

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Katarina R. Nešović

**HIDROGELOVI POLIVINIL-ALKOHOLA I
HITZANA SA ELEKTROHEMIJSKI SINTETISANIM
NANOČESTICAMA SREBRA ZA MEDICINSKE
PRIMENE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2021.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ

Катарина Р. Нешовић

**ХИДРОГЕЛОВИ ПОЛИВИНИЛ-АЛКОХОЛА И
ХИТОЗАНА СА ЕЛЕКТРОХЕМИЈСКИ
СИНТЕТИСАНИМ НАНОЧЕСТИЦАМА СРЕБРА ЗА
МЕДИЦИНСКЕ ПРИМЕНЕ**

Докторска дисертација

Београд, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Katarina R. Nešović

**POLY(VINYL ALCOHOL) AND CHITOSAN
HYDROGELS WITH ELECTROCHEMICALLY
SYNTHESIZED SILVER NANOPARTICLES FOR
MEDICAL APPLICATIONS**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2021.

MENTOR:

Dr Vesna Mišković-Stanković, redovni profesor

Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Jelena Bajat, redovni profesor

Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Maja Vukašinović-Sekulić, vanredni profesor

Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Aleksandra Perić-Grujić, redovni profesor

Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Vesna Kojić, viši naučni saradnik

Univerziteta u Novom Sadu, Institut za onkologiju Vojvodine

DATUM ODBRANE: _____

Ova doktorska disertacija je izrađena najvećim delom na Katedri za Fizičku hemiju i elektrohemiju Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom prof. dr Vesne Mišković-Stanković, kojoj se ovom prilikom iskreno zahvaljujem na ukazanom poverenju i strpljenju, kao i na nesebično podeljenim savetima, znanju i iskustvu, kojima je omogućila uspešnu izradu ovog doktorata.

Iskreno se zahvaljujem članovima komisije, prof. dr Jeleni Bajat, prof. dr Maji Vukašinić-Sekulić, prof. dr Aleksandri Perić-Grujić i dr Vesni Kojić, na velikoj pomoći u eksperimentalnom radu i korisnim komentarima tokom pisanja disertacije, kao i na podeljenim savetima, znanju i posvećenosti tokom čitavog perioda izrade doktorata.

Veliku zahvalnost dugujem dr Tamari Radetić, za ispitivanja nanočestica srebra transmisionom elektronskom mikroskopijom, i dr Ljiljani Živković, za ispitivanja metodom dinamičkog rasipanja svetlosti; ali prvenstveno za veliko znanje i entuzijazam koje su bezrezervno podelile sa mnom. Takođe se zahvaljujem dr Ani Janković, dr Jasmini Stojkovskoj i dr Jovani Zvicer, na pomoći prilikom eksperimentalnih merenja. Zahvaljujem se i istraživačima iz Laboratorije za atomsku fiziku Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, koji su velikodušno omogućili pristup svom transmisionom elektronskom mikroskopu na kome je i izvršena TEM analiza u okviru ove disertacije. Kolegicama dr Ani Janković, dr Mariji Došić i Mileni Stevanović se zahvaljujem na saradnji, pomoći i podršci tokom godina zajedničkog rada.

Katarina Nešović

HIDROGELOVI POLIVINIL-ALKOHOLA I HITOZANA SA ELEKTROHEMIJSKI SINTETISANIM NANOČESTICAMA SREBRA ZA MEDICINSKE PRIMENE

SAŽETAK

Cilj ove doktorske disertacije bila je sinteza novih biomaterijala, hidrogelova polivinil-alkohola i hitozana, sa i bez grafena, sa elektrohemijски inkorporisanim nanočesticama srebra i njihova detaljna karakterizacija u cilju ispitivanja mogućnosti primene u obliku antibakterijskih obloga za rane. Hidrogelovi srebro/polivinil-alkohol/hitozan i srebro/polivinil-alkohol/hitozan/grafen su dobijeni metodom zamrzavanja i odmrzavanja, praćenom elektrohemijskom *in situ* sintezom nanočestica srebra unutar polimernih matrica hidrogelova, nakon bubrenja u rastvoru Ag^+ jona.

Detaljna karakterizacija dobijenih hidrogelova je izvršena u cilju ispitivanja njihove strukture, morfologije, hemijskog sastava, mehaničkih i termičkih svojstava, kao i oblika, dimenzija i strukture sintetisanih nanočestica srebra. Ispitan je uticaj sadržaja hitozana na efikasnost elektrohemijske sinteze nanočestica, kao i na strukturu i svojstva samih hidrogelova. Karakterizacija u *in vitro* uslovima je obuhvatala ispitivanje sposobnosti bubrenja svih dobijenih hidrogelova i kinetike otpuštanja srebra u fiziološki relevantnim uslovima (pH 7,4, 37 °C), kao i određivanje antibakterijskih svojstava i biokompatibilnosti dobijenih materijala.

Rezultati ove disertacije su pokazali da dobijeni nanokompozitni hidrogelovi imaju visok potencijal za primenu kao aktivne obloge za rane sa jakim antibakterijskim efektom, koji se postiže kontrolisanim otpuštanjem elektrohemijски sintetisanih nanočestica srebra. Dobijeni rezultati su takođe pokazali povoljan efekat hitozana, kako na samu elektrohemijску sintezu nanočestica srebra, tako i na fizičko-hemijaska i antibakterijska svojstva dobijenih hidrogelova, tako da se ovi materijali mogu smatrati pogodnim kandidatima za dalja ispitivanja u oblasti biomedicinskih materijala.

Ključne reči: hidrogelovi; obloge za rane; hitozan; nanočestice srebra; polivinil-alkohol; elektrohemijaska sinteza; otpuštanje srebra; antibakterijska svojstva; biokompatibilnost

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Hemijsko inženjerstvo

UDK broj:

POLY(VINYL ALCOHOL) AND CHITOSAN HYDROGELS WITH ELECTROCHEMICALLY SYNTHESIZED SILVER NANOPARTICLES FOR MEDICAL APPLICATIONS

ABSTRACT

The aim of this doctoral dissertation was the synthesis of new biomaterials, poly(vinyl alcohol) and chitosan hydrogels, with and without graphene, with electrochemically incorporated silver nanoparticles, and their detailed characterization in terms of potential applications as antibacterial wound dressing materials. Silver/poly(vinyl alcohol)/chitosan and silver/poly(vinyl alcohol)/chitosan/graphene hydrogels were obtained *via* the freezing-thawing method, followed by *in situ* electrochemical synthesis of silver nanoparticles inside hydrogel matrices, previously swollen in Ag⁺ ion solutions.

Extensive characterization of the obtained hydrogels was carried out in order to examine their structure, morphology, chemical composition, mechanical and thermal properties, as well as the shape, size and structure of the synthesized silver nanoparticles. The effect of chitosan content on the electrochemical synthesis yield and on the structure and properties of the synthesized hydrogels was also investigated. *In vitro* characterizations included the investigation of the hydrogels' swelling properties and silver release kinetics in physiologically-relevant environment (pH 7.4, 37 °C), as well as the determination of antibacterial properties and biocompatibility.

The results of this dissertation demonstrated that the synthesized nanocomposite hydrogels exhibited compelling potential for applications as active wound dressings with potent antibacterial effect, achieved through controlled release of the electrochemically embedded silver nanoparticles. The significant beneficial chitosan influence on both the electrochemical synthesis of silver nanoparticles, and the physicochemical and antibacterial properties of the hydrogels was proven. Therefore, these materials could be considered as apt candidates for further research in biomedical materials field.

Keywords: hydrogels; wound dressings; chitosan; silver nanoparticles; poly(vinyl alcohol); electrochemical synthesis; silver release; antibacterial properties; biocompatibility

Scientific field: Technology engineering

Scientific subfield: Chemical engineering

UDC number:

SADRŽAJ

1	<u>UVOD</u>	<u>1</u>
2	<u>TEORIJSKI DEO</u>	<u>4</u>
2.1	HIDROGELOVI – STRUKTURA I SVOJSTVA	4
2.2	HIDROGELOVI ZA PRIMENE U MEDICINI KAO OBLOGE ZA RANE	5
2.2.1	POLIMERNE KOMPONENTE	7
2.2.2	GRAFEN	9
2.2.3	NANOČESTICE SREBRA	10
2.2.3.1	<i>Optička svojstva nanočestica srebra</i>	10
2.2.3.2	<i>Biološka svojstva nanočestica srebra – antibakterijska aktivnost i citotoksičnost</i>	14
2.3	HIDROGELOVI HITOZANA, POLIVINIL-ALKOHOLA I NANOČESTICA SREBRA ZA BIOMEDICINSKE PRIMENE	17
2.4	FIZIČKO-HEMIJSKE I BIOLOŠKE METODE KARAKTERIZACIJE HIDROGELOVA	25
3	<u>CILJ ISTRAŽIVANJA</u>	<u>29</u>
4	<u>EKSPERIMENTALNI DEO</u>	<u>30</u>
4.1	MATERIJAL	30
4.2	PRIPREMA KOLOIDNIH DISPERZIJA POLIVINIL-ALKOHOL/ HITOZAN I POLIVINIL-ALKOHOL/HITOZAN/GRAFEN	30
4.3	DOBIJANJE HIDROGELOVA POLIVINIL-ALKOHOL/HITOZAN I POLIVINIL-ALKOHOL/HITOZAN/GRAFEN	30
4.4	ELEKTROHEMIJSKA SINTEZA NANOČESTICA SREBRA U HIDROGELOVIMA POLIVINIL-ALKOHOL/HITOZAN I POLIVINIL-ALKOHOL/HITOZAN/GRAFEN	31
4.5	FIZIČKO-HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA HIDROGELOVA	32
4.5.1	ODREĐIVANJE UDELA GEL-FRAKCIJE U HIDROGELU	32
4.5.2	UV-VIDLJIVA SPEKTROSKOPIJA	33
4.5.3	SKENIRAJUĆA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (FE-SEM) I ENERGETSKA DISPERZIONA SPEKTROSKOPIJA (EDS)	33
4.5.4	DINAMIČKO RASIPANJE SVETLOSTI (DLS)	33
4.5.5	TRANSMISIONA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (TEM)	33
4.5.6	RENDGENSKA FOTOELEKTRONSKA SPEKTROSKOPIJA (XPS)	34
4.5.7	INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA SA FURIJEOVOM TRANSFORMACIJOM (FTIR)	34
4.5.8	RAMANOVA SPEKTROSKOPIJA	34
4.5.9	CIKLIČNA VOLTAMetriJA	34
4.5.10	TERMOGRAVIMETRIJSKA ANALIZA (TGA) I DIFERENCIJALNA SKENIRAJUĆA KALORIMetriJA (DSC)	34

4.5.11	ISPITIVANJE MEHANIČKIH SVOJSTAVA.....	35
4.6	ISPITIVANJE BUBRENJA I OTPUŠTANJA SREBRA.....	35
4.6.1	KINETIKA BUBRENJA	35
4.6.2	KINETIKA OTPUŠTANJA SREBRA	36
4.7	BIOLOŠKA KARAKTERIZACIJA HIDROGELOVA.....	36
4.7.1	ANTIBAKTERIJSKA SVOJSTVA	36
4.7.1.1	<i>Agar-difuzioni test.....</i>	36
4.7.1.2	<i>Kinetika antibakterijske aktivnosti.....</i>	37
4.7.2	CITOTOKSIČNOST	37
4.7.2.1	<i>Čelijske linije.....</i>	37
4.7.2.2	<i>Test odbacivanja boje tripan-plavo (DET).....</i>	37
4.7.2.3	<i>MTT test.....</i>	38
4.7.2.4	<i>Statistička analiza.....</i>	38
5	REZULTATI I DISKUSIJA.....	39
5.1	SINTEZA HIDROGELOVA SREBRO/POLIVINIL-ALKOHOL/ HITIZAN I SREBRO/POLIVINIL-ALKOHOL/HITIZAN/GRAFEN	39
5.1.1	MEHANIZAM FORMIRANJA HIDROGELOVA.....	39
5.1.2	ELEKTROHEMIJSKA SINTEZA NANOČESTICA SREBRA U HIDROGELOVIMA	40
5.2	FIZIČKO-HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA HIDROGELOVA	43
5.2.1	UV-VIDLJIVA SPEKTROSKOPIJA	43
5.2.2	SKENIRAJUĆA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (FE-SEM) I ENERGETSKA DISPERZIONA SPEKTROSKOPIJA (EDS) 46	
5.2.3	DINAMIČKO RASIPANJE SVETLOSTI (DLS).....	49
5.2.4	TRANSMISIONA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (TEM).....	51
5.2.5	RENDGENSKA FOTOELEKTRONSKA SPEKTROSKOPIJA (XPS)	54
5.2.6	INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA SA FURIJEOVOM TRANSFORMACIJOM (FTIR)	61
5.2.7	RAMANOVA SPEKTROSKOPIJA	65
5.2.8	CIKLIČNA VOLTAMetriJA.....	68
5.2.9	TERMOGRAVIMETRIJSKA ANALIZA (TGA) I DIFERENCIJALNA SKENIRAJUĆA KALORIMetriJA (DSC)..	70
5.2.10	ISPITIVANJE MEHANIČKIH SVOJSTAVA.....	76
5.3	ISPITIVANJE BUBRENJA I OTPUŠTANJA SREBRA.....	78
5.3.1	KINETIKA BUBRENJA	78
5.3.2	KINETIKA OTPUŠTANJA SREBRA	86
5.4	BIOLOŠKA KARAKTERIZACIJA NANOKOMPOZITNIH HIDROGELOVA.....	100
5.4.1	ANTIBAKTERIJSKA SVOJSTVA	100
5.4.1.1	<i>Agar-difuzioni test.....</i>	100
5.4.1.2	<i>Kinetika antibakterijske aktivnosti.....</i>	102
5.4.2	CITOTOKSIČNOST	105

