atmosferskom pritisku, a samo u definisanim vremenskim intervalima se prenose u komore pod hidrostatičkim pritiskom. Kod diskontinualnih sistema razlikuju se dva tipa bioreaktora: sa direktnom kompresijom hranljivog medijuma (slika 1.15a) i sa indirektnom kompresijom pomoću kompresionog fluida (slika 1.15b). Zajedničko kod oba tipa je da su komore pod pritiskom najčešće izrađene od nerđajućeg čelika i da se kompresija ostvaruje preciznim pomeranjem klipa koji je povezan sa aktuatorom uređaja za preciznu mehaničku karakterizaciju materijala.

Bioreaktori sa direktnom kompresijom hranljivog medijuma predstavljaju najjednostavnije sisteme jer ne zahtevaju dodatnu manipulaciju ispitivanih uzoraka. Ovi sistemi prvi put su korišćeni u studiji na monosloju hondrocita poreklom iz artikularne hrskavice (*Smith i sar., 1996*), a kasnije i sa ćelijama iz IVD u 2D i 3D sistemu (*Kasra i sar., 2003, 2006*). Međutim, pored jednostavnosti, pokazalo se da su ovakvi sistemi nepogodni za ispitivanja u dužem vremenskom periodu. Značajna potrošnja hranljivog medijuma i potencijalni problemi kao što su kontaminacija i prisustvo toksičnih jona hroma, izluženih iz materijala od koga je izrađena komora (*Merritt i Brown, 1995*) doveli su do razvoja bioreaktora sa indirektnom kompresijom (slika 1.15b). Kod ovih sistema nosači sa zasejanim ćelijama i hranljivim medijumom su zatvoreni unutar pogodnih kesica, špriceva ili epruveta sa membranom, i onda se prenose u komoru pod pritiskom. Na taj način su nosači sa ćelijama izolovani od kompresionog fluida unutar komore. Kao kompresioni fluid najčešće je korišćena voda, dok je vazduh korišćen u studijama koje su imale za cilj ispitivanje uticaja hiperbaričnih ili hipoksičnih uslova u kombinaciji sa hidrostatičkim pritiskom na aktivnost ćelija (*Grimshaw i Mason, 2000; Hutton i sar., 1999, 2001; Neidlinger-Wilke i sar., 2005; Singh i sar., 2011*).



**Slika 1.15** Dizajn bioreaktora kod diskontinualnih sistema sa hidrostatičkim pritiskom: A) direktna kompresija hranljivog medijuma - pomeranjem klipa ostvaruje se kompresija hranljivog medijuma koji je u direktnom kontaktu sa ćelijama, B) indirektna kompresija hranljivog medijuma - pomeranjem klipa komprimuje se fluid (voda, vazduh) koji prenosi pritisak na ispitivane uzorke u kontaktu sa hranljivim medijumom, zatvorene unutar sterilnih kesica, špriceva, ili epruveta sa membranom (*Zvicer i Obradovic, 2018*)

Najveći broj studija uticaja hidrostatičkog pritiska na hondrogene ćelije sproveden je upravo u ovom tipu bioreaktorskih sistema. Rezultati dobijeni u ovim studijama predstavljaju osnovu za razumevanje ćelijskog odgovora na hidrostatički pritisak, čime je napravljen korak ka pronalazanju optimalnih uslova za *in vitro* regeneraciju tkiva IVD. Pokazano je da male vrednosti fiziološki relevantnog hidrostatičkog pritiska (0,1 – 1 MPa) u naizmeničnom režimu tokom dužeg

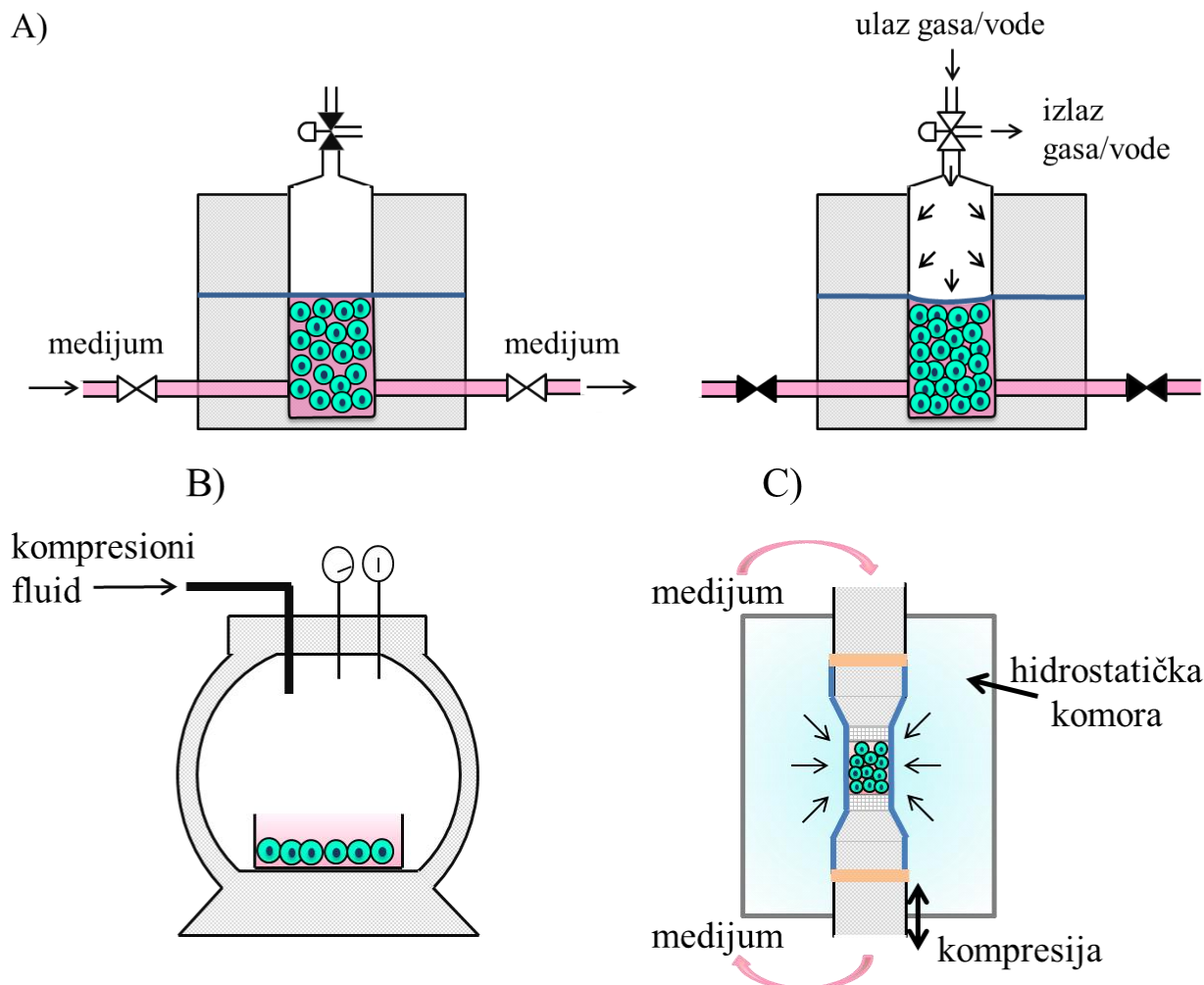


vremenskog perioda podstiču anaboličku aktivnost hondrogenih ćelija u 3D ćelijskim kulturama (npr. *Ishihara i sar., 1996; Hutton i sar., 1999, Le Maitre i sar., 2009*).

Posebnu grupu bioreaktora sa hidrostatičkim pritiskom predstavljaju kontinualni sistemi sa direktnom kompresijom hranljivog medijuma u statičkim uslovima, najčešće pomoću komprimovanog gasa (slika 1.16b). Tehnička rešenja ovih sistema pružaju mogućnost gajenja i direktne kompresije unutar iste komore bez potrebe za prenošenjem ćelijske kulture, pa se stoga mogu ubrojiti u red kontinualnih sistema (*van Kampen i sar., 1985; Klein- Nulend i sar., 1986; Roelofsen i sar., 1995, Hansen i sar., 2001, Scherer i sar., 2004, Heyland i sar., 2006, Kim i sar., 2009, Ding i sar., 2012*).

Pored diskontinualnih i kontinualnih sistema za statičke kulture, razvijeni su i kontinualni bioreaktorski sistemi sa protokom hranljivog medijuma. Pre svega, ovi sistemi omogućavaju hidrostatičku kompresiju i protok medijuma u jednom uređaju bez potrebe za premeštanjem uzoraka, zatim poboljšavaju prenos mase unutar 3D ćelijskih kultura i obezbeđuju kontinuirano snabdevanje svežim medijumom i kiseonikom uz redovno uklanjanje metabolita. S druge strane, glavni nedostatak ovih sistema je nemogućnost potpune automatizacije jer se usled normalnog metabolizma ćelija stvaraju mehurići gasa koje je nužno ručno ukloniti pre ciklusa kompresije. U nekim od rešenja predloženo je uklanjanje mehurova gasa pomoću vakuum pumpe (*Watanabe i sar., 2005*). Najčešći pristup u dizajniranju ovih sistema je razvoj dvokomornih bioreaktora gde su komore razdvojene fleksibilnom membranom (slika 1.16a) (*Orr i Burg, 2008, Maxson i Burg, 2012, Mizuno i sar., 2004; Watanabe i sar., 2005, Mizuno i Ogawa, 2011*). Tokom perioda gajenja kroz donju komoru u kojoj se nalaze ćelije na 3D nosačima kontinualno protiče hranljivi medijum na atmosferskom pritiku. Tokom perioda kompresije protok medijuma kroz ovu komoru se zaustavlja zatvaranjem ventila, a pritisak iz gornje kompresione komore se prenosi na donju komoru preko membrane. Takođe, humane matične ćelije poreklom iz masnog tkiva (ASC) diferentovale su se u pravcu hondrocita i sintetisale ECM pod uticajem naizmeničnog pritiska od 5 MPa i frekvencom od 0,5 Hz čime je potvrđena mogućnost primene ovih kontinualnih i sofisticiranog bioreaktorskih sistema u inženjerstvu tkiva IVD (*Correira i sar., 2012*).

Poseban tip kontinualnih bioreaktora je bioreaktor sa više fizičkih signala, odnosno sa uniaksijalnom kompresijom, hidrostatičkim pritiskom i pulzatilnim protokom, slika 1.16c (*Naing i sar., 2014*). Ovi sistemi predstavljaju budućnost inženjerstva tkiva jer pokušavaju da što bliže imitiraju prirodnu sredinu posebno skeletnih tkiva. Rad sa ovakvim sistemima je zahtevan i to je jedan od razloga zašto se oni ređe koriste. U tom pravcu, potrebno je nastaviti sa razvojem kontinualnih bioreaktora sa hidrostatičkim pritiskom koji bi omogućili jednostavniji rad i ponovljivost rezultata, a što je i bio jedan od ciljeve ove teze.



**Slika 1.16** Dizajn kontinualnih bioreaktora sa hidrostatičkim pritiskom: A) kontinualni sistem gde se prenos pritiska vrši preko membrane, B) kontinualni sistem sa statičkim kulturama, C) sofisticirani bioreaktor sa više biomehaničkih signala (Zvicer i Obradovic, 2018)

### 1.3 PRISTUPI U KARAKTERIZACIJI BIOMATERIJALA

Razvoj novih biomaterijala zahteva detaljnu karakterizaciju u smislu fizičko-hemijskih osobina, kao i *in vitro* i *in vivo* funkcionalnosti. Brojne metode, kao što su UV-vidljiva spektroskopija, određivanje zeta potencijala, različite mikroskopske metode, mikro kompjuterska tomografija (mikro CT), određivanje veličine i raspodele pora po Bruner - Emet – Teler (*Brunauer-Emmett-Teller*) metodi, infracrvena spektroskopija sa Furijeovom (*Fourier*) transformacijom (FTIR), difrakcija rentgenskih zraka (*X-ray Diffraction* - XRD) i mnoge druge, daju uvid u osnovne fizičko-hemijske karakteristike materijala kao što su poroznost, sastav, morfologija i sl. Međutim, sa aspekta primene biomaterijala posebno je značajna adekvatna funkcionalna karakterizacija koja, između ostalog, uključuje određivanje kinetike otpuštanja aktivne supstance, mehaničkih karakteristika i citotoksičnosti.

Ispitivanje kinetike otpuštanja aktivne komponente potrebno je sprovesti u uslovima koji odgovaraju uslovima pri kojima se ispituje efekat aktivne komponente biomaterijala (npr. antimikrobna svojstva, citotoksičnost i sl.), tj. u uslovima koji najbliže imitiraju uslove na mestu potencijalne primene.

U objavljenim studijama generalno ne postoje standardizovane procedure po kojima se ova ispitivanja vrše. Pa tako, od studije do studije, kao medijum za otpuštanje se koriste voda, fosfatno-

pufferisan fiziološki rastvor (eng. *phosphate buffer saline* - PBS), simulirana telesna tečnost (SBF), fiziološki rastvor natrijum hlorida i sl. (npr. *Valle i sar., 2014, Boonkaew i sar. 2013, Wang i sar. 2014, Tao i sar. 2019*), pri čemu je odnos mase ispitivanog materijala i medijuma za otpuštanje vrlo često proizvoljan. Sastav medijuma za otpuštanje je veoma važan, posebno kada se radi sa hidrogelovima, jer joni prisutni u medijumu mogu uticati na brzinu bubrenja hidrogela, a time i na otpuštanje aktivne supstance. Posebno bitno pitanje je inicijalno stanje uzorka, tj. da li se ispituje u suvom ili vlažnom stanju. Na primer, u studiji koju su sproveli Kostić i saradnici, gde su korišćene suve alginatne mikročestice sa sadržanim nanočesticama srebra, jasno je pokazano da prilikom brze rehidracije mikročestica dolazi do značajnijeg taloženja AgCl unutar čestica i manjeg otpuštanja srebra nego što je slučaj sa istim ali inicijalno vlažnim mikročesticama (*Kostić i sar., 2016*).

Inicijalno stanje uzoraka je od velike važnosti i prilikom određivanja mehaničkih karakteristika. Mehaničke karakteristike biomaterijala se najčešće određuju primenom uređaja za precizno određivanje mehaničkih karakteristika ili određivanjem reoloških karakteristika materijala. Međutim, u oba ova pristupa uzorci su najčešće uništeni nakon ispitivanja i ove metode se uglavnom ne mogu koristiti za praćenje mehaničkih karakteristika istog uzorka u dužem vremenskom periodu.

Određivanje citotoksičnosti je posebno izazovno kada se radi o citotoksičnosti nanomaterijala. Nanomaterijali zbog svojih fizičko-hemijskih osobina (kao što je odnos površine i zapremine, tj. velika specifična površina, a time i velika reaktivnost nanočestica) i drugih prednosti u odnosu na materijale mikro i makro dimenzija smatraju se materijalima 21. veka. Potencijalnu primenu nalaze u biomedicini i to u kontrolisanom dopremanju lekova u organizmu, u lečenju tumora, rezistentnih bakterijskih infekcija i slično (*Singh i sar., 2008*). Nanomaterijali zahtevaju poseban pristup u razvoju metoda za karakterizaciju i evaluaciju jer mogu izazvati citotoksičnost i akumulaciju u organizmu, najčešće u jetri, bubrezima, slezini i plućima, gde mogu prouzrokovati izmenjenu biološku funkciju organa (*Lasagna-Reeves i sar., 2010*). Ispitivanje citotoksičnosti biomaterijala generalno počinje ispitivanjima *in vitro*, najčešće na monosloju ćelija, gde se tradicionalno sprovode direktni kontak test (slika 1.17) i ekstrakcioni test. Kontakt test uključuje dovođenje biomaterijala u direktan kontakt sa monoslojem ćelija tako što se materijal postavlja preko formiranog monosloja (npr. *Jovanovic i sar., 2013, Stojkowska i sar., 2014, Makvandi i sar. 2019*), ili se ćelije zasejavaju na površinu uzorka materijala (npr. *Rattanuengsrikul i sar. 2012, Alarcon i sar., 2015, Resmi i sar. 2017, Raho i sar. 2020*). Efekat citotoksičnosti se utvrđuje u definisanim vremenskim tačkama, i to primenom mikroskopije u cilju utvrđivanja zone inhibicije, raspoređenosti i morfologije ćelija na površini i oko uzorka (npr. *Rattanuengsrikul i sar. 2012, Alarcon i sar., 2015*), kao i različitih kolorimetrijskih testova (npr. *Resmi i sar. 2017, Makvandi i sar. 2019*). Kolorimetrijski testovi koji se najčešće koriste su zasnovani na tetrazolijumovim solima (kao što je npr. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid - MTT), zatim laktat dehidrogenazi (LDH), *Alamar blue* boji itd. Svi ovi testovi se baziraju na ispitivanju ćelijske metaboličke aktivnosti uz upotrebu specifičnih boja što omogućava kvantifikaciju vijabilnosti ćelija primenom spektrofotometrije (*Adan i sar., 2016*).

Ekstrakcioni test se zasniva na potapanju biomaterijala u određeni ekstrakcioni medijum, tokom određenog vremena i tretmanu monosloja ćelija dobijenim medijumom, a zatim određivanju vijabilnosti ćelija gore navedenim metodama (npr. *Leawhiran i sar. 2014, Huang i sar. 2017, Khampieng i sar. 2018*). Ekstrakcioni proces se izvodi tokom definisanog vremenskog perioda, obično između 24 i 72 h, u inkubatoru na temperaturi 37 °C, pri koncentraciji 5% CO<sub>2</sub> i vlažnoj atmosferi. U različitim radovima autori koriste različite protokole koji definišu sastav ekstrakcionog medijuma (npr. bezserumski medijum (npr. *Valle i sar. 2014*), PBS (*Loo i sar., 2014*)), odnos medijuma i biomaterijala, količinu medijuma koja se dodaje ćelijskoj kulturi, što sve značajno može da utiče na rezultat vijabilnosti ćelija u ispitivanoj studiji.

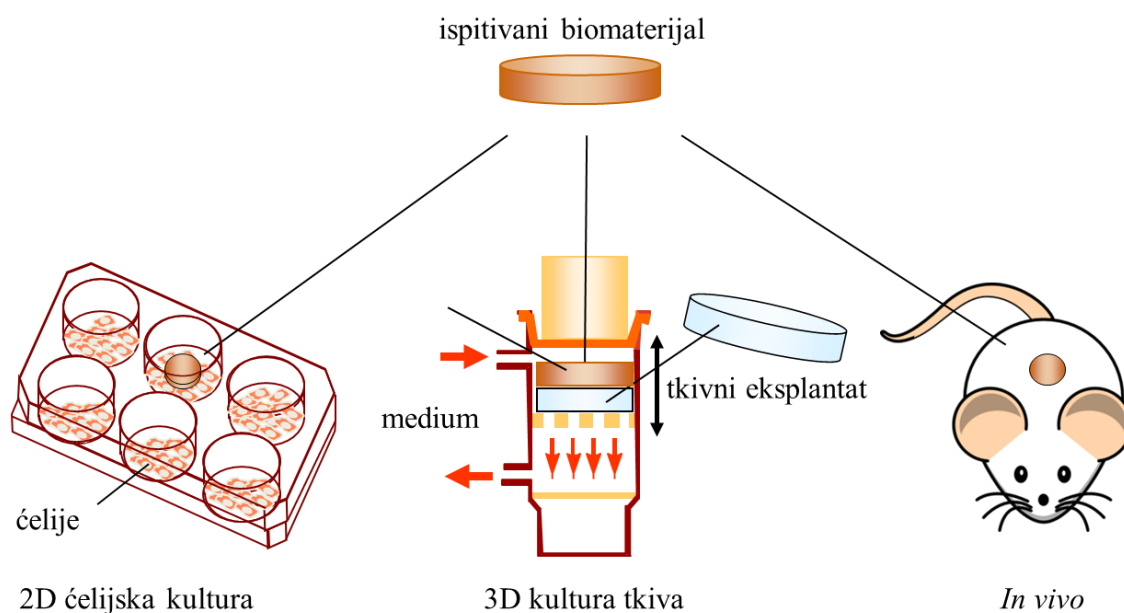
Pored određivanja citotoksičnosti na monosloju ćelija, Evropski centar za nanotoksikologiju (*EURO-NanoTox*), predlaže da se tokom *in vitro* karakterizacije nanomaterijali ispituju u pogledu



hematotoksikologije, imunotoksikologije, genotoksikologije, inflamatornog potencijala, penetracije unutar ćelija i degradacije nanomaterijala ([www.bionanonet.at](http://www.bionanonet.at)). Navedena ispitivanja na monosloju ćelija predstavljaju jednostavne, standardizovane i lako ponovljive metode, koje daju brze rezultate i uvid u uticaj materijala na određenu ćelijsku kulturu (Joris i sar., 2013). Međutim, glavni nedostatak ovih metoda je to što su ćelije izolovane iz prirodnog okruženja, čime gube zaštitu ECM, karakteristične međusobne interakcije, kao i interakcije sa okolnim matriksom, a time postaju dodatno senzitivisane (Luo i sar., 2012, Joris i sar., 2013).

Sa druge strane *in vivo* studije na životinjama sprovode se sa idejom da se evaluiira imunogenost, mutagenost i alergogenost materijala i da se utvrdi dugoročna i akutna toksikologija, tj. da se evaluiiraju potencijalna štetna dejstva na organizam kao celinu. Rezultati *in vivo* studija su daleko pouzdaniji od rezultata u 2D kulturama ćelija u monosloju ali ipak efikasnost prevođenja rezultata dobijenih na životinjama na predviđanje efekata na ljudima je generalno mala (čak i ispod 10%, npr. Shanks i sar., 2009). Osim ovih ozbiljnih pitanja relevantnosti životinjskih modela za dalja klinička ispitivanja i etičkih pitanja, ova ispitivanja povlače i pitanja ekonomske opravdanosti pošto su komplikovana za izvođenje i skupa.

Poseban problem predstavlja poređenje rezultata dobijenih u 2D ćelijskim kulturama i na životinjama koji su često kontradiktorni što je poznato kao *in vitro* – *in vivo* jaz (Joris i sar., 2013). Poslednjih godina učinjeni su značajni pomaci u razvoju različitih 3D *in vitro* pristupa za fiziološki relevantniju karakterizaciju potencijalnih biomaterijala, koji bi trebalo da premoste ovaj jaz, čime bi se značajno smanjila i bespotrebna ispitivanja na životinjama. Jedan od pristupa je primena ko-kultura različitih ćelija (Sukhanova i sar., 2018), koje bliže odgovaraju modelu specifičnog tkiva ili organa, međutim ove kulture i dalje predstavljaju 2D okruženje bez ECM. 3D pristupi obuhvataju četiri *in vitro* sistema: i) ćelijski sferoidi, ii) mikrouređaji sa ćelijama (*cells on chip*), iii) imobilisane ćelije na adekvatnim nosačima i iv) 3D tkivne kulture.



**Slika 1.17** Prikaz pristupa za ispitivanje citotoksičnosti biomaterijala: kontakt test na monosloju ćelija, 3D kulturi tkiva u biomimetičnom bioreaktoru i ispitivanje na životinjama (deo prilagođen u odnosu na Zvicer i sar., 2015)

Trodimenzionalno okruženje u svim navedenim sistemima omogućava interakciju između ćelija, njihovu proliferaciju, diferentovanje, sintezu ECM i/ili mehaničku zaštitu, što rezultira fiziološki relevantnijim ćelijskim odgovorom. Sa druge strane, dugotrajni eksperimenti u 3D sistemima predstavljaju izazov za sebe, usled difuzionih ograničenja, kao i operativnih problema u održavanju kulture. Način da se i ovi izazovi premoste je primena biomimetičnih bioreaktora

namenjenih inženjerstvu tkiva kao 3D modela za fiziološki relevantnu karakterizaciju potencijalnih biomaterijala (slika 1.17). Bioreaktori sa kontinualnim protokom medijuma obezbeđuju uniformnu distribuciju jona u hranljivom medijumu i konvektivni prenos mase, a time i bolju prehranu ćelija i redovno uklanjanje produkata metabolizma. Pokazano je da je jedan takav protočni bioreaktor uspešno korišćen za evaluaciju citotoksičnosti otpuštenog srebra iz Ag/alginatnih mikročestica ( $4,7 \pm 0,6$  mM) u pakovanom sloju alginatnih mikročestica sa imobilisanim ćelijama hondrocita izolovanim iz artikularne hrskavice teleta ( $21,0 \pm 1,7 \times 10^6$  ćelija/ml). Zabeležen je visok stepen preživljavanja (vijabilnost oko 80%) nakon 2 nedelje ispitivanja pri protoku od 0,38 ml/min (Stojkowska i sar., 2014), što ukazuje na mogućnost primene biomimičnih bioreaktora u ispitivanjima citotoksičnosti u dužem vremenskom periodu.

Ipak, održavanje bioreaktorske kulture je zahtevno, tako da su za širu primenu ovih sistema potrebna sveobuhvatna istraživanja koja će pokazati potencijal u različitim oblastima primene biomaterijala, kao i relevantnost u odnosu na rezultate dobijene u *in vivo* uslovima.

## 2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji je bio ispitivanje mogućnosti primene biomimičnih bioreaktora u razvoju, karakterizaciji i određivanju potencijala primene biomaterijala u inženjerstvu tkiva kosti i hrskavice, kao i razvoj bioreaktora sa hidrostatičkim pritiskom za inženjerstvo tkiva intervertebralnog diska.

Istraživanja su uključivala nekoliko celina:

1. Ispitivanje potencijalne primene nanokompozitnih Ag/alginatnih diskova kao implantata u inženjerstvu tkiva hrskavice, na osnovu:
  - određivanja citotoksičnosti hidrogelova u ćelijskim kulturama i kulturi tkiva u biomimičnim uslovima u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom,
  - određivanja biomehaničkih karakteristika i stabilnosti,
  - određivanja kinetike otpuštanja nanočestica/jona srebra.
2. Ispitivanje potencijalne primene hidrogelova na bazi gelanske gume i bioaktivnog stakla u inženjerstvu tkiva kosti na osnovu:
  - određivanja formiranja mineralne faze kalcijum fosfata u fiziološki relevantnim uslovima primenom protočnog bioreaktora i bioreaktora sa dinamičkom kompresijom,
  - određivanja biomehaničkih karakteristika.
3. Ispitivanje potencijalne primene dvofaznih hidrogelova na bazi gelanske gume i gelanske gume i bioaktivnog stakla u inženjerstvu osteohondralnog tkiva na osnovu:
  - ispitivanja mogućnosti dobijanja dvofaznih hidrogelova jednostavnim metodama,
  - određivanja formiranja mineralne faze kalcijum fosfata u fiziološki relevantnim uslovima primenom bioreaktora sa dinamičkom kompresijom,
  - određivanja biomehaničkih karakteristika.
4. Ispitivanje i validaciju prototipa bioreaktora sa hidrostatičkim pritiskom namenjenog inženjerstvu tkiva intervertebralnog diska u pogledu:
  - prenošenja i održavanja pritiska,
  - akvizicije podataka.

### 3 MATERIJALI I METODE

#### 3.1 MATERIJALI I HEMIKALIJE

U ovom radu za sintezu nanokompozitnih materijala korišćena su dva tipa Na-alginata različitog sastava. Alginat niske viskoznosti (A3249, „*AppliChem*“, *Darmstadt*, Nemačka) odlikovao se visokim sadržajem guluronskih (G) jedinica i odnosom M/G od 1,38 (*Topuz i sar.*, 2012). Kod ovog tipa alginata ustanovljeno je da frakcije MM i GG blokova dimera iznose 0,26 i 0,41, redom (*Topuz i sar.*, 2012). U daljem tekstu ovaj alginat je označen kao alginat sa većim sadržajem G jedinica – VG alginat. Alginat srednje viskoznosti (A2033, „*Sigma*“, *St. Louis*, SAD) imao je manji sadržaj G jedinica, odnos M/G od 1,94, kao i veću frakciju MM blokova (0,47) u poređenju sa GG blokovima dimera (0,16) (*Topuz i sar.*, 2012). U daljem tekstu ovaj alginat označen je kao alginat sa malim sadržajem G jedinica – MG alginat. Korišćeni su još i  $\text{AgNO}_3$  („*M.P. Hemija*“ d.o.o., Beograd, Srbija),  $\text{KNO}_3$  i  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  („*Centrohem*“, Stara Pazova, Srbija). Azot je bio visokog stepena čistoće (99,5%).

U eksperimentima sa ćelijskim kulturama korišćeni su „*Dulbecco*“ modifikovan „*Eagle*“ medijum sa 4,5 g/l sadržajem glukoze i 0,584 g/l L-glutamina (DMEM, 01-055-1), fetalni goveđi serum (FBS), 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina (HEPES), penicilin/streptomycin (svi kupljeni od „*Biological Industries*“, *Beit-Haemek*, Izrael), askorbinska kiselina („*Galenika*“, Beograd, Srbija), fosfatno-puferisan fiziološki rastvor (eng. *phosphate buffer saline* - PBS), etilendiamin-tetraacetatna kiselina (EDTA), dimetiltiazoldifenil-tetrazolijum-bromid (MTT), tripan plavo (*trypan blue*) i prolin (svi kupljeni od „*Sigma*“, *St. Luis*, SAD) i kolagenaza tipa II („*Gibco Life Technology*“, *Grand Island*, Njujork). Poli (vinil) alkohol (PVA, rastvoran u vrućoj vodi, P163-250 G) i poli (vinil) piroolidon (PVP, M=40.000) nabavljeni su od firme „*Sigme-Aldrich*“ (*St. Luis*, SAD). Korišćene su i bakarne pločice (>99,9% Cu, „*Valjaonica bakra*“, Sevojno, Srbija) i silikonski lepak („*Bison*“, Holandija).

U eksperimentima razvoja i karakterizacije hidrogelova za koštano i osteohondralno tkivo korišćeni su: polimer gelanske gume (G1910, *Gelzan*<sup>TM</sup> CM, „*Sigma-Aldrich*“, *St. Luis*, SAD), bioaktivno staklo (BAG; sastava 70%  $\text{SiO}_2$  i 30% CaO, sintetisano po prethodno opisanoj proceduri (*Gantar i sar.*, 2014) na Institutu „*Jožef Stefan*“, Slovenija), zatim NaCl („*Centrohem*“, Stara Pazova, Srbija),  $\text{NaHCO}_3$  („*Alkaloid*“ AD, Skoplje, Makedonija), KCl („*Zorka Pharma-Hemija*“, Šabac, Srbija),  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  („*Alkaloid*“ AD, Skopje, Makedonija),  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  („*VWR Chemicals*“, Belgija), HCl (37 mas.%, „*Zorka Pharma-Hemija*“, Šabac, Srbija),  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (*Acros Organics*, SAD),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  („*Centrohem*“, Stara Pazova, Srbija) i tris(hidroksimetil)aminometan (*Tris*, „*Sigma-Aldrich*“, *St. Luis*, SAD).

Pored navedenih, korišćeni su još:  $\text{HNO}_3$  (65 mas.%, „*Zorka Pharma-Hemija*“, Šabac, Srbija),  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25 mas.%, „*NRK Inženjering*“, Beograd, Srbija) i natrijum citrat dihidrat („*Sigma-Aldrich*“, *St. Luis*, SAD).

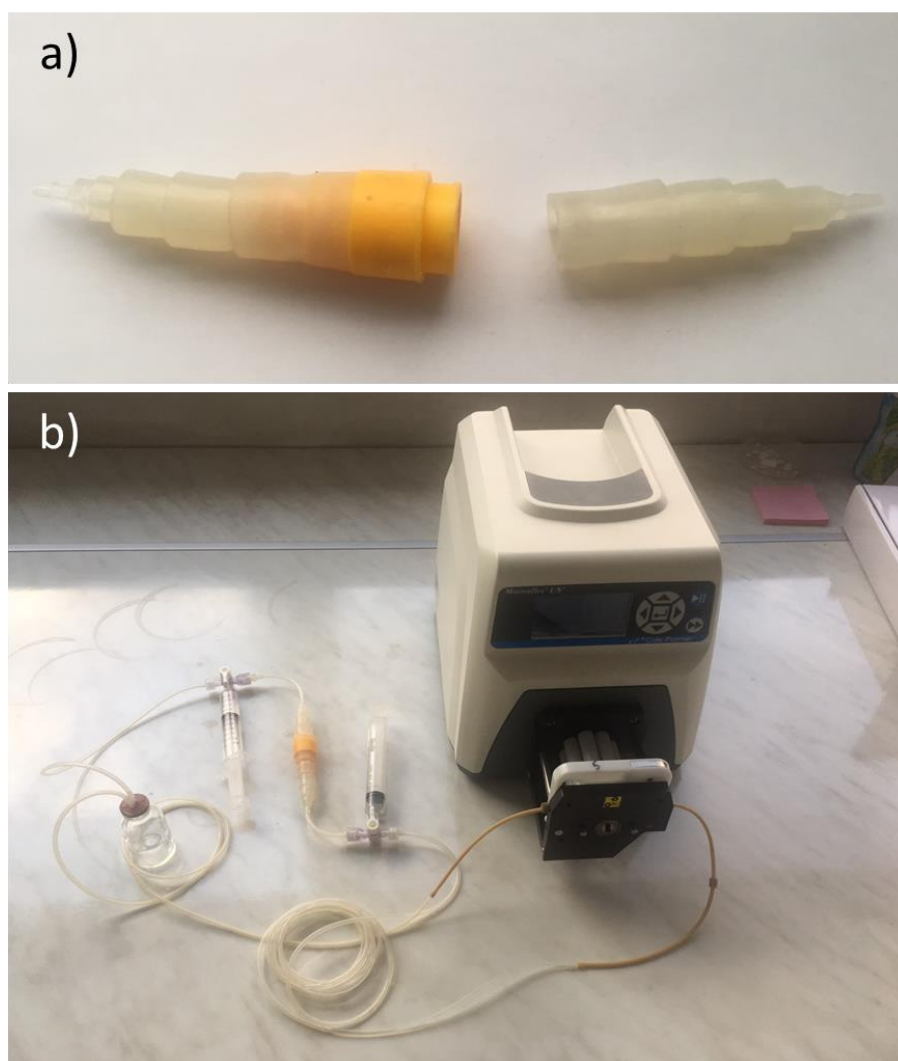
Sve hemikalije su bile p.a. čistoće.

#### 3.2 BIOREAKTORSKI SISTEMI

U ovoj doktorskoj disertaciji korišćena su dva tipe biomimičnih bioreaktora: protočni bioreaktor i bioreaktor sa dinamičkom kompresijom. Jedan deo istraživanja odnosio se na razvoj bioreaktora sa hidrostatičkim pritiskom i na ispitivanje režima rada bioreaktora u fazama prototip 1 i 2.

### 3.2.1 Protočni bioreaktor

Protočni bioreaktori korišćeni u ovom radu napravljeni su na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Komora za smeštanje uzoraka sastojala se od filterskog kućišta (prečnika 15 mm i visine 17 mm, *CellTrics®*, „*Protec*“, *Munster*, Nemačka), koje sa nizom redukcionih, silikonskih creva obrazuje komoru (slika 3.1a). U svaku komoru umetnut je mrežasti držač koji omogućava fiksaciju uzorka unutar komore i obezbeđuje strujanje medijuma direktno kroz uzorak. Svaka komora je nezavisno povezana sa sistemom za recirkulaciju medijuma, koji se sastoji od silikonskih creva (platinski isprana, „*Cole-Parmer Instrument Co.*“, *Illinois*, SAD), creva za razmenu gasova i rezervoara za medijum (slika 3.1b). Medijum se potiskuje višekanalnom peristaltičkom pumpom (*Masterflex*, SAD) kroz sistem silikonskih creva, od rezervoara za odlaganje medijuma, direktno kroz uzorak smešten unutar bioreaktorske komore i vraća nazad u rezervoar. Ispred i iza bioreaktorske komore postavljena su dva šprica koja omogućavaju zamenu medijuma i istiskivanje mehurića vazduha iz sistema.



**Slika 3.1** Protočni bioreaktorski sistem: A) komora bioreaktora napravljena od filterskog kućišta koje se povezuje sa sistemom za recirkulaciju medijuma preko niza od četiri redukciona creva, B) ceo sistem u kome je komora bioreaktora povezana sa sistemom creva za recirkulaciju medijuma koja se odvija pomoću višekanalne peristaltičke pumpe

Opisani bioreaktorski sistemi korišćeni su u ispitivanjima formiranja kalcijum fosfata unutar hidrogelova na bazi gelanske gume i bioaktivnog stakla koji nalaze potencijalnu primenu u inženjerstvu tkiva kosti.

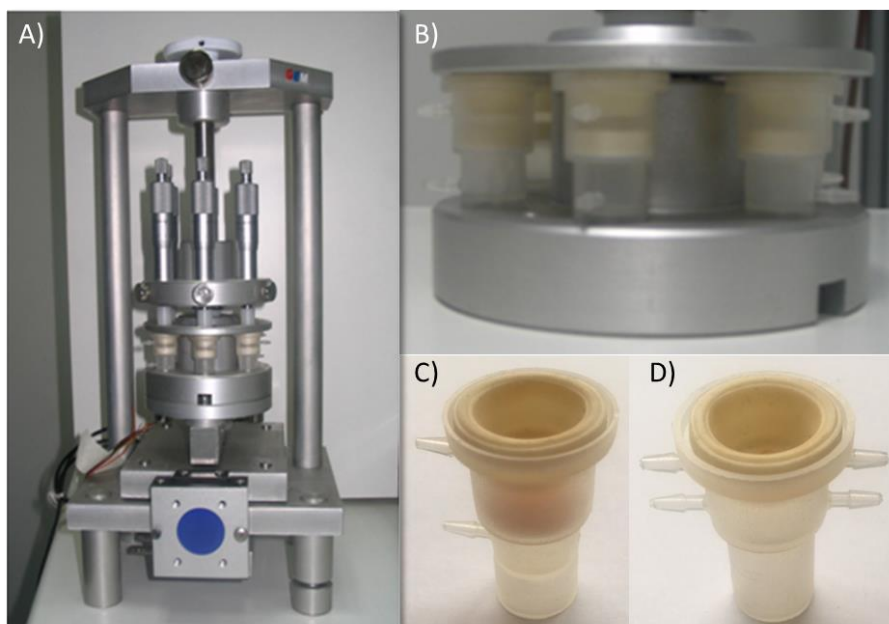
### 3.2.2 Bioreaktor sa dinamičkom kompresijom i protokom medijuma

Bioreaktor sa dinamičkom kompresijom (u daljem tekstu *bioreaktor sa dinamičkom kompresijom*) (slika 3.2a), konstruisan na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu (*Petrović i sar., 2009*), namenjen je za istraživanja u oblasti inženjerstva tkiva hrskavice i kosti, kao i za karakterizaciju potencijalnih biomaterijala u fiziološki relevantnim uslovima. Bioreaktor se sastoji od: komora za gajenje tkiva, nosača komora, metalne baze za koju se nosač pričvršćuje, step motora, senzora opterećenja i metalne konstrukcije koja povezuje sve delove sistema. Kompresija uzorka se osvaruje pomoću step motora (*Superstep* STP-MTR-23055, „AutomationDirect“, SAD) koji je smešten ispod metalne osnove bioreaktora i vrši pomeranje ove osnove u aksijalnom pravcu. Opterećenje pod kojim se nalaze uzorci se kontinualno meri pomoću senzora opterećenja (*Scaime* AL3C3SH5E, „Scaime“, Francuska) smeštenog ispod nosača komora. Senzor beleži srednje vrednosti odziva opterećenja za sve uzorke istovremeno što omogućava proračun napona u materijalu u odnosu na primenjenu deformaciju.

Na nosač je moguće montirati do šest komora za gajenje tkiva istovremeno (slika 3.2b). Komore se sa gornje strane zatvaraju dijafragmom napravljenom od bergafleksa (*Bergaflex*, „Termoplast“ DOO, Beograd), na koje naležu mikrometarski zavrtanji tako da posredno opterećuju uzorke. Na taj način, omogućena je precizna kompresija svakog uzorka, nezavisno od debljine pojedinačnog uzorka. Svaka bioreaktorska komora je zasebno povezana sa sistemom za recirkulaciju medijuma koji je već opisan kod protočnog bioreaktorskog sistema. Sastoji se od silikonskih creva, rezervoara za medijum i namotaja creva koji služi za razmenu gasova, dok je recirkulacija medijuma obezbeđena višekanalnom peristaltičkom pumpom (*Masterflex*, SAD). Rad bioreaktora je automatski kontrolisan pomoću računara koji kontroliše dva odvojena protoka informacija: jedan koji definiše kretanje osnove bioreaktora, i drugi koji registruje izlazne signale sa senzora opterećenja. Pomeranje step motora se reguliše pomoću računarskog programa razvijenog u „Labview“ softverskom paketu („National Instruments“, SAD), koji kontroliše brzinu i smer pomeraja osnove bioreaktora.

Razvijene su i dve vrste bioreaktorskih komora. Komore cilindričnog oblika, napravljene od polipropilena, sa dva bočna priključka, jedan iznad drugog, koji obezbeđuju transport medijuma (slika 3.2c). Ove komore su namenjene za eksperimente iz oblasti inženjerstva artikularne hrskavice gde se koristi samo medijum za hondrogenezu. Dimenzije uzoraka koji se mogu smestiti unutar ovih komora su 16 mm u prečniku i do 4 mm debljine. Kod ovih komora uzorak se smešta na nosač od sinterovanog stakla koji je postavljen unutar komore. Ove komore su korišćene u eksperimentima ispitivanja citotoksičnosti, mehaničke stabilnosti i kinetike otpuštanja nanočestica srebra iz Ag/alginatnih nanokompozitnih biomaterijala.

Drugi tip komore napravljen je od istog materijala samo sa četiri bočna priključka, radi primene u oblasti inženjerstva osteohondralnog tkiva gde je potrebna upotreba dva različita medijuma – za podsticanje hondrogeneze i osteogeneze (slika 3.2d). Dimenzije uzoraka koji se mogu smestiti unutar ovih komora su 16 mm u prečniku i do 5 mm debljine. Ove komore su korišćene u eksperimentima koji se odnose na razvoj i ispitivanje nosača na bazi gelanske gume i bioaktivnog stakla za potencijalnu primenu u oblasti inženjerstva koštanog i osteohondralnog tkiva.



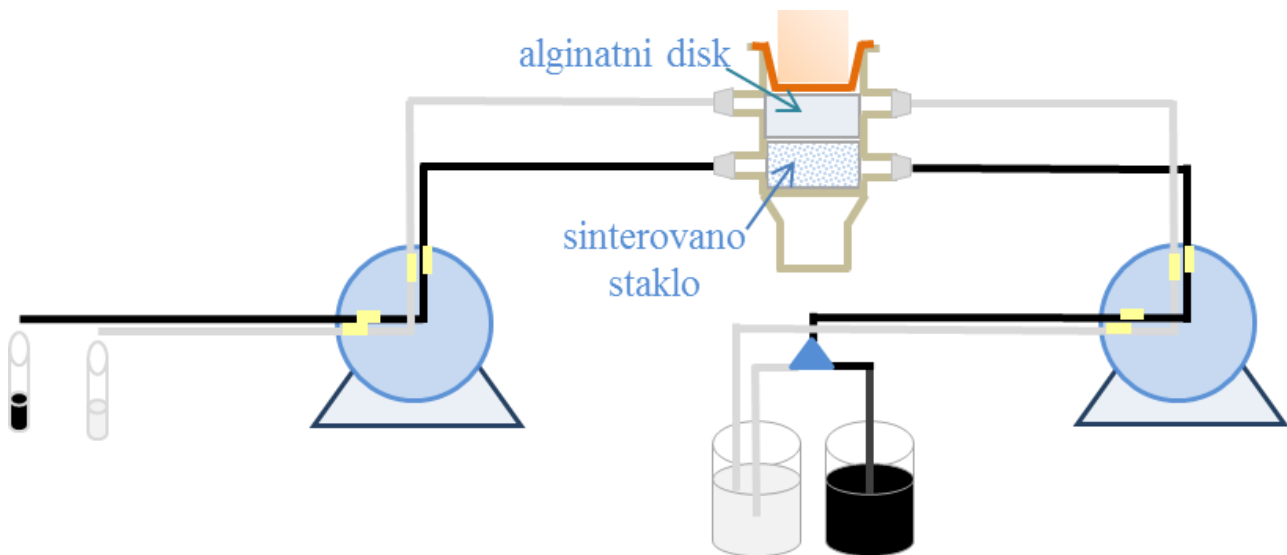
**Slika 3.2** Bioreaktor sa dinamičkom kompresijom: A) na osnovu bioreaktora (2) se pričvršćuje nosač komora (1) pri čemu se osnova vertikalno pomera pomoću step motora (3); ispod osnove je ugrađen senzor opterećenja (4); B) nosač sa 6 bioreaktorskih komora; C) bioreaktorska komora sa dva priključka; D) bioreaktorska komora sa četiri priključka

### 3.2.2.1 Određivanje raspodele vremena zadržavanja i distribucije obeležene supstance u komorama za osteohondralne implante

Komore bioreaktora sa dinamičkom kompresijom sa dva ulaza i dva izlaza su ispitane u pogledu vremena zadržavanja i distribucije dva medijuma, koji se inače koriste za gajenje osteohondralnih implantata. U komoru je postavljen 2 mas.% alginatni disk (prečnik 16 mm, visina 2 mm) preko sinterovanog stakla (prečnik 16 mm, visina 2 mm) tako da zajedno oponašaju dvofazni osteohondralni implant. Preko peristaltičke pumpe gornji ulaz je povezan sa rezervoarom u kome se nalazila destilovana voda, dok je donji ulaz na isti način povezani sa dva rezervoara preko slavine (slika 3.3) koji su sadržali destilovanu vodu, odnosno rastvor tuša. Kako bi se obezbedio ravnomeran protok na oba izlaza medijum se takođe odvodio crevima pomoću peristaltičke pumpe.

Na početku je ceo sistem napunjen destilovanom vodom, koja je kontinualno recirkulisala kroz sistem istostrujno, protokom od 0,43 ml/min. U nekom trenutku, izvedena je stepenasta promena na donjem ulazu, pomoću slaviniće kojom je prekinut dovod vode i ostvaren dovod rastvora tuša. Trenutak kada tuš uđe u komoru označava se sa  $t_0$ . Kako je od izlaza na komori do mesta na kome se sakuplja rastvor postavljeno crevo ukupne zapremine 650  $\mu$ l, izlazni rastvor je sakupljan tek nakon 90 s od trenutka  $t_0$ , a zatim na svakih 30 s. Ispitivanje raspodele proticanja medijuma unutar komore je izvršeno pri statičkim i dinamičkim uslovima (pri deformaciji od 10% alginatnog diska i frekvenciji od 0,84 Hz) u dve odvojene serije merenja sa po dva ponavljanja.





**Slika 3.3** Šematski prikaz postavke eksperimenta tokom ispitivanja načina strujanja dva različita fluida kroz komore za osteohontaralne uzorke

### 3.2.3 Bioreaktor sa hidrostatičkim pritiskom

Bioreaktor sa hidrostatičkim pritiskom, razvijan za potrebe ispitivanja u oblasti inženjerstva tkiva intervertebralnog diska, projektovan je i konstruisan na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, u tri faze: prototip 1 (slika 3.4), prototip 2 i finalna faza.



**Slika 3.4** Izgled bioreaktora sa hidrostatičkim pritiskom kroz faze razvoja, prototip 1

Prototip 1 se sastoji od dve komore: gornje – hidrauličke, u kojoj se nalazi radni fluid za kompresiju i donje – bioreaktorske komore, u kojoj se nalazi testirani biomaterijal ili tkivni uzorak. Hidrostatički pritisak se iz hidrauličke komore prenosi na bioreaktorsku komoru preko silikonske membrane i može se primeniti u različitim režimima u rasponu vrednosti od 0 od 30 MPa. Bioreaktorska komora opremljena je sa dva priključka, za ulaz i izlaz medijuma koji protiče u periodima kada u komori nije ostvaren hidrostatički pritisak. Prototip 1 je napravljen od nerđajućeg čelika i obe komore (bioreaktorska i hidraulička) su povezene sa senzorima pritiska (PA-23/8464.1 i PA-25/8797.1, redom, „Keller“ AG, Švajcarska) koji kontinualno mere pritiske u komorama. Podizanje i kontrola pritiska se ostvaruju pomoću manuelne pumpe.



Kod prototipa 2 bioreaktorska komora izrađena je od biokompatibilnog materijala, polikarbonata. Tri bioreaktorske komore istovremeno se smeštaju na nosač i pritisak iz hidrauličke komore se prenosi na bioreaktorske komore na način opisan kod prototipa 1. Pritisak se podiže manuelnom pumpom, koja je povezana sa hidrauličkom komorom preko ventila. Jedna od bioreaktorskih komora je zamenjena sa test komorom koja nema ulaz i izlaz za protok medijuma, već se puni direktno preko priključka komore ispod silikonske membrane. Test komora povezana je sa senzorom za pritisak (PA-23/8464.1, „Keller“ AG, Švajcarska).

Kod finalnog rešenja, iz konstrukcije bioreaktorske komore je izostavljen senzor pritiska, zbog potencijalnog štetnog dejstva na medijum i ćelije tokom eksperimenta. Pritisak u bioreaktorskoj komori, stoga, određuje se na osnovu izvedene zavisnosti pritiska u hidrauličkoj i test komori i izmerene vrednosti pritiska u hidrauličkoj komori. U finalnoj verziji, kontrola pritiska je ostvarena pomoću step motora i odgovarajućeg softverskog programa „Labview“ („National Instruments“, SAD), čime je rad bioreaktora skoro potpuno automatizovan.

Ovom disertacijom obuhvaćena su ispitivanja režima rada prototipa 1 i 2 bioreaktora, u kojima je podizanje pritiska otvoreno pomoću manuelne pumpe.

### 3.2.3.1 Ispitivanje rada prototipa bioreaktora sa hidrostatičkim pritiskom

U cilju uspostavljanja korelacije pritiska u hidrauličkoj i bioreaktorskoj komori ispitan je uticaj punjenja probne komore. Komora je punjena na dva načina: (1) napunjena je vodom, zatvorena membranom i hidrauličkom komorom, (2) napunjena je vodom, uz pomoć igle su uklonjeni svi mehurići zadržani na zidovima komore, a zatim je, tokom zatvaranja komore, voda dodatno ubrizgavana špricom. Izvršeno je 15 kratkotrajnih merenja u trajanju od prosečno 5 minuta (10 pri prvom načinu punjenja i 5 pri drugom) i tri duža merenja u trajanju od 24 h (2 pri prvom načinu punjenja i 1 pri drugom).

## 3.3 ELEKTROHEMIJSKA SINTEZA NANOČESTICA SREBRA

Nanočestice srebra su elektrohemijski sintetisane u rastvorima alginata (*Jovanović i sar. 2012, Obradović i sar., 2015*). Polazni rastvori dobijeni su tako što je u vodene rastvore 2,0 mas.% natrijum-alginata, dodate – soli  $\text{AgNO}_3$  u koncentraciji 3,9 mM i  $\text{KNO}_3$  u koncentraciji 0,1 M. Iz rastvora je uklonjen kiseonik prodivavanjem azota tokom 20 min uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici. U toku sinteze azot je kontinualno uvođen iznad rastvora, kako bi se očuvala inertna sredina.

Za redukciju  $\text{Ag}^+$  korišćena je elektrohemijska ćelija, koja se sastoji od radne i pomoćne Pt elektrode i referentne - zasićene kalomelove elektrode. Redukcija je vršena pod galvanostatskim uslovima pri gustini struje od  $50 \text{ mA cm}^{-2}$  u toku vremena implementacije od 10 min (*Jovanović i sar., 2012*). Kao rezultat, dobijeni su koloidni rastvori smanjene koncentracije alginata na 1,7 mas.%. Nakon trodnevne stabilizacije, sintetisani koloidni rastvori su razblaženi sa 1,7 mas.% rastvorima alginata do željene koncentracije srebra od 1 mM. U ovom radu, za elektrohemijsku sintezu nanočestica srebra, korišćena su dva tipa alginata: sa malim sadržajem G jedinica (MG) i većim sadržajem G jedinica (VG). Kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije u svim eksperimentima korišćeni su sterilisani rastvori kuvanjem tokom 30 min uz konstantno mešanje.

## 3.4 DOBIJANJE NANOKOMPOZITNIH Ag/ALGINATNIH HIDROGELOVA

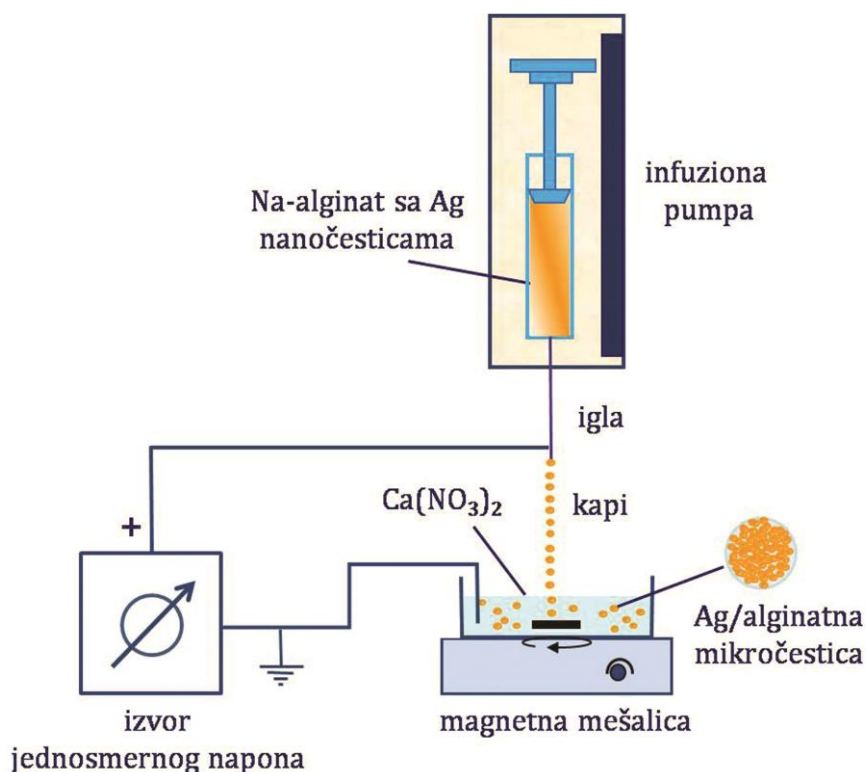
### 3.4.1 Dobijanje hidrogelova u obliku diskova

Nanokompozitni Ag/alginatni diskovi dobijeni su geliranjem 1 mM koloidnog rastvora Ag/alginata pomoću 3 mas.% rastvora  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ . Procedura dobijanja diskova se sastoji u izlivanju 20 ml koloidnog rastvora u sterilne Petri šolje između dva sloja filter papira natopljenih rastvorom za geliranje. Preko gornjeg filter papira se zatim pažljivo sipa rastvor za geliranje (20 - 30 ml) i ostavi da gelira, prilikom čega dolazi do razmene jona natrijuma i kalcijuma. Nakon 24 h modlom su iz dobijenog hidrogela isecani manji diskovi (prečnika 12 mm i visine 2 mm) koji su ostavljeni u novopripremljenom rastvoru za geliranje tokom narednih 24 h, kako bi se obezbedilo potpuno geliranje. Za dobijanje diskova korišćena su oba tipa sintetisanih koloidnih rastvora, te su dobijeni diskovi bazirani na alginatima različitog sastava označeni kao *VG* i *MG* diskovi. Ovi diskovi dalje su ispitivani u pogledu mehaničke stabilnosti, otpuštanja srebra i citotoksičnosti.

Istom procedurom dobijeni su diskovi Ca-alginata geliranjem rastvora 1,7 mas.% *VG* Na-alginata. Dobijeni alginatni diskovi korišćeni su za ispitivanje mogućnosti prelaska nanočestica srebra iz Ag/alginatnog diska u alginatni hidrogel u uslovima dinamičke kompresije.

### 3.4.2 Dobijanje nanokompozitnih Ag/alginatnih mikročestica

Nanokompozitne Ag/alginatne mikročestice su dobijene metodom elektrostatičke ekstruzije kojom se pod dejstvom elektrostatičkog polja dobijaju čestice veoma malih dimenzija (slika 3.5). Pripremljeni 1 mM *MG* koloidni rastvor potisnut je kroz pozitivno naelektrisanu iglu sa ravnim vrhom od nerđajućeg čelika (23 G, „*Small Parts, Inc.*“, SAD), uz pomoć infuzione pumpe za potiskivanje tečnosti („*Racel Scientific Instruments*“, *Stamford, SAD*). Kao rastvor za geliranje korišćen je 1,5 mas.% rastvor  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ . Elektrostatičko polje uspostavljeno je povezivanjem vrha igle sa pozitivnom elektrodom izvedenom iz generatora visokog napona (Model 30R, „*Bertan Associates, Inc.*“, Njujork, SAD), dok je u rastvor za geliranje uronjena uzemljena elektroda. Pod dejstvom elektrostatičkog i gravitacionog polja, potiskivani koloidni rastvor odvaja se od vrha igle u vidu mlaza sitnih naelektrisanih kapljica. Elektrostatička ekstruzija izvedena je pri rastojanju između vrha igle i rastvora za geliranje od 2,5 cm, elektrostatičkom naponu od 7,3 kV i pri protoku koloidnog rastvora od 39,3 ml/h, koji se nalazio u špricu zapremine 10 ml. Tokom 30 min u rastvoru za geliranje uz blago mešanje dolazi do potpunog geliranja i formiranja mikročestica. Dobijene mikročestice su ispitivane u pogledu citotoksičnosti u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom u direktnom kontaktu sa tkivom articularne hrskavice.



**Slika 3.5** Šematski prikaz eksperimentalne aparature za izvođenje elektrostatičke ekstruzije kojom se, pod dejstvom gravitacione i elektrostatičke sile dobijaju kapi koje u rastvoru za geliranje očvršćavaju i formiraju Ag/alginatne mikročestice (Stojkowska, 2015)

### 3.5 DOBIJANJE PVA/PVP DISKOVA

PVA/PVP diskovi dobijeni su rastvaranjem 17 mas.% PVA i 10 mas.% PVP polimera u vrućoj vodi tokom noći uz konstantno mešanje. Dobijeni rastvor je izliven u sterilnu Petrijevu šolju, nakon čega su usledila četiri ciklusa zamrzavanja (na  $-20^{\circ}\text{C}$  tokom 24 h) i odmrzavanja (na  $+4^{\circ}\text{C}$  tokom 5 h). Iz dobijenog visoko umreženog PVA/PVP diska isečeni su manji diskovi (prečnika 12 mm i visine 2 mm). Tako dobijeni diskovi držani su u hranljivom medijumu za ćelijske kulture do upotrebe, kao zamena za eksplantate hrskavice u eksperimentima otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih nanokompozitnih diskova.

### 3.6 IZOLACIJA EKSPLANTATA I HONDROCITA IZ ARTIKULARNE HRSKAVICE

Eksplantati artikularne hrskavice izolovani su iz kolena zadnjih nogu teleta starosti oko mesec dana, u periodu do 24 h od klanja. Nakon što je pažljivo oko kolena odstranjeno mišićno tkivo tako da ne dođe do oštećenja sinovijalne opne oko zgloba, zglobovi su premazani povidon-jodom i izloženi dejstvu UV lampe tokom 30 min u laminarnoj komori. Nakon sterilizacije, zglobovi su otvoreni i iz femura su uzeti uzorci hrskavice (slika 3.6). Eksplantati hrskavice isecani su cilindričnim sečivom, prečnika 13 mm, zatim isprani rastvorom PBS koji je sadržao 50 U/ml penicilina i 50  $\mu\text{g/ml}$  streptomicina i najzad isečeni na diskove prečnika 13 mm i visine 2 mm. Eksplantati hrskavice su ostavljeni u hranljivom medijumu u inkubatoru u atmosferi 5%  $\text{CO}_2$  i na  $37^{\circ}\text{C}$  na period ne kraći od 48 h, radi provere da nije došlo do kontaminacije.

Sastav hranljivog medijuma koji je korišćen u svim eksperimentima sa ćelijskim i tkivnim kulturama sastojao se od: DMEM, 10 mas.% FBS, 10 mM HEPES, 100 U/ml penicilina, 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomicina, 0,4 mM prolina i 50  $\mu\text{g/ml}$  askorbinske kiseline.

Dobijeni eksplantati su korišćeni za utvrđivanje citotoksičnosti u kulturi tkiva u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom, kao i u kontrolnoj statičkoj studiji.

Hondrociti su izolovani iz articularne hrskavice prema proceduri opisanoj u literaturi (*Freed i sar., 1993*). Komadići tkiva hrskavice su digestirani pomoću 0,2 mas.% rastvora kolagenaze tipa II u PBS, u inkubatoru na 37°C i 5% CO<sub>2</sub> uz kontinualno mešanje na orbitalnoj mešalici brzinom 80 obr/min tokom 17 h. Na 1 g vlažne mase tkiva korišćeno je 10 ml rastvora za digestiju. Komadići tkiva koji se nisu rastvorili odstranjeni su filtriranjem kroz sterilnu tkaninu, a proces digestije je zaustavljen dodatkom rastvora PBS sa 0,02 mas.% EDTA. Nakon toga, digestat je centrifugiran na 1200 obr/min tokom 10 min kako bi se ćelije oborile i formirao ćelijski talog. Supernatant je odbačen, dok je ćelijski talog resuspendovan u rastvoru PBS-EDTA i ponovo centrifugiran. Ovaj postupak je ponovljen tri puta. Broj ćelija utvrđen je brojanjem iz rastvora pomoću hematocitometra primenom *Trian blue* boje.



**Slika 3.6** Femur teleta sa koga je izolovana articularna hrskavica

### 3.7 MEHANIČKA STABILNOST Ag/ALGINATNIH DIKSOVA U BIOREAKTORU SA DINAMIČKOM KOMPRESIJOM

Dobijeni VG i MG Ag/alginatni diskovi (n=3) su ispitani u pogledu stabilnosti i mehaničkih karakteristika u prisustvu hranljivog medijuma u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom tokom 7 dana. Dinamička kompresija je primenjena u režimu 10% deformacije, brzinom kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$ , pri frekvenciji od 0,84 Hz. Svakodnevno su beležene vrednosti odziva senzora opterećenja, kako bi se odredila vrednost napona u zavisnosti od primenjene deformacije. Na dobijene vrednosti napona primenjen je matematički metod kliznog proseka od pet tačaka, čime su ublažene devijacije napona kao posledica postojanja šuma. Dinamički modul kompresije određen je iz nagiba najbolje linearne zavisnosti napona od deformacije, određene metodom najmanjeg kvadrata odstupanja od eksperimentalnih vrednosti.

### 3.8 ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOSTI Ag/ALGINATNIH NANOKOMPOZITNIH HIDROGELOVA

Citotoksičnost dobijenih Ag/alginatnih nanokompozitnih hidrogelova ispitana je primenom tradicionalnih 2D metoda na monosloju ćelija, kontakt i ekstrakcionim testom, kao i u kulturi tkiva articularne hrskavice u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom.

### 3.8.1 Određivanje citotoksičnosti u 2D sistemima na monosloju ćelija

#### 3.8.1.1 Ispitivanje citotoksičnosti Ag/alginatnih koloidnih rastvora

Citotoksičnost 0,05 mM i 0,5 mM MG koloidnog rastvora je ispitana po akreditovanoj metodi laboratorije za ćelijske terapije „Educell“, Ljubljana, Slovenija na ćelijskim linijama humanih matičnih ćelija poreklom iz masnog tkiva pacijenata (*human Adipose Stem Cell – hASC*) i na immortalizovanoj ćelijskoj liniji L929. Ćelije u koncentraciji 5000 ćel./cm<sup>2</sup> ostavljene su preko noći da se zalepe za dno posude za ćelijsku kulturu sa 96 mesta, nakon čega je medijum zamenjen sa 100 µl rastvora finalne koncentracije 0,05 mM i 0,5 mM nanočestica srebra u hranljivom medijumu. Vijabilnost ćelija utvrđena je direktnim brojenjem živih i mrtvih ćelija pod invertnim mikroskopom nakon 2 h, 48 h i 6 dana.

U posebnoj eksperimentalnoj seriji citotoksičnost MG Ag/alginatnog koloidnog rastvora ispitivana je i na monosloju telećih hondrocita, pri različitim koncentracijama i/ili količinama koloidnog rastvora. Ćelije su zasejane u koncentraciji 10<sup>5</sup> ćel./cm<sup>2</sup> na dno posude za ćelijsku kulturu sa 24 mesta i ostavljene da se zalepe tokom noći. Posle 24 h, hranljivi medijum zajedno sa nezalepljenim ćelijama je odstranjen, a u bunariće redom je dodat po 1 ml hranljivog medijuma sa nominalnom koncentracijom nanočestica srebra od 0; 0,05 i 0,5 mM. Dodatna eksperimentalna grupa je uspostavljena korišćenjem 2 ml hranljivog medijuma sa nominalnom koncentracijom srebra od 0,5 mM. Na taj način su ustanovljene četiri eksperimentalne grupe: G1 - 0,05 mM (1 ml), G2 - 0,5 mM (1 ml), G3 - 0,5 mM (2 ml) i G4 - kontrolna grupa (1 ml medijuma bez koloidnog rastvora). Citotoksičnost je određena nakon 24 h inkubacije u inkubatoru na 37°C pri 5% CO<sub>2</sub> pomoću MTT testa. Svi eksperimenti na telećim hondrocitima su izvedeni u triplicatu i ponovljeni dva puta.

#### 3.8.1.2 Ispitivanje citotoksičnosti Ag/alginatnih diskova u direktnom kontakt testu

Citotoksičnost MG i VG Ag/alginatnih diskova ispitana je direktnim kontakt testom na monosloju telećih hondrocita. Uspostavljeno je pet eksperimentalnih grupa za evaluaciju citotoksičnosti u 2D sistemu koristeći posude za ćelijsku kulturu sa šest mesta: grupa G1 – VG Ag/alginatni diskovi, G2 – MG Ag/alginatni diskovi, grupa G3 – bakarne pločice kao referentni toksični materijal, grupa G4 – silikonski lepak kao referentni biokompatibilni materijal, i grupa G5 – netretirana kontrolna grupa. Ag/alginatni diskovi fiksirani su na dno posude pomoću polipropilenskih nastavaka koji su bili zalepljeni na poklopac posude, dok su bakarne pločice (1 cm×1 cm) bile zalepljene direktno za dno pomoću silikonskog lepka. Silikonski lepak, kao pozitivna kontrola, nanet je na dno bunarića u vidu kruga prečnika 12 mm. U svaki bunarić redom dodato je po 3 ml ćelijske suspenzije, tako da je koncentracija ćelija bila 10<sup>5</sup> ćel./cm<sup>2</sup>. Nakon 48 i 96 h inkubacije u inkubatoru sa 5% CO<sub>2</sub> i na 37°C, ispitivani diskovi i hranljivi medijum su potpuno uklonjeni kako bi se odredila inhibiciona zona formirana oko Ag/alginatnih diskova i referentnih materijala. Za analiziranje inhibicione zone korišćen je optički mikroskop (*Olympus CX41RF*, Tokio, Japan). Koncentracija otpuštenih Ag<sup>+</sup> i Cu<sup>2+</sup> u medijumu, kao i preostala koncentracija srebra unutar Ag/alginatnih diskova, određena je primenom atomske apsorpcione spektroskopije (AAS).

#### 3.8.1.3 Ispitivanje citotoksičnosti Ag/alginatnih diskova u ekstrakcionom testu

Citotoksičnost Ag/alginatnih diskova ispitana je i indirektnom metodom - ekstrakcionim testom na monosloju telećih hondrocita. Potencijalno toksične materije iz ispitivanih diskova i referentnih materijala ekstrahovane su tokom 72 h u inkubatoru na 37°C i 5% CO<sub>2</sub>, pri konstantnom mešanju na orbitalnoj mešalici brzinom 80 obr./s. Kao referentni toksičan materijal korišćen je bakar, a kao referentni biokompatibilan materijal korišćen je polipropilen. Procedurom je definisano da je na 1 ml hranljivog medijuma potrebno staviti 6 cm<sup>2</sup> materijala za ekstrakciju. Kako su ćelije

veoma osetljive na vrednost pH, izvršeno je podešavanje pH ekstrakata referentnih materijala, kako bi pH vrednost bila u granicama koje su pogodne za ćelije (6,8-7,5), odnosno da ne bi došlo do odumiranja ćelija usled visoke pH vrednosti. Ekstrakti referentnih materijala nakon ekstrakcije imali su vrednost pH=7,80. Snižavanje pH vrednosti vršeno je dodavanjem 1 mM rastvora HCl, nakon čega je pH vrednost polipropilenskog ekstrakta bila 7,25, a bakarnih pločica 7,20. pH vrednost ekstrakta Ag/alginatnih diskova je inicijalno bila 7,37 pa podešavanje pH nije bilo potrebno.

Potom su dobijenim ekstraktom tretirane ćelije, prethodno prilepljene za dno posude za ćelijsku kulturu sa 24 mesta u koncentraciji  $10^5$  ćel/cm<sup>2</sup>.

Uspostavljeno je pet eksperimentalnih grupa: G1 – VG Ag/alginatni diskovi, G2 – MG Ag/alginatni diskovi, G3 – bakarne pločice kao referentni toksični materijal, grupa G4 – polipropilenske pločice kao referentni biokompatibilni materijal, i grupa G5 – netretirana kontrolna grupa. Nakon 24 h kako su ćelije tretirane sa po 1 ml hranljivog medijuma u kome je ekstrahovan materijal, MTT metodom utvrđena je vijabilnost ćelija. Svi eksperimenti su urađeni u triplicatu.

### **3.8.2 Određivanje citotoksičnosti u 3D sistemu u kulturi tkiva**

U cilju određivanja potencijalnog citotoksičnog dejstva biomaterijala na bazi Ag/alginata u formi koloidnog rastvora, mikročestica i diskova u 3D sistemu, uspostavljeni su eksperimenti u kulturama tkiva artikularne hrskavice u biorektoru sa dinamičkom kompresijom.