5.4.2.1	<i>Test odbacivanja boje tripan-plavo (DET)</i>	105
5.4.2.2	<i>MTT test</i>	106
6	<u>ZAKLJUČAK</u>	108
7	<u>LITERATURA</u>	111
	<u>BIOGRAFIJA KANDIDATA</u>	132
	<u>ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ</u>	133
	<u>ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКОГ РАДА</u>	134
	<u>ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ</u>	135
	<u>ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ</u>	137

1 UVOD

Poslednjih godina primetna je težnja nauke i inženjerstva biomaterijala ka unapređenju materijala za obloge za rane, a jedan od najčešćih i najperspektivnijih pravaca u ovoj oblasti istraživanja je sinteza kompozitnih materijala sa polimernom matricom, koji pružaju neizmeran potencijal razvoja i prilagođavanja specifičnim zahtevima prilikom lečenja rana, kao i mogućnost dobijanja materijala sa aktivnim antibakterijskim svojstvima. Potreba za poboljšanjem svojstava i funkcije obloga za rane je sveprisutna u medicini, a posebno bi trebalo istaći važnost trajnosti obloga za rane i njihove sposobnosti da zadrže sterilnost i antibakterijska svojstva tokom dužeg perioda, čime bi se umanjila neophodnost čestih zamena obloge i ponovnih previjanja i ublažila opasnost od novih povreda novonastalog tkiva rane [1].

Tradicionalni i najčešće korišćeni materijali za obloge za rane – pamučne gaze, zavoji, flasteri i dr. – predstavljaju samo fizičku barijeru za zaštitu rane od okoline, te zbog toga imaju čitav niz nedostataka [2]. Na primer, iako se pre korišćenja mogu sterilisati, ovi materijali predstavljaju tokom primene pogodnu sredinu za razmnožavanje patogenih vrsta bakterija i razvoj infekcije, pa samim tim predstavljaju nezanemarljiv rizik po zdravlje pacijenta, posebno u slučaju lečenja hroničnih rana. Osim toga, većina ovih obloga je izrađena od pamučnih materijala, koji imaju lošu sposobnost regulacije toplote i vlažnosti, lako isušuju ranu i mogu se lepiti za novonastalo tkivo, što vrlo često dovodi do ozlede tokom previjanja i usporava sam proces zarastanja rane. Činjenica da su pamučne obloge za rane podložne razvoju bakterijskih infekcija, s druge strane, diktira potrebu za čestim previjanjem, što dodatno pojačava pomenuti rizik oštećenja novog tkiva rane. Inficirane rane je često neophodno uporno lečiti antibioticima, ponekad čak i sistemski, što je vrlo nepovoljno usled sve rasprostranjenije pojave antibiotske rezistencije kod velikog broja patogenih bakterijskih sojeva [3].

U cilju otklanjanja navedenih nedostataka, smanjenja rizika i poboljšanja kvaliteta lečenja rana i komfora pacijenata, sve su brojnija istraživanja posvećena novim materijalima naprednih svojstava, najčešće na bazi različitih polimera, prirodnih ili sintetskih. Među brojnim polimernim materijalima koji se mogu primenjivati u svojstvu obloga za rane, posebno se ističu hidrogelovi – umrežene matrice polimera koje imaju sposobnost da bubre u vodi i vodenim rastvorima, čak i do nekoliko stotina puta od svoje početne mase. Ova visoka moć apsorpcije čini hidrogelove pogodnim oblogama za rane, jer omogućuje održavanje vlažnosti lokalne sredine, čime se sprečava lepljenje obloge za ranu [1]. Osim sposobnosti bubrenja, materijali na bazi hidrogelova imaju i druga brojna povoljna svojstva, kao što su izuzetna permeabilnost za gasove (O_2 , CO_2) i vodenu paru, niska adhezivnost, sposobnost regulacije vlažnosti i termoregulacije, kao i odlična biokompatibilnost [4].

Svojstva i struktura hidrogelova se mogu do najsitnijih detalja prilagođavati specifičnim primenama i kontrolisati prema potrebama željenog materijala, jer se oni mogu dobiti od velikog broja različitih polimera, bilo prirodnih ili sintetskih, kao i kombinacijom dve ili više vrsta polimera u obliku blendi, kopolimera, interpenetrirajućih mreža, itd. Konkretno u oblasti materijala za obloge za rane, neki primeri polimera koji se najčešće sreću kao predmet istraživanja su polivinil-alkohol [5–7], polivinil-pirolidon [8–10], alginat [11,12], celuloza i njeni derivati [13], hitin i hitozan [14,15], a takođe su veoma zastupljene i blende nekih od pomenutih polimera [16,17], kao i njihovi hemijski modifikovani derivati [18,19].

Polivinil-alkohol (PVA) je sintetski polimer koji se dugo koristi za primene u medicini, zbog njegovih brojnih pogodnih svojstava, kao što su pre svega biokompatibilnost, zatim elastičnost, visoka moć apsorpcije i jednostavno formiranje dobro umreženih hidrogelova. Često se ovaj polimer koristi i u kombinaciji sa drugim, prirodnim, polimerima, među kojima su hitozan i derivati hitozana [16,20], alginat [21], skrob [22] ili želatin [23]. Hitozan (CHI) je linearni

polisaharid prirodnog porekla, jedini među ovom klasom polisaharida koji poseduje svojstva polikatjona usled protonovanja $-NH_2$ grupa na lancu CHI do $-NH_3^+$, u kiselim sredinama čiji je $pH < 6,3$, što predstavlja pK hitozana [24]. Ovo svojstvo hitozana omogućava različite primene, na primer u obliku pH -zavisnih nosača za lekove [24]. Hitozan takođe ispoljava i antibakterijsku aktivnost [25–27], što je veoma pogodno svojstvo CHI kao komponente hidrogelnih obloga za rane. Takođe, ovaj polimer se često koristi i kao nosač lekova, a posebno je interesantan kao stabilizator za nanočestice srebra, jer istovremeno poseduje i sposobnost redukcije Ag^+ jona do Ag , što omogućuje jedinstvenu primenu kao istovremeno stabilizaciono sredstvo i agens za sintezu nanočestica [28–32]. Grafen (Gr) je u poslednje dve decenije izazvao veliko interesovanje među istraživačima najrazličitijih profila, zbog svojih brojnih interesantnih svojstava, a između ostalog se aktivno ispituje u cilju primene u mnogim oblastima nauke o materijalima. U oblasti biomaterijala, pre svega u istraživanjima bio- i nanokompozitnih materijala, grafen i grafen-oksid su često korišćeni kao dodaci ili punioci za ojačanje polimerne matrice i poboljšanje njenih mehaničkih svojstava, električne i toplotne provodljivosti [33–35]. U slučaju nanokompozitnih materijala na bazi PVA, pokazalo se da dodatak čak i veoma malih količina grafena dovodi do poboljšanja termičke stabilnosti [36] kao i mehaničke čvrstoće [35,37–39].

Hidrogelne matrice se takođe pokazuju kao idealni nosači za dostavljanje terapijski aktivnih supstanci, antibakterijskih agenasa, lekova, i sl., zbog njihove sposobnosti prilagođavanja strukture i svojstava izborom polimernih komponenata, načina sinteze i formiranja matrice, postupka umrežavanja, itd. [40–46]. Kada su u pitanju aktivni materijali za obloge za rane, veoma je važan izbor aktivne antibakterijske komponente. U slučaju težih infekcija, najčešće se pribegava sistemskoj primeni antibiotika, koja, međutim, predstavlja opasnost od razvijanja rezistencije, posebno u slučaju dugoročnog lečenja. Zbog toga se sve više istraživanja okreće definisanju aktivnih materijala sa nekim od alternativnih antibakterijskih sredstava, koji bi mogli da pruže aktivnu i efikasnu zaštitu rane od infekcije, kao i da potpomognu lečenje već inficiranih rana, a da se pritom mogu bezbedno koristiti i u dužim periodima, što je posebno važno u slučaju pacijenata sa hroničnim ranama. Među brojnim alternativnim antibakterijskim sredstvima, srebro, bilo da je u obliku jona ili nanočestica, ima veoma jaku antibakterijsku aktivnost prema širokom spektru mikroorganizama, uključujući i Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije [47–50]. Zbog svoje veoma snažne i raznolike antimikrobne aktivnosti, nanočestice srebra su postale popularan i čest izbor aktivne komponente u polimernim oblogama za rane [51]. Kao jedan od problema prilikom primene nanočestica srebra, javlja se njihova nestabilnost usled veoma malih dimenzija i velike površinske energije, a ovaj se problem može efikasno prevazići njihovom inkorporacijom u polimernim matricama, kao što su i hidrogelovi. Sam mehanizam antibakterijskog dejstva nanočestica srebra je predmet brojnih istraživanja, iako još uvek nije potpuno objašnjen, jer obuhvata višestruko dejstvo, uključujući oštećenje citoplazmatične membrane, ometanje replikacije DNK putem vezivanja za fosfatne grupe, ometanje respiratornih procesa u bakterijskoj ćeliji, kao i obrazovanje reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *reactive oxygen species*, ROS), što dovodi do oštećenja membranskih proteina [47,49,50].

Brojne su metode sinteze nanočestica srebra, kao i njihove inkorporacije unutar polimernih matrica, čime se pružaju raznovrsne mogućnosti za kontrolisanje dimenzija dobijenih nanočestica, njihovog oblika i strukture. Inkorporacija nanočestica srebra u umreženom hidrogelu se može izvršiti *in* ili *ex situ*, odnosno, direktnom redukcijom Ag^+ jona u hidrogelu ili prethodnom sintezom nanočestica praćenom njihovom inkorporacijom u polimernoj matrici. Sinteza nanočestica srebra se najčešće ostvaruje putem hemijske redukcije (pomoću jakog redukcionog sredstva kao što je $NaBH_4$) [52], vrlo rasprostranjene usled jednostavnosti i pristupačnosti postupka, koji daje visok prinos i omogućuje kontrolu dimenzija i raspodele nanočestica [53]. Međutim, hemijska redukciona sredstva su takođe i toksična i opasna po okolinu, što je posebno nepoželjno prilikom sinteze materijala za biomedicinske primene jer može ugroziti biokompatibilnost dobijenog materijala [4,54]. „Zelenije” metode obuhvataju radijacione tehnike, kao što je sinteza nanočestica srebra γ -zračenjem [8,10,55], koja takođe omogućava visok prinos i

dobru kontrolu svojstava dobijenih nanočestica uz istovremenu sterilizaciju samog materijala [4], ali zahteva specijalna postrojenja sa izvorom visokoenergetskog zračenja, što se može odraziti na cenu, pristupačnost i bezbednost čitavog postupka. Elektrohemijaska redukcija i sinteza nanočestica srebra se takođe može uvrstiti u „zelene” metode, koje zahtevaju minimalan broj hemikalija i obezbeđuju biokompatibilnost materijala uz dobar prinos i visoku čistoću nanočestica, a istovremeno predstavljaju jednostavan i bezbedan proces, koji se može izvoditi kako *ex situ* u koloidnim rastvorima polimera [56–58], tako i direktnom *in situ* sintezom u hidrogelu [59–63]. Upravo iz ovih razloga je u ovom radu elektrohemijaska *in situ* sinteza izabrana kao postupak inkorporacije nanočestica srebra u umreženoj matrici hidrogela.

Cilj ovog rada je sinteza nanokompozitnih hidrogelova polivinil-alkohola i hitozana, sa ili bez grafena, sa elektrohemijaskim putem inkorporisanim nanočesticama srebra, kako bi se formirali antibakterijski aktivni materijali za primene kao obloge za rane poboljšanih svojstava. Posebno će biti ispitan uticaj hitozana na sintezu i inkorporaciju nanočestica srebra u polimernoj matrici, kao i na fizičko-hemijaska i biološka svojstva dobijenih hidrogelova. Osim toga, biće ispitana kinetika bubrenja sintetisanih hidrogelova, kao i kinetika otpuštanja srebra, a takođe i njihova biološka svojstva – antibakterijska aktivnost i citotoksičnost, u cilju potvrđivanja biokompatibilnosti dobijenih materijala i njihovog potencijala za biomedicinske primene.

2 TEORIJSKI DEO

2.1 HIDROGELOVI – STRUKTURA I SVOJSTVA

Hidrogelovi predstavljaju umrežene polimerne materijale svojevrsnih svojstava, koji pokazuju svojstva materije u čvrstom agregatnom stanju, sadržeći istovremeno čak i do 99 % tečnosti, usled čega su pronašli veoma široku primenu u najrazličitijim oblastima nauke o materijalima. Pritom, hidrogelovi su posebno interesantni pre svega u oblasti biomaterijala, usled hidrofilitnosti koja ih čini kompatibilnim sa fiziološkim puferima i telesnim tečnostima, a takođe pruža mogućnost primene polimernih matrica kao nosača različitih vrsta lekova i drugih antibakterijskih i antiinflamatornih supstanci, kao i njihovog kontrolisanog otpuštanja i ciljanog dostavljanja na mesto infekcije, što obezbeđuje izbegavanje sistemskog lečenja putem efikasnije i brže lokalne primene leka [43,45,46,64]. Umrežavanje polimerne matrice i formiranje hidrogela se može ostvariti hemijskim ili fizičkim putem. Opšta karakteristika, zajednička za sve hemijski umrežene hidrogelove, je činjenica da su oni ireverzibilni, odnosno da se njihovo stanje i oblik ne mogu izmeniti, tj. vratiti u stanje sola, a da se polimerne komponente ne mogu razdvojiti bez raskidanja hemijskih veza i bez narušavanja same strukture polimera. S druge strane, gelovi nastali umrežavanjem fizičkim putem pokazuju svojstvo reverzibilnosti, odnosno mogućnosti ostvarenja prelaza sol/gel neograničen broj puta, bez narušenja strukture makromolekula i raskidanja veza. Fizičko umrežavanje se može ostvariti na različite načine, recimo formiranjem prepletaja makromolekulskih lanaca linearnih polimera, ili nastajanjem kristalita, što se dešava u slučaju nekih termoplastičnih polimera.

Zajedničko svojstvo, koje je karakteristično za polimerne gelove, je činjenica da se oni u dodiru sa pogodnim rastvaračem ne rastvaraju, već isključivo bubre u većoj ili manjoj meri. Hidrogelovi bubre u vodi i vodenim rastvorima. Sposobnost bubrenja zavisi od vrste polimera, strukture hidrogela i stepena njegovog umreženja. Samo linearni neumreženi polimeri mogu bubriti „neograničeno”, dok je bubrenje hidrogelova, umreženih u većem ili manjem stepenu, ograničeno dostizanjem tzv. ravnotežnog stepena bubrenja, koji je karakteristika date vrste hidrogela. Sposobnost bubrenja je veoma važna karakteristika hidrogelova, a činjenica da se ona može kontrolisati promenom same strukture hidrogelova je veoma interesantna sa stanovišta različitih primena hidrogelova. Umreženi sintetski polimerni hidrogelovi sa sposobnošću bubrenja i do nekoliko hiljada puta od svoje početne mase, našli su široku primenu kao jonoizmenjivačke membrane, superapsorberi [65–68], itd., dok je za biomedicinske primene svojstvo bubrenja hidrogelova interesantno zbog mogućnosti njihove primene kao nosača vodorastvornih antibiotika i drugih lekova, i obloga za rane, gde sposobnost bubrenja daje mogućnost upijanja eksudata, uklanjanja ostataka nekrotičnog tkiva, termoregulacije i regulacije vlažnosti rane [69].

Kako se hidrogelovi generalno i uopšteno smatraju biokompatibilnim, našli su posebno široku primenu u brojnim oblastima biomedicine i nauke o biomaterijalima. Polimerne matrice hidrogelova najrazličitijih polimera odavno se koriste u regenerativnoj medicini i inženjerstvu tkiva [70], kao skafoldi [71,72], implantati hrskavice [73] i mekih tkiva [74], usled strukturne sličnosti i kompatibilnosti sa vanćelijskim matriksom mnogih tkiva koji sadrži brojne polimerne komponente [75]. Biomaterijali na bazi hidrogelova se takođe koriste i kao nosači lekova, matičnih ćelija, hormona i faktora rasta, enzima i drugih biološki aktivnih materija [43–46,70,76,77], kontaktna sočiva [78], biosenzori [70,78], ali i kao obloge za lečenje hroničnih i akutnih rana i opekotina [1,40,41,64,79–83]. Trodimenzionalne matrice hidrogelova takođe su veoma pogodne za sintezu čitavih novih klasa kompozitnih i nanokompozitnih materijala sa različitim neorganskim komponentama kao što su nanočestice metala [84,85], prirodna glina [86],

i minerali poput hidroksiapatita [87,88]. Sinteza i razvoj (nano)kompozitnih materijala su doživeli vrtoglavi uzmah u 21. veku i otvorili su čitav niz novih mogućnosti primene polimernih hidrogelova. U poslednje vreme, zanačajan zamajac je doživela i primena takozvanih „pametnih” ili „inteligentnih” materijala na bazi hidrogelova [43,89,90], koji imaju sposobnost da reaguju na spoljašnje stimulanse („trigere”), kao što su promena pH vrednosti, temperature, magnetnog ili električnog polja, mehanički udar ili pritisak, i na taj način ostvare kontrolisano otpuštanje lekova [42–44,77,89], ili pak ispolje efekat „samozalečenja” [41,90]. Ovako široka i naizgled neograničena primena samo jedne klase materijala, i to samo u oblasti biomedicine, ne zalazeći u njihove primene u drugim granama nauke o materijalima, ipak nije neočekivana, imajući u vidu da se struktura i svojstva hidrogelova mogu u visokom stepenu kontrolisati kako bi se prilagodile željenoj primeni. Izbor polimernih komponenata i načina umrežavanja pruža istraživačima brojne mogućnosti sinteze novih vrsta biomaterijala putem formiranja blendi, kopolimerizacije, formiranja polielektrolitnih kompleksa, kao i sintetskim strukturnim izmenama samih polimera uvođenjem novih funkcionalnih grupa, čime se mogu dobiti derivati sa izmenjenim svojstvima. Upravo iz tih razloga se u oblasti biomedicinskih materijala već dugo koristi čitav niz sintetskih polimera, koji se smatraju biokompatibilnim, a pružaju nebrojene mogućnosti u pogledu strukturnih izmena radi kontrole željenih svojstava i predstavljaju čitave potklase derivata. Među ovakvim sintetskim polimerima najčešći su polietilen-glikol [91], polivinil-alkohol [92,93], poliuretani [94], poliakrilati i polimetakrilati (na primer, poli(2-hidroksietil metakrilat)) [95]. Takođe, velike mogućnosti pružaju hidrogelovi na bazi polimera dobijenih iz prirodnih izvora, gde se mogu posebno izdvojiti hitozan i celuloza – dva polimera koji su nerastvorni u vodi (ili rastvorni samo pod određenim uslovima, kao što je hitozan u kiselim sredinama), ali se uvođenjem hidrofilnih funkcionalnih grupa mogu modifikovati tako da se dobiju brojni vodorastvorni derivati sa čitavim nizom povoljnih bioloških svojstava [96–101].

Hidrofilna priroda hidrogelova i sposobnost bubrenja omogućuju interakcije i jednostavnu inkapsulaciju hidrofilnih lekova poput antibiotika i nesteroidnih antiinflamatornih lekova. Osim toga, visokoporozna unutrašnja struktura hidrogelne matrice predstavlja idealnu podlogu za proliferaciju ćelija i uzgajanje ćelijskih kultura, kao i za dostavljanje matičnih ćelija i faktora rasta [102,103], za lečenje oštećenja tkiva i kostiju. Predmet velikog interesovanja i brojnih istraživanja su takođe i nanokompoziti hidrogelova sa različitim nanočesticama metala i oksida metala, kao što su srebro, zlato, cink, bakar, itd. [70,84,85], koje se smatraju alternativnim antibakterijskim agensima i sve se češće primenjuju usled težnje ka izbegavanju antibiotskih tipova lekova, a istražuju se, između ostalog, za mogućnosti sprečavanja ili lečenja infekcije rana, kao i sprečavanja infekcije na mestu ugradnje implantata [104–107].

Kako je predmet ovog rada sinteza novih antibakterijskih materijala na bazi blende sintetskog polimera polivinil-alkohola i prirodnog polisaharida hitozana, za primene u funkciji aktivnih obloga za rane, u narednim poglavljima biće predstavljen detaljniji pregled hidrogelova u ovoj oblasti biomaterijala, sa posebnim osvrtom na upravo ova dva polimera, kao i na mogućnosti inkorporacije nanočestica srebra kao antibakterijskog agensa.

2.2 HIDROGELOVI ZA PRIMENE U MEDICINI KAO OBLOGE ZA RANE

Obloge za rane su važna kategorija materijala u inženjerstvu biomaterijala, kao i u medicinskoj i farmaceutskoj industriji, koji bi trebalo da pruže adekvatnu zaštitu rane od okoline tokom zarastanja, ali i da spreče bakterijske infekcije, posebno u bolničkom okruženju, kao i da potpomognu proces zarastanja, uz formiranje minimalne količine ožiljnog tkiva i efikasno uklanjanje ostataka nekrotičnog tkiva [79]. Tradicionalno upotrebljavane i najrasprostranjenije obloge za rane su najčešće različite tkanine, pretežno pamučni materijali, zavoji, gaze i flasteri, koji pružaju prvenstveno fizičku zaštitu rane od okoline i imaju ograničenu moć upijanja eksudata

rane, dok ne poseduju nikakvu sposobnost zaštite od infekcije. Ovi materijali imaju čitav niz nedostataka, i vrlo su nepogodni za dugotrajno lečenje rana, posebno težih i ozbiljnijih slučajeva, jer ne pospešuju zarastanje, mogu dovesti do isušivanja rane i lepljenja, pa time i oštećenja i sekundarne ozlede prilikom previjanja, a takođe su i vrlo podložni infekcijama i predstavljaju pogodnu sredinu za razmnožavanje patogenih vrsta bakterija, usled čega se moraju često menjati [108]. Kako se pamučni materijali lako lepe za ranu, prilikom previjanja postoji opasnost od nove povrede i dodatnog oštećenja rane. Pokazalo se takođe da održavanje optimalne temperature i vlažnosti okoline rane pogoduje bržem lečenju i zarastanju [69]. Zbog toga, u poslednjih nekoliko godina sve više maha uzima trend istraživanja novih materijala poboljšanih svojstava u poređenju sa postojećim komercijalnim oblogama, a posebna pažnja se poklanja razvoju materijala poboljšanih fizičko-mehaničkih svojstava, kao što su polimerni hidrogelovi, koji mogu imati aktivnu ulogu u ubrzavanju procesa zarastanja, kao i u zaštiti i lečenju rana od bakterijskih infekcija [69,79,109,110].

Pre svega, kako rane mogu biti veoma raznovrsne i različitog oblika i težine, tako se i strategije lečenja rana i izbor obloge moraju prilagoditi konkretnom slučaju, uzimajući u obzir stanje same ozlede, unutrašnje i spoljne faktore koji se mogu odraziti na proces zarastanja, ali i opšte zdravstveno stanje pacijenta [108,110]. Ove potrebe za prilagođavanjem karakteristikama i tipovima rana moraju se uzeti u obzir i prilikom sinteze novih materijala za obloge za rane. Naročito je važna uloga obloge za rane u sprečavanju prodiranja bakterija na povređeno mesto, pa je poželjno da one sadrže i neki antibakterijski agens, koji treba da spreči formiranje bakterijskog biofilma u prvih 24-48 h [111]. U tom smislu, materijal obloge treba izabrati tako da odgovori nizu zahteva, koji su postavljeni tako da omogućuju ostvarenje optimalne nege rane i ubrzanog zarastanja. Neki od ovih zahteva obuhvataju [1,4,69,80,109,112]:

- (1) biokompatibilnost i netoksičnost prema zdravom tkivu,
- (2) visoku moć apsorpcije eksudata,
- (3) zadovoljavajuću permeabilnost za gasove (O_2 , CO_2 , vodena para), kako bi rana mogla da „diše”,
- (4) sposobnost održavanja lokalne vlažnosti i sprečavanja sušenja rane,
- (5) sterilnost i barijerna svojstva prema prodiranju mikroorganizama,
- (6) toplotnu provodljivost i sposobnost održavanja optimalne temperature rane i njene okoline,
- (7) nisku adhezivnost prema tkivu rane,
- (8) antibakterijska svojstva, kako bi obloga mogla da pruži i aktivnu zaštitu rane od infekcije, pored pasivnih barijernih svojstava.