#### **3.8.2.1 Ispitivanje citotoksičnosti Ag/alginatnih koloidnih rastvora**

Eksplantati artikularne hrskavice (prečnika 12 mm, debljine 2 mm, n=3) postavljeni su u tri biorektorske komore i podvrgnuti dinamičkoj kompresiji tokom 48 h u režimu 1 h kompresije/1 h pauze pri deformaciji od 10%, frekvenciji od 0,84 Hz i brzini kompresije od 337,5  $\mu$ m/s. Svi sistemi za recirkulaciju su bili napunjeni sa po 15 ml hranljivog medijuma pomešanog sa MG Ag/alginatnim koloidnim rastvorom, tako da je finalna koncentracija nanočestica srebra bila 0,5 mM. Kroz svaku komoru je uspostavljen protok medijuma sa 0,5 mM od 0,12 ml/min. Eksperiment je trajao 48 h, nakon čega su eksplantati isprani sa fiziološkim rastvorom i pripremljeni za histološku analizu i određivanje sadržaja srebra.

#### **3.8.2.2 Ispitivanje citotoksičnosti Ag/alginatnih mikročestica**

Eksplantati artikularne hrskavice ( $m=0,262 \pm 0,026$  g, n=3) postavljeni su na dno tri biorektorske komore, dok su mikročestice, dobijene elektrostatičkom ekstruzijom MG koloidnog rastvora, postavljene oko i preko eksplantata ( $m=0,697 \pm 0,021$  g). Sistem je podvrgnut dinamičkoj kompresiji u režimu 1 h kompresije/1 h pauze pri deformaciji od 10%, frekvenciji od 0,56 Hz i brzini kompresije od 337,5  $\mu$ m/s. Kroz biorektorski sistem je recirkulisao hranljivi medijum protokom od 0,33 ml/min. Nakon eksperimenta koji je trajao 13 dana eksplantati su isprani sa fiziološkim rastvorom i pripremljeni za histološku analizu.

#### **3.8.2.3 Ispitivanje citotoksičnosti Ag/alginatnih diskova**

Eksplantati artikularne hrskavice (prečnika 12 mm, debljine 2 mm) postavljeni su na dno tri biorektorske komore, dok su preko njih postavljeni VG Ag/alginatni diskovi (prečnika 12 mm, debljine 2 mm, n=3). Sistem je podvrgnut dinamičkoj kompresiji u režimu 1 h kompresije/1 h pauze pri deformaciji od 10%, frekvenciji od 0,84 Hz i brzini kompresije od 337,5  $\mu$ m/s. Svaka komora je povezana sa sistemom za recirkulaciju u kome se nalazilo po 15 ml hranljivog medijuma, koji je kontinualno recirkulisao protokom od 0,12 ml/min. Eksperiment je trajao 4 dana i ponovljen je dva puta. Nakon eksperimenta eksplantati su isprani fiziološkim rastvorom i pripremljeni za histološku analizu.

### 3.9 OTPUŠTANJE SREBRA IZ Ag/ALGINATNIH DISKOVA U USLOVIMA DINAMIČKE KOMPRESIJE

U cilju određivanja otpuštanja nanočestica srebra iz VG Ag/alginatnih diskova u uslovima dinamičke kompresije u bioreaktoru, postavljene su dve studije. U prvoj studiji ispitano je da li dolazi do migracije nanočestica srebra iz Ag/alginatnih diskova u tkivo, koje su imitirali alginatni diskovi u direktnom kontaktu. U drugoj studiji određena je kinetika otpuštanja nanočestica i/ili jona srebra iz Ag/alginatnih diskova u uslovima kao u studiji ispitivanja citotoksičnosti u 3D kulturi tkiva (poglavlje 3.8.2.3).

#### 3.9.1 Migracija nanočestica srebra iz Ag/alginatnih diskova u hidrogel u direktnom kontaktu

Alginatni diskovi (prečnika 12 mm, debljine 2 mm) pojedinačno su smešteni u tri bioreaktorske komore, pa su preko njih postavljeni VG Ag/alginatni diskovi (prečnika 12 mm, debljine 2 mm). Dinamička kompresija je izvršena u režimu 1 h kompresije/1 h pauze, pri frekvenciji od 0,84 Hz do 10% deformacije brzinom kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$ . Svaka komora je povezana sa sistemom za recirkulaciju u kome se nalazilo po 15 ml hranljivog medijuma, koji je kontinualno recirkulisao protokom od 0,12 ml/min. Eksperiment je trajao 4 dana.

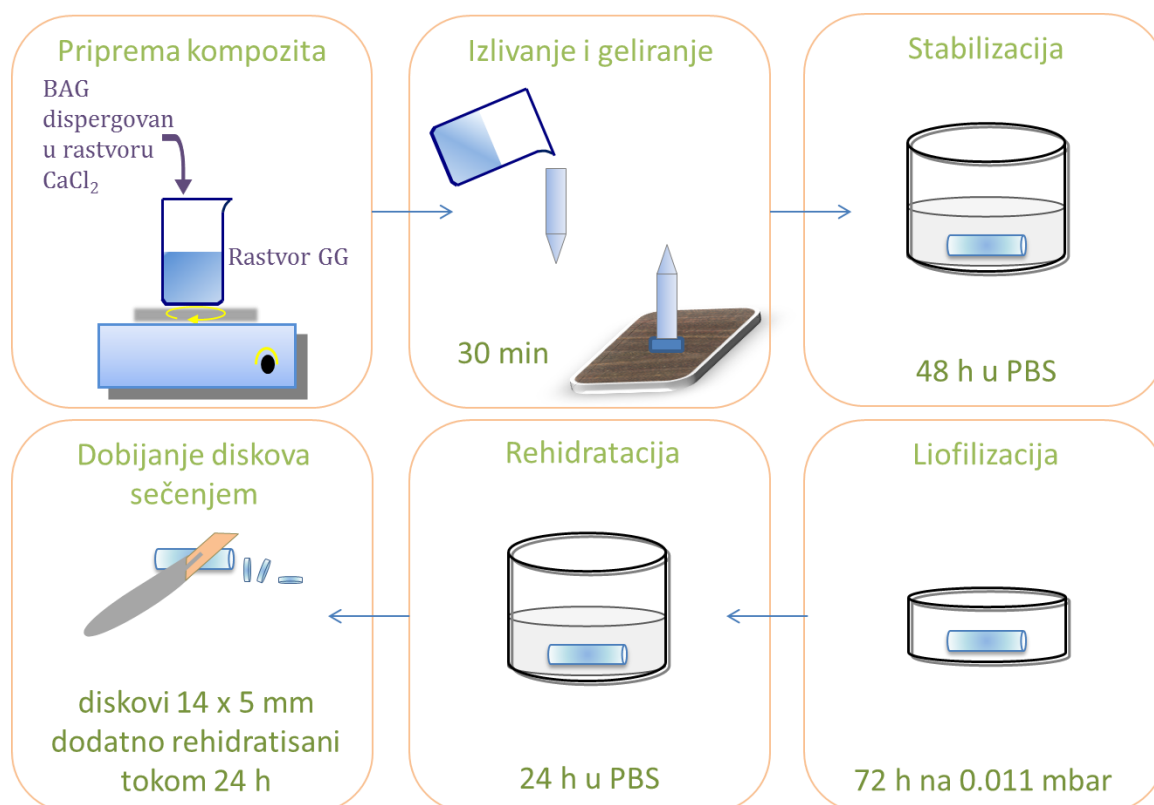
#### 3.9.2 Kinetika otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih diskova

PVA/PVP diskovi koji su imitirali eksplantate artikularne hrskavice pojedinačno su smešteni u tri bioreaktorske komore, pa su preko njih postavljeni VG Ag/alginatni diskovi, na način kako je opisano u studiji citotoksičnosti u 3D sistemu (poglavlju 3.8.2.3). Dinamička kompresija do 10% deformacije uzorka, pri frekvenciji od 0,84 Hz i brzini kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$  ostvarena je u režimu 1 h kompresije/1 h pauze. Ukupno 14 ml hranljivog medijuma po komori je recirkulisalo protokom od 0,12 ml/min, pri čemu je hranjivi medijum menjan sveže pripremljenim na svakih 24 h. Kontrolna statička studija postavljena je u posudi za ćelijsku kulturu sa šest mesta gde su pojedinačno postavljena tri Ag/alginatna diska sa po 14 ml medijuma. Hranjivi medijum u kontrolnoj studiji takođe je menjan na svakih 24 h, a nakon svake zamene, deo medijuma je ostavljen za dalju analizu sadržaja otpuštenog srebra primenom AAS. Eksperiment je trajao 7 dana.

### 3.10 DOBIJANJE HIDROGELOVA GELANSKE GUME SA NANOČESTICAMA BIOAKTIVNOG STAKLA

Prva serija poroznih hidrogelova na bazi gelanske gume i bioaktivnog stakla (GG-BAG) pripremljena je na Institutu „Jožef Štefan“ u Ljubljani, Slovenija. Prah nanočestičnog dvokomponentnog BAG (70%  $\text{SiO}_2$  i 30%  $\text{CaO}$  (mol.%)) sintetisan je primenom sol-gel tehnike (*Drnovšek i sar., 2012*), nakon čega je termički tretiran kako bi se uklonili potencijalni organski ostaci. U vodeni rastvor, koji je dobijen rastvaranjem praha GG u dejonizovanoj vodi na 90°C pri konstantnom mešanju na magnetnoj mešalici, dodat je prah BAG dispergovan u vodenom rastvoru 0,18 mas.%  $\text{CaCl}_2$  bez i sa primenom ultrazvučne (UZ) sonde (*Sonics & Materials Inc., SAD, 750W, 20 kHz, 80% snage, titanijumska sonda prečnika 19 mm, model CV334, vreme implantacije 5 min*). Finalna koncentracija rastvora bila je 2 mas.% GG, 2 mas.% BAG i 0,03 mas.%  $\text{CaCl}_2$ . Nakon dobrog umešavanja polimera i neorganske komponente (20 min mešanja na magnetnoj mešalici), suspenzija je izlivena u posudu za ćelijsku kulturu sa 24 mesta i ostavljena da gelira tokom narednih 30 min. Dobijeni hidrogelovi u obliku diska (prečnik 13 mm, visina 5 mm) su prebačeni u rastvor PBS tokom narednih 48 h, kako bi došlo do stabilizacije hidrogela. Nakon stabilizacije, diskovi su kratko isprani dejonizovanom vodom, zamrznuti preko noći na -70°C, a zatim liofilizovani u liofilizatoru (*Beta 2-8 LD plus, „Martin Christ“, Nemačka*) tokom 72 h na 0,011 mbar. Pre ispitivanja u bioreaktoru, uzorci su rehidratirani u rastvoru PBS tokom 48 h.

Druga serija poroznih hidrogelova GG-BAG dobijena je modifikacijom gore opisane metode u cilju dobijanja makroporozne strukture sa otvorenim i interkonektovanim porama. Izmena se sastoji u tome da se umesto u posudu za ćelijsku kulturu, umešani GG-BAG rastvor izliva u polipropilensku epruvetu zapremine 15 ml, u kojoj dolazi do geliranja (slika 3.7), čime se formira hidrogel u obliku cilindra ( $L=8\text{ cm}$ ,  $d=15\text{ mm}$ ). Dobijeni hidrogel je tretiran na isti način kao i uzorci iz prve serije kroz opisane faze stabilizacije i liofilizacije. Faza zamrzavanja je kontrolisana primenom posude za postepeno smrzavanje sa izopropanolom, koja omogućava kontrolisano spuštavanje temperature uzorka brzinom  $1^\circ\text{C}/\text{min}$ . Tokom prvih 24 h rehidracije, rehidratiran je ceo cilindar, a potom je isečen na diskove visine 5 mm, koji su ostavljeni u PBS narednih 24 h do potpune rehidracije. Ovim postupkom dobijeni su diskovi sa makroskopskim porama u aksijalnom pravcu.



**Slika 3.7** Šematski prikaz procedure za dobijanje makroporoznih hidrogelova na bazi gelanske gume i bioaktivnog stakla: (i) mešanje polimernog rastvora gelanske gume sa neorganskom komponentom bioaktivnog stakla, (ii) izlivanje smeše u epruvete u kojima se odvija geliranje, (iii) stabilizacija, (iv) liofilizacija, (v) rehidracija celog suvog cilindričnog uzorka, (vi) sečenje na diskove odgovarajuće visine, koji se zatim ponovo rehidrišu do potpune rehidracije

### 3.11 KARAKTERIZACIJA HIDROGELOVA GELANSKE GUME SA NANOČESTICAMA BIOAKTIVNOG STAKLA

#### 3.11.1 Određivanje inicijalne poroznosti rehidratiranih hidrogelova

U cilju ispitivanja poroznosti i povezanosti između pora, početni rehidratirani GG-BAG hidrogelovi ( $n = 3$ ) iz obe serije uzoraka su postavljeni u protočni bioreaktor uz protok plavog tuša (*KOH-I-NOOR*, Austrija) od  $1,1\text{ ml}/\text{min}$ . Posle kraćeg perioda, poprečni preseki hidrogelova su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom (*Stereo Discoveri.V12*, „Carl Zeiss“, Nemačka).



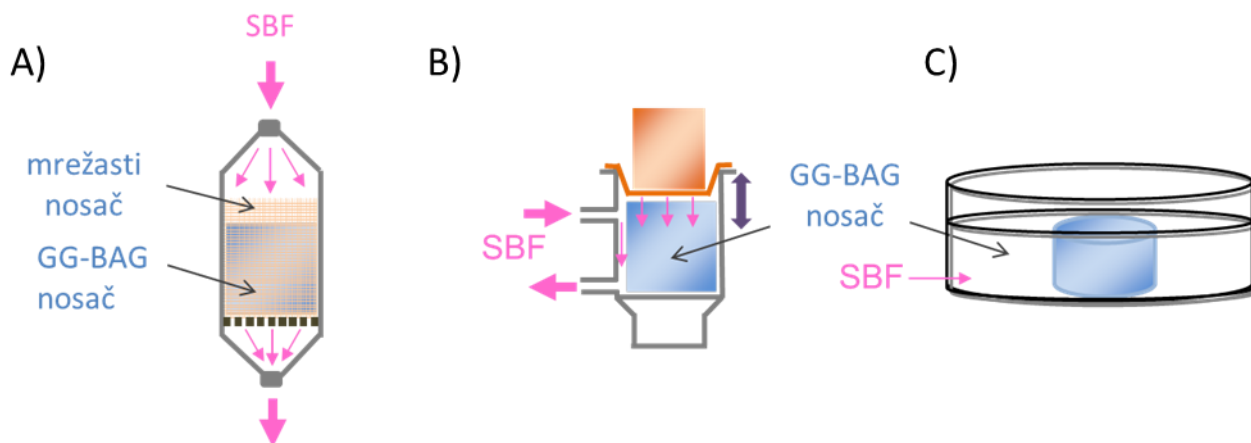
### 3.11.2 Ispitivanje formiranja mineralne faze kalcijum fosfata

#### 3.11.2.1 Procedura za pripremu simulirane telesne tečnosti

Za pripremu rastvora simulirane telesne tečnosti (*simulated body fluid*, SBF) korišćena je procedura opisana u literaturi (Kokubo i Takadama, 2006). Ukratko, priprema se izvodi u vodenom kupatilu (Memmert WNB14, Schwabach, Nemačka) na temperaturi 37°C, a za pripremu se koristi plastični sud u kome je pomoću magnetnog zrna i magnetne mešalice (IKA C-MAG HS 7, Staufen, Nemačka) ostvareno konstantno mešanje. U sud je prvo dodata dejonizovana i sterilisana voda, a zatim su reagensi dodati postepeno, jedan po jedan redom, tako da koncentracija u finalnom rastvoru bude 137,48 mM NaCl; 4,23 mM NaHCO<sub>3</sub>; 3,02 mM KCl; 1,01 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×3H<sub>2</sub>O; 1,53 mM MgCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O; 2,63 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,51 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 50,51 mM Tris baze. Podešavanje pH finalnog rastvora izvršeno je pomoću 1 mM HCl na 7,40. Pre upotrebe, pripremljeni rastvor SBF je sterilisan filtriranjem kroz 0,22 µm celulozni filter (Merck Millipore, „Sigma-Aldrich“, SAD) i temperiran na 37°C.

#### 3.11.2.2 Eksperimentalni sistem

Bioaktivnost obe serije GG-BAG hidrogelova je ispitana u protočnom bioreaktoru, bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom i u statičkoj studiji (slika 3.8), u prisustvu SBF na 37 ± 1°C. Izvedeni su dve odvojene studije za hidrogelove iz različitih serija. U svim eksperimentalnim sistemima, korišćeno je 13 ml SBF po hidrogelu, a kompletan SBF je menjan svežim na svakih 48 h. U bioreaktorskim sistemima, SBF je kontinualno recirkulisan protokom od 1,1 ml/min, što je predstavljalo površinsku brzinu SBF od ~100 µm/s, što odgovara brzini strujanja krvi u kapilarama. Statička studija je postavljena u posudi za ćelijsku kulturu sa 6 mesta, gde je u svaki bunarić stavljen po jedan uzorak hidrogela sa 13 ml SBF.



**Slika 3.8** Šematski prikaz tri sistema u kojima je ispitivan prelazak bioaktivnog stakla u mineralnu fazu kalcijum fosfata: A) protočni bioreaktor omogućava direktan protok simulirane telesne tečnosti kroz uzorak u aksijalnom pravcu, B) bioreaktor sa dinamičkom kompresijom omogućava dinamičku kompresiju uzorka pored protoka simulirane telesne tečnosti u aksijalnom pravcu; C) statička studija u kojoj se uzorak gelanske gume sa bioaktivnim staklom nalazi potopljen u simuliranoj telesnoj tečnosti

#### 3.11.2.3 Formiranje mineralne faze kalcijum fosfata unutar hidrogelova GG-BAG sa unutrašnjim porama

U cilju ispitivanja prelaska BAG u mineralnu fazu kalcijum fosfata unutar hidrogelova GG-BAG iz prve serije uzoraka, pri različitim hidrodinamičkim uslovima, postavljena je studija u

trajanju od 14 dana. Ukupno je postavljeno šest nezavisnih protočnih bioreaktora i tri bioreaktorske komore u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom, svaka sa po jednim uzorkom (prečnik 12 mm, debljina 5 mm). U dinamičkom bioreaktoru uzorci su bili podvrgnuti kompresiji u režimu 1 h kompresije/1 h pauze, 5% deformaciji pri frekvenciji od 0,68 Hz i brzini kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$ .

Nakon 7 dana od početka eksperimenta tri uzoraka iz protočnog bioreaktora i tri uzorka iz statičke studije su pripremljena za SEM analizu kako bi se ispitalo formiranje mineralne faze kalcijum fosfata. Preostala po tri uzorka u oba sistema kao i tri uzorka u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom su dalje ispitivana još 7 dana, tako da su na kraju eksperimenta, odnosno 14. dana, svi uzorci pripremljeni za SEM, EDS i Raman spektroskopiju.

Priprema uzoraka za dalju analizu podrazumevala je kratko potapanje uzoraka u dejonizovanu vodu, zatim ponovno zamrzavanje preko noći ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) i liofilizaciju (72 h na 0,011 mbar), praćeno sečenjem na poprečne preseke, na kojima je urađeno snimanje.

#### 3.11.2.4 Formiranje mineralne faze kalcijum fosfata unutar makroporoznih hidrogelova GG-BAG sa otvorenim porama duž akcijalnih strana

U cilju ispitivanja prelaska BAG u mineralnu fazu kalcijum fosfata unutar makroporoznih hidrogelova GG-BAG iz druge serije uzoraka, izvedena je paralelna studija u trajanju od 14 dana pri istim hidrodinamičkim i statičkim uslovima opisanim u prethodnom odeljku. Ukupno je postavljeno šest nezavisnih protočnih bioreaktora i četiri komore u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom, svaki sa po jednim uzorkom (prečnik 12 mm, debljina 5 mm). U bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom uzorci su bili podvrgnuti u režimu 1 h kompresije/1 h pauze do 5% deformacije pri frekvenciji od 0,68 Hz i brzini kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$ . U statičkim uslovima postavljeno je šest uzoraka.

Na kraju eksperimenta, 14. dana, po četiri uzorka iz svake grupe su korišćena za određivanje mehaničkih karakteristika u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom. Po dva uzorka koja su korišćena za određivanje mehaničkih karakteristika u bioreaktoru iz svih sistema, i po jedan od uzoraka iz protočnog bioreaktora i statičkih uslova, koji nisu korišćeni za mehaničku karakterizaciju, pripremljeni su za SEM i EDS analizu. Pri tome je razvijena nova procedura pripreme uzoraka za ove analize. Prvo, svi uzorci su posle eksperimenta pojedinačno isprani sa po 40 ml dejonizovane vode, a potom ručno isećeni u vlažnom stanju na tanke poprečne preseke, koji su zatim zalepljeni na predmetna stakla, prethodno premazana belancetom, i ostavljeni da se suše. Na isti način pripremljeni su i inicijalni uzorci, prethodno rehidratirani tokom 48 h u PBS.

Ostali uzorci iz svake grupe ( $n = 2$  ili  $3$ ) su isprani sa po 40 ml dejonizovane vode, zatim ponovo zamrznuti preko noći ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) i liofilizovani (72 h na 0,011 mbar). Dobijeni suvi uzorci su sprášeni u homogenizatoru *TissueLiser LT* („KIAGEN GmbH“, Nemačka) na 50 Hz tokom 5 min, a dobijeni prah je korišćen za FTIR, ICP i XRD analize.

### 3.12 DOBIJANJE DVOFAZNIH IMPLANTATA ZA INŽENJERSTVO OSTEOHONDRALNOG TKIVA

Za dobijanje dvofaznih implantata koji nalaze potencijalnu primenu u inženjerstvu osteohondralnog tkiva, korišćeni su gelanska guma i bioaktivno staklo. Za donji deo, koji odgovara koštanom delu implantata korišćeni su makroporozni GG-BAG hidrogelovi (prečnik 12 mm, visina 3 mm), pripremljeni po proceduri za dobijanje druge serije uzoraka (odjeljak 3.10). Za gornji deo, koji odgovara delu hrskavice u implantatu izliven je hidrogel gelanske gume (prečnik 12 mm, visina 3 mm). Polazna smeša za dobijanje hidrogela GG je napravljena rastvaranjem 2 mas.% GG u dejonizovanoj vodi na  $90^{\circ}\text{C}$  pri konstantnom mešanju, uz dodatak  $\text{CaCl}_2$  do finalne koncentracije

od 0,03 mas.%. Pri tome je, u eksperimentima gde su korišćeni rehidratirani uzorci GG-BAG, rehidracija ostvarena tokom 48 h u rastvoru PBS.

Dobijanje dvofaznih implantata izvedeno je u 6 serija.

- U seriji A GG rastvor temperature 70°C je preliven preko rehidratiranih GG-BAG uzoraka temperature: 25°C, 4°C i -22°C.
- U seriji B GG rastvor temperature 70°C je preliven preko rehidratiranih GG-BAG uzoraka uronjenih u rastvor PBS do visine od 3 mm, temperature: 25°C, 4°C i -22°C.
- U seriji C GG rastvor temperature 70°C je preliven preko suvih makroporoznih uzoraka GG-BAG na sobnoj temperaturi (25°C).
- U seriji D suvi makroporozni uzorci GG-BAG su uranjani u rastvor GG temperature 70°C.
- U seriji E rastvor GG (0,5 ml) temperature 60°C je sporo izlivan uz pomoć pipete, preko suvih makroporoznih uzoraka GG-BAG u kriostatu na temperaturi -25 °C. Nakon geliranja, kalota koja je formirana od izlivenog hidrogela, skalpelom je poravnjena kako bi se dobila ravna površina.
- U seriji F rastvor GG (1 ml) temperature 60°C je sporo izlivan uz pomoć pipete, preko suvih makroporoznih uzoraka GG-BAG (prečnik 17 mm, visina 3 mm) u kriostatu na temperaturi -25 °C. Nakon geliranja, dvofazni uzorci su isečeni pomoću modle na diskove prečnika 12 mm i visine 6 mm.

### 3.13 KARAKTERIZACIJA DVOFAZNIH IMPLANTATA U BIOREAKTORU SA DINAMIČKOM KOMPRESIJOM

Dvofazni implantati na bazi GG-BAG, su ispitani u pogledu prelaska BAG u mineralnu fazu kalcijum fosfata unutar koštanog dela, kao i u pogledu stabilnosti ostvarene integracije između slojeva. Izvedene su dve studije u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom sa dvofaznim implantatima koji su se pokazali kao najbolji kandidati. Pre navedenih ispitivanja, dvofazni uzorci su stabilisani/rehidratirani tokom 48 h u rastvoru PBS.

Prva studija je izvedena sa uzorcima iz 5. serije. Postavljene su tri komore sa četiri priključka, svaka sa po jednim uzorkom (prečnik 12 mm, visina 4,5 mm). Dinamička kompresija je ostvarena u režimu 1 h kompresije/1 h pauze, do 10% deformacije u odnosu na gornji deo uzorka (1,5 mm visina gornjeg dela nakon ostranjivanja kalote), pri frekvenciji od 1,1 Hz i brzini kompresije 337,5  $\mu\text{m/s}$ . Kao medijum korišćen je rastvor SBF, tako da je po komori suprotnostrujno recirkulisalo 20 ml medijuma uz pomoć višekanalne peristaltičke pumpe protokom 1,1 ml/min na svakom od dva ulaza. Medijum je menjan na 48 h, a na svakih 24 h beleženi su signali sa senzora opterećenja.

Eksperiment je trajao 8 dana.

Druga studija je izvedena sa uzorcima iz 6. serije. Postavljene su četiri komore sa četiri priključka, svaka sa po jednim uzorkom (prečnik 12 mm, visina 6 mm). Dinamička kompresija je ostvarena u režimu 1 h kompresije/dan u periodu od 7-14. dana, do 5% deformacije u odnosu na gornji deo uzorka (3 mm visina gornjeg dela), pri frekvenciji od 1,1 Hz i brzini kompresije 337,5  $\mu\text{m/s}$ . Kao medijum korišćen je rastvor SBF, tako da je po komori suprotnostrujno recirkulisalo 18 ml medijuma uz pomoć višekanalne peristaltičke pumpe protokom 1,1 ml/min na svakom od dva ulaza. I u ovoj studiji medijum je menjan na 48 h i svakih 24 h beleženi su signali sa senzora opterećenja. Kontrolna statička studija postavljena je u četiri Petrijeve šolje, gde je svaki uzorak pojedinačno postavljen sa po 18 ml SBF.

Nakon obe studije, uzorci su isprani sa po 20 ml dejonizovane vode, a potom ručno isečeni u vlažnom stanju na tanke poprečne preseke, koji su zatim zalepljeni na predmetna stakla, prethodno premazana belancetom i ostavljeni da se suše. Ovako pripremljeni preseki korišćeni su za SEM analizu, dok je na uzorcima iz druge studije urađena i EDS analiza.

### 3.14 FIZIČKO-HEMIJSKE METODE KARAKTERIZACIJE MATERIJALA

#### 3.14.1 Infracrvena spektrometrijska analiza sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

FTIR spektrometrija korišćena je za određivanje molekulskih interakcija u hidrogelu alginata, nanokompozita Ag/alginata pre i nakon geliranja, kao i za potvrdu prelaska BAG u kalcijum fostat unutar hidrogelova GG-BAG, pri različitim hidrodinamičkim i statičkim uslovima.

Uzorci *VG* i *MG* Na-alginatnih rastvora i odgovarajućih Ca-alginatnih hidrogelova, Ag/alginatnih koloidnih rastvora i Ag/alginatnih diskova su osušeni, sprášeni i pripremljeni u obliku KBr peleta. IR spektri su snimljeni u opsegu između 400 i 4000  $\text{cm}^{-1}$  korišćenjem *Bomem MB-102 FTIR* spektrometra (*Quebec*, Kanada) sa rezolucijom od 4  $\text{cm}^{-1}$ .

Sprášeni uzorci GG-BAG hidrogelova su direktno analizirani FTIR spektroskopijom sa prigušenom totalnom refleksijom (ATR-FTIR) u apsorpcionom modu između 3500 i 500  $\text{cm}^{-1}$  korišćenjem *Nicolet iS10 FTIR* spektrometra (*Thermo Scientific*, Švedska) sa rezolucijom od 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 3.14.2 UV-vidljiva spektroskopija

Prisustvo nanočestica srebra u koloidnom rastvoru, kao i u rastvorenim nanokompozitnim mikročesticama i diskovima je ispitano UV-vidljivom spektrofotometrijom, pomoću spektrofotometra (UV3100, Mapada, Kina). Pri tome su Ag/alginatni koloidni rastvori razblaženi destilovanom vodom i to 100  $\mu\text{l}$  koloidnog rastvora u 2,9 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ .

Ag/alginatne mikročestice i diskovi su prvo rastvoreni u 2 mas.% rastvoru natrijum-citrata dihidrata, i to 0,1 g vlažnih mikročestica/diskova je rastvaran u 2,9 ml rastvora

#### 3.14.3 Raman spektroskopija

Ramanski spektri dobijeni su korišćenjem KsploRA Raman spektrometra tip *Horiba Jobin Ivon* (*Horiba Scientific*, *Northampton*, UK) na reprezentativnim tačkama poprečnih preseka suvih uzoraka. Korišćen je laser na 532 nm maksimalne izlazne snage od 20-25mV. Sva merenja su urađena korišćenjem spektrometra opremljenog rešetkom od 2400  $\text{gr/mm}$ . Raman spektrometar je bio povezan sa optičkim mikroskopom pomoću koga je podešen položaj uzorka, tako da se snimanje Raman spektara izvrši u određenim tačkama.

#### 3.14.4 Atomska apsorpciona spektroskopija (AAS) i optička emisiona spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES)

Koncentracija srebra u Ag/alginatnim diskovima i hranljivom medijumu određena je sa preciznošću 0,001 primenom atomske apsorpcione spektroskopije (AAS) na Perkin Elmer 3100 spektrometru (*Perkin Elmer*, SAD). Ag/alginatni diskovi (0,1 g) su rastvoreni u 10 mas.% rastvoru natrijum citrata (1 ml) u koji je zatim dodat amonijum hidroksid u višku kako bi se sve nanočestice srebra prevele u jone (10-20 ml 25 mas.%  $\text{NH}_4\text{OH}$  na 0,1 g diskova).

Koncentracija srebra u hranljivom medijumu je određena nakon oksidacije nanočestica srebra i rastvaranja potencijalnih precipitata AgCl, dodatkom amonijum hidroksida u višku (0,5–1 ml 25 mas%  $\text{NH}_4\text{OH}$  na 1 ml medijuma).

Koncentracija Cu (II) jona u hranljivom medijumu koji su oslobođeni tokom kontaktnog testa, određena je primenom AAS uz dodatak HNO<sub>3</sub> u višku (0,5 ml 65 mas% HNO<sub>3</sub> na 1 ml medijuma).

Koncentracija srebra u PVA/PVP diskovima određena je primenom AAS iz rastvora dobijenog rastvaranja celih diskova ( $\approx$  0,24 g) u 1 ml ključale dejonizovane vode u koji je dodato 1 ml 25 mas% NH<sub>4</sub>OH.

Koncentracija srebra u eksplantatima hrskavice nakon 48 h dinamičke kompresije u prisustvu 0,5 mM rastvora nanočestica srebra u hranljivom medijumu, određena je nakon digestije eksplantata u 65 mas% HNO<sub>3</sub> tokom 12 h na 120°C (2 ml HNO<sub>3</sub> na 0,2-0,5 g tkiva). Za određivanje koncentracije srebra korišćena je optička emisiona spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES) na *Thermo Scientific iCAP 7400 ICP-OES Duo* uređaju (*Thermo Scientific, SAD*).

Koncentracija jona Ca, P i Si u svim uzorcima GG-BAG hidrogelova nakon druge studije ispitivanja prelaska BAG u mineralnu fazu kalcijum fosfata, pri različitim hidrodinamičkim uslovima, određena je primenom optičke emisione spektrometrije sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES) na *Thermo Scientific iCAP 7400 ICP-OES Duo* uređaju (*Thermo Scientific, SAD*). Sprašeni uzorci ( $0,0105 \pm 0,0003$  g) su rastvoreni u 1 ml 10 mas.% rastvora natrijum citrata, nakon čega su čvrsti ostaci izdvojeni centrifugiranjem (5 min na 11000 rpm). Posle dvostepenog ispiranja u dejonizovanoj vodi, koncentracija jona je određene u 50 puta razblaženom rastvoru koji je dobijen digestijom čvrstih ostataka u 65 mas.% HNO<sub>3</sub> i 30 zap.% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 ml HNO<sub>3</sub> i 0,2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> po uzorku).

### 3.14.5 Rendgenska difrakcija X-zraka (XRD)

Prisustvo i kristaliničnost kalcijum fosfata formiranog unutar GG-BAG hidrogelova nakon 14 dana u SBF ispitani su rendgenskom difrakcijom praha (XRPD). Za XRPD merenja korišćen je APD2000 difraktometar (*Ital Structure, Italija*) koji je sa CuK lampom ( $\lambda = 0,15418$  nm) u opsegu  $2\theta$  od 15 do 60° sa koracima od 0,01° i vremenim zadržavanjem od 2 s po koraku.

### 3.14.6 Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) i energodisperzivna spektroskopija X-zracima (EDS)

Skenirajući elektronski mikroskop (*MIRA 3 XMU Field Emission Scanning Electron Microscope; Tescan USA inc, SAD*) korišćen je za analizu uzoraka Ag/alginatnih i alginatnih diskova nakon 4 dana u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom. Uzorci su pripremljeni za snimanje tako što su potapani u sledeće vodene rastvore: 3% sirćetne kiseline, zatim 3% sirćetne kiseline i 25% etanola, pa 3% sirćetne kiseline i 50% etanola i najzad 70% etanola. Uzorci su zatim isečeni na tanke listiće na komadićima mikroskopskih pločica i ostavljeni da se osuše na vazduhu. Površina osušenih uzoraka je obložena tankim slojem zlata nakon čega je analizirano prisustvo nanočestica srebra.

Morfologija GG-BAG hidrogelova je analizirana primenom istog SEM mikroskopa. Osušeni poprečni preseći rehidratiranih inicijalnih uzoraka i uzoraka nakon 14 dana u SBF obloženi su tankim slojem zlata i snimljeni pri naponu od 20 keV.

Elementarna analiza je urađena primenom energodisperzivne spektroskopije X-zraka (EDS) na osušanim poprečnim preseccima direktno, koristeći *Jeol JSM 5800* skenirajući elektronski mikroskop (Tokio, Japan). Analiza je urađena na najmanje tri tačke na površini uzorka i tri tačke u unutrašnjosti uzorka.

### 3.14.7 Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)

Veličina i oblik nanočestica srebra u Ag/alginatnim koloidnim rastvorima, kao i u diskovima nakon rastvaranja, ispitivana je pomoću transmisione elektronske mikroskopije (TEM) korišćenjem „100 CX Electron” mikroskopa (*JEOL Ltd., Tokio, Japan*), na radnom naponu od 100 kV. Uzorci za TEM analizu su postavljeni na bakarnim mrežama prekrivenim ugljenikom (*SPI Supplies/Structure Probe Inc., West Chester, SAD*).

### 3.14.8 Optička mikroskopija

Prečnik Ag/alginatnih mikročestica određen je uz pomoć optičkog mikroskopa (*Olympus CX41RF, Tokio, Japan*), analizom slike primenom programa „CellA“ (*Olympus, Tokio, Japan*). Na osnovu dobijenih vrednosti merenja veličine najmanje 20 mikročestica određena je srednja vrednost prečnika.

Prečnik inhibicione zone oko *MG* i *VG* diskova u direktnom kontakt testu na monosloju hondrocita takođe je analiziran primenom istog optičkog mikroskopa. Pre posmatranja inhibicione zone, diskovi su prvo pažljivo uklonjeni iz bunarića posude za ćelijsku kulturu, a zatim je iz tih i ostalih bunarića gde su se nalazili referentni materijali, uklonjen medijum.

Za posmatranje poroznosti i ostvarenog kontakta između slojeva GG-BAG dvofaznih nosača korišćen je stereo zum mikroskop.

## 3.15 BIOLOŠKA KARAKTERIZACIJA

### 3.15.1 MTT test

MTT test je korišćen za određivanje citotoksičnosti Ag/alginatnih koloidnih rastvora na monosloju hondrocita. Uspostavljena je procedura za određivanje citotoksičnosti MTT testom za tečne uzorke koji su viskozni. MTT reagens je aseptično rastvoren u rastvoru PBS u koncentraciji od 5 mg/ml, a zatim dodat u svaki bunarić, tako da finalna koncentracija u bunariću bude 0,5 mg/ml.

Posude za ćelijsku kulturu su nakon toga vraćene u inkubator na 37°C naredna 3 h, kao period koji je potreban da bi došlo do redukcije tetrazolijumske soli u formazan u mitohondrijama živih ćelija. Nakon tog perioda, supernatant je odstranjen, i pre dodavanja izopropanola sa 0,1 M HCl, svaki bunarić je dva puta ispran sa po 1-2 ml DMEM, kako bi se uklonili ostaci koloidnog rastvora sa zidova bunarića. Kvantifikacija rastvorenog formazana određena je korišćenjem UV-vidljivog spektrofotometra (model 3100, *Mapada, Kina*) na talasnoj dužini od 540 nm. Preživljavanje ćelija je definisano kao odnos broja ćelija koje rastu u prisustvu materijala koji se ispituje i broja ćelija u kontroli. Pošto je broj živih ćelija direktno proporcionalan apsorbanci, ćelijsko preživljavanje, *S*, može se izračunati kao:

$$S[\%] = A_u / A_c \cdot 100$$

gde je:  $A_u$  apsorbanca ćelija koje su gajene u prisustvu Ag/alginatnih koloidnih rastvora,

$A_c$  je apsorbanca ćelija iz kontrole.

Citotoksičnost je određena prema skali: ne-toksično (> 90% preživljavanje ćelija), slabo citotoksično (60–90% preživljavanje ćelija), umereno citotoksično (30–59% preživljavanje ćelija), i jako citotoksično (≤ 30% preživljavanje ćelija) (*Meriç i sar., 2008*).

### 3.15.2 Histološka analiza

Uzorci tkiva artikularne hrskavice pripremljeni su za histološku analizu tako što su prvo fiksirani u 4% formaldehidu u periodu od najmanje 24 h. Potom je tkivo dehidratirano u rastvorima alkohola rastućih koncentracija (70%, 96%, 100%), čime je pripremljeno za kalupljenje u Paraplastu. Histološki preparati su obojeni hematoksilin i eozin i *alcian blue* bojom. Posebno je obraćena pažnja da se površine eksplantata koje su bile u direktnom kontaktu sa Ag/alginatnim diskovima i mikročesticama označe kako bi se uočio potencijalni citotoksičan efekat u direktnom kontaktu sa ispitivanim materijalom.

## 4 REZULTATI

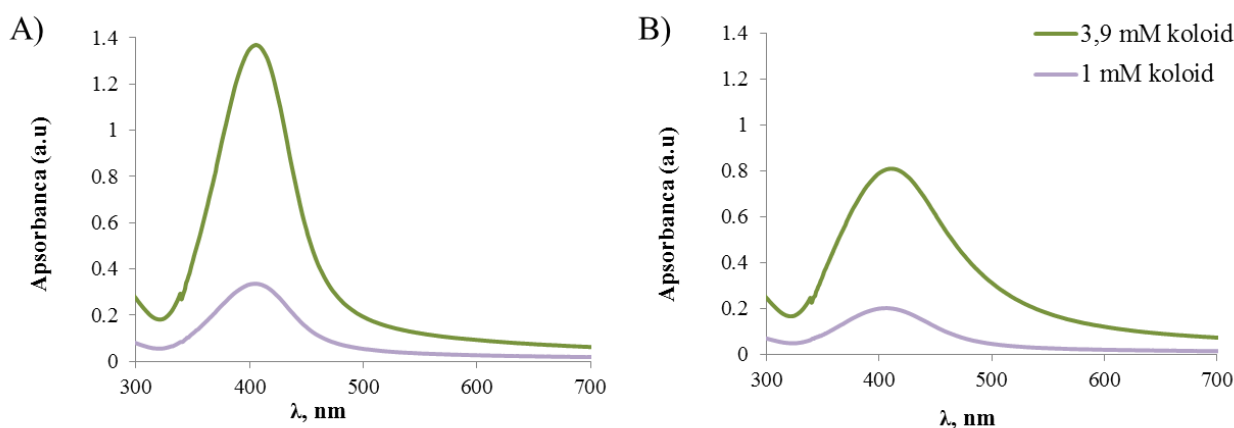
Istraživanja sprovedena u okviru ove doktorske disertacije obuhvataju razvoj različitih biomaterijala za potencijalnu primenu u inženjerstvu skeletnih tkiva (hrskavice, kosti i osteohondralnog tkiva), kao i primenu više biomimetičkih bioreaktorskih sistema u razvoju i karakterizaciji dobijenih biomaterijala, sa aspekta primene.

### 4.1 KARAKTERIZACIJA Ag/ALGINATNIH NANOKOMPOZITA U 2D I 3D SISTEMIMA

U ovoj doktorskoj disertaciji primenjen je biomimetički bioreaktorski sistem za funkcionalnu karakterizaciju Ag/alginatnih koloidnih rastvora i hidrogelova sintetisanih od dve vrste alginata, kako bi se utvrdili potencijali ovih biomaterijala za određene primene. Naime, Ag/alginatni koloidni rastvori su atraktivni za primenu u tretmanu rana kao antimikrobni premazi i kreme, dok Ag/alginatni hidrogelovi mogu poslužiti kao različite obloge za rane, ali i kao potencijalni antimikrobni implantati za meka tkiva. Sa tim namenama u vidu, u ovoj doktorskoj disertaciji primenjen je bioreaktor sa dinamičkom kompresijom radi određivanja citotoksičnosti u 3D kulturama ćelija i tkiva u odnosu na 2D ćelijske kulture u monosloju, kao i stabilnosti i mehaničke karakterizacije u uslovima koji imitiraju uslove u prirodnoj artikulanoj hrskavici.

#### 4.1.1 Dobijanje Ag/alginatnih koloidnih rastvora

Nanočestice srebra sintetisane su elektrohemijским postupkom u rastvorima alginata različite viskoznosti i sa M/G odnosom od 1,94 i 1,38 za *MG* i *VG* koloidne rastvore, redom. Prisustvo nanočestica srebra u oba dobijena koloidna rastvora koncentracije 3,9 mM, kao i u razblaženim rastvorima finalne koncentracije 1 mM, potvrđeno je primenom UV-vidljive spektrofotometrije (slika 4.1).



**Slika 4.1** UV-vidljivi apsorpcioni spektri inicijalnih 3,9 mM koloidnih rastvora i sterilisanih 1 mM koloidnih rastvora za: A) alginat male viskoznosti sa velikim sadržajem G jedinica (*VG*) i B) alginat srednje viskoznosti sa malim sadržajem G jedinica (*MG*); (100  $\mu$ l koloidnog rastvora je razblaženo u 2,9 ml dejonizovane vode; podaci su srednje vrednosti od  $n=3$ ; standardne devijacije su izostavljene radi preglednosti)

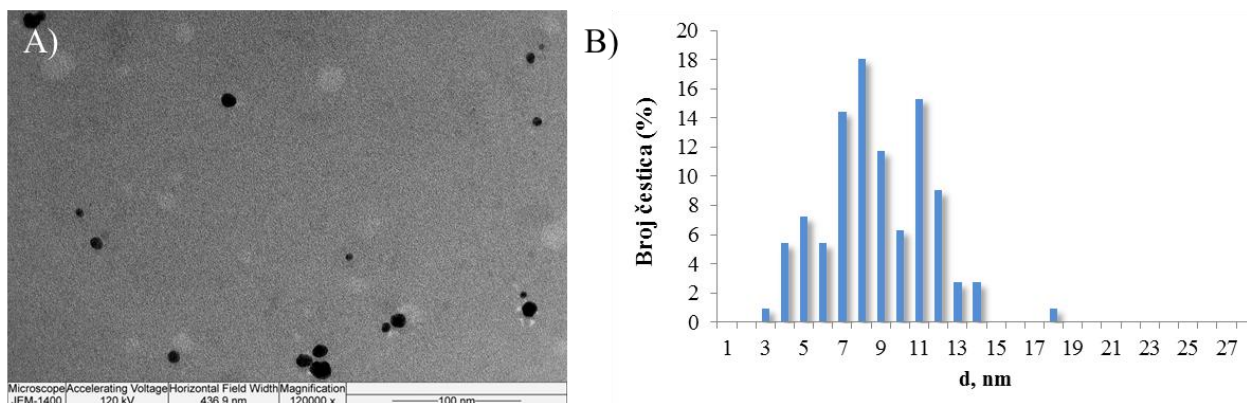
UV-vidljivi spektari pokazali su da u svim uzorcima maksimum apsorpcije postoji na talasnim dužinama u opsegu 405-413 nm, što odgovara karakterističnim talasnim dužinama za



nanočestice srebra (*Mulfinger i sar., 2007; Martínez-Castañón i sar., 2008*). Veći i uži pikovi primećeni su kod *VG* koloidnog rastvora (slika 4.1a), što ukazuje na veću koncentraciju nanočestica srebra, kao i na uniformniju raspodelu veličina dobijenih nanočestica srebra u poređenju sa *MG* koloidnim rastvorom (slika 4.1b). Razblaživanjem koloidnih rastvorima alginata do željene koncentracije nanočestica srebra od 1 mM, vrednost maksimuma apsorpcije približno je proporcionalno smanjena kod oba tipa koloidnih rastvora (slika 4.1).

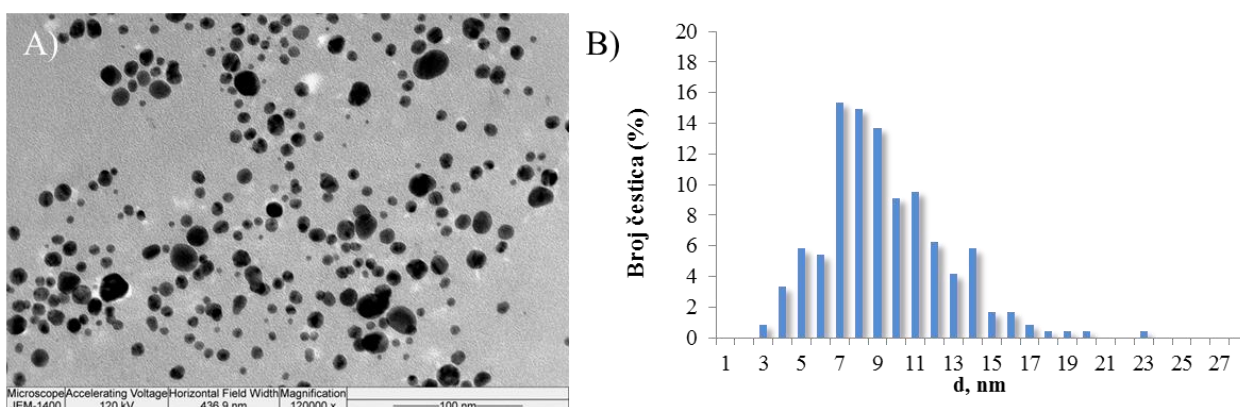
#### 4.1.1.1 TEM analiza koloidnih rastvora

TEM analiza potvrdila je prisustvo sferičnih nanočestica srebra u oba koloidna rastvora (slike 4.2a i 4.3a). Na uzorku od preko 100 čestica, utvrđeno je da je veličina nanočestica srebra u *VG* koloidnom rastvoru u opsegu 3-18 nm sa srednjim prečnikom  $8,7 \pm 2,6$  nm (slika 4.2b).



**Slika 4.2** TEM analiza koloidnog rastvora alginat male viskoznosti sa velikim sadržajem G jedinica (*VG*): A) mikrografija nanočestica srebra; B) raspodela veličina nanočestica srebra

Veličina nanočestica srebra sintetisanih u *MG* alginatu bila je u opsegu 3-28 nm sa srednjim prečnikom  $9,3 \pm 3,2$  nm (slika 4.3b).



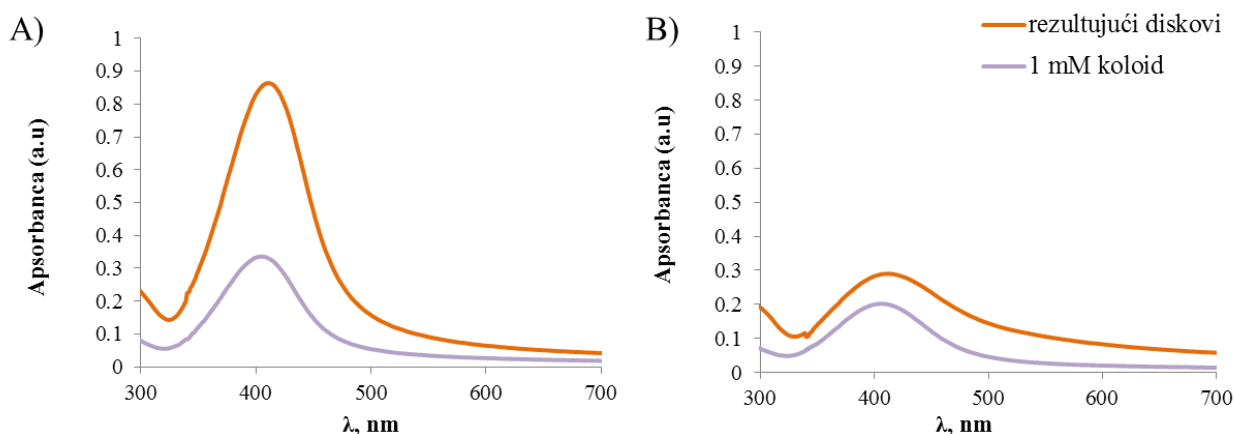
**Slika 4.3** TEM analiza koloidnog rastvora alginat srednje viskoznosti sa malim sadržajem G jedinica (*MG*): A) mikrografija nanočestica srebra; B) raspodela veličina nanočestica srebra

Dobijeni rezultati potkrepljuju zapažanja vezana za UV-vidljivu spektrofotometrijsku analizu koja je ukazala na trend raspodele veličina nanočestica u dobijenim koloidnim rastvorima, odnosno da su u *VG* koloidnom rastvoru dobijene manje nanočestice srebra, uniformnije raspodele.

## 4.1.2 Dobijanje Ag/alginatnih hidrogelova

U ovom radu ispitivani su Ag/alginatni hidrogelovi u obliku diskova, dok su za jednu studiju citotoksičnosti proizvedene i Ag/alginatne mikročestice, kako je opisano u prethodnom radu (Jovanović i sar., 2012).

UV-vidljivi spektri rastvorenih diskova pokazali su značajno veće apsorpcione maksimume u odnosu na odgovarajuće početne koloidne rastvore, za oba tipa alginata (slika 4.4). Koncentrovanje nanočestica srebra unutar diskova posledica je kontrakcije alginatnih hidrogelova tokom 48 h geliranja, što je zapaženo u prethodnim istraživanjima (Martinsen i sar., 1989; Velings i Mestdagh, 1995; Stojkowska i sar., 2012).



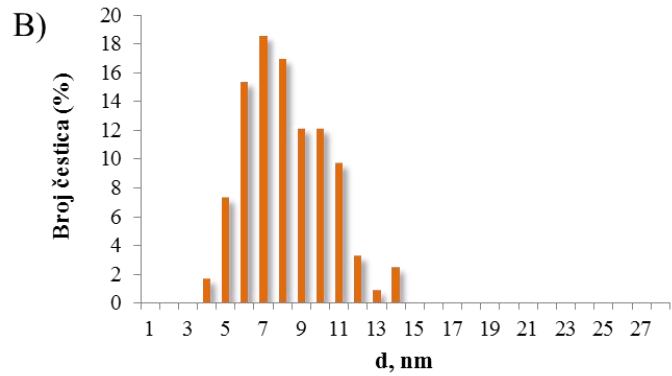
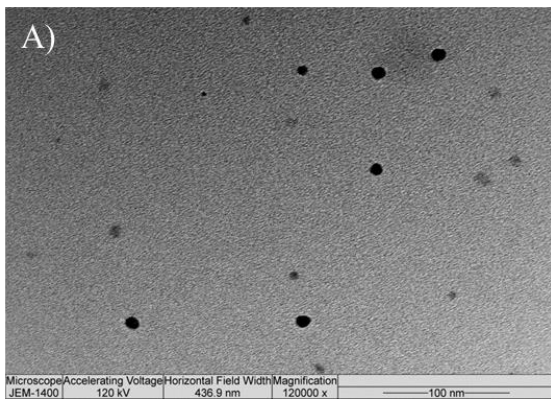
**Slika 4.4** UV-vidljivi apsorpcioni spektri sterilisanih 1 mM koloidnih rastvora i dobijenih diskova za: A) alginat male viskoznosti sa velikim sadržajem G jedinica (VG) i B) alginat srednje viskoznosti sa malim sadržajem G jedinica (MG); (100  $\mu$ l koloidnog rastvora je razblaženo u 2,9 ml dejonizovane vode dok je 0,1 g Ag/alginatnih diskova rastvorenih u 2,9 ml 10 mas.% Na-citrata; podaci su srednje vrednosti od  $n=3$ ; standardne devijacije su izostavljene radi preglednosti)

Primećeno je da je, u slučaju VG alginata, povećanje maksimuma apsorpcije veće i to  $\sim 2,5$  puta, dok je u slučaju MG alginata to povećanje bilo  $\sim 1,4$  puta (slika 4.4). Veći stepen kontrakcije, zapažen kod VG alginata, u direktnoj je vezi sa brojem G jedinica prisutnih kod ovog tipa alginata, koje su odgovorne za stvaranje primarnih veza i bolje umrežavanje unutar polimernog hidrogela (Davidovich-Pinhas i Bianco-Peled, 2010; Topuz, 2012).

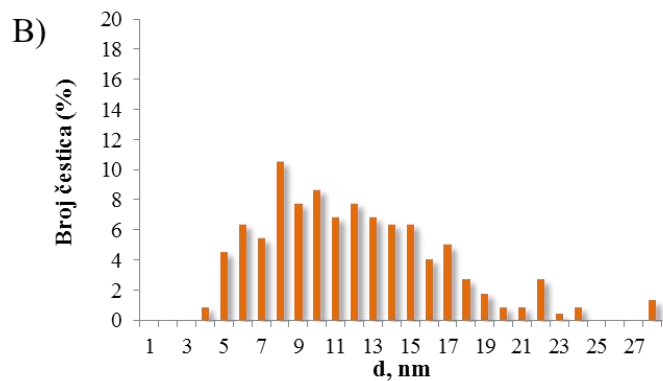
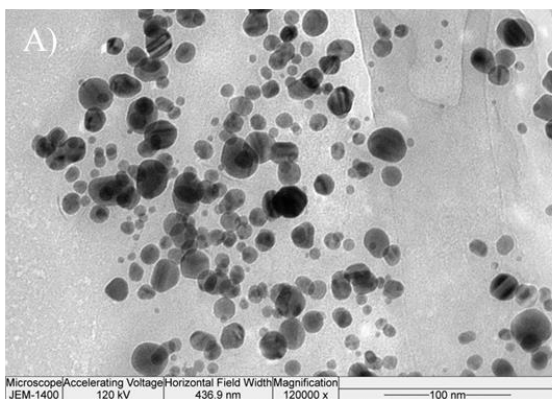
Rezultati dobijeni UV-vidljivom spektrofotometrijom potvrđeni su primenom AAS metode, kojom je u VG Ag/alginatnim diskovima izmerena ukupna koncentracija srebra od  $2,28 \pm 0,12$  mM, dok je u MG Ag/alginatnim diskovima izmerena značajno manja koncentracija srebra od  $1,29 \pm 0,19$  mM.

### 4.1.2.1 TEM analiza rastvorenih Ag/alginatnih diskova

U rastvorenim Ag/alginatnim diskovima TEM analizom potvrđeno je prisutvo nanočestica srebra, čije su veličine u VG diskovima bile 4-14 nm sa srednjim prečnikom od  $8,2 \pm 2,1$  nm, dok su u MG diskovima bile u opsegu 4-28 nm, sa srednjim prečnikom od  $11,9 \pm 4,8$  nm (slike 4.5 i 4.6, redom). Ovi rezultati ukazuju da su u VG alginatnim diskovima nanočestice bile dobro stabilisane i da nije došlo do aglomeracije tokom geliranja. Sa druge strane u MG Ag/alginatnim diskovima došlo je do blage aglomeracije nanočestica srebra, tako da je srednji prečnik porastao  $\sim 28\%$ .



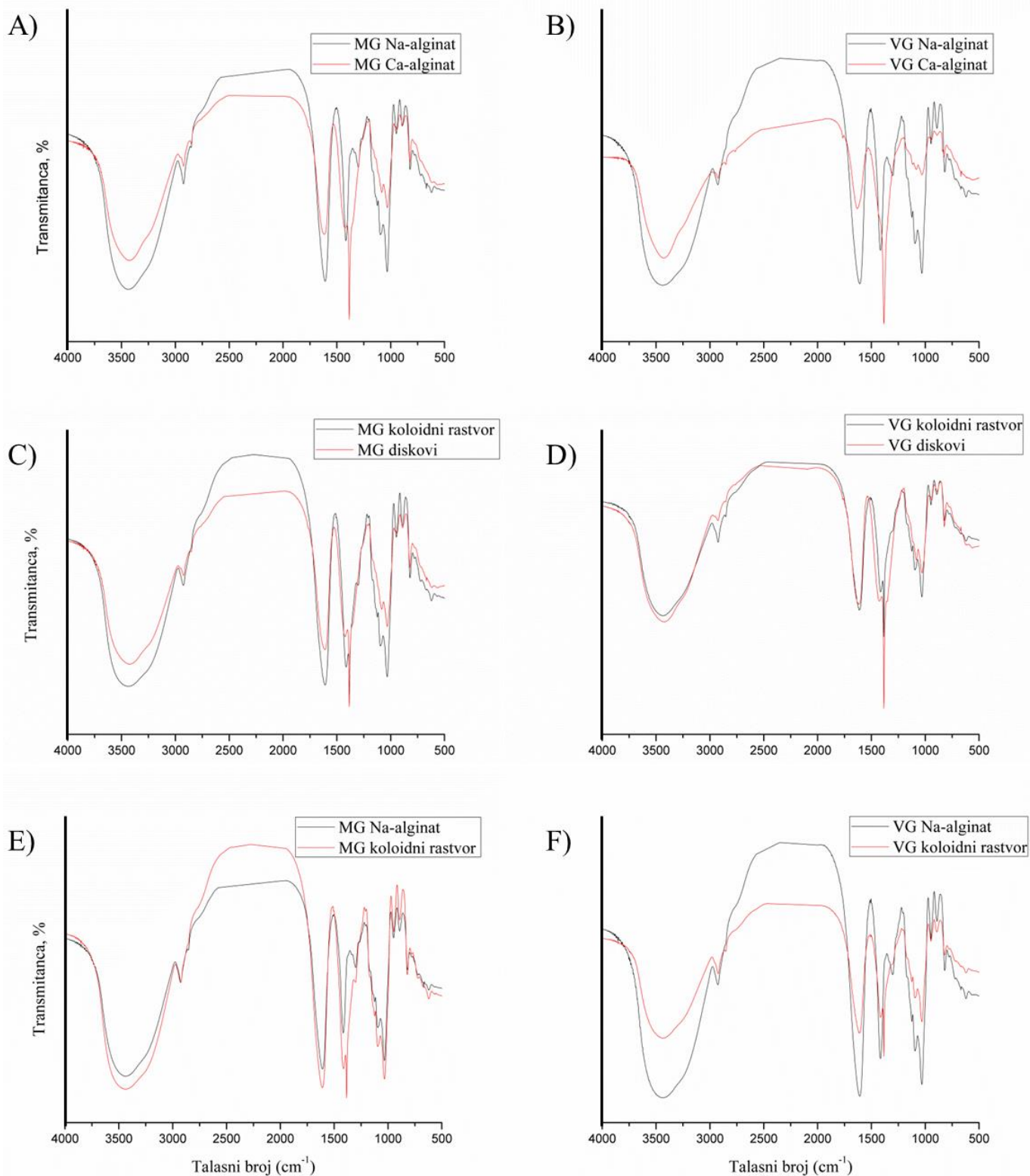
**Slika 4.5** TEM analiza nakon rastvaranja Ag/alginatnih diskova na bazi alginata male viskoznosti sa velikim sadržajem G jedinica (VG): A) mikrografija nanočestica srebra; B) raspodela veličina nanočestica srebra



**Slika 4.6** TEM analiza nakon rastvaranja Ag/alginatnih diskova na bazi alginata srednje viskoznosti sa malim sadržajem G jedinica (MG): A) mikrografija nanočestica srebra; B) raspodela veličina nanočestica srebra

### 4.1.3 FTIR analiza alginatnih i koloidnih rastvora i hidrogelova

Razlike između dva tipa alginata, dobijenih koloidnih rastvora i njihovih hidrogel formi na molekularskom nivou ispitane su FTIR spektroskopijom, slika 4.7.



**Slika 4.7** Uporedni FTIR spektri: A) Na- alginata srednje viskoznosti sa malim sadržajem G jedinica (*MG*) i *MG* Ca-alginata, B) Na-alginata male viskoznosti sa velikim sadržajem G jedinica (*VG*) i *VG* Ca-alginata, C) *MG* koloidnog rastvora i *MG* diskova, D) *VG* koloidnog rastvora i *VG* diskova, E) *MG* Na-alginata i *MG* koloidnog rastvora i F) *VG* Na-alginata i *VG* koloidnog rastvora

Talasni brojevi karakterističnih pikova prikazani su u tabeli 4.1.

**Tabela 4.1** FTIR spektroskopska analiza oba tipa alginata, odgovarajućih alginatnih hidrogelova, dobijenih koloidnih rastvora i njihovih hidrogel formi

<i>Talasni broj, cm<sup>-1</sup></i>								<i>Karakteristična veza</i>
<i>MG Na-alginat</i>	<i>VG Na-alginat</i>	<i>MG Ca-alginat</i>	<i>VG Ca-alginat</i>	<i>MG koloidni rastvor</i>	<i>VG koloidni rastvor</i>	<i>MG diskovi</i>	<i>VG diskovi</i>	
3448	3444	3431	3435	3434	3446	3431	3416	$\nu(\text{OH})$
2929	2929	2929	2929	2929	2929	2929	2929	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$
1612	1612	1620	1640	1612	1619	1615	1618	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$
1421	1419	1428		1418	1421	1428	1430	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$

Poređenjem IR spektara alginata i odgovarajućih hidrogelova uočeno je značajno pomeranje karakterističnih apsorpcionih traka koje potiču od vibracija istezanja ( $-\text{OH}$ ) veze, kao i simetričnih i asimetričnih vibracija istezanja ( $-\text{COO}$ ) veze. Pomeranje apsorpcione trake ( $-\text{OH}$ ) veze sa karakteristične talasne dužine od  $\sim 3440 \text{ cm}^{-1}$  na niže talasne dužine ( $\sim 3431$ ,  $\sim 3435$ ,  $\sim 3431$  i  $\sim 3416 \text{ cm}^{-1}$  za *MG* alginatne diskove, *VG* alginatne diskove, *MG Ag/alginatne* diskove i *VG Ag/alginatne* diskove, redom) ukazuje na jaču interakciju između hidroksilnih grupa u svim hidrogelovima. Posebno značajne interakcije između hidroksilnih grupa su primećene kod *VG Ag/alginatnih* diskova, što je posledica jake kontrakcije polimerne mreže tokom geliranja, izbacivanja vode i približavanja polimernih lanaca usled povećanjem koncentracije polimera, kao što je navedeno u literaturi (*Zechner-Krpan i sar., 2010*).

Pomeranje ove karakteristične apsorpcione trake ka nižim talasnim dužinama ( $\sim 3434 \text{ cm}^{-1}$ ) je takođe primećeno u *MG* koloidnom rastvoru najverovatnije usled interakcije hidroksilnih grupa sa nanočesticama srebra (*Zhao i sar., 2014*). Na spektru *VG* koloidnog rastvora nije primećeno slično pomeranje karakteristične apsorpcione trake hidroksilnih grupa. Izmena jona natrijuma sa jonima kalcijuma, tokom procesa geliranja, rezultirala je stvaranjem jače  $\text{C}=\text{O}$  veze, a time i većom energijom veze, što je dovelo do manjeg pomeranja u vibracionim spektrima karboksilnih grupa ka višim talasnim dužinama (*Sartori i sar., 1997*). Značajne promene u asimetričnim vibracijama istezanja veze ( $-\text{COO}$ ) grupa, primećene su samo kod *VG* koloidnog rastvora i *VG Ag/alginatnih* diskova. Ovaj rezultat najverovatnije ukazuje na interakcije između nanočestica srebra i karboksilnih grupa kod *VG* koloidnog rastvora i diskova, ali potencijalno i na različite mehanizme i načine stabilizaciji nanočestica srebra prilikom sinteze u alginatima različitog sastava.

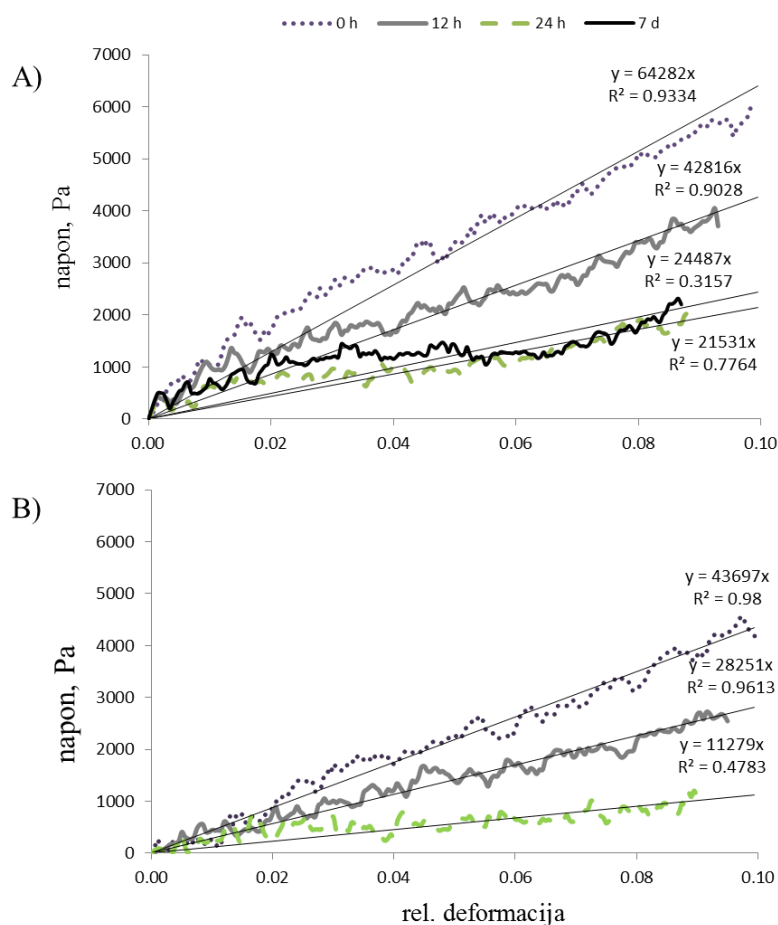
#### 4.1.4 Funkcionalna karakterizacija Ag/alginatnih nanokompozita primenom biomimičnog bioreaktora

Funkcionalna karakterizacija Ag/alginatnih nanokompozita je obuhvatala ispitivanje citotoksičnosti Ag/alginatnih koloidnih rastvora i hidrogelova, uz paralelna ispitivanja otpuštanja srebra. U cilju odabira odgovarajućeg tipa alginata za potencijalnu primenu kao implantata za meka tkiva, posebno tkiva hrskavice, prvo su izvedena ispitivanja mehaničke stabilnosti Ag/alginatnih hidrogelova u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom.



#### 4.1.4.1 Mehanička stabilnost *MG* i *VG* Ag/alginatnih diskova

Stabilnost i mehanička svojstva dva tipa Ag/alginatnih diskova ispitani su u biomimicnom bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom, u fiziološki relevantnim uslovima tokom 7 dana. Na slici 4.8 prikazane su zavisnosti srednje vrednosti za tri merenja napona od deformacije i linearne zavisnosti dobijene metodom najmanjih kvadrata odstupanja. Može se uočiti relativno dobro slaganje eksperimentalnih podataka sa linearnim trendom ( $R^2=0,93-0,98$ ) u prvih 24 h ispitivanja. Iz nagiba linearne zavisnosti određeni su dinamički moduli elastičnosti, pri čemu su *MG* Ag/alginatni diskovi već na početku pokazali za oko 30% slabije inicijalne mehaničke karakteristike u odnosu na *VG* diskove, odnosno dinamički moduli elastičnosti su iznosili  $43,7 \pm 1,5$  kPa i  $64,3 \pm 3,3$  kPa, redom (slika 4.8).