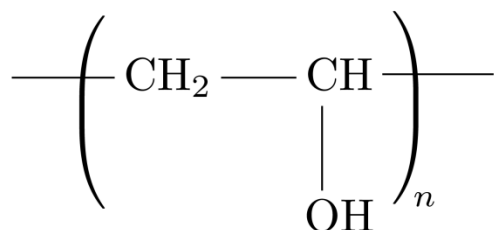
Hidrogelovi, kao visoko porozne čvrste matrice polimera, koje sadrže i do 90 % vode, predstavljaju idealan materijal za obloge za rane [1,4,69,80,109,113], imajući u vidu specifične potrebe zarastanja rana različite težine, kao i sve gorenavedene zahteve koje materijali za obloge za rane moraju da ispune [1,4]. Visok sadržaj vode u hidrogelu omogućava regulaciju vlažnosti okoline rane, a njihova moć apsorpcije potpomaže u upijanju eksudata i uklanjanju nekrotičnog tkiva sa površine rane. Porozna struktura hidrogelova je visoko permeabilna za gasove, pa omogućava razmenu O_2 i CO_2 sa okolinom. Osim toga, struktura matrice hidrogela liči na strukturu vanćelijskog matriksa, što olakšava migraciju i proliferaciju ćelija i ubrzava zarastanje rane [1]. Još jedna prednost materijala na bazi hidrogelova je i činjenica da se njihova svojstva i struktura mogu gotovo neograničeno prilagođavati specifičnim potrebama i zahtevima, usled veoma raznovrsnog izbora polimernih komponenata i njihovih kombinacija. Neki od polimera korišćenih za dobijanje hidrogelnih obloga za rane obuhvataju sintetske materijale, kao što su polivinil-alkohol [5,6,114–116], polivinil-pirolidon (PVP) [10], poli-kaprolakton [117], polilaktid [118], poli(metakrilna

kiselina) [119], polietilen-glikol [117,120], dok su najčešće korišćeni prirodni polimeri hitin i hitozan [14,15,121–123], alginat [11,124,125], želatin [23,126,127], celuloza [13,128,129], skrob [130], dekstran [131,132], hijaluronska kiselina [133–135], uključujući i proteinske biopolimere kao što su keratin [136] i kolagen [123,133,135], fibroin svile i sericin [137]. Bilo koji od navedenih polimera se vrlo retko koristi pojedinačno – češće su kombinacije dva ili više polimera, čime se ostvaruje još širi spektar mogućnosti kontrole strukture, svojstava i mehaničkih osobina hidrogelnih materijala za obloge za rane. Izbor antibakterijske komponente i načina njene inkorporacije u polimernu matricu takođe u određenoj meri diktira izbor polimernih komponenata koje bi trebalo da igraju ulogu nosača i ostvare optimalne interakcije kako bi se antibakterijski agens stabilizovao, a da istovremeno omoguće kontrolisano otpuštanje i neometano dostavljanje dovoljne količine antibakterijskog agensa u okolinu rane, kako bi se obezbedila dugotrajna i efikasna zaštita od infekcije.

Osim toga, svakako bi na umu trebalo imati i mogućnost produženja vremena trajanja obloge, kako bi se umanjila potreba za čestim previjanjem i time smanjila opasnost od dodatnog oštećenja tkiva u okolini rane. Sve ove karakteristike se mogu dobro kontrolisati izborom polimernih komponenata materijala za obloge za rane i njihovim kombinovanjem kako bi se postigla što bolja svojstva. Svakako je jedan od najvažnijih izbora i vrsta antibakterijskog agensa, koji bi trebalo da omogući dugotrajnu zaštitu rane od prodiranja bakterija, nastajanja infekcija i formiranja biofilma. Prema tome, optimalan materijal za obloge za rane bi trebalo da sadrži biokompatibilne, netoksične polimere, dobrih mehaničkih svojstava koja se moraju održati i tokom dužeg perioda primene, kao i visoke moći upijanja. Ovakav materijal bi trebalo da sadrži i aktivnu antibakterijsku komponentu širokog spektra, kao i da obezbedi njeno kontrolisano otpuštanje, kako bi se postigla produžena sterilnost okoline rane i same oblasti rane. U ovom radu su kao polimerne komponente odabrani polivinil-alkohol i hitozan, a kao antibakterijski agens su izabrane nanočestice srebra, pa će o svim ovim materijalima biti nešto više reči u narednim odeljcima.

2.2.1 Polimerne komponente

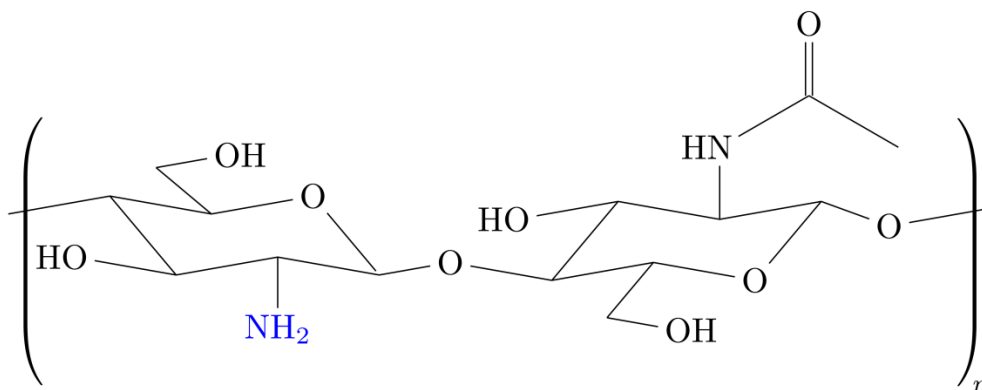
Polivinil-alkohol (PVA) (slika 2.1) je biokompatibilan, netoksičan i hemijski inertan polimer, koji je dobro rastvoran u vodi i brzo i lako formira strukturno stabilnu umreženu matricu dobrih mehaničkih svojstava i visoke elastičnosti [138]. Svojstvo hidrofilitnosti usled prisustva brojnih -OH grupa daje makromolekulu PVA sposobnost da formira gel fizičkim umrežavanjem polimernih lanaca putem uspostavljanja vodoničnih veza [139,140]. Fizički umreženi hidrogelovi PVA imaju odlična fizičko-mehanička svojstva i visoku elastičnost te veoma nalikuju ljudskim tkivima, a takođe su izuzetno biokompatibilni jer se prilikom fizičkog dobijanja gelova ne primenjuju toksični hemijski umreživači, što ih čini idealnim za različite (bio)medicinske primene, uključujući kontaktna sočiva, nosače lekova [141], obloge za rane [20,142–145], implantate hrskavice i reparaciju tkiva [138], itd.



Slika 2.1. Strukturna formula polivinil-alkohola

Hitozan (CHI) je katjonski polisaharid prirodnog porekla, čiji linearni makromolekulski lanac zapravo predstavlja kopolimer koji se sastoji od dve funkcionalne jedinice (slika 2.2): (1→4)-2-amino-2-deoksi-β-D-glukan (D-glukozamin) i (1→4)-2-acetamido-2-deoksi-β-D-glukan (N-acetil-D-glukozamin), povezane (1→4)-β glikozidnim vezama [146]. Hitozan se iz prirodnih izvora dobija parcijalnom ili potpunom deacetilacijom hitina u alkalnoj sredini (najčešće pomoću NaOH), pri čemu svojstva dobijenog proizvoda, kao i molarna masa CHI, veoma zavise od stepena deacetilacije i od prirodnog porekla izvornog polimera hitina (ćelijski zidovi gljiva, egzoskelet zglavkara, kao što su rakovi i insekti, radule mekušaca, itd.) [101,146,147].

Hitozan sadrži veliki broj amino (-NH₂) grupa, nastalih uklanjanjem acetil funkcionalnih grupa na makromolekulskom lancu hitina, koje su podložne protonizaciji do -NH₃⁺, što ovom polimeru daje polikatjonska svojstva i čini ga jedinstvenim među svim polisaharidima prirodnog porekla. Polielektrolitni karakter daje hitozanu sposobnost da formira polielektrolitne komplekse sa polimerima polianjonske prirode, kao i mogućnost interakcija i uspostavljanja kompleksnih veza sa nanočesticama i jonima metala. Osim toga, rastvorljivost hitozana u vodenim rastvorima zavisi od pH – u kiselim sredinama (pH < 6,3) su bočne -NH₂ grupe protonovane, te mogu da grade vodonične veze sa molekulima H₂O, pa je polimer rastvoran, dok se u alkalnim rastvorima ove grupe deprotonuju i CHI postaje nerastvoran [148], što omogućava interesantne primene CHI u sintezi različitih biomaterijala, uz kontrolu njihovih svojstava. Takođe je poznato i da je hitozan biodegradabilan, tj. da određeni enzimi (neke proteaze i lizozim) mogu razgraditi njegovu strukturu, a osim toga je identifikovano osam „hitanaza” humanog porekla, koje su sposobne da izazovu degradaciju CHI raskidanjem glikozidnih veza između njegovih funkcionalnih jedinica [146]. Usled ovih povoljnih svojstava, hitozan je sve češći predmet interesovanja i istraživanja u oblasti biomaterijala, uključujući sintezu obloga za rane i nosača lekova [149,150].



Slika 2.2. Strukturna formula hitozana

Kako se hidrogelovi čistog PVA mogu dobiti fizičkim postupcima umrežavanja, tako se i hidrogelne blende polivinil-alkohol/hitozan mogu formirati ovim putem [149], a osim toga se često primenjuju i hemijski ili radijacioni postupci umrežavanja, te se dobijaju hidrogelne matrice visokoumrežene i kontrolisane strukture, usled dobre mešljivosti i mogućnosti uspostavljanja vodoničnih veza između makromolekulskih lanaca ovih polimera, što omogućuje stvaranje jakih inter- i intramolekulskih interakcija.

Hidrogelovi polivinil-alkohola i hitozana su našli i široku primenu u lečenju rana, jer kao materijali za obloge za rane imaju mnoge prednosti i povoljna svojstva zahvaljujući sinergističkoj kombinaciji prirodnog i sintetskog polimera – dok PVA daje oblozi elastičnost i smanjuje potencijalne negativne efekte biodegradacije hitozana, CHI poboljšava biokompatibilnost i daje oblozi antibakterijska svojstva. Hitozan takođe ima sposobnost da stimuliše rast i proliferaciju

ćelija na mestu ozlede, čime potpomaže regeneraciju tkiva i brže zarastanje [148,151]. Ovi hidrogelovi takođe imaju odličnu sposobnost bubrenja, te mogu apsorbovati eksudate rane i tako doprineti uklanjanju ostataka oštećenog i odumrlog tkiva, kao i efikasno održavati lokalnu vlažnost, što je neophodno za pravilno zarastanje rane.

Poznato je da hitozan prirodno poseduje određenu antibakterijsku aktivnost [25–27,152,153], iako mehanizam ovog dejstva nije u potpunosti ispitan. Istraživanja uglavnom ukazuju na to da su antibakterijska svojstva CHI posledica prisustva pozitivno naelektrisanih $-\text{NH}_3^+$ grupa u kiselim rastvorima, odn. njegovog polikatjonskog karaktera, koji je posledica delimične deacetilacije hitina [146]. Zbog toga makromolekuli CHI imaju sposobnost da stupaju u interakcije sa površinom ćelija bakterija (koje su pretežno negativnog naelektrisanja), izazivajući izmene i oštećenja strukture membrane, čime se ometaju respiratorni procesi i ostale normalne funkcije bakterijske ćelije, izazivajući njenu smrt [25–27,146,154–156]. Usled ovih interakcija dolazi do povećanja permeabilnosti membrane i do curenja unutarćelijskog sadržaja i gubitka funkcionalnih proteina iz ćelije [152]. Antibakterijska svojstva hidrogelova CHI bitno zavise od mnogih internih i eksternih faktora, kao što su stepen deacetilacije, molarna masa, stepen umreženja hidrogela i sadržaj hitozana, temperatura i pH vrednost okoline, kao i struktura bakterijskih ćelija [31,152,154,157]. Kao što je već pomenuto, hitozan se dobija iz prirodnih izvora, te i način njegove sinteze može imati značajan uticaj na njegova svojstva, uključujući i antibakterijsku aktivnost, jer od postupka dobijanja hitozana veoma zavise njegova molarna masa i stepen deacetilacije. Molarna masa utiče na fizička svojstva CHI, uključujući viskoznost, rastvorljivost i sposobnost formiranja gela, dok od stepena deacetilacije izrazito zavise njegova prirodna antibakterijska svojstva [31], jer je broj NH_2 i NH_3^+ grupa, a samim tim i ukupno površinsko naelektrisanje makromolekula, u direktnoj korelaciji sa stepenom deacetilacije [154].

2.2.2 Grafen

Grafen (Gr), dvodimenzionalni monosloj sp^2 -hibridizovanih atoma ugljenika, organizovanih u kristalnu rešetku oblika pčelinjeg saća [158], jedinstveni je materijal koji poseduje izuzetna svojstva kao što su visoka pokretljivost elektrona, termička i električna provodljivost, mehanička čvrstoća i specifična optička svojstva [159]. Grafen, kao i grafen-oksidi, predmet su velikog interesovanja u brojnim oblastima nauke o polimerima, usled njihove odlične procesabilnosti i mogućnosti formiranja kompozita i nanokompozita sa širokim spektrom polimernih materijala [160]. Brojna istraživanja su pokazala da grafen može da poboljša mehaničku čvrstoću kompozitnih materijala sa polimernom matricom [35,37–39]. Takođe se pokazalo da dodatak i inkorporacija malih količina grafena može dovesti i do poboljšanja termičke stabilnosti i termoprovodnosti polimernih matrica [33–36]. Osim toga, postoje brojne i raznovrsne studije posvećene ispitivanju antibakterijske aktivnosti grafena i njegovih derivata kao što je grafen-oksidi, a predloženi su mehanizmi antibakterijskog dejstva koji obuhvataju narušavanje strukture bakterijske citoplazmatične membrane i izazivanje oksidativnog stresa u ćeliji kao posledice nastajanja reaktivnih kiseoničnih vrsta [161,162]. Potencijalno postojanje antibakterijske aktivnosti kod grafena bi svakako bilo povoljno prilikom sinteze antibakterijskih hidrogelnih obloga za rane, međutim, ovaj aspekt ostaje još uvek prilično kontroverzan [163], kako ni sam mehanizam antibakterijske aktivnosti, niti uslovi pod kojima se ona ispoljava, još uvek nisu dovoljno ispitani, te su svakako neophodna opsežna istraživanja u pogledu ovakvih svojstava grafena.