**Slika 4.8** Zavisnosti napona od deformacije pri brzini kompresije od  $337,5 \mu\text{m/s}$ ; eksperimentalni rezultati (srednja vrednost tri merenja) i linearne zavisnosti dobijene metodom najmanjih kvadrata odstupanja: A) Ag/alginatni diskovi na bazi alginata male viskoznosti sa velikim sadržajem G jedinica (*VG*), B) Ag/alginatni diskovi na bazi alginata srednje viskoznosti sa malim sadržajem G jedinica (*MG*) (na eksperimentalne rezultate primenjen je centralni matematički metod filtriranja srednje vrednosti od pet tačaka)

Tokom daljeg ispitivanja mehaničkih karakteristika u uslovima dinamičke kompresije i protoka medijuma došlo je do postepenog slabljenja oba tipa hidrogelova, usled izmene  $\text{Ca}^{2+}$  iz hidrogela sa  $\text{Na}^+$  iz hranljivog medijuma. Nakon perioda od 12 h, dinamički moduli elastičnosti su iznosili  $28,3 \pm 0,6$  kPa i  $42,8 \pm 1,5$  kPa za *MG* i *VG* Ag/alginatne diskove, redom, što predstavlja smanjenje od oko 34%. Dinamički moduli elastičnosti izmereni nakon 24 h iznosili su  $11,3 \pm 1,0$  kPa i  $21,5 \pm 2,1$  kPa za *MG* i *VG* diskove, redom, što je odgovaralo smanjenju od ~74% i ~66%, redom. Nakon perioda od 24 h zavisnost napona od deformacije kod *MG* diskova značajno

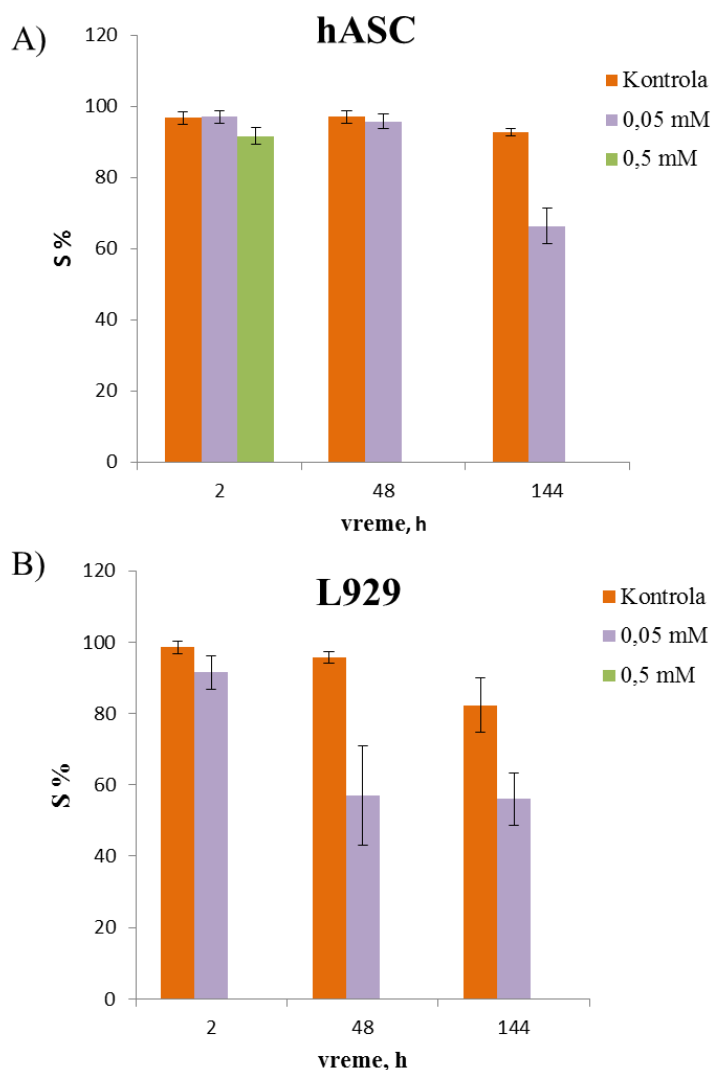
je odstupala od linearne zavisnosti ( $R^2 < 0,5$ ), što je ukazalo na raspadanje i gubitak integriteta diskova, tako da se posle tog perioda mehaničke karakteristike ovih diskova nisu ni mogle izmeriti. Sa druge strane, *VG* Ag/alginatni diskovi su zadržali približno konstantane mehaničke karakteristike, do kraja eksperimenta, odnosno 7 dana. Zavisnost napona od deformacije izmerena 7. dana nije statistički značajno različita od eksperimentalne zavisnosti dobijene posle 24 h (slika 4.8).

Mehanička karakterizacija diskova pod fiziološki relevantnim uslovima u biomimicnom bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom i protokom medijuma, nedvosmisleno je ukazala na mogućnost primene *VG* Ag/alginatnih hidrogelova kao potencijalnih kandidata za implantate mekih tkiva. Sa druge strane *MG* diskovi, usled brze razgradnje u fiziološkom okruženju, nisu pogodni za implantaciju na mestu kao što je artikularna hrskavica, već potencijalno mogu naći primenu u tretmanu rana.

#### 4.1.4.2 Citotoksičnost u 2D sistemima na monosloju ćelija

##### 4.1.4.2.1 *Ag/alginatni koloidni rastvor*

Citotoksičnost *MG* Ag/alginatnog koloidnog rastvora ispitivana je u 2D sistemu direktnim kontakt testom na monosloju ćelija, i to na dve ćelijske linije – hASC i L929, kao i na primarnim ćelijama hondrocita izolovanim iz artikularne hrskavice teleta. U eksperimentima sa ćelijskim linijama postavljane su tri eksperimentalne grupe: (i) ćelije tretirane sa 0,05 mM ukupne koncentracije srebra (što odgovara  $3 \times 10^{-9}$  mmolAg/ćeliji), (ii) ćelije tretirane sa 0,5 mM ukupne koncentracije srebra (što odgovara  $30 \times 10^{-9}$  mmolAg/ćeliji) i (iii) kontrolna grupa sa hranljivim medijumom, u kojoj ćelije nisu bile tretirane. Preživljavanje ćelija (S%) utvrđeno je brojanjem nakon 2 h, 48 h i nakon 6 dana, slika 4.9.



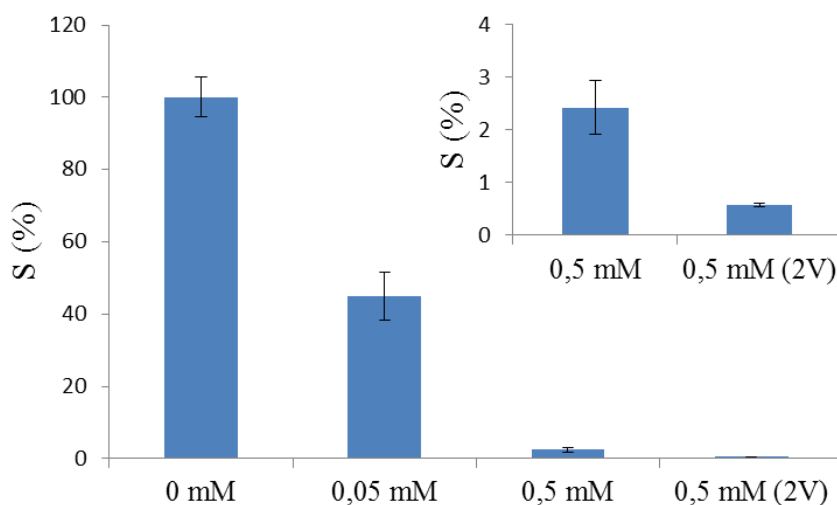
**Slika 4.9** Preživljavanje (S%) ćelijskih linija tretiranih sa koloidnim rastvorom alginata srednje viskoznosti sa malim sadržajem G jedinica (MG) pri ukupnoj koncentraciji srebra od 0,05 mM i 0,5 mM nakon 2 h, 48 h i 144 h: A) humanih matičnih ćelija poreklom iz masnog tkiva (hASC); B) L929

MG koloidni rastvor razblažen do koncentracije srebra od 0,5 mM ispoljio je jaku citotoksičnost (0% preživljavanja) na oba tipa ćelijskih linija, pri čemu je ovaj efekat bio blago odložen u slučaju hASC ćelija. Naime, u periodu od 2 h preživljavanje ćelija je još uvek iznosilo oko 92%. Kod ćelija tretiranih sa koloidnim rastvorom pri koncentraciji srebra od 0,05 mM zabeleženo je preživljavanje > 56% kod oba tipa ćelijskih linija čak i posle 6 dana, što ukazuje na slab do umeren citotoksičan efekat. Interesantno je da se citotoksičan efekat 0,05 mM koncentracije srebra na L929 ćelijskoj liniji postiže u prvih 48 h, nakon čega broj metabolički aktivnih ćelija ostaje konstantan. Sa druge strane, citotoksičnost koloidnog rastvora sa koncentracijom srebra od 0,05 mM na hASC izgleda vremenski zavisna, i u poređenju sa citotoksičnim efektom na L929 ćelijskoj liniji, daleko manja.

U eksperimentima na ćelijama hondrocita, ispitivan je efekat koncentracije i količine nanočestica srebra i/ili  $\text{Ag}^+$  na vijabilnost ćelija. Postavljene su četiri eksperimentalne grupe: (i) ćelije tretirane sa 0,05 mM ukupne koncentracije srebra (što je ekvivalentno  $2,5 \times 10^{-10}$  mmolAg/ćelija), (ii) ćelije tretirane sa 0,5 mM ukupne koncentracije srebra (što je ekvivalentno  $5 \times 10^{-10}$  mmolAg/ćelija), (iii) ćelije tretirane sa 0,5 mM ukupne koncentracije srebra u većoj zapremini (što je ekvivalentno  $50 \times 10^{-10}$  mmolAg/ćeliji) i (iv) kontrolna grupa sa hranljivim



medijumom, i netretiranim ćelijama. Vijabilnost ćelija (S%) utvrđena je MTT testom nakon 24 h (slika 4.10).



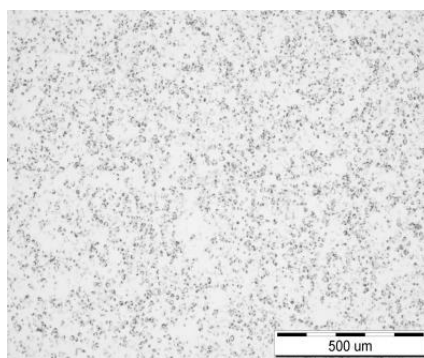
**Slika 4.10** Preživljavanje (S%) ćelija hondrocita tretiranih sa koloidnim rastvorom alginata srednje viskoznosti sa malim sadržajem G jedinica (MG) koncentracije srebra od 0,05 mM i 0,5 mM, kao i sa MG koloidnim rastvorom u dva puta većoj zapremini (0,5 mM (2V)) nakon 24 h; umetak predstavlja uvećan deo grafika za grupe 0,5 mM i 0,5 mM (2V)

Umeren citotoksičan efekat (preživljavanje ~ 50%) primećen je u grupi u kojoj su ćelije tretirane sa 0,05 mM koncentracijom srebra. Sa druge strane, u grupama u kojima su ćelije tretirane sa 0,5 mM koncentracijom srebra primećena je jaka citotoksičnost sa preživljavanjem manjim od 5%, (slika 4.10, umetak). U grupama u kojima su ćelije tretirane sa rastvorom iste koncentracije, ali u većoj količini ( $50 \times 10^{-10}$  mmol/ćeliji u odnosu na  $25 \times 10^{-10}$  mmol/ćeliji) preživljavanje se dodatno smanjilo (sa 2,5 na 0,5%).

Dobijeni rezultati su ukazali da citotoksičnost zavisi od koncentracije nanočestica/jona srebra kojoj su ćelije izložene, ali potencijalno i od količine srebra. Zavisnost citotoksičnosti od količine srebra trebalo bi utvrditi preciznije, pri manjim koncentracijama srebra (kao što je 0,05 mM) koje imaju umeren citotoksičan efekat na ćelije.

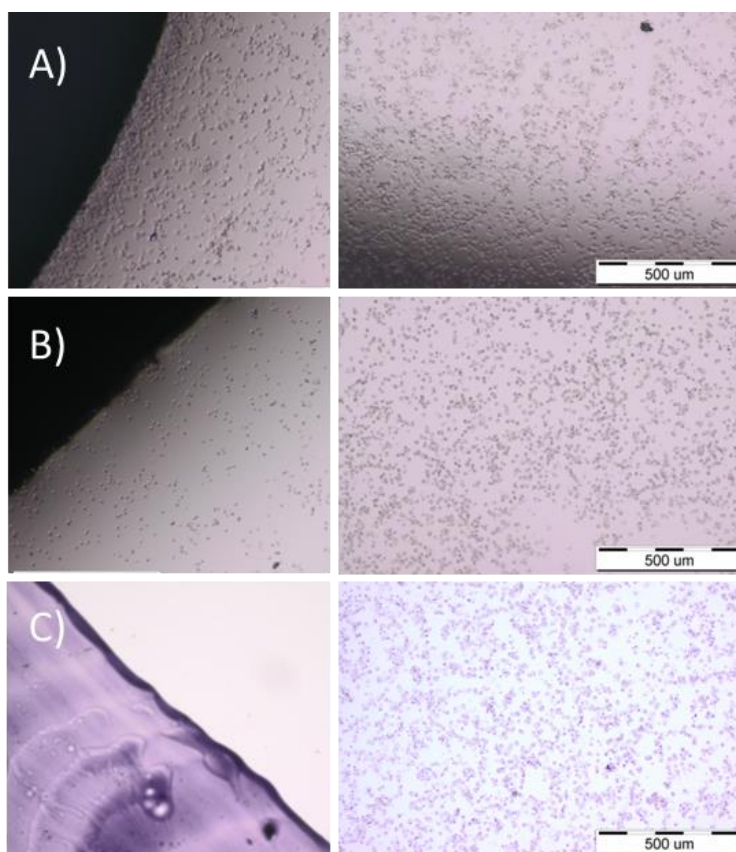
#### 4.1.4.2.2 Ag/alginatni diskovi - direktni kontakt test

Citotoksičnost VG Ag/alginatnih diskova ispitana je u direktnom kontakt testu na monosloju telećih hondrocita tokom 48 i 96 h. Citotoksičnost ispitivanih diskova procenjena je na osnovu veličine formirane inhibicione zone oko diskova i upoređena sa referentnim biokompatibilnim i referentnim toksičnim materijalom, kao i sa kontrolnom grupom u kojoj su netretirane ćelije. U kontrolnoj grupi ćelije su ravnomerno zauzele celu dostupnu površinu bunarića sa karakterističnom morfologijom ćelija hondrocita u monosloju, koja podseća na morfologiju fibroblasta (Glowacki i sar., 1983) (slika 4.11).



**Slika 4.11** Ćelije u monosloju iz kontrolne studije, bez tretmana (razmernik = 500  $\mu\text{m}$ )

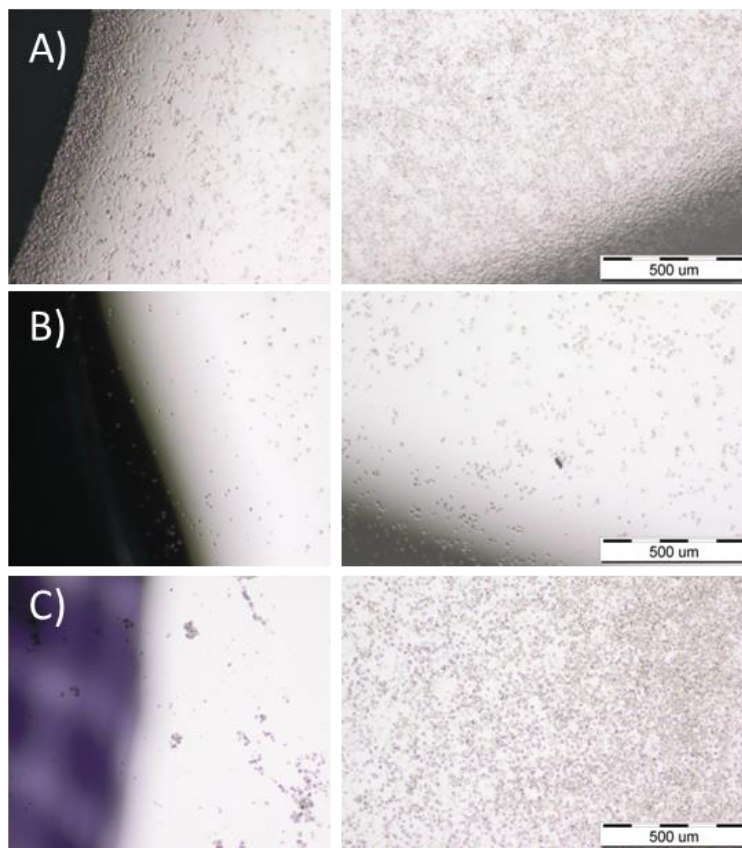
U grupi u kojoj je korišćen silikonski lepak kao biokompatibilni i/ili bioinertni materijal, ćelije su bile raspoređene na sličan način po celoj površini bunarića, ali i po površini i oko samog referentnog materijala. Pri tome je morfologija ćelija odgovarala morfologiji hondrocita i ćelija u kontrolnoj grupi. Izgled monosloja u obe ove grupe je bio sličan i nakon 48 i 96 h (slike 4.12a i 4.13a).



**Slika 4.12** Kontakt test u kulturi hondrocita u monosloju nakon 48 h: A) silikonski lepak kao biokompatibilni referentni materijal, B) bakarna pločica kao referentni toksični materijal, C) Ag/alginatni disk na bazi alginata male viskoznosti sa velikim sadržajem G jedinica (VG); levi panel: ivica materijala, desni panel: ivica bunarića (razmernik = 500  $\mu\text{m}$ )

U negativnoj kontrolnoj grupi gde su kao citotoksičan materijal korišćene bakarne pločice, ispoljena je značajna citotoksičnost nakon 48 h, u vidu inhibicione zone od oko 4-6 mm koju je pratila zona prilično zaobljenih i atipičnih ćelija. Kod negativne kontrole samo u uskoj zoni uz zidove bunarića mogle su se uočiti žive ćelije normalne morfologije (slika 4.12b). Citotoksičnost bakarnih pločica bila je još izraženija nakon 96 h, što je dovelo do formiranja zone inhibicije 10-12

mm, sa veoma malim brojem živih ćelija uz ivicu bunarica (slika 4.13b). Ag/alginatni diskovi izazvali su manje izražene citotoksične efekte nakon 48 h u poređenju sa negativnom kontrolom. Ćelije unutar bunarića su bile žive osim u neposrednoj blizini samih diskova u inhibicionoj zoni prečnika od 1 do 2 mm (slika 4.12c). Citotoksičnost Ag/alginatnih diskova praktično se nije menjala u narednih 48 h, tako da je nakon 96 h izmerena ista debljina inhibicione zone oko 1-2 mm (slika 4.13c).



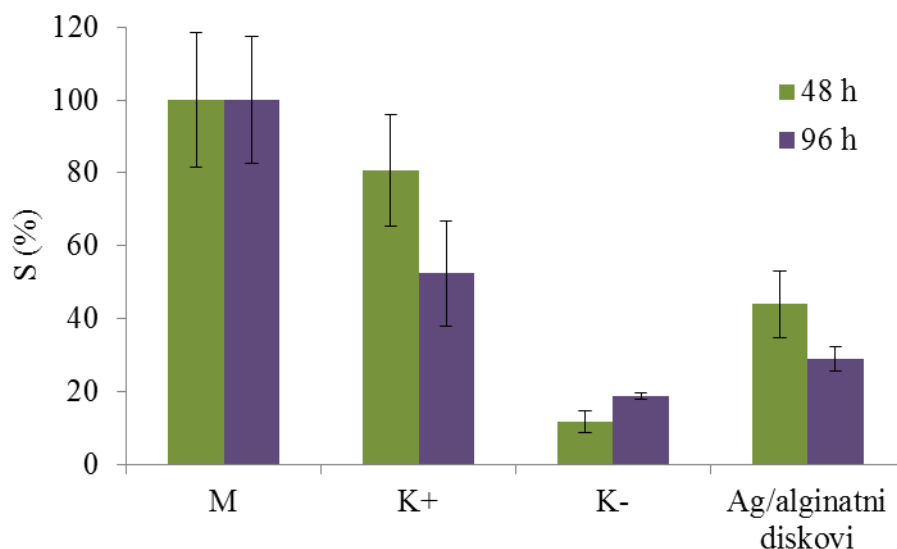
**Slika 4.13** Kontakt test u kulturi hondrocita u monosloju nakon 96 h: A) silikonski lepak kao biokompatibilni referentni materijal, B) bakarna pločica kao referentni toksični materijal, C) Ag/alginatni disk na bazi alginata male viskoznosti sa velikim sadržajem G jedinica (VG); levi panel: ivica materijala, desni panel: ivica bunarića (razmernik = 500 µm)

Da bi se objasnili dobijeni rezultati izmerene su koncentracije otpuštenog srebra u medijumu, pomoću AAS. Nakon 48 h izmerena koncentracija je iznosila  $10 \pm 1 \mu\text{M}$ , dok je posle 96 h ova koncentracija iznosila  $16 \pm 1 \mu\text{M}$ . U isto vreme, koncentracije  $\text{Cu}^{2+}$  u medijumu u kulturama sa bakarnim pločama su iznosile  $5,11 \pm 0,61 \text{ mM}$  i  $4,95 \pm 0,78 \text{ mM}$  nakon 48 i 96 h, redom. Blagi porast koncentracije srebra nije imao značajan uticaj na citotoksičnost, dok je u kulturama sa bakarnim pločama pri istoj oslobođenoj koncentraciji  $\text{Cu}^{2+}$ , došlo do smanjenja vijabilnosti ćelija. Dobijeni rezultati se mogu pripisati formiranju AgCl usled prisustva značajne količine  $\text{Cl}^-$  u medijumu (Stojkowska i sar., 2014, Kostić i sar., 2016) za koje je pokazano da ima manju toksičnost nego joni srebra ili nanočesticesrebra (Angel i sar., 2013).

#### 4.1.4.2.3 Ag/alginatni diskovi – indirektni ekstrakcioni test

Citotoksičnost VG Ag/alginatnih diskova ispitana je u indirektnom ekstrakcionom testu na monosloju telećih hondrocita u toku 48 i 96 h pri čemu je primenjena MTT metoda za procenu vijabilnosti ćelija. Kao i u prethodnom slučaju, rezultati ispitivanja Ag/alginatnih diskova su upoređen sa rezultatima ekstrakata bakarnih pločica, kao negativne kontrole, ekstrakata polipropilenskih pločica, kao pozitivne kontrole i kontrolnom grupom koja je sadržala samo

hranljivi medijum (slika 4.14). U pozitivnoj kontrolnoj grupi vijabilnost ćelija nakon 48 h je bila oko 80%, što spada u slabu citotoksičnost. Sa druge strane, u negativnoj kontrolnoj grupi primećena je jaka citotoksičnost sa stepenom preživljavanja od ~ 15%. U odnosu na kontrolne grupe, u grupi koja je tretirana ekstraktom Ag/alginatnih diskova, izmerena je umerena citotoksičnost i stepen preživljavanja od ~ 40%. Na osnovu rezultata dobijenih nakon 96 h tretmana, može se uočiti da toksičnost primenjenih ekstrakata raste sa porastom vremena kontakta sa ćelijama. Pa je tako, u pozitivnoj kontrolnoj grupi zapažena umerena citotoksičnost i preživljavanje ćelija od ~ 50%, što predstavlja smanjenje stepena preživljavanja ćelija za oko 60%. U negativnoj kontrolnoj grupi, gde su ćelije tretirane ekstraktom bakarnih pločica, primećena je jaka citotoksičnost sa stepenom preživljavanja od ~ 20%, što statistički nije značajna promena u odnosu na 48 h. Na kraju, u grupi gde su ćelije tretirane ekstraktom Ag/alginatnih diskova izmereno je preživljavanje ćelija od ~ 30%, što predstavlja smanjenje stepena preživljavanja za ~ 30%, ali i dalje predstavlja umerenu citotoksičnost.



**Slika 4.14** Preživljavanje (S%) ćelija hondrocita u grupi sa hranljivim medijumom (M) i u tretiranim grupama sa ekstraktom polipropilenskih pločica (pozitivna kontrola, K+), ekstraktom bakarnih pločica (negativna kontrola, K-) i ekstraktom Ag/alginatnih diskova na bazi alginata male viskoznosti sa velikim sadržajem G jedinica (VG) nakon 48 i 96 h

Dobijeni rezultati u ekstrakcionom testu za negativnu kontrolu su suprotni sa očekivanim jer bi polipropilen trebalo da bude potpuno biokompatibilan (*Labay i sar., 2015*). Stoga su izmerene pH vrednosti korišćenih ekstrakata i ustanovljeno je značajno povećanje u svim ispitivanim grupama u odnosu na netretiranu kontrolu gde je pH vrednost iznosila 7,4. Za pozitivnu kontrolu, negativnu kontrolu i za Ag/alginatne diskove ove vrednosti su iznosile 7,65; 7,85 i 7,70 redom. Stoga se može zaključiti da su rezultati citotoksičnosti posledica i povećane pH vrednosti u medijumu jer su hondrociti u artikulanoj hrskavici izloženi neutralnoj do blago kiseloj sredini (pH~6,9; *Gibson i sar., 2008*).

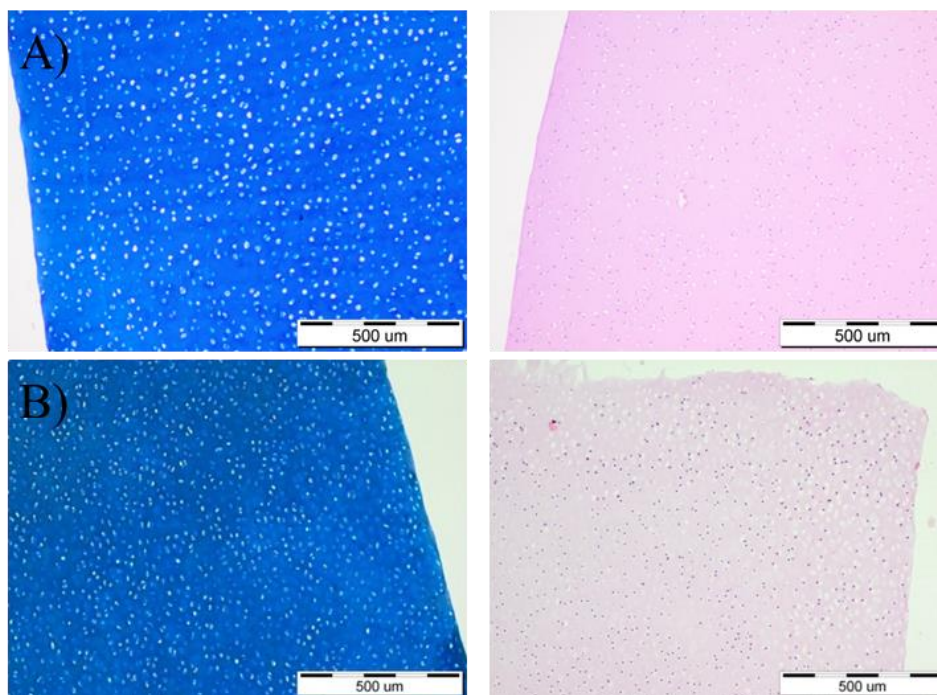
#### 4.1.4.3 Citotoksičnost u 3D sistemima u kulturi tkiva

##### 4.1.4.3.1 *Ag/alginatni koloidni rastvor*

Citotoksičnost *MG* Ag/alginatnog koloidnog rastvora ispitivana je u 3D kulturi eksplantata artikulane hrskavice u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom i protokom medijuma tokom 48 h. Koloidni rastvor u medijumu za ćelijsku kulturu sa ukupnom koncentracijom srebra od 0,5 mM, kontinualno je recirkulisao protokom od 0,12 ml/min. Istovremeno je postavljena kontrolna statička



studija sa hranljivim medijumom bez dodatka koloidnog rasvora. Nakon 48 h u uslovima dinamičke kompresije do 10% deformacije eksplantata u režimu 1 h rada/1 h pauze, histološka analiza nije pokazala postojanje razlika između eksplantata iz dinamičkog sistema u prisustvu nanočestica srebra i kontrolne statičke studije. U oba slučaja histološki preparati su pokazali ravnomernu raspodelu živih ćelija i GAG (slika 4.15). Da bi se proverila mogućnost migracije nanočestica srebra ili  $Ag^+$  unutar tkiva hrskavice usled difuzije i/ili prinudne konvekcije izazvane dinamičkom kompresijom, eksplantati hrskavice su digestirani i merena je koncentracija srebra pomoću ICP. Prisustvo srebra nije detektovano ni u jednom uzorku.

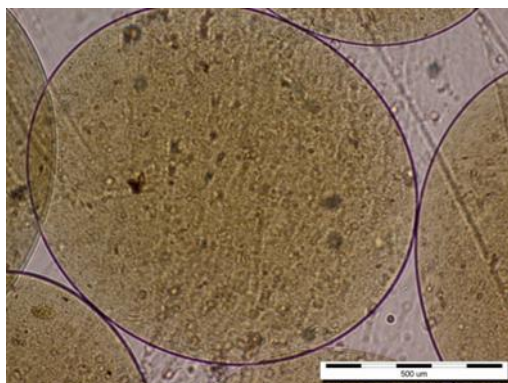


**Slika 4.15** Histološki preseki eksplantata tkiva artikularne hrskavice posle 48 h: A) statička kultura, B) bioreaktorska kultura sa protoka 0,5 mM koloidnog rastvora u medijumu. Levi paneli: „alcian blue“ bojenje; desni paneli: „H&E“ bojenje (razmernik = 500  $\mu$ m)

#### 4.1.4.3.2 Ag/alginatne mikročestice

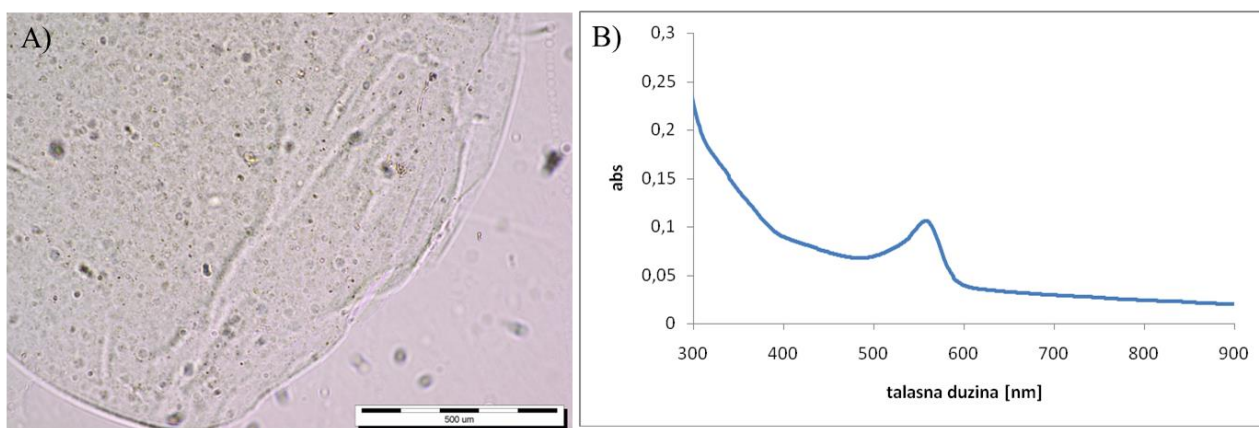
U posebnoj studiji ispitana je citotoksičnost Ag/alginatnih mikročestica dobijenih iz 1mM MG koloidnog rastvora u 3D kulturi eksplantata artikularne hrskavice u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom i protokom medijuma u periodu od 13 dana kako bi se odredili efekti u produženom vremenskom periodu.

Ag/alginatne mikročestice prečnika  $1,06 \pm 0,14$   $\mu$ m (slika 4.16) su proizvedene u sterilnim uslovima, postupkom koji je ranije opisan (Stojkowska i sar., 2012).



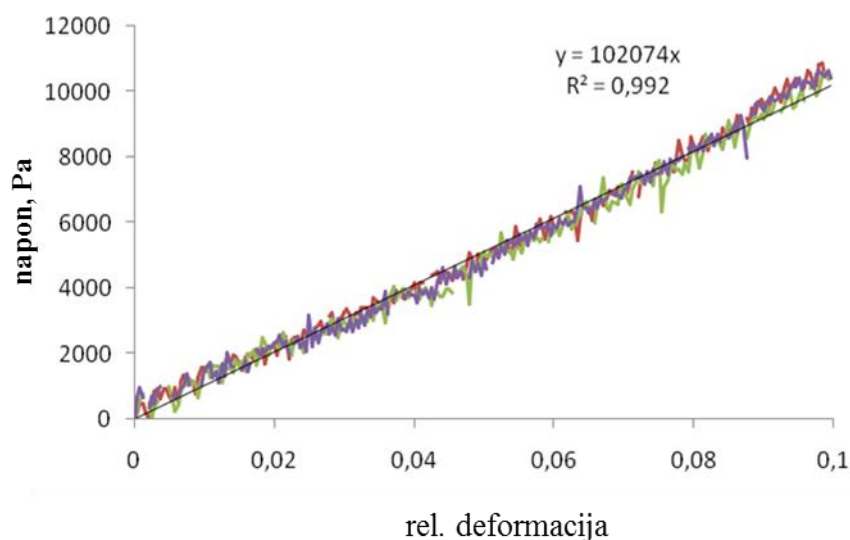
**Slika 4.16** Izgled sterilnih nanokompozitnih mikročestica korišćenih za ispitivanje citotoksičnosti u bioreaktorskim uslovima tokom 13 dana

Tri bioreaktorske komore su napunjene prvo mikročesticama na koje je postavljen po jedan eksplantat hrskavice, tako da su donja i laterelne površine eksplantata bile u direktnom dodiru sa mikročesticama. Posle 13 dana ispitivanja, mikročestice koje su bile direktno izložene dinamičkoj kompresiji u prisustvu  $\text{Na}^+$  iz hranljivog medijuma su nabubrele, deformisale se i uglavnom popucale, dok su mikročestice koje su bile neopterećene jer su se nalazile u zoni između zida komore i dijafragme ostale celovite i delimično nabubrele, ali bezbojne (slika 4.17a). Na kraju eksperimenta masa preostalih mikročestica je iznosila  $\sim 50\%$  početne vlažne mase, a prečnik je bio  $1,55 \pm 0,24$  mm. U ovom ispitivanju UV-vidljivom spektrofotometrijom nakon rastvaranja nije potvrđeno prisustvo nanočestica srebra (slika 4.17b).



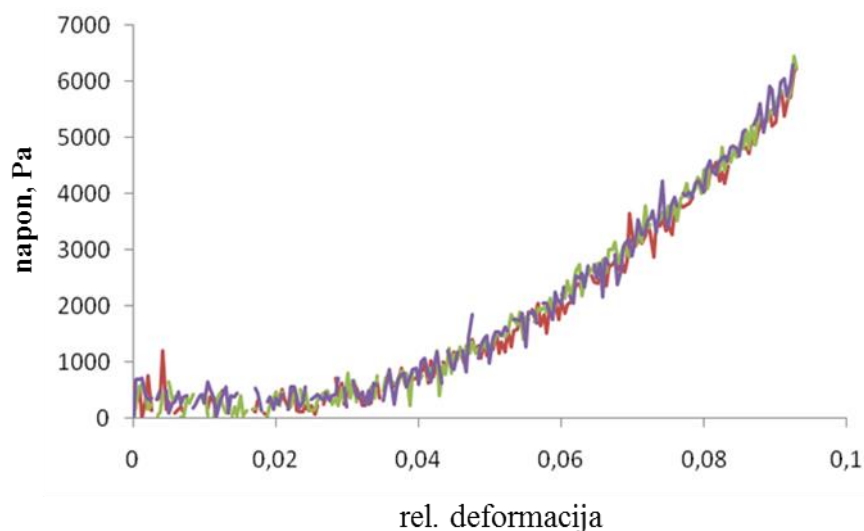
**Slika 4.17** Analiza Ag/alginatnih mikročestica nakon 13 dana eksperimenta; A) mikrografija dela mikročestice, razmernik = 500  $\mu\text{m}$ ; B) UV-vidljivi spektar rastvorenih Ag/alginatnih mikročestica (0,1 g mikročestica rastvorenih u 2,9 ml 10 mas.% Na-citrata; podaci predstavljaju srednju vrednost od tri merenja)

Dezintegraciju mikročestica su potvrdila i merenja odziva senzora opterećenja bioreaktora u toku eksperimenta. Na slici 4.18 prikazana je zavisnost napona od deformacije na početku eksperimenta gde se može uočiti linearan trend ( $R^2 > 0,99$ ) i mala odstupanja rezultata pri ponovljenim ciklusima kompresije.



**Slika 4.18** Zavisnosti napona od deformacije pri brzini kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$  za eksplantate artikularne hrskavice na sloju Ag/alginatnih mikročestica na početku eksperimenta; eksperimentalni podaci i linearna zavisnost dobijena metodom najmanjih kvadrata odstupanja za srednje vrednosti merenja

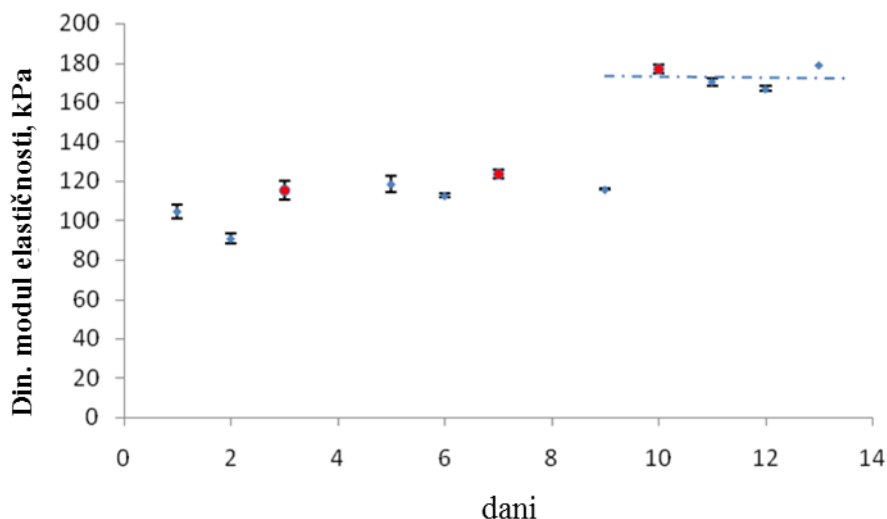
Iz nagiba prave dobijene metodom najmanjih kvadrata odstupanja određen je dinamički modul elastičnosti koji je iznosio  $102,1 \pm 1,7$  kPa. Međutim, tokom prva dva dana ispitivanja došlo je do odsupanja od linearnosti usled sleganja pakovanog sloja Ag/alginatnih mikročestica (slika 4.19), pa je vrednost dinamičkog modula kompresije određena na osnovu dela gde je zadržana linearna zavisnost.



**Slika 4.19** Zavisnosti napona od deformacije pri brzini kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$  za eksplantate artikularne hrskavice na sloju Ag/alginatnih mikročestica drugog dana eksperimenta; eksperimentalni podaci

Do sleganja pakovanog sloja Ag/alginatnih mikročestica, a time i do odstupanja od linearnosti napona od deformacije došlo je ponovo 6. i 9. dana eksperimenta. Kako bi se obezbedila ravnomerna kompresija pakovanog sloja i eksplantata, 3-ćeg, 7-og i 10-og dana eksperimenta spuštani su klipovi tako da dijafragme komora ponovo dodiruju eksplantate, čime je obezbeđena ravnomerna kompresija.

Vrednosti dinamičkog modula elastičnosti u zavisnosti od vremena su prikazani na slici 4.20. Može se uočiti blagi porast vrednosti dinamičkog modula kompresije sa vremenom koji ukazuje na pucanje Ag/alginatnih mikročestica i porast doprinosa mehaničkih karakteristika eksplantata artikularne hrskavice.

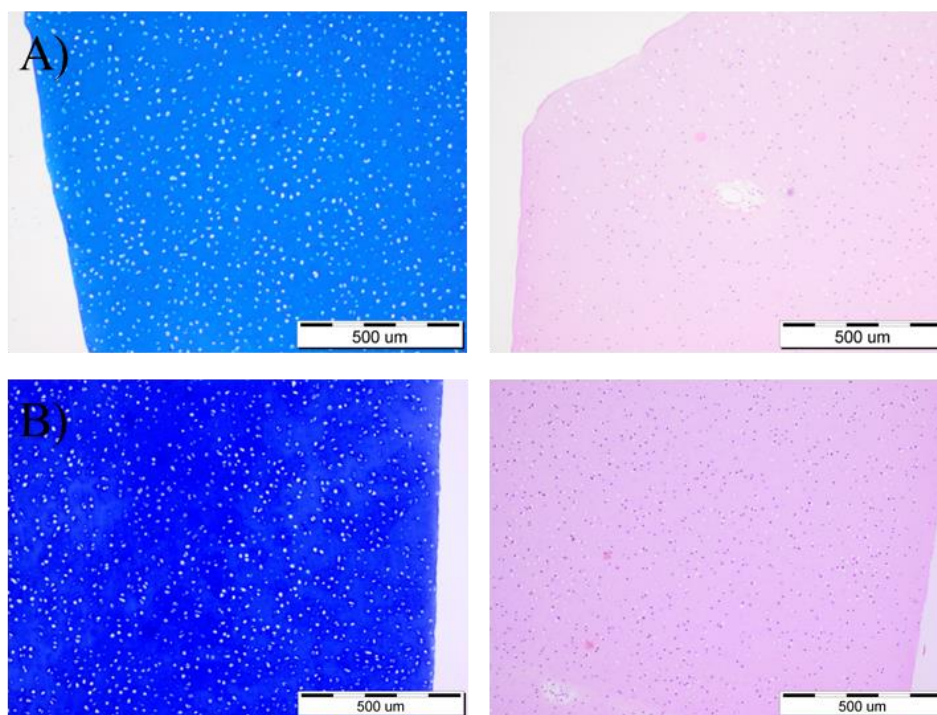


**Slika 4.20** Vrednosti dinamičkog modula elastičnosti tokom vremena; crvenim tačkama su predstavljene vrednosti modula kompresije za dane kada su spuštani klipovi

Vrednosti dinamičkog modula kompresije (slika 4.20) ukazuju da je tokom prva dva dana došlo do značajnog slabljenja mehaničkih karakteristika pakovanog sloja mikročestica (~ 10%) i da je već tada došlo do delimične dezintegracije mikročestica, dok je potpuna dezintegracija i praktično gubljenje sloja mikročestica nastalo 9. dana ispitivanja.

Stoga se može pretpostaviti da je u toku eksperimenta došlo do skoro potpunog otpuštanja srebra iz mikročestica, dok histološki preparati eksplantata pokazuju ravnomernu raspodelu živih ćelija i GAG (slika 4.21) koja se ne razlikuje od prirodne hrskavice.



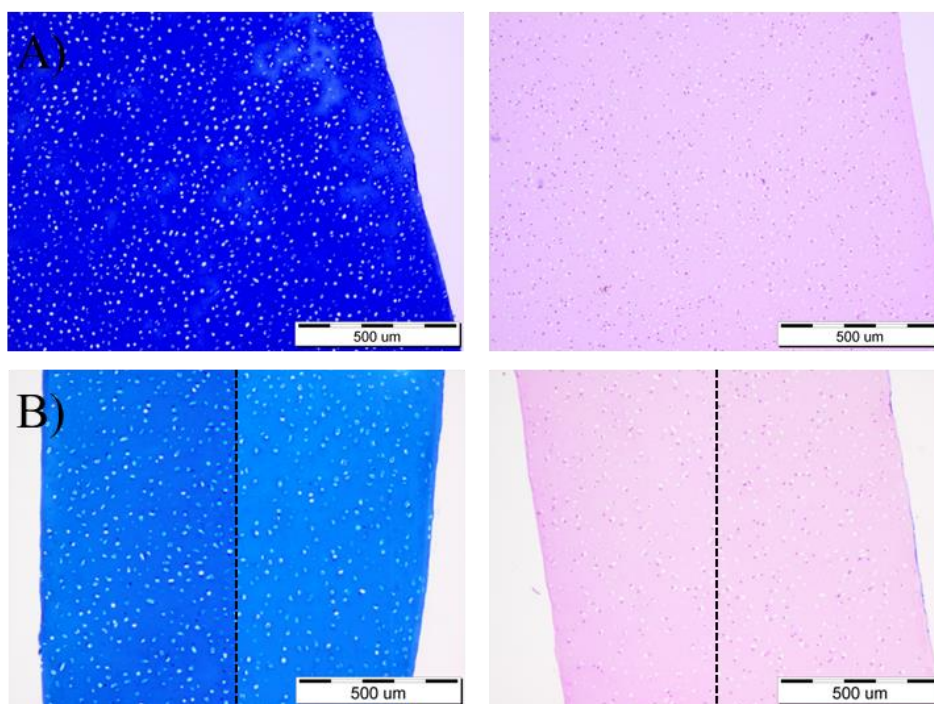


**Slika 4.21** Histološki preseki eksplantata tkiva artikularne hrskavice: A) prirodno tkivo, B) bioreaktorska kultura nakon 13 dana u kontaktu sa Ag/alginatnim mikročesticama. Levi paneli: „alcian blue“ bojenje; desni paneli: „H&E“ bojenje (razmernik = 500 µm)

#### 4.1.4.3.3 Ag/alginatni diskovi

Citotoksičnost VG Ag/alginatnih diskova je ispitana u kulturi tkiva artikularne hrskavice u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom i protokom medijuma tokom 4 dana. Pri tome su Ag/alginatni diskovi postavljeni direktno preko eksplantata hrskavice i podvrgnuti dinamičkoj kompresiji pri brzini kompresije od 337,5 µm/s, pri frekvenciji od 0,84 Hz do 10% deformacije u režimu 1 h rada/1 h pauze, dok je protok medijuma iznosio 0,12 ml/min.

U ovom sistemu posebna pažnja je posvećena razlikovanju gornje i donje strane eksplantata u bioreaktoru kako bi se otkrili potencijalni efekti direktnog kontakta sa Ag/alginatnim diskovima. Histološka analiza je pokazala da nema razlike između ovih površina i da su eksplantati sadržali uniforman ECM sa uniformno raspoređenim živim ćelijama, koji se nije razlikovao od kontrolne statičke studije (slika 4.22).



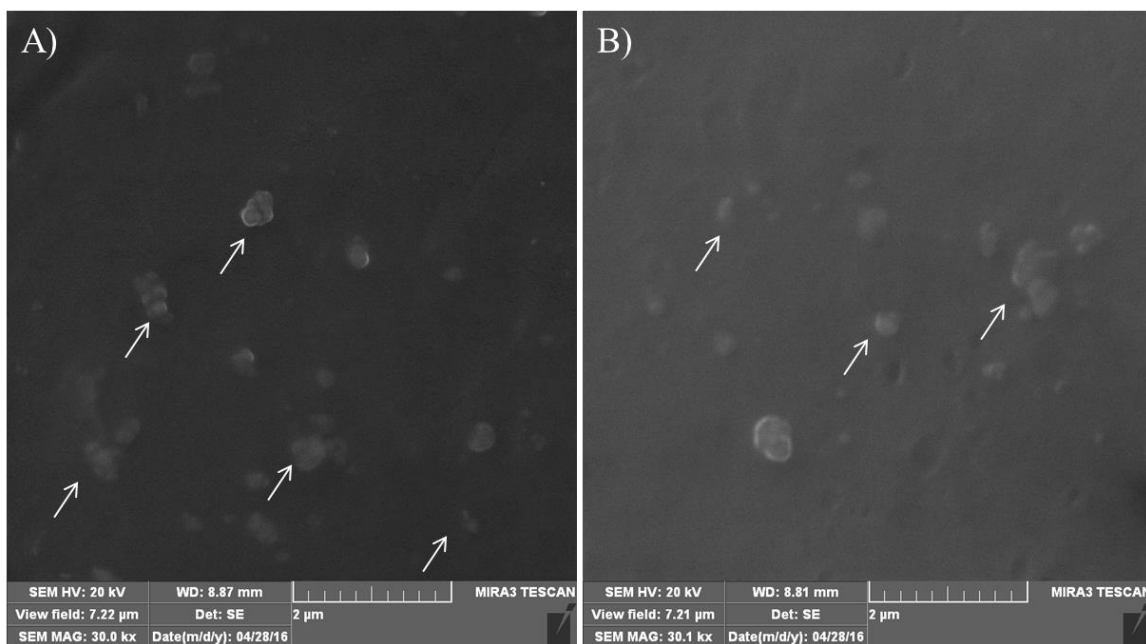
**Slika 4.22** Histološki preseki eksplantata tkiva artikularne hrskavice nakon 4 dana: A) statička kultura, B) bioreaktorska kultura u kontaktu sa Ag/alginatnim diskovima (levi deo predstavlja površinu eksplantata u direktnom kontaktu sa diskom, desni deo predstavlja donju stranu eksplantata). Levi paneli: „alcian blue“ bojenje; desni paneli: „H&E“ bojenje (razmernik = 500 μm)

#### **4.1.5 Otpuštanje nanočestica srebra iz Ag/alginatnih diskova u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom**

Otpuštanje nanočestica i/ili srebra iz Ag/alginatnih diskova u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom ispitano je u uslovima dinamičke kompresije pri brzini kompresije od 337,5 μm/s, frekvenciji od 0,84 Hz do 10% deformacije u režimu 1 h rada/1 h pauze i pri protoku medijuma od 0,12 ml/min, što odgovara uslovima ispitivanja citotoksičnosti Ag/alginatnih diskova u 3D sistemu. Ag/alginatni diskovi bili su postavljeni preko alginatnih diskova unutar komora bioreaktora. Urađene su dve odvojene studije u trajanju 4 i 7 dana koje su imale za cilja da se odredi da li nanočestice srebra difunduju u okolinu u nano obliku i kinetika otpuštanja, redom.

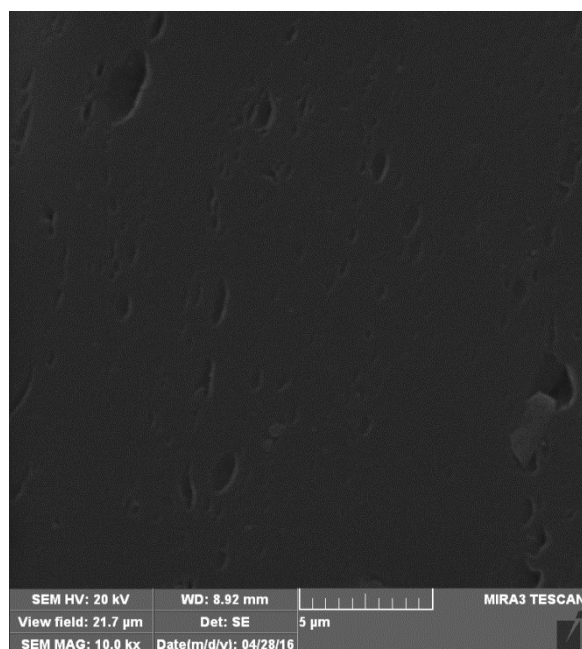
##### **4.1.5.1 Migracija nanočestica srebra iz Ag/alginatnih diskova u hidrogel u direktnom kontaktu**

Primenom SEM metode nakon 4 dana dinamičke kompresije u biomimičnom bioreaktoru, u kome su eksplantati hrskavice bili imitirani alginatnim diskovima, ispitano je da li dolazi do difuzije nanočestica srebra iz Ag/alginatnog u alginatni disk (slika 4.23).



**Slika 4.23** SEM mikrografije preseka diskova nakon 4 dana eksperimenta: A) Ag/alginatni disk; B) alginatni disk u kontaktu sa Ag/alginatnim diskom; razmernik = 2  $\mu\text{m}$ , strelicama su označeni aglomerati nanočestica srebra

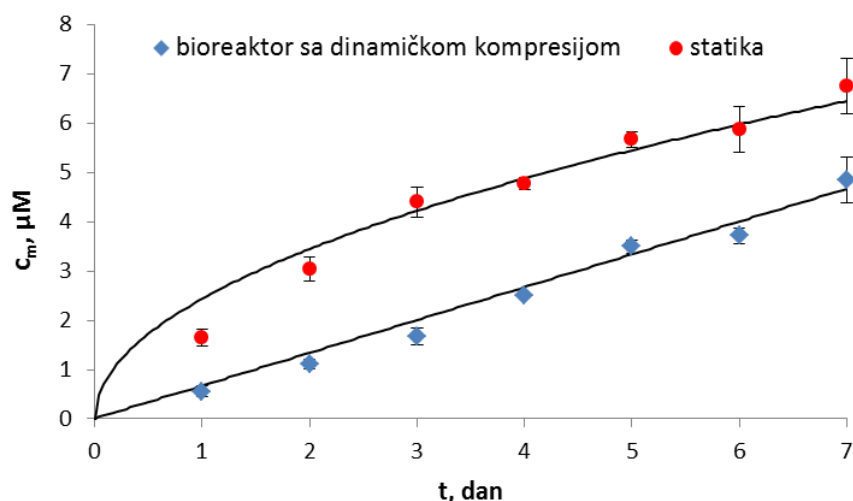
Prisustvo nanočestica srebra u Ag/alginatnom disku potvrđeno je SEM analizom koja pokazuje da je došlo do aglomeracije nanočestica srebra unutar hidrogela, verovatno kao posledica dinamičke kompresije u bioreaktoru (slika 4.23). Takođe je pokazano da dolazi do difuzije/migracije nanočestica/aglomerata srebra iz Ag/alginatnih diskova u alginatne diskove u direktnom kontaktu i da se oni zadržavaju blizu kontaktne površine (slika 4.23b), a da nisu prisutni na suprotnoj strani alginatnog diska (slika 4.24).



**Slika 4.24** SEM mikrografija ivice alginatnog diska koja nije bila u kontaktu sa Ag/alginatnim diskom posle 4 dana eksperimenta; razmernik = 5  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.5.2 Kinetika otpuštanja srebra

Otpuštanje nanočestica srebra iz Ag/alginatnih diskova ispitano je tokom 7 dana u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom i u paralelnoj statičkoj studiji pri slobodnom bubrenju. PVA/PVP diskovi su korišćeni kao zamena za eksplantate artikularne hrskavice. Na kraju eksperimenta je u PVA/PVP diskovima pomoću AAS određena koncentracija od  $0,033 \pm 0,020$  mM srebra, što odgovara količini od  $2,7 \pm 0,9$  nmol nanočestica/jona srebra po disku. Izmerene koncentracije oslobođenog srebra u medijumu u statičkim i u uslovima dinamičke kompresije na kraju eksperimenta (slika 4.25) su iznosile  $6,75 \pm 0,56$  i  $4,86 \pm 0,47$   $\mu$ M, redom, što odgovara 12,3% i 9,4% inicijalne količine srebra u Ag/alginatnim diskovima.

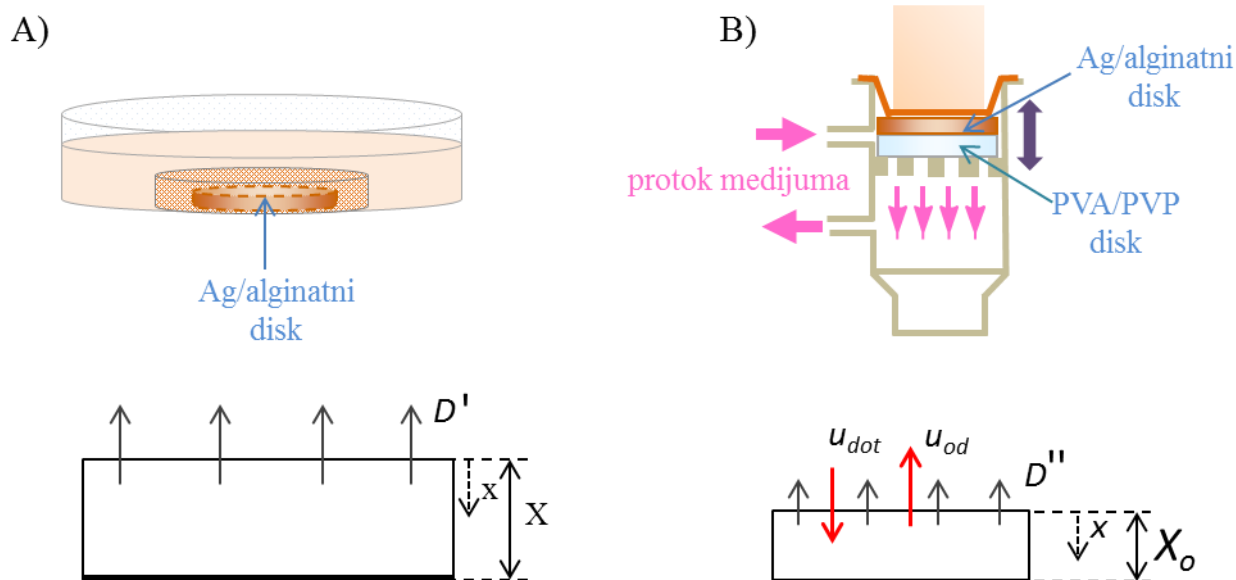


**Slika 4.25** Koncentracija srebra u medijumu tokom 7 dana u statičkim i uslovima dinamičke kompresije u bioreaktoru: eksperimentalni podaci (simboli) i rezultati modelovanja (linije) (podaci predstavljaju prosek  $n = 3$ )

Dobijeni rezultati ukazuju da je pri otpuštanju u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom oslobođena manja količina srebra u odnosu na statičke uslove, što je potvrđeno i zaostalom sadržajem srebra u diskovima nakon eksperimenta ( $515 \pm 105$  nmol u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom vs.  $343 \pm 32$  nmol u statičkoj studiji).

Veće oslobađanje srebra u statičkim uslovima nastalo je usled slobodnog bubrenja diskova, što je omogućilo lakšu jonsku razmenu u alginatu i generalno slabljenje mreže polimera. Tokom 7 dana u statičkim uslovima, težina diskova i zapremina su se povećavali  $\sim 3$  puta. Na početku eksperimenta masa diskova je iznosila  $310 \pm 20$  mg, a dimenzije: prečnik 12 mm i debljina 2 mm. Nakon 7 dana masa diskova je iznosila  $950 \pm 30$  mg, a dimenzije: prečnik 17 mm i debljine 4 mm. Za razliku od slobodnog bubrenja u statičkim uslovima, diskovi u bioreaktoru bili su okruženi zidovima komore, dijafragmom i PVA/PVP diskom koji se nalazio ispod, tako da se veličina diska praktično nije menjala značajno, dok je došlo do umerenog povećanja mase (sa  $300 \pm 10$  mg na  $500 \pm 70$  mg).

Na eksperimentalne podatke za otpuštanje srebra iz Ag/alginatnih diskova u oba slučaja primenjen je matematički model koji uključuje različite procese u dva sistema, što je prikazano na slici 4.26.



**Slika 4.26** Šematski prikaz otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih diskova: eksperimentalna postavka i geometrija neophodna za matematičko modelovanje: A) statički uslovi – povećanje diskova od početne debljine 2 mm do debljine  $X=4$  mm; jednodimenzionalna difuzija nano nanočestica/jona srebra sa prividnim koeficijentom difuzije  $D'$ ; B) bioreaktor sa dinamičkom kompresijom – zanemarljivo bubrenje; jednodimenzionalna difuzija nanočestica/jona srebra sa prividnim koeficijentom difuzije  $D''$  uz intersticijalni protok fluida sa neto brzinom  $u$  kao rezultat dotoka tečnosti ( $u_{dot}$ ) tokom kompresije i odtoka ( $u_{ot}$ ) tokom relaksacije

U statičkim uslovima otpuštanje srebra se odvija difuzijom, pa je u ovom slučaju kinetički model predstavljen jednodimenzionalnom unutrašnjom difuzijom (Lavoine i sar., 2016):

$$\frac{\partial c_n}{\partial t} = D' \left( \frac{\partial^2 c_n}{\partial x^2} \right) \quad (1)$$

gde su:  $x$  aksijalna koordinata,  $c_n$  koncentracija srebra u Ag/alginatnim diskovima,  $D'$  prividni koeficijent difuzije nanočestica ili jona srebra iz alginatnog hidrogela.

Kako je proces bubrenja Ag/alginatnih diskova najznačajniji u prvih 24 h, za dimenzije diska uzete su vrednosti u nabubrelom stanju (17 mm u prečniku i 4 mm debljine) i usvojena je pretpostavka da se dimenzija diskova ne menja tokom vremena. Otpuštena koncentracija srebra u medijumu tokom vremena  $c_m$  izračunata je kao razlika između početnog sadržaja srebra u diskovima i sadržaja srebra u diskovima u svakom vremenskom trenutku  $\langle c_n \rangle$ , (Kostic i sar., 2017):

$$c_m = \frac{(c_o - \langle c_n \rangle)V}{V_m} \quad (2)$$

gde je  $V$  zapremina diska, a  $V_m$  je zapremina medijuma u sistemu.

Srednja koncentracija srebra koja ostaje u diskovima u svakom vremenskom trenutku može se izračunati pomoću jednačine (Kostic i sar., 2017):

$$\langle c_n \rangle = \frac{1}{X} \int_0^X c_n(x) dx \quad (3)$$

gde je  $X$  debljina diska.

Za početne uslove pretpostavljeno je da su nanočestice srebra ravnomerno raspoređene unutar diskova te je početna koncentracija srebra  $c_0$ . Na početku u medijumu nema srebra, te je  $c_m$  jednaka 0. Tokom eksperimenta otpušteno je svega oko  $\sim 10\%$  početne količine srebra, te se može pretpostaviti da je koncentracija srebra u medijumu zanemarljivo mala tokom eksperimenta. Na osnovu te pretpostavke postavljen je prvi granični uslov na gornjoj granici diska za  $x = 0$ , gde je postavljeno da je  $c_n=0$ . Na izlazu iz diska postavljen je Nojmanov (*Neumann*) granični uslov:

$$\frac{\partial c_n}{\partial x} = 0 \text{ za } x = X \quad (4)$$

Jednačine (1-4) rešene su numerički u MatLab programu, primenom metode konačnih razlika. Prividni koeficijent difuzije,  $D'$  određen je na osnovu metode najmanjih kvadratnih odstupanja od eksperimentalnih podataka. Slika 4.25 pokazuje zadovoljavajuće slaganje predviđanja modela i eksperimentalnih podataka (RSD = 17%). Prividan koeficijent difuzije određen za nanočestice i/ili jone srebra izračunat na osnovu gore predstavljenog modela za Ag/alginatne diskove u statičkim uslovima iznosio je  $1,2 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ .

U uslovima dinamičke kompresije u bioreaktoru, ponovljeni ciklusi kompresije doveli su do deformacije i relaksacije polimerne mreže, što je uslovalo protok fluida unutar diskova i nazad, kao što je šematski prikazano na slici 4.26b. Stoga se, otpuštanje nanočestica i/ili jona srebra u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom osim difuzijom, odvija i konvektivnim prenosom koji je izazvan neto protokom medijuma. U literaturi je već navedeno da u uslovima dinamičke kompresije transport rastvorenih supstanci u hidrogelima i npr. tkivu hrskavice se odigrava po konvektivno – difuzionom mehanizmu (*Bonassar i sar., 2001, Evans i Quinn, 2006, Albro i sar., 2008, Chahine i sar., 2009*).

Jednodimenzionalni model otpuštanja nanočestica i/ili jona srebra iz Ag/alginatnih diskova za uslove u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom predstavljen je stoga jednačinom (*Kostic i sar., 2017*):

$$\frac{\partial c_n}{\partial t} = D'' \left( \frac{\partial^2 c_n}{\partial x^2} \right) - u \frac{\partial c_n}{\partial x} \quad (5)$$

gde su:  $x$  aksijalna koordinata,  $u$  je neto brzina tečnosti kroz disk, a  $D''$  prividni koeficijent difuzije nanočestica i/ili jona srebra iz zanemarljivo nabubrelih Ag/alginatnih diskova.

Jednačine (2-5) rešene su numerički u MatLab programu, pri čemu su dva parametra modela, prividni koeficijent difuzije i neto brzina fluida kroz diskove, bili određeni metodom najmanjih kvadratnih odstupanja od eksperimentalnih podataka. Na osnovu modela koji je pokazao zadovoljavajuće slaganje sa eksperimentalnim podacima (RSD = 18%, slika 25), određeno je da prividni koeficijent difuzije iznosio je  $1,4 \times 10^{-17} \text{ m}^2/\text{s}$ , a neto brzina fluida  $3,9 \times 10^{-10} \text{ m/s}$ .

## 4.2 HIDROGELOVI GELANSKE GUME SA NANOČESTICAMA BIOAKTIVNOG STAKLA

U ovom radu dobijene su i okarakterisane tri serije hidrogelova na bazi gelanske gume sa nanočesticama bioaktivnog stakla za potencijalnu primenu u inženjerstvu tkiva kosti.

Prva serija hidrogelova sa unutrašnjim porama (u daljem tekstu *hidrogelovi sa unutrašnjim porama*) dobijena je u Laboratoriji za keramičke materijale Instituta „Jožef Stefan“ u Ljubljani, i u okviru ove serije ispitane su dve grupe hidrogelova: i) grupa kod koje je dispergovanje nanočestica



BAG postignuto mešanjem na magnetnoj mešalici i ii) grupa kod koje je dispergovanje nanočestica BAG postignuto primenom ultrazvučnom (UZ) sonde.

Druga serija hidrogelova (u daljem tekstu *makroporozni hidrogelovi*) dobijena je modifikacijom postupka dobijanja GG-BAG hidrogelova, koja je razvijena u okviru ove disertacije tako da su dobijeni makroporozni hidrogelovi sa otvorenim i interkonektovanim porama.

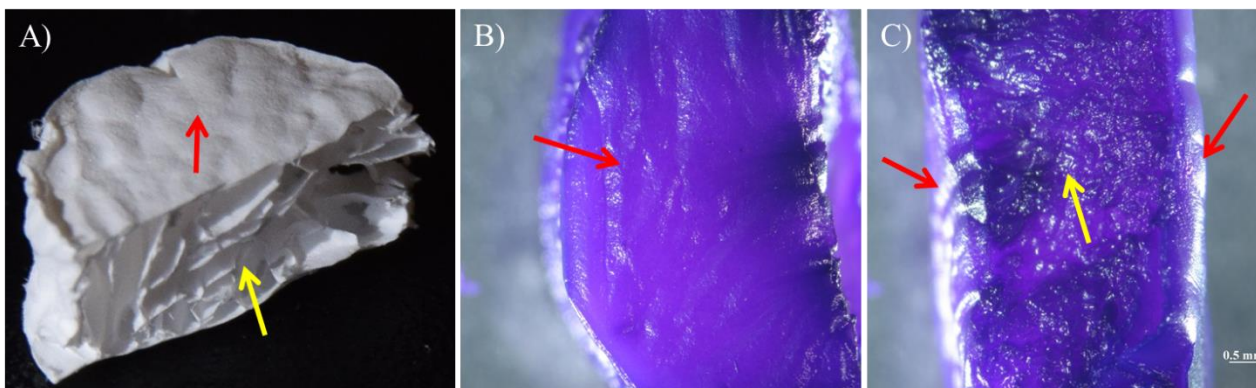
Radi lakšeg praćenja u tabeli 4.2 su sumirani načini dobijanja različitih hidrogelova obuhvaćeni istraživanjima u okviru ove doktorske disertacije.

**Tabela 4.2** Sumaran prikaz serija uzoraka i načina njihove pripreme

<i>Seriya</i>	<i>Način dispergovanja BAG</i>	<i>Način dobijanja hidrogelova</i>	<i>Opis uzorka</i>
<b>A</b>	primenom magnetne mešalice	izlivanje, zamrzavanje i liofilizacija pojedinačnih uzoraka	hidrogelovi sa unutrašnjim porama
<b>B</b>	primenom UZ sonde (750W, 16 kHz, 5 min)	izlivanje, zamrzavanje i liofilizacija pojedinačnih uzoraka	hidrogelovi sa unutrašnjim porama
<b>C</b>	primenom UZ sonde (750W, 16 kHz, 5 min)	izlivanje, zamrzavanje i liofilizacija cilindra kompozita, rehidratacija i sečenje na pojedinačne uzorke	makroporozni hidrogelovi sa otvorenim porama

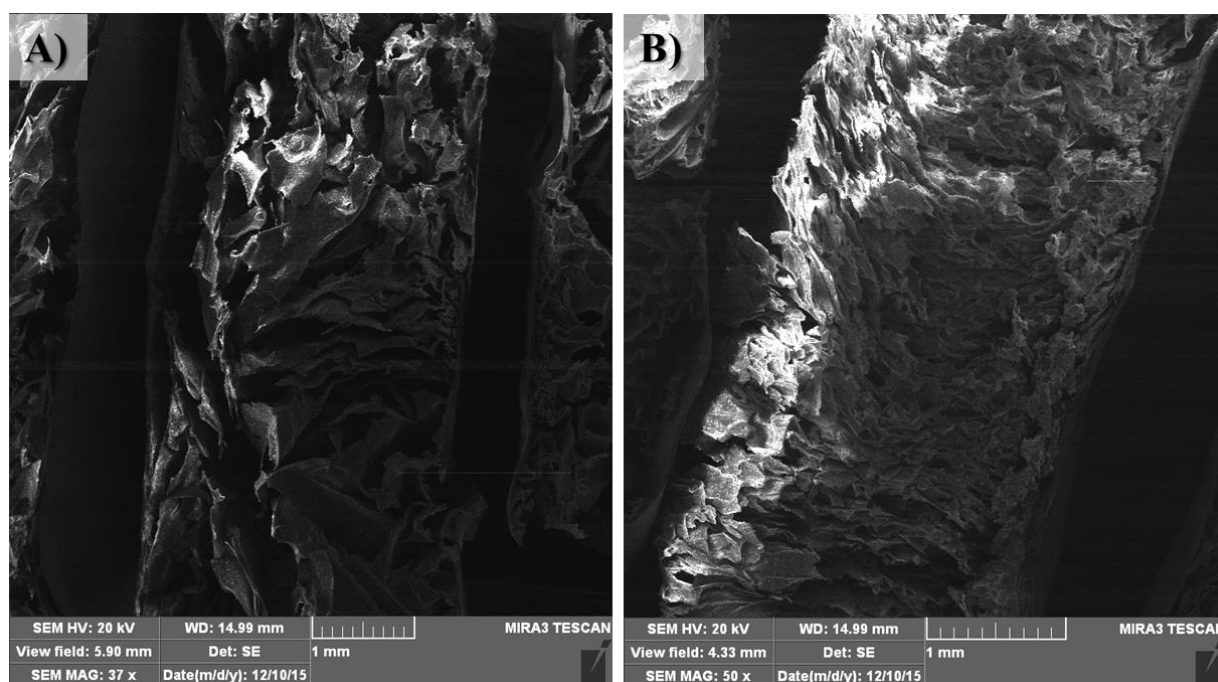
#### 4.2.1 Hidrogelovi gelanske gume i boaktivnog stakla sa unutrašnjim porama

Prva serija hidrogelova je dobijena izlivanjem smeše GG-BAG u posude za ćelijsku kulturu sa 24 mesta nakon čega su dobijeni diskovi zamrznuti, liofilizovani i rehidratirani. Ove hidrogelove je karakterisala slaba do zatvorena poroznost na spoljašnjim površinama usled formiranja gušće mreže polimera tokom geliranja (slika 4.27a). Nakon rehidratacije i bubrenja polimernih lanaca, hidrogelovi su dodatno obojeni rastvorom mastila, kako bi se posmatrala poroznost rehidratiranih hidrogelova, relevantna za dalja ispitivanja. Aksijalne i lateralne površine hidrogelova posmatrane pod stereo mikroskopom izgledale su glatko, bez vidljivih pora, što se uočava na slikama 4.27b i 4.27c, dok je unutrašnji deo hidrogelova, okružen ovim neporoznim površinama, zadržao makroporoznu strukturu (slika 4.27c). U makroporama unutar rehidratiranih hidrogelova primećeno je da dolazi do zadržavanja mehurova gasa, koji nisu mogli biti oslobođeni ni nakon postupaka rehidratacije pod vakuum uslovima i mehaničkim pritiskanjem uzoraka. Ovo zapažanje potvrdilo je zaključak da su spoljašnje površine hidrogelova slabo, do potpuno neporozne.