2.2.3 Nanočestice srebra

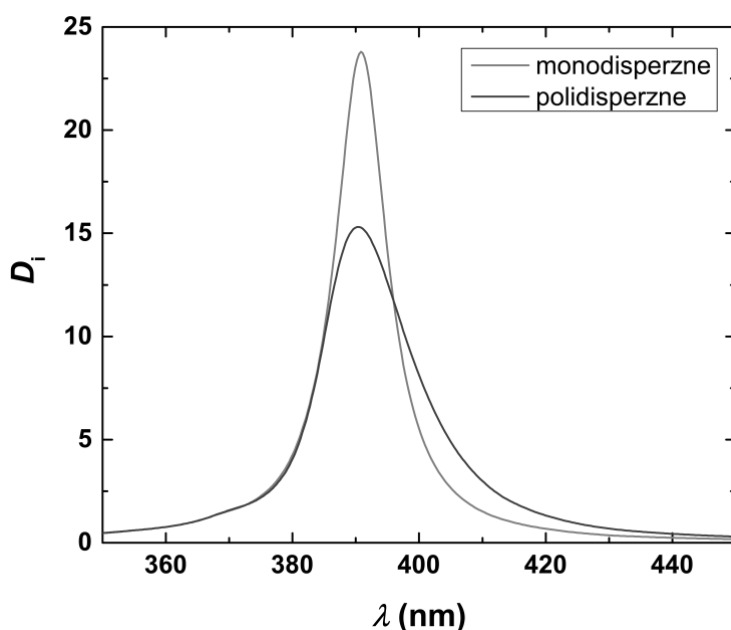
Pojava antibiotske rezistencije kod mnogih bakterijskih sojeva, a posebno onih bolničkih, sve je češći problem u poslednje vreme, pa se sve više pažnje posvećuje alternativnim antibakterijskim agensima. Kada su u pitanju obloge za rane, opasnost od razvijanja rezistencije je utoliko veća, ukoliko je neophodno dugotrajnije lečenje, pri čemu je dugoročna sistemska terapija antibioticima veoma nepogodna, pa je poželjnije primenjivati antibakterijske obloge na mestu ozlede. Nanočestice srebra su poznate kao antimikrobni agensi širokog spektra [50,164], koji poseduju snažnu aktivnost prema velikom broju različitih vrsta patogenih mikroorganizama, uključujući i brojne rezistentne bakterijske sojeve. U literaturi se navode brojni mogući različiti mehanizmi antibakterijske aktivnosti nanočestica srebra, uključujući oštećenje citoplazmatične membrane, inhibiciju replikacije DNK, ometanje respiratornih procesa i proizvodnje ATP, koji vode ka smrti bakterijske ćelije [47–50]. Međutim, prilikom primene srebra uvek je prisutna opasnost od toksičnosti prema zdravim ćelijama i tkivima, te se koncentracija srebra u antibakterijskom materijalu mora optimizovati tako da omogućava zadovoljavajuću antibakterijsku aktivnost a ne izaziva toksične efekte u živim ćelijama. S druge strane, sa tačke gledišta dizajna i sinteze materijala za obloge za rane, kao čest problem javlja se stabilnost nanočestica srebra, usled njihovih malih dimenzija i velike površinske energije. Aglomeracijom nanočestica srebra se gube njihova povoljna antibakterijska svojstva, te se dosta pažnje poklanja prevazilaženju ovog problema, što se najčešće postiže primenom stabilizatora koji se vezuju za nanočestice srebra, smanjujući njihovu površinsku energiju i sprečavajući aglomeraciju, dok istovremeno omogućavaju kontrolisano otpuštanje na mestu aplikacije. Polimerni materijali, među kojima i hidrogelovi, su se pokazali kao dobra rešenja za stabilizaciju nanočestica srebra, putem interakcija sa određenim funkcionalnim grupama na lancu polimera, formiranjem koordinacionih veza i nastajanjem kompleksa polimer-metal, kao i imobilizacijom nanočestica u porama hidrogelne matrice [165]. Na taj način se mogu dobiti funkcionalni nanokompozitni materijali nanočestica srebra u polimernim matricama, u različitim oblicima i formama i za različite primene [84,166,167], a jedna od istaknutih oblasti primene ovih materijala su svakako aktivne obloge za rane [168].

2.2.3.1 Optička svojstva nanočestica srebra

Nanočestice srebra pokazuju interesantna optička svojstva usled karakterističnih interakcija sa elektromagnetnim zračenjem, svojstvenih metalima u nanodimenzionom obliku [169]. Jedan od ovih fenomena je i apsorpcija i rasipanje svetlosti u vidljivoj oblasti elektromagnetnog spektra, usled čega položaj maksimuma apsorpcije na UV-vidljivim spektrima nanočestica srebra zavisi od geometrije, veličine, distribucije i stanja površine nanočestica, kao i od strukture i dielektričnih svojstava okolnog medijuma [170]. Zahvaljujući ovom fenomenu se, uz pomoć UV-vidljive spektroskopije može ne samo utvrditi prisustvo i koncentracija nanočestica srebra u nekom sistemu, već se mogu dobiti i informacije o njihovom obliku, dimenzijama i stepenu aglomeracije. UV-vidljivi spektri nanočestica srebra ispoljavaju veoma karakterističan maksimum apsorpcije na talasnim dužinama od ≈ 400 nm. Ovaj maksimum potiče od fenomena tzv. rezonancije površinskog plazmona (eng. *surface plasmon resonance*, SPR) [171,172], do koga dolazi usled kretanja elektrona u provodnoj traci elektronskog omotača atoma srebra usled interakcija sa upadnim elektromagnetnim zračenjem, što dovodi do izmeštanja pozitivnih i negativnih naelektrisanja i do polarizacije nanočestice [172]. Na taj način, usled dejstva elektromagnetnog zračenja odgovarajuće talasne dužine, u nanočestici dolazi do indukovanja dipola, dok, sa druge strane, pozitivno naelektrisanje deluje kao pogonska sila koja teži da metal vrati u početno stanje, što dovodi do kolektivne oscilacije elektrona i do pojave apsorpcije na karakterističnoj rezonantnoj talasnoj dužini [169,172]. Ovakvo ponašanje je najizraženije u slučaju nanočestica metala koji sadrže slobodne elektrone u provodnoj traci, kao što su Ag, Au ili Cu [169]. Do pojave rezonancije dolazi usled kolektivnih oscilacija elektrona iz nepopunjenih viših orbitala u atomima metala, na graničnoj površini između dva materijala sa indukovanom pozitivnom i negativnom

permitivnošću. Kada je frekvencija fotona upadnog elektromagnetnog zračenja jednaka sopstvenoj frekvenciji oscilovanja elektrona na površini nanočestica, dolazi do njihovog pobuđivanja i izvođenja iz ravnotežnog stanja, usled čega pobuđeni elektroni osciluju karakterističnom frekvencijom rezonancije površinskog plazmona [173].

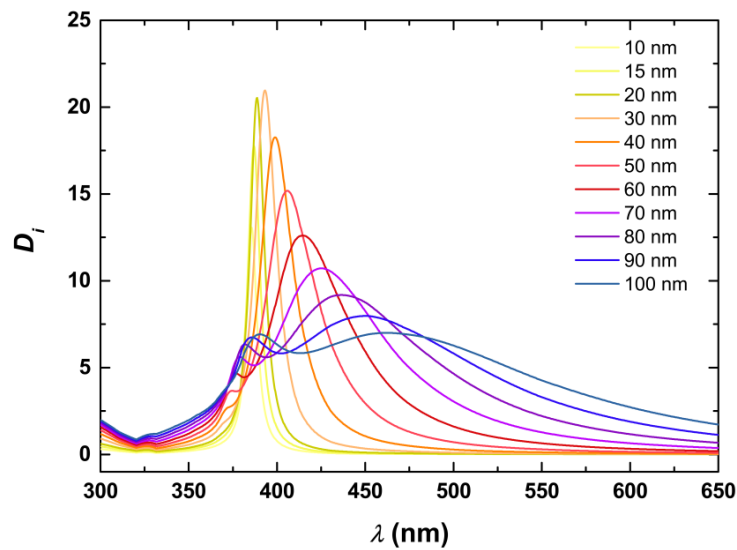
Ako se u koloidnom rastvoru nalaze sferične nanočestice Ag malih dimenzija (prečnika ≤ 25 nm), one će apsorbovati svetlost u oblasti talasnih dužina ≤ 400 nm i rastvor će biti obojen žuto. Ako je sistem monodisperzan, na UV-vidljivom spektru će se pojaviti jedan vrlo uzak i oštar pik na ovim talasnim dužinama. Međutim, monodisperznost je retka pojava, i statistički je verovatnije da će se u rastvoru nalaziti nanočestice različitih dimenzija, tj. sa polidisperznom raspodelom dimenzija. Ovo dovodi i do širenja pika i smanjenja intenziteta maksimuma apsorpcije na UV-vidljivom spektru. Uporedni prikaz UV-vidljivih spektara monodisperznih i polidisperznih nanočestica srebra i ilustracija uticaja polidisperznosti na oblik i položaj maksimuma apsorpcije, prikazan je na slici 2.3. Simulacija reprezentativnih spektara izvršena je pomoću kompjuterskog softvera MiePlot (verzija 4.6.1.4) [174].



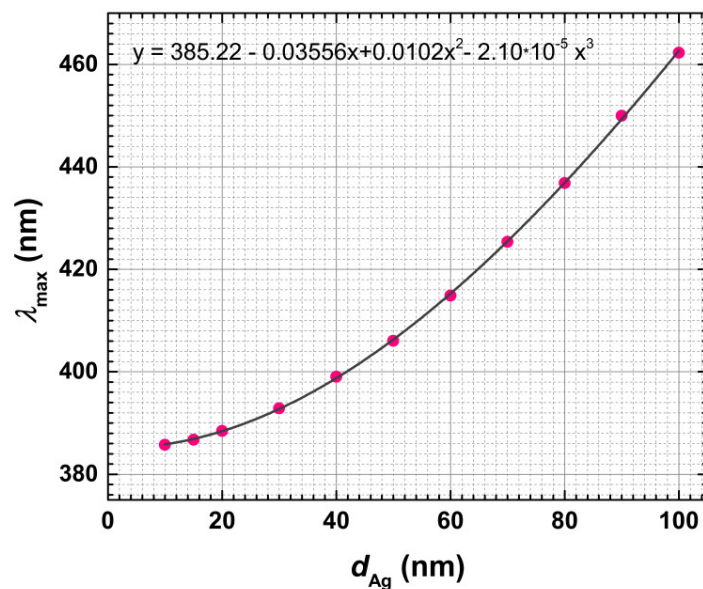
Slika 2.3. Uticaj polidisperznosti nanočestica srebra ($d = 25$ nm \pm 40 %) na intenzitet i širinu maksimuma na UV-vidljivom spektru

Još jedan efekat koji može značajno uticati na izgled spektara nanočestica srebra je efekat agregacije. Kako su nanočestice veoma sitne, one imaju veoma razvijenu površinu i veliku površinsku energiju pa su zbog toga podložne agregaciji, usled čega su i rastvori nanočestica srebra nestabilni, pa sa vremenom dolazi do povećanja dimenzija nanočestica što dovodi do promene boje rastvora i, naravno, do promene položaja i oblika maksimuma na vidljivom spektru. Što su nanočestice krupnije (prečnika 30 nm, 50 nm itd.) položaj pika će se utoliko više pomerati ka većim talasnim dužinama, što odgovara i promeni boje rastvora (od žute ka narandžastoj, crvenoj, ljubičastoj itd.). Ilustracija promene oblika i položaja maksimuma apsorpcije na UV-vidljivom spektru nanočestica srebra prikazana je na slici 2.4. Na osnovu zavisnosti položaja maksimuma od veličine nanočestica, na simuliranim UV-vidljivim spektrima, dobijenim simulacijom pomoću kompjuterskog softvera MiePlot (verzija 4.6.1.4) [174] (slika 2.4), može se formirati i kalibracioni dijagram na osnovu koga se mogu proceniti dimenzije eksperimentalno sintetisanih nanočestica srebra (slika 2.5). Naravno, ovakav način određivanja dimenzija nanočestica srebra može biti samo aproksimativan, usled brojnih drugih efekata koje mogu uticati na izgled UV-vidljivog spektra, a za precizno određivanje dimenzija nanočestica srebra su mnogo

pogodnije druge, specijalizovane metode, kao što je dinamičko rasipanje svetlosti i transmisiona elektronska mikroskopija.