**Slika 4.27** Fotografije hidrogelova gelanske gume i bioaktivnog stakla sa unutrašnjim porama - serija A: A) poprečni presek suvog uzorka, B) aksijalna površina nakon bojenja plavim mastilom, C) poprečni presek nakon bojenja plavim mastilom (crvene strelice označavaju neporoznu aksijalnu površinu hidrogelova, žute strelice označavaju poroznu unutrašnjost hidrogelova); (razmernik=0,5 mm)

Primena ultrazvučne sonde za disperziju čestica BAG u vodenom rastvoru pre dodatka u rastvor GG dovela je do formiranja manjih pora unutar strukture hidrogelova u poređenju sa hidrogelovima dobijenim samo umešavanjem (slika 4.28), ali bez uticaja na poroznost spoljašnjih površina. Razlog je verovatno porast količine slobodnih  $Ca^{2+}$  koji učestvuju u procesu umrežavanja, a koji su oslobođeni iz BAG tokom procesa disperzije ultrazvučnom sondom.

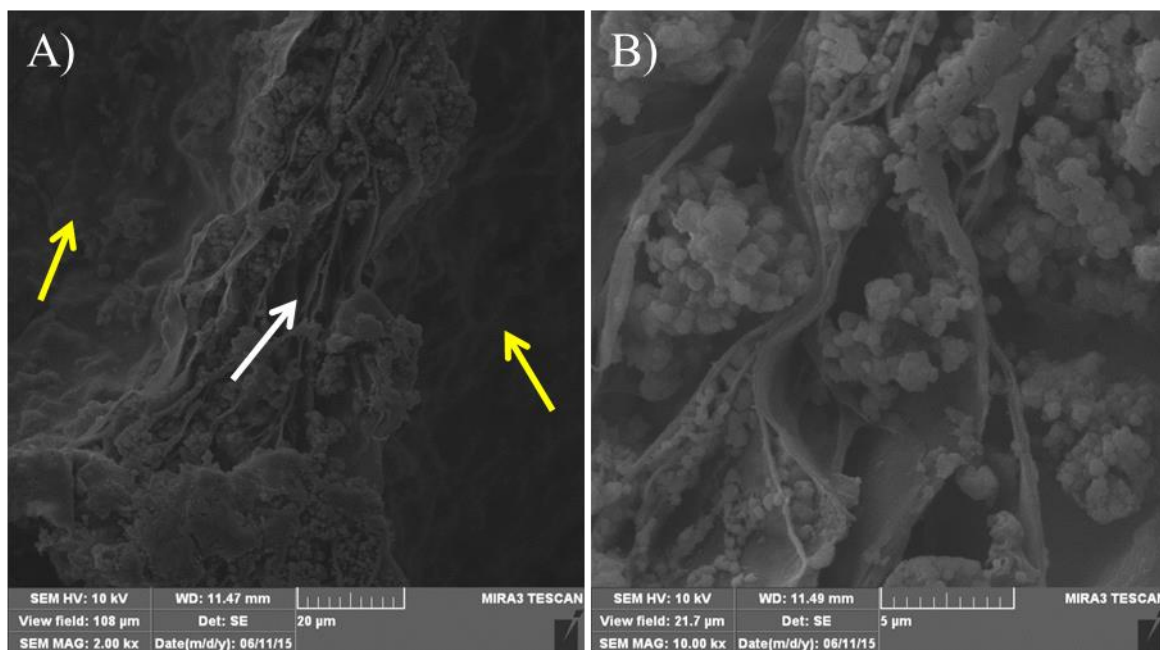


**Slika 4.28** SEM mikrografije poprečnih preseka hidrogelova sa unutrašnjim porama kod kojih je dispergovanje bioaktivnog stakla u vodenom rastvoru podstignuto: A) jednostavnim umešavanjem na magnetnoj mešalici, serija A; B) primenom ultrazvučne sonde, serija B (razmernik = 1 mm)

Na mikroskopskom nivou, ravnomerna distribucija aglomerata nanočestičnog BAG primećena je kod uzoraka iz grupe hidrogelova dobijenih jednostavnim umešavanjem BAG. Kod ovih uzoraka jasno se izdvajaju mostovi polimera i neorganske faze (slika 4.29a, bele strelice) koji razdvajaju susedne pore (slika 4.29a, žute strelice). Između lamelarnih struktura polimernih lanaca,



uočavaju se nepravilne globularne strukture aglomerata BAG koje povezuju susedne lamele (slika 4.29b).



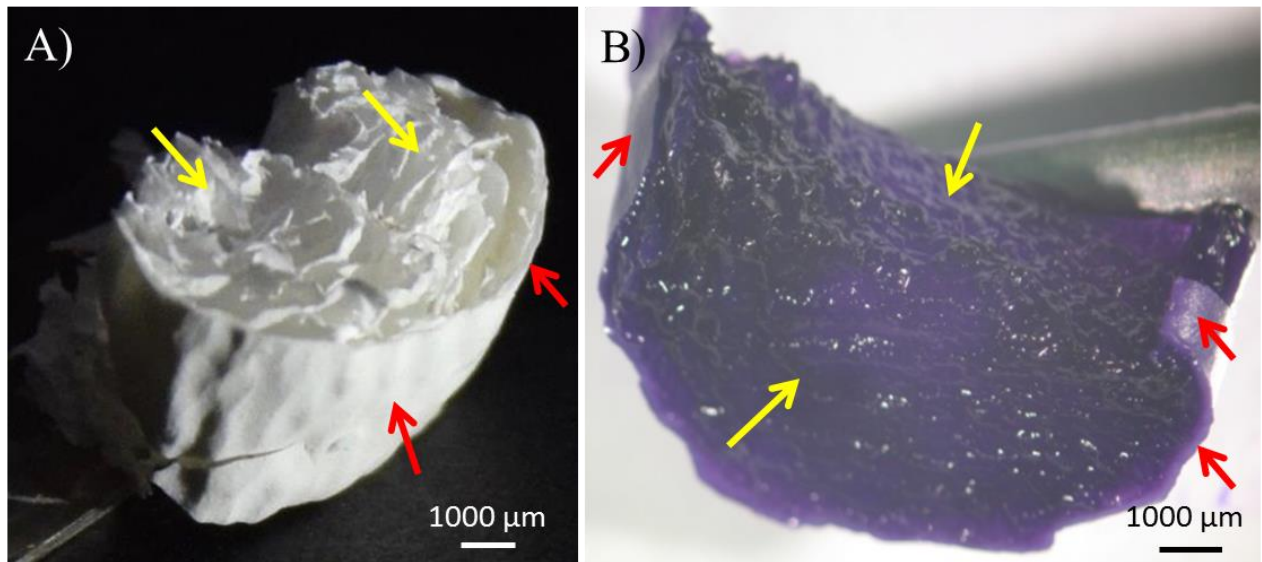
**Slika 4.29** SEM mikrografije poprečnih preseka reprezentativnih hidrogelova sa unutrašnjim porama dobijenih jednostavnim umešavanjem bioaktivnog stakla– serija A; A) razmernik = 20 μm, B) razmernik = 5 μm; (bele strelice ukazuju na deo koji predstavlja polimer i bioaktivno staklo, žute strelice ukazuju na postojanje pora)

Slična ravnomerna distribucija aglomerata nanočestičnog BAG primećena je takođe kod uzoraka koji su dobijeni primenom ultrazvučne sonde.

#### 4.2.2 Makroporozni hidrogelovi gelanske gume i bioaktivnog stakla

Makroporozni hidrogelovi GG-BAG su dobijeni modifikovanom procedurom tako što je rastvor GG-BAG geliran u epruvetama, zatim zamrznut, liofilizovan i rehidratisan, a zatim isečen na diskove. Ovi uzorci su u poređenju sa prvom serijom hidrogelova se razlikovali u pogledu makromorfologije.

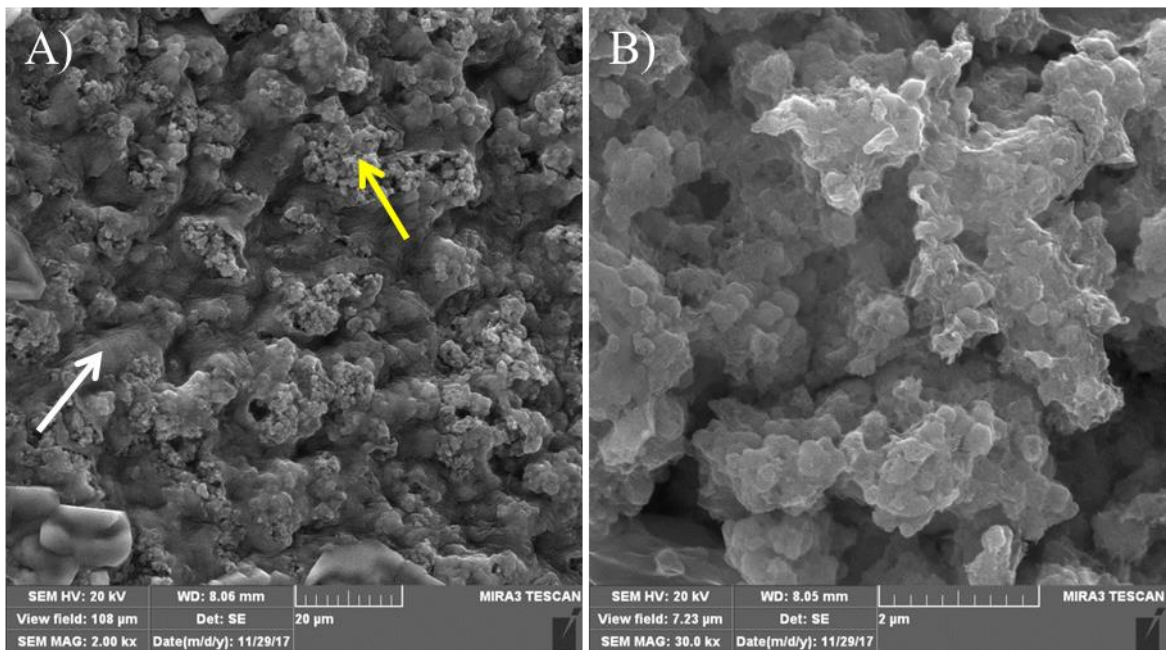
U ovom slučaju formirale su se interkonektovane i otvorene makroskopske pore duž obe aksijalne površine (slika 4.30a). Lateralne površine su zadržale gladak izgled bez vidljivih pora, koje su se nakon procesa rehidracije jasno uočavale kao sloj oko porozne centralne zone (slika 4.30b). Kod uzoraka kroz koje je propuštano plavo mastilo (slika 4.30b) jasno se vidi ravnomerna distribucija rastvora mastila, bez neobojenih zona, što potvrđuje da uzorci imaju otvorene i interkonektovane pore koje obezbeđuju direktan protok fluida u aksijalnom pravcu.



**Slika 4.30** Slike poprečnog preseka makroporoznih hidrogelova gelenske gume i bioaktivnog stakla - serija C: A) u suvoj formi, B) nakon rehidratacije i bojenja plavim mastilom (crvene strelice označavaju neporoznu lateralnu površinu hidrogelova, žute strelice označavaju poroznu aksijalnu površinu i unutrašnjost hidrogela)

Na mikroskopskom nivou, na poprečnim presecima, uočava se porozna građa i prisustvo aglomerata BAG (slika 4.31a,b), ali ne tako jasno kao kod uzoraka iz serija A i B, što je posledica drugačije pripreme uzoraka za SEM.

Uzorci iz serija A i B su pripremljeni za SEM analizu tako što su liofilizovani uzorci direktno isečeni na poprečne preseke, dok su uzorci iz serije C prvo rehidratirani, zatim isečeni, osušeni na sobnoj temperaturi i onda posmatrani na mikroskopu. Proces rehidratacije polimernih lanaca u značajnoj meri je uticao na smanjenje pora unutar strukture hidrogela, i na izraženije prisustvo tankog sloja polimera preko aglomerata BAG (slika 4.31a,b). Primećene razlike u značajnoj meri ukazuju na strukturne promene koje se dešavaju u hidrogelovima u vlažnom stanju u poređenju sa uzorcima u suvom stanju.



**Slika 4.31** SEM mikrografije poprečnih preseka reprezentativnih makroporoznih hidrogelova – serija C; A) razmernik = 20  $\mu\text{m}$ , B) razmernik = 2  $\mu\text{m}$ ; (bela strelica ukazuju na deo gde polimer prekriva bioaktivno staklo, žuta strelica pokazuje na aglomerat bioaktivnog stakla)

### 4.2.3 Karakterizacija hidrogelova gelanke gume i bioaktivnog stakla

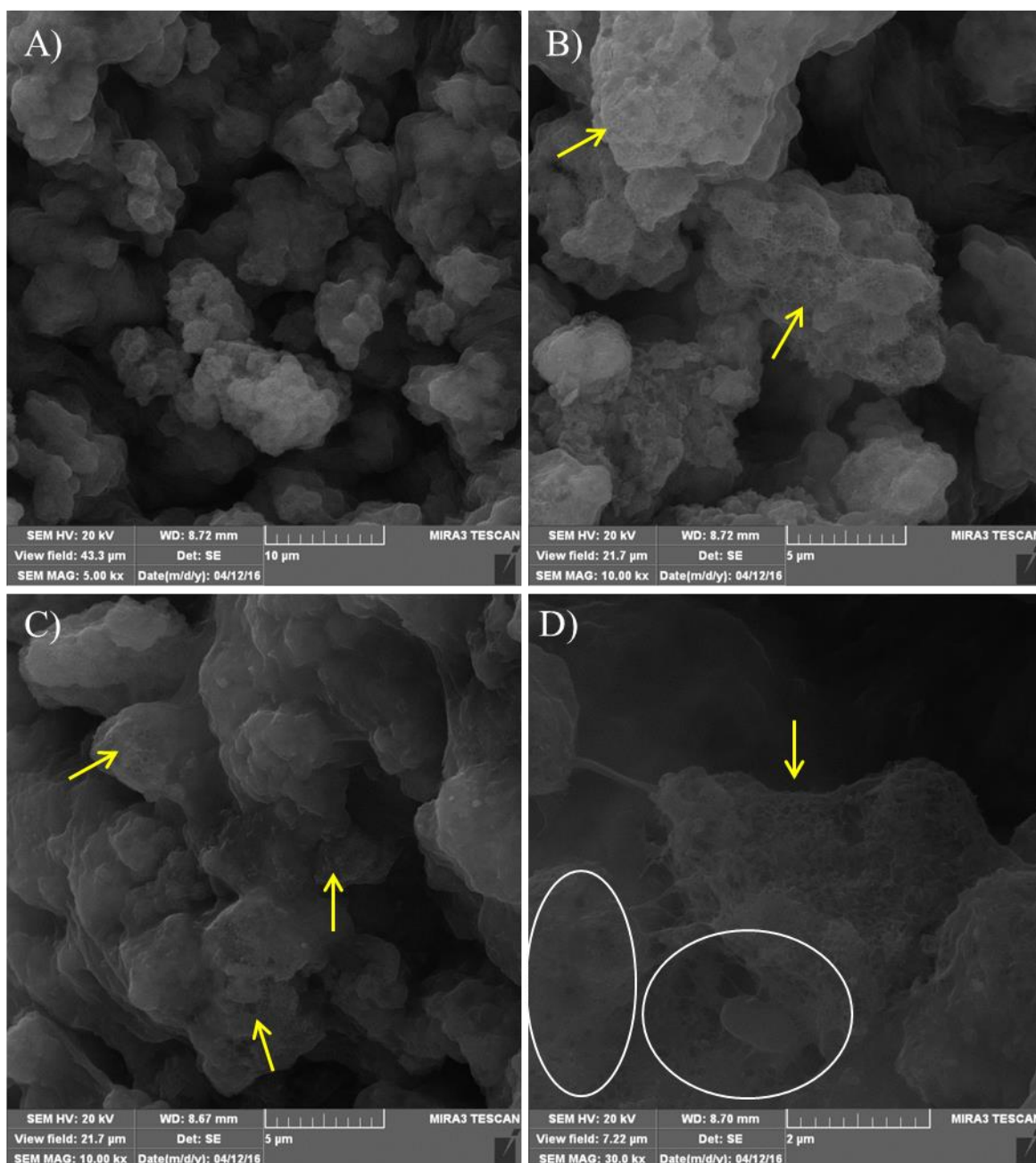
#### 4.2.3.1 Karakterizacija hidrogelova gelanke gume i bioaktivnog stakla sa unutrašnjim porama

Formiranje mineralne faze kalcijum fosfata unutar GG-BAG hidrogelova sa unutrašnjim porama iz serija A i B ispitano je tokom 14 dana u različitim hidrodinamičkim uslovima, i to u protočnom bioreaktoru, u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom i u kontrolnim statičkim uslovima. Pri tome je ostvaren protok u oba bioreaktora od 1,1 ml/min, dok je dinamička kompresija izvedena do 5% deformacije uzorka pri brzini kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$ .

##### 4.2.3.1.1 SEM analiza

Formiranje mineralne faze kalcijum fosfata u uzorcima iz protočnog bioreaktora i kontrolne statičke studije (n=3) je analizirano primenom skenirajuće elektronske mikroskopije nakon 7 dana od početka eksperimenta (slike 4.32 i 4.33), a nakon 14 dana u uzorcima u svim uslovima. Pri tome su svi uzorci bili pripremljeni umešavanjem BAG u vodeni rastvor na magnetnoj mešalici (serija A).

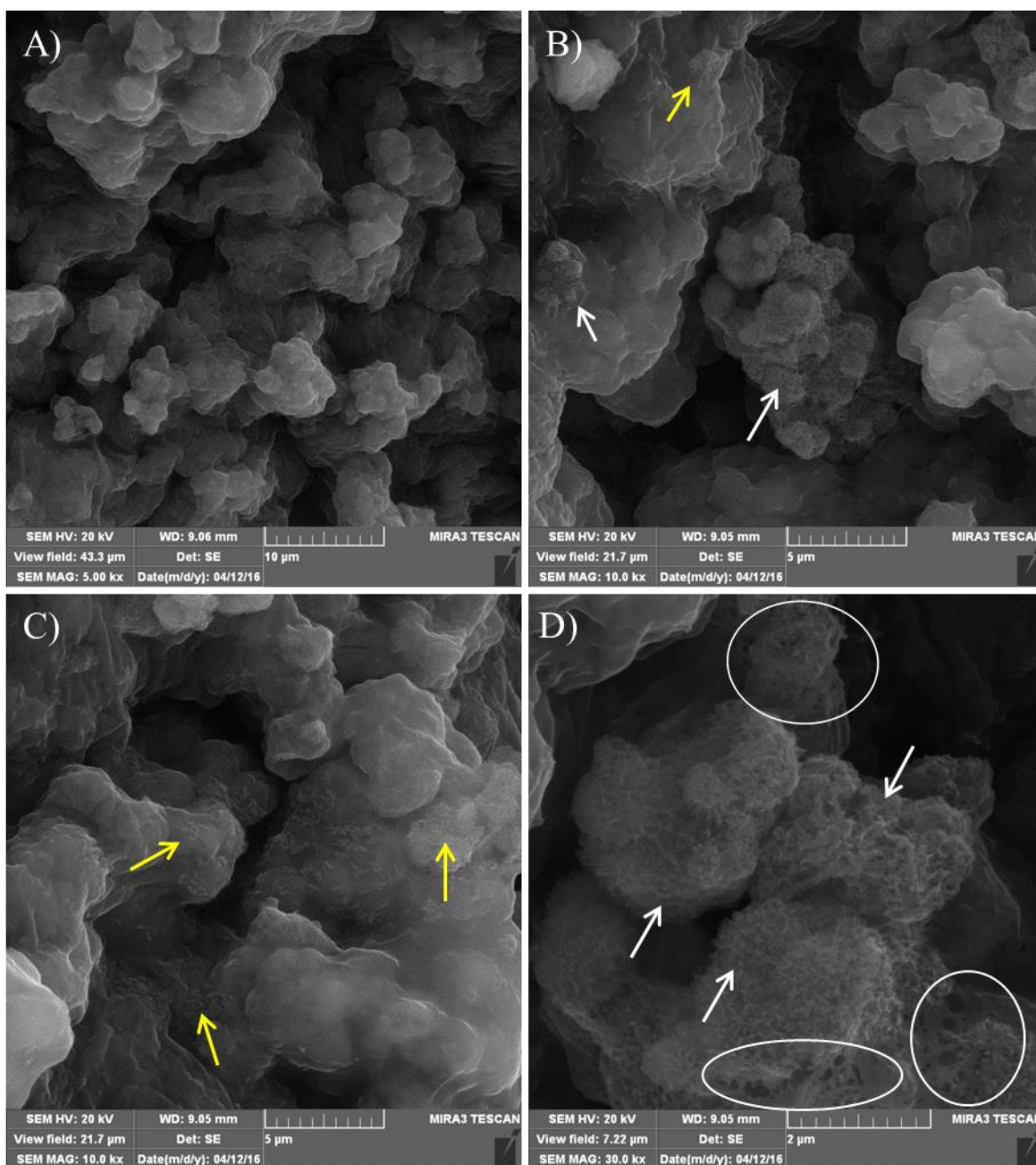
U uzorcima iz protočnog bioreaktora primećuje se mestimično formiranje mineralne faze kalcijum fosfata, koja je na nekim mestima izraženija (slika 4.32b) do manje primetna (slika 4.32c) usled prisustva tankog sloja polimera oko neorganske faze. Na većim uvećanjima (30 000 $\times$ , slika 4.32d) uočavaju se igličaste forme mineralne faze (označeno žutim strelicama), koje podsećaju na karakterističnu strukturu HAp u obliku štapića. Takođe, primećena je i mestimična degradacija polimera, što se najbolje uočava na slici 4.32d (označeno belim konturama).



**Slika 4.32** SEM mikrografije poprečnih preseka hidrogelova sa unutrašnjim porama – serija A, iz protočnog bioreaktora nakon 7 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti; A) razmernik = 10 μm, B) i C) razmernik = 5 μm, (žute strelice označavaju mineralnu fazu; D) razmernik = 2 μm; (beli krugovi označavaju mesta gde se uočava degradacija polimera)

Kod uzoraka iz kontrolne statičke studije (slika 4.33) takođe se mestimično uočavaju morfologije formirane mineralne faze, slično kao u uzorcima iz protočnog bioreaktora. Karakteristične morfologije koje podsećaju na cvetove karfiola (slika 4.33b) označene su belim strelicama, dok je žitim strelicama označena formirana mineralna faza u obliku štapića (slika 4.33c). Degradacija polimera mogla se uočiti na većim uvećanjima (slika 4.33d), a mesta gde je došlo do degradacije polimera označena su belim konturama.



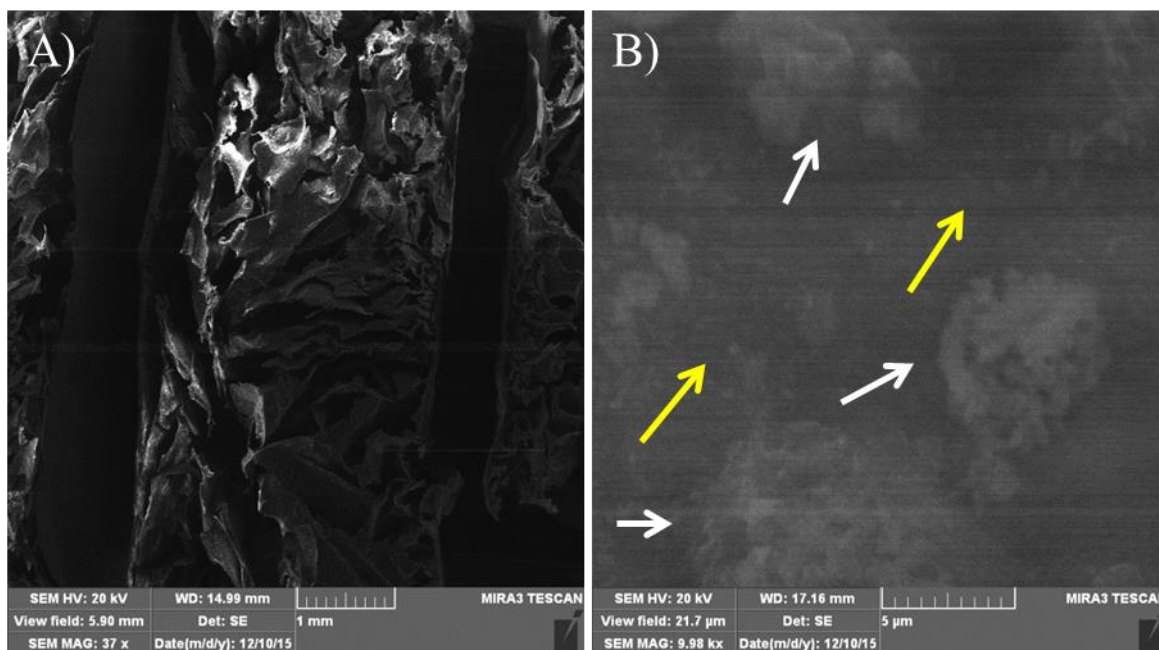


**Slika 4.33** SEM mikrografije poprečnih preseka hidrogelova sa unutrašnjim porama, serija A iz kontrolne statičke studije nakon 7 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti; A) razmernik = 10 μm, B) i C) razmernik = 5 μm, D) razmernik = 2 μm; (žute strelice označavaju mineralnu fazu u početnoj fazi formiranja, bele strelice označavaju mineralnu fazu u obliku cvetova karfiola, bele konture označavaju mesta gde se uočava degradacija polimera)

Na priloženim mikrografijama (slike 4.32 i 4.33) ne primećuju se značajne makromorfološke razlike između uzoraka nakon 7 dana u protočnom bioreaktoru i statičkoj kontrolnoj studiji.

Nakon 14 dana od početka eksperimenta, u po tri uzorka iz svih sistema (protočnog bioreaktora, bioreaktora sa dinamičkom kompresijom i kontrolne statičke studije) ispitano je prisustvo mineralne faze kalcijum fosfata primenom SEM i EDS analize i Ramanskom mikroskopijom. Po jedan od ispitanih uzoraka bio je iz grupe uzoraka kod kojih je tokom pripreme korišćena UZ sonda za dispergovanje BAG u vodenom rastvoru (serija B), dok su po dva bila iz serije A.

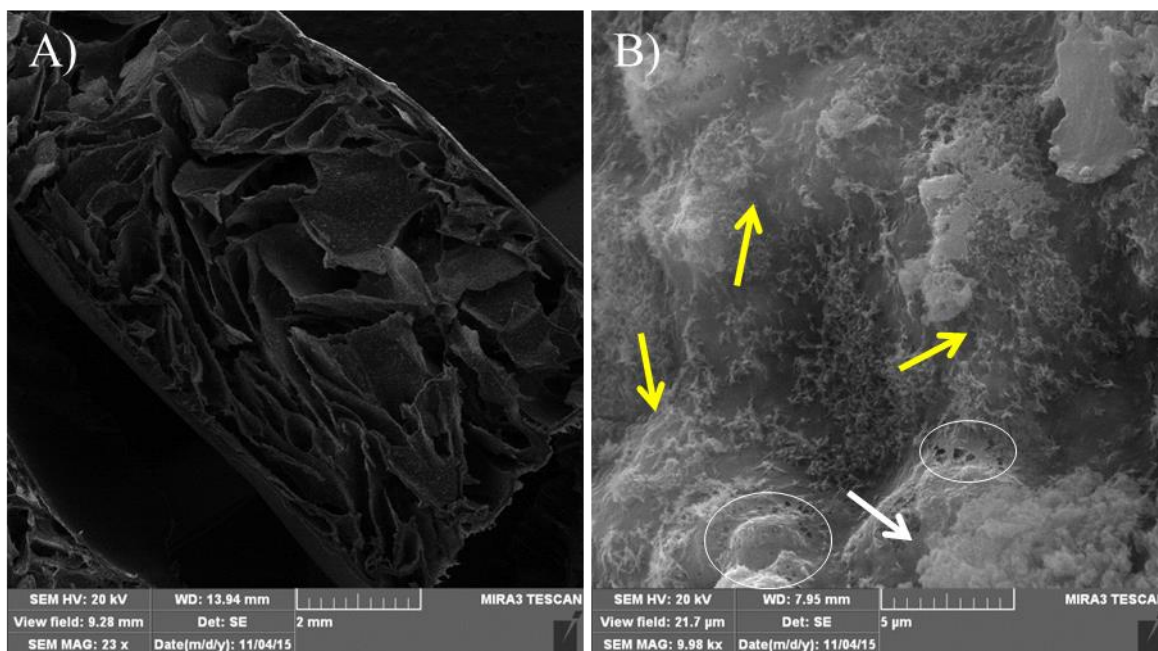
Na slikama 4.34-4.36 prikazane su mikrografije uzoraka iz serije A, nakon 14 dana u sva tri sistema.



**Slika 4.34** SEM mikrografije uzoraka sa unutrašnjim porama, serija A nakon 14 dana u protočnom bioreaktoru: A) makroskopski prikaz, razmernik 1 mm, B) mikroskopski prikaz, razmernik 5 µm; (žute strelice označavaju formiranje mineralne faze u početnoj fazi, bele strelice označavaju mineralnu fazu u obliku cvetova karfiola)

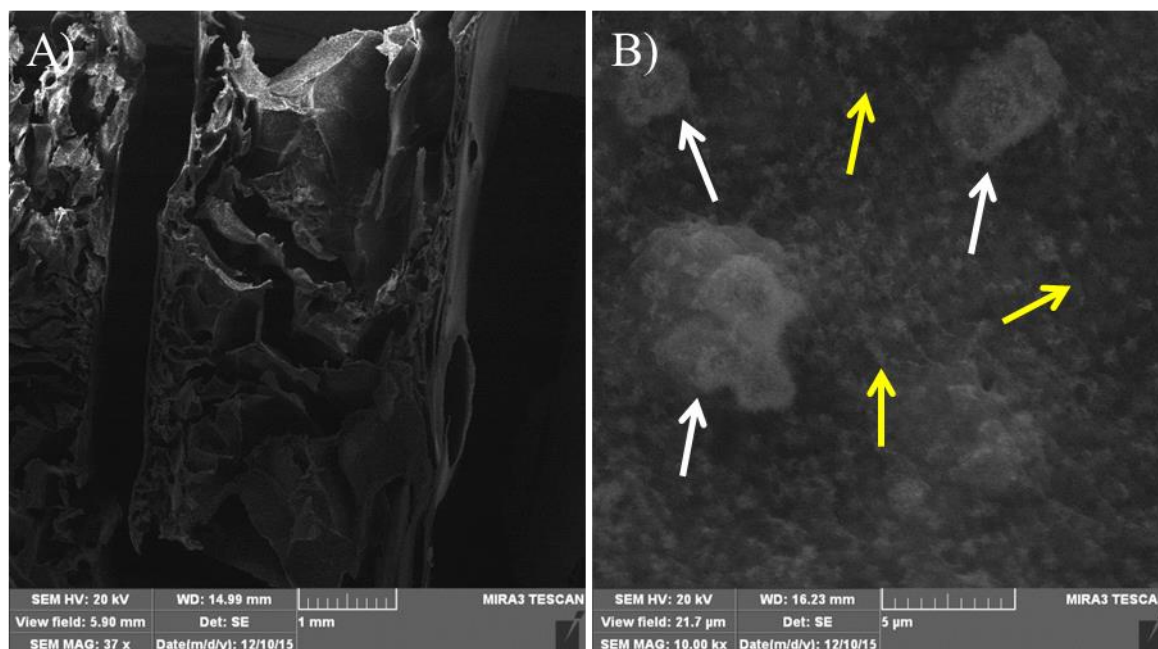
Makroskopski posmatrano kod uzoraka iz sva tri sistema (slike 4.34a-4.36a) ne uočavaju se značajne razlike u izgledu poprečnih preseka kao ni morfološke promene u odnosu na inicijalne uzorke (slika 4.28a).

Na većim uvećanjima (slika 4.34b-4.36b) potvrđeno je mestimično prisustvo mineralne faze u obliku cvetova karfiola (bele strelice), ali i pojedinačnih, raspoređenih igličastih oblika koje se izdvajaju iznad površine polimera (žute strelice).



**Slika 4.35** SEM mikrografije uzoraka sa unutrašnjim porama, serija A nakon 14 dana u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom: A) makroskopski prikaz, razmernik 2 mm, B) mikroskopski prikaz, razmernik 5 µm; (žute strelice označavaju formiranje mineralne faze u početnoj fazi, bele strelice označavaju mineralnu fazu u obliku cvetova karfiola, dok bele konture označavaju područja mestimične degradacije polimera)

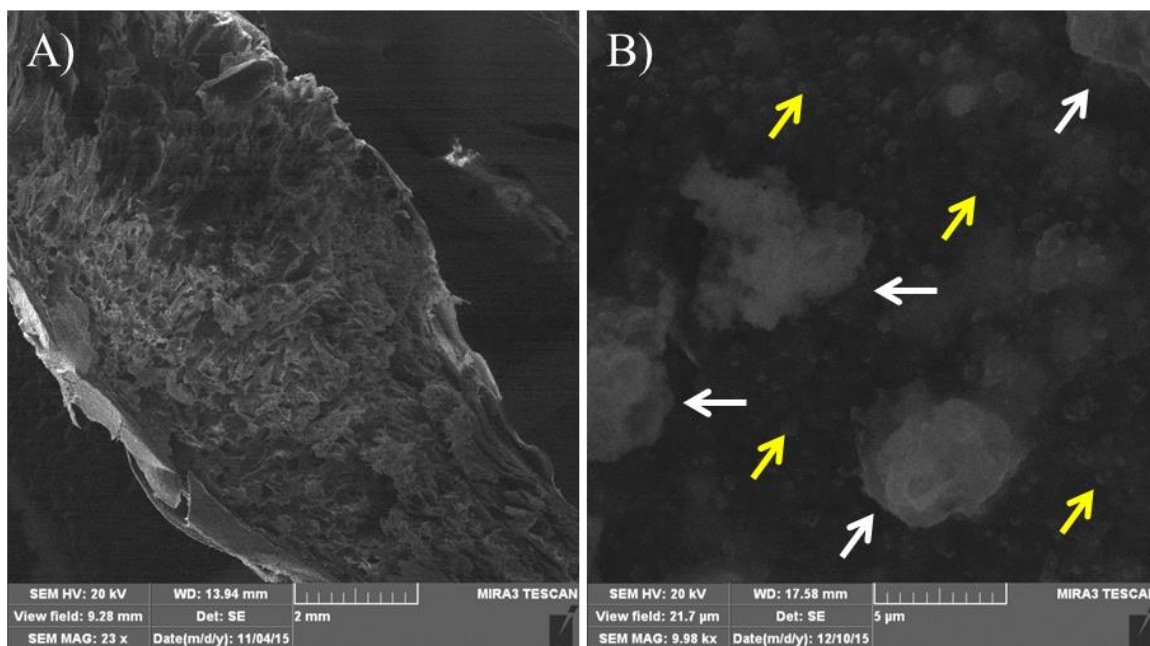
Kod uzoraka koji su proveli 14 dana u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom, primećena je i parcijalna razgradnja polimernog matriksa (slika 4.35b), koja nije bila toliko uočljiva na mikrografijama uzoraka iz ostalih sistema. Ipak, do degradacije polimera je došlo i u ovim sistemima kao što je uočeno u uzorcima posle 7 dana (slike 4.32 i 4.33).



**Slika 4.36** SEM mikrografije uzoraka sa unutrašnjim porama, serija A nakon 14 dana u kontrolnoj statičkoj studiji: A) makroskopski prikaz, razmernik 1 mm, B) mikroskopski prikaz, razmernik 5 µm; (žute strelice označavaju formiranje mineralne faze u početnoj fazi, bele strelice označavaju mineralnu fazu u obliku cvetova karfiola)

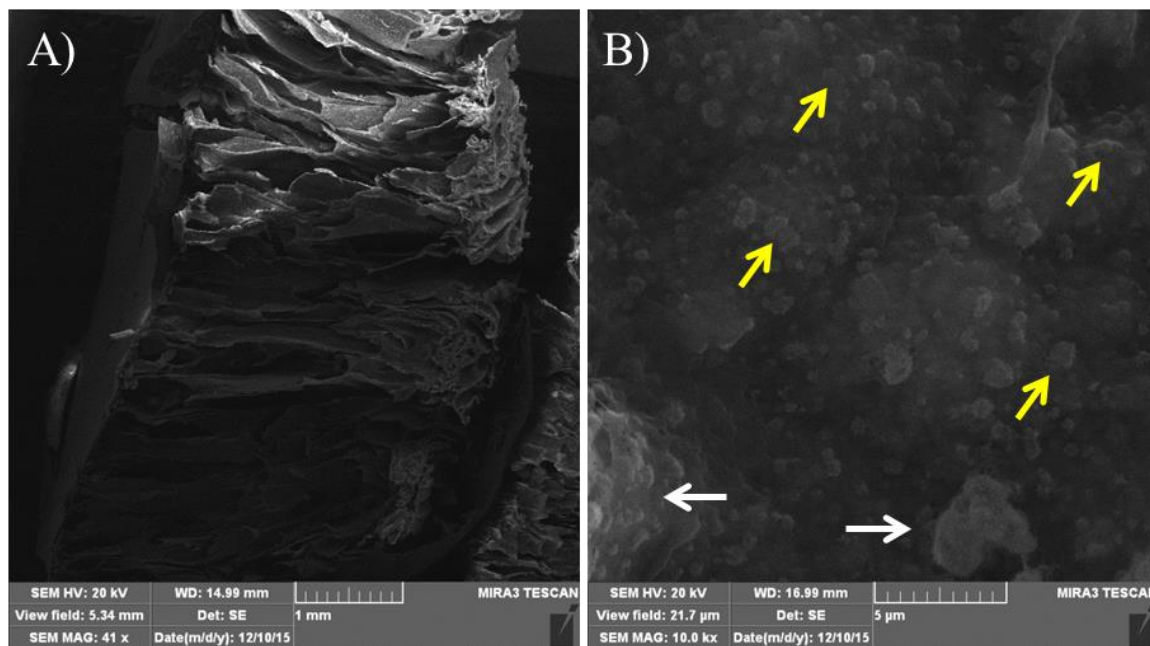


Na slikama 4.37- 4.39 prikazane su mikrografije uzoraka iz serije B, nakon 14 dana u sva tri sistema.



**Slika 4.37** SEM mikrografije hidrogelova sa unutrašnjim porama, serija B nakon 14 dana u protočnom bioreaktoru: A) makroskopski prikaz, razmernik 2 mm, B) mikroskopski prikaz, razmernik 5 µm; (žute strelice označavaju formiranje mineralne faze u početnoj fazi, bele strelice označavaju mineralnu fazu u obliku cvetova karfiola)

Na makroskopskom nivou (slike 4.37a-4.39a) značajne morfološke promene u odnosu na inicijalne uzorke (slika 4.28b) primetne su samo kod uzoraka koji su ispitivani u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom (slika 4.38a).

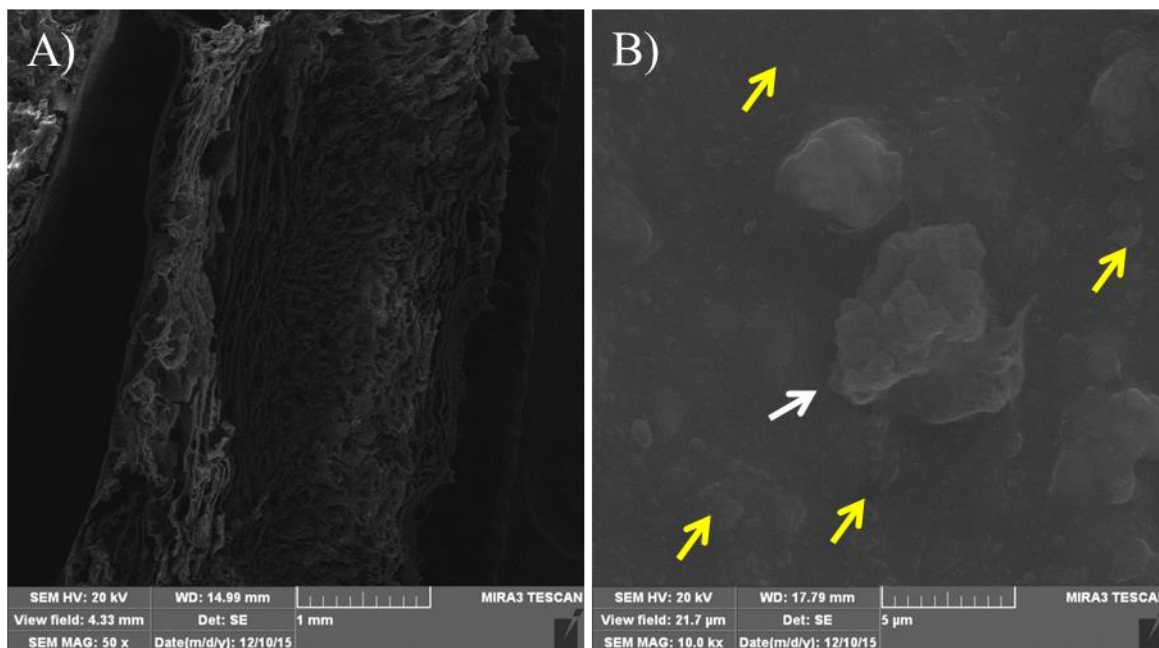


**Slika 4.38** SEM mikrografije hidrogelova sa unutrašnjim porama. serija B nakon 14 dana u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom: A) makroskopski prikaz, razmernik 1 mm, B) mikroskopski prikaz, razmernik 5 µm; (žute strelice označavaju formiranje mineralne faze u početnoj fazi, bele strelice označavaju mineralnu fazu u obliku cvetova karfiola)



Primenom UZ sonde postignuto je da se dobijaju uzorci sa bolje dispergovanim BAG, ali i sa manjim porama usled umrežavanja hidrogelova u prisustvu veće količine slobodnih  $\text{Ca}^{2+}$  (slika 4.28). Kod uzoraka koji su ispitivani u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom u većem delu hidrogela postojale su cilindrične pore, uspravno orjentisane (slika 4.38a).

Na većim uvećanjima potvrđeno je prisustvo mineralne faze kalcijum fosfata u svim grupama uzoraka (slike 4.37b - 4.39b), pri čemu je najmanje izraženo kod uzoraka iz statičke kontrolne studije. Ovo zapažanje je donekle u suprotnosti sa rezultatima koji su dobijeni sa uzorcima iz serije A nakon 14 dana u statičkim uslovima (slika 4.36).

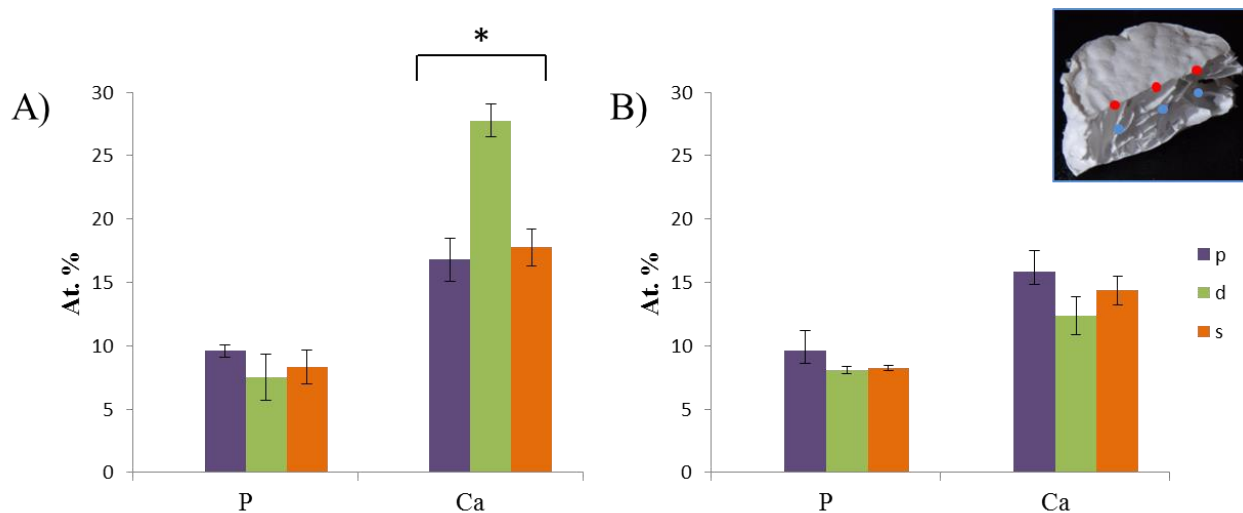


**Slika 4.39** SEM mikrografije hidrogelova sa unutrašnjim porama, serija B nakon 14 dana u kontrolnoj statičkoj studiji: A) makroskopski prikaz, razmernik 1 mm, B) mikroskopski prikaz, razmernik 5  $\mu\text{m}$ ; (žute strelice označavaju formiranje mineralne faze u početnoj fazi, bele strelice označavaju mineralnu fazu u obliku cvetova karfiola)

Generalno, SEM analiza potvrdila je prisustvo mineralne faze kalcijum fosfata u svim uzorcima nakon 7 i 14 dana kontakta sa SBF u različitim hidrodinamičkim uslovima, bez uočljivih razlika. Kako bi se pokazale potencijalne razlike između uzoraka iz različitih sistema urađena je EDS analiza na više proizvoljnih tačaka i primenom tehnike mapiranja, kao i Ramanska mikroskopija.

#### 4.2.3.1.2 EDS analiza

EDS elementarna analiza je sprovedena na nekoliko proizvoljnih tačaka na površini i unutar uzoraka iz serije A nakon 14 dana u SBF, sa ciljem određivanja odnosa Ca/P u različitim sistemima (slika 4.40). Primećeno je da nema statistički značajnih razlika u sadržaju P na površini i u unutrašnjosti uzoraka, kao ni među različitim sistemima. Statistički značajne razlike u sadržaju Ca postojale su kod uzoraka iz bioreaktora sa dinamičkom kompresijom i iz statičke studije, kada se posmatra spoljašnja površina i unutrašnjost uzoraka (slika 4.40a vs b). Između različitih sistema, sadržaj Ca na površini uzoraka se statistički razlikovao i bio značajno veći kod uzoraka iz bioreaktora sa dinamičkom kompresijom u odnosu na uzorke iz protočnog bioreaktora i statičke studije (slika 4.40a).



**Slika 4.40** EDS elementarna analiza hidrogelova sa unutrašnjim porama, serija A nakon 14 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti: iz protočnog bioreaktora (p), bioreaktora sa dinamičkom kompresijom (d) i statičke kontrolne studije (s): A) spoljašnja površina uzoraka, B) unutrašnjost uzoraka (statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ) kod: \* uzoraka iz bioreaktora sa dinamičkom kompresijom u odnosu na uzorke iz ostala dva sistema)

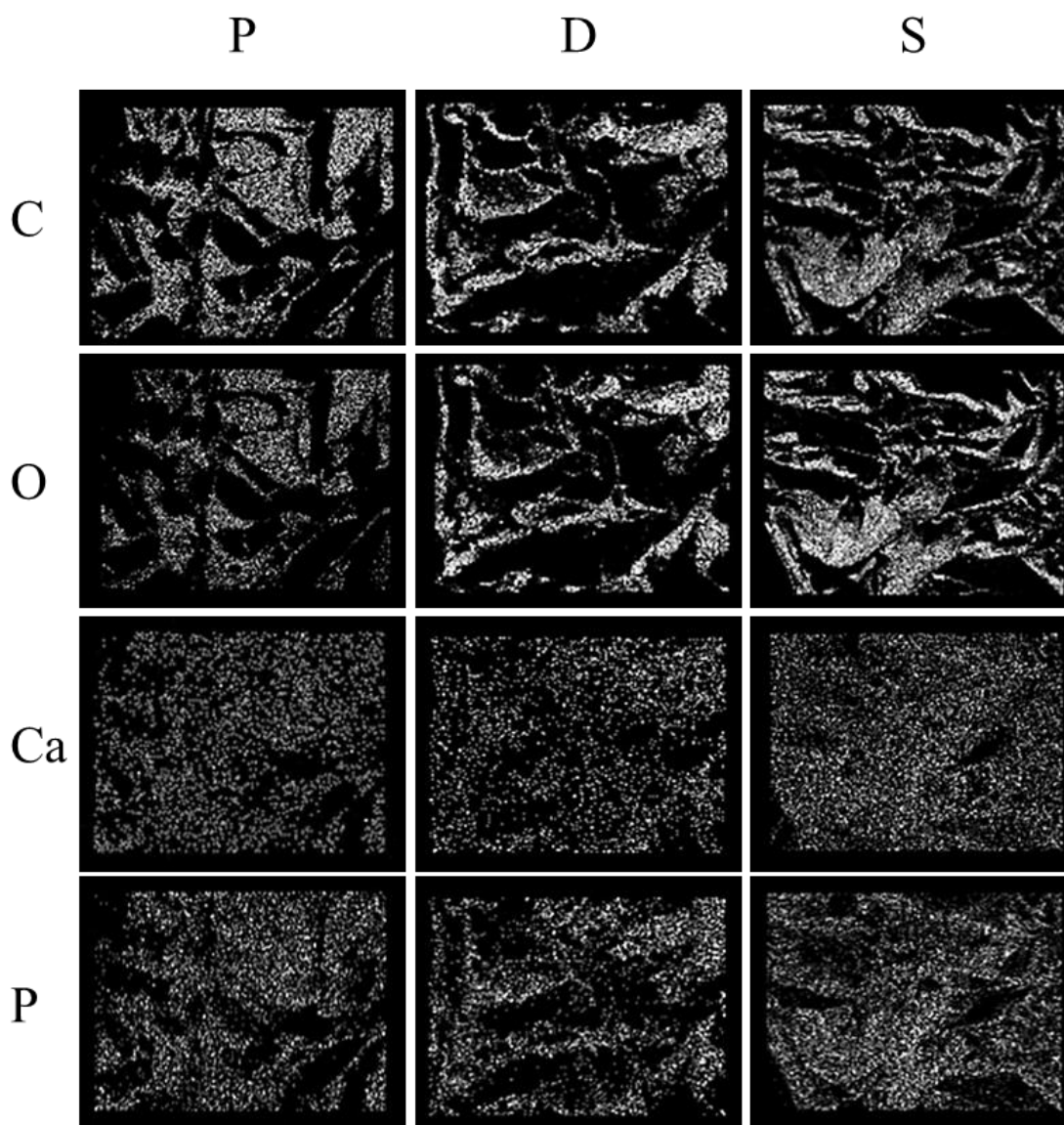
Sadržaj kalcijuma na površini uzoraka može poticati i iz BAG, ali i od kalcijuma koji učestvuje i procesu geliranja polimernog matriksa. Veći sadržaj kalcijuma na površini uzoraka može biti potvrda zapažanja da se tokom procesa geliranja GG-BAG hidrogelova u spoljašnjim zonama formira gusta mreža polimera. Analiza odnosa Ca/P prikazana je u tabeli 4.3 gde se uočava da je kod uzoraka iz protočnog bioreaktora ovaj odnos najbliži odnosu od 1,67 koji odgovara odnosu Ca/P u HAp.

**Tabela 4.3** EDS analiza odnos Ca/P određena u proizvoljnim tačkama na površini i unutar hidrogelova sa unutrašnjim porama, serija A, ispitivanih tokom 14 dana u prisustvu simulirane telesne tečnosti u protočnom bioreaktoru (p), bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom (d) i iz statičke kontrolne studije (s)

<i>Sistem</i>	<i>deo uzorka</i>	<i>Odnos Ca/P</i>
p	spoljašnja površina	$1,76 \pm 0,26$
	unutrašnjost	$1,66 \pm 0,09$
d	spoljašnja površina	$3,85 \pm 1,02$
	unutrašnjost	$1,53 \pm 0,13$
s	spoljašnja površina	$2,19 \pm 0,55$
	unutrašnjost	$1,74 \pm 0,11$

EDS analiza na osnovu proizvoljnih tačaka dopunjena je naknadno metodom EDS mapiranja, sa ciljem da se dobiju detaljniji rezultati zastupljenosti karakterističnih elemenata (C, O, Ca, P, Si) unutar uzoraka. Treba napomenuti da EDS mapiranje nije obuhvatalo ivice uzoraka, već samo unutrašnjost.

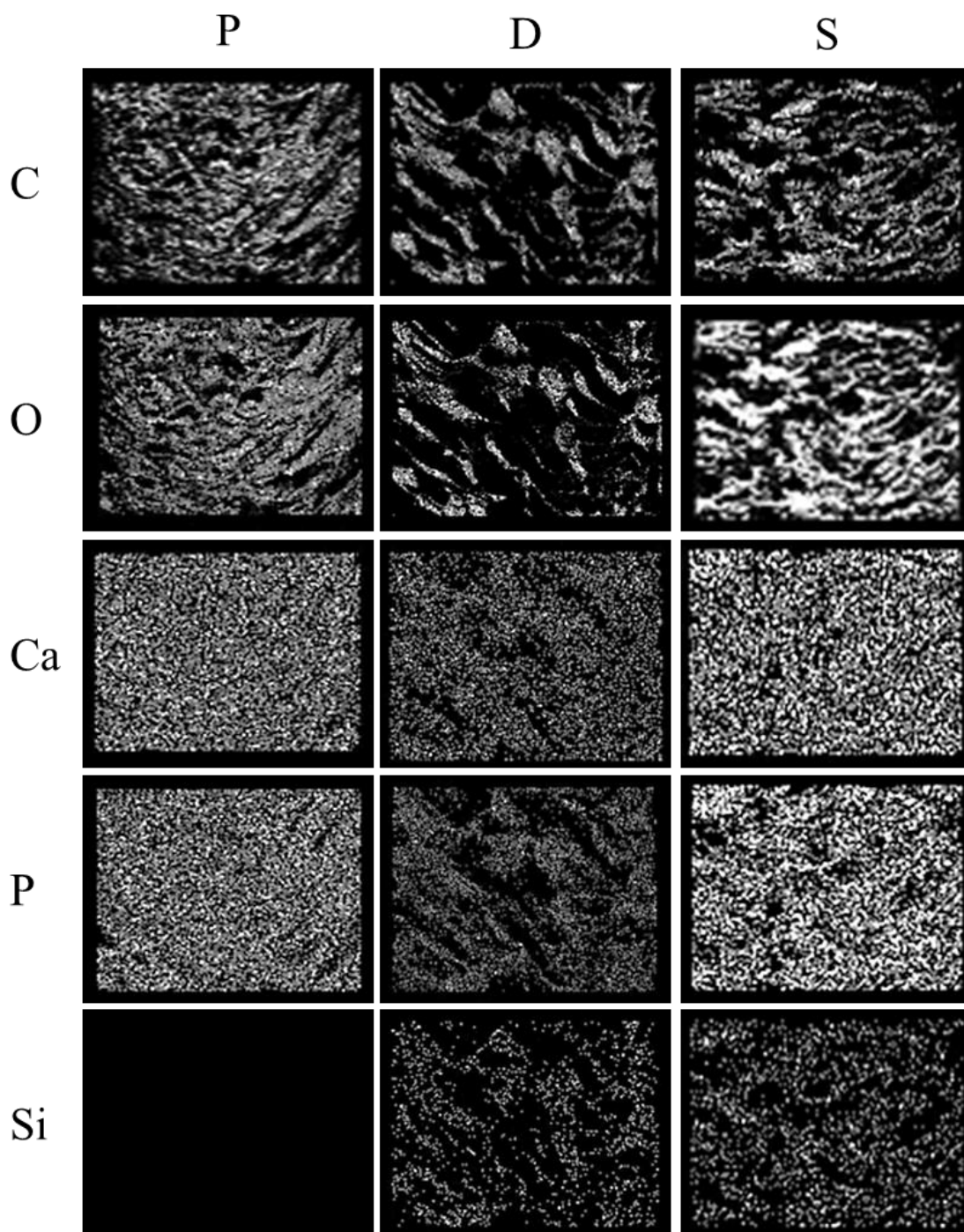
Na slici 4.41 prikazana je zastupljenost ugljenika, kiseonika, kalcijuma i fosfora unutar uzoraka iz protočnog bioreaktora, bioreaktora sa dinamičkom kompresijom i statičke kontrolne studije za uzorke iz serije A nakon 14 dana u SBF. Zastupljenost kiseonika unutar uzoraka apsolutno se poklapala sa prisustvom ugljenika što ukazuje da pomoću ovih elemenata možemo da pratimo prisustvo polimernog dela kompozita. Na osnovu slike 4.41 može se zaključiti da poroznost uzoraka iz serije A hidrogelova, dobijenih umešavanjem BAG na magnetnoj mešalici nije uniformna i da varira od uzorka do uzorka. Sa priloženih EDS mikrografija ne može se zaključiti da ne postoji međusobna povezanost pora kod ovih uzoraka, što zajedno sa prisustvom neporoznog sloja na površini, ukazuje da verovatno nije bilo moguće ostvariti protok SBF kroz uzorke.



**Slika 4.41** Elementarna analiza (sadržaj C, O, Ca, P) EDS mapiranjem hidrogelova sa unutrašnjim porama, serija A nakon 14 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti u protočnom bioreaktoru (levi panel, P), bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom (središnji panel, D) i statičkoj kontrolnoj studiji (desni panel, S)

Sa druge strane, mapiranjem uzoraka iz serije B nakon 14 dana u SBF, potvrđeno je zapažanje da primena UZ sonde za dispergovanje čestica BAG značajno utiče na smanjenje veličine pora uzoraka (slika 4.42). Na osnovu zastupljenosti ugljenika i kiseonika može se zaključiti da poroznost ovih uzoraka takođe nije uniformna, što je najočiglednije kod uzorka iz bioreaktora sa

dinamičkom kompresijom (slika 4.42-D panel). Zastupljenost kalcijuma i fosfora ukazuje na formiranje mineralne faze kalcijum fosfata unutar uzoraka, bez uočljivih razlika između sistema. Međutim, EDS mapiranje uzoraka iz serije B pokazalo je prisustvo silicijuma kod uzoraka iz bioreaktora sa dinamičkom kompresijom i statičke studije. U poređenju sa fosforom, silicijum je zastupljen u manjoj meri, što ukazuje da je veći deo BAG preveden u mineralnu fazu kalcijum fosfata, ali i na potencijalnu razliku u formiranju mineralne faze između različitih sistema.



**Slika 4.42** Elementarna analiza (sadržaj C, O, Ca, P i Si) EDS mapiranje hidrogelova sa unutrašnjim porama, serija B nakon 14 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti u protočnom bioreaktoru, (levi panel, P), bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom (središnji panel, D) i statičkoj kontrolnoj studiji (desni panel, S)

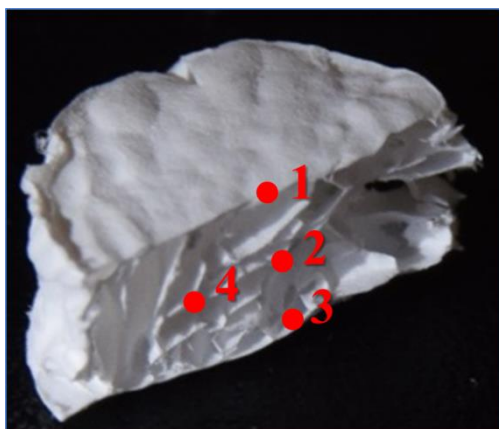
Karakterističan odnos Ca/P (1,67) dobijen za uzorke iz serije A nakon 14 dana u protočnom bioreaktoru i statičkoj studiji može ukazati na formiranje mineralne faze HAp (tabela 4.4). Kod uzoraka iz grupe B ispitivanih u ovim sistemima dobijen je karakterističan odnos Ca/P <1,67 što može ukazati na formiranje kalcijum deficitarnog HAp, kod koga su mesta rezervisana za Ca<sup>2+</sup> ili OH<sup>-</sup> zauzeta fosfatnim jonima, ili hidrogen-fosfatnim jonima (*Siddharthan i sar., 2004*), te da proces kristalizacije HAp nije u potpunosti završen. Kod obe grupe uzoraka odnos Ca/P iz bioreaktora sa dinamičkom kompresijom bio veći od 1,67, što opet može ukazati na lokalni porast koncentracije kalcijumovih jona usled rastvaranja BAG.

**Tabela 4.4** Odnos Ca/P određen mapiranjem hidrogelova sa unutrašnjim porama, serija A i B, ispitivanih tokom 14 dana u prisustvu simulirane telesne tečnosti u protočnom bioreaktoru (p), bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom (d) i iz statičke kontrolne studije (s)

<i>Sistem</i>	<i>Grupa</i>	<i>Odnos Ca/P</i>
p	A	1.67
	B	1.46
d	A	1.83
	B	2.39
s	A	1.68
	B	1.39

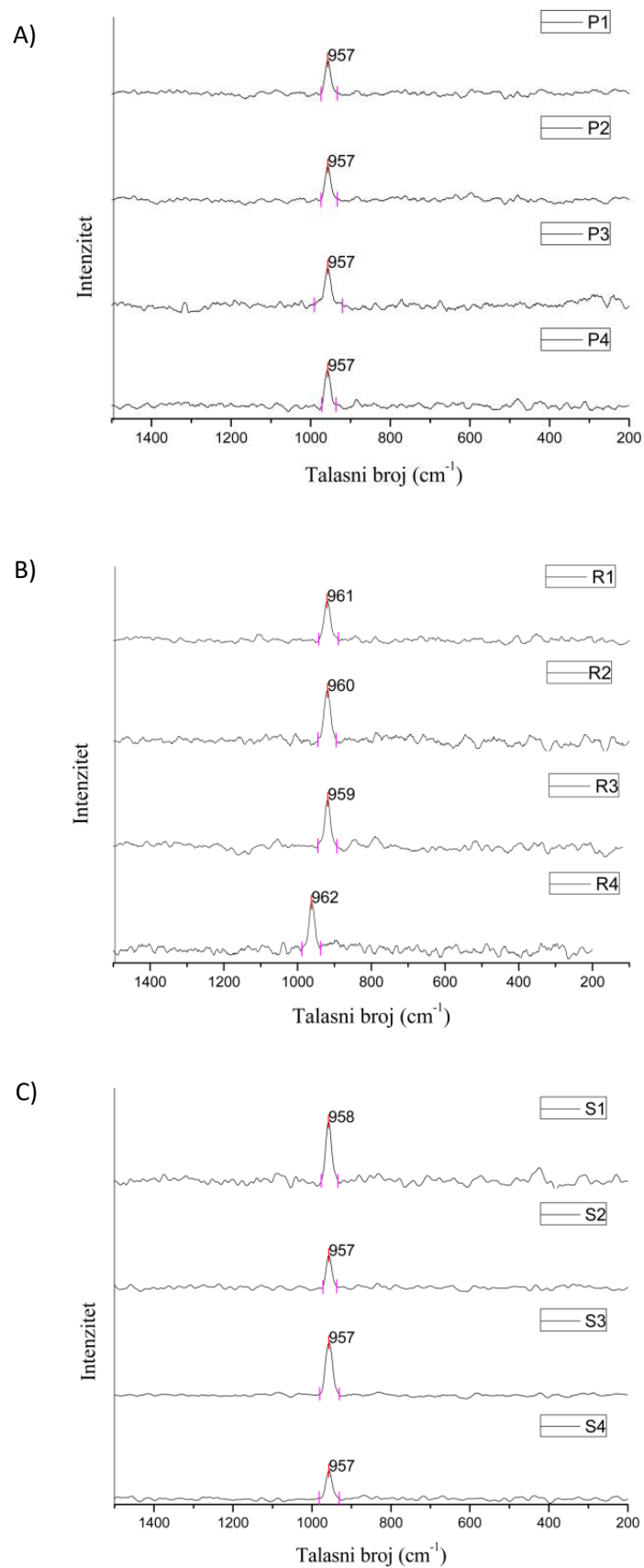
#### 4.2.3.1.3 Ramanska mikroskopija

Poprečni preseki uzoraka iz sva tri ispitivana sistema, nakon 14 dana u SBF analizirani su Ramanskom mikroskopijom. Raman spektar je snimljen u četiri reprezentativne tačke poprečnog preseka svakog uzorka (slika 4.43).



**Slika 4.43** Reprezentativne tačke na poprečnim presecima uzoraka u kojima je snimljen Raman spektar

Na slici 4.44 prikazani su Ramanski spektri, na kojima se jasno uočava pik na ~ 960 cm<sup>-1</sup>, koji odgovara vezanom fosforu u mineralnoj fazi (*Gopi i sar., 2012*) u svim ispitivanim tačkama poprečnog preseka svih uzoraka.



**Slika 4.44** Ramanski spektri snimljeni u reprezentativnim tačkama hidrogelova sa unutrašnjim porama nakon 14 dana u SBF u: A) protočnom bioreaktoru, B) bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom, C) statičkoj kontrolnoj studiji

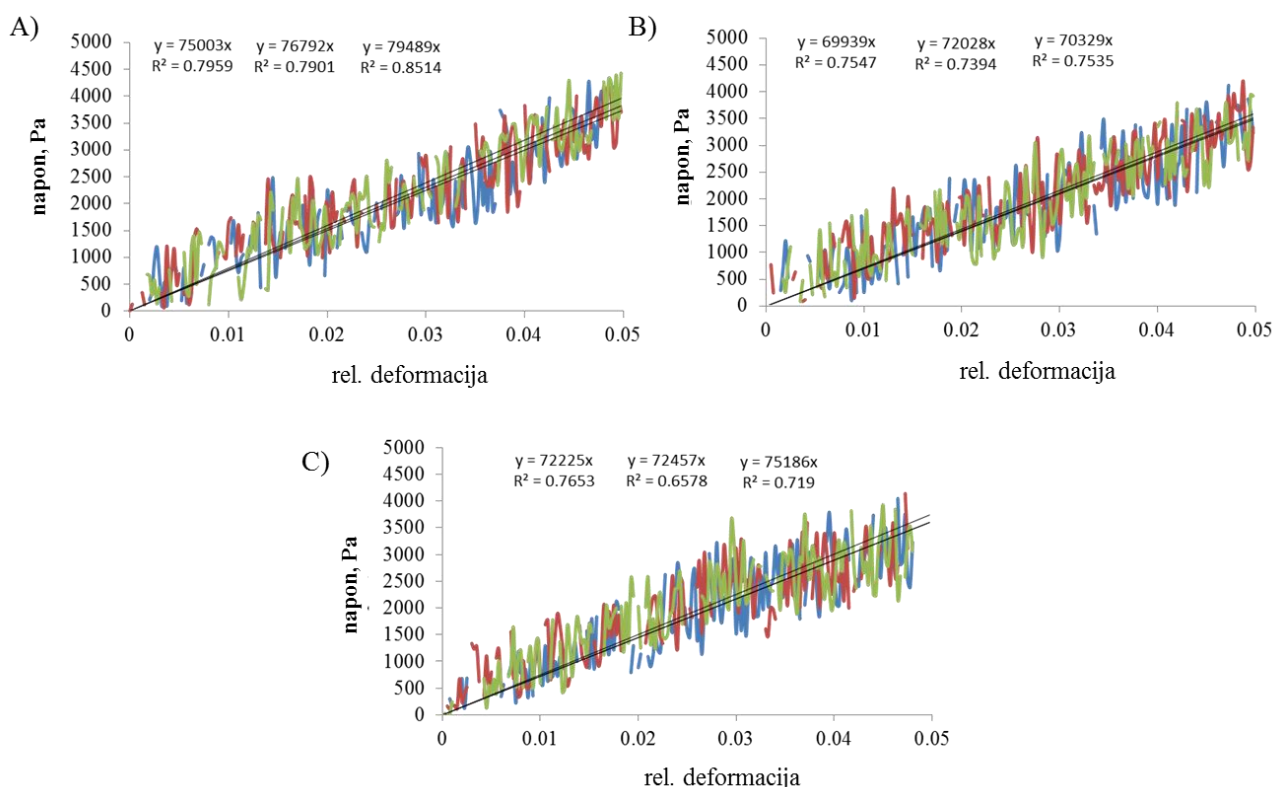


Iako je Ramanska spektroskopija potvrdila prisustvo fosfora u mineralnoj fazi unutar svih uzoraka, pokazalo se da ova tehnika nije dovoljno senzitivna za određivanje razlika između uzoraka.

#### 4.2.3.1.4 Mehaničke karakteristike uzoraka u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom

Mehaničke karakteristike hidrogelova sa unutrašnjim porama su određene u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom pri 5% deformacije na 0,68 Hz, na početku, nakon 7 dana i na kraju, posle 14 dana ispitivanja.

Porozna struktura uzoraka i relativno slabe mehaničke karakteristike kompozitnih materijala ovog tipa, uticali su na čestu pojavu šuma tokom merenja srednje vrednosti opterećenja uzoraka posebno pri početnoj deformaciji. Krive napona u funkciji od primenjene deformacija pratile su trend linearne zavisnosti ( $R^2 > 0,8$ ), što je omogućilo određivanje dinamičkih modula elastičnosti iz nagiba pravih (slika 4.45). Vrednosti dinamičkog modula elastičnosti sumirane su u tabeli 4.5.



**Slika 4.45** Grafici zavisnosti napona od primenjene deformacije za hidrogelove sa unutrašnjim porama tokom 14 dana u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom pri brzini kompresije  $337,5 \mu\text{m/s}$  i frekvenciji od 0,68 Hz uz protok simulirane telesne tečnosti od 1,1 ml/min: A) inicijalni; B) 7. dan; C) 14. dan

U odnosu na inicijalne uzorke, dinamički modul elastičnosti uzoraka nakon 7 dana bioreaktorskog ispitivanja ukazuje da je došlo do blagog smanjenja mehaničke čvrstoće hidrogela ( $\sim 77 \text{ kPa}$  vs.  $71 \text{ kPa}$ ). Niža vrednost dinamičkog modula elastičnosti može se pripisati slabljenju polimerne mreže usled uzastopnih ciklusa kompresije poroznih hidrogelova. U periodu od 7. do 14. dana nije došlo do statistički značajne promene vrednosti dinamičkog modula elastičnosti. Ovaj rezultat može biti posledica dva suprotna procesa, odnosno da dolazi do daljeg slabljenja polimerne mreže, ali da mehaničku čvrstoću nadoknađuje novoformirana mineralna faza kalcijum fosfata unutar hidrogela kao što je pokazala SEM analiza.