Slika 2.4. Uticaj povećanja prečnika nanočestica srebra na položaj i oblik maksimuma na UV-vidljivom spektru



Slika 2.5. Zavisnost položaja maksimuma (λ_{\max}) na UV-vidljivom spektru od dimenzija nanočestica srebra (d_{Ag}); rastvarač – voda na 25 °C, polidisperzne nanočestice sa standardnom devijacijom od 15%

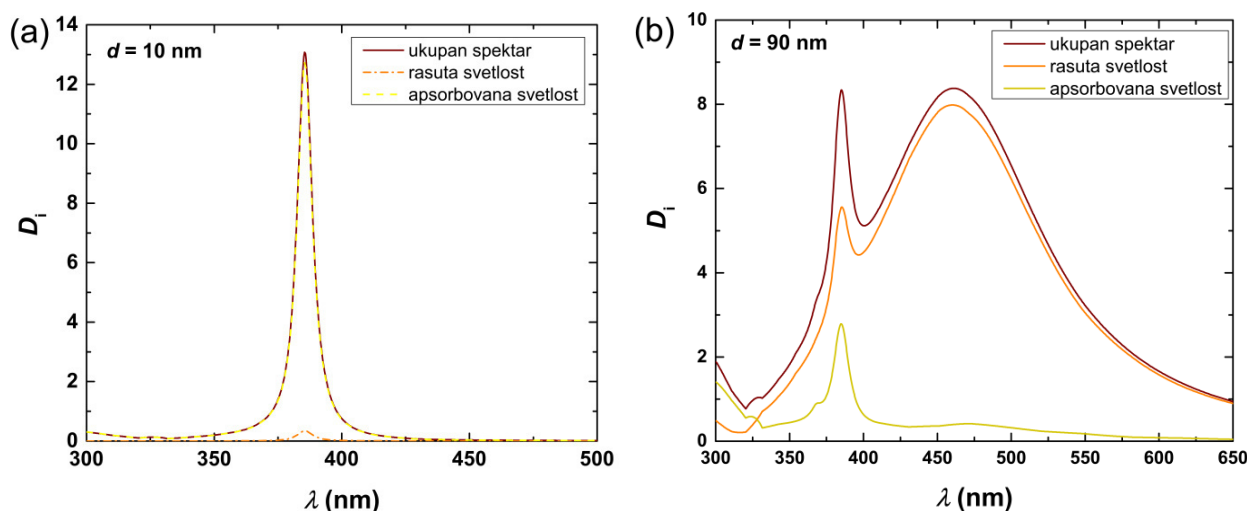
Zbog agregacije takođe može doći i do pojave dva pika na spektru, što se dešava u slučaju nanočestica krupnijih dimenzija, jer talasna dužina na kojoj nanočestice apsorbuju/rasipaju svetlost veoma zavisi od njihovih dimezija [171,172]. Rasipanje svetlosti od strane čestica koje su značajno manje od talasne dužine upadnog zraka (obično $d < \lambda/20$) i koje se prema tome mogu smatrati tačkastim izvorima zračenja, se naziva *selektivno, elastično* ili *Rejljevo rasipanje* [175–178], a intenzitet rasute svetlosti se može opisati jednačinom:

$$I = I_0 \cdot \frac{1 + \cos^2 \theta}{2l^2} \cdot \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^4 \cdot \left(\frac{d}{2}\right)^6 \cdot \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2}\right)^2 \quad (2.1)$$

gde su I i I_0 intenzitet rasute svetlosti i upadnog zraka, θ je ugao rasipanja, l je rastojanje koje svetlost pređe, n je indeks prelamanja (funkcija indeksa prelamanja rastvarača i nanočestica), λ talasna dužina i d prečnik čestica.

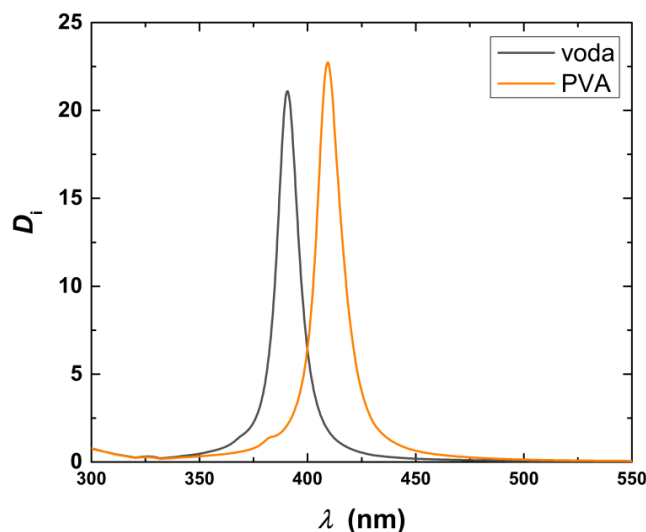
Iz jednačine (2.1) se vidi da je intenzitet rasute svetlosti obrnuto proporcionalan četvrtom stepenu talasne dužine ($I \sim \lambda^{-4}$), tako da je intenzivnije rasipanje svetlosti kraćih talasnih dužina. Jednačina (2.1) takođe pokazuje i da intenzitet rasipanja svetlosti raste sa povećanjem dimenzija nanočestica (tj. sa šestim stepenom njihovog prečnika, $I \sim d^6$). Fenomenom Rejljevog rasipanja svetlosti koriste se i spektrofotometrijski instrumenti koji su zasnovani na metodi dinamičkog rasipanja svetlosti (eng. *dynamic light scattering*, DLS), a kojima se vrlo precizno mogu meriti dimenzije i statistička raspodela, kao i stepen polidisperznosti dimenzija raznih čestica i nanočestica, uključujući i nanočestice srebra. Ovi instrumenti sadrže monohromatski izvor svetlosti čija se talasna dužina nalazi u vidljivoj oblasti (obično je to crveni laser na 633 nm), a princip njihovog rada je zasnovan na merenju promena intenziteta svetlosti rasute od strane nanočestica u rastvoru, na osnovu kojih se može izračunati srednja vrednost veličine čestica, kao i funkcija raspodele njihovih veličina.

Kada su dimenzije nanočestica veće od $\lambda/20$, one rasipaju svetlost raznih talasnih dužina, pri čemu je intenzitet rasipanja različit u različitim pravcima. Ovakvo rasipanje se opisuje *Debajevom teorijom* [177–179]. Zapravo, teorija Rejljevog rasipanja je samo poseban slučaj, odnosno aproksimacija Debajevе teorije za čestice manjih dimenzija. Što su dimenzije nanočestica veće, efekat rasipanja svetlosti postaje sve značajniji. To dovodi do intenzivnijeg rasipanja svetlosti na većim talasnim dužinama. Zbog toga se na UV-vidljivom spektru pojavljuju dva pika – jedan na oko 380-400 nm, koji potiče pretežno od apsorpcije (ali i od delimičnog rasipanja) od strane nanočestica Ag, i još jedan pik na 450-500 nanometara, koji je proporcionalan intenzitetu rasute svetlosti. Eksperimentalni spektri snimljeni UV-vidljivim spektrofotometrima, posledica su oba efekta (i apsorpcije i rasipanja), i na njima se ne može razlikovati koji deo unutrašnje gustine transmisije, D_i , potiče od apsorbovane, a koji od rasute svetlosti. Na slici 2.6 prikazan je primer ukupnih spektara, simuliranih pomoću programa MiePlot, kao i njihovo razlaganje na pojedinačne spektre apsorbovane i rasute svetlosti, za nanočestice srebra sitnijih (10 nm) i krupnijih (90 nm) prečnika.



Slika 2.6. Uticaj povećanja prečnika nanočestica srebra na odnos rasute i apsorbovane svetlosti i pojavu novog maksimuma na UV-vidljivom spektru monodisperznih nanočestica srebra

Na kraju, promena optičkih svojstava okolnog medijuma, kao što su rastvori polimera u kojima su nanočestice srebra stabilizovane, takođe može uticati na izgled spektra i položaj maksimuma. Na slici 2.7 ilustrovan je ovaj efekat uticaja okolnog medijuma na izgled UV-vidljivog spektra nanočestica srebra, na primeru čiste vode i polivinil-alkohola. To se može objasniti činjenicom da se u okolnom medijumu indukuje polarizacija suprotnog znaka u odnosu na polarizaciju nanočestica, što može dovesti do smanjenja povratne sile koja deluje na elektrone, pa samim tim i do smanjenja rezonantne frekvencije oscilovanja površinskog plazmona. Upravo iz ovih razloga dielektrična svojstva okolnog medijuma značajno utiču na položaj SPR maksimuma apsorpcije nanočestica srebra [173].



Slika 2.7. Uticaj okolnog medijuma (voda ili PVA) na položaj maksimuma na UV-vidljivom spektru nanočestica srebra prečnika $25 \text{ nm} \pm 15 \%$

2.2.3.2 *Biološka svojstva nanočestica srebra – antibakterijska aktivnost i citotoksičnost*

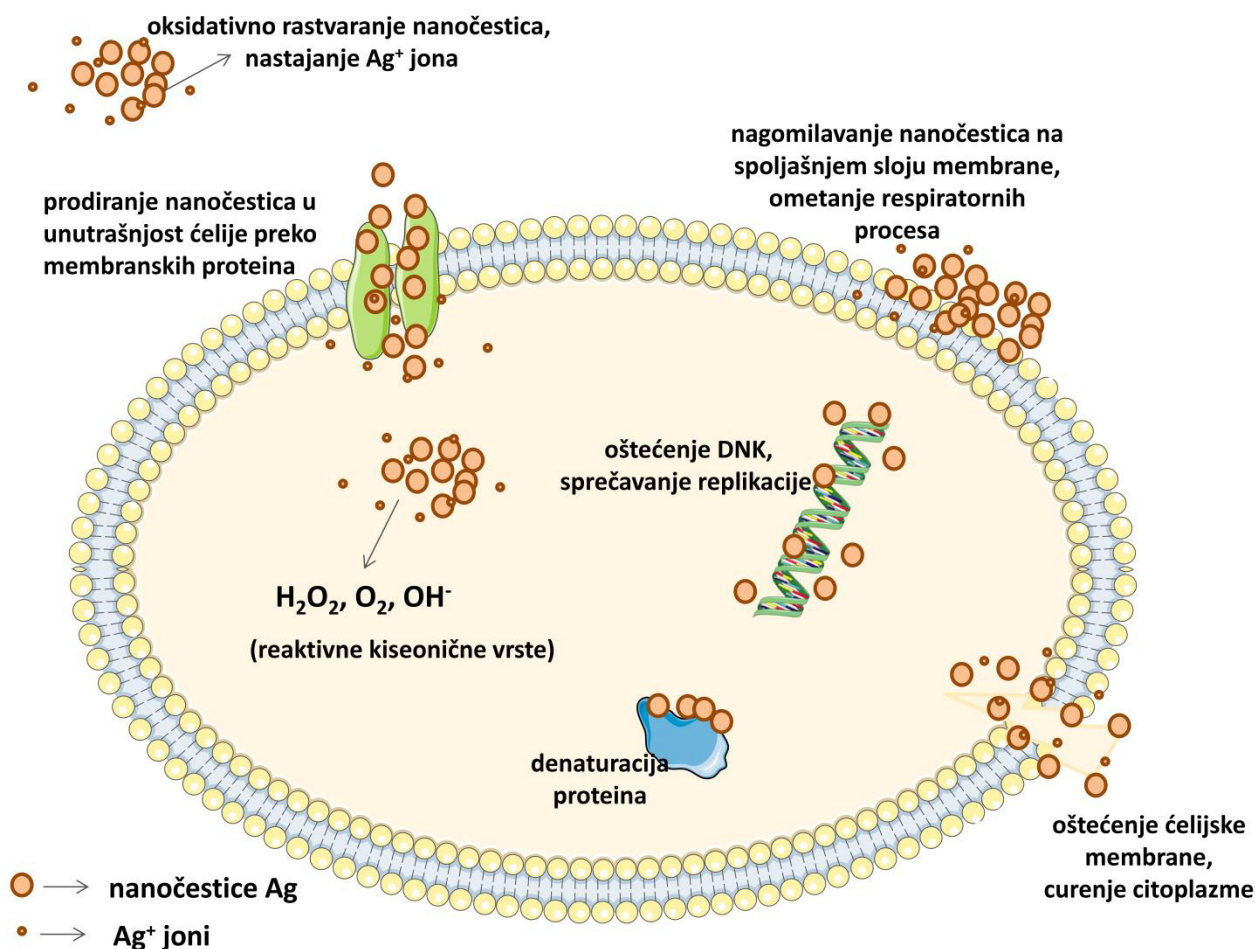
Istraživanja su pokazala da srebro u nanokristalnom obliku poseduje jaču antibakterijsku aktivnost u poređenju sa antibakterijskim materijalima na bazi srebra u jonskom ili kompleksnom obliku. Snažno dejstvo nanočestica srebra pripisuje se njihovim jedinstvenim svojstvima koja proističu iz nanometarske strukture i malih dimenzija, usled kojih je pojačana aktivnost nanočestica srebra, a koje takođe pružaju i raznovrsne mehanizme dejstva usled velikog broja mogućih interakcija sa ćelijama mikroorganizama, ali i usled činjenice da nanočestice srebra u fiziološkim medijumima takođe otpuštaju i Ag^+ jone putem oksidativnog rastvaranja [164]. Pokazano je takođe da antibakterijska aktivnost nanočestica srebra veoma zavisi od njihovih dimenzija – antibakterijski efekat je jači, što su nanočestice sitnije [168]. Nanočestice veoma malih dimenzija imaju visoku površinsku energiju, koja ih čini vrlo reaktivnim i spremnijim na interakcije sa bakterijskim ćelijama, ali iz tog razloga i vrlo nestabilnim, usled čega se one uvek stabilizuju inkorporacijom unutar polimernih matrica, uključujući i hidrogelove, što omogućava dugotrajno skladištenje i poboljšanu efikasnost tako dobijenih materijala [168].