**Tabela 4.5** Sumirane vrednosti dinamičkog modula elastičnosti tokom 14 dana ispitivanja u bioreктору sa dinamičkom kompresijom

<b>Dinamički modul kompresije</b>	
<i>Vreme, dan</i>	<i>kPa</i>
inicijalni	77,1±2,2
7. dan	70,8±1,1
14. dan	72,3±1,6

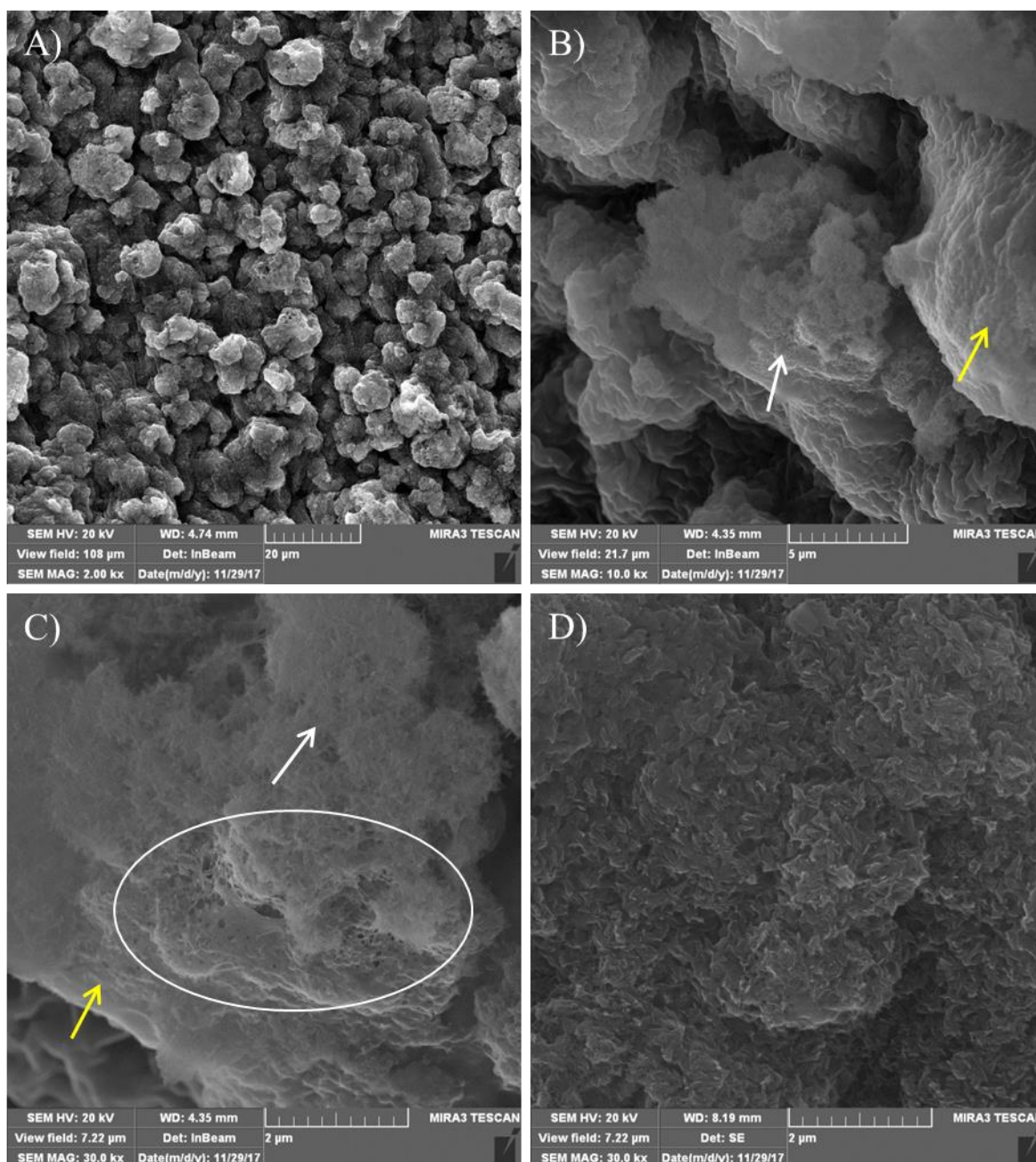
#### 4.2.3.2 Karakterizacija makroporoznih hidrogelova gelanske gume sa bioaktivnim staklom

Formiranje mineralne faze kalcijum fosfata u GG-BAG makroporoznim hidrogelovima, serija C, ispitano je tokom 14 dana paralelno u sva tri sistema: protočnom bioreктору, bioreктору sa dinamičkom kompresijom i u kontrolnoj statičkoj studiji.

##### 4.2.3.2.1 *SEM analiza*

SEM mikrografije na kraju eksperimenta su prikazane na slikama 4.46-4.48. U poređenju sa inicijalnim makroporoznim hidrogelovima (slika 4.31), primenjeni eksperimentalni uslovi nisu imali značajan uticaj na makroskopskom nivou, već su integritet i funkcionalnost hidrogelova očuvani tokom 14 dana eksperimenta.

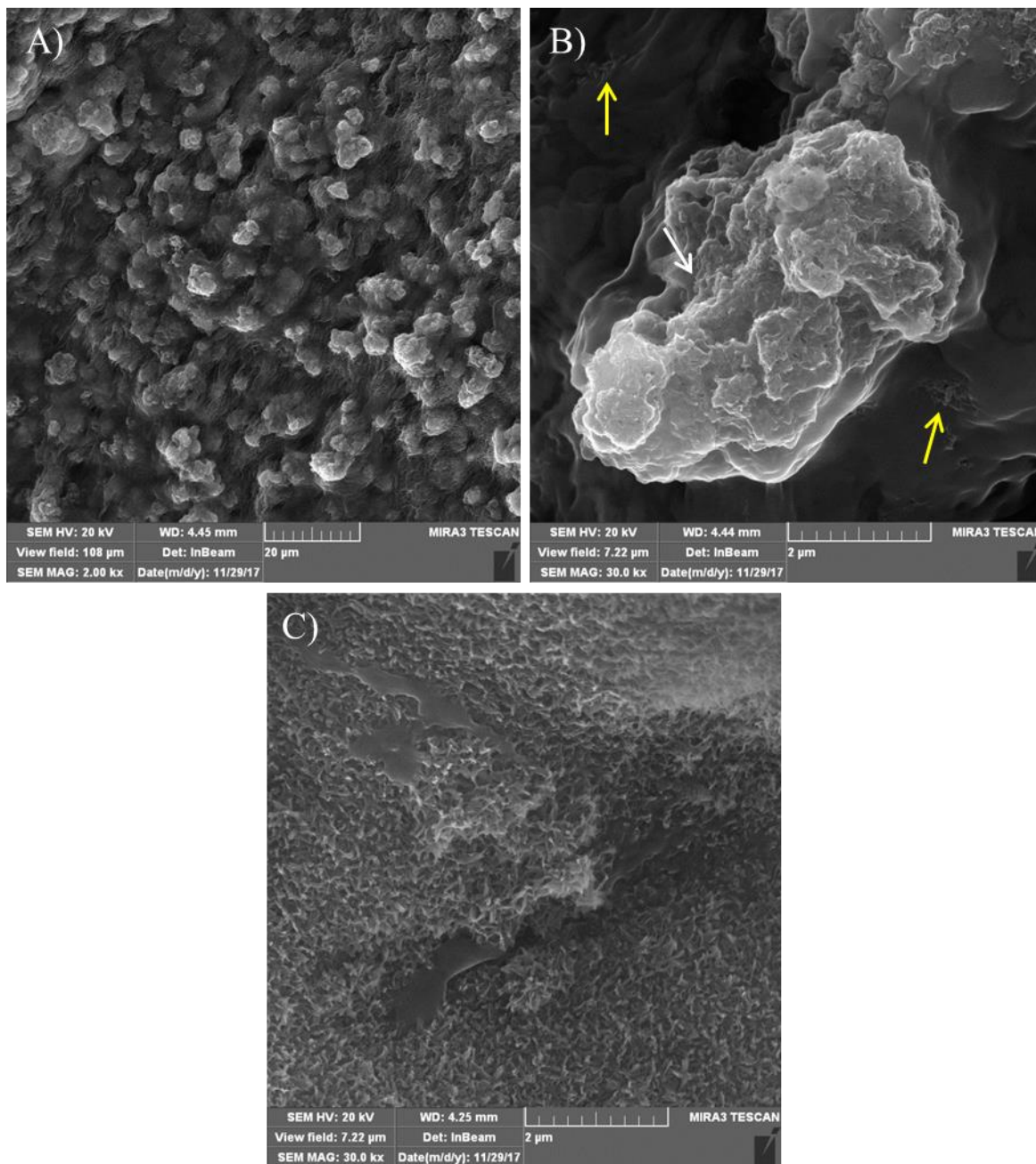




**Slika 4.46** SEM mikrofografije poprečnih preseka makroporoznih hidrogelova, serija C iz protočnog bioreaktora nakon 14 dana u prisustvu simulirane telesne tečnosti; A) razmernik = 20 µm, B) razmernik = 5 µm, C) i D) razmernik = 2 µm; (žute strelice označavaju formiranje mineralne faze u početnoj fazi, bele strelice označavaju mineralnu fazu u obliku cvetova karfiola, bela kontura označava mesto gde se uočava degradacija polimera)

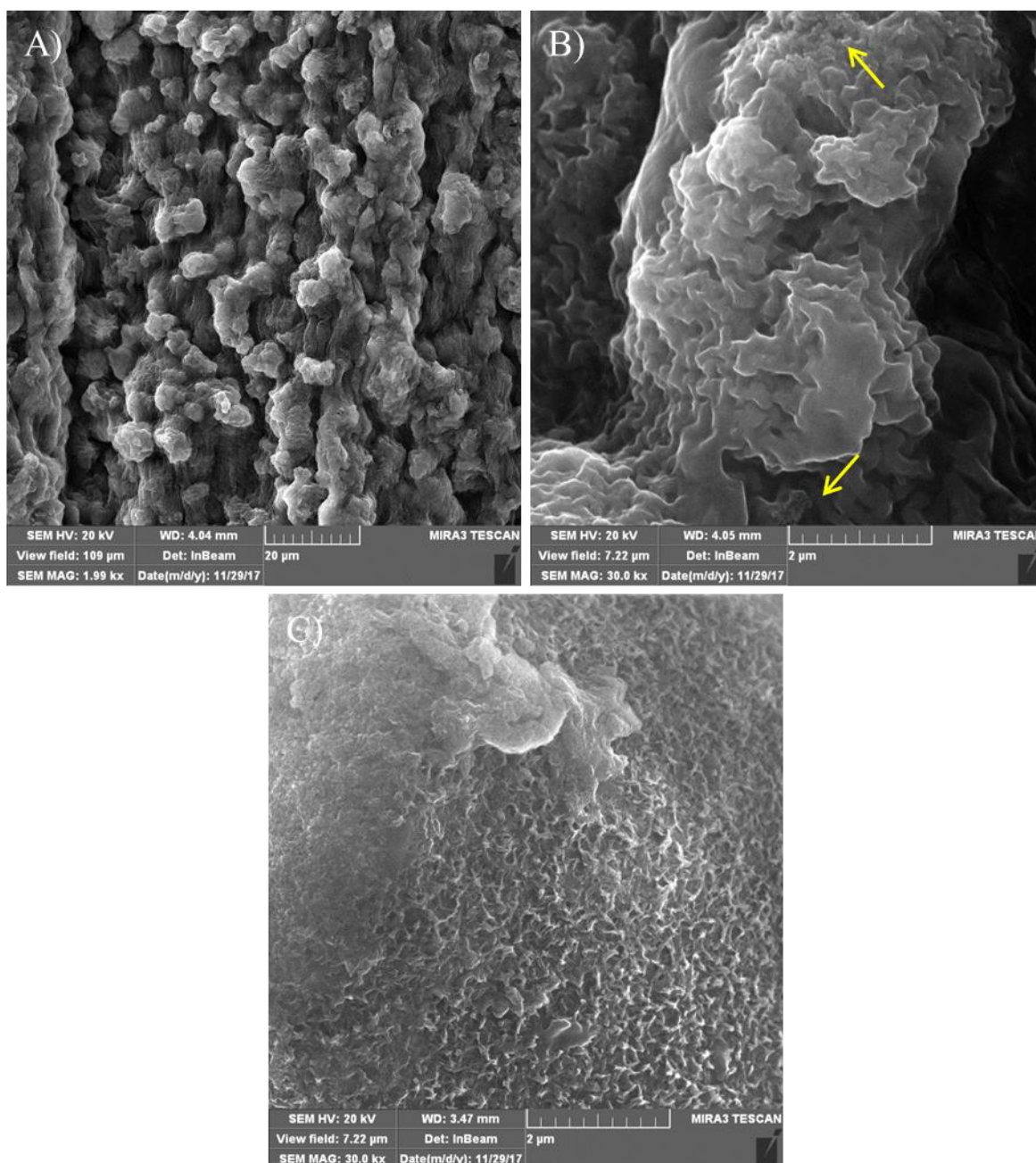
S druge strane, primenjeni biomimični bioreaktorski uslovi su značajno promenili mikromorfologiju uzoraka. Strujanje SBF u protočnim bioreaktorima je izazvalo veću bioaktivnost kompozita pri primenjenim uslovima, koja se ogleda u ubrzanoj degradaciji polimera (slika 4.46a,c) i stvaranju značajne količine mineralne faze. Protok fluida indukovao je formiranje struktura mineralne faze nalik na cvetove karfiola ravnomerno unutar makroporoznih hidrogelova (slika 4.46b,c). Na bočnim spoljašnjim površinama hidrogelova (slika 4.46d) formirana je mineralna faza u obliku kristala sličnih pahuljama, što je prethodno opisano u literaturi kao efekat protoka fluida na formiranje HAp (*Baumgartner i sar., 2015*).

U bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom mineralna faza kalcijum fosfata je formirana i na bočnim spoljašnjim površinama makroporoznih hidrogelova (slika 4.47c) i lokalno unutar samih uzoraka (slika 4.47b), ali u značajno manjoj količini u poređenju sa makroporoznim hidrogelovima iz protočnog bioreaktora (slika 4.46). Degradacija polimera pod dinamičkim uslovima je bila manje izražena u odnosu na uzorke iz protočnog bioreaktora (slika 4.47a nasuprot slike 4.46a) i više odgovarala rezultatima dobijenim u statičkoj kontroli (slika 4.48a). Na mestima gde je došlo do delimične degradacije polimera (slika 4.47b) došlo je do formiranja pojedinačnih štapićastih oblika koji predstavljaju začetak formiranja mineralne faze (slika 4.47b, žute strelice).



**Slika 4.47** SEM mikrografije poprečnih preseka makroporoznih hidrogelova iz bioreaktora sa dinamičkom kompresijom nakon 14 dana; A) razmernik = 20 µm, B) i C) razmernik = 2 µm; (žute strelice označavaju formiranje mineralne faze u početnoj fazi, bele strelice označavaju mineralnu fazu u obliku cvetova karfiola)



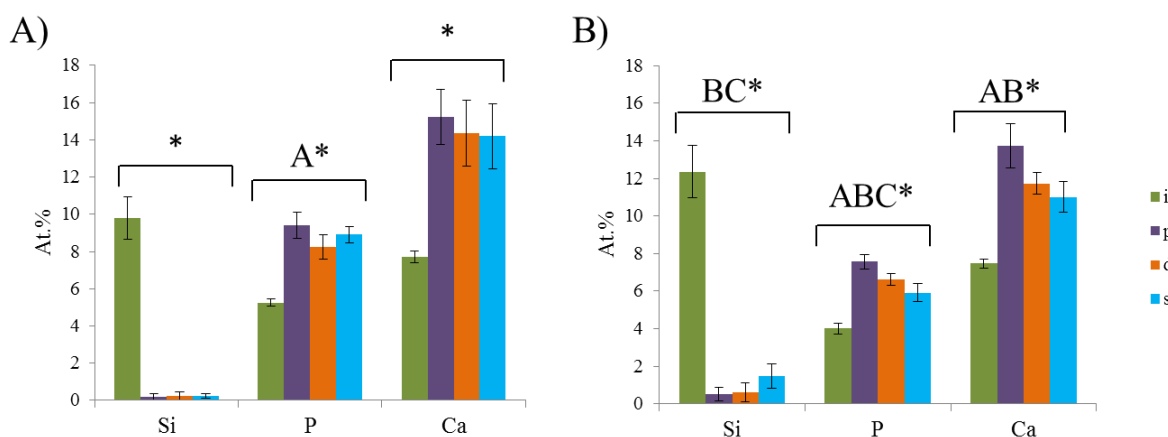


**Slika 4.48** SEM mikrografije poprečnih preseka makroporoznih hidrogelova iz statičke studije nakon 14 dana u prisustvu SBF; A) razmernik = 20 µm, B) i C) razmernik = 2 µm; (žute strelice označavaju formiranje mineralne faze u početnoj fazi, bele strelice označavaju kristale mineralne faze obliku cvetova karfiola)

Efekte protoka na formiranje mineralne faze kalcijum fosfata su još izraženiji u poređenju sa kontrolnim uzorcima iz statičke studije nakon 14 dana u SBF (slika 4.48). Kod ovih makroporoznih hidrogelova mineralna faza se formirala mestimično (slika 4.48b) sa više kristala na spoljašnjim površinama (slika 4.48c). Delimična degradacija polimera uočena je u unutrašnjosti makroporoznih hidrogelova (slika 4.48a) ne dovodeći do značajnijeg formiranja kalcijum fosfata.

#### 4.2.3.2.2 EDS analiza

EDS elementarna analiza potvrdila je povećanje sadržaja kalcijuma i fosfora i smanjenje sadržaja silicijuma u spoljašnjim i unutrašnjim delovima makroporoznih hidrogelova, nakon 14 dana u SBF, u svim sistemima u odnosu na početne uzorke (slika 4.49).



**Slika 4.49** EDS elementarna analiza nakon 14 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti: inicijalnih uzoraka (i), iz protočnog bioreaktora (p), bioreaktora sa dinamičkom kompresijom (d) i statičke kontrole studije (s); A) spoljašnja površina uzoraka, B) unutrašnjost uzoraka (statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ,  $n=5$ ) za: ) \* - svi sistemi u poređenju sa inicijalnim uzorcima; A - p u poređenju sa d; B - p u poređenju sa s, C – d u poređenju sa s)

Statistički značajne razlike u elementarnom sadržaju primećene su pretežno u unutrašnjosti makroporoznih hidrogelova iz različitih sistema. Veće rastvaranje BAG uočeno je u biomimičnim bioreaktorskim uslovima u odnosu na statičke uslove, na šta ukazuje smanjenja sadržaja silicijuma. Značajne razlike ( $p < 0,05$ ) u sadržaju fosfora su uočene u svim eksperimentalnim grupama, pri čemu je najviše ovog elementa bilo u uzorcima iz protočnog bioreaktora. U ovom sistemu, akumulirana je i najveća količina kalcijuma, što potvrđuje zaključak da je protok SBF poboljšao rastvaranje BAG i formiranje mineralne faze, posebno unutar makroporoznih hidrogelova.

#### 4.2.3.2.3 ICP elementarna analiza

Koncentracije elemenata od interesa (kalcijum, fosfor i silicijum) su određene induktivno – spregnutom plazma spektroskopijom (ICP) nakon rastvaranja inicijalnih i uzoraka posle 14 dana u SBF u protočnom bioreaktoru, bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom i statičkoj kontrolnoj studiji (tabela 4.6).

**Tabela 4.6** Koncentracija kalcijuma, fosfora i silicijuma unutar inicijalnih uzoraka (i) i uzoraka nakon 14 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti u protočnom bioreaktoru (p), bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom (d) i statičkoj kontrolnoj studiji (s)

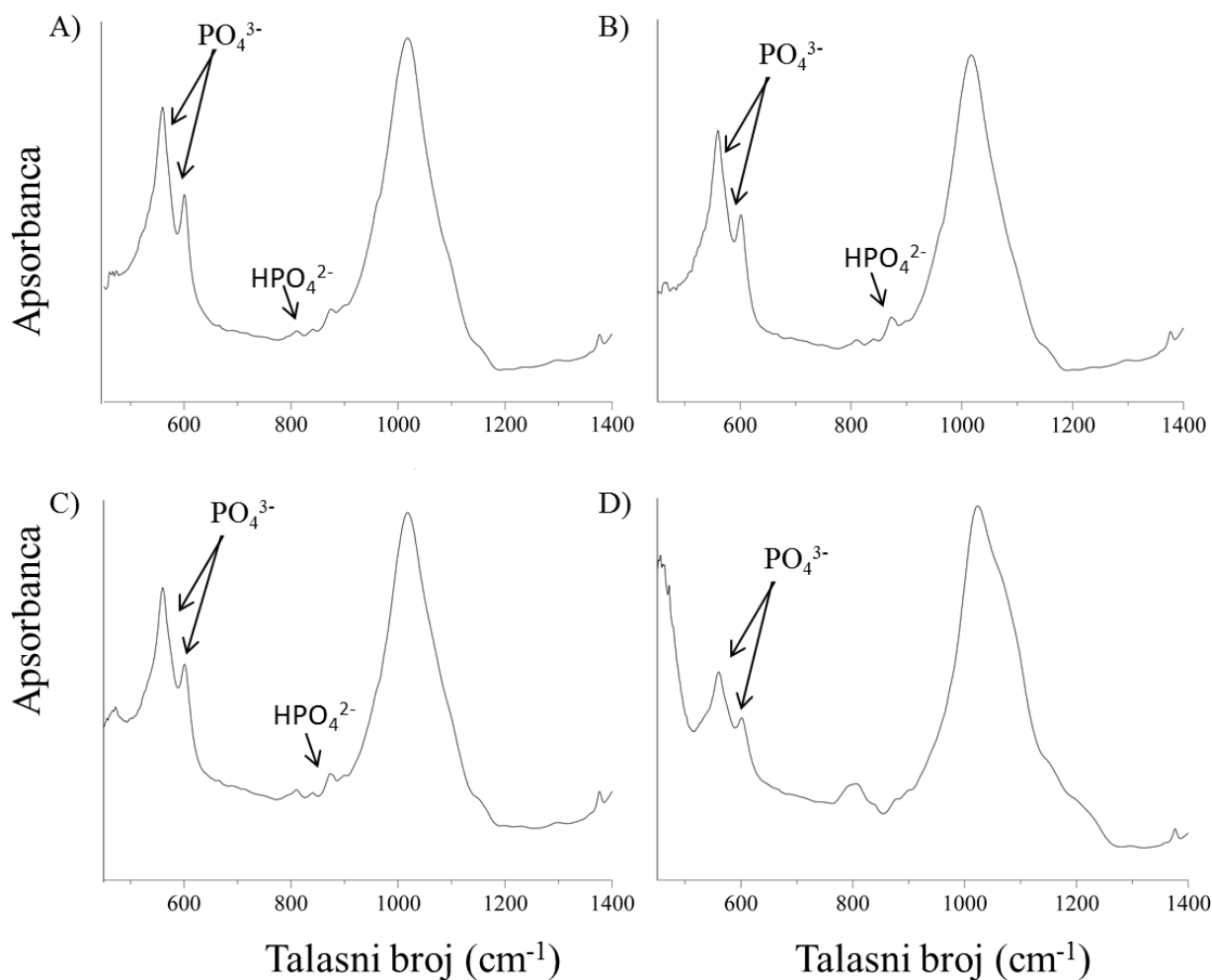
<i>Uzorak</i>	<i>Ca, mg/g uzorka</i>	<i>P, mg/g uzorka</i>	<i>Si, mg/g uzorka</i>
i	70.6	13.2	24.4
p	179.6 ± 40.3	61.1 ± 0.8	2.9 ± 0.5
d	160.8 ± 1.4	63.2 ± 2.1	4.6 ± 0.6
s	171.6 ± 30.9	50.6 ± 7.1	6.6 ± 0.6

Dobijeni rezultati prate očekivani trend promene koncentracija ispitivanih elemenata i može se zaključiti da je transformacija BAG u mineralnu fazu kalcijum fosfata najsporija u statičkim uslovima, što potvrđuje zaključak da u bioreaktorskim uslovima konvektivni prenos utiče na proces

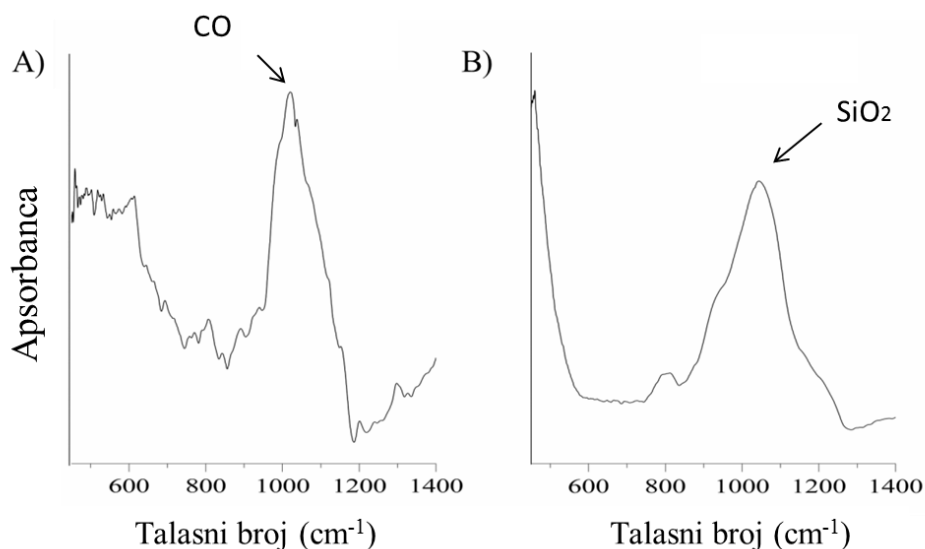
formiranja mineralne faze. Odnos Ca/P, određen na osnovu prikazanih rezultata, ne odgovara stehiometrijskom odnosu za HAp (2,94; 2,54; 3,39, redom za uzorke iz protočnog bioreaktora, bioreaktora sa dinamičkom kompresijom i statičke studije), već bi ovi rezultati mogli da ukazuju da deo BAG još uvek nije preveden u HAp.

#### 4.2.3.2.4 FTIR analiza

FTIR spektri inicijalnih i hidrogelova nakon 14 dana, u prisustvu SBF pod različitim uslovima, prikazani su na slici 4.50, dok su referentni spektri BAG i GG prikazani na slici 4.51.



**Slika 4.50** FTIR spektri inicijalnih i uzoraka nakon 14 dana u prisustvu SBF: A) protočni bioreaktor, B) bioreaktor sa dinamičkom kompresijom i C) statička kontrolna studija, D) inicijalni uzorci

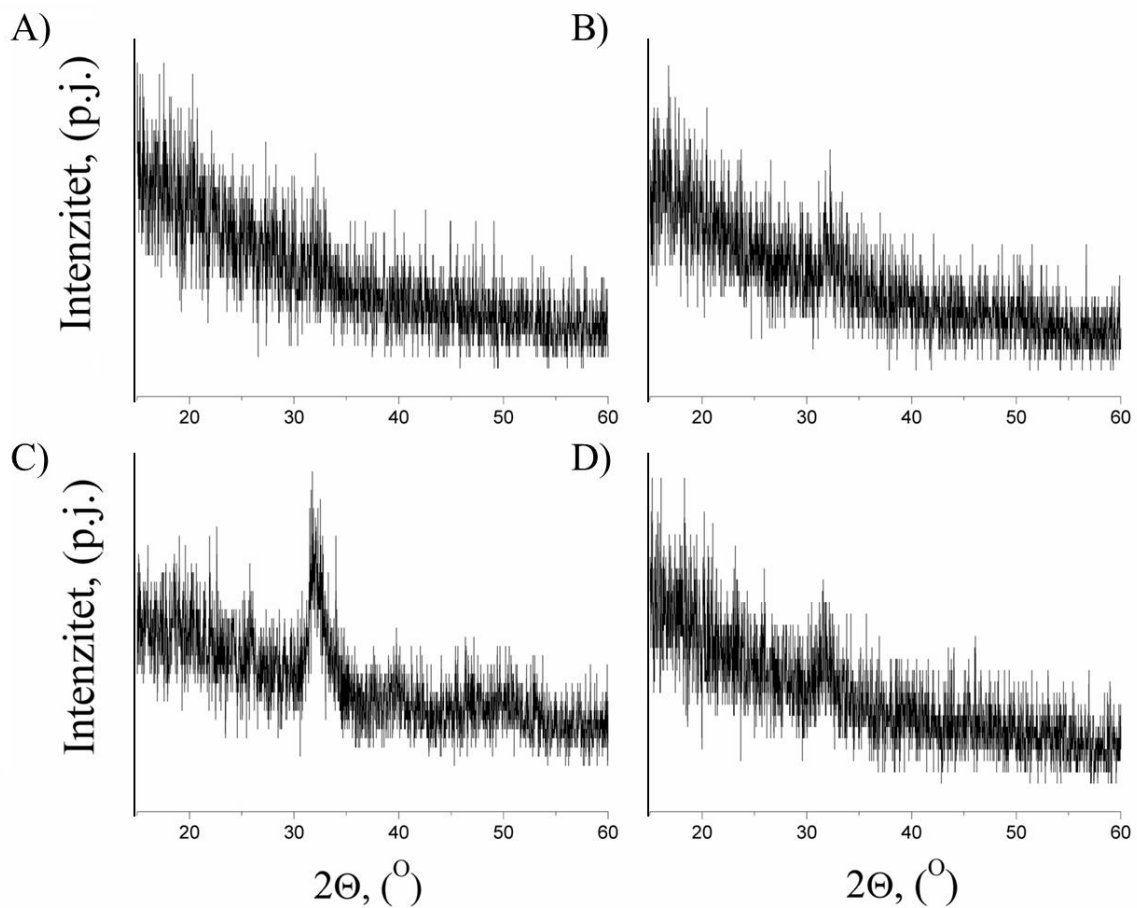


**Slika 4.51** FTIR spektri referentnih prahova: A) gelanske gume i B) bioaktivnog stakla

Kod svih FTIR spektara, dominantan pik je zabeležen na oko  $1000\text{ cm}^{-1}$ . Za BAG, pik koji se pojavljuje na  $\sim 1040\text{ cm}^{-1}$  odgovara vibracijama istezanja  $\text{SiO}_2$  veze (Sun i sar., 2015), dok je u GG spektru pik prisutan na  $\sim 1030\text{ cm}^{-1}$  i odgovara vibracijama istezanja CO veze (Silva-Correia i sar. 2011). Nakon 14 dana u SBF pod različitim hidrodinamičkim uslovima, pik prisutan na  $\sim 1020\text{ cm}^{-1}$  verovatno odgovara  $\nu_3$  vibracijama  $\text{PO}_4^{3-}$  grupe (Miller i sar., 2001), ali takođe može poticati od polimernog matriksa ili ostatka BAG koji nije preveden u mineralnu fazu. Pojava pikova na  $\sim 560\text{ cm}^{-1}$  i  $\sim 600\text{ cm}^{-1}$  (Douglas i sar., 2014) koji su označeni na slici 4.50, odnose se na  $\nu_4$  vibracije grupe  $\text{PO}_4^{3-}$  i potvrđuju formiranje mineralne faze kalcijum fosfata u svim ispitivanim hidrogelovima. Takođe, pik karakterističan za mineralnu fazu na  $\sim 870\text{ cm}^{-1}$ , koji odgovara karakterističnim vibracijama  $\text{HPO}_4^{2-}$ , izražen je kod svih uzoraka nakon 14 dana u prisutvu SBF, što dodatno potvrđuje formiranje kalcijum fosfata u svim ispitivanim sistemima.

#### 4.2.3.2.5 XRD analiza

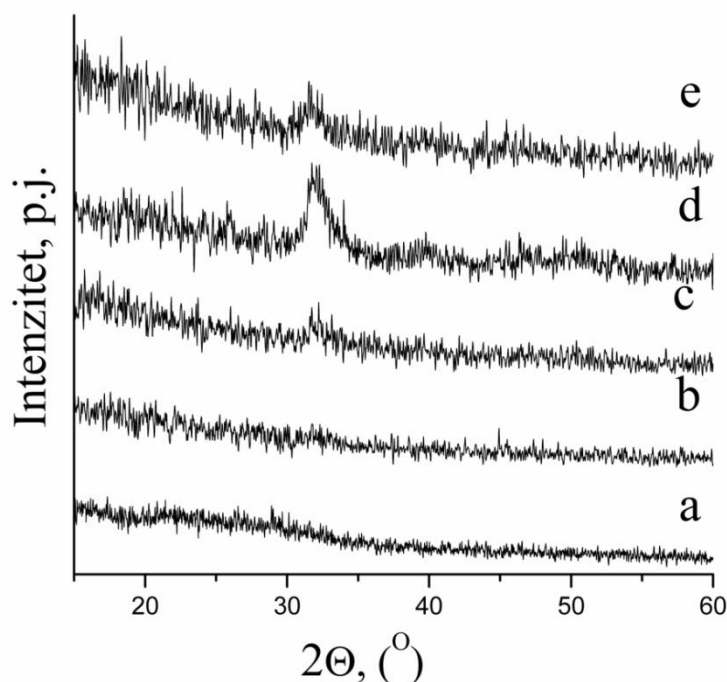
XRD difraktogrami inicijalnih i hidrogelova nakon 14 dana u SBF pod različitim hidrodinamičkim uslovima prikazani su na slici 4.52.



**Slika 4.52** XRD difraktogrami: A) inicijalnih uzoraka, B) uzoraka nakon 14 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti u statičkoj kontrolnoj studiji, C) uzoraka nakon 14 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti u protočnom bioreaktoru, D) uzoraka nakon 14 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti u bioreaktoru sa dinamičkom kompre

Prisustvo polimera i amorfne faze u uzorcima pre i nakon 14 dana u hidrodinamičkim uslovima jasno se primećuje na svim prikazanim difraktogramima, čiji izgled odgovara uzorcima niske kristalinočnosti. Kako bismo jasnije izdvojili pikove koji potiču od konverzije BAG u mineralnu fazu kalcijum fosfata, i uporedili uticaj hidrodinamičkih uslova na formiranje mineralne faze, na prikazane difraktograme primenjena je metoda usrednjavanja dobijenih vrednosti, te su rezultati prikazani zajedno sa difraktogramom za BAG na slici 4.53.





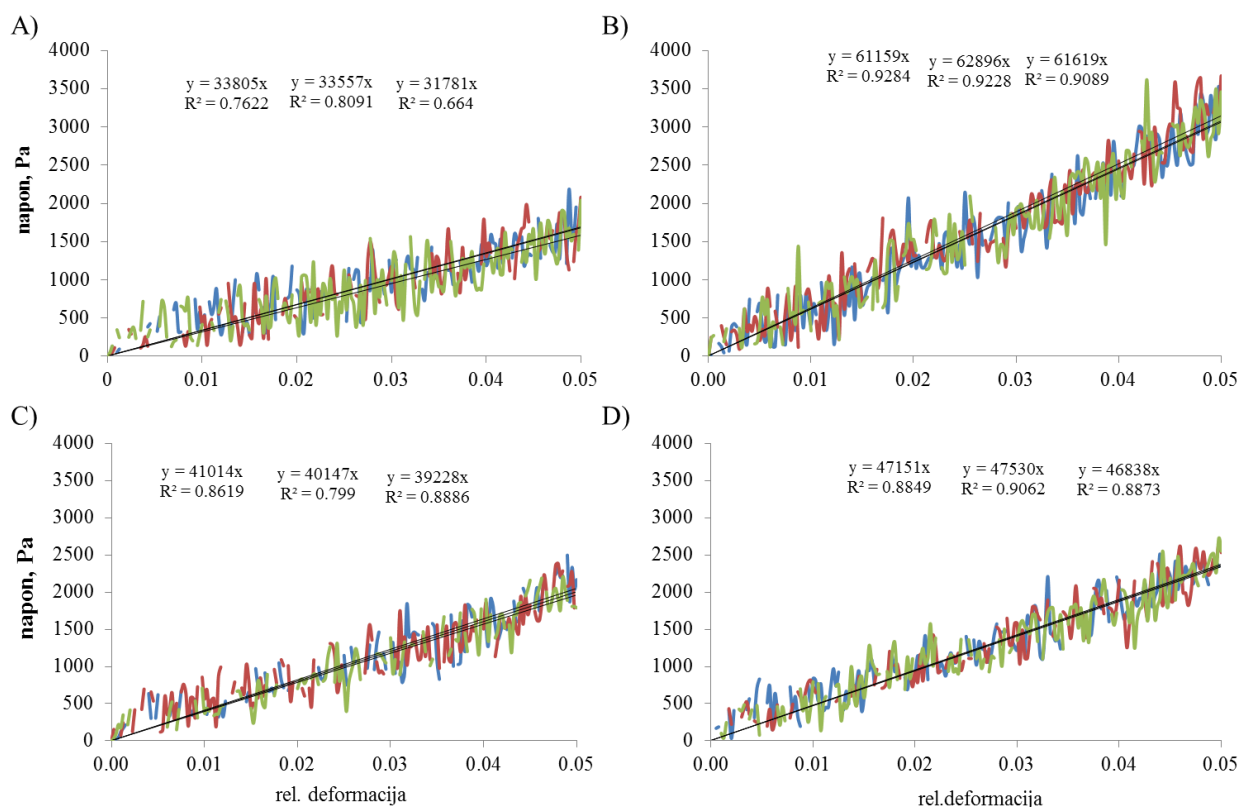
**Slika 4.53** Usrednjeni XRD difraktogrami: A) referentnog praha bioaktivnog stakla, B) inicijalnih uzoraka, C) uzoraka nakon 14 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti u statičkoj kontrolnoj studiji, D) uzoraka nakon 14 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti u protočnom bioreaktoru, E) uzoraka nakon 14 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti u bioreaktoru sa dinamičkom kompre

Ni nakon usrednjavanja manje intenzivni pikovi mineralne faze na difraktogramima hidrogelova jasno se ne izdvajaju, već su pokriveni šumovima koji potiču od polimerne faze GG i amorfne faze BAG. Najintenzivniji, karakteristični pik za HAp i kalcijum fosfate na  $\sim 32^\circ$   $2\Theta$  (Surmenev i sar., 2019), jasno se uočava kod uzoraka iz protočnog bioreaktora i bioreaktora sa dinamičkom kompresijom. U prvom slučaju, moguće je uočiti i nekoliko manje intenzivnih pikova na  $\sim 26^\circ$  i  $\sim 40^\circ$   $2\Theta$  (slika 4.52d), takođe karakterističnih za kalcijum fosfate (Krupa-Zuczek i sar., 2008, Safarzadeh i sar., 2018). Dobijeni XRD difraktogrami ukazuju na prisustvo mineralne faze unutar svih ispitivanih hidrogelova, sa jasnim pokazateljima da je udeo mineralne faze najveći kod hidrogelova iz protočnog bioreaktora i da taj odnos opada kada se posmatraju uzorci iz bioreaktora sa dinamičkom kompresijom i iz statičke studije, redom. Rezultati XRD analize su potvrdili prethodne rezultate SEM i EDS analize koje su pokazale da direktan protok utiče na značajnije formiranje mineralne faze kalcijum fosfata.

#### 4.2.3.2.6 Mehaničke karakteristike

Mehaničke karakteristike makroporoznih hidrogelova sa otvorenim porama – serija C, određene su u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom pri 5% deformacije na 0,68 Hz, na početku i na kraju eksperimenta, odnosno 14-tog dana ispitivanja.

Krive napona, zavisno od deformacije, pratile su linearnu zavisnost ( $R^2 > 0,8$ ), što je omogućilo određivanje dinamičkih modula elastičnosti iz nagiba najboljih linearnih trendova (slika 4.54).



**Slika 4.54** Grafici zavisnosti napona od primenjene deformacije određene u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom pri brzini kompresije  $337,5 \mu\text{m/s}$ , za inicijalne uzorke (A) i uzorke nakon 14 dana u SBF: u protočnom bioreaktoru (B), bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom (C), statičkoj studiji (D)

Vrednosti dinamičkih modula elastičnosti za inicijalne i uzorke iz različitih hidrodinamičkih uslova nakon 14 dana u prisustvu SBF, sumirane su u tabeli 4.7.

**Tabela 4.7** Sumirane vrednosti dinamičkog modula elastičnosti određene u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom za inicijalne i uzorke iz protočnog bioreaktora (p), bioreaktora sa dinamičkom kompresijom (d) i iz statičke studije (s) nakon 14 dana u prisustvu simulirane telesne tečnosti

<i>Uzorak</i>	<b>Dinamički modul elastičnosti, <i>kPa</i></b>
i	$33,0 \pm 1,1$
p	$61,9 \pm 0,9$
d	$40,1 \pm 0,9$
s	$47,2 \pm 0,3$

Za sve ispitivane hidrogelove dinamički moduli elastičnosti, određeni nakon 14 dana u SBF, porasli su u poređenju sa vrednošću za inicijalne hidrogelove. Najmanji porast dinamičkog modula elastičnosti je primećen za hidrogelove iz bioreaktora sa dinamičkom kompresijom (za  $\sim 21\%$ ). Očekivano, najveća vrednost dinamičkog modula elastičnosti dobijena je za hidrogelove iz

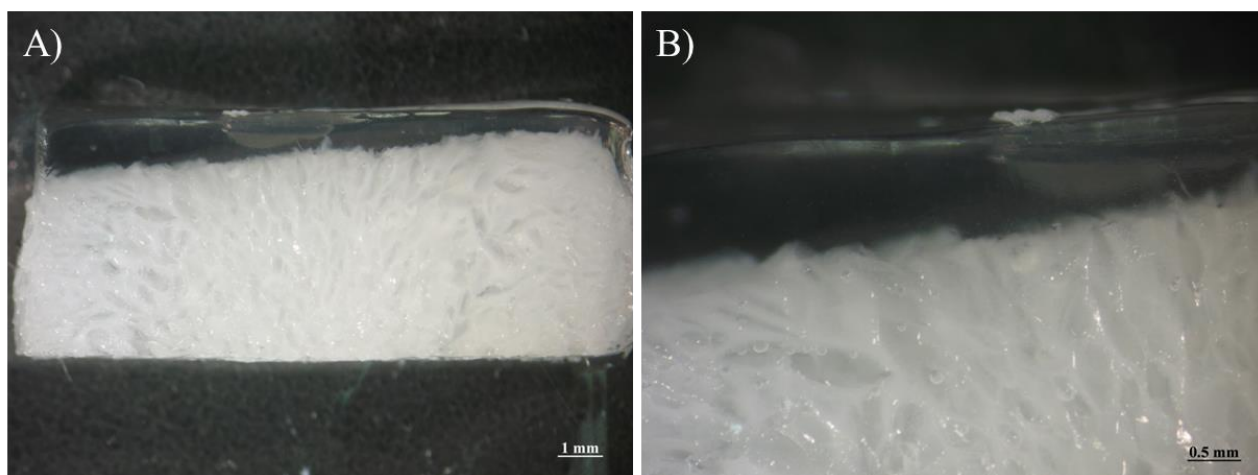
protočnog bioreaktora. Ovi rezultati jasno ukazuju da je stvaranje mineralne faze poboljšalo mehaničke karakteristike hidrogelova. Dobijena vrednost dinamičkog modula elastičnosti za hidrogelove iz bioreaktora sa dinamičkom kompresijom može se objasniti slabljenjem porozne mreže polimera usled ponovljenih ciklusa kompresije, što je primećeno i u studiji sa serijom hidrogelova sa unutrašnjim porama. Uticaj slabljenja polimerne strukture je dominantan u odnosu na porast sadržaja mineralne faze.

#### 4.3 DVOFAZNI IMPLANTATI ZA INŽENJERSTVO OSTEONDRALNOG TKIVA

U okviru ove disertacije razvijeni su dvofazni implantati za potencijalnu primenu u inženjerstvu osteohondralnog tkiva. Polazna hipoteza je bila da se u ovom pristupu može koristiti GG kao polazni materijal, koji se može dobiti u formi uniformnog hidrogela sa karakteristikama koje odgovaraju tkivu hrskavice i u formi makroporoznog hidrogela sa nanočesticama BAG koji bi podsticao regeneraciju tkiva kosti. Za dobijanje adekvatnih implantata korišćeno je šest različitih pristupa (poglavlje 3.12), sa ciljem da se ostvari dobra integracija ovih slojeva u vidu tanke, prelazne zone.

Postupci dobijanja dvofaznih implantata, zasnovani na prelivanju rastvora GG temperature 70°C preko makroporoznih hidrogelova GG-BAG vlažnih rehidratiranih ili rehidratiranih uzoraka uronjenih u rastvor PBS (temperirani na -22°C, 4°C i 25°C), rezultirali su formiranjem nedovoljno dobre integracije između slojeva. Kod obe serije uzoraka na temperaturama iznad 0°C gornji sloj (GG hidrogel) odvajao se od makroporoznog GG-BAG sloja prilikom procesa stabilizacije u PBS. Sa druge strane, na temperaturi ispod 0°C rehidratirani GG-BAG sloj je bio potpuno zaleđen, te je prilikom preliivanja rastvora GG dolazilo do njegovog trenutnog geliranja iznad zaleđenog GG-BAG sloja, tako da je izostala integracija slojeva.

Prelivanje kao i uranjanje suvih GG-BAG makroporoznih hidrogelova na sobnoj temperaturi (25°C) sa rastvorom GG, temperature 70°C, pokazalo se neadekvatnim usled nemogućnosti kontrole debljine zone integracije. Naime, preliivanjem rastvora GG preko makroporoznog hidrogela GG-BAG dolazilo je do potpunog prodiranja rastvora GG (slika 4.55a) i formiranja gela unutar pora GG-BAG sloja (slika 4.55b), čime je narušena potrebna poroznost osteo-dela dvofaznog implantata.



**Slika 4.55** Poprečni presek dvofaznog implantata dobijenog prelivanjem rastvora gelanske gume preko suvog makroporoznog uzorka na bazi gelanske gume i bioaktivnog stakla; A) ceo poprečni presek, razmernik 1 mm, B) zona kontakta slojeva, razmernik 0,5 mm

Sa druge strane, usled visoke hidrofilitnosti suvog GG-BAG makroporoznog hidrogela, uranjanjem u rastvor GG, mikrokapilanim silama, došlo je do integracije slojeva i formiranja prelazne zone debljine 3-4 mm. Iako je dobijena dobra integracija između slojeva, debljina prelazne zone je značajno veća u odnosu na prirodno osteohondralno tkivo, gde zona kalcifikovane hrskavice iznosi oko 0,4 mm (*Frisbie i sar., 2006*).

Sa ciljem određivanja optimalnog pristupa i uslova izlivanja GG rastvora, razvijen je jednostavan matematički model (*Radonjić, 2017*), koji opisuje proces geliranja sloja GG. Model je poslužio za predviđanje optimalnih temperatura rastvora GG i makroporoznih hidrogelova GG-BAG u cilju formiranje tanke prelazne zone.

Primenjen je model jednodimenzionog nestacionarnog provođenja toplote, (*Radonjić, 2017*):

$$\frac{\partial T}{\partial t} = a \frac{\partial^2 T}{\partial x^2} \quad (6)$$

gde je:  $a$  termička difuzivnost, koja se može izračunati na osnovu  $\rho$  – gustina GG,  $C_p$  – toplotnog kapaciteta GG i  $\lambda$  – toplotne provodljivosti.

Za početni uslov, temperatura rastvora GG  $T_{g0}$  usvojeno je:

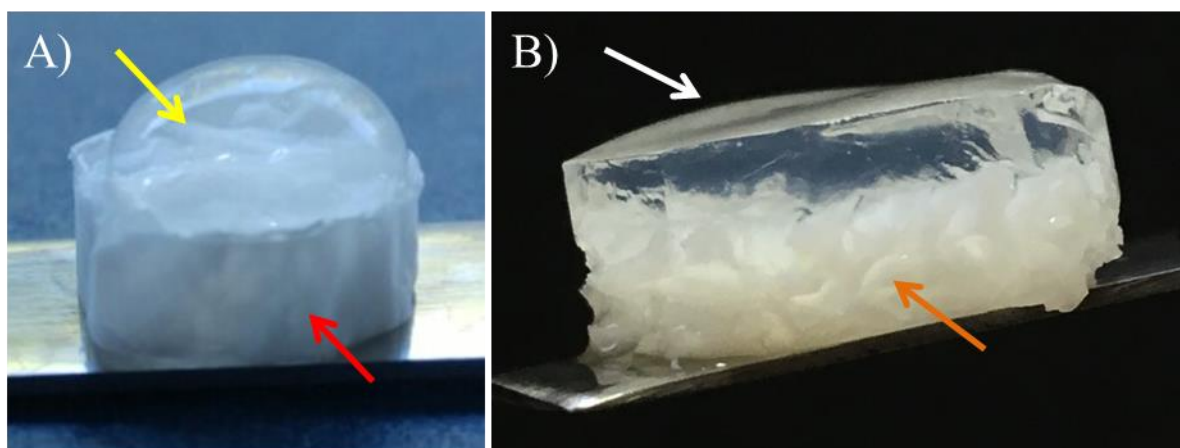
$$\text{za } t = 0 \text{ i } 0 \leq x \leq h \quad T = T_{g0}$$

dok su za granične uslove postavljeni:

$$\begin{aligned} t > 0; \quad x = 0 \quad T = T_o \\ \quad \quad \quad x = h \quad T = T_u \end{aligned}$$

Jednačina 6 je rešena numerički primenom Šmitove metode pri čemu su za granične uslove  $T_o = -25^\circ\text{C}$  i  $T_u = -25^\circ\text{C}$  i početni uslov  $T_{g0} = 60^\circ\text{C}$  dobila zadovoljavajuća brzina i temperature geliranja sloja GG (*Radonjić, 2017*).

Na taj način dobijeni su uzorci iz serije E i F, sporim izlivanjem rastvora GG temperature  $60^\circ\text{C}$  uz pomoć pipete, preko suvih makroporoznih uzoraka GG-BAG u kriostatu na temperaturi  $-25^\circ\text{C}$ . Ovi uzorci su se odlikovali dobrom integracijom između slojeva i prelaznom zonom debljine  $\sim 1$  mm (slika 4.56).



**Slika 4.56** Dvofazni implantati sa adekvatnom integracijom slojeva, dobijeni nakon optimizacije temperatura slojeva primenom matematičkog modela: A) sa neporoznim osteo-slojem u radijalnom pravcu i kalotom u hondralnom delu (serija E), B) sa poroznim osteo-slojem u radijalnom pravcu i ravnim hondralnim delom (serija F); (žuta strelica označava dobijeni hondralni deo u obliku kalote, bela strelica označava ravni hondralni deo, crvena strelica označava neporozni osteo-deo, naranžasta strelica označava porozni osteo-deo)

U tabeli 4.8 sumirani su različiti pristupi kojima se nastojalo dobiti dvofazni implantat poželjnih karakteristika.

**Tabela 4.8** Sumaran prikaz serija uzoraka i načina njihove pripreme

<i>Seriya</i>	<i>Način dobijanja dvofaznog hidrogela</i>	<i>Stanje i temperatura makroporoznog dela implantata</i>	<i>Temperatura rastvora gelanske gume</i>	<i>Opis uzorka</i>
<b>A</b>	prelivanje rastvora GG preko GG-BAG	rehidratirani 25°C, 4°C i –22°C	70°C	razdvajanje slojeva
<b>B</b>	prelivanje rastvora GG preko GG-BAG	rehidratirani i uronjeni u PBS 25°C, 4°C i –22°C	70°C	razdvajanje slojeva
<b>C</b>	prelivanje rastvora GG preko GG-BAG	suvi, 25 °C	70°C	nemogućnost kontrolisanja debljine prelazne zone
<b>D</b>	uronjenje GG-BAG u rastvor GG	suvi, 25 °C	70°C	nemogućnost kontrolisanja debljine prelazne zone
<b>E</b>	prelivanje rastvora GG preko GG-BAG	suvi, -25 °C	60°C	dobra integracija, adekvatna debljina prelazne zone, formiranje kalote u hondralnom delu, anularna zona osteo dela neporozna
<b>F</b>	prelivanje rastvora GG preko GG-BAG isecanje središnjeg dela	suvi, -25 °C	60°C	dobra integracija, adekvatna debljina prelazne zone

Tokom geliranja GG kod uzoraka dobijenih prelivanjem GG preko suvog makroporoznog hidrogela GG-BAG, serija E pod dejstvom sila površinskog napona, formiran je hidrogel čija je gornja površina imala oblik kalote (slika 4.55a označeno žitom strelicom). Deo kalote je odstranjen, kako bi se dobila ravna površina potrebna za dalja ispitivanja. Finalno su dobijeni uzorci prečnika 12 mm i ukupne debljine oko 4,5 mm, od čega je donji sloj bio debljine oko 2 mm, prelazna zona debljine oko 1 mm i gornji sloj debljine oko 1,5 mm. Pošto su korišćeni GG-BAG makroporozni hidrogelovi (serija C) dobijeni modifikovanom metodom, lateralne površine su bile praktično neporozne. Dobijena su ukupno 4 uzorka na ovaj način.

Uzorci dobijeni prelivanjem GG preko suvog makroporoznog hidrogela GG-BAG iz serije F proizvedeni su na isti način kao i uzorci iz serije E samo što su iz dobijenih uzoraka prečnika 17 mm, isecani uzorci prečnika 12 mm i ukupne visine 6 mm. Visina donjeg sloja iznosila je oko 3 mm, dok je prelazna zona bila ~ 1 mm, a gornji sloj ~ 2 mm. Za razliku od uzoraka iz serije E, uzorci iz serije F imali su porozne lateralne površine donjeg sloja što je omogućilo protok fluida kako u aksijalnom, tako i u radijalnom pravcu (slika 4.55b, označeno narandžastom strelicom). Pošto je početna veličina ovih uzoraka bila 17 mm, isecanjem centralnog dela prečnika 12 mm dobijena je ravna površina gornjeg sloja (slika 4.55b, označeno belom strelicom).

Dobijeno je ukupno 12 uzoraka na ovaj način.

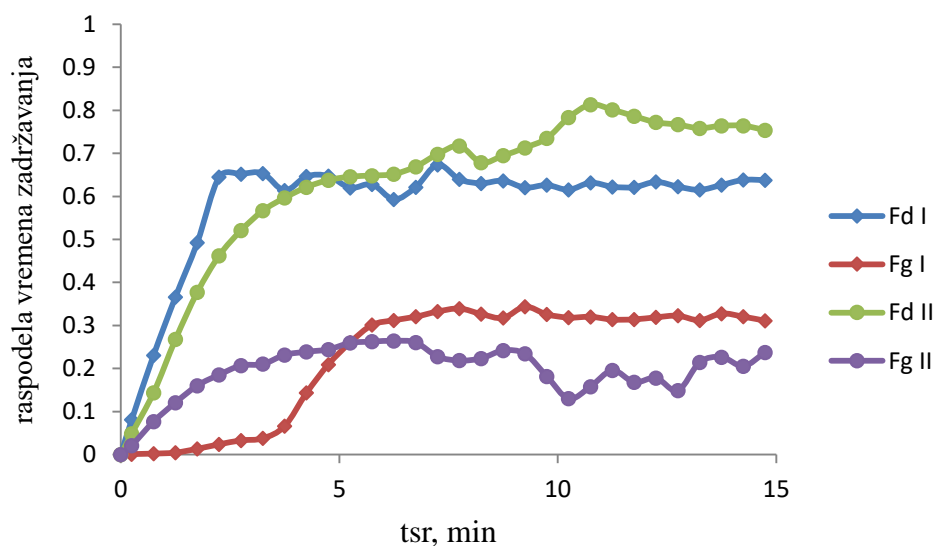
### 4.3.1 Određivanje raspodele vremena zadržavanja i distribucije obeležene supstance u komorama za osteohondralne implante

Komore bioreaktora sa dinamičkom kompresijom i protokom medijuma sa dva ulaza i dva izlaza, namenjene za inženjerstvo osteohondralnih implantata, ispitane su prvo u pogledu raspodele vremena zadržavanja i distribucije dva tipa medijuma, kao modela za hondrogeni i osteogeni medijum. Kao model osteohondralnog tkiva korišćeni su sinterovano staklo i alginatni diskovi.

Prvo je bilo potrebno izabrati adekvatan obelježivač koji će u sistemu predstavljati drugi medijum (pored vode), takav da omogućava određivanje koncentracije u izlaznoj struji spektrofotometrijski, a da se ne apsorbira unutar diska. Stoga su diskovi alginata potapani u rastvore potencijalnih obeleživača (metilensko plavo, eozin žuto, metil crveno, *acridine orange* i rastvor mastila) u trajanju od 25 i 60 minuta, nakon čega su na karakterističnim talasnim dužinama za određeni obeleživač čitane apsorbance rastvorenih diskova. Rastvor mastila (početne koncentracije 0,04 ml/ml vode) je izabran kao adekvatan obeleživač, jer ni nakon 60 min nije primećen apsorpcioni pik kod rastvorenih diskova koji su bili potopljeni u ovaj rastvor.

Ekspiriment je izveden tako što je na sinterovano staklo postavljen alginatni disk; ulazi komore su povezani sa rezervoarima sa vodom i mastilom, a pomoću peristaltičke pumpe ostvaren je istostrujni protok oba tipa medijuma kroz komoru od 0,43 ml/min. Pri tome je mastilo dovođeno na donji, a voda na gornji ulaz.

Na slici 4.57 prikazane su koncentracije mastila na pojedinačnim izlazima, normalizovane u odnosu na početnu koncentraciju mastila, odnosno F krive, za dva ponovljena merenja bez primene dinamičke kompresije.



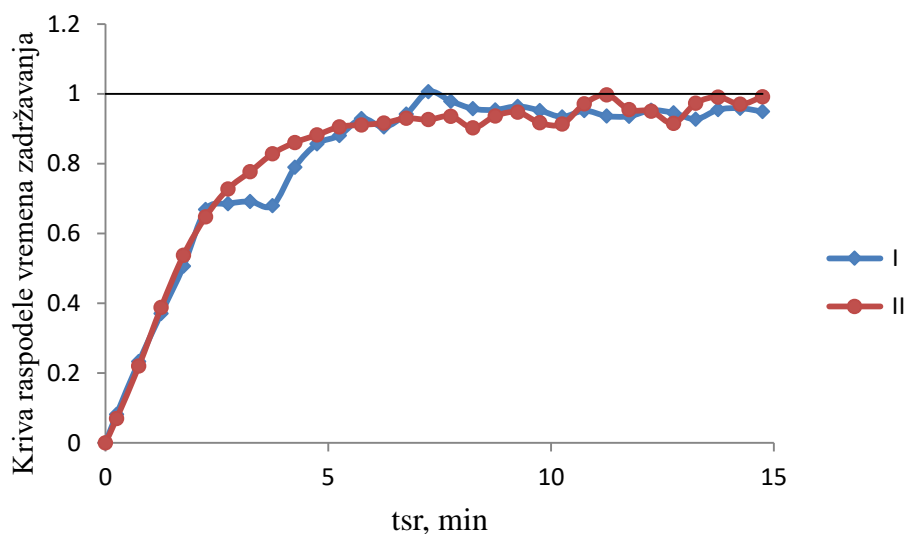
**Slika 4.57** Kriva raspodele vremena zadržavanja za pojedinačne izlaze za dve serije merenja bez dinamičke kompresije; Fd – krive raspodele vremena zadržavanja na donjem izlazu, Fg – krive raspodele vremena zadržavanja na gornjem izlazu

Sa slike 4.57 za obe serije merenja primećuje se relativno slično strujanje i očekivani trend rasta koncentracije mastila u izlaznim strujama sa vremenom, kao i značajna koncentracija mastila na gornjem izlazu.

Rezultati prve serije merenja pokazuju da u prvih 2,5 min dolazi do porasta koncentracije mastila u izlaznoj struji, pri čemu skoro sva količina mastila izlazi na donji izlaz. Nakon ovog perioda količina mastila u donjoj struji ostaje praktično konstantna do kraja eksperimenta (~ 65% ukupne količine mastila). Slično zapažanje važi i za izlaznu struju na gornjem izlazu, gde u periodu

od 3 do 6 min značajno raste koncentracija mastila u izlaznoj struji, a potom se zadržava na tom nivou (~30% ukupne količine mastila). Za drugu seriju merenja F krive pokazuju pojedinačno značajno drugačiju raspodelu mastila u izlaznim strujama. Tokom II merenja, na samom početku je primećena distribucija mastila u oba toka izlaznih struja, pri čemu već u prvom minutu merenja ~10% mastila napušta sistem u gornjoj struji. Takođe je interesantno da nakon ravnomernog rasta koncentracije mastila u izlaznim strujama, posle 7 min dolazi do poremećaja toka fluida unutar komore, što se uočava kao promena koncentracije mastila u ispitivanim strujama. Porast koncentracije mastila u donjoj struji, jasno je praćen opadanjem koncentracije mastila u gornjoj struji. Na kraju eksperimenta, distribucija mastila u pojedinačnim strujama je bila ~20% ukupne količine mastila na gornjem izlazu i ~ 80% ukupne količine mastila na gornjem izlazu.

Kako bi se razmotrila ponovljivost merenja, ukupne F krive, dobijene sabiranjem F krivih na donjem i gornjem izlazu, za obe serije merenja bez dinamičke kompresije prikazane su na slici 4.58.

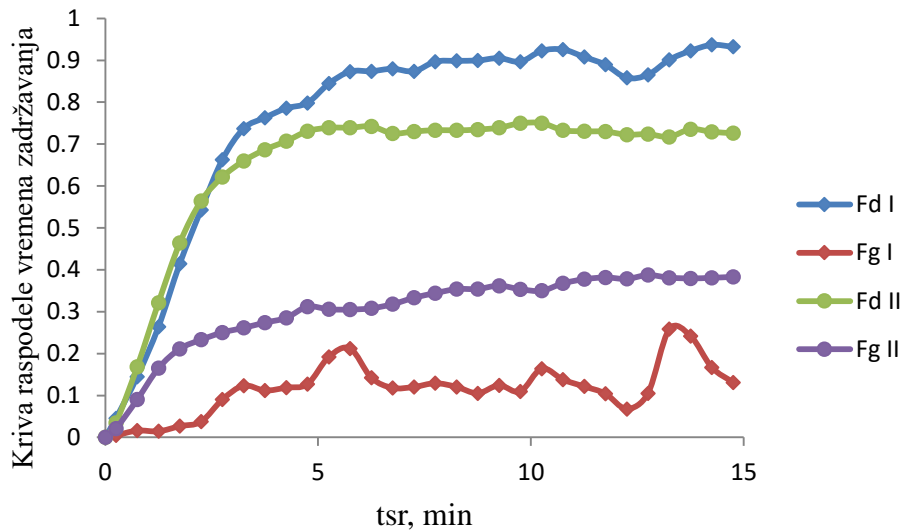


**Slika 4.58** Ukupne izlazne krive raspodele vremena zadržavanja za obe serije merenja bez dinamičke kompresije

Suprotno primećenim razlikama u distribuciji rastvora mastila u pojedinim delovima komore tokom ponovljenih ciklusa merenja, na osnovu slike 4.58 može se zaključiti da postoji dobro poklapanje ukupne F krive za ispitivani sistem, posebno u prvih 2,5 min, gde ne postoji odstupanje između merenja. Sa greškom manjom od 7% može se zaključiti da je prilikom merenja u oba sistema nakon 7 min došlo do zasićenja, tj. da je na izlazu postignuta ulazna koncentracija mastila.

Na slici 4.59 prikazane su koncentracije mastila na pojedinačnim izlazima, normalizovane u odnosu na početnu koncentraciju mastila, odnosno F krive, za dva ponovljena merenja u uslovima dinamičke kompresije (pri frekvenciji od 0,56 Hz, do 10% deformacije alginatnog diska).



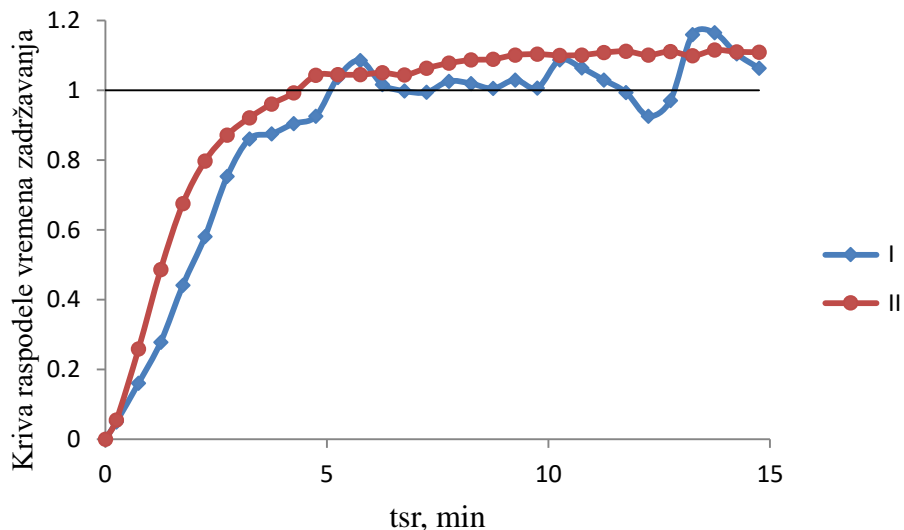


**Slika 4.59** Kriva raspodele vremena zadržavanja za pojedinačne izlaze za dve serije merenja pri dinamičkoj kompresiji; Fd – krive raspodele vremena zadržavanja na donjem izlazu, Fg – krive raspodele vremena zadržavanja na gornjem izlazu.

Sa slike 4.59 primećuje se razlika u strujanju u I i II eksperimentu, ali očekivani trend rasta koncentracije mastila u izlaznim strujama sa vremenom, kao i značajna koncentracija mastila na gornjem izlazu.

Rezultati prve serije merenja pokazuju da u prvih 2,5 min dolazi do porasta koncentracije mastila u izlaznoj struji, pri čemu skoro sva količina mastila izlazi na donjem izlazu. Nakon ovog perioda količina mastila u donjoj struji ostaje praktično konstantna do kraja eksperimenta (~90% ukupne količine mastila). Sa druge strane, koncentracija mastila u izlaznoj struji na gornjem izlazu oscilira tokom vremena, verovatno usled efekta dinamičke kompresije zadržavajući se na ~10% ukupne količine mastila.

Interesantno je da se i pri dinamičkoj kompresiji druga serija merenja značajno razlikovala od prve. Razlika u načinu strujanja nije posledica eventualne deformacije diskova, jer su isti između eksperimenata izvađeni iz bioreaktora, isprani i vraćeni. Na samom početku u obe struje je primećena distribucija mastila. Već nakon 2 min ~20% mastila je prešlo u gornju struju, dok je na kraju eksperimenta taj udeo iznosio ~35%. U donjoj struji nakon inicijalnog rasta do kraja merenja, koncentracija mastila je održana na ~70%. Na slici 4.60 prikazane su ukupne F krive određene u dinamičkim uslovima.



**Slika 4.60** Ukupne izlazne krive raspodele vremena zadržavanja za dve serije merenja u dinamičkim uslovima

Ukupne F krive za oba merenja pokazuju da su izlazne koncentracije mastila veće u odnosu na ulazne. Razlog može biti greška u merenju, ali može biti i posledica eventualnog isparavanja dela vode iz rastvora mastila. Takođe je primetno da F kriva druge serije merenja ima pravilniji oblik i ravnomerniji trend rasta koncentracije mastila.

#### 4.3.2 Karakterizacija dvofaznih implantata u biorektoru sa dinamičkom kompresijom

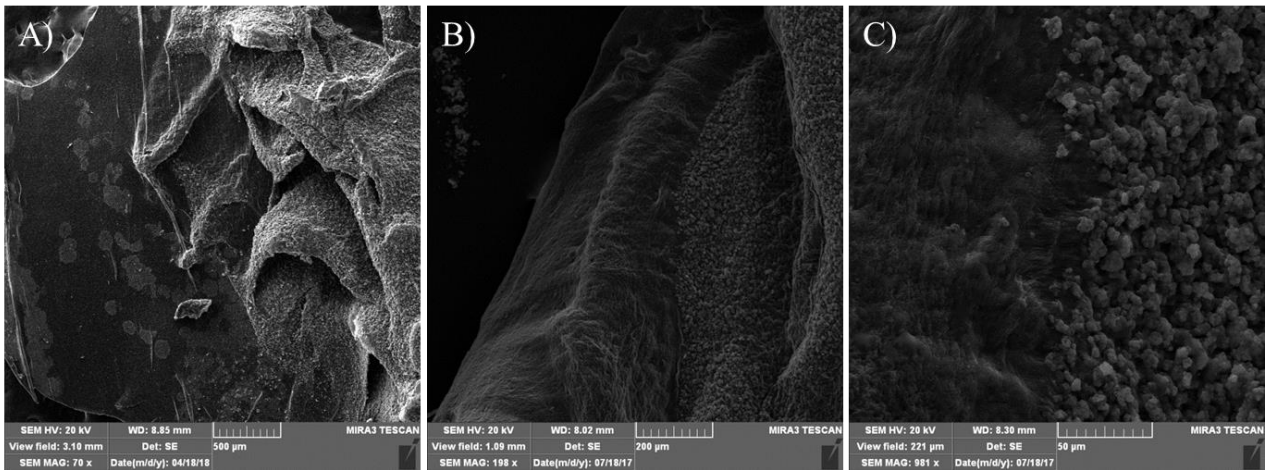
U dve odvojene studije ispitani su dvofazni implantati dobijeni prelivanjem GG preko suvog makroporoznog hidrogela GG-BAG sa neporoznim i potpuno poroznim osteo delom implantata, serije E i F (tabela 4.8) u biorektoru sa dinamičkom kompresijom, pri brzini kompresije od  $337,5 \mu\text{m/s}$ . U obe studije kroz biorektorske komore sa dva ulaza i dva izlaza uspostavljen je suprotnostrujni protok SBF od  $1,1 \text{ ml/min}$ .

U prvoj studiji na tri implantata iz serije E primenjena je dinamička kompresija u režimu 10% deformacije na sloj hidrogela GG (što odgovara nominalnom pomeraju od  $150 \mu\text{m}$ ), pri frekvenciji od  $1,1 \text{ Hz}$ , u režimu 1 h kompresije/1 h pauze. Studija je trajala 8 dana.

U drugoj studiji ispitana su četiri implantata iz serije F u toku 14 dana pri konstantnom protoku SBF. Na uzorke je od 7. dana primenjena dinamička kompresija u režimu 5% deformacije na sloj hidrogela GG (što odgovara nominalnom pomeraju od  $100 \mu\text{m}$ ), pri frekvenciji od  $1,14 \text{ Hz}$ , 1 h kompresije/dan. Paralelno je postavljena kontralna studija u statičkim uslovima.

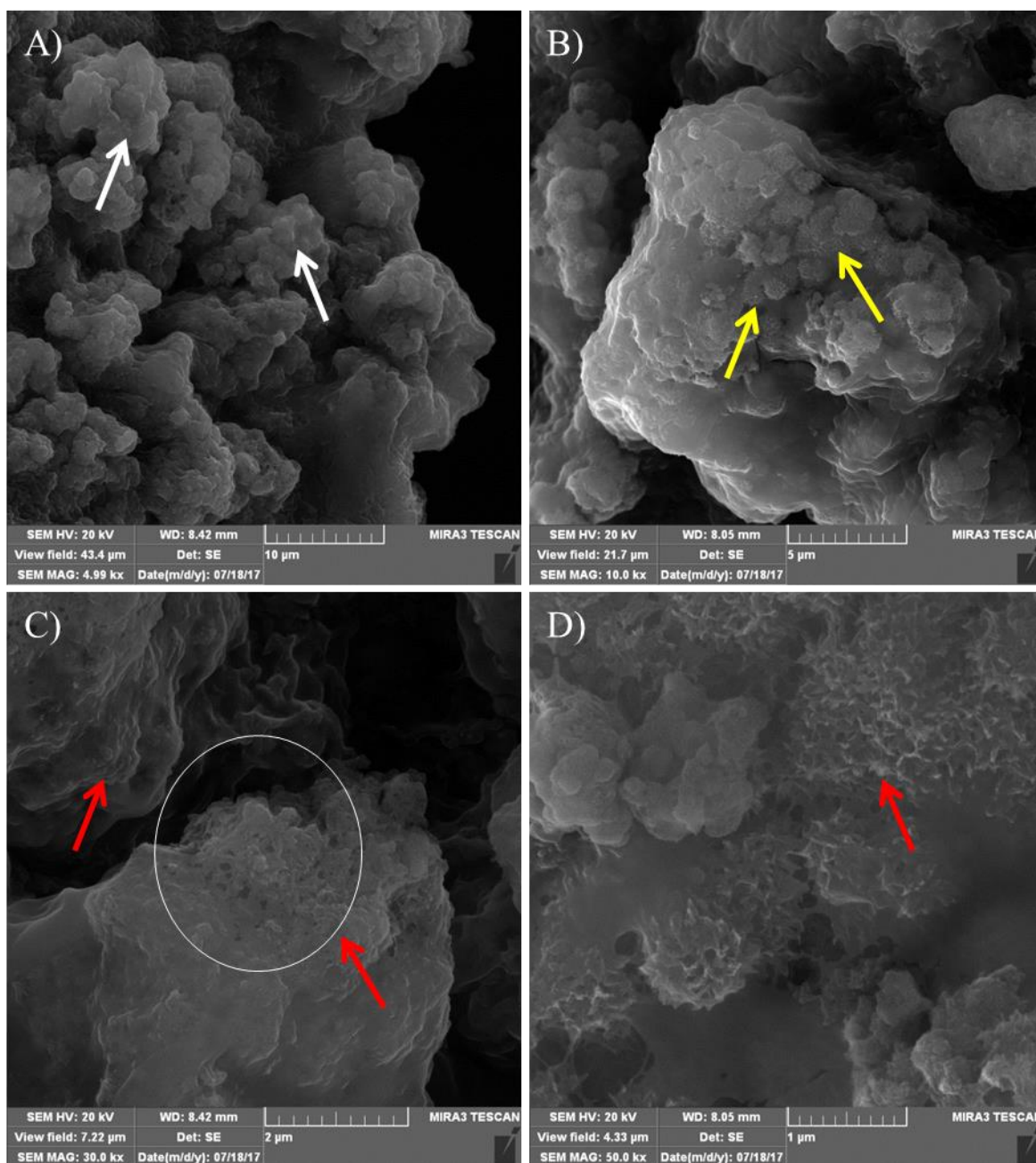
##### 4.3.2.1 Formiranje mineralne faze

U toku biorektorskog ispitivanja u uslovima dinamičke kompresije, obe grupe uzoraka su očuvale oblik i strukturu, kao i dobru integraciju između slojeva. Reprezentativne mikrofografije uzoraka i prelazne zone prikazane su na slici 4.61.



**Slika 4.61** SEM mikrografije prelazne zone na poprečnom preseke dvofaznog uzorka dobijenih prelivanjem rastvora gelanske gume preko suvih makroporoznih hidrogelova gelanske gume sa bioaktivnim staklom na optimalnoj temperaturi, kod kojih je dobijen potpuno porozan osteo deo implantata, serija F; A) razmernik = 300 µm, B) razmernik = 200 µm i C) razmernik = 50 µm

Na slici 4.62 prikazane su mikrografije uzoraka iz serije E ispitivanih u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom tokom 8 dana.



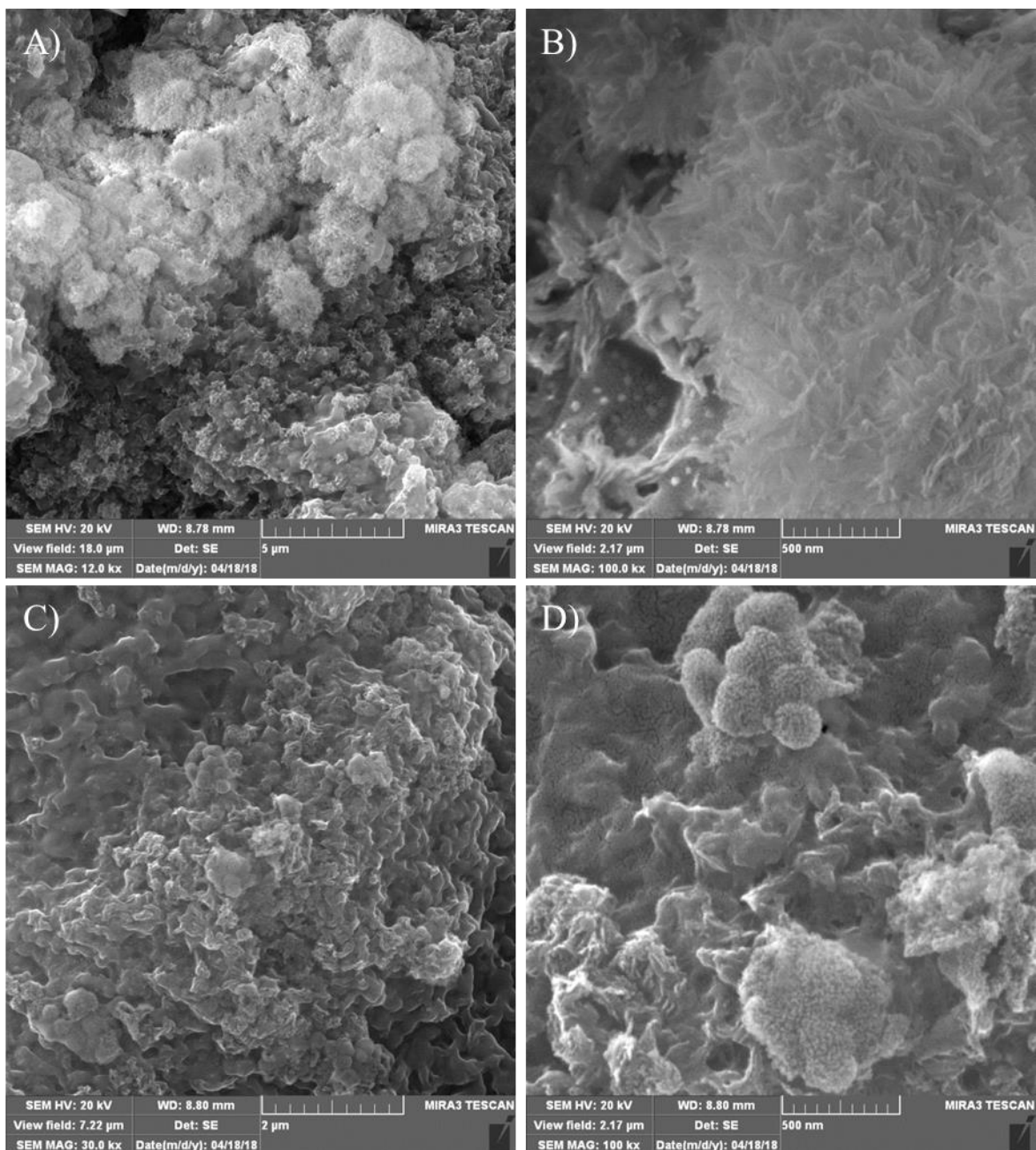
**Slika 4.62** SEM mikrofografije osteo-dela dvofaznih implantata dobijenih prelivanjem rastvora gelanske gume preko suvih makroporoznih hidrogelova gelanske gume sa bioaktivnim staklom na optimalnoj temperaturi, kod kojih je postojao neporozni sloj hidrogela oko osteo dela, serija E nakon 8 dana u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom; A) unutrašnjost uzorka, razmernik = 10  $\mu\text{m}$ , B) donji deo uzorka, razmernik = 5  $\mu\text{m}$ , C) donji deo uzorka, razmernik = 2  $\mu\text{m}$ , D) spoljašnja površina neporoznog dela uzorka, razmernik = 1  $\mu\text{m}$  (bele strelice označavaju globularne strukture bioaktivnog stakla, žute strelice označavaju mineralnu fazu formiranu u obliku cvetova karfiola, crvene strelice označavaju formiranje mineralne faze u početnoj fazi, bela kontura označava zonu unutar uzorka gde je došlo do formiranja igličastih struktura mineralne faze i delimične degradacije polimera)

Primećeno je da u unutrašnjosti, a posebno u zoni koja se nalazila u neposrednoj blizini gornjeg GG sloja, gotovo da nije došlo do mineralizacije i prelaska BAG u mineralnu fazu kalcijum fosfata. U ovom delu jasno se primećuju globularne strukture BAG koje još uvek ne ispoljavaju bioaktivnost u kontaktu sa SBF (4.62a, bele strelice). U donjem delu uzorka koji je bio u kontaktu sa dnom komore, došlo je do delimičnog prelaska BAG u mineralnu fazu pa se u ovom delu

izdvajaju sitnije strukture koje podsećaju na cvetove karfiola (slika 4.62b, žute strelice) i kristali u obliku štapica (slika 4.62c, crvene strelice), kakvi se sreću i kod HAp. Diskretna degradacija polimerne mreže primećena je na većim uvećanjima (slika 4.62c, bela kontura). U lateralnoj zoni osteo-dela dvofaznog uzorka koja je bila u direktnom kontaktu sa SBF, prisustvo mineralne faze kalcijum fosfata je bilo značajnije u odnosu na unutrašnjost uzorka, što se uočava prisustvom igličastih kristala. I u lateralnoj zoni osteo-dela dvofaznog uzorka mogu se uočiti i globularne strukture BAG, što ukazuje da period od 7 dana nije dovoljno dug za potpuni prelazak BAG u mineralnu fazu kalcijum fosfata.

Na slici 4.63 prikazane su mikrografije uzoraka iz serije F ispitivanih u bioreктору tokom 14 dana pod dinamičkom kompresijom u periodu od 7. do 14. dana, kao i iz kontrolne statičke studije.

U poređenju sa uzorcima iz statičke studije (4.63c i 4.63d), gde je došlo do formiranja mineralne faze mestimično i u obliku manjih minerala, u unutrašnjosti uzoraka iz bioreaktora sa dinamičkom kompresijom u potpunosti je došlo do prelaska BAG u mineralnu fazu kalcijum fosfata koja po svom izgledu veoma podseća na izgled HAp, što se može uočiti na slikama 4.63a i 4.63b. Protok SBF je i ovde uticao na formiranje mineralne faze, te ovi rezultati potvrđuju značaj kontinualnog protoka SBF i konventivnog prenosa, tako da formiranje mineralne faze nije difuziono limitirano.

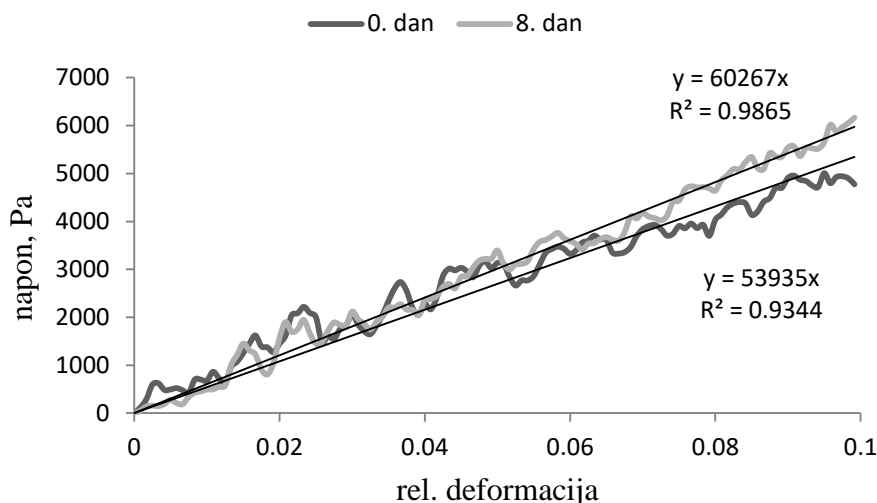


**Slika 4.63** SEM mikrografije osteo-dela dvofaznih implantata dobijenih prelivanjem rastvora gelanske gume preko suvih makroporoznih hidrogelova gelanske gume sa bioaktivnim staklom na optimalnoj temperaturi, kod kojih je osteo deo implantata bio potpuno porozan, serija F, nakon 14 dana: A, B) u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom u periodu od 7. do 14. dana i konstantnim protokom simulirane telesne tečnosti (A) razmernik = 5 µm, (B) razmernik = 500 nm); C, D) u statičkim uslovima: (C) razmernik = 5 µm, (D) razmernik = 500 nm)

#### 4.3.2.2 Mehaničke karakteristike

Zavisnost napona od primenjene deformacije za dvofazne uzorke iz serije E na početku i nakon 8 dana u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom, prikazana je na slici 4.64.

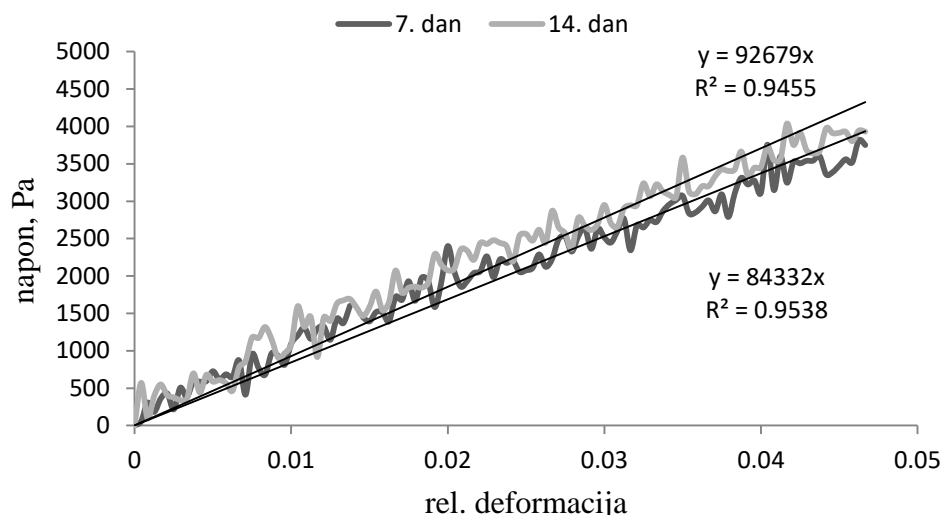




**Slika 4.64** Grafici zavisnosti napona od primenjene deformacije određene u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom pri brzini kompresije  $337,5 \mu\text{m/s}$  za dvofazne uzorke dobijene prelivanjem rastvora gelanske gume preko suvih makroporoznih hidrogelova gelanske gume sa bioaktivnim staklom na optimalnoj temperaturi, kod kojih je postojao neporozni sloj hidrogela oko osteo dela, serija E, na početku i nakon 8 dana u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom

Dinamički moduli elastičnosti su određeni iz srednjih linearnih zavisnosti napona od deformacije određenih metodom najmanjih kvadrata odstupanja. Ove vrednosti pri brzini kompresije od  $337,5 \mu\text{m/s}$  i frekvenci  $1,1 \text{ Hz}$  izosile su  $53,9 \pm 1,0 \text{ kPa}$  na početku i  $60,3 \pm 1,9 \text{ kPa}$  nakon 8 dana ispitivanja u bioreaktoru. Blaga porast vrednosti modula elastičnosti je najverovatnije posledica sleganja poroznog osteo-sloja dvofaznih uzoraka usled uzastopnih ciklusa dinamičke kompresije. Na sleganje sloja je ukazala i potreba za dotezanjem klipova bioreaktora 5. dana eksperimenta, kako bi se održao direktan kontakt između dijafragmi i površine uzoraka.

Zavisnost napona od primenjene deformacije za dvofazne implantate iz serije F na početku ciklusa kompresije (7. dana eksperimenta) i nakon 14 dana u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom, prikazana je na slici 4.65.



**Slika 4.65** Grafici zavisnosti napona od primenjene deformacije određene u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom pri brzini kompresije  $337,5 \mu\text{m/s}$  za dvofazne uzorke dobijene prelivanjem rastvora gelanske gume preko suvih makroporoznih hidrogelova gelanske gume sa bioaktivnim staklom na optimalnoj temperaturi, kod kojih je osteo deo implantata bio potpuno porozan, serija F,: a) na početku ciklusa kompresije, 7. dana eksperimenta, b) nakon 14 dana u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom

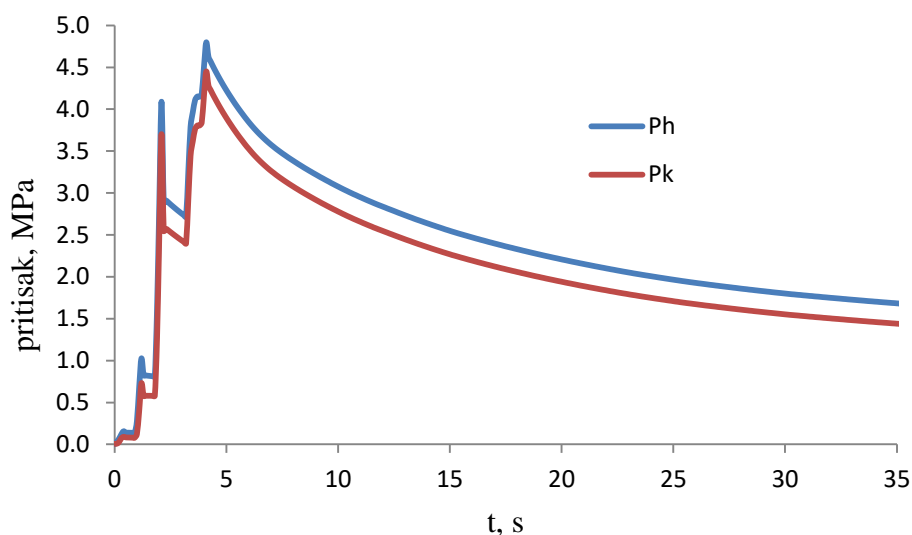
Vrednosti dinamičkog modula elastičnosti određene su iz srednje linearne zavisnosti napona od deformacije određene metodom najmanjih kvadrata odstupanja. Ove vrednosti pri brzini kompresije od  $337,5 \mu\text{m/s}$  i frekvenci  $1,14 \text{ Hz}$ , izosile su  $84,3 \pm 1,6 \text{ kPa}$  na početku ciklusa kompresije (7. dana eksperimenta) i  $92,7 \pm 1,9 \text{ kPa}$  nakon 14 dana ispitivanja u bioreaktoru, što nije statistički značajno različito.

#### 4.4 ISPITIVANJE RADA PROTOTIPA BIOREAKTORA SA HIDROSTATIČKIM PRITISKOM

U okviru ove disertacije ispitana su dva prototipa bioreaktora sa hidrostatičkim pritiskom za inženjerstvo tkiva intervertebalnog diska, u pogledu održavanja hidrostatičkog pritiska pri čemu je podizanje pritiska ostvareno manuelno. U cilju uspostavljanja korelacije pritisaka u hidrauličkoj i bioreaktorskoj komori ispitana je uticaj punjenja test komore.

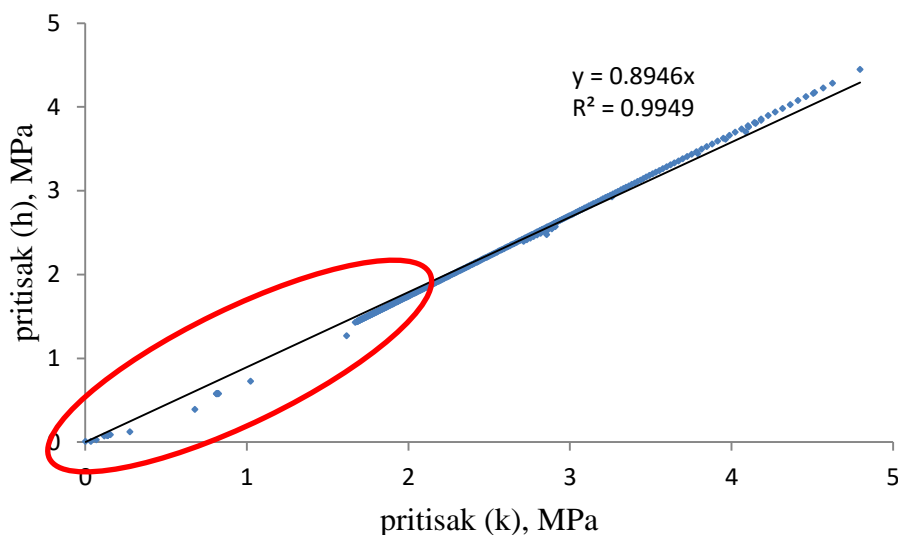
U prvom prototipu bioreaktora izvedeno je preko 120 merenja, pri čemu je korišćena test komora sa jednim ulaznim i jednim izlaznim priključkom za protok medijuma, što odgovara i finalnom rešenju komore. Pored toga što omogućavaju kontinualno recirkulisanje medijuma tokom perioda kada bioreaktorske komore nisu pod hidrostatičkim pritiskom, priključci za protok medijuma omogućavaju ručno uklanjanje mehurova gasa iz sistema.

Na slici 4.66 prikazan je jedan od primera izmerenih vrednosti zavisnosti pritisaka u hidrauličkoj i test komori.



**Slika 4.66** Zavisnosti pritiska u hidrauličkoj komori (Ph) i test bioreaktorskoj komori (Pk) od vremena tokom jednog od merenja u prototipu 1

Sa slike 4.66 se može uočiti da ne postoji sasvim jasna korelacija pritiska u test bioreaktorskoj komori u odnosu pritiska u hidrauličkoj komori. U prve 2 s merenja, pritisak u hidrauličkoj komori dostiže vrednost od ~1 MPa, dok je pritisak u test komori ~0,7 MPa, ukazujući na evidentno kašnjenje pritiska u donjoj komori. Pri maksimalno postignutim pritiscima tokom ovog merenja ta razlika je bila još izraženija (~0,4 MPa). Kao rezultat, dobijena je približno linearna zavisnost između ostvarenih pritiska u hidrauličkoj i test komori (slika 4.67).

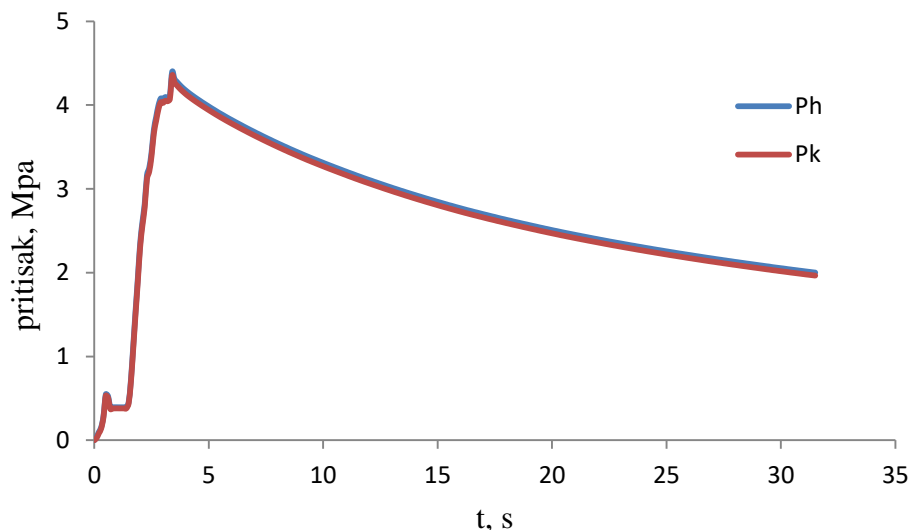


**Slika 4.67** Zavisnost pritiska u test bioreaktorskoj komori (Pk) od pritiska u hidrauličkoj komori (Ph) za jedno od reprezentativnih merenja u prototipu 1 (elipsa predstavlja oblast u kojoj je izražena nelinearnost)

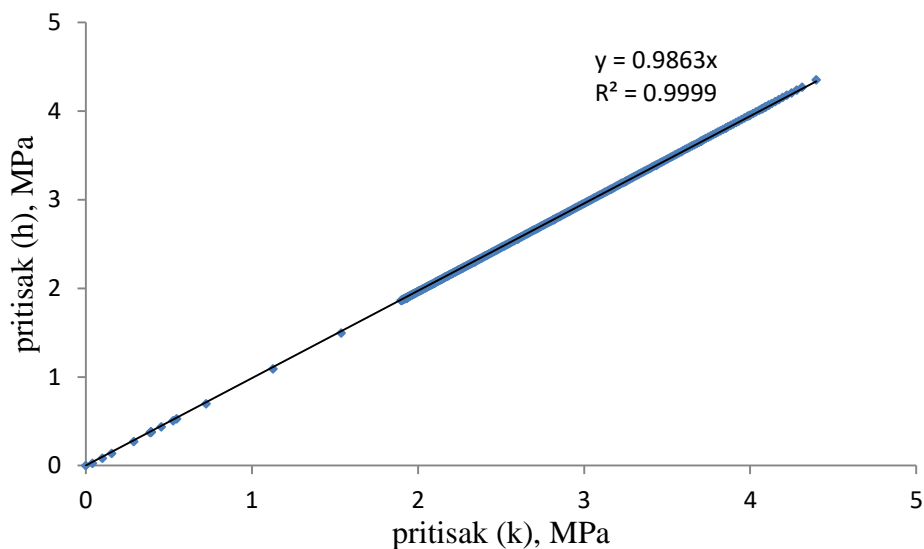
Sa slike 4.67 može se primetiti da pri manjim vrednostima pritiska eksperimentalne tačke nešto značajnije odstupaju od linearnosti, dok pri većim vrednostima (preko 2 MPa) zavisnost postaje linearna ( $R^2 > 0,99$ ). Međutim, efikasnost prenosa pritiska iz gornje u donju komoru je oko 90%. Ovaj rezultat sugerira na prisustvo gasovite faze unutar test komore i na potrebu za

revidiranjem punjenja komore. Usled toga je isprobano više metoda punjenja donje komore, a metod sa primenom igle i šprica je dao najbolji rezultat.

Na slici 4.68 prikazana je dobijena zavisnost pritiska u test od pritiska u hidrauličkoj komori gde se vidi da je izbegnuto formiranje gasovite faze unutar test komore. Na slici 4.69 je prikazana zavisnost izmerenih pritiska gde se uočava linearni trend u celom opsegu merenja ( $R^2 > 0,999$ ).



**Slika 4.68** Zavisnosti pritiska u hidrauličkoj komori (Ph) i test komori (Pk) od vremena u prototipu 1 fazi sa optimizovanim punjenjem komore



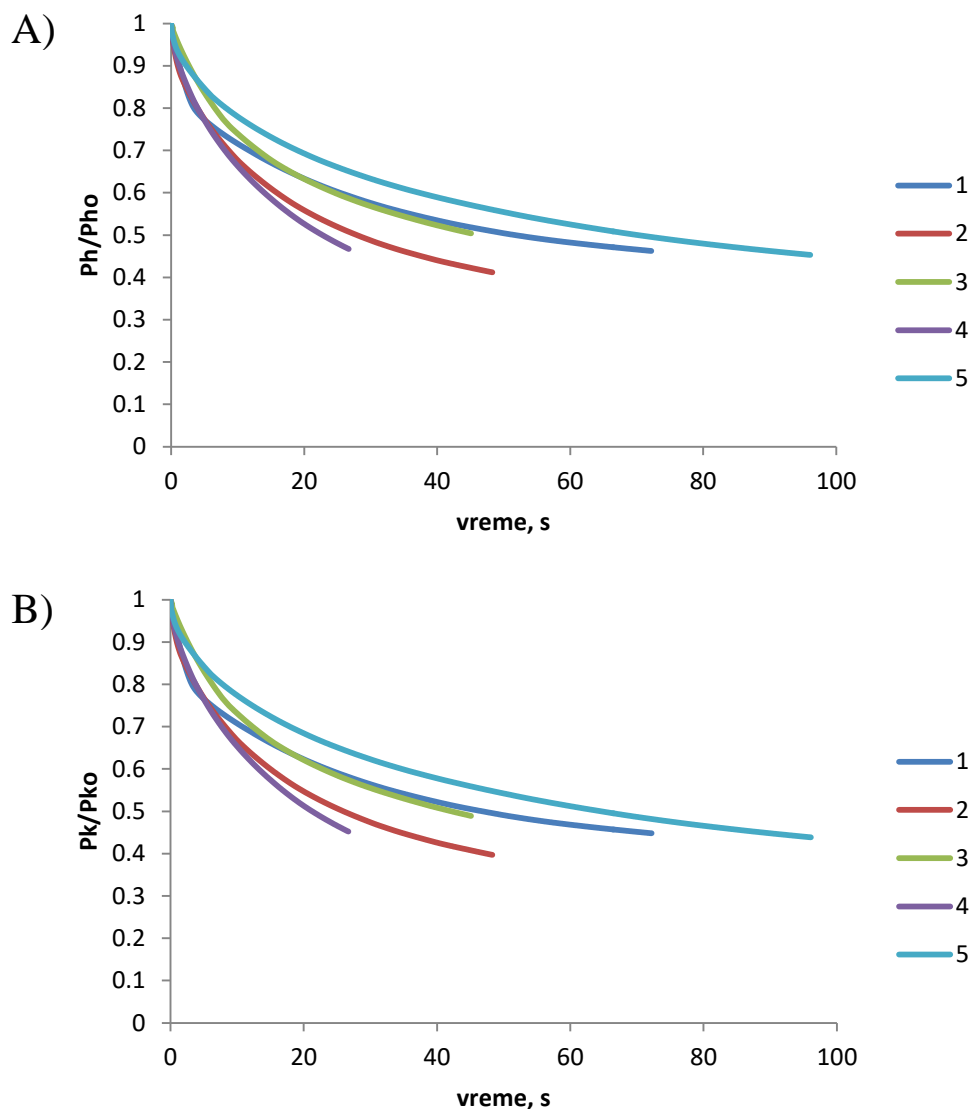
**Slika 4.69** Zavisnost pritiska u test komori (Pk) od pritiska u hidrauličkoj (Ph) komori za jedno od reprezentativnih merenja u prototipu 1 fazi

Za razliku od zavisnosti prikazane na slici 4.66, dobijene za merenje pri neadekvatnom punjenju, potpuno punjenje bioreaktorske komore omogućava prenošenje pritiska preko 98% i mogućnost predviđanja vrednosti pritiska na osnovu dobijene linearne zavisnosti.

Ručno, nekontrolisano povećanje pritiska je dalo različite krive zavisnosti pritiska od vremena, koje nije bilo moguće međusobno uporediti. Da bi se uporedili rezultati različitih merenja, dobijene vrednosti pritiska u odgovarajućim komorama normalizovane su u odnosu na maksimalne

vrednosti ostvarenih pritisaka, pri čemu je posmatran samo deo krive kada sistem počinje spontano da se relaksira, nakon dostizanja maksimuma.

Na slici 4.70 prikazani su grafici normalizovanih vrednosti pritiska za 5 proizvoljnih merenja prilikom spontane relaksacije sistema.



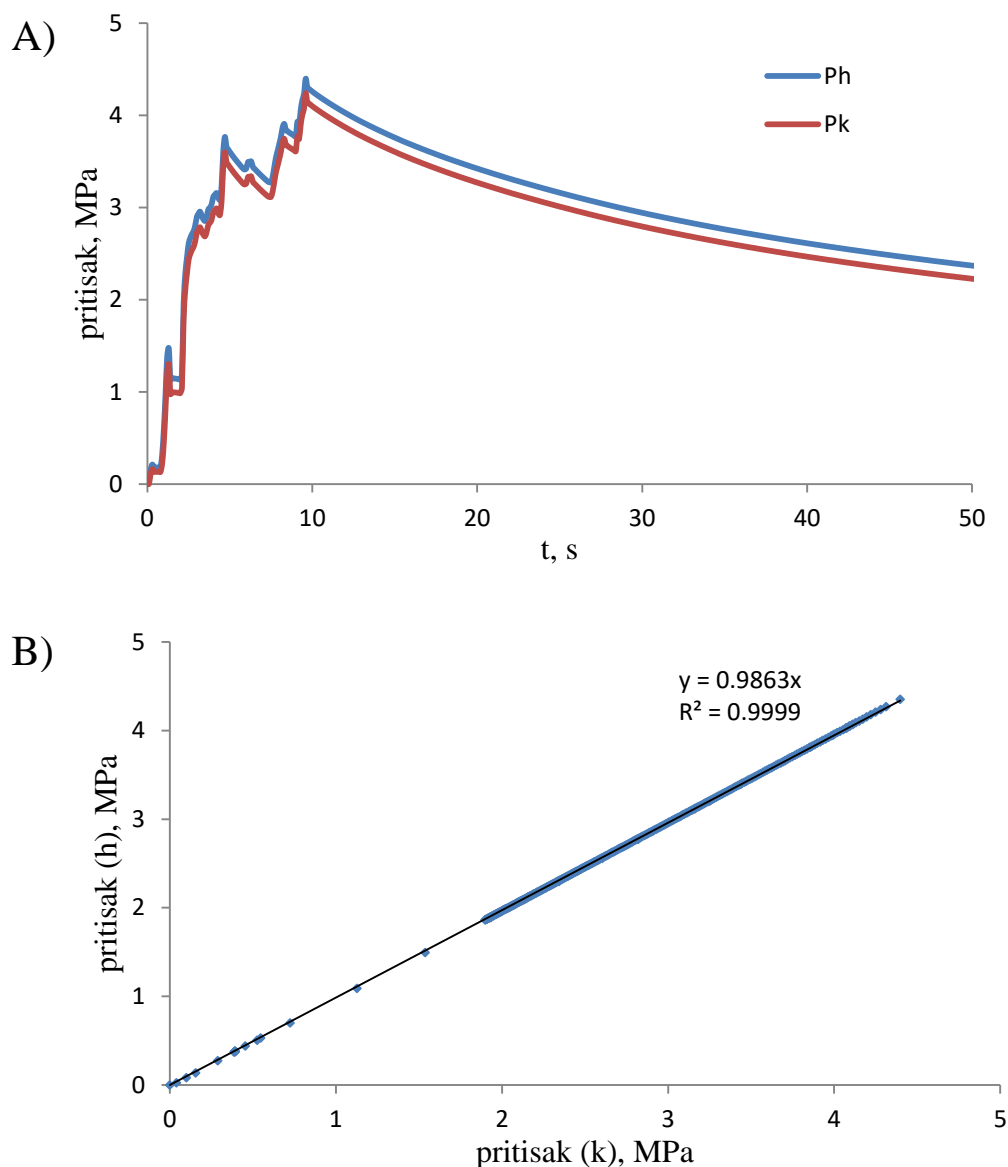
**Slika 4.70** Normalizovane vrednosti normiranih pritisaka u prototipu 1 u: a) hidrostatičkoj i b) test komori za 5 proizvoljnih merenja, prikazane u toku spontane relaksaciju sistema

Sa slike 4.70 uočava se da ne postoji ponovljivost merenja, tj. da se prilikom relaksacije brzina kojom se vrednosti pritiska smanjuju menja, u zavisnosti od eksperimenta, kao posledica, najverovatnije, konstrukcionih ograničenja samog sistema za povećanje pritiska.

U prototipu 2 bioreaktora test komora nije imala predviđene priključke, što je zahtevalo optimizaciju punjenja ove komore. Tokom ispitivanja testirana su dva načina punjenja:

- I. test komora je napunjena vodom, zatvorena membranom i hidrauličkom komorom,
- II. test komora je napunjena vodom, uz pomoć igle su uklonjeni svi mehurići zadržani na zidovima komore, a zatim tokom zatvaranja komore hidrauličkom komorom voda je ubrizgavana špricem.

Primenom I načina punjenja sa kojim je izvršeno ukupno 12 merenja, dobijeni su rezultati koji ukazuju na postojanje gasovite faze unutar test komore (slika 4.71, reprezentativni primer).

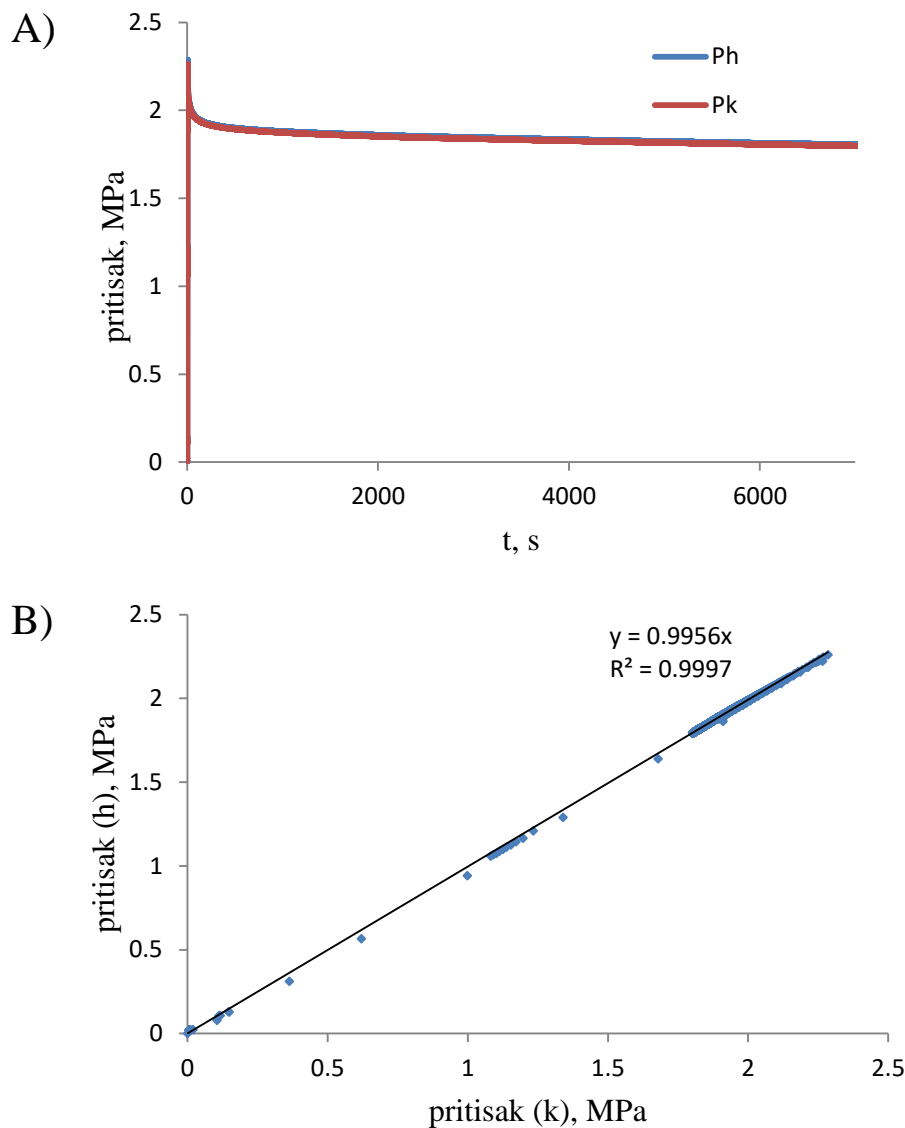


**Slika 4.71** Zavisnost pritiska u hidrauličkoj i test komori za merenja u prototipu 2, pri prvom načinu punjenja; a) zavisnost pritiska od vremena, b) međusobna zavisnost pritiska u komorama

Sa slike 4.71a može se primetiti da kašnjenje pritiska u test komori nije toliko izraženo kao kod merenja u prototipu 1, međutim prenošenje pritiska sa hidrauličke na bioreaktorsku komoru nije još uvek zadovoljavajuće.

Primenom II načina punjenja sa kojim je izvršeno ukupno 6 merenja, dobijeni su zadovoljavajući rezultati (slika 4.72, reprezentativni primer).



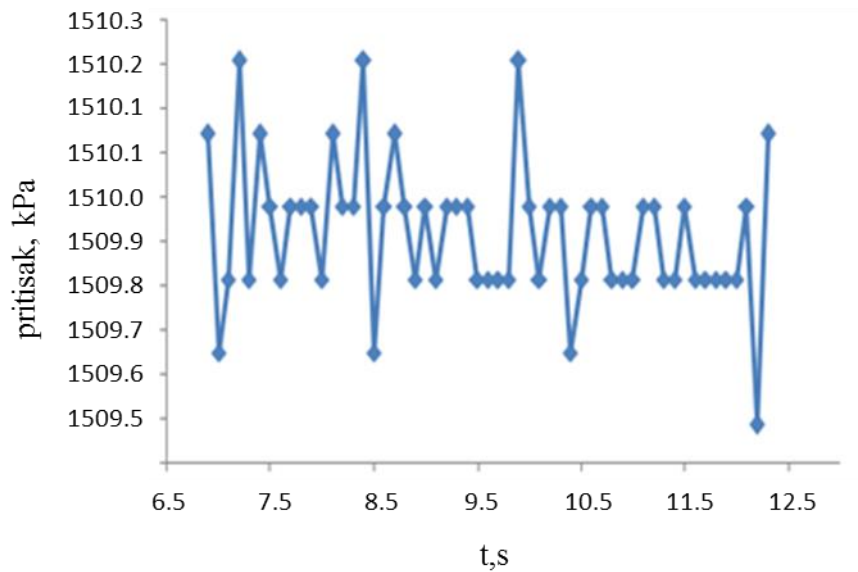


**Slika 4.72** Zavisnost pritiska u hidrauličkoj i test komori za merenje u prototipu 2 pri drugom načinu punjenja; a) zavisnost pritiska od vremena, b) međusobna zavisnost pritiska u komorama

Sa slike 4.72a može se primetiti dobro slaganje između pritiska u hidrauličkoj i test komori, kao i dobro prenošenje pritiska sa gornje na donju komoru (slika 4.72b). Ostvareno prenošenje pritiska veće od 99%, kao i dobijena zavisnost sa velikim koeficijentom linearnosti ( $R^2=0.9997$ ) ukazuju na adekvatno punjenje komore pre samog ciklusa hidrostatičke kompresije. Tokom merenja u dužem vremenskom periodu (2 h) pri II načinu punjenja, početna razlika pritiska između komora iznosila je 30 kPa, da bi na kraju merenja porasla na 70 kPa. Pri tome je pad pritiska u hidrauličkoj komori iznosio 480 kPa, a u test komori 470 kPa. Iako i dalje postoji razlika u brzini pada pritiska u komorama, može se uočiti da je pad pritiska prilikom adekvatnog punjenja daleko manji u odnosu na sistem gde postoji nedovoljno dobar prenos pritiska iz jedne u drugu komoru.

Na osnovu dobijenih rezultata ispitana je senzitivnost senzora pritiska i određena je frekvencija akvizicije podataka. Pri akviziciji podataka od 10 Hz tokom dužih eksperimenata, kao što su eksperimenti u oblasti inženjerstva tkiva, bio bi prikupljen veliki broj podataka, koje kasnije nije jednostavno obraditi. Sa druge strane tokom ispitivanja u prototipu 2, ustanovljeno je da je najveća brzina pada pritiska 5 Pa/s, što ostavlja prostor da se smanji frekvencija sa kojom se

prikupljaju podaci. Na slučajnom uzorku od 60 tačaka određena je srednja vrednost pritiska i relativna standardna devijacija (slika 4.73).



**Slika 4.73** Izdvojeni slučajni uzorak od 60 tačaka zabeležen sa senzora pritiska u hidrauličkoj komori tokom eksperimeta od 24 h pri adekvatnom punjenju u prototipu 2

Kada se izdvoji mali segment vrednosti ( $t = 6$  s) može se primetiti da postoje blagi šumovi prilikom očitavanja pritiska, na nivou relativne standardne devijacije od 0,01% (srednja vrednosti pritiska  $1509.8 \pm 16$  kPa). Ovaj rezultat ukazuje da se oscilacije senzora postavljenog u hidrauličkoj komori mogu zanemariti, a da se frekvencija akvizicije podataka može značajno smanjiti (blizu 60 puta).

## 5 DISKUSIJA

Cilj ove doktorske disertacije je bio dobijanje, razvoj i fiziološki relevantna karakterizacija različitih biomaterijala za potencijalnu primenu u regenerativnoj medicini i inženjerstvu skeletnih tkiva (hrskavice, kosti i osteohondralnog tkiva) sa posebnim akcentom na upotrebi biomimetičkih bioreaktora, kao 3D sistema, u razvoju i karakterizaciji dobijenih biomaterijala, shodno primeni.

Sveobuhvatna *in vitro* karakterizacija u fiziološki relevantnim uslovima, koji podrazumevaju 3D okruženje i obezbeđivanje fizičko-hemijskih i biomehaničkih uslova koji vladaju u specifičnom tkivu, predstavlja inovativan pristup u razvoju i karakterizaciji potencijalnih biomaterijala primenljivih u inženjerstvu tkiva i regenerativnoj medicini. Porožnost materijala, stepen bubrenje, mehanička stabilnost, brzina degradacije i sl. u velikoj meri utiču na ponašanje ćelija i ispoljavanje njihovih specifičnih metaboličkih funkcija (Kobolak i sar., 2016) te procena njihovog realnog potencijala u fiziološki relevantnim uslovima direktno skraćuje potrebno vreme i smanjuje troškove razvoja.

U radu su primenjena tri biomimetična bioreaktorska sistema. Bioreaktor sa dinamičkom kompresijom primenjen je u ispitivanjima Ag/alginatnih nanokompozita kao potencijalnih implantata u inženjerstvu tkiva hrskavice, kao i u evaluaciji hidrogelova na bazi GG-BAG koji potencijalnu primenu nalaze u inženjerstvu tkiva kosti i osteohondralnog tkiva. Protočni bioreaktor primenjen je u ispitivanjima makroporoznih hidrogelova na bazi GG-BAG u cilju evaluacije mogućnosti njihove primene u inženjerstvu tkiva kosti. I najzad, poseban deo istraživanja se odnosio na razvoj bioreaktor sa hidrostatičkim pritiskom, koji primenu nalazi u ispitivanjima u oblasti inženjerstva tkiva IVD, koji je tokom izrade ove teze razvijen do prototipa II i testiran.

Nanočestice srebra u ovom radu su sintetisane u rastvorima alginata sa različitim sadržajem G jedinica, primenom poznate elektrohemijske metode (Obradović i sar., 2015). UV-vidljivom spektrofotometrijom i TEM analizom potvrđeno je prisustvo nanočestica srebra unutar oba koloidna rastvora kao i unutar rezultujućih hidrogelova dobijenih geliranjem koloidnih rastvora u prisustvu rastvora za geliranje koji sadrži kalcijumove jone. Pokazano je da su nanočestice srebra sintetisane u alginatu sa većim sadržajem G jedinica (VG koloidnom rastvoru) bile manjih dimenzija i sa užom raspodelom veličina nanočestica ( $8,7 \pm 2,6$  nm). Potencijalno objašnjenje ovog rezultata može biti povoljnija prostorna konformacija G jedinica i GG blokova dimera na stabilizaciju sintetisanih nanočestica srebra, što bi onda upravo doprinelo tome da će se kod alginata sa većim sadržajem G jedinica i sekvenci GG dimera dobiti uniformnija raspodela veličina nanočestica i veća stabilnost. Naime, u rastvoru alginata joni srebra se povezuju sa negativno naelektrisanim karboksilnim (-COO) i hidroksilnim (-OH) grupama, stvarajući komplekse (Pandey i Ramontja, 2016). Redukcijom jona srebra dobijaju se nanočestice srebra koje elektrostatičkim van der Valsovim silama (*van der Waals*) bivaju naknadno stabilisane upravo negativno naelektrisanim (-COO) i (-OH) grupama (Pandey i Ramontja, 2016). Usled učešća (-COO) i (-OH) grupa u procesu stabilizacije sintetisanih nanočestica, u različitim studijama pokazano je da  $\zeta$  potencijal nanočestica ima negativnu vrednost.  $\zeta$  potencijal se često uzima kao mera stabilnosti dobijenih nanočestica (El Badawy i sar., 2011, Seo i sar., 2012) i što je  $\zeta$  potencijal negativniji, to su nanočestice bolje stabilisane, a više (-COO) i (-OH) grupa je uključeno u proces stabilizacije (Umoren i sar., 2014). U skladu sa tim, u ovom radu FTIR analiza je pokazala da kod VG koloidnog rastvora dolazi do značajnog pomeranja u asimetričnim vibracijama istezanja veza kod (-COO) grupa nakon sinteze nanočestica srebra, čime je potvrđeno njihovo učestvovanje u samom procesu redukcije i stabilizacije. Sa druge strane, pokazano je da nanočestice srebra mogu biti stabilisane i elektrostatičkim interakcijama sa negativno naelektrisanim kiseonikom iz prstena G i M jedinica (Jovanovic i sar., 2012; Montaser i sar., 2016). Uzimajući u obzir funkcionalne grupe i elemente koji učestvuju u procesu stabilizacije dobijenih nanočestica i njihovu prostornu konformaciju unutar G i M jedinica, može se pretpostaviti da je pogodna prostorna konformacija G jedinica i GG blokova dimera verovatno odgovorna za bolju stabilizaciju sintetisanih nanočestica srebra u odnosu

na stabilizaciju putem M jedinica i MM blokova dimera, na sličan način kao što je pokazano i za vezivanje kalcijumovih jona prilikom procesa geliranja (*Braccini i sar., 2001*).

Nakon geliranja i dobijanja VG Ag/alginatnih diskova, veličina nanočestica srebra unutar diskova je očuvana ( $8,2 \pm 2,1$  nm), čime je potvrđena i njihova dobra stabilizacija alginatnim polimernim lancima, dok je u MG Ag/alginatnim diskovima došlo do blagog, ali ne statistički značajnog, povećanja vrednosti srednjeg prečnika za  $\sim 25\%$  (od  $9,3 \pm 3,2$  nm do  $11,9 \pm 4,8$  nm). Položaj karakterističnih pikova hidroksilnih i kabroksilnih grupa Ag/alginatnih diskova uglavnom je pomećen ka nižim talasnim brojevima, što ukazuje na slabljenje veze karakterističnih grupa usled interakcije sa nanočesticama srebra. Prema FTIR analizi manje značajno pomeranje je primećeno kod MG diskova, što bi potencijalno objasnilo činjenicu da dolazi do delimične aglomeracije nanočestica i rasta srednjeg prečnika nakon geliranja.

Takođe, nakon geliranja primećeno je da su dobijeni VG hidrogelovi bili značajno manjih dimenzija u odnosu na MG hidrogelove. Do smanjenja je došlo usled formiranja jačih veza između kalcijumovih jona i G jedinica, čime dolazi do približavanja polimernih lanaca i otpuštanja dela vode. Proces formiranja Ca/alginatnog hidrogela je opisan poznatim „egg-box“ modelom (model kutije za jaja, *Grant i sar., 1973*). U toku geliranja dolazi do otpuštanja vode, što je poznato kao sinerezis. Posledično, kod formiranih VG Ag/alginatnih diskova je došlo do povećanja koncentracije alginata, što je rezultiralo boljim mehaničkim svojstvima diskova. Dobijeni rezultati su u skladu sa očekivanjima i poznatom činjenicom u literaturi da alginati bogati G jedinicama formiraju jače i stabilnije hidrogelove od alginata bogatih M jedinicama (*Draget i sar., 1997; Briganti i sar., 2006; Yang i sar., 2013*).

Mehanička karakterizacija MG i VG diskova izvršena je u periodu od 7 dana, primenom bioreaktora sa dinamičkom kompresijom i protokom medijuma, pod fiziološki relevantnim uslovima za artikularnu hrskavicu (brzina kompresije  $337,5 \mu\text{m/s}$ , pri frekvenciji od  $0,84$  Hz do deformacije od  $10\%$ , u režimu 1 h rada/ 1 h pauze). Režim je odabran na osnovu literaturnih podataka za prirodnu hrskavicu koja je tokom dnevnih aktivnosti podvrgnuta deformaciji od najviše  $20\%$  (*Mauck i sar., 2000*), pri čemu je frekvencija od  $0,84$  Hz u bliskoj korelaciji sa frekvencijom ciklusa hodanja ( $\sim 1$  Hz, *Stolk i sar., 2004*) i smatra se da generalno stimuliše hondrogenezu (*Anderson i Johnstone, 2017*).

Na osnovu nagiba prave linearne zavisnosti napona od deformacije primenom metode najmanjih kvadrata određeni su dinamički moduli elastičnosti za oba tipa Ag/alginatnih hidrogelova u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom. Treba napomenuti da sam bioreaktor kao takav nije namenjen preciznom određivanju mehaničkih karakteristika, već određivanju relativnih promena mehaničkih karakteristika tokom vremena u odnosu na referentno početno stanje. Dinamički modul elastičnosti za VG nanokompozitne diskove sa M/G odnosom u alginatu od  $1,38$  je iznosio oko  $\sim 64$  kPa, što je skoro za  $50\%$  veća vrednost od dinamičkog modula elastičnosti određenog za MG nanokompozitne diskove sa M/G odnosom u alginatu od  $1,94$  ( $\sim 44$  kPa). Prilikom poređenja vrednosti dinamičkog modula elastičnosti sa vrednostima objavljenim u literaturi treba uzeti u obzir da na vrednost modula utiče više parametara. Pa tako, povećanjem koncentracije alginata, očekivano dolazi do porasta vrednosti dinamičkog modula elastičnosti (npr. *Stojkovska i sar., 2010*). U ispitivanjima alginatnih diskova sa  $1,5$  mas.% i  $2$  mas.% alginata u istom bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom, pri brzini kompresije od  $337,5 \mu\text{m/s}$  određene su vrednosti dinamičkih modula elastičnosti od  $\sim 77$  kPa i  $\sim 120$  kPa, redom (*Stojkovska i sar., 2010*). U istoj studiji je takođe pokazano da dinamički modul elastičnosti za  $2$  mas.% alginatne diskove sa manjim sadržajem G jedinica ( $M/G=1,6$ ) u odnosu na iste diskove sa većim sadržajem G jedinica ( $M/G=0,49$ ) je manji za  $\sim 40\%$  ( $70,2$  kPa u odnosu na  $120,3$  kPa) (*Stojkovska i sar., 2010*). Kako su alginatni hidrogelovi viskoelastični materijali, to vrednosti dinamičkog modula elastičnosti zavise od primenjene brzine kompresije. Tako je u ispitivanjima mehaničkih karakteristika  $1,5$  mas.% alginatnih diskova pri većoj brzini kompresije ( $100 \mu\text{m/s}$ ) dobijena veća vrednost dinamičkog modula elastičnosti ( $\sim 33$  kPa) u odnosu na vrednost ( $\sim 25$  kPa) dobijenu pri manjoj brzini

kompresije (80  $\mu\text{m/s}$ ) (Kuo i Ma, 2001; Aarstad i sar., 2017). Veće vrednosti dinamičkog modula elastičnosti dobijene su za pakovani sloj 1,9 mas.% Ag/alginatnih mikročestica ( $\sim 150$  kPa pri brzini kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$ ) usled doprinosa intersticijalne vode na mehaničke karakteristike sloja (Stojkowska i sar, 2012). Uzimajući sve ovo u obzir, inicijalne vrednosti dinamičkog modula elastičnosti dobijene u ovom radu su reda veličine i u skladu sa vrednostima dobijenim za Ag/alginatne ili alginatne hidrogelove objavljenim u literaturi.

Sa druge strane, istraživanja sprovedena u ovom radu pokazala su da se mehaničke karakteristike Ag/alginatnih diskova u uslovima koji imitiraju prirodne uslove u artikulanoj hrskavici, značajno menjaju tokom vremena usled procesa koji se odvijaju u takvoj sredini. Naime, u hranljivom medijumu u kome su natrijumovi joni (3550  $\text{mg/dm}^3$ ) zastupljeni u većoj meri u odnosu na kalcijumove jone (264,92  $\text{mg/dm}^3$ ), dolazi do jonske izmene natrijuma i kalcijuma, a time i do slabljenja Ca-alginatnih hidrogelova. To je rezultiralo slabljenjem mehaničkih karakteristika MG nanokompozitnih hidrogelova tokom perioda od 36 h, nakon čega ih više nije bilo moguće izmeriti, što ukazuje da su diskovi izgubili integritet. Izmena natrijumovih i kalcijumovih jona, takođe je uticala na slabljenje mehaničkih karakteristika VG hidrogelova tokom prvih 24 h ispitivanja, nakon čega je vrednost dinamičkog modula elastičnosti iznosila  $\sim 24$  kPa i ostala konstantna do kraja eksperimenta, odnosno do 7. dana ispitivanja.

Biomimična bioreaktorska karakterizacija jasno je kvantifikovala razlike između dve vrste alginatnih hidrogelova. Rezultati su nedvosmisleno ukazali na potrebu fiziološki relevantne karakterizacije potencijalnih biomaterijala, posebno naglašavajući važnost ovakve karakterizacije za određivanje potencijalne primene. U ovom radu Ag/alginatni diskovi sa većim sadržajem G jedinica jasno su pokazali potencijal za dalje ispitivanje kao kandidati za implantate artikularne hrskavice sa antibakterijskim svojstvom. Ag/alginatni diskovi bogati M jedinicama potencijalno bi mogli naći primenu u tretmanu rana. Obloge za rane bazirane na Ag/alginatnim hidrogelovima (diskovima, mikrovlaknima ili mikročesticama) obezbeđuju regulaciju vlažnosti rane usled brze apsorpcije eksudata iz rane, a uz to kontrolisano oslobađaju nanočestice srebra i/ili jone srebra u periodu od dva do tri dana, što je period pogodan za zamenu obloge. Takođe, MG koloidni rastvor može biti primenjen za površinski tretman rana kao deo kreme/masti koje se nanose na ozleđeno mesto, što upotrebu čini još jednostavnijom i lakšom.

Ispitivanja mehaničkih karakteristika su dopunjena komplementarnim ispitivanjima citotoksičnosti u 3D sistemu u kulturi tkiva artikularne hrskavice primenom biomimičnog bioreaktora, koja su upoređena sa ispitivanjima u 2D sistemu ćelija u monosloju. Za razliku od sferoida koji su razvijeni i koriste se kao 3D modeli (npr. Kunz-Schughart i sar., 2004; Gurumurthy i sar., 2017), bioreaktori u kojima se ostvaruje difuziono-konvektivni mehanizam prenosa mase, prevazilaze difuzione limitacije do kojih dolazi usled rasta sferoida u statičkim uslovima, te ispitivanja u biomimičnim bioreaktorima nisu vremenski ograničena na par dana, već se mogu sprovoditi u dužem vremenskom periodu. Sa druge strane, primena eksplantata tkiva u odnosu na druge 3D ćelijske forme (imobilisane ćelije, sferoide), posebno je važna jer obezbeđuje strukturu i sastav nativnog tkiva što bliže odgovara *in vivo* uslovima.

Rezultati dobijeni u studiji na monosloju ćelija u skladu su sa prethodnim opažanjima da citotoksičnost nanočestica srebra zavisi od više parametara: veličine i površine nanočestica, koncentracije, primenjene doze, vremena izloženosti, kao i da je karakteristična za svaki ćelijski model (Grosse i sar., 2013).

MG koloidni rastvor koncentracije 0,5 mM ispoljio je jako citotoksično dejstvo na oba tipa ispitivanih ćelijskih linija (hASC i L929) i na primarnim hondrocitima, pri čemu je primećeno da postoje manje razlike u senzitivnosti određenog tipa ćelija prema nanočesticama srebra. Prema stepenu preživljavanja najmanji stepen citotoksičnosti primećen je kod hASC (S  $\sim 92\%$  u prvih 2 h). Nivo citotoksičnosti kao funkcija izbora ćelijske linije potvrđen je i u drugim radovima (Singh i Ramarao, 2012, Akter i sar., 2018). Pa tako, u studiji sprovedenoj na različitim ćelijskim linijama (mišijim makrofagima izolovanim iz krvi (RAW 264.7), humanim plućnim epitelijalnim ćelijama

adenokarcinoma (A549), humanim epitelijalnim ćelijama bubrežnog karcinoma (A498), humanim hepatocitima poreklom od hepatocelularnog karcinoma (HepG2), i na mišijim ćelijama neuroblastoma (Neuro 2A)) koncentracija od 2 mg/dm<sup>3</sup> nanočestica srebra veličine 5 - 43 nm imala je najjače citotoksično dejstvo na ćelijskoj liniji makrofaga (*Singh i Ramarao, 2012*). Činjenicu da citotoksičnost značajno varira u odnosu na tip ispitivanih ćelija takođe treba uzeti u obzir prilikom karakterizacije potencijalnih biomaterijala, što stavlja akcenat na važnost fiziološki relevantne karakterizacije biomaterijala u smislu potencijalne primene.

Takođe, u ovom radu primećeno je da je citotoksičnost funkcija primenjene doze (~ 2% preživljavanja *vs.* ~ 5% preživljavanja u grupi tretiranoj sa 2 ml 0,5 mM *MG* koloidnim rastvorom u odnosu na grupu tretiranu sa 1 ml istog rastvora), kao što je uočeno i u prethodnim istraživanjima na humanim ćelijama jetre tretiranim sa različitim dozama nanočestica srebra (*Piao i sar., 2011*).

Sa druge strane, *MG* koloidni rastvor manje koncentracije nanočestica srebra od 0,05 mM ispoljio je slabu do umereno jaku citotoksičnost prema ispitivanim ćelijama u monosloju, sa preživljavanjem između ~ 50 i 70%. Ćelijska linija hASC pokazala je veću otpornost prema nanočesticama srebra u odnosu na ćelijsku liniju L929 i hondrocite. Kod hASC primećeno je da je citotoksičnost zavisila od vremena izloženosti, za razliku od ćelijske linije L929 kod koje se citotoksičnost nakon 48 h zadržala na istom nivou. Nasuprot preživljavanju od ~ 70% koje je dobijeno u eksperimentima izvedenim u okviru ove teze, u drugoj studiji je pokazano da nanočestice srebra veličine 10 i 20 nm, primenjene u koncentraciji od ~ 0,09 mM imaju zanemarljiv citotoksičan efekat na hASC (*Samberg i sar., 2012*). Različiti rezultati mogu se objasniti često prihvaćenim stavom da citotoksičnost nanočestica srebra ne potiče od samih nanočestica, već od jona srebra koji se kontrolisano otpuštaju sa površine nanočestica (*Samberg i sar., 2012; Xiu i sar., 2012*). Proces otpuštanja jona srebra sa površine nanočestica oksidacijom je prilično složen i zavisi od različitih faktora, kao što su način sinteze nanočestica srebra, tip medijuma u kome se sprovede istraživanje, temperatura, izloženost svetlu, ali i od vremena čuvanja sintetisanih nanočestica pre upotrebe, što značajno može uticati na nivo citotoksičnosti (*Kittler i sar., 2010*). Osim biološke aktivnosti, joni srebra otpušteni u okolni medijum dovode i do formiranja nerastvorne soli AgCl, koja ima različit citotoksični efekat na ćelije u odnosu na jone ili nanočestice srebra. U drugim istraživanjima je pokazano da AgCl ima umeren citotoksičan efekat na ćelije (*Hogstrand i sar., 1996, Levard i sad., 2012*). U okviru ove disertacije u eksperimentu migracije nanočestica srebra iz Ag/alginatnih diskova u direktnom kontaktu sa PVA/PVP diskovima pokazano je da jedan deo srebra biva otpušten iz diskova u okolinu u nano obliku. Sa druge strane, direktni kontakt i ekstrakcioni test (ako se izuzme uticaj pH na ćelije u svim tretiranim grupama) mogli bi ukazati i potvrditi prethodnu tvrdnju da u prisutvu hranljivog medijuma, bogatog jonima Cl, nanočestice srebra bivaju prevedene u so AgCl, koja i prema rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji ima značajno manje citotoksično dejstvo na ćelije u poređenju sa nanočesticama i/ili jonima srebra.

Generalno, nanočestice srebra veličine od 10 do 100 nm u *in vitro* uslovima pokazale su jako citotoksično dejstvo prema ćelijama kada su primenjene u koncentracijama 0,045 - 0,09 mM (*Ahamed i sar., 2008; Arora i sar., 2009*). Međutim, citotoksičnost *MG* koloidnog rastvora i *VG* Ag/alginatnih diskova u standardnim 2D studijama na monosloju ćelija i u 3D bioreaktorskim kulturama artikularne hrskavice pokazale su suprotne rezultate. Dok je u slučaju direktnog kontakta *VG* Ag/alginatnih diskova sa ćelijama u monosloju određen umereni citotoksični efekat, pri čemu je koncentracija otpuštenog srebra iznosila  $10 \pm 1 \mu\text{M}$ , u isto vreme, nisu primećene promene na histološkim preparatima eksplantata hrskavice koji su bili u direktnom kontaktu sa tim diskovima u uslovima dinamičke kompresije u bioreaktoru tokom 4 dana. Posebno treba istaći da dok je u direktnom kontaktu *MG* koloidnog rastvora koncentracije 0,5 mM sa različitim ćelijskim linijama i ćelijama hondrocita u monosloju određen jak citotoksični efekat sa skoro 0% preživljavanja, u bioreaktoru pri uslovima fiziološki relevantne dinamičke kompresije nisu primećene promene na histološkim preparatima hrskavice. Takođe, sadržaj srebra unutar eksplantata nije bilo moguće detektovati. Promene kod eksplantata hrskavice na histološkom nivou nisu primećene ni u studiji ispitivanja efekta produženog otpuštanja nanočestica srebra iz *MG* nanokompozitnih mikročestica u



uslovima dinamičke kompresije u biorektoru u periodu od 13 dana tokom kojih je došlo do potpunog otpuštanja imobilisane količine srebra od 0,3  $\mu\text{mol}$ . Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima objavljenim u literaturi da su ćelije u 2D kulturama osjetljivije na nanočestice u poređenju sa ćelijama u 3D okruženju, koje su zaštićene ECM (Lee i sar., 2009). ECM obezbeđuje interakcije između ćelija i tkiva, normalnu morfologiju ćelija i fizičku barijeru za prodiranje nanočestica (Barua i Mitragotri, 2014). Dobijeni rezultati su takođe u skladu sa rezultatima primene sličnih Ag/alginatnih hidrogelova u obliku mikrovlakana koji su pokazali efikasnost u zarastanju rana na modelu pacova bez negativnih efekata (Stojkowska i sar., 2013; Stojkowska i sar., 2018), te se zaključuje da rezultati ispitivanja u biomimičnom biorektoru bliže odgovaraju rezultatima *in vivo* ispitivanja nego rezultati u 2D ćelijskim kulturama.

U cilju razumevanja razlika između citotoksičnosti u 2D i 3D sistemima, izvršeno je ispitivanje kinetike otpuštanja nanočestica i/ili jona srebra u režimu biomimične kompresije i u statičkim uslovima. Dobijeni rezultati pokazali su različite mehanizme oslobađanja nanočestica srebra i ponašanja diskova u ova dva režimu.

Prividni koeficijent difuzije nanočestica i/ili jona srebra dobijen u statičkim uslovima ( $1,2 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ ) je u saglasnosti sa ranije objavljenim vrednostima koeficijenta difuzije nanočestica srebra u biološkim tkivima. Za difuziju pojedinačnih nanočestica (5 – 46 nm) unutar embriona zebra riba u statičkim uslovima, određen je koeficijent difuzije  $3 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ , primenom Braunovog difuzionog modela (Lee i sar., 2007). Koeficijent difuzije sfernih nanočestica (50 nm) unutar kože miša određen primenom Francove difuzione ćelije iznosio je  $(4,3 - 4,6) \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$  (Tak i sar., 2015).

Dobijena vrednost za koeficijent difuzije u ovom radu bila je nešto veća od vrednosti koeficijenta difuzije određene za jone srebra ( $1,5 \times 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$ ) iz Ag/PVA hidrogelova uronjenih u fosfatni pufer (pH = 7) (Krstić i sar., 2014). Značajno manji koeficijenti difuzije nanočestica srebra i/ili jona srebra od  $4,6 \times 10^{-19}$  i  $6,9 \times 10^{-19} \text{ m}^2/\text{s}$  su dobijeni za Ag/alginatne mikročestice držane u vodi u statičkim uslovima, primenom istog difuzionog modela u diferencijalnom obliku kao u ovom radu (Kostić i sar., 2016; Kostić i sar., 2017). Sporija difuzija u navedenim slučajevima je očekivana zbog veće stabilnosti polimernog hidrogela u vodi u poređenju sa hranljivim medijumom koji sadrži jone natrijuma, što omogućava bubrenje polimerne mreže, a time i bržu difuziju.

U biorektorskim uslovima, Ag/alginatni diskovi su ograničeno mogli da bubre, dok dinamička kompresija izaziva cikličnu deformaciju i relaksaciju polimerne mreže, što uzrokuje neto tok fluida unutar diskova, te se otpuštanje srebra odvija po konvektivno – difuzionom mehanizmu. U odnosu na slobodno bubrenje u statičkim uslovima, u biorektoru sa dinamičkom kompresijom različiti procesi doveli su do smanjenog otpuštanja srebra, što je rezultiralo prividnim koeficijentom difuzije od  $1,4 \times 10^{-17} \text{ m}^2/\text{s}$ . Prema Reinhart-Pepasovoj (Reinhart-Peppas) teoriji, vrednosti koeficijenta difuzije su direktno proporcionalne stepenu bubrenja hidrogela (Reinhart i Peppas, 1984). Pored toga, dinamička kompresija osim na neto tok fluida, može uticati na deformaciju polimerne matrice, čime dolazi do smanjenja veličine pora unutar hidrogela, a time i do povećanja sternog otpora prilikom difuzije ili konvekcije. Takođe, eksperimentalni i rezultati dobijeni na osnovu matematičkog modelovanja ispitivanja suvih Ag/alginatnih mikročestica u hranljivom medijumu tokom 21dana, ukazali su da dolazi do manjeg otpuštanja srebra u okolinu u odnosu na vlažne mikročestice (Kostić i sar., 2016). Pokazano je da nakon kontakta suvih Ag/alginatnih mikročestica i medijuma dolazi do brze rehidratacije ili bubrenja, čime značajna količina medijuma biva zarobljena unutar čestica. Nanočestice srebra reaguju sa jonima hlora iz medijuma nakon čega dolazi do stvaranja i taloženja AgCl unutar samih čestica, što u mnogome može uticati na ukupnu kinetiku otpuštanja srebra. Modelovanjem otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih diskova u biorektoru sa dinamičkom kompresijom određena je neto intersticijalna brzina fluida kroz hidrogelove koja je bila veoma mala, reda veličine  $10^{-10} \text{ m/s}$  i uporediva sa intersticijalnom brzinom toka tečnosti unutar tkiva oštećene hrskavice ( $3,14 \times 10^{-10} \text{ m/s}$ ) pod dejstvom smicajnog napona (Sadeghi i sar., 2015).