Mehanizam antibakterijske aktivnosti nanočestica srebra, i pored brojnih istraživanja i vrlo detaljnih studija, još uvek nije u potpunosti rasvetljen, upravo iz razloga svoje raznovrsnosti i različitih mogućnosti dejstva prema različitim mikroorganizmima i bakterijskim sojevima. Zbog toga postoji veliki broj predloženih mehanizama antibakterijskog dejstva nanočestica srebra, koji obuhvataju procese kao što su interakcije sa citoplazmatičnom membranom bakterijskih ćelija, dovodeći do njenog oštećenja nastajanjem pukotina na površini membrane, ili akumulacijom nanočestica srebra na njenom spoljašnjem sloju [180–182]. Osim toga, nanočestice srebra mogu

prodreti i u unutrašnjost same bakterijske ćelije, gde aktivno reaguju sa brojnim funkcionalnim grupama ćelijskih proteina i nukleinskih kiselina, čime ometaju različite metaboličke i respiratorne procese u ćeliji [47,49,50,183]. Nanočestice srebra se aktivno vezuju za proteinske funkcionalne grupe koje sadrže sumpor, kao i za fosfatne grupe na lancima DNK, dovodeći do oštećenja DNK i ometanja replikacije [180], što sprečava razmnožavanje bakterijskih ćelija i formiranje kolonija. Nanočestice srebra u vodenim rastvorima (kakva je i citoplazma) učestvuju u oksidoredukcionim reakcijama u kojima nastaju reaktivne kiseonične vrste (eng. *reactive oxygen species*, ROS), odnosno slobodni radikali, koji su veoma aktivni i izazivaju čitav niz lančanih reakcija u ćeliji koje dovode do oštećenja citoplazmatične membrane i denaturacije ćelijskih proteina [48]. Osim toga, nanočestice srebra se u vodenim medijumima lako oksiduju u prisustvu kiseonika, pri čemu otpuštaju Ag^+ jone, koji takođe doprinose jačem antibakterijskom efektu, jer sami po sebi mogu reagovati sa funkcionalnim jedinicama u ćeliji, čime se ostvaruje dvojni efekat nanočestica i jona srebra [180,184,185]. Naravno, i (nano)čestice srebra krupnijih dimenzija se mogu rastvarati i otpuštati Ag^+ jone, ali je ovaj efekat utoliko izraženiji, ukoliko su njihove dimenzije manje, jer se njihova reaktivnost povećava usled velike specifične površine [184,185]. Osim toga, pokazano je da je i oblik nanočestica u direktnoj korelaciji sa brzinom njihovog rastvaranja u vodenim rastvorima, pri čemu su Helmlinger i sar. [184] zaključili da se najaktivnije rastvaraju nanočestice srebra oblika pločica, da su sferne nanočestice (dobijene različitim postupcima sinteze) na drugom mestu, dok su najmanje reaktivne štačićaste i kockaste nanočestice. Pored toga, Bondarenko i saradnici [186] su otkrili da rastvaranje nanočestica srebra i otpuštanje Ag^+ jona, a posebno u unutrašnjosti bakterijskih ćelija, ima značajan uticaj na njihovu antibakterijsku aktivnost, ali ne predstavlja jedini mehanizam antibakterijskog dejstva nanočestica srebra, koje obuhvata i brojne druge interakcije sa bakterijskim ćelijama i njihovim funkcionalnim proteinima, kao što je objašnjeno u tekstu iznad. Na slici 2.8 je šematski prikazana ilustracija različitih mehanizama antibakterijskog dejstva nanočestica srebra [183].

Kada su u pitanju polimerni materijali za obloge za rane sa inkorporisanim nanočesticama srebra kao aktivnom supstancom, njihovo antibakterijsko dejstvo, efikasnost i dugovečnost veoma zavise od strukture i oblika materijala, kao i od kinetike otpuštanja srebra i efikasnosti interakcija sa bakterijskim kulturama, odnosno od aktivne dodirne površine [168,183]. Zbog toga je ispitivanje antibakterijskih svojstava u *in vitro* uslovima, različitim testovima i prema različitim vrstama bakterija i njihovim sojevima od ključne važnosti za potencijalnu primenu ovakvih materijala.

Brojni su faktori koji mogu uticati na antibakterijsku efikasnost materijala sa nanočesticama srebra, i mehanizam dejstva samog materijala za obloge za rane ne zavisi samo od antibakterijskog mehanizma nanočestica, već i od niza drugih aspekata koji moraju biti uzeti u obzir prilikom dizajniranja ovakvih materijala. Neki od njih obuhvataju ukupan broj bakterijskih ćelija prilikom inicijalnog kontakta sa materijalom, osetljivost konkretnog soja, medijuma u kojima su kulture uzgajane, itd. Takođe je pokazano da antibakterijska aktivnost nanočestica srebra pokazuje pomalo i iznenađujuće visok stepen selektivnosti prema pojedinim sojevima, tako da čak i različiti sojevi jedne iste vrste bakterije ispoljavaju različit stepen osetljivosti prema delovanju nanočestica srebra [187]. Poznato je, na primer, da bakterijske vrste *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* pokazuju vrlo različit nivo osetljivosti prema nanočesticama srebra. Mehanizam usled kojeg se ovo dešava nije još uvek dobro poznat, mada se smatra da je upravo razlika u strukturi, sastavu i debljini ćelijskog zida Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija razlog njihove različite osetljivosti prema nanočesticama srebra [48]. Međutim, rezultati različitih istraživanja se često razmimoilaze, pa su tako neke studije pokazale da je Gram-negativna *E. coli* generalno osetljivija prema nanočesticama Ag u poređenju sa Gram-pozitivnim *S. aureus* [48,187], dok je u drugim ispitivanjima zaključeno upravo obrnuto [188]. Sve ovo govori u prilog tome da antibakterijsko dejstvo i efikasnost nanočestica srebra zavisi kako i od strukture i svojstava samih nanočestica, tako i od konkretnog bakterijskog soja korišćenog u datim ispitivanjima.



Slika 2.8. Interakcije nanočestica srebra sa bakterijskom ćelijom i različiti mehanizmi antibakterijskog dejstva (reprodukovano po ugledu na [183], korišćeni su elementi ćelijskih konstituenata iz baze Servier Medical Art pod CreativeCommons Attribution 3.0 licencom [189])

Pored antibakterijske aktivnosti, biokompatibilnost, odnosno netoksičnost je jedno od najvažnijih svojstava a ujedno i glavni kriterijum koji mora zadovoljiti novosintetisani materijal, kako bi se mogao uzeti u razmatranje za primenu u obliku obloga za rane (ili bilo koju drugu medicinsku primenu). Poznato je da nanočestice srebra ispoljavaju određeni stepen citotoksičnosti, odnosno da mogu negativno delovati ne samo na bakterijske, već i na zdrave humane i animalne ćelije [168,190]. Nanočestice srebra pre svega pokazuju dozno-zavisnu citotoksičnost prema zdravim ćelijama, čiji je mehanizam sličan mehanizmu antibakterijske aktivnosti, odnosno, slične su interakcije sa ćelijama i njihovim konstitutivnim jedinicama [168]. Nanočestice srebra mogu izazvati oštećenje citoplazmatične membrane, peroksidaciju membranskih lipida, inhibiciju funkcije mitohondrija i oštećenje strukture ćelijskog DNK materijala [191]. Zato se prilikom dizajniranja i sinteze materijala sa nanočesticama srebra mora voditi računa o njihovoj koncentraciji, odnosno formulacija se mora optimizovati tako da je sadržaj nanočestica srebra dovoljno visok da bi se ostvarila efikasna zaštita od bakterijskih infekcija, a istovremeno i dovoljno nizak kako bi se izbegao efekat toksičnosti prema zdravom tkivu. Međutim, još jedan vrlo bitan činilac koji se ne sme ispustiti iz vida je efekat akumulacije nanočestica srebra (ili jona koje one otpuštaju) u ćelijama, koji može izazvati vremenski-zavisnu i tzv. citoksičnost ponovljene doze [168,192]. Osim toga, citotoksičnost nanočestica srebra zavisi i od njihovih dimenzija [193–196], kao i od oblika i površinske strukture i morfologije, pri čemu je pokazano da neravne površine i prisustvo defekata mogu izazvati jači citotoksični efekat [197]. Svi ovi faktori

se moraju uzeti u obzir prilikom sinteze nanočestica srebra i njihove inkorporacije unutar hidrogelnih obloga za rane, a takođe je od ključne važnosti potvrditi netoksičnost, odn. biokompatibilnost dobijenog materijala putem testova u *in vitro* uslovima prema relevantnim modelima ćelijskih linija.

2.3 HIDROGELOVI HITOZANA, POLIVINIL-ALKOHOLA I NANOČESTICA SREBRA ZA BIOMEDICINSKE PRIMENE

Kada su u pitanju primene hidrogelova za obloge za rane, jedno od najvažnijih svojstava je antibakterijska aktivnost. Hitozan je stoga posebno interesantan za ove primene, kao biopolimer sa prirodnim antibakterijskim svojstvima. Međutim, jedan od najznačajnijih nedostataka hidrogelova na bazi čistog CHI se ogleda u brzom razgradnji u fiziološkoj sredini u prisustvu enzima [198], kao i lošim mehaničkim svojstvima, posebno kada su u pitanju fizički umreženi hidrogelovi [146,199]. Iz ovog razloga se CHI vrlo retko koristi u čistom obliku, već se mnogo češće sreće kao jedna od komponenata u blendama i kopolimerima sa drugim polimernim materijalima, kao što su želatin [200,201], dekstran [202], alginat [203,204], hijaluronska kiselina [205], poliakrilamid [206], PVA [207–210]. U slučaju hidrogelova hitozana sa polianjonskim polimerima, kao što je alginat, dolazi do gubitka antibakterijske aktivnosti hidrogela [203,211], usled formiranja polielektrolitnog kompleksa između NH_3^+ grupa hitozana i COO^- grupa na lancu alginata, što dovodi do ograničenja broja pozitivno naelektrisanih grupa, koje mogu da stupe u interakcije sa bakterijskim ćelijama [207]. Sa ciljem postizanja dugotrajnog i delotvornog antibakterijskog efekta, najčešće je neophodna inkorporacija dodatnih, ne-antibiotskih antibakterijskih agenasa, kao što su nanočestice srebra [20,212–214], kako bi se poboljšala antibakterijska svojstva materijala i ostvario dugoročniji efekat. I hitozan i polivinil-alkohol su dobro poznati kao stabilizatori nanočestica metala, uključujući i nanočestice srebra, a osim ovih svojstava, PVA i CHI poseduju brojne druge povoljne osobine, među kojima su biokompatibilnost, netoksičnost, hidrofilnost i sposobnost apsorpcije tečnosti, odnosno bubrenja, pa nije iznenađujuća činjenica da su ova dva polimera čest izbor komponenata prilikom sinteze hidrogelova i drugih polimernih materijala za različite biomedicinske primene. Polivinil-alkohol, kao elastičan sintetski polimer, značajno doprinosi održavanju strukturnog integriteta i smanjenju biodegradabilnosti hidrogela [92]. Blende PVA/CHI su posebno interesantne jer prisustvo sintetskog polimera PVA značajno pojednostavljuje proces fizičkog umrežavanja i omogućuje dobijanje strukturno čvrstih i elastičnih hidrogelova, dok hitozan doprinosi antibakterijskim svojstvima i poboljšava stabilizaciju nanočestica srebra unutar polimerne matrice [207,208]. Pokazano je da, sa povećanjem sadržaja hitozana, hidrogelovi PVA/CHI ispoljavaju jaču antibakterijsku aktivnost, a da dodatak nanočestica srebra značajno poboljšava baktericidno dejstvo ovih hidrogelova prema ćelijama *E. coli* [20,215,216]. Takođe je utvrđeno da hitozan ima i određenu sposobnost da ubrza zarastanje rana [155,217]. Biomaterijali na bazi CHI i PVA se mogu dobiti u vrlo raznovrsnim formama i oblicima, npr. kao hidrogelovi [92], filmovi [218], membrane [216]; a umrežavanje polimerne matrice se može postići hemijskim putem (dodatkom različitih hemijskih umreživača kao što su epihlorohidrin [209], tetraetoksisilan [219] ili glutaraldehid [20,220]), elektropredenjem [215], gama-zračenjem [221], kao i fizičkim umrežavanjem u nekoliko ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja [139,140,222]. U poslednje vreme se brojna istraživanja posvećuju biomedicinskim primenama hidrogelova PVA i CHI, između ostalog i kao obloge za rane. U tabeli 2.1 je prikazan pregled reprezentativnih radova sa tematikom hidrogelova CHI u kombinaciji sa PVA i drugim polimerima, sa inkorporisanim nanočesticama srebra za različite biomedicinske primene, uz pregled postupaka sinteze hidrogelova i nanočestica srebra, kao i osnovnih bioloških svojstava dobijenih materijala.

Očevidna je raznovrsnost postupaka sinteze nanočestica srebra, koje se mogu inkorporisati unutar polimernih hidrogelova na veoma različite načine, a najčešće redukcijom jona srebra putem

hemijskih, bioloških, radijacionih ili elektrohemijskih postupaka, od kojih svaki ima svoje prednosti i nedostatke. Jedan od svakako najčešćih postupaka sinteze nanočestica srebra je hemijska redukcija pomoću različitih redukcionih agenasa, kao što su NaBH_4 [200,202,209] ili trinatrijum-citrat [212,223]. Prednost hemijske sinteze ogleda se pre svega u jednostavnosti i fleksibilnosti postupka, pri čemu se redukcija može izvoditi u rastvoru polimera (stabilizatora nanočestica srebra) nakon čega se vrši formiranje hidrogela, kao što je izvršeno u slučaju sinteze hidrogelova Ag/hitozan/želatin [200], kao i Ag/tiolisani CHI/dekstran modifikovan maleinskom kiselinom [202]. Osim toga, hemijska sinteza se, naravno, može izvoditi i direktno unutar umreženog hidrogela, prethodno nabubrelog u rastvoru Ag^+ prekursora (najčešće AgNO_3) kao što su pokazali Xie i sar. [212] i Gholamali i sar. [209]. Osim natrijum-borhidrida i trinatrijum-citrata, za hemijsku redukciju nanočestica srebra korišćena je i mravlja kiselina [224], pri čemu su nanočestice sintetisane u rastvoru polimera CHI koji je zatim pomešan sa rastvorom PVA, a hidrogelne blende su dobijene elektropredenjem, kao i galna kiselina, pomoću koje su nanočestice Ag sintetisane *ex situ*, zatim dodate u rastvor CHI, a umrežavanje hidrogela je izvršeno pomoću glicerola [214,225]. Iako je hemijska sinteza jednostavan postupak koji se može dobro kontrolisati u smislu dimenzija, prinosa i fizičko-hemijskih svojstava dobijenih nanočestica, hemijski reagensi za sintezu nanočestica srebra za biomedicinske primene nisu idealni sa tačke gledišta biokompatibilnosti materijala. U slučaju nanočestica Ag sintetisanih pomoću galne kiseline, primećena je dozno-zavisna citotoksičnost, pri čemu je ostvarena vijabilnost humanih fibroblasta od 75 % za koncentraciju nanočestica u hidrogelovima od 500 ppm [225], međutim, ovi hidrogelovi su takođe pokazali i značajnu antibiofilmsku aktivnost prema bakterijskim sojevima *Pseudomonas aeruginosa* i meticilin-rezistentni sojevi *S. aureus* (MRSA) [225], kao i prema kliničkim izolatima *Staphylococcus epidermidis*, *Acinetobacter baumannii* i vankomicin-rezistentnog *Enterococcus faecium* [214]. MTT testovi su takođe pokazali zadovoljavajuću biokompatibilnost hidrogelova na bazi hitozana sa hemijski sintetisanim nanočesticama srebra pri nižim koncentracijama, ispitanim na ćelijama MCF-7 i NIH 3T3 [226], klinički izolovanim dermalnim fibroblastima [214], kao i tipskim humanim dermalnim fibroblastima [200]. Međutim, formulacije sa nižim koncentracijama su takođe pokazale i primetno slabiju antibakterijsku aktivnost, pri čemu su hidrogelovi Ag/hitozan/želatin pokazali zonu inhibicije prema *S. aureus*, ali nisu ispoljili antibakterijski efekat prema *Enterococcus faecalis* [200], dok su hidrogelovi Ag/hitozan izazvali 90 % smanjenje broja bakterijskih ćelija *E. coli* tek nakon 5 dana, i to pri najvišoj koncentraciji srebra (15 mM) [226]. Alternativni postupci hemijske sinteze nanočestica srebra podrazumevaju primenu manje toksičnih redukcionih agenasa, kao što je glukoza, koja je korišćena za dobijanje Ag/hitozan mikročestica, prethodnom sintezom nanočestica srebra u rastvoru hitozana, praćenom ekstruzijom u NaOH kako bi se dobile mikročestice hidrogela [226], kao i za dobijanje elektropredenih vlakana Ag/CHI/PVA umreženih glutaraldehidom, pri čemu su nanočestice takođe prethodno sintetisane redukcijom glukozom u rastvoru hitozana [20].

U savremenim istraživanjima, sve veća pažnja se poklanja tzv. „zelenim” postupcima sinteze nanočestica srebra, koji se oslanjaju na biohemijsku redukciju srebra pomoću aktivnih supstanci iz prirodnih ekstrakata raznih biljaka, gljiva, ali i bakterijskih sojeva, koji su biokompatibilni te stoga svakako predstavljaju i manji rizik toksičnosti prema živim ćelijama. Primeri ovakvih biosinteza nanočestica srebra obuhvataju redukciju pomoću ekstrakata plesni *Fusarium verticillioides* [227], biljke *Curcuma longa* [206], polisaharida iz gljive *Sanghuangporus sanghuang* [228], kao i bakterijskog soja *Enterobacter cloacae* [229]. Biosinteza se na ovaj način može izvršiti bilo *ex situ* uz naknadno dodavanje u rastvor polimera i formiranje hidrogela umrežavanjem pomoću propilen-glikola [227], ili izlivanjem filmova i sušenjem pod različitim uslovima [228,229], bilo direktnom sintezom unutar umrežene matrice hidrogela, dobijenog graft-kopolimerizacijom hitozana i akrilamida, i nabubrelog u rastvoru AgNO_3 [206]. Ovako dobijeni hidrogelovi sa nanočesticama srebra su pokazali značajnu antibakterijsku aktivnost prema različitim bakterijskim vrstama, uključujući *S. aureus*, MRSA, *S. epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* [227,229], dok su neki od ovih materijala pokazali i tendenciju ka ubrzavanju zarastanja rana u *in vivo* uslovima [227,228]. Primer upotrebe prirodnih biljnih ekstrakata sa terapijskim svojstvima

predstavlja i inkorporacija gela *Aloe vera* unutar hidrogelova Ag/hitozan/alginat, međutim, u ovom slučaju su korišćene komercijalno nabavljene nanočestice srebra, koje su dodate u hidrogel njegovim neposrednim bubrenjem u rastvoru nanočestica [204]. Ovi hidrogelovi su pokazali dobru antibakterijsku aktivnost sa zonama inhibicije od oko 27 mm prema *P. aeruginosa* i *S. aureus*, međutim, njihova citotoksičnost nije ispitivana [204].

Još jedan, dosta rasprostranjen, način inkorporacije nanočestica srebra unutar hidrogelnih materijala na bazi hitozana, predstavlja sintezu nanočestica srebra u rastvoru polimera redukcijom pomoću hitozana, za koji je poznato da poseduje blaga redukciona svojstva, što omogućuje direktnu sintezu nanočestica srebra bez upotrebe drugih hemikalija [30,32,205,215,219,220,230,231]. Prilikom ovakve sinteze, u rastvoru polimera se odigrava simultana redukcija Ag^+ jona i stabilizacija nastalih nanočestica [204,205,219,220,230], usled sposobnosti hitozana da redukuje jone srebra i istovremeno formira hidrogel sa novonastalim nanočesticama [32,232]. Hidrogelovi od ovako sintetisanih rastvora su dobijeni različitim putem, na primer hemijskim umrežavanjem pomoću tetraetoksisilana (TEOS) [219], hijaluronske kiseline [205] ili polietilen-glikola i glutaraldehida [220], zatim formiranjem mikročestica Ag/hitozan/sericin liofilizacijom [230], kao i direktnim umrežavanjem hidrogelova hitozana sa nanočesticama i jonima srebra [32], ili izlivanjem filmova uz sušenje na povišenoj temperaturi i neutralizaciju tretmanom NaOH [30]. Svi navedeni materijali su pokazali izražen antibakterijski efekat prema bakterijskim vrstama kao što su *E. coli*, *S. aureus* i *Bacillus subtilis* (tabela 2.1), međutim, u većini studija nisu dostupni podaci o citotoksičnosti [30,32,215,219], dok su hidrogelovi Ag/hitozan-L-glutaminska kiselina/hijaluronska kiselina pokazali zadovoljavajuću biokompatibilnost (75-80% vijabilnost ćelija L929 nakon 24 h), kao i poboljšano zarastanje rana u *in vivo* uslovima [205]. Testovi u *in vivo* uslovima su takođe pokazali visok stepen efikasnosti hidrogelova sa nanočesticama srebra u funkciji obloga za rane, te su hidrogelovi Ag/hitozan/PEG doveli do potpunog zarastanja rana nakon 12 dana [220], dok su hidrogelovi Ag/hitozan/sericin bili nešto manje efikasni, izazivajući smanjenje površine rane od 60 % nakon 14 dana [230]. Takođe, hidrogelove Ag/CHI/PVA moguće je dobiti i redukcijom nanočestica srebra hitozanom, uz istovremeno elektropredenje i naknadni termički tretman (16 h, 130 °C), pri čemu dobijeni materijali izazivaju potpunu redukciju broja bakterijskih ćelija *E. coli* nakon 6 h inkubacije [215]. Uzrok dobre antibakterijske aktivnosti hidrogelova hitozana sa nanočesticama srebra bezuslovno leži i u njihovom sinergističkom dejstvu, koje je primećeno u mnogim istraživanjima [202,220,226]. Posebno je interesantna studija u kojoj je izvršeno ispitivanje antibakterijske aktivnosti filmova hitozana sa nanočesticama srebra različitih koncentracija [30], gde je pokazano da filmovi sa nanočesticama srebra zadržavaju baktericidna svojstva prema *E. coli* i do 20 dana primene, dok se filmovi čistog hitozana ponašaju baktericidno samo tokom prvih 6 dana, zatim bakteriostatski od 6. do 18. dana, a nakon 18 dana potpuno gube svoja antibakterijska svojstva. Ovakvo ponašanje je objašnjeno različitim mehanizmima antibakterijskog dejstva nanočestica srebra i hitozana. Naime, antibakterijska aktivnost hitozana, kao polikatjonskog polimera, se ogleda u vezivanju za negativno naelektrisanu citoplazmatičnu membranu bakterijske ćelije i ometanju njene funkcije, a osim toga, polimerni materijali su pokazali i tendenciju ka adsorpciji ćelija bakterija na svojoj površini, što može da dovede do gubitka antibakterijskog dejstva u onom trenutku kada je površina filma ili hidrogela potpuno pokrivena mrtvim bakterijskim ćelijama [30]. S druge strane, nanočestice srebra deluju antibakterijski putem nekoliko različitih mehanizama, koji uključuju oštećenje citoplazmatične membrane, inhibiciju proizvodnje energije, respiratornih procesa i replikacije DNK [47–50], a osim toga je moguće i otpuštanje određene količine jona srebra, koji doprinose pojačanju antibakterijske aktivnosti, usled čega materijali sa nanočesticama srebra zadržavaju sterilnost i baktericidno dejstvo tokom dužeg vremena.

S jedne strane, direktna sinteza nanočestica srebra pomoću hitozana je pogodan i jednostavan postupak, posebno za biomedicinske primene jer omogućuje izbegavanje korišćenja hemijskih redukcionih agenasa, ali sa druge strane, takva sinteza nanočestica srebra može biti zametna i dugotrajna, jer redukcija Ag^+ hitozanom, u zavisnosti od koncentracije rastvora i drugih

parametara sinteze može da traje od 6 h pa sve do 8-10 dana [30,32,231], a često je neophodno izvoditi reakciju na povišenoj temperaturi [20,30]. Iz tog razloga je poželjno koristiti neki drugi, efikasniji metod redukcije i sinteze nanočestica srebra, dok su redukciona svojstva hitozana odgovarajuća kao dodatni način dobijanja nanočestica, čime se može postići veći prinos prilikom sinteze i efikasnija stabilizacija nanočestica srebra. Brojne studije stoga pribegavaju tzv. sintezi nanočestica srebra pomoću hitozana potpomognutoj mikrotalasima, gde se mikrotalasnim zračenjem postiže pobuđivanje i ubrzavanje reakcije uz povećanje temperature, što omogućava značajno skraćanje vremena trajanja sinteze [210,233]. Ovi hidrogelovi su pokazali zadovoljavajuću antibakterijsku aktivnost, dok su uzorci hidrogelova Ag/CHI/PVA, dobijeni sintezom potpomognutom mikrotalasnim zračenjem takođe imali i dobru biokompatibilnost, pri čemu je vijabilnost L929 ćelija iznosila 70-92 % u zavisnosti od koncentracije Ag [210].

Radijacione metode sinteze nanočestica srebra, tj. redukcija gama-zračenjem, takođe su dosta zastupljene [203,216,221], usled čistoće postupka bez primene toksičnih hemikalija, kao i zbog mogućnosti istovremenog umrežavanja hidrogela i redukcije Ag^+ jona, što je primenjeno za dobijanje Ag/hitozan/alginat/PVP [203] i