Na primeru razvoja potencijalnog biomaterijala na bazi nanočestica srebra i alginata, biomimični bioreaktori su pokazali značajnu relevantnost u određivanju adekvatne potencijalne primene materijala, na osnovu ispitivnja mehaničkih karakteristika, citotoksičnosti prema određenim tipovima ćelija i mogućnosti da kontrolisano otpuštaju aktivnu komponentu u kraćem ili dužem vremenskom periodu.

Protočni bioreaktor i bioreaktor sa dinamičkom kompresijom su posebno ispitivani za karakterizaciju biomaterijala namenjenih inženjerstvu tkiva kosti. Bioreaktori korišćeni u ovoj studiji su dobar izbor za inženjerstvo koštanog tkiva iz razloga što obezbeđuju dinamičku kompresiju kao oblika mehaničkog opterećenja i/ili protok intersticijalne tečnosti, za koje je pokazano da podstiču diferentovanje u pravcu osteogenih ćelija (*npr. Sikavitsas i sar., 2003, Chen i sar., 2017, Vetsch i sar., 2017, Seo i sar., 2018*). Na primeru stromalnih ćelija koštane srži pacova pokazano je da smicajni naponi izazvani strujanjem medijuma utiču na pojačanu ekspresiju osteoplastičnog fenotipa, veću mineralizaciju i bolju distribuciju ECM unutar 3D poroznih mrežastih nosača od titanijumskih vlakana nakon 16 dana gajenja u protočnom bioreaktoru (*Sikavitsas i sar., 2003*). Pojačana aktivnost i vijabilnost ćelija, praćena porastom nivoa alkalne fosfataze i osteokalcina, kod ćelija osteoblasta poreklom iz koštane srži zasejanim na poroznom keramičkom materijalu, primećena je kod uzoraka iz protočnog bioreaktora gde je ostaren protok medijuma brzinom od 2 ml/h tokom perioda od 4 nedelje (*Wang i sar., 2003*). Dobri rezultati su dobijeni i kada su ovi uzorci nakon 2 nedelje gajenja u protočnom bioreaktoru bili implantirani subkutano kod pacova, gde je nakon 4 i 8 nedelja primećen značajan porast novosintetisanog ECM kosti (*Wang i sar., 2003*). Sa druge strane, dinamička kompresija izazvala je osteogeno diferentovanje MC3T3-E1 ćelijske linije gajene u agaroznim gelovima (*Chen i sar., 2017*), kao i humanih mezenhimalnih matičnih ćelija (hMSC) gajenih u 5% metakrilnom hidrogelu (*Seo i sar., 2018*).

Primenom određenih fizičkih signala, kao što su protok ili dinamička kompresija, ostvaruje se uticaj ne samo na ćelije, već i na biomaterijale koji služe kao nosači. Iz tog razloga pre primene potencijalnih biomaterijala u inženjerstvu tkiva, neophodno je da se prvo izvrši karakterizacija i eventualna optimizacija samih biomaterijala kako bi se razlikovao efekat protoka i efekat biomaterijala na gajene ćelije.

U inženjerstvu tkiva kosti jedan od glavnih pristupa se bazira na razvoju visoko poroznih, polimernih biomaterijala sa sadržanim prekursorima mineralne faze, kao što su kalcijum fosfat, hidroksiapatit i bioaktivno staklo. U uslovima prirodne sredine ovi materijali nakon implantacije formiraju kalcifikovani sloj na svojoj površini i omogućavaju osteointegraciju (*Vieira i sar., 2019*). U *in vivo* studijama pokazano je da bioaktivno staklo brže ostvaruje vezu sa okolnim tkivom kosti u odnosu na druge keramičke materijale, a razlog tome je najverovatnije stimulatívni efekat proizvoda rastvaranja bioaktivnog stakla na osteoprogenitorske ćelije na genetskom nivou, što je uočeno u *in vitro* studijama (*Jones, 2015*).

Bioaktivnost ovih materijala najčešće se pokazuje ispitivanjem u statičkim uslovima u simuliranoj telesnoj tečnosti čime difuzijom dolazi do razmene jona i formiranja kristala mineralne faze. Sa druge strane, fizičko-hemijske karakteristike, kao što su poroznost, mehaničke karakteristike, i sl. ispituju se primenom sofisticiranih tehnika, najčešće u suvom, početnom ili krajnjem stanju (*npr. Gantar i sar., 2014*).

U ovom radu ispitivani su materijali za potencijalnu primenu u inženjerstvu tkiva kosti na bazi gelanske gume i bioaktivnog stakla dobijeni na 2 načina. U prethodnoj studiji (*Gantar i sar., 2014*) dobijeni su hidrogelovi u formi diskova sa unutrašnjim porama, jednostavnom metodom izlivanja i kasnije liofilizacije. U ovim hidrogelovima je nakon 14 dana u SBF primećeno delimično formiranje HAp, dok je tokom perioda od 30 dana formiranje HAp nastavljeno i to od periferije ka unutrašnjosti nosača (*Gantar i sar., 2014*), ukazujući na moguća difuziona ograničenja i delimično zatvaranje pora na površini nosača. U ovom radu, pomenuti hidrogelovi su ispitani pri različitim hidrodinamičkim uslovima (protoku, dinamičkoj kompresiji i statičkim uslovima) i nije primećena

razlika u formiranju mineralne faze kalcijum fosfata, što je pokazano SEM, Raman i EDS analizom. Nakon 14 dana u svim ispitivanim uzorcima je došlo do formiranja igličastih struktura mineralne faze koja podseća na izgled HAp u prirodnom tkivu (Zhou i Lee, 2011). Kristali su se formirali najviše na površini, ali i unutar uzoraka, bez vidnih razlika u odnosu na primenjene uslove. Dobijeni rezultati ukazali su da se u svim ispitivanim uslovima prenos mase odvija po istom difuzionom mehanizmu, te da je u svim sistemima proces formiranja mineralne faze difuziono ograničen. Razlog tome je formiranje slabo poroznog površinskog sloja hidrogelova nakon rehidratacije, koji onemogućava protok SBF kroz hidrogel. Ovo zapažanje je potkrepljeno nalazima iz literature da se tokom geliranja formira veoma tanak (debljine 0,1 mm ili manje), gust i visoko umrežen polimerni sloj na dodirnoj površini između hidrogela i spoljne sredine, dok se ispod njega formira slabije umrežen i propustljiv hidrogel (Baker, 2012). Posebno tokom rehidratacije suvih hidrofiličnih hidrogelova, kao što su hidrogelovi GG, bubrenje dovodi do drastičnog smanjenja broja pora ili veličine pora (Omidian i sar., 2007), čime dolazi do promene fizičko hemijskih karakteristika, ali i do ograničenja prenosa mase isključivo difuzionim mehanizmom.

Stoga je u ovom radu, na osnovu rezultata karakterizacije prve serije uzoraka u biomimetičnim uslovima poboljšan postupak proizvodnje hidrogelova kako bi se osiguralo postojanje međusobno povezanih i otvorenih pora koje omogućavaju protok fluida u aksijalnom pravcu. Razvijena je procedura koja se zasniva na dobijanju, liofilizaciji i rehidrataciji GG hidrogela u cilindričnom obliku, koji se zatim poprečno seče na diskove željene visine, dajući aksijalno porozne uzorke. Razvijena procedura potencijalno je primenljiva i na ostale polimerne hidrogelove (kao što su alginat, hitozan i drugi). Međutim, lateralne površine ovih diskova imaju i dalje karakteristike guste i slabo porozne do neporozne mreže polimera. U protočnom bioreaktoru konvektivni transport SBF kroz unutrašnjost hidrogelova je rezultirao formiranjem najveće količine mineralne faze i značajno poboljšanim mehaničkim svojstvima u odnosu na ostale uzorke, što jasno ukazuje na uticaj brzine prenosa mase na formiranje kalcijum fosfata unutar kompozitnog materijala.

Sa druge strane, uzorci iz bioreaktora sa dinamičkom kompresijom sadržali su više mineralne faze u poređenju sa kontrolnim statičkim uzorcima, ali je dinamički modul elastičnosti bio manji. Može se pretpostaviti da je dinamička kompresija izazvala slabljenje ili delimično oštećenje strukture hidrogelova. Ovaj rezultat ukazuje na značaj praćenje mehaničkih karakteristika tokom eksperimenta, tj. u dužem vremenskom periodu na predviđanje ponašanja materijala nakon implantacije. Prepoznato je da karakterizacija materijala u jednoj vremenskoj tački izostavlja moguće vremenske promene u mehaničkoj čvrstoći, stabilnosti i poroznosti materijala kada se zapravo implantira u prirodnoj sredini (Baumgartner i sar., 2015). Posebno je pokazano da karakteristike u suvom stanju ne predstavljaju ponašanje materijala nakon implantacije. Kitir i saradnici (Kytýř i sar., 2017) npr. su pokazali da je modul elastičnosti GG-BAG nosača u suvom stanju 20 puta veći od modula elastičnosti određen za rehidratirane hidrogelove ( $2,15 \pm 0,25$  MPa i  $107,65 \pm 30,52$  kPa, redom).

Istraživanja sprovedena u ovom radu pokazuju veliki potencijal poroznih GG-BAG hidrogelova ispitanih u uslovima intersticijalnog strujanja kao relevantnog biosignala za tkivo kosti. Glavni nedostatak ovih hidrogelova je mala mehanička čvrstoća sa modulom elastičnosti od  $61,8 \pm 0,9$  kPa, koji je značajno manji od modula elastičnosti prirodnog koštanog tkiva. U literaturi je objavljeno da modul elastičnosti trabekularne kosti govečeta, mereno *ex vivo* pri frekvenciji kompresije od 1 Hz iznosi  $\sim 147$  MPa (David i sar., 2008), što je višestruko veća vrednost u poređenju sa vrednošću dobijenom za hidrogelove na bazi GG i BAG. Dobijena niska vrednost se očekuje zbog visoke početne poroznosti hidrogelovi i relativno kratkog eksperimentalnog vremena, nedovoljnog za punu transformaciju BAG u mineralnu fazu i potpunu kalcifikaciju. Ipak, mehanička čvrstoća hidrogelova rasla je tokom vremena (14 dana) sa formiranjem i akumulacijom mineralne faze ( $\sim 62$  kPa u odnosu na inicijalnu vrednost od  $\sim 33$  kPa). Za očekivati je da će mehaničke karakteristike dodatno porasti u kulturi ćelija usled stvaranja funkcionalnog ECM, što bi dovelo do mehanički kompetentnog implantata. Formiranje ECM u nosačima dobijenim 3D

štamptom hMSC ćelija i poli(etilen)glikol dimetakrilata uticalo je na povećanje modula elastičnosti sa  $290 \pm 14$  kPa na  $358 \pm 48$  kPa nakon 21 dana u statičkoj kulturi (Gao i sar., 2014).

Bioreaktor sa dinamičkom kompresijom i razvijeni GG-BAG hidrogelovi iskorišćeni su za razvoj novih potencijalnih osteohondralnih implantata. Razvoj osteohondralnih implantata dobija na sve većem značaju usled pokazatelja da regeneracija hrskavice nije potpuna i održiva ako nije potpomognuta regeneracijom iz zone subhondralne kosti (Oliveira i sar., 2006, Grayson i sar., 2008). To znači da je za dobijanje funkcionalne hrskavice potrebno obezbediti regeneraciju na nivou osteohondralne zone primenom osteohondralnih implantata.

Jednostavnom metodom izlivanja dobijeni su dvofazni uzorci sa tankom prelaznom zonom, koji su i nakon 14 dana u uslovima dinamičke kompresije zadržali integritet. Mehanička stabilnost implantata se pokazala od izuzetne važnosti kako *in vitro*, tako i *in vivo*, a dobra integracija između slojeva kao ključni parametar (Martin i sar., 2007, Allan i sar., 2007, Lima i sar., 2008). Naime, jedan od čestih problema prilikom ispitivanja osteohondralnih implantata je odvajanje hondralnog dela (Scotti i sar., 2010). Dobijanjem dobro integrisanih slojeva nosača u ovoj doktorskoj disertaciji, prevaziđen je problem dezintegracije implantata dobijenih integracijom pojedinačnih delova implantata, prethodno odvojeno gajenih, u jedinstven nosač (Scotti i sar., 2010, Shimomura i sar., 2014).

Povezivanje slojeva osteohondralnih implantata moguće je ostvariti upotrebom klinički prihvatljivih lepkova, kao što je fibrin, ili biopolimera, kao što je hondroitin-sulfat (Malafaya i sar., 2005, Wang i sar., 2007). U odnosu na vezu koja se ostvaruje primenom ovih biolepkova, u prethodnim studijama pokazano je da integracija ostvarena formiranjem nosintetisanog ECM na granici između slojeva je do 10 puta jača, te da obezbeđuje sigurnu mehaničku stabilnost implantata (Scotti i sar., 2010). Može se pretpostaviti da će kombinovanjem adekvatnih ćelija i osteohondralnih implantata razvijenih u ovoj disertaciji, u biomimičnim uslovima u bioreaktoru, doći do ravnomernog formiranja ECM u hondralnom delu, a time i u tankoj zoni prelaza između slojeva, čime bi se ostvario kontinuitet u strukturi implantata. Pored toga, ovom jednostavnom metodom izlivanja hondralnog dela implantata, u prelaznoj zoni se postiže sastav međusloja koji ima odgovarajuće karakteristike i osteo i hondralnog dela, a time veliki potencijal za razvoj kalcifikovane hrskavice. Pravilno diferentovanje i funkcija ćelija unutar implantata upravo je vođena adekvatnim sastavom okruženja koji je potrebno da što bliže imitira prirodnu sredinu (Ansari i sar., 2019). Višeslojni nosači kao što je npr. nosač koji se sastojao od kolagen tipa I / 60% kolagen tipa I i 40% HAp / 30% kolagen tipa I i 70% HAp (polazeći od dela hrskavice prema subhondralnoj kosti) (Filardo i sar., 2014), baziraju se na ovoj preporuci, međutim, njihovo dobijanje i integracija u jedinstvene nosače daleko je zahtevnija i neizvesnija od predložene metode u ovoj disertaciji.

Primenom jednostavne metode dobijene su i ispitane dve serije dvofaznih nosača sa ostvarenom dobrom integracijom između slojeva – serija kod koje je postojao neporozan sloj oko osteo dela implantata i serija kod koje je osteo deo bio potpuno porozan. Potencijal za dalja ispitivanja sa ćelijama imaju nosači iz druge serije kod kojih je pokazano da nakon 14 dana ispitivanja u biomimičnim uslovima došlo je do ravnomernog formiranja mineralne faze u osteo delu. Ovi nosači ispitivani su u uslovima mehaničkog opterećenja koji su primenjeni u studiji Li i saradnici i koji su pokazali da primenjeni režim podstiče hondrogenezu humanih mezenhimalnih matičnih ćelija (Li i sar., 2010). Dobijeni rezultati ukazuju na formiranje značajnije količine mineralne faze kalcijum fosfata u odnosu na makroporozne hidrogelove GG-BAG u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom, ali i u protočnom bioreaktoru. Razlog tome je konstrukcija same komore bioreaktora u kojoj su ispitivani dvofazni implantati koja obezbeđuje direktan protok medijuma u radijalnom pravcu, pri čemu je utvrđeno na osnovu validacije strujanja u komorama da 70 - 90% medijuma direktno prođe kroz uzorak. Podsećanja radi, kod GG-BAG makroporoznih uzoraka ispitivanih u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom primećeno je da veći deo medijuma opstrujava uzorak.

Pored toga, 4 puta veća površinska brzina strujanja SBF kod dvofaznih nosača u poređenju sa makroporoznim hidrogelovima ( $\sim 500 \mu\text{m/s}$  vs.  $\sim 120 \mu\text{m/s}$ ) najverovatnije je uticala na ovakav rezultat. Brzina koja se pokazala kao poželjna za formiranje mineralne faze ( $\sim 500 \mu\text{m/s}$ ) bliska je površinskoj brzini strujanja ( $\sim 600 \mu\text{m/s}$ ) za koju je pokazano da obezbeđuje ravnomernu gustinu tkiva unutar nosača sa ćelijama, pored pozitivnog uticaja na osteogeno diferentovanje matičnih ćelija (Grayson i sar., 2010).

Takođe, u studiji Zhao i saradnici modelovan je smicajni napon kome su izloženi zidovi nosača u odnosu na strujanje medijuma i strukturu nosača, pri čemu je pokazano da u uslovima simultanog delovanja protoka fluida i dinamičke kompresije, smicajni napon je do 3 puta veći u odnosu na situaciju u kojoj deluje samo jedan mehanički stimulans (Zhao i sar., 2016). Ovaj zaključak takođe mogao bi biti deo objašnjenja za dobar rezultat formiranja mineralne faze kod dvoslojnih nosača u odnosu na makroporozne hidrogelove sa otvorenim porama ispitivane u perfuzionom reaktoru.

Dobijeni rezultati predstavljaju dobru osnovu za dalji razvoj dvofaznih hidrogelova sa ćelijama u uslovima koji su se u ovoj disertaciji pokazali kao poželjni za formiranje mineralne faze kalcijum fosfata.

U ovoj disertaciji razvijen je drugi prototip bioreaktora sa hidrostatičkim pritiskom i testiran u pogledu mogućnosti prenošenja pritiska iz hidrauličke na bioreaktorsku komoru, održavanja pritiska, kao i brzine prikupljanja podataka. Dobijeni rezultati ukazali su na važnost punjenja bioreaktorske komore, kako u pogledu postizanja linearne zavisnosti između pritisaka u komorama, tako i sa stanovišta održavanja pritiska na željenoj vrednosti tokom dužeg vremenskog perioda. Glavna prednost predloženog rešenja u odnosu na rešenja predložena u literaturi je uklanjanje gasovite faze jednostavnim metodom izvlačenja mehurova gasa pomoću špriceva, za razliku od rešenja gde je za uklanjanje mehurova predložena upotreba vakum pumpe (Mizuno i sar., 2004). Ovaj pristup osim što olakšava rukovanje ujedno i umanjuje troškove razvoja bioreaktorskog sistema jer ne zahteva dodatnu opremu. Akvizicija vrednosti pritisaka u određenom vremenskom periodu je ukazala na mogućnost smanjenja učestalosti prikupljanja podataka za 60 puta, u cilju jednostavnijeg rada sa prikupljenim podacima bez uticaja na kvalitet prikupljenih podataka. U sledećoj fazi razvoja potrebno je bioreaktor povezati sa sistemom za automatsku kontrolu pritiska, čime bi se konstrukcijska ograničenja na nivou prototipa I i II prevazišla, a omogućila potpuna validacija mogućnosti primene razvijenog sistema u inženjerstvu tkiva IVD.

## 6 ZAKLJUČAK

U ovoj doktorskoj disertaciji pokazano je da biomimični bioreaktori mogu služiti kao 3D modeli u razvoju, karakterizaciji i određivanju potencijala primene biomaterijala u inženjerstvu tkiva kosti i hrskavice.

Primenjena su dva biomimična bioreaktora: bioreaktor sa dinamičkom kompresijom i protočni bioreaktor, dok se poseban deo istraživanja odnosio na razvoj bioreaktora sa hidrostatičkim pritiskom. U prvom delu disertacije ispitan je potencijal primene dve vrste Ag/alginatnih diskova kao antibakterijskih implantata za primenu u inženjerstvu tkiva artikularne hrskavice. Fiziološki relevantna karakterizacija u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom uključila je ispitivanje mehaničke stabilnosti, citotoksičnosti i kinetiku otpuštanja nanočestica/jona srebra iz diskova. U drugom delu disertacije ispitana je bioaktivnost i potencijal primene novih makroporoznih hidrogelova na bazi GG-BAG u inženjerstvu tkiva kosti, u uslovima kontinualnog protoka medijuma i pri dinamičkoj kompresiji primenom oba bioreaktora. Razvijeni makroporozni hidrogelovi GG-BAG i bioreaktor sa dinamičkom kompresijom iskorišćeni su u daljim istraživanjima za potrebe razvoja dvofaznih osteohondralnih implantata. U poslednjem delu disertacije deo istraživanja se bazirao na upoznavanju i testiranju bioreaktorskog sistema sa hidrostatičkim pritiskom iz ugla konstrukcije i razvoja do željenog proizvoda.

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Elektrohemijskom sintezom sintetisane su sferične nanočestice srebra u rastvorima alginata sa različitim odnosom M/G jedinica. Veličina nanočestica zavisila je od početnog sastava alginata, pri čemu su u rastvoru sa većim sadržajem G jedinica sintetisane manje nanočestice. Prostorna konformacija G jedinica uticala je na bolju stabilizaciju sintetisanih nanočestica.
- Geliranjem u prisustvu  $\text{Ca}^{2+}$  dobijeni su Ag/alginatni diskovi, pri čemu je nakon geliranja došlo do blage agregacije i/ili rasta nanočestica srebra kod diskova na bazi alginata sa manjim sadržajem G jedinica.
- Ag/alginatni diskovi sa manjim sadržajem G jedinica pokazali su inicijalno slabije mehaničke karakteristike (~ 44 kPa) u odnosu na Ag/alginatne diskove sa većim udelom G jedinica (~ 64 kPa). Veći udeo M jedinica uticao je na brže vreme dezintegracije diskova (nešto duže od 2 dana) dok su alginatni diskovi sa većim udelom G jedinica ostali stabilni tokom 7 dana sa konstantnim modulom elastičnosti od ~ 24 kPa. Na bazi toga je zaključeno da alginatni diskovi sa manjim sadržajem G jedinica mogu da se koriste na mestima koja ne zahtevaju mehaničku stabilnost i gde je poželjno da u kraćem vremenskom periodu dođe do oslobađanja nanočestica srebra, npr. obloge za rane, dok su alginati sa većim udelom G jedinica potencijalni kandidati za implante u inženjerstvu tkiva hrskavice.
- Biomimični bioreaktor sa dinamičkom kompresijom omogućio je određivanje relativnih mehaničkih karakteristika potencijalnih biomaterijala na početku i tokom dužeg vremenskog perioda u uslovima koji imitiraju prirodnu sredinu, što je omogućilo procenu potencijala za određenu primenu.
- Citotoksičnost koloidnog rastvora u 2D sistemu na ćelijama u monosloju zavisila je od ukupne količine nanočestica srebra, vremena izloženosti i tipa ćelija. Dok je koloidni rastvor sa koncentracijom srebra od 0,5 mM imao jak citotoksičan efekat (~ 0% preživljavanja) na ispitana tri tipa ćelija, u biomimičnom bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom i kulturom tkiva u direktnom kontaktu sa 0,5 mM koloidnim rastvorom koji je recirkulisao, nije primećen negativni uticaj, što je potvrđeno histološkom analizom, kao i u studiji produženog dejstva nanočestica/jona srebra otpuštenih iz Ag/alginatnih mikročestica tokom 13 dana.

- Oko Ag/alginatnih diskova u direktnom kontaktu sa telećim hondroцитima u monosloju je formirana inhibiciona zona (1-2 mm) koja nije funkcija koncentracije otpuštanog srebra u medijumu i najverovatnije je posledica formiranja taloga AgCl u neposrednoj blizini oko diskova. U poređenju sa referentnim toksičnim materijalom inhibiciona zona je značajno manja i ukazuje na blagi citotoksični efekat.
- Nasuprot rezultatima iz 2D sistema Ag/alginatni diskovi nisu ispoljili citotoksično dejstvo u bioreктору sa dinamičkom kompresijom u kulturi tkiva artikularne hrskavice.
- Mehanizam i kinetika otpuštanja srebra zavisi od uslova kojima su podvrgnuti Ag/alginatni diskovi. Slobodno bubrenje u statičkim uslovima dovodi do relaksacije polimerne mreže i brže difuzije srebra sa prividnim koeficijentom difuzije od  $1,2 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ . U biomimičnom bioreктору sa dinamičkom kompresijom otpuštanje se odvija po konvektivno-difuzionom mehanizmu, pri čemu dinamička kompresija uslovljava protok medijuma unutar i iz diskova neto brzinom od  $3,9 \times 10^{-10} \text{ m/s}$ , dok prividni koeficijent difuzije je iznosio  $1,4 \times 10^{-17} \text{ m}^2/\text{s}$ .
- Makroporozni GG-BAG hidrogelovi su dobijeni jednostavnim metodama izlivanja, zamrzavanja i liofilizacije modifikovanom procedurom, nakon čega su dobijeni makroporozni hidrogelovi sa međupovezanim porama duž aksijalnih strana, bez uticaja na ravnomernu raspoređenost BAG čestica unutar hidrogela.
- Direktni protok SBF u protočnom bioreктору površinskom brzinom od oko  $\sim 120 \mu\text{m/s}$  podstakao je na najznačajnije formiranje mineralne faze kalcijum fosfata unutar hidrogelova u odnosu na uzorke u bioreктору sa dinamičkom kompresijom i u statičkim uslovima. Najveći sadržaj kalcijum fosfata je uticao na poboljšanje mehaničkih karakteristika za  $\sim 90\%$  u odnosu na inicijalne uzorke (sa 33 kPa na 62 kPa).
- Dinamička kompresija je izazvala slabljenje strukture polimera u GG-BAG hidrogelovima. Iako je kod makroporoznih GG-BAG hidrogelova formirana veća količina mineralne faze u odnosu na uzorke iz statičke studije, mehaničke karakteristike su bile lošije (40 kPa i 47 kPa, redom).
- Razvijena je jednostavna metoda za dobijanje dvofaznih osteohondralnih implantata izlivanjem sloja hidrogela GG na makroporozni GG-BAG hidrogel. Integracija između slojeva je ostavarena u vidu tanke prelazne zone debljine do 1 mm. Mehanička stabilnost i dobra integraciju između slojeva očuvana je i posle 14 dana dinamičke kompresije u biomimičnom bioreктору, dok je direktni protok SBF u radijalnom pravcu površinskom brzinom od oko  $\sim 500 \mu\text{m/s}$  doveo je do značajnog formiranja mineralne faze ravnomerno unutar osteo-dela uzoraka.
- Ispitani su prototipovi I i II biorektora sa hidrostatičkim pritiskom u pogledu dostizanja i održavanja pritiska u hidrauličkoj i biorektorskoj komori. Razvijen je način punjenja biorektorske komore tako da ne sadrži mehurove gase čime je postignuta linearna zavisnost pritiska u obe komore. Na taj način je stvorena mogućnost za dalju fazu razvoja biorektora sa hidrostatičkim pritiskom, odnosno validaciju u eksperimentima gajenja ćelija i tkiva.

Ova doktorska disertacija, osim naučnog doprinosa u vidu razvoja novih biomaterijala i njihove karakterizacije u fiziološki relevantnim uslovima, ima praktičan doprinos u pogledu upotrebe biomimičnih biorektora kao adekvatnih 3D modela za procenu potencijala u konkretnoj primeni razvijenog biomaterijala sa ciljem da se smanje bespotrebna ispitivanja na životinjama i skрати put do dobijanja novih medicinskih sredstava i terapija.



## 7 LITERATURA

Aarstad O, Heggset E, Pedersen I, Bjørnøy S, Syverud K, Strand B. (2017) Mechanical properties of composite hydrogels of alginate and cellulose nanofibrils. *Polymers* 9 (378):1-19.

Adan A, Kiraz Y, Baran Y. (2016) Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 17(14): 1213-1221.

Ahamed M, Karns M, Goodson M, Rowe J, Hussain S.M, Schlager J.J, et al. (2008) DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 233:404–10.

Ahmed A.M, Burke D.L. (1983) In-vitro measurement of static pressure distribution in synovial joints - part I: tibial surface of the knee. *Journal of Biomechanical Engineering* 105:216–25.

Akter M, Sikder M, Rahman M, Ullah A, Hossain K, Banik S, Hosokawa T, Saito T, Kurasaki M. (2018) A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *Journal of Advanced Research* 9:1-16.

Alarcon E, Udekwu K, Noel C, Gagnon L, Taylor P, Vulesevic B, Simpson M, Gkotzis S, Islam M, Lee C-J, Richter-Dahlfors A, Mah T-F, Suuronen E, Scaiano H, Griffith M (2015) Safety and efficacy of composite collagen–silver nanoparticle hydrogels as tissue engineering scaffolds. *Nanoscale* 7:18789–18798.

Albro M, Chahine N, Li R, Yeager K, Hung C, Ateshian G. (2008) Dynamic loading of deformable porous media can induce active solute transport. *Journal of Biomechanics* 41:3152–3157.

Allan K.S, Pilliar R.M, Wang J, Grynepas M.D, Kandel R.A. (2007) Formation of biphasic constructs containing cartilage with a calcified zone interface. *Tissue Engineering*, 13:167–77.

Alves N.M, Leonor I.B, Azevedo H.S, Reis R.L, Mano J.F. (2010) Designing biomaterials based on biomineralization of bone. *Journal of Materials Chemistry* 20: 2911–2921.

Anderson D.E, Johnstone B. (2017) Dynamic mechanical compression of chondrocytes for tissue engineering: A critical review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 5:1–20.

Angel B, Batley G, Jarolimek C, Rogers N. (2013) The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems. *Chemosphere* 93:359–365.

Ansari S, Khorshidi S, Karkhaneh A. (2019). Engineering of gradient osteochondral tissue: from nature to lab. *Acta Biomaterialia* 87:41-54.

Arano T, Sato T, Matsuzaka K, Ikada Y, Yoshinari M. (2010) Osteoblastic cell proliferation with uniform distribution in a large scaffold using radial-flow bioreactor. *Tissue Engineering Part C: Methods* 16:1387–98.

Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. (2009) Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 236:310–318.

Ateshian G.A, Hung C.T. (2003) Functional properties of native articular cartilage. In: *Functional Tissue engineering: The role of biomechanics*. Guilak F, Butler D.L, Goldstein S.A, Mooney D.J (eds), Springer – Verlag NY Inc., NY, USA, 46-68.

Bacelar A, Silva-Correia J, Oliveira J, Reis R. (2016) Recent progress in gellan gum hydrogels provided by functionalization strategies. *Journal of Materials Chemistry B* 4:6164-6174.

Baino F, Hamzehlou S, Kargozar S. (2018) Bioactive Glasses: Where Are We and Where Are We Going? *Journal of Functional Biomaterials* 9 (25):1-26.

- Bajpai S, Sharma S. (2004) Investigation Of Swelling/Degradation Behaviour Of Alginate Beads Crosslinked With Ca<sup>2+</sup> And Ba<sup>2+</sup> Ions. *Reactive and Functional Polymers* 59:129-140.
- Baker RW. (2012) *Membrane Technology and Applications*. John Wiley and Sons, UK.
- Bancroft G.N, Sikavitsas V.I, van den Dolder J, Sheffield T.L, Ambrose C.G, Jansen J.A, Mikos A.G.(2002) Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts on a dose-depend manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:12600–12605.
- Barbir A, Godburn K.E, Michalek A.J, Lai A, Monsey R.D, Iatridis J.C. (2011) Effects of Torsion on Intervertebral Disc Gene Expression and Biomechanics, Using a Rat Tail Model. *Spine* 36:607–614.
- Barua S, Mitragotri S. (2014) Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects. *Nano Today*, 9:223–243.
- Baumann C.A, Hinckel B.B, Bozynski C.C, Far R. (2019) Articular Cartilage: Structure And Restoration. in *Joint Preservation of the Knee*. Yanke A.B, Cole B.J. (eds.), Springer Nature Switzerland, 3-24.
- Baumgartner W, Welti M, Hild N, Hess S.C, Stark W.J, Bürgisser G.M, Giovanoli P, Buschmann J. (2015) Tissue mechanics of piled critical size biomimetic and biomineralizable nanocomposites: formation of bioreactor-induced stem cell gradients under perfusion and compression . *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 47:124-134.
- Bibby S, Jones D, Lee R, Yu J, Urban J. (2001) The pathophysiology of the intervertebral disc. *Joint Bone Spine* 68:537-542.
- Bjerre L, Bungler , Baatrup A, Kassem M, Mygind T. (2011) Flow perfusion culture of human mesenchymal stem cells on coralline hydroxyapatite scaffolds with various pore sizes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 97:251–263.
- Bonassar L, Grodzinsky A, Frank E, Davila S, Bhaktav N, Trippel S. (2001) The effect of dynamic compression on the response of articular cartilage to insulin-like growth factor-I. *Journal of Orthopaedic Research* 19:11–17.
- Bonewald L.F. (2007) Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1116:281–290.
- Boonkaew B, Suwanpreuksa P, Cuttle L, Barber P.M, Supaphol P. (2013) Hydrogels containing silver nanoparticles for burn wounds show antimicrobial activity without cytotoxicity. *Journal of Applied Polymer Science* 131:40215.
- Bowles R.D, Setton L.A. (2017) Biomaterials for intervertebral disc regeneration and repair. *Biomaterials* 129:54-67.
- Braccini I, Perez S. (2001) Molecular basis of Ca<sup>2+</sup> -induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. *Biomacromolecules* 2:1089–1096.
- Briganti E, Losi P, Raffi A, Scoccianti M, Munaò A, Soldani G. (2006) Silicone based polyurethane materials: A promising biocompatible elastomeric formulation for cardiovascular applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 17:259–266.
- Brown T.D, Shaw D.T. (1983) In vitro contact stress distributions in the natural human hip. *Journal of Biomechanics*, 16:373–84.
- Buckley C.T, Hoyland J.A, Fujii K, Pandit A, Iatridis J.C, Grad S. (2018) Critical Aspects And Challenges For Intervertebral Disc Repair And Regeneration-Harnessing Advances In Tissue Engineering. *JOR Spine* 1.3: e1029

- Camarero-Espinosa S, Rothen-Rutishauser B, Foster EJ, Weder C. (2016). Articular cartilage: from formation to tissue engineering. *Biomaterials Science* 4:734–767.
- Chahine N, Albro M, Lima E, Wei V, Dubois C, Hung C, Ateshian G. (2009) Effect of dynamic loading on the transport of solutes into Agarose hydrogels. *Biophysical Journal* 97:968–975.
- Chan S.C.W, Ferguson S.J, Gantenbein-Ritter B. (2011) The effects of dynamic loading on the intervertebral disc. *European Spine Journal* 20:1796-1812.
- Charest J.M, Okamoto T, Kitano K, Yasuda A, Gilpin E, Mathisen D.J, Ott H.C. (2015) Design and validation of a clinical-scale bioreactor for long-term isolated lung culture. *Biomaterials* 52:79-87.
- Chen G, Xu R, Zhang C, Lv Y. (2017) Responses of MSCs to 3D scaffold matrix mechanical properties under oscillatory perfusion culture. *ACS Applied Material Interfaces* 9:1207-1218.
- Chen L, Hu J, Ran J, Shen X, Tong H. (2014) Preparation and evaluation of collagen-silk fibroin/hydroxyapatite nanocomposites for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 65:1–7.
- Chen Q.Z, Thompson I.D, Boccaccini A.R. (2006) 45S5 Bioglass®-derived glass–ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27:2414–2425.
- Chen Y, Bloemen V, Impens S, Moesen M, Luyten F.P, Schrooten J. (2011) Characterization and optimization of cell seeding in scaffolds by factorial design: quality by design approach for skeletal tissue engineering. *Tissue Engineering Part C* 17:1211–1221.
- Cheng H.W, Luk K.D, Cheung K.M, Chan B.P. (2011) In vitro generation of an osteochondral interface from mesenchymal stem cell-collagen microspheres. *Biomaterials* 32:1526-1535.
- Choi J.R, Yong K.W, Choi J.Y. (2017). Effects of mechanical loading on human mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering. *Journal of Cellular Physiology* 233:1913–1928.
- Chung C, Burdick J.A. (2008) Engineering cartilage tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60:243-62.
- Chung K. (2018) Rapid drug screen using 3D tumor organoids. *Science Translational Medicine* 10 (423):eaar7507
- Cinotti G, Postacchini F. (1999) 'Biomechanics' in Lumbar disc herniation, ed. Postacchini F, Springer-Verlag, Wien; 81 -93.
- Correia C, Pereira A.L, Duarte A.R, Frias A.M, Pedro A.J, Oliveira J.T, Sousa R.A, Reis R.L. (2012) Dynamic culturing of cartilage tissue: the significance of hydrostatic pressure, *Tissue Engineering Part A* 18:1979-1991.
- Correia V, Panadero J.A, Ribeiro C, Sencadas V, Rocha J.G, Gomez Ribelles J.L, Lanceros-Méndez S. (2016) Design and validation of a biomechanical bioreactor for cartilage tissue culture. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 15:471–478.
- Costa L, Silva-Correia J, Oliveira J.M, Reis R.L. (2018) Gellan Gum-Based Hydrogels for Osteochondral Repair. In: Oliveira J, Pina S, Reis R, San Roman J. (eds) *Osteochondral Tissue Engineering*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1058. Springer, Cham.
- Costa P.F, Martins A, Neves N.M, Gomes M.E, Reis R.L. (2014) Automating the processing steps for obtaining bone tissue-engineered substitutes: From imaging tools to bioreactors. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 20:567-577.

Currey J. (2016) Chapter A1 Cortical Bone. In: Murphy W, Black J, Hastings G. (eds) *Handbook of Biomaterial Properties*. Springer, New York, N.Y

Dallas S.L, Prideaux M, Bonewald L.F. (2013) The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocrine Reviews* 34:658–690.

Daly A, Sathy B, Kelly D. (2019) Engineering Large Cartilage Tissues Using Dynamic Bioreactor Culture At Defined Oxygen Conditions. *Journal of Tissue Engineering* 9 :1-12.

Dang M, Saunders L, Niu X, Fan Y, Ma P. (2018). Biomimetic delivery of signals for bone tissue engineering. *Bone Research* 6:1-12.

David V, Guignandon A, Martin A, Malaval L, Lafage-Proust MH, Rattner A, Mann V, Noble B, Jones J, Vico L. (2008) Ex Vivo bone formation in bovine trabecular bone cultured in a dynamic 3D bioreactor is enhanced by compressive mechanical strain. *Tissue Engineering: Parts A, B, and C* 14:117-26.

Davidovich-Pinhas M, Bianco-Peled H. (2010) A quantitative analysis of alginate swelling. *Carbohydrate Polymers* 79:1020–1027.

Day R.M. (2005) Bioactive glass stimulates the secretion of angiogenic growth factors and angiogenesis in vitro. *Tissue Engineering* 11 (5e6):768e77.

De Vos P, Faas M.M, Strand B, Calafiore R. (2006) Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials* 27:5603-17.

Ding F, Shao Z, Yang S, Wu Q, Gao F, Xiong L. (2012) Role of mitochondrial pathway in compression-induced apoptosis of nucleus pulposus cells. *Apoptosis* 17:579-590.

Donato D, De Napoli IE, Catapano G. Model-based optimization of scaffold geometry and operating conditions of radial flow packed-bed bioreactors for therapeutic applications. *Processes* 2014;2:34–57.

Douglas T.E.L, Krawczyk G, Pamula E, Declercq H.A, Schaubroeck D, Bucko M.M, Balcaen L, Van Der Voort P, Bliznuk V, van den Vreken N, Dash M, Detsch R, Boccaccini A, Vanhaecke F, Cornelissen M, Dubruel P. (2014). Generation of composites for bone tissue-engineering applications consisting of gellan gum hydrogels mineralized with calcium and magnesium phosphate phases by enzymatic means. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 10:938–954.

Draget K, Skjåk-Bræk G, Smidsrød O. (1997) Alginate based new materials. *International Journal of Biological Macromolecules* 21:47–55.

Draget K.I, Taylor C. (2011) Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocolloids* 25:251–256.

Drnovšek N. (2012) Development of Coatings on Ti6Al4V Alloy for New Generation Implants Bone with Improved Osseointegration, Jožef Stefan International Postgraduate School, Ljubljana, 132.

Durán N, Durán M, de Jesus M.B, Seabra A.B, Fávaro W.J, Nakazato G. (2016) Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 12:789–799.

El Badawy A, Silva R, Morris B, Scheckel K, Suidan M, Tolaymat T. (2011) Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. *Environmental Science & Technology* 45:283–287.

Elder B, Athanasiou K. (2009) Hydrostatic Pressure In Articular Cartilage Tissue Engineering: From Chondrocytes To Tissue Regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 15:43-53.

Euler S.A, Hengg C, Wambacher M, Spiegl U.J, Kralinger F. (2015) Allogenic bone grafting for augmentation in two-part proximal humeral fracture fixation in a high-risk patient population. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 135:79–87.

Evans R, Quinn T. (2006) Dynamic compression augments interstitial transport of a glucose-like solute in articular cartilage. *Biophysical Journal* 91:1541–1547.

Fan J.P, Kalia P, Di Silvio L, Huang J. (2014) In vitro response of human osteoblasts to multi-step sol–gel derived bioactive glass nanoparticles for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering C* 36:206–14.

Filardo G, Drobic M, Perdisa F, Kon E, Hribernik M, Marcacci M. (2014) Fibrin glue improves osteochondral scaffold fixation: study on the human cadaveric knee exposed to continuous passive motion. *Osteoarthritis and Cartilage* 22:557-565.

Finger A.R, Sargent C.Y, Dulaney K.O, Bernacki S.H, Lobo E.G. (2007) Differential effects on messenger ribonucleic acid expression by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells seeded in agarose constructs due to ramped and steady applications of cyclic hydrostatic pressure. *Tissue Engineering* 13:1151-1158.

Florencio-Silva R, Sasso G, Sasso-Cerri E, Simões M, Cerri P. (2015). *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells*. *BioMed Research International*, 1-17.

Fragomeni G, Iannelli R, Falvo Durso Labate G, Schwentenwein M, Catapano G. (2019) Validation Of A Novel 3D Flow Model For The Optimization Of Construct Perfusion In Radial-Flow Packed-Bed Bioreactors (Rpbbs) For Long-Bone Tissue Engineering. *New Biotechnology* 52:110-120.

Franz-Odenaal T.A, Hall B.K, Witten P.E. (2006) Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Developmental Dynamics* 235:176–190.

Frauchiger D, Tekari A, Wöltje M, Fortunato G, Benneker L, Gantenbein B. (2017) A Review Of The Application Of Reinforced Hydrogels And Silk As Biomaterials For Intervertebral Disc Repair. *European Cells and Materials* 34:271-290.

Freed L.E, Marquis J.C, Nohria A, Emmanuel J, Mikos A.G, Langer R. (1993) Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *Journal of Biomedical Materials Research* 27:11–23.

Freed L, Vunjak-Novakovic G. (2000) *Bioreactors in tissue engineering* in *Principles in Tissue Engineering*, Lanza R, Langer R, Vacanti J (eds), Burlington, M.A: Elsevier/Academic Press.

Frisbie D.D, Cross M.W, McIlwraith C.W. (2006) A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 19:142–146.

Frohlich M, Grayson WL, Marolt D, Gimble J.M, Kregar-Velikonja N, Vunjak-Novakovic G. (2010) Bone grafts engineered from human adipose-derived stem cells in perfusion bioreactor culture. *Tissue Engineering Part A* 16:179–89.

Gadžanski I, Vunjak-Novakovic G. (2013) Purinergic responses of chondrogenic stem cells to dynamic loading. *Journal of the Serbian Chemical Society* 78:1865-1874.

Gantar A, da Silva L.P, Oliveira J.M, Marques A.P, Correlo V.M, Novak S, Reis R.L. (2014) Nanoparticulate bioactive-glass-reinforced gellan-gum hydrogels for bone-tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C* 43:27–36.

Gardner O.F, Fahy N, Alini M, Stoddart M.J. (2017) Joint mimicking mechanical load activates TGF $\beta$ 1 in fibrin- poly (ester- urethane) scaffolds seeded with mesenchymal stem cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 11:2663-2666

Gao G, Schilling A.F, Yonezawa T, Wang J, Dai G, Cui X. (2014). Bioactive nanoparticles stimulate bone tissue formation in bioprinted three-dimensional scaffold and human mesenchymal stem cells. *Biotechnology Journal* 9:1304–1311.

Garibaldi R.A, Cushing D, Lerer T. (1991). Risk factors for postoperative infection. *The American Journal of Medicine* 91:S158–S163.

Gaspar D.A, Gomide V, Monteiro F.J. (2012) The role of perfusion bioreactors in bone tissue engineering. *Biomatter* 2:167–75.

Gharravi A.M, Orazizadeh M, Ansari-Asl K, Banoni S, Izadi S, Hashemitabar M. (2012) Design and fabrication of anatomical bioreactor systems containing alginate scaffolds for cartilage tissue engineering. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* 4:65-74.

Gibson J.S, Milner P.I, White R, Fairfax T.P.A, Wilkins R.J. (2008) Oxygen and reactive oxygen species in articular cartilage: modulators of ionic homeostasis. *European Journal of Physiology* 455:563-573.

Glowacki J, Trepman E, Folkman J. (1983) Cell shape and phenotypic expression in chondrocytes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology Medicine* 172:93–98.

Gopi D, Ansari M.T, Shinyjoy E, Kavitha L. (2012). Synthesis and spectroscopic characterization of magnetic hydroxyapatite nanocomposite using ultrasonic irradiation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 87:245–250.

Gorustovich A.A, Roether J.A, Boccaccini A.R. (2009) Effect of bioactive glasses on angiogenesis: a review of in vitro and in vivo evidences. *Tissue Engineering Part B Review* 16:199-207.

Grant G.T, Morris E.R, Rees D.A, Smith P.J.C, Thom D. (1973) Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Letters* 32:195–8.

Grayson W.L, Bhumiratana S, Cannizzaro C, Chao P.H.G, Lennon D.P, Caplan A, Vunjak-Novakovic G. (2008) Effects of initial seeding density and fluid perfusion rate in formation of tiessue-engineered bone. *Tissue Engineering* 14:1809-1820.

Grayson W.L, Chao P.H.G, Marolt D, Kaplan D.L, Vunjak-Novakovic G. (2008) Engineering custom-designed osteochondral tissue grafts. *Trends in Biotechnology* 26:181-189.

Grayson W.L, Marolt D, Bhumiratana S, Fröhlich M, Guo E, Vunjak-Novakovic G. (2011) Optimizing the medium perfusion rate in bone tissue engineering bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* 108:1159–1170.

Grimshaw M.J, Mason R.M. (2000) Bovine articular chondrocyte function in vitro depends upon oxygen tension. *Osteoarthritis and Cartilage* 8:386–392.

Grosse S, Evje L, Syversen T. (2013) Silver nanoparticle-induced cytotoxicity in rat brain endothelial cell culture. *Toxicology in Vitro* 27:305–13.

Gunawidjaja P.N, Lo A.Y.H, Izquierdo-Barba I, García A, Arcos D, Stevansson B, Grins J, Vallet-Regí M, Edén M. (2010) Biomimetic apatite mineralization mechanisms of mesoporous bioactive glasses as probed by multinuclear  $^{31}\text{P}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ,  $^{23}\text{Na}$  and  $^{13}\text{C}$  solid-state NMR. *The Journal of Physical Chemistry C* 114:19345–19356.

Gurumurthy B, Bierdeman P, Janorkar A. (2017) Spheroid model for functional osteogenic evaluation of human adipose derived stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 105:1230–1236.

- Hadida M, Marchat D. (2020) Strategy for achieving standardized bone models. *Biotechnology and bioengineering* 117: 251-271.
- Hannink G, Arts J. (2011). Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration?. *Injury* 42:S22-S25.
- Hansen U, Schünke M, Domm C, Ioannidis N, Hassenpflug J, Gehrke T, Kurz B. (2001) Combination of reduced oxygen tension and intermittent hydrostatic pressure: a useful tool in articular cartilage tissue engineering. *Journal of Biomechanics* 34:941-949.
- Hardingham T.E, Fosang A.J. (1992) Proteoglycans: Many forms and many functions. *The FASEB Journal* 6:861–870
- Hartvigsen J, Hancock MJ., Kongsted A, et al. (2018) What low back pain is and why we need to pay attention. *Lancet* 391:2356-2367.
- Haug A, Larsen B, Smidsrod O. (1974) Uronic acid sequence in alginate from different sources. *Carbohydrate Research* 32:217-225.
- Hay I, Rehman Z, Moradali M, Wang Y, Rehm B. (2013) Microbial alginate production, modification and its applications. *Microbial Biotechnology* 6:637–650.
- Hench L.L. (1991) Bioceramics: From concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society* 74:1487–1510.
- Hench L.L, Xynos I.D, Polak J.M. (2004) Bioactive glasses for in situ tissue regeneration. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 15:543e62.
- Heyland J, Wiegandt K, Goepfert C, Nagel-Heyer S, Ilinich E, Schumacher U, Pörtner R. (2006) Redifferentiation of chondrocytes and cartilage formation under intermittent hydrostatic pressure. *Biotechnology Letters* 28:1641-1648.
- Hirsh C, Paulson S, Sylven B, Snellman O. (1952) Biophysical and physiological investigations on cartilage and other mesenchymal tissues: characteristics of human nuclei pulposi during aging, *Acta Orthopaedica Scandinavica* 22:175–183.
- Hoffman AS. (2001) Hydrogels for biomedical applications. *Annals of the New York Academy of Sciences* 944:62–73.
- Hoffman T, Khademhosseini A, Langer R. (2019) Chasing The Paradigm: Clinical Translation Of 25 Years Of Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part A* 25.9-10:679-687.
- Hogstrand C, Galvez F, Wood C.M. (1996) Toxicity, silver accumulation and metallothionein induction in freshwater rainbow trout during exposure to different silver salts. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15:1102–1108.
- Huang A.H, Farrell M.J, Kim M, Mauck R.L. (2010). Long-term dynamic loading improves the mechanical properties of chondrogenic mesenchymal stem cell-laden hydrogels. *European cells & materials* 19:72.
- Huang K.T, Fang Y, Hsieh P, Lee C, Dai N, Huang C. (2017) Non-sticky and antimicrobial zwitterionic nanocomposite dressings for infected chronic wounds. *Biomaterial Science* 5:1072–1081.
- Hunziker E.B. (2002) Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and Cartilage* 10:432–463.
- Hutmacher D.W. (2010) Biomaterials offer cancer research the third dimension. *Nature Materials* 9:90–3.
- Hutton W, Elmer W, Boden S, Hyon S, Toribatake Y, Tomita K, Hair G. (1999) The effect of hydrostatic pressure on intervertebral disc metabolism. *Spine* 24:1507-1515.



Hutton W.C, Elmer W.A, Bryce L.M, Kozłowska E.E, Boden S.D, Kozłowski M. (2001) Do the intervertebral disc cells respond to different levels of hydrostatic pressure? *Clinical Biomechanics* 16: 728-734.

Illien-Jünger S, Lu Y, Purmessur D, Mayer J.E, Walter B.A, Roughley P.J, Qureshi S.A, Hecht A.C, Iatridis J.C. (2014) Detrimental Effects of Discectomy on Intervertebral Disc Biology can be Decelerated by Growth Factor Treatment during Surgery – A large animal organ culture model. *Spine Journal* 14:2724–2732.

Ingber D, Mow V, Butler D, Niklason L, Huard J, Mao J, Yannas I, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G. (2006) *Tissue Engineering And Developmental Biology: Going Biomimetic*. *Tissue Engineering* 12:3265-3283.

Ishihara H, McNally D.S, Urban J.P, Hall A.C. (1996) Effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in different regions of the intervertebral disk. *Journal of Applied Physiology* 80:839-846.

Izzo R, Guarnieria, Guglielmi G, Muto M. (2013) Biomechanics of the spine. Part I: Spinal stability. *European Journal of Radiology* 82:118– 126.

Jaffe F.F, Manki N.H.J, Weiss C, Zarins A. (1974) Water binding in the articular cartilage of rabbits. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 56: 1031–1039.

Jang J, Seol Y.J, Kim H.J, Kundu J, Kim S.W, Cho D.W. (2014). Effects of alginate hydrogel cross-linking density on mechanical and biological behaviors for tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 37:69–77.

Jensen G. (1980) Biomechanics of the lumbar intervertebral disk: a review. *Physical Therapy* 60:765-773.

Johnstone B, Alini M, Cucchiari M, Dodge GR, Eglin D, Guilak F, Madry H, Mata A, Mauck RL, Semino CE, Stoddart MJ. (2013) Tissue engineering for articular cartilage repair - the state of the art. *European Cells & Materials* 25:248-267.

Jones JR. (2015) Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia* 23:S53-S82.

Jørgensen T, Sletmoen M, Draget K, Stokke B. (2007) Influence of Oligoguluronates on Alginate Gelation, Kinetics, and Polymer Organization. *Biomacromolecules* 8:2388-2397.

Joris F, Manshian B, Peynshaert K, De Smedt S, Braeckmans K, Soenen S. (2013) Assessing nanoparticle toxicity in cell-based assays: influence of cell culture parameters and optimized models for bridging the in vitro–in vivo gap. *Chemical Society Reviews* 42:8339–8359.

Jovanović Z, Radosavljević A, Kačarević-Popović Z, Stojkowska J, PerićGrujić A, Ristić M, Matic I, Juranić Z, Obradovic B, MiskovicStankovic V. (2013) Bioreactor validation and biocompatibility of Ag/poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogel nanocomposites. *Colloids Surface B: Biointerfaces* 105:230–235.

Jovanović Ž, Stojkowska J, Obradović B, Mišković-Stanković V. (2012) Alginate hydrogel microbeads incorporated with Ag nanoparticles obtained by electrochemical method. *Materials Chemistry and Physics* 133:182-189.

Junter G.A, Vinet F. (2009) Compressive properties of yeast cell-loaded Ca-alginate hydrogel layers: Comparison with alginate–CaCO<sub>3</sub> microparticle composite gel structures. *Chemical Engineering Journal* 145:514–21.

Kang H, Zeng Y, Varghese S. (2018) Functionally graded multilayer scaffolds for in vivo osteochondral tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 78:365-377.

Karpiński R, Jaworski Ł, Jonak J and Krakowski P. (2019) Stress distribution in the knee joint in relation to tibiofemoral angle using the finite element method (MATEC Web of Conferences) 252:07007.

Kasra M, Goel V, Martin J, Wang S.T, Choi W, Buckwalter J. (2003) Effect of dynamic hydrostatic pressure on rabbit intervertebral disc cells. *Journal of Orthopaedics Research* 21:597-603.

Kasra M, Merryman W.D, Loveless K.N, Goel V.K, Martin J.D, Buckwalter J.A. (2006) Frequency response of pig intervertebral disc cells subjected to dynamic hydrostatic pressure. *Journal of Orthopaedics Research* 24: 1967-1973.

Katayama A, Arano T, Sato T, Ikada Y, Yoshinari M. (2013) Radial-flow bioreactor enables uniform proliferation of human mesenchymal stem cells throughout a three-dimensional scaffold. *Tissue Engineering* 19:109–16.

Karageorgiou V, Kaplan D. (2005) Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26:5474–91.

Kashte S, (2017) Artificial Bone via Bone Tissue Engineering: Current Scenario and Challenges. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 14:1–14.

Khampieng T, Wongkittithavorn S, Chairwut S, Ekabutr P, Pavasant P, Supaphol P. (2018) Silver nanoparticles-based hydrogel: characterization of material parameters for pressure ulcer dressing applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 44:91–100.

Khatoon N, Mazumder Jahirul A, Meryam S. Biotechnological Applications of Green Synthesized Silver Nanoparticles. *Journal of Nanosciences: Current Research* 2: 1000107.

Khorshidi S, Karkhaneh A. (2018) A review on gradient hydrogel/fiber scaffolds for osteochondral regeneration. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 12: e1974-e1990.

Khorshidi S, Solouk A, Mirzadeh H, Mazinani S, Lagaron JM, Sharifi S, Ramakrishna S. (2016) A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 10:715-738.

Kino-Oka M, Taya M. (2005) Design and operation of a radial flow bioreactor for reconstruction of cultured tissues. In: Chaudhuri J, Al-Rubeai M, (eds). *Bioreactors for Tissue Engineering*. 1st ed. Dordrecht, the Netherlands: Springer Verlag; 2005, 115–33.

Kim D.H, Kim S, Heo S, Shin J.W, Lee S.W, Park S.A, Shin J. (2009) Enhanced differentiation of mesenchymal stem cells into NP-like cells via 3D co-culturing with mechanical stimulation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 108: 63-67.

Kim H.M, Beppu T, Minoda M, Kawashita M, Kokubo T, Nakao M, Nakamura T, Miyamoto T. (2003a) Apatite-forming ability of carboxyl group-containing polymer gels in a simulated body fluid. *Biomaterials* 24:2477–2484.

Kim K.W, Lim T.H, Kim J.G, Jeong S.T, Masuda K, An H.S. (2003b) The origine of chondrocytes in the NP and histologic findings associated with the transition of a notochondral NP to a fibrocartilaginous NP in intact rabbit IVD. *Spine* 28: 982-990.

Kittler S, Greulich C, Diendorf J, Köller M, Epple M. (2010) Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. *Chemistry of Materials* 22:4548–4554.

Klein-Nulend J, Veldhuijzen J.P, Burger E.H. (1986) Increased calcification of growth plate cartilage as a result of compressive force in vitro. *Arthritis & Rheumatism* 29:1002-1009.

Kleinhans C, Mohan R.R, Vacun G, Schwarz T, Haller B, Sun Y, Kahlig A, Kluger P, Finne-Wistrand A, Walles H, Hansmann J. (2015) A Perfusion Bioreactor System Efficiently Generates Cell-Loaded Bone Substitute Materials For Addressing Critical Size Bone Defects. *Biotechnology Journal* 10:1727-1738.

Kobolak J, Dinnyes A, Memic A, Khademhosseini A, Mobasheri A. (2016) Mesenchymal Stem Cells: Identification, Phenotypic Characterization, Biological Properties And Potential For Regenerative Medicine Through Biomaterial Micro-Engineering Of Their Niche. *Methods* 99:62-68.

Koch M.A, Vrij E.J, Engel E, Planell J.A, Lacroix D. (2010) Perfusion cell seeding on large porous PLA/calcium phosphate composite scaffolds in a perfusion bioreactor system under varying perfusion parameters. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 95:1011–1018.

Kokubo T, Kim H.M, Kawashita M. (2003) Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials* 24:2161–2175.

Kokubo T, Takadama H. (2006) How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 27:2907–2915.

Kosik-Kozioł A, Costantini M, Bolek T, Szöke K, Barbetta A, Brinchmann J, Świążkowski W. (2017) PLA short sub-micron fiber reinforcement of 3D bioprinted alginate constructs for cartilage regeneration. *Biofabrication* 9:044105.

Kostić D, Malagurski I, Obradovic B. Transport of silver nanoparticles from nanocomposite Ag/alginate hydrogels under conditions mimicking tissue implantation. *Hemijska Industrija* 2017;71:383–394.

Kostić D, Vidovic S, Obradovic B. (2016) Silver release from nanocomposite Ag/alginate hydrogels in the presence of chloride ions: Experimental results and mathematical modeling. *J Nanoparticles Research* 18(76):1–16.

Krstic J, Spasojevic J, Radosavljevic A, Peric-Grujic A, Đuric M, Kacarevic-Popovic Z, Popovic S. (2014) In vitro silver ion release kinetics from nanosilver/poly(vinyl alcohol) hydrogels synthesized by gamma irradiation. *Journal of Applied Polymer Science* 131:40321–40335.

Krupa-Zuczek K, Kowalski Z, Wzorek Z. (2008) Manufacturing of Phosphoric Acid from Hydroxyapatite, Contained in the Ashes of the Incinerated Meat-Bone Wastes Pol. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 10:13-20.

Kuboki Y, Jin Q, Kikuchi M, Mamood J, Takita H. (2002) Geometry of artificial ECM: sizes of pores controlling phenotype expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. *Connective Tissue Research* 43:529–34.

Kühbeck D, Mayr J, Häring M, Hofmann M, Quignard F, Díaz Díaz D. (2015) Evaluation of the nitroaldol reaction in the presence of metal ion-crosslinked alginates. *New Journal of Chemistry* 39:2306-2315.

Kumar S.S.D, Rajendran N.K, Houreld N.N, Abrahamse H. (2018) Recent advances on silver nanoparticle and biopolymer-based biomaterials for wound healing applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 115:165–175.

Kundu J, Shim J, Jang J, Kim S, Cho D. (2015) An Additive Manufacturing-Based PCL-Alginate-Chondrocyte Bioprinted Scaffold For Cartilage Tissue Engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 9 :1286-1297.

Kunz-Schughart L, Freyer J, Hofstaedter F, Ebner R. (2004) The use of 3-D cultures for high-throughput screening: The multicellular spheroid model. *Journal of Biomolecular Screening* 9:273–285.

- Kuo C, Ma P. (2001) Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* 22:511–521.
- Kytýř D, Krčmářová N, Šleichrt J, Fila T, Koudelka P, Gantar A, Novak S. (2017) Deformation response of gellan gum based bone scaffold subjected to uniaxial quasi-static loading. *Acta Polytechnica Hungarica* 57:14-21.
- Labay C, Canal J, Modic M, Cvelbar U, Quiles M, Armengol M, Arbos M, Gil F, Canal C. (2015) Antibiotic-Loaded Polypropylene Surgical Meshes With Suitable Biological Behaviour By Plasma Functionalization And Polymerization. *Biomaterials* 71:132-144.
- Laor T, Jaramillo D. (2020) It's time to recognize the perichondrium. *Pediatric Radiology* 50:153-160.
- Lasagna-Reeves C, Gonzalez-Romero D, Barria M.A, Olmedo I, Closa A, Sadagopa Ramanujam V.M, Urayama A, Vergara L, Kogan M.J, Soto C. (2010) Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 393:649-655.
- Lavoine N, Guillard V, Desloges I, Gontard N, Bras J. (2016) Active biobased food-packaging: Diffusion and release of active substances through and from cellulose nanofiber coating toward foodpackaging design. *Carbohydrate Polymers* 149:40–50.
- Le Maitre C, Fotheringham A, Freemont A, Hoyland J. (2009) Development of an in vitro model to test the efficacy of novel therapies for IVD degeneration. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 3:461-469.
- Leawhiran N, Pavasant P, Soontornvipart K, Supaphol P. (2014) Gamma irradiation synthesis and characterization of AgNP/gelatin/PVA hydrogels for antibacterial wound dressings. *Journal of Applied Polymer Science* 131:41138.
- Lee J, Lilly G, Doty R, Podsiadlo P, Kotov N. (2009) In vitro toxicity testing of nanoparticles in 3D cell culture. *Small* 5:1213–1221.
- Lee K, Mooney D. (2012) Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science* 37:106-126.
- Lee K, Nallathamby P, Browning L, Osgood C, Xu X. (2007) In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of Zebrafish embryos. *ACS Nano* 1:133–143.
- LeGeros R.Z. (2002) Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 395:81–98.
- LeGeros R.Z. (2008) Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chemical Reviews* 108:4742–53.
- Levard C, Hotze E.M, Lowry G.V, Brown G.E, Jr. (2012) Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environmental Science & Technology* 46:6900–6914.
- Leu A, Leach J. (2008) Proangiogenic potential of a collagen/bioactive glass substrate. *Pharmaceutical Research* 25:1222e9.
- L'Heureux N, Dusserre N, Marini A, Garrido S, de la Fuente L, McAllister T. (2007) Technology Insight: the evolution of tissue-engineered vascular grafts—from research to clinical practice. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 4:389-395.
- Li D, Tang T, Lu J, Dai K. (2009) Effects of flow shear stress and mass transport on the construction of a large-scale tissue-engineered bone in a perfusion bioreactor. *Tissue Engineering Part A* 15:2773-2783.

- Li D.W, Zhou Q, Guo P, Song L, Liu Y. (2010) Proliferation of tissue-engineered cartilage cells under compressive stress. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 30: 2530-2.
- Li K, Williamson A, Wang A.S, Sah R.L. (2001) Growth Responses of Cartilage to Static and Dynamic Compression. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 391:S34-S48.
- Li K, Zhang C, Qiu L, Gao L, Zhang X. (2017). Advances in Application of Mechanical Stimuli in Bioreactors for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 23: 399–411.
- Li Y.J, Batra N.N, You L, Meier S.C, Coe I.A, Yellowley C.E, Jacobs C.R (2004) Oscillatory fluid flow affects human marrow stromal cell proliferation and differentiation. *Journal of Orthopaedic Science* 22:1283–1289
- Li Z, Yao S.J, Alini M, Stoddart MJ. (2010) Chondrogenesis of human bone marrow mesenchymal stem cells in fibrinpolyurethane composites is modulated by frequency and amplitude of dynamic compression and shear stress. *Tissue Engineering* 16:575–584.
- Lima E.G, Grace Chao P.H, Ateshian G.A, Bal B.S, Cook J.L, Vunjak-Novakovic G, Hung C. (2008) The effect of devitalized trabecular bone on the formation of osteochondral tissue-engineered constructs. *Biomaterials* 29:4292–9.
- Long R.G, Torre OM, Hom W.W, Assael D.J, Iatridis J.C. (2016) Design requirements for annulus fibrosus repair: Review of forces, displacements, and material properties of the intervertebral disk and a summary of candidate hydrogels for repair. *Journal of Biomechanical Engineering* 138: 021007.
- Loo C, Young P.M, Lee W, Cavaliere R, Whitchurch C.B, Rohanzadeh R. (2014) Non-cytotoxic silver nanoparticle-polyvinyl alcohol hydrogels with anti-biofilm activity: designed as coatings for endotracheal tube materials. *Biofouling* 30:773–788.
- Lovecchio J, Gargiulo P, Vargas Luna J.L, Giordano E, Sigurjónsson O.E. (2019) A standalone bioreactor system to deliver compressive load under perfusion flow to hBMSC-seeded 3D chitosan-graphene templates. *Scientific Reports* 9: 6854 (1-11).
- Luo Y, Wang C, Hossain M, Qiao Y, Ma L, An J, Su M. (2012) Three-Dimensional Microtissue Assay for High-Throughput Cytotoxicity of Nanoparticles. *Analytical Chemistry* 84:6731-6738.
- Ma L, Barker J, Zhou C, Li W, Zhang J, Lin B, Foltz G, Küblbeck J, Honkakoski P. (2012) Towards Personalized Medicine With A Three-Dimensional Micro-Scale Perfusion-Based Two-Chamber Tissue Model System. *Biomaterials* 33:4353-4361.
- Ma H, Yin B, Wang S, Jiao Y, Pan W, Huang S, Chen S, Meng F. (2004) Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles by a Novel Electrochemical Method. *ChemPhysChem* 5:68-75.
- Maepa M, Razwinani M, Motaung S. (2016) Effects Of Resveratrol On Collagen Type II Protein In The Superficial And Middle Zone Chondrocytes Of Porcine Articular Cartilage. *Journal of Ethnopharmacology* 178:25-33.
- Maia F.R, Musson D.S, Naot D, Da Silva L.P, Bastos A.R, Costa J.B, Oliveira J.M, Correlo V.M, Reis R.L, Cornish J. (2018) Differentiation Of Osteoclast Precursors On Gellan Gum-Based Spongy-Like Hydrogels For Bone Tissue Engineering. *Biomedical Materials* 13: 035012.
- Malafaya P.B, Pedro A.J, Peterbauer A, Gabriel C, Redl H, Reis R.L. (2005) Chitosan particles agglomerated scaffolds for cartilage and osteochondral tissue engineering approaches with adipose tissue derived stem cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 16:1077–1085.

- Mancini M, Moresi M, Rancini R. (1999) Mechanical properties of alginate gels: empirical characterization. *Journal of Food Engineering* 39:369–78.
- Mankin H.J, Mow V.C, Buckwalter J.A, Iannotti J.P, Ratcliffe A. (2000) Articular cartilage structure, composition, and function. *Orthopaedic basic science: biology and biomechanics of the musculoskeletal system* 2:443-470.
- Mauck R, Byers B, Yuan X, Tuan R. (2007) Regulation of cartilaginous ECM gene transcription by chondrocytes and MSCs in 3D culture in response to dynamic loading. *Biomechanics and modeling in mechanobiology* 6:113-125.
- Mayne R. (1989) Cartilage collagens. What is their function, and are they involved in articular disease? *Arthritis & Rheumatology* 32:241–246.
- Mern D.S, Beierfuß A, Thomé C, Hegewald A.A. (2014) Enhancing human nucleus pulposus cells for biological treatment approaches of degenerative intervertebral disc diseases: a systematic review. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 8:925-936.
- Merritt K, Brown S.A. (1995) Release of hexavalent chromium from corrosion of stainless steel and cobalt—chromium alloys. *Journal of Biomedical Materials Research* 29:627–633.
- Mow V.C, Huiskes R. (2005) *Basic orthopaedic biomechanics & mechano-biology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Makvandi P, Ali G, Della Sala F, Abdel-Fattah W, Borzacchiello A. (2019) Biosynthesis and characterization of antibacterial thermosensitive hydrogels based on corn silk extract, hyaluronic acid and nanosilver for potential wound healing. *Carbohydrate Polymers* 223:115023.
- Mardones R, Jofré C, Minguell J. (2015) Cell Therapy And Tissue Engineering Approaches For Cartilage Repair And/Or Regeneration. *International Journal of Stem Cells* 8: 48-53.
- Marlovits S, Tichy B, Truppe M, Gruber D, Schlegel W. (2003) Collagen expression in tissue engineered cartilage of aged human articular chondrocytes in a rotating bioreactor. *International Journal of Artificial Organs* 26:319-330.
- Martín A, Salinas A, Vallet-Regí M. (2005) Bioactive and degradable organic–inorganic hybrids. *Journal of the European Ceramic Society* 25:3533–3538.
- Martin I, Miot S, Barbero A, Jakob M, Wendt D. (2007) Osteochondral tissue engineering. *Journal of Biomechanics* 40:750–65.
- Martin I, Wendt D, Heberer M. (2004) The Role of Bioreactors in Tissue Engineering. *Trends in Biotechnology* 22:80-86.
- Martino M.M, Briquez P.S, Maruyama K, Hubbell J.A. (2015) Extracellular matrix-inspired growth factor delivery systems for bone regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews* 94: 41–52.
- Martinsen A, Skjåk-Braek G, Smidsrød O. (1989) Alginate as immobilization material: I. correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnology and Bioengineering* 33:79–89.
- Martínez-Castañón G, Niño-Martínez N, Martínez-Gutierrez F, Martínez-Mendoza J, Ruiz F. (2008) Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of Nanoparticle Research* 10: 1343–1348.
- Marsell R, Einhorn T.A. (2011) The biology of fracture healing. *Injury* 42:551–555.
- Mauck R.L, Soltz M.A, Wang C.C.B, Wong D.D, Chao P-H.G, Valhmu W.B, Hung C.T, Athesian G.A. (2000) Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte seeded agarose gels. *Journal of Biomechanical Engineering* 122:252–260.

Maxson S, Burg KJL. (2012) Synergistic effects of conditioned media and hydrostatic pressure on the differentiation of mesenchymal stem cells. *Cellular and Molecular Bioengineering* 5: 414–426.

Meinel L, Karageorgiou V, Fajardo R, Snyder B, Shinde-Patil V, Zichner L, et al. (2004) Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow. *Annals of Biomedical Engineering* 32:112–22.

Melchels FP Tonnarelli B, Olivares AL, Martin I, Lacroix D, Feijen J, Wendt DJ, Grijpma DW (2011) The influence of the scaffold design on the distribution of adhering cells after perfusion cell seeding. *Biomaterials* 32:2878–2884.

Meriç G, Dahl JE, Ruyter IE. (2008). Cytotoxicity of silica–glass fiber reinforced composites. *Dental Materials* 24: 1201–1206.

Milentijevic D, Torzilli P.A. (2005) Influence Of Stress Rate On Water Loss, Matrix Deformation And Chondrocyte Viability In Impacted Articular Cartilage. *Journal of Biomechanics* 38:493-502.

Miller LM, Vairavamurthy V, Chance MR, Mendelsohn R, Paschalis E.P, Betts F, Boskey AL. (2001) In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared micro-spectroscopy of the  $\nu_4$  PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> vibration *Biochim. Biophys. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1527: 11-19.

Mizuno S, Ogawa R. (2011) Using changes in hydrostatic and osmotic pressure to manipulate metabolic function in chondrocytes, *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 300: C1234–C1245.

Mizuno S, Watanabe S, Takagi T. (2004) Hydrostatic fluid pressure promotes cellularity and proliferation of human dermal fibroblasts in a three-dimensional collagen gel/sponge. *Biochemical Engineering Journal* 20: 203-208.

Miyaniishi K, Trindade M, Lindsey D, Beaupré G, Carter D, Goodman S, Schurman D, Smith R. (2006a) Effects of hydrostatic pressure and transforming growth factor- $\beta_3$  on adult human mesenchymal stem cell chondrogenesis in vitro. *Tissue Engineering* 12: 1419-1428.

Miyaniishi K, Trindade M, Lindsey D, Beaupré G, Carter D, Goodman S, Schurman D, Smith R. (2006b) Dose- and time-dependent effects of cyclic hydrostatic pressure on transforming growth factor- $\beta_3$ -induced chondrogenesis by adult human mesenchymal stem cells in vitro. *Tissue Engineering* 12: 2253-2262.

Moghadasali R, Shekarchian S, Hajinasrollah M, Yousefian E, Najarasl M, Baharvand H, Aghdami, N. (2019) Decellularized Kidney Scaffold Mediated Renal Regeneration in a Rhesus Macaque Mulatta Monkey Model. *Journal of Bioengineering Research* 1:1-18.

Molleman B, Hiemstra T. (2017) Time, pH, and size dependency of silver nanoparticle dissolution: the road to equilibrium. *Environmental Science: Nano* 4:1314-1327.

Montaser A, Abdel-Mohsen A, Ramadan M, Sleem A, Sahffie N, Jancar J, Hebeish A. (2016) Preparation and characterization of alginate/- silver/nicotinamide nanocomposites for treating diabetic wounds. *International Journal of Biological Macromolecules* 92:739–747.

Mow V.C, Ratcliffe A, Poole A.R. (1992) Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials* 13:67-97.

Mulfinger L, Solomon S, Bahadory M, Jeyarajasingam A, Rutkowsky S, Boritz C. (2007) Synthesis and study of silver nanoparticles. *Journal of Chemical Education* 84:322–325.

Mumme M, Barbero A, Miot S, Wixmerten A, Feliciano S, Wolf F, Asnaghi AM, Baumhoer D, Bieri O, Kretschmar M, Pagenstert G, Haug M, Schaefer DJ, Martin I, Jakob M.



(2016) Nasal Chondrocyte-Based Engineered Autologous Cartilage Tissue For Repair Of Articular Cartilage Defects: An Observational First-In-Human Trial. *The Lancet* 388: 1985-1994.

Mwale F, Roughley P, Antoniou J. (2004) Distinction between the extracellular matrix of the nucleus pulposus and hyaline cartilage: a requisite for tissue engineering of intervertebral disc. *European cells & materials* 8: 58-64.

Nachemson A. (1981) Disc Pressure Measurements. *Spine* 6: 93-97.

Nagae M, Ikeda T, Mikami Y, Hase H, Ozawa H, Matsuda K, Sakamoto H, Tabata Y, Kawata M, Kubo T. (2007) Intervertebral Disc Regeneration Using Platelet-Rich Plasma and Biodegradable Gelatin Hydrogel Microspheres. *Tissue Engineering* 13: 147-158.

Naidi B, Govender P, Adam J. (2015) Nano Silver Particles in Biomedical and Clinical Applications : Review. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 9:1-10.

Naing M, Liu Y, Sebastine I, Dingmann D, Williams C, Williams D. (2014) Design and Validation of a Physiologically-Adapted Bioreactor for Tissue Engineering of the Nucleus Pulposus. *Processes* 2:1–11.

Natarajan Raghu N, Andersson Gunnar BJ. (2017) Lumbar Disc Degeneration Is an Equally Important Risk Factor as Lumbar Fusion for Causing Adjacent Segment Disc Disease. *Journal of Orthopaedic Research* 35:123-130.

Neidlinger-Wilke C, Würtz K, Liedert A, Schmidt C, Börm W, Ignatius A, Wilke H, Claes L. (2005) A three-dimensional collagen matrix as a suitable culture system for the comparison of cyclic strain and hydrostatic pressure effects on intervertebral disc cells. *Journal of Neurosurgery Spine* 2: 457-465.

Ng K.W, Mauck R.L, Wang C.C, Kelly T.A, Ho M.M, Chen F.H, Ateshian G.A, Hung C.T. (2009) Duty cycle of deformational loading influences the growth of engineered articular cartilage. *Cellular and Molecular Bioengineering* 2:386-394.

Obradović B, Miskovic-Stankovic V, Jovanovic Z, Stojkowska J. Production of alginate microbeads with incorporated silver nanoparticles. patent RS53508 (B1), 2015.

O'Connor C.J, Case N, Guilak F. (2013) Mechanical regulation of chondrogenesis. *Stem cell research & therapy* 4:61.

Oliveira J,M, Rodrigues M,T, Silva S,S, Malafaya P,B, Gomes M,E, Viegas C,A, ... & Reis RL. (2006) Novel hydroxyapatite/chitosan bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications: Scaffold design and its performance when seeded with goat bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 27:6123-6137.

Olivier V, Hivart P, Descamps M, Hardouin P. (2007) In vitro culture of large bone substitutes in a new bioreactor: importance of the flow direction. *Biomedical Materials* 2:174–80.

Olson E, Carlson C. (2017) Bones, Joints, Tendons, and Ligaments in Pathologic Basis of Veterinary Disease. (ed.) Zachary J, Elsevier, St. Louis, Missouri.

Omidian H, Park K, Rocca J.G. (2007) Recent Developments in Superporous Hydrogels. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59: 317-327.

Orr D.E, Burg K.J.L. (2008) Design of a modular bioreactor to incorporate both perfusion flow and hydrostatic compression for tissue engineering applications. *Annals of Biomedical Engineering* 36:1228-1241.

Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. (2014) Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 9:18.

Pandey S, Ramontja J. (2016) Sodium alginate stabilized silver nanoparticles–silica nanohybrid and their antibacterial characteristics. *International Journal of Biological Macromolecules* 93: 712–723.

Park E.J, Yi J, Kim Y, Choi K, Park K. (2010) Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicology in Vitro* 24: 872–878.

Park K, Shin Y, Kim K, Shin H. (2018) Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2017: A Year in Review. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 24:327-344.

Park S, Hung C, Ateshian G. (2004) Mechanical Response Of Bovine Articular Cartilage Under Dynamic Unconfined Compression Loading At Physiological Stress Levels. *Osteoarthritis and Cartilage* 12: 65-73.

Pearle A.D, Warren R.F, Rodeo S.A. (2005) Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. *Clinical Journal of Sport Medicine* 24(1):1–12.

Pereira D.R, Silva-Correia J, Oliveira J.M, Reis R.L. (2013) Hydrogels in acellular and cellular strategies for intervertebral disc regeneration. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 7:85-98.

Petrović M, Mitraković D, Bugarski B, Vonwil D, Martin I, Obradović B, A novel bioreactor with mechanical stimulation for skeletal tissue engineering. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly* 15: 41–44.

Piao M.J, Kang KA, Lee I.K, Kim H.S, Kim S, Choi J.Y, Choi J, Hyun J.W. (2011) Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letters* 201:92-100.

Pickup M.W, Mouw J.K, Weaver V.M. (2014) The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Reports* 15:1243–53.

Puetzer J, Williams J, Gillies A, Bernacki S, Lobo E. (2013) The effects of cyclic hydrostatic pressure on chondrogenesis and viability of human adipose- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in three-dimensional agarose constructs. *Tissue Engineering Part A* 19: 299-306.

Radonjić M. (2017) Razvoj i karakterizacija dvofaznih osteohondralnih implantata na bazi gelanske gume. Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.

Raho R, Nguyen N.Y, Zhang N, Jiange W, Sannino A, Liu H, Pollini M, Paladini F. (2020) Photo-assisted green synthesis of silver doped silk fibroin/carboxymethyl cellulose nanocomposite hydrogels for biomedical applications. *Materials Science and Engineering C* 107:110219.

Rattanuengsrikul V, Pimpha N, Supaphol P. (2012) In vitro efficacy and toxicology evaluation of silver nanoparticle-loaded gelatin hydrogel pads as antibacterial wound dressings. *J Appl Polym Sci* 124:1668–1682.

Raquel Maia F, Correló V, Oliveira J, Reis R. (2019) Natural Origin Materials for Bone Tissue Engineering. in *Principles of Regenerative Medicine*; Atala A, Lanza R, Mikos A, Nerem R. (eds), Elsevier Inc. 535-558.

Reinhart C, Peppas N. (1984) Solute diffusion in swollen membranes. Part II. Influence of crosslinking on diffusive properties. *J Memb Sci* 18:227–239.

Resmi R, Unnikrishnan S, Krishnan L, Kalliyana Krishnan V. (2017) Synthesis and characterization of silver nanoparticle incorporated gelatin-hydroxypropyl methacrylate hydrogels for wound dressing applications. *Journal of Applied Polymer Science* 134:44529.

Rijal G, Li W. (2018) Native-mimicking in vitro microenvironment: an elusive and seductive future for tumor modeling and tissue engineering. *Journal of Biological Engineering* 12: 1:22.

Rikimaru-Nishi Y, Rikimaru H, Hashiguchi S, Kanazawa T, Ohta K, Nakamura KI, Kiyokawa K (2018) Histological study of costal cartilage after transplantation and reasons for avoidance of postoperative resorption and retention of cartilage structure in rats. *Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery* 52:352-358.

Rocheffort G.Y, Pallu S, Benhamou CL. (2010) Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporosis International* 21:1457–1469.

Roelofsen J, Klein-Nulend J, Burger E. (1995) Mechanical stimulation by intermittent hydrostatic compression promotes bone-specific gene expression in vitro. *Journal of Biomechanics* 28: 1493-1503.

Rosenzweig D.H, Fairag R, Mathieu A.P, Li L, Eglin D, D’Este M, et al. (2018) Thermoreversible hyaluronan-hydrogel and autologous nucleus pulposus cell delivery regenerates human intervertebral discs in an ex vivo, physiological organ culture model. *European Cells & Materials* 36 200–217.

Santoro R, Olivares A.L, Brans G, Wirz D, Longinotti C, Lacroix D, Marti I, Wendt D. (2010) Bioreactor based engineering of large-scale human cartilage grafts for joint resurfacing. *Biomaterials* 31: 8946-8952.

Santos M.V.B, Oliveira A.L, Osajima J.A, Silva-Filho E.C. (2020) Development Of Composites Scaffolds With Calcium And Cerium-Hydroxyapatite And Gellan Gum. *Ceramics International* 46: 3811-3817.

Sadeghi H, Shepherd D, Espino D. (2015) Effect of the variation of loading frequency on surface failure of bovine articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 23:2252–2258.

Safarzadeh M, Ramesh S, Tan C.Y, Chandran H, Noor A.F.M, Krishnasamy S, Alengaram UJ, Ramesh S. (2018) Effect of multi-ions doping on the properties of carbonated hydroxyapatite bioceramic. *Ceramics International* 45: 3473-3477.

Samberg M, Lobo E, Oldenburg S, Monteiro-Riviere N. (2012) Silver nanoparticles do not influence stem cell differentiation but cause minimal toxicity. *Nanomedicine* 7:1197-1209.

Sanosh K.P, Gervaso F, Sannino A, Licciulli A. (2013) Preparation and characterization of Collagen/hydroxyapatite microsphere composite scaffold for bone regeneration. *Key Engineering Materials* 587:239–44.

Sari-Chmayssem N, Taha S, Mawlawi H, Guégan J, Jeftid J, Benvegna T. (2015) Extracted and depolymerized alginates from brown algae *Sargassum vulgare* of Lebanese origin: chemical, rheological, and antioxidant properties. *Journal of Applied Phycology* 28:1915-1929.

Sartori C, Finch D, Ralph B, Gilding K. (1997) Determination of the cation content of alginate thin films by FTIR spectroscopy. *Polymer* 38:43–51.

Sawatjui N, Limpaboon T, Schrobback K, Klein T. (2018) Biomimetic Scaffolds And Dynamic Compression Enhance The Properties Of Chondrocyte- And MSC-Based Tissue-Engineered Cartilage. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 12: 1220-1229.

Saxena A.K. (2010) Tissue engineering and regenerative medicine research perspectives for pediatric surgery, *Pediatric Surgery International* 26:557-573

Schatti O, Grad S, Goldhahn J, Salzmann G, Li Z, Alini M, Stoddart M. (2011) A combination of shear and dynamic compression leads to mechanically induced chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *European Cells & Materials* 22(214-225):b97.

Scherer K, Schünke M, Sellckau R, Hassenpflug J, Kurz B. (2004) The influence of oxygen and hydrostatic pressure on articular chondrocytes and adherent bone marrow cells in vitro. *Biorheology* 41: 323–333.

Scotti C, Wirz D, Wolf F, Schaefer D, Bürgin V, Daniels A, Valderraban V, Candrian C, Jakob M, Martin I, Barbero A. (2010) Engineering Human Cell-Based, Functionally Integrated Osteochondral Grafts By Biological Bonding Of Engineered Cartilage Tissues To Bony Scaffolds. *Biomaterials* 31: 2252-2259.

Seo J, Shin J.Y, Leijten J, Jeon O, Bal Öztürk A, Rouwkema J, Li Y, Shin S.R, Hajjali H, Alsberg E, Khademhosseini A. (2018) Interconnectable dynamic compression bioreactors for combinatorial screening of cell mechanobiology in three dimensions. *ACS Applied Material Interfaces* 10:13293-13303

Seo S, Lee G, Lee S, Jung S, Lim J, Choi J. (2012) Alginate-based composite sponge containing silver nanoparticles synthesized in situ. *Carbohydrate Polymers* 90:109–115.

Setton L.A, Chen J. (2006) Mechanobiology of the intervertebral disc and relevance to disc degeneration. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume* 88-A: 52-57.

Shahin K, Doran P.M. (2011) Strategies for enhancing the accumulation and retention of extracellular matrix in tissue-engineered cartilage cultured in bioreactors. *PLoS One* 6: e23119,

Shanks N, Greek R, Greek J (2009) Are animal models predictive for humans? *Philosophy, Ethics, and Humanities in Medicine* 4:2.

Shimomura K, Moriguchi Y, Murawski C.D, Yoshikawa H, Nakamura N. (2014). Osteochondral Tissue Engineering with Biphasic Scaffold: Current Strategies and Techniques. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 20: 468–476.

Siddharthan A, Seshadri S.K, Sampath Kumar T.S. (2004) Microwave accelerated synthesis of nanosized calcium deficient hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1:1279 – 1284.

Sikavitsas V.I, Bancroft G.N, Holtorf H.L, Jansen J.A, Mikos A.G. (2003) Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion culture increases with increasing fluid shear forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:14683-14688.

Sikavitsas V.I, Bancroft G.N, Mikos A.G. (2002) Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor. *Journal of Biomedical Materials Research* 62:36–48.

Silva-Correia J, Oliveira J.M, Caridade S.G, Oliveira J.T, Sousa R.A, Mano J.F, Reis R.L. (2011) Gellan gum-based hydrogels for intervertebral disc tissue-engineering applications. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 5:97-107.

Singh H, Ang E.S, Lim T.T, Hutmacher D.W. (2007) Flow modeling in a novel non-perfusion conical bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 97:1291–9.

Singh M, Pierpoint M, Mikos A.G, Kasper FK. (2011) Chondrogenic differentiation of neonatal human dermal fibroblasts encapsulated in alginate beads with hydrostatic compression under hypoxic conditions in the presence of bone morphogenetic protein-2, *Journal of Biomedical Materials Research A* 98A: 412-424.

Singh M, Singh S, Gambhir P. (2008) Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 3: 115 – 122.

Singh R.P, Ramarao P. (2012) Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles. *Toxicol Lett* 213:249–59.

Smith L.R, Rusk SF, Ellison BE, Wessells P, Tsuchiya K, Carter DR, Caler WE, Sandell LJ, Schurman D.J. (1996) In vitro stimulation of articular chondrocyte mRNA and extracellular matrix synthesis by hydrostatic pressure. *Journal of Orthopaedic Research* 14: 53-60

Smith L.R, Trindade M.C.D, Ikenoue T, Mohtai M, Das P, Carter D.R, Goodman S.B, Schurman D.J. (2000) Effects of shear stress on articular chondrocyte metabolism. *Biorheology* 37:95-107.

Stevens L.R, Gilmore KJ, Wallace G.G, in het Panhuis M. (2016) Tissue engineering with gellan gum. *Biomaterial Science* 4:1276e90.

Stojkowska J. (2015) Dobijanje i karakterisanje nanokompozitnih hidrogelova na bazi alginata i nanočestica srebra za primenu u biomedicini. Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.

Stojkowska J, Bugarski B, Obradovic B. (2010) Evaluation of alginate hydrogels under in vivo-like bioreactor conditions for cartilage tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21:2869–2879.

Stojkowska J, Djurdjevic Z, Jancic I, Bufan B, Milenkovic M, Jankovic R, Miskovic-Stankovic V, Obradovic B. (2018) Comparative in vivo evaluation of novel formulations based on alginate and silver nanoparticles for wound treatments. *Journal of Biomaterials Applications* 32: 1197–1211.

Stojkowska J, Jovanovic Ž, Jancic I, Bufan B, Milenkovic M, Mišković-Stanković V, Obradovic B. (2013) Novel Ag/alginate nanocomposites for wound treatments: Animal studies. *Rane* 4: 17–22.

Stojkowska J, Kostic D, Jovanovic Z, Vukašinović-Sekulić M, Mišković-Stanković V, Obradovic B. (2014) A comprehensive approach to in vitro functional evaluation of Ag/alginate nanocomposite hydrogels. *Carbohydrate Polymers* 111:305–314.

Stojkowska J, Zvicer J, Jovanovic Z, Miskovic-Stankovic V, Obradovic B. (2012) Controlled production of alginate nanocomposites with incorporated silver nanoparticles aimed for biomedical applications. *Journal of Serbian Chemical Society* 77:1709–1722.

Stolk R, Wegen van der-Franken C.P, Neumann H.A. (2004) A method for measuring the dynamic behavior of medical compression hosiery during walking. *Dermatologic Surgery* 30:729–736.

Sukhanova A, Bozrova S, Sokolov P, Berestovoy M, Karaulov A, Nabiev I. (2018) Dependence of nanoparticle toxicity on their physical and chemical properties. *Nanoscale Research Letters* 13:44.

Sun Y, Zhang Z, Liu L, Wang X. (2015) FTIR, Raman and NMR investigation of CaO – SiO<sub>2</sub> – P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and CaO–SiO<sub>2</sub>–TiO<sub>2</sub>–P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 420:26-33.

Surmenev R.A, Shkarina S, Syromotina D.S, Melnik E.V, Shkarin R, Selezneva II, Ermakov A.M, Ivlev S.I, Cecilia A, Weinhardt V, Baumbach T, Lapanje A, Chaikina M.V, Surmeneva M.A. (2019) Characterization of Biomimetic Silicate- and Strontium-Containing Hydroxyapatite Microparticles Embedded in Biodegradable Electrospun Polycaprolactone Scaffolds for Bone Regeneration. *European Polymer Journal* 113:67-77.

Swieszkowski W, Tuan B.H, Kurzydowski K.J, Hutmacher D.W. (2007) Repair and regeneration of osteochondral defects in the articular joints. *Biomolecular Engineering* 24:489-95.

Šerban N. (2005) Pokretne i nepokretne ćelije, Savremena administracija, Beograd, 308.

Tak Y, Pal S, Naoghare P, Rangasamy S, Song J. (2015) Shape-dependent skin penetration of silver nanoparticles: Does it really matter? *Scientific Reports* 5:16908.

Tanahashi M, Yao T, Kokubo T, Minoda M, Miyamoto T, Nakamura T, Yamamuro T. (1994) Apatite coated on organic polymers by biomimetic process: Improvement in its adhesion to substrate by NaOH treatment. *Journal of Applied Biomaterials* 5: 339–347.

Tanaka Y, Noda K, Isse K, Tobita K, Maniwa Y, Bhama J.K, D’Cunha J, Bermudez C.A, Luketich J.D, Shigemura N. (2015) A novel dual ex vivo lung perfusion technique improves immediate outcomes in an experimental model of lung transplantation. *American Journal of Transplantation* 15:1219.

Tao G, Cai R, Wang Y, Liu L, Zuo H, Zhao P, Umar A, Mao C, Xia Q, He H. (2019) Bioinspired design of AgNPs embedded silk sericin-based sponges for efficiently combating bacteria and promoting wound healing. *Materials & Design* 180:107940.

Thakuri P.S, Liu C, Luker GD, Tavana H. (2017) Biomaterials-based approaches to tumor spheroid and organoid modeling. *Advanced Healthcare Materials* 7:1700980.

Topuz F, Henke A, Richtering W, Groll J. (2012) Magnesium ions and alginate do form hydrogels: a rheological study. *Soft Matter* 8:4877-4881.

Tranquilli Leali P, Doria C, Zachos A, Ruggiu A, Milia F, Barca F. (2009) Bone fragility: current reviews and clinical features. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* 6:109–113.

Turner C. (2006) Bone Strength: Current Concepts. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1068:429-446.

Umoren S.A, Obot I.B, Gasem Z.M. (2014) Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using Red Apple (*Malus domestica*) Fruit Extract at Room Temperature. *Journal of Materials and Environmental Science* 5: 907-914.

Valle H, Rivas B, Fernandez M, Mondaca M, Aguilar M, Roman J.S. (2014) Antibacterial activity and cytotoxicity of hydrogelnanosilver composites based on copolymers from 2-acrylamido-2-methylpropanesulfonate sodium. *Journal of Applied Polymer Science* 131:39644.

Van Kampen G.P.J, Veldhuijzen J.P, Kuijer R, van de Stadt R.J, Schipper C.A. (1985) Cartilage response to mechanical force in high-density chondrocyte cultures, *Arthritis & Rheumatology*, 28: 419-424.

Velings N, Mestdagh M. (1995) Physico-chemical properties of alginate gel beads. *Polymer Gels and Networks* 3:311–330.

Velioglu ZB, Pulat D, Demirbakan B, Ozcan B, Bayrak E, Eriskan C. (2018) 3D-Printed Poly (Lactic Acid) Scaffolds For Trabecular Bone Repair And Regeneration: Scaffold And Native Bone Characterization. *Connective Tissue Research* 60: 274-282.

Venkatesan J, Bhatnagar I, Kim S.K. (2014) Chitosan-alginate biocomposite containing fucoidan for bone tissue engineering. *Marine Drugs* 12:300–16.

Vetsch J.R, Betts D.C, Müller R, Hofmann S. (2017) Flow velocity-driven differentiation of human mesenchymal stromal cells in silk fibroin scaffolds: a combined experimental and computational approach, *PLoS One*, 12:1-17.

Vidović S, Zvicer J, Stojkowska J, Miskovic-Stankovic V, Obradovic B. (2012) Nanocomposite microfibers based on alginate and PVA hydrogels with incorporated silver nanoparticles, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 6:s189-s189.

Vetsch J.R, Betts D.C, Müller R, Hofmann S. (2013) The evolution of simulation techniques for dynamic bone tissue engineering in bioreactors. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 9:903-17.

Vieira S, da Silva Morais A, Garet E, Silva-Correia J, Reis RL, González-Fernández Á, Miguel Oliveira J. (2019). Self-mineralizing Ca-enriched Methacrylated Gellan Gum Beads for Bone Tissue Engineering. *Acta Biomaterialia* 93; 74-85.

Vo T.N, Kasper F.K, Mikos A.G. (2012) Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64:1292–1309.

Walter B.A, Illien-Jünger S, Nasser PR, Hecht, Iatridis C. (2014) Development and validation of a bioreactor system for dynamic loading and mechanical characterization of whole human intervertebral discs in organ culture. *Journal of Biomechanics* 47: 2095–2101.

Wang C, Huang X, Deng W, Chang C, Hang R, Tang B. (2014) A nanosilver composite based on the ion-exchange response for the intelligent antibacterial applications. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* 41: 134–141.

Wang D.A, Varghese S, Sharma B, Strehin I, Fermanian S, Gorham J, et al. (2007) Multifunctional chondroitin sulphate for cartilage tissue-biomaterial integration. *Nature Materials* 6:385–92.

Wang Y, Uemura T, Dong J, Kojima H, Tanaka J, Tateishi T. (2003) Application of Perfusion Culture System Improves in Vitro and in Vivo Osteogenesis of Bone Marrow-Derived Osteoblastic Cells in Porous Ceramic Materials. *Tissue Engineering* 9:1205-1214.

Watanabe S, Inagaki S, Kinouchi I, Takai H, Masuda Y, Mizuno S. (2005) Hydrostatic pressure/perfusion culture system designed and validated for engineering tissue. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100: 105-111.

Wobma H, Vunjak-Novakovic G. (2016). *Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2015: A Year in Review. Tissue Engineering Part B: Reviews* 22:101-113.

Xie Y, Hardouin P, Zhu Z, Tang T, Dai K, Lu J. (2006) Three-dimensional flow perfusion culture system for stem cell proliferation inside the critical-size B-tricalcium phosphate scaffold. *Tissue Engineering* 12:3535–43.

Xiu Z.M, Zhang Q.B, Puppapa H.L, Colvin V.L, Colvin P.J. (2012) Negligible particlespecific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Letters* 12:4271–5.

Xynos I.D, Edgar A.J, Buttery L.D.K, Hench L.L, Polak J.M. (2001) Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. *Journal of Biomedical Materials Research* 55:151e7.

Xynos I.D, Hukkanen M.V.J, Batten J.J, Buttery L.D, Hench L.L, Polak JM. (2000) Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation in vitro: Implications and applications for bone tissue engineering. *Calcified Tissue International* 67:321–9.

Yang C, Wang M, Haider H, Yang J, Sun J, Chen Y, Zhou J, Suo Z. (2013) Strengthening Alginate/polyacrylamide hydrogels using various multivalent Cations. *ACS Applied Materials & Interfaces* 5:10418–10422.

Yang T, Yao Q, Cao F, Liu Q, Liu B, Wang X. (2016). Silver nanoparticles inhibit the function of hypoxia-inducible factor-1 and target genes: insight into the cytotoxicity and antiangiogenesis. *International Journal of Nanomedicine* 11: 6679–6692.

Yoon H.H, Bhang SH, Shin JY, Shin J, Kim BS. (2012) Enhanced cartilage formation via three-dimensional cell engineering of human adipose-derived stem cells. *Tissue Engineering Part A* 18:1949-1956.

Zechner-Krpan V, Petravić-Tominac V, Gospodarić I, Sajli L, Đaković S, Filipović –Grčić J. (2010) Characterization of 13-glucans isolated from brewer's yeast and dried by different methods. *Food Technology and Biotechnology* 48:189–197.



Zhang J, Zhao S, Zhu Y, Huang Y, Zhu M, Tao C, et al. (2014) Three dimensional printing of strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds for bone regeneration. *Acta Biomaterialia* 10:2269–81.

Zhao F, Vaughan TJ, McNamara LM. (2016) Quantification of fluid shear stress in bone tissue engineering scaffolds with spherical and cubical pore architectures. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 15:561-577.

Zhao J, Griffin M, Cai J, Li S, Bulter P, Kalaskar D. (2016) Bioreactors for Tissue Engineering: An Update, *Biochemical Engineering Journal* 109:268-281.

Zhao X, Xia Y, Li Q, Ma X, Quan F, Geng C, Han Z. (2014) Microwave assisted synthesis of silver nanoparticles using sodium alginate and their antibacterial activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 444:180–188.

Zhou J, Xu C, Wu G, Cao X, Zhang L, Zhai Z, Zheng Z, Chen X, Wang Y. (2011) In vitro generation of osteochondral differentiation of human marrow mesenchymal stem cells in novel collagen-hydroxyapatite layered scaffolds. *Acta Biomaterialia* 7:3999-4006.

Zia K.M, Tabasum S, Khan M.F, Akram N, Akhter N, Noreen A, Zuber M. (2018) Recent Trends On Gellan Gum Blends With Natural And Synthetic Polymers: A Review. *International Journal of Biological Macromolecules* 109: 1068-1087.

Zvicer J, Obradovic B. (2018) Bioreactors with hydrostatic pressures imitating physiological environments in intervertebral discs (Review). *Journal of Tissue engineering and Regenerative Medicine* 12:529-545.

Zvicer J, Samardžić M, Mišković-Stanković V, Obradović B. (2015) Cytotoxicity studies of Ag/alginate nanocomposite hydrogels in 2D and 3D cultures, 2015 IEEE 15th International Conference on Bioinformatics and Bioengineering (BIBE).

## 8 PRILOG

### 8.1 SPISAK SLIKA

- Slika 1.1** Koncept inženjerstva tkiva uključuje izolaciju adekvatnih ćelija iz pacijenta ili drugog izvora, njihovu proliferaciju, zasejavanje na 3D nosače i gajenje u biomimičnim bioreaktorima sa ciljem da se dobije tkivni ekvivalent za dalju implantaciju (*Saxena, 2010*) 2
- Slika 1.2** Neki primeri nosača: a) alginatni nosač dobijen 3D štampom (*Kosik-Kozioł i sar., 2017*), b) decelularizovani bubreg (*Moghadasali i sar., 2019*) 3
- Slika 1.3** Struktura artikularne hrskavice: a) organizacija i morfologija zona hrskavice, b) histološki presek (*Karpiński i sar., 2019*) 5
- Slika 1.4** Geliranje natrijum-alginata u prisustvu jona kalcijuma i formiraje hidrogela kalcijum-alginata; a) prikaz strukturnih formula  $\beta$ -D-manuronske kiseline (M jedinica),  $\alpha$ -L-guluronske kiseline (G jedinica) organizovanih u GG i MM blokove, b) model kutije za jaje (prilagođeno u odnosu na *Kühbeck i sar., 2015*) 7
- Slika 1.5** Reprezentativni primer mehaničkih karakteristika alginata: a) zavisnost napona od primenjene deformacije za 2 mas.% alginatne hidrogelove umrežene sa različitom koncentracijom  $\text{CaCO}_3$  (36, 72 i 144 mM; b) modul elastičnosti za dobijene hidrogelove (*Jang i sar., 2014*) 8
- Slika 1.6** Primena nanočestica srebra u biomedicini (prilagođeno u odnosu na *Khatoon i sar., 2017*) 8
- Slika 1.7** Tipovi bioreaktora koji se najčešće koriste u inženjerstvu tkiva hrskavice: a) rotirajući bioreaktor, b) sud sa mešanjem, c) protočni bioreaktor, d) bioreaktor sa hidrostatičkim pritiskom, e) bioreaktor sa dinamičkom kompresijom i f) bioreaktor sa kombinovanim mehaničkim opterećenjima (prilagođeno u odnosu na *Stojkowska, 2015*) 10
- Slika 1.8** Struktura i građa kosti: a) poprečni presek kompaktnog dela kosti, b) gradivna struktura kompaktne kosti, c) razlika između gradivne jedinice kompaktne i sponozaste kosti (*Olson i Charlson, 2017*) 13
- Slika 1.9** Strukturna formula gelasne gume 15
- Slika 1.10** Šematski prikaz zatvorenog protočnog bioreaktorskog sistema. Medijum iz rezervoara pomoću pumpe se potiskuje kroz komoru protočnog bioreaktora u kojoj je smešten uzorak. Na putu ka komori prolazi kroz dugo crevo za razmenu gasova gde dolazi do oksigenacije medijuma 17
- Slika 1.11** Protočni bioreaktor sa radijalnim tokom, izgled komore i uzorka i način strujanja: a) pogled odozgo, b) uzdužni poprečni presek (*Fragomeni i sar., 2019*) 19
- Slika 1.12** Građa intervertebralnog diska: a) bočni prikaz susednih pršljenova sa intervertebralnog diska, b) normalan prikaz (preuzeto iz *Anatomy and Physiology, Openstax, 2013, online book*) 20
- Slika 1.13** Mehanička naprezanja unutar intervertebralnog diska tokom aksijalne kompresije i savijanja: a) aksijalna kompresija izaziva pritisak unutar *nucleus pulposus*, pri čemu dolazi do naprezanja *anulus fibrosus*, b) savijanje generiše pritisak unutar *nucleus pulposus* dok kod *anulus fibrosus* dolazi do nabijanja ili c) istezanje vlnaka (*Cinotti i Postacchini, 1999*) 21
- Slika 1.14** Eksperimentalni biomimični sistem za ispitivanje ćelijskog odgovora u 3D ćelijskoj kulturi. Autologne ćelije poreklom iz *nucleus pulposus* lumbalnog dela kičme pacijenta umnožene su u monosloju, a zatim imobilisane u hidrogelove na bazi hijalurona i poli(N-izopropilakril amida) i smeštene unutar silikonskih modli uz pomoć agaroznih gelova. Proliferacija, formiranje ekstracelularnog matriksa i vijabilnost su ispitivani nakon 3 nedelje u fiziološki-relevantnim uslovima (*Rosenzweig i sar., 2018*) 22

- Slika 1.15** Dizajn bioreaktora kod diskontinualnih sistema sa hidrostatičkim pritiskom: a) direktna kompresija hranljivog medijuma - pomeranjem klipa ostvaruje se kompresija hranljivog medijuma koji je u direktnom kontaktu sa ćelijama, b) indirektna kompresija hranljivog medijuma - pomeranjem klipa komprimuje se fluid (voda, vazduh) koji prenosi pritisak na ispitivane uzorke u kontaktu sa hranljivim medijumom, zatvorene unutar sterilnih kesica, špriceva, ili epruveta sa membranom (*Zvicer i Obradovic, 2018*) 23
- Slika 1.16** Dizajn kontinualnih bioreaktora sa hidrostatičkim pritiskom: a) kontinualni sistem gde se prenos pritiska vrši preko membrane, b) kontinualni sistem sa statičkim kulturama, c) sofisticirani bioreaktor sa više biomehaničkih signala (*Zvicer i Obradovic, 2018*) 25
- Slika 1.17** Prikaz pristupa za ispitivanje citotoksičnosti biomaterijala: kontakt test na monosloju ćelija, 3D kulturi tkiva u biomimetičnom bioreaktoru i ispitivanje na životinjama (deo prilagođen u odnosu na *Zvicer i sar., 2015*) 27
- Slika 3.1** Protočni bioreaktorski sistem: a) komora bioreaktora napravljena od filterskog kućišta koje se povezuje sa sistemom za recirkulaciju medijuma preko niza od četiri redukciona creva, b) ceo sistem u kome je komora bioreaktora povezana sa sistemom creva za recirkulaciju medijuma koja se odvija pomoću višekanalne peristaltičke pumpe 31
- Slika 3.2** Bioreaktor sa dinamičkom kompresijom: a) na osnovu bioreaktora (2) se pričvršćuje nosač komora (1) pri čemu se osnova vertikalno pomera pomoću step motora (3); ispod osnove je ugrađen senzor opterećenja (4); b) nosač sa 6 bioreaktorskih komora; c) bioreaktorska komora sa dva priključka; d) bioreaktorska komora sa četiri priključka 33
- Slika 3.3** Šematski prikaz postavke eksperimenta tokom ispitivanja načina strujanja dva različita fluida kroz komore za osteohontaralne uzorke 34
- Slika 3.4** Izgled bioreaktora sa hidrostatičkim pritiskom u prvoj fazi razvoja, prototip 1 34
- Slika 3.5** Šematski prikaz eksperimentalne aparature za izvođenje elektrostatičke ekstruzije kojom se, pod dejstvom gravitacione i elektrostatičke sile dobijaju kapi koje u rastvoru za geliranje očvršćavaju i formiraju Ag/alginatne mikročestice (*Stojkowska, 2015*) 37
- Slika 3.6** Femur teleta sa koga je izolovana artikularna hrskavica 38
- Slika 3.7** Šematski prikaz procedure za dobijanje makroporoznih hidrogelova na bazi gelanske gume i bioaktivnog stakla: (i) mešanje polimernog rastvora gelanske gume sa neorganskom komponentom bioaktivnog stakla, (ii) izlivanje smeše u epruvete u kojima se odvija geliranje, (iii) stabilizacija, (iv) liofilizacija, (v) rehidracija celog suvog cilindričnog uzorka, (vi) sečenje na diskove odgovarajuće visine, koji se zatim ponovo rehidrišu do potpune rehidracije 42
- Slika 3.8** Šematski prikaz tri sistema u kojima je ispitivan prelazak bioaktivnog stakla u mineralnu fazu kalcijum fosfata: a) protočni bioreaktor omogućava direktan protok simulirane telesne tečnosti kroz uzorak u aksijalnom pravcu, b) bioreaktor sa dinamičkom kompresijom omogućava dinamičku kompresiju uzorka pored protoka simulirane telesne tečnosti u aksijalnom pravcu; c) statička studija u kojoj se uzorak gelanske gume sa bioaktivnim staklom nalazi potopljen u simuliranoj telesnoj tečnosti 43
- Slika 4.1** UV-vidljivi apsorpcioni spektri inicijalnih 3,9 mM koloidnih rastvora i sterilisanih 1 mM koloidnih rastvora za: a) alginat male viskoznosti sa velikim sadržajem G jedinica (VG) i b) alginat srednje viskoznosti sa malim sadržajem G jedinica (MG); (100 µl koloidnog rastvora je razblaženo u 2,9 ml dejonizovane vode; podaci su srednje vrednosti od n=3; standardne devijacije su izostavljene radi preglednosti) 50
- Slika 4.2** TEM analiza koloidnog rastvora alginat male viskoznosti sa velikim sadržajem G jedinica (VG): a) mikrografija nanočestica srebra; b) raspodela veličina nanočestica srebra 51
- Slika 4.3** TEM analiza koloidnog rastvora alginat srednje viskoznosti sa malim sadržajem G jedinica (MG): a) mikrografija nanočestica srebra; b) raspodela veličina nanočestica srebra 51

- Slika 4.4** UV-vidljivi apsorpcioni spektri sterilisanih 1 mM koloidnih rastvora i dobijenih diskova za: a) alginat male viskoznosti sa velikim sadržajem G jedinica (*VG*) i b) alginat srednje viskoznosti sa malim sadržajem G jedinica (*MG*); (100  $\mu$ l koloidnog rastvora je razblaženo u 2,9 ml dejonizovane vode dok je 0,1 g Ag/alginatnih diskova rastvorenih u 2,9 ml 10 mas.% Na-citrata; podaci su srednje vrednosti od  $n=3$ ; standardne devijacije su izostavljene radi preglednosti) 52
- Slika 4.5** TEM analiza nakon rastvaranja Ag/alginatnih diskova na bazi alginata male viskoznosti sa velikim sadržajem G jedinica (*VG*): a) mikrografija nanočestica srebra; b) raspodela veličina nanočestica srebra 53
- Slika 4.6** TEM analiza nakon rastvaranja Ag/alginatnih diskova na bazi alginata srednje viskoznosti sa malim sadržajem G jedinica (*MG*): a) mikrografija nanočestica srebra; b) raspodela veličina nanočestica srebra 53
- Slika 4.7** Uporedni FTIR spektri: a) Na- alginata srednje viskoznosti sa malim sadržajem G jedinica (*MG*) i *MG* Ca-alginata, b) Na-alginata male viskoznosti sa velikim sadržajem G jedinica (*VG*) i *VG* Ca-alginata, c) *MG* koloidnog rastvora i *MG* diskova, d) *VG* koloidnog rastvora i *VG* diskova, e) *MG* Na-alginata i *MG* koloidnog rastvora i f) *VG* Na-alginata i *VG* koloidnog rastvora 54
- Slika 4.8** Zavisnosti napona od deformacije pri brzini kompresije od 337,5  $\mu$ m/s; eksperimentalni rezultati (srednja vrednost tri merenja) i linearne zavisnosti dobijene metodom najmanjih kvadratna odstupanja: a) Ag/alginatni diskovi na bazi alginata male viskoznosti sa velikim sadržajem G jedinica (*VG*), b) Ag/alginatni diskovi na bazi alginata srednje viskoznosti sa malim sadržajem G jedinica (*MG*) (na eksperimentalne rezultate primenjen je centralni matematički metod filtriranja srednje vrednosti od pet tačaka) 56
- Slika 4.9** Preživljavanje (S%) ćelijskih linija tretiranih sa koloidnim rastvorom alginata srednje viskoznosti sa malim sadržajem G jedinica (*MG*) pri ukupnoj koncentraciji srebra od 0,05 mM i 0,5 mM nakon 2 h, 48 h i 144 h: a) humanih matičnih ćelija poreklom iz masnog tkiva (hASC); b) L929 58
- Slika 4.10** Preživljavanje (S%) ćelija hondrocita tretiranih sa koloidnim rastvorom alginata srednje viskoznosti sa malim sadržajem G jedinica (*MG*) koncentracije srebra od 0,05 mM i 0,5 mM, kao i sa *MG* koloidnim rastvorom u dva puta većoj zapremini (0,5 mM (2V)) nakon 24 h; umetak predstavlja uvećan deo grafika za grupe 0,5 mM i 0,5 mM (2V) 59
- Slika 4.11** Ćelije u monosloju iz kontrolne studije, bez tretmana (razmernik = 500  $\mu$ m) 60
- Slika 4.12** Kontakt test u kulturi hondrocita u monosloju nakon 48 h: a) silikonski lepak kao biokompatibilni referentni materijal, b) bakarna pločica kao referentni toksični materijal, c) Ag/alginatni disk na bazi alginata male viskoznosti sa velikim sadržajem G jedinica (*VG*); levi panel: ivica materijala, desni panel: ivica bunarića (razmernik = 500  $\mu$ m) 60
- Slika 4.13** Kontakt test u kulturi hondrocita u monosloju nakon 96 h: a) silikonski lepak kao biokompatibilni referentni materijal, b) bakarna pločica kao referentni toksični materijal, c) Ag/alginatni disk na bazi alginata male viskoznosti sa velikim sadržajem G jedinica (*VG*); levi panel: ivica materijala, desni panel: ivica bunarića (razmernik = 500  $\mu$ m) 61
- Slika 4.14** Preživljavanje (S%) ćelija hondrocita u grupi sa hranljivim medijumom (M) i u tretiranim grupama sa ekstraktom polipropilenskih pločica (pozitivna kontrola, K+), ekstraktom bakarnih pločica (negativna kontrola, K-) i ekstraktom Ag/alginatnih diskova na bazi alginata male viskoznosti sa velikim sadržajem G jedinica (*VG*) nakon 48 i 96 h 62
- Slika 4.15** Histološki preseki eksplantata tkiva artikularne hrskavice posle 48 h: a) statička kultura, b) bioreaktorska kultura sa protoka 0,5 mM koloidnog rastvora u medijumu. Levi paneli: „alcian blue“ bojenje; desni paneli: „H&E“ bojenje (razmernik = 500  $\mu$ m) 63
- Slika 4.16** Izgled sterilnih nanokompozitnih mikročestica korišćenih za ispitivanje citotoksičnosti u bioreaktorskim uslovima tokom 13 dana 64

- Slika 4.17** Analiza Ag/alginatnih mikročestica nakon 13 dana eksperimenta; a) mikrografija dela mikročestice, razmernik = 500  $\mu\text{m}$ ; b) UV-vidljivi spektar rastvorenih Ag/alginatnih mikročestica (0,1 g mikročestica rastvorenih u 2,9 ml 10 mas.% Na-citrata; podaci pred stavljaju srednju vrednost od tri merenja 64
- Slika 4.18** Zavisnosti napona od deformacije pri brzini kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$  za eksplantate artikularne hrskavice na sloju Ag/alginatnih mikročestica na početku eksperimenta; eksperimentalni podaci i linearna zavisnost dobijena metodom najmanjih kvadrata odstupanja za srednje vrednosti merenja 65
- Slika 4.19** Zavisnosti napona od deformacije pri brzini kompresije od 337,5  $\mu\text{m/s}$  za eksplantate artikularne hrskavice na sloju Ag/alginatnih mikročestica drugog dana eksperimenta; eksperimentalni podaci 65
- Slika 4.20** Vrednosti dinamičkog modula elastičnosti tokom vremena; crvenim tačkama su predstavljene vrednosti modula kompresije za dane kada su spuštani klipovi 66
- Slika 4.21** Histološki preseki eksplantata tkiva artikularne hrskavice: a) prirodno tkivo, b) bioreaktorska kultura nakon 13 dana u kontaktu sa Ag/alginatnim mikročesticama. Levi paneli: „alcian blue“ bojenje; desni paneli: „H&E“ bojenje (razmernik = 500  $\mu\text{m}$ ) 67
- Slika 4.22** Histološki preseki eksplantata tkiva artikularne hrskavice nakon 4 dana: a) statička kultura, b) bioreaktorska kultura u kontaktu sa Ag/alginatnim diskovima (levi deo predstavlja površinu eksplantata u direktnom kontaktu sa diskom, desni deo predstavlja donju stranu eksplantata). Levi paneli: „alcian blue“ bojenje; desni paneli: „H&E“ bojenje (razmernik = 500  $\mu\text{m}$ ) 68
- Slika 4.23** SEM mikrografije preseka diskova nakon 4 dana eksperimenta: a) Ag/alginatni disk; b) alginatni disk u kontaktu sa Ag/alginatnim diskom; razmernik = 2  $\mu\text{m}$ , strelicama su označeni aglomerati nanočestica srebra 69
- Slika 4.24** SEM mikrografija ivice alginatnog diska koja nije bila u konkaktu sa Ag/alginatnih diskom posle 4 dana eksperimenta; razmernik = 5  $\mu\text{m}$ . 69
- Slika 4.25** Koncentracija srebra u medijumu tokom 7 dana u statičkim i uslovima dinamičke kompresije u bioreaktoru: eksperimentalni podaci (simboli) i rezultati modelovanja (linije) (podaci predstavljaju prosek  $n = 3$ ) 70
- Slika 4.26** Šematski prikaz otpuštanja srebra iz Ag/alginatnih diskova: eksperimentalna postavka i geometrija neophodna za matematičko modelovanje: a) statički uslovi – povećanje diskova od početne debljine 2 mm do debljine  $X=4$  mm; jednodimenzionalna difuzija nano nanočestica/jona srebra sa prividnim koeficijentom difuzije  $D'$ ; b) bioreaktor sa dinamičkom kompresijom – zanemarljivo bubrenje; jednodimenzionalna difuzija nanočestica/jona srebra sa prividnim koeficijentom difuzije  $D''$  uz intersticijalni protok fluida sa neto brzinom  $u$  kao rezultat dotoka tečnosti ( $u_{\text{dot}}$ ) tokom kompresije i odtoka ( $u_{\text{ot}}$ ) tokom relaksacije 71
- Slika 4.27** Fotografije hidrogelova gelanske gume i bioaktivnog stakla sa unutrašnjim porama - serija A: a) poprečni presek suvog uzorka, b) aksijalna površina nakon bojenja plavim mastilom, c) poprečni presek nakon bojenja plavim mastilom (crvene strelice označavaju neporoznu aksijalnu površinu hidrogelova, žute strelice označavaju poroznu unutrašnjost hidrogelova); (razmernik=0,5 mm) 74
- Slika 4.28** SEM mikrografije poprečnih preseka hidrogelova sa unutrašnjim porama kod kojih je dispergovanje bioaktivnog stakla u vodenom rastvoru podstignuto: a) jednostavnim umešavanjem na magnetnoj mešalici, serija A, b) primenom ultrazvučne sonde, serija B (razmernik = 1 mm) 74
- Slika 4.29** SEM mikrografije poprečnih preseka reprezentativnih hidrogelova sa unutrašnjim porama dobijenih jednostavnim umešavanjem bioaktivnog stakla– serija A; a) razmernik = 20  $\mu\text{m}$ ,

b) razmernik = 5  $\mu\text{m}$ ; (bele strelice ukazuju na deo koji predstavlja polimer i bioaktivno staklo, žute strelice ukazuju na postojanje pora) 75

**Slika 4.30** Slike poprečnog preseka makroporoznih hidrogelova gelenske gume i bioaktivnog stanka - serija C: a) u suvoj formi, b) nakon rehidratacije i bojenja plavim mastilom (crvene strelice označavaju neporoznu lateralnu površinu hidrogelova, žute strelice označavaju poroznu aksijalnu površinu i unutrašnjost hidrogela) 76

**Slika 4.31** SEM mikrografije poprečnih preseka reprezentativnih makroporoznih hidrogelova – serija C; a) razmernik = 20  $\mu\text{m}$ , b) razmernik = 2  $\mu\text{m}$ ; (bela strelica ukazuju na deo gde polimer prekriva bioaktivno staklo, žuta strelica pokazuje na aglomerat bioaktivnog stakla) 77

**Slika 4.32** SEM mikrografije poprečnih preseka hidrogelova sa unutrašnjim porama – serija A, iz protočnog bioreaktora nakon 7 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti; a) razmernik = 10  $\mu\text{m}$ , b) i c) razmernik = 5  $\mu\text{m}$ , (žute strelice označavaju mineralnu fazu; d) razmernik = 2  $\mu\text{m}$ ; (beli krugovi označavaju mesta gde se uočava degradacija polimera) 78

**Slika 4.33** SEM mikrografije poprečnih preseka hidrogelova sa unutrašnjim porama, serija A iz kontrolne statičke studije nakon 7 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti; a) razmernik = 10  $\mu\text{m}$ , b) i c) razmernik = 5  $\mu\text{m}$ , d) razmernik = 2  $\mu\text{m}$ ; (žute strelice označavaju mineralnu fazu u početnoj fazi formiranja, bele strelice označavaju mineralnu fazu u obliku cvetova karfiola, beli krugovi označavaju mesta gde se uočava degradacija polimera) 79

**Slika 4.34** SEM mikrografije uzoraka sa unutrašnjim porama, serija A nakon 14 dana u protočnom bioreaktoru: a) makroskopski prikaz, razmernik 1 mm, b) mikroskopski prikaz, razmernik 5  $\mu\text{m}$ ; (žute strelice označavaju formiranje mineralne faze u početnoj fazi, bele strelice označavaju mineralnu fazu u obliku cvetova karfiola) 80

**Slika 4.35** SEM mikrografije uzoraka sa unutrašnjim porama, serija A nakon 14 dana u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom: a) makroskopski prikaz, razmernik 2 mm, b) mikroskopski prikaz, razmernik 5  $\mu\text{m}$ ; (žute strelice označavaju formiranje mineralne faze u početnoj fazi, bele strelice označavaju mineralnu fazu u obliku cvetova karfiola, dok beli krugovi označavaju područja mestimične degradacije polimera) 81

**Slika 4.36** SEM mikrografije uzoraka sa unutrašnjim porama, serija A nakon 14 dana u kontrolnoj statičkoj studiji: a) makroskopski prikaz, razmernik 1 mm, b) mikroskopski prikaz, razmernik 5  $\mu\text{m}$ ; (žute strelice označavaju formiranje mineralne faze u početnoj fazi, bele strelice označavaju mineralnu fazu u obliku cvetova karfiola) 81

**Slika 4.37** SEM mikrografije hidrogelova sa unutrašnjim porama, serija B nakon 14 dana u protočnom bioreaktoru: a) makroskopski prikaz, razmernik 2 mm, b) mikroskopski prikaz, razmernik 5  $\mu\text{m}$ ; (žute strelice označavaju formiranje mineralne faze u početnoj fazi, bele strelice označavaju mineralnu fazu u obliku cvetova karfiola) 82

**Slika 4.38** SEM mikrografije hidrogelova sa unutrašnjim porama. serija B nakon 14 dana u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom: a) makroskopski prikaz, razmernik 1 mm, b) mikroskopski prikaz, razmernik 5  $\mu\text{m}$ ; (žute strelice označavaju formiranje mineralne faze u početnoj fazi, bele strelice označavaju mineralnu fazu u obliku cvetova karfiola) 82

**Slika 4.39** SEM mikrografije hidrogelova sa unutrašnjim porama, serija B nakon 14 dana u kontrolnoj statičkoj studiji: a) makroskopski prikaz, razmernik 1 mm, b) mikroskopski prikaz, razmernik 5  $\mu\text{m}$ ; (žute strelice označavaju formiranje mineralne faze u početnoj fazi, bele strelice označavaju mineralnu fazu u obliku cvetova karfiola) 83

**Slika 4.40** EDS elementarna analiza hidrogelova sa unutrašnjim porama, serija A nakon 14 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti: iz protočnog bioreaktora (p), bioreaktora sa dinamičkom kompresijom (d) i statičke kontrolne studije (s): a) spoljašnja površina uzoraka, b) unutrašnjost uzoraka

- (statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ) kod: \* uzoraka iz bioreaktora sa dinamičkom kompresijom u odnosu na uzorke iz ostala dva sistema) 84
- Slika 4.41** Elementarna analiza (sadržaj C, O, Ca, P) EDS mapiranjem hidrogelova sa unutrašnjim porama, serija A nakon 14 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti u protočnom bioreaktoru (levi panel, P), bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom (središnji panel, D) i statičkoj kontrolnoj studiji (desni panel, S) 85
- Slika 4.42** Elementarna analiza (sadržaj C, O, Ca, P i Si) EDS mapiranje hidrogelova sa unutrašnjim porama, serija B nakon 14 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti u protočnom bioreaktoru, (levi panel, P), bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom (središnji panel, D) i statičkoj kontrolnoj studiji (desni panel, S) 86
- Slika 4.43** Reprezentativne tačke na poprečnim presecima uzoraka u kojima je snimljen Raman spektar 87
- Slika 4.44** Ramanski spektri snimljeni u reprezentativnim tačkama hidrogelova sa unutrašnjim porama nakon 14 dana u SBF u: a) protočnom bioreaktoru, b) bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom, c) statičkoj kontrolnoj studiji 88
- Slika 4.45** Grafici zavisnosti napona od primenjene deformacije za hidrogelove sa unutrašnjim porama tokom 14 dana u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom pri brzini kompresije  $337,5 \mu\text{m/s}$  i frekvenciji od  $0,68 \text{ Hz}$  uz protok simulirane telesne tečnosti od  $1,1 \text{ ml/min}$ : a) inicijalni; b) 7. dan; c) 14. dan 89
- Slika 4.46** SEM mikrografije poprečnih preseka makroporoznih hidrogelova, serija C iz protočnog bioreaktora nakon 14 dana u prisustvu simulirane telesne tečnosti; a) razmernik =  $20 \mu\text{m}$ , b) razmernik =  $5 \mu\text{m}$ , c) i d) razmernik =  $2 \mu\text{m}$ ; (žute strelice označavaju formiranje mineralne faze u početnoj fazi, bele strelice označavaju mineralnu fazu u obliku cvetova karfiola, beli krug označava mesto gde se uočava degradacija polimera) 91
- Slika 4.47** SEM mikrografije poprečnih preseka makroporoznih hidrogelova iz bioreaktora sa dinamičkom kompresijom nakon 14 dana; a) razmernik =  $20 \mu\text{m}$ , b) i c) razmernik =  $2 \mu\text{m}$ ; (žute strelice označavaju formiranje mineralne faze u početnoj fazi, bele strelice označavaju mineralnu fazu u obliku cvetova karfiola) 92
- Slika 4.48** SEM mikrografije poprečnih preseka makroporoznih hidrogelova iz statičke studije nakon 14 dana u prisustvu SBF; a) razmernik =  $20 \mu\text{m}$ , b) i c) razmernik =  $2 \mu\text{m}$ ; (žute strelice označavaju formiranje mineralne faze u početnoj fazi, bele strelice označavaju kristale mineralne faze u obliku cvetova karfiola) 93
- Slika 4.49** EDS elementarna analiza nakon 14 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti: inicijalnih uzoraka (i), iz protočnog bioreaktora (p), bioreaktora sa dinamičkom kompresijom (d) i statičke kontrole studije (s); a) spoljašnja površina uzoraka, b) unutrašnjost uzoraka (statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ,  $n=5$ ) za: ) \* - svi sistemi u poređenju sa inicijalnim uzorcima; A - p u poređenju sa d; B - p u poređenju sa s, C - d u poređenju sa s) 94
- Slika 4.50** FTIR spektri inicijalnih i uzoraka nakon 14 dana u prisustvu SBF: a) protočni bioreaktor, b) bioreaktor sa dinamičkom kompresijom i c) statička kontrolna studija, d) inicijalni uzorci 95
- Slika 4.51** FTIR spektri referentnih prahova: a) gelanske gume i b) bioaktivnog stakla 96
- Slika 4.52** XRD difraktogrami: a) inicijalnih uzoraka, c) uzoraka nakon 14 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti u statičkoj kontrolnoj studiji, d) uzoraka nakon 14 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti u protočnom bioreaktoru, e) uzoraka nakon 14 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti u bioreaktoru sa dinamičkom kompre 97
- Slika 4.53** Usrednjeni XRD difraktogrami: a) referentnog praha bioaktivnog stakla, b) inicijalnih uzoraka, c) uzoraka nakon 14 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti u statičkoj kontrolnoj studiji, d) 98



uzoraka nakon 14 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti u protočnom bioreaktoru, e) uzoraka nakon 14 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti u bioreaktoru sa dinamičkom kompre 98

**Slika 4.54** Grafici zavisnosti napona od primenjene deformacije određene u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom pri brzini kompresije 337,5  $\mu\text{m/s}$ , za inicijalne uzorke (a) i uzorke nakon 14 dana u SBF: u protočnom bioreaktoru (b), bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom (c), statičkoj studiji (d) 99

**Slika 4.55** Poprečni presek dvofaznog implantata dobijenog prelivanjem rastvora gelanske gume preko suvog makroporoznog uzorka na bazi gelanske gume i bioaktivnog stakla; a) ceo poprečni presek, razmernik 1 mm, b) zona kontakta slojeva, razmernik 0,5 mm 100

**Slika 4.56** Dvofazni implantati sa adekvatnom integracijom slojeva, dobijeni nakon optimizacije temperatura slojeva primenom matematičkog modela: a) sa neporoznim osteo-slojem u radijalnom pravcu i kalotom u hondralnom delu (serija E), b) sa poroznim osteo-slojem u radijalnom pravcu i ravnim hondralnim delom (serija F); (žuta strelica označava dobijeni hondralni deo u obliku kalote, bela strelica označava ravni hondralni deo, crvena strelica označava neporozni osteo-deo, naranžasta strelica označava porozni osteo-deo) 101

**Slika 4.57** Kriva raspodele vremena zadržavanja za pojedinačne izlaze za dve serije merenja bez dinamičke kompresije; Fd – krive raspodele vremena zadržavanja na donjem izlazu, Fg – krive raspodele vremena zadržavanja na gornjem izlazu 103

**Slika 4.58** Ukupne izlazne krive raspodele vremena zadržavanja za obe serije merenja bez dinamičke kompresije 104

**Slika 4.59** Kriva raspodele vremena zadržavanja za pojedinačne izlaze za dve serije merenja pri dinamičkoj kompresiji; Fd – krive raspodele vremena zadržavanja na donjem izlazu, Fg – krive raspodele vremena zadržavanja na gornjem izlazu. 105

**Slika 4.60** Ukupne izlazne krive raspodele vremena zadržavanja za dve serije merenja u dinamičkim uslovima 106

**Slika 4.61** SEM mikrografije prelazne zone na poprečnom preseke dvofaznog uzorka dobijenih prelivanjem rastvora gelanske gume preko suvih makroporoznih hidrogelova gelanske gume sa bioaktivnim staklom na optimalnoj temperaturi, kod kojih je dobijen potpuno porozan osteo deo implantata, serija F; a) razmernik = 300  $\mu\text{m}$ , b) razmernik = 200  $\mu\text{m}$  i c) razmernik = 50  $\mu\text{m}$  107

**Slika 4.62** SEM mikrografije osteo-dela dvofaznih implantata dobijenih prelivanjem rastvora gelanske gume preko suvih makroporoznih hidrogelova gelanske gume sa bioaktivnim staklom na optimalnoj temperaturi, kod kojih je postojao neporozni sloj hidrogela oko osteo dela, serija E nakon 8 dana u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom; a) unutrašnjost uzorka, razmernik = 10  $\mu\text{m}$ , b) donji deo uzorka, razmernik = 5  $\mu\text{m}$ , c) donji deo uzorka, razmernik = 2  $\mu\text{m}$ , d) spoljašnja površina neporoznog dela uzorka, razmernik = 1  $\mu\text{m}$  (bele strelice označavaju globularne strukture bioaktivnog stakla, žute strelice označavaju mineralnu fazu formiranu u obliku cvetova karfiola, crvene strelice označavaju formiranje mineralne faze u početnoj fazi, beli krug označava zonu unutar uzorka gde je došlo do formiranja igličastih struktura mineralne faze i delimične degradacije polimera) 108

**Slika 4.63** SEM mikrografije osteo-dela dvofaznih implantata dobijenih prelivanjem rastvora gelanske gume preko suvih makroporoznih hidrogelova gelanske gume sa bioaktivnim staklom na optimalnoj temperaturi, kod kojih je osteo deo implantata bio potpuno porozan, serija F, nakon 14 dana: a, b) u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom u periodu od 7. do 14. dana i konstantnim protokom simulirane telesne tečnosti (a) razmernik = 5  $\mu\text{m}$ , b) razmernik = 500 nm); c,d) u statičkim uslovima: (c) razmernik = 5  $\mu\text{m}$ , d) razmernik = 500 nm) 110

- Slika 4.64** Grafici zavisnosti napona od primenjene deformacije određene u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom pri brzini kompresije 337,5  $\mu\text{m/s}$  za dvofazne uzorke dobijene prelivanjem rastvora gelanske gume preko suvih makroporoznih hidrogelova gelanske gume sa bioaktivnim staklom na optimalnoj temperaturi, kod kojih je postojao neporozni sloj hidrogela oko osteo dela, serija E, na početku i nakon 8 dana u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom 111
- Slika 4.65** Grafici zavisnosti napona od primenjene deformacije određene u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom pri brzini kompresije 337,5  $\mu\text{m/s}$  za dvofazne uzorke dobijene prelivanjem rastvora gelanske gume preko suvih makroporoznih hidrogelova gelanske gume sa bioaktivnim staklom na optimalnoj temperaturi, kod kojih je osteo deo implantata bio potpuno porozan, serija F,: a) na početku ciklusa kompresije, 7. dana eksperimenta, b) nakon 14 dana u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom 112
- Slika 4.66** Zavisnosti pritiska u hidrauličkoj komori (Ph) i test bioreaktorskoj komori (Pk) od vremena tokom jednog od merenja u prototipu 1 113
- Slika 4.67** Zavisnost pritiska u test bioreaktorskoj komori (Pk) od pritiska u hidrauličkoj komori (Ph) za jedno od reprezentativnih merenja u prototipu 1 (elipsa predstavlja oblast u kojoj je izražena nelinearnost) 113
- Slika 4.68** Zavisnosti pritiska u hidrauličkoj komori (Ph) i test komori (Pk) od vremena u prototipu 1 fazi sa optimizovanim punjenjem komore 114
- Slika 4.69** Zavisnost pritiska u test komori (Pk) od pritiska u hidrauličkoj (Ph) komori za jedno od reprezentativnih merenja u prototipu 1 fazi 114
- Slika 4.70** Normalizovane vrednosti normiranih pritisaka u prototipu 1 u: a) hidrostatičkoj i b) test komori za 5 proizvoljnih merenja, prikazane u toku spontane relaksaciju sistema 115
- Slika 4.71** Zavisnost pritisaka u hidrauličkoj i test komori za merenja u prototipu 2, pri prvom načinu punjenja; a) zavisnost pritiska od vremena, b) međusobna zavisnost pritisaka u komorama 116
- Slika 4.72** Zavisnost pritisaka u hidrauličkoj i test komori za merenje u prototipu 2 pri drugom načinu punjenja; a) zavisnost pritiska od vremena, b) međusobna zavisnost pritisaka u komorama 117
- Slika 4.73** Izdvojeni slučajni uzorak od 60 tačaka zabeležen sa senzora pritiska u hidrauličkoj komori tokom eksperimenta od 24 h pri adekvatnom punjenju u prototipu 2 118

## 8.2 SPISAK TABELA

Tabela 4.1 FTIR spektroskopska analiza oba tipa alginata, odgovarajućih alginatnih hidrogelova, dobijenih koloidnih rastvora i njihovih hidrogel formi .....	55
Tabela 4.2 Sumaran prikaz serija uzoraka i načina njihove pripreme .....	73
Tabela 4.3 EDS analiza odnos Ca/P određena u proizvoljnim tačkama na površini i unutar hidrogelova sa unutrašnjim porama, serija A, ispitivanih tokom 14 dana u prisustvu simulirane telesne tečnosti u protočnom bioreaktoru (p), bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom (d) i iz statičke kontrolne studije (s).....	84
Tabela 4.4 Odnos Ca/P određen mapiranjem hidrogelova sa unutrašnjim porama, serija A i B, ispitivanih tokom 14 dana u prisustvu simulirane telesne tečnosti u protočnom bioreaktoru (p), bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom (d) i iz statičke kontrolne studije (s) .....	87
Tabela 4.5 Sumirane vrednosti dinamičkog modula elastičnosti tokom 14 dana ispitivanja u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom .....	90
Tabela 4.6 Koncentracija kalcijuma, fosfora i silicijuma unutar inicijalnih uzoraka (i) i uzoraka nakon 14 dana u simuliranoj telesnoj tečnosti u protočnom bioreaktoru (p), bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom (d) i statičkoj kontrolnoj studiji (s).....	94
Tabela 4.7 Sumirane vrednosti dinamičkog modula elastičnosti određene u bioreaktoru sa dinamičkom kompresijom za inicijalne i uzorke iz protočnog bioreaktora (p), bioreaktora sa dinamičkom kompresijom (d) i iz statičke studije (s) nakon 14 dana u prisustvu simulirane telesne tečnosti.....	99
Tabela 4.8 Sumaran prikaz serija uzoraka i načina njihove pripreme .....	102

## BIOGRAFIJA

Jovana S. Zvicer rođena je 09.02.1986. u Beogradu, Republika Srbija, gde je završila osnovnu školu i X beogradsku gimnaziju. Osnovne akademske i master studije pohađala je na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu, u periodu od 2005. do 2011. g. sa prosečnom ocenom tokom studiranja 8,62, odnosno 9,75 na master studijama. Doktorske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu upisala je 2011. g. na studijskom programu Hemijsko inženjerstvo pod mentorstvom prof. dr Bojane Obradović. Ispite predviđene planom i programom, kao i završni ispit pod nazivom „Primena bioreaktorskih sistema u inženjerstvu tkiva i karakterizaciji biomaterijala“ na doktorskim studijama položila je sa prosečnom ocenom 9,58. Od juna 2012. g. zaposlena je na Tehnološko-metalurškom fakultetu, Univerziteta u Beogradu u istraživačkom zvanju na projektima Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije. Bila je uključena u realizaciju nekoliko međunarodnih i nacionalnih projekata, kao i u dve COST akcije.

Tokom studija pohađala je više akreditovanih letnjih škola i kurseva, kao i više treninga usmerenih na razvoj poslovnih veština, zaštitu intelektualne svojine i tranfer tehnologije. Nagrađena je od strane Udruženja za istraživanje materijala Srbije i Instituta tehničkih nauka Srbije SANU za najbolju usmenu prezentaciju na Konferenciji mladih istraživača 2013.g., kao i od strane IEEE kompjuterskog društva za najbolji studentski rad na Konferenciji BIBE 2015.g. Bila je deo Bio Teh tima koji je osvojio 3. mesto na Takmičenju za najbolju tehnološku inovaciju u Srbiji 2018. g. Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.

Govori engleski jezik.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јована С. Звицер

Број индекса 4035/2011

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Примена биомимичних биореактора у дизајнирању и карактеризацији нових биоматеријала за инжењерство ткива“

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

У Београду, 15. јун 2020.

Потпис аутора

---

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јована С. Звицер

Број индекса 4035/2011

Студијски програм Хемијско инжењерство

Наслов рада Примена биомимичних биореактора у дизајнирању и карактеризацији нових биоматеријала за инжењерство ткива

---

Ментор проф. др Бојана Обрадовић

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

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

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

У Београду, 15. јун 2020.

Потпис аутора

---

## Изјава о коришћењу

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

„Примена биомимичних биореактора у дизајнирању и карактеризацији нових биоматеријала за инжењерство ткива“

која је моје ауторско дело.

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

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

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 15. јун 2020.

Потпис аутора

---



1. **Ауторство.** Дозвољава 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.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољава 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.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољава 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.** Дозвољава 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.

## ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „**Примена биомимичних биореактора у дизајнирању и карактеризацији нових биоматеријала за инжењерство ткива**”, аутора **Јоване С. Звицер**, констатујем да утврђено подударање текста износи 5%. Овај степен подударности последица је цитата, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

У Београду, 15. јун 2020.

Потпис ментора

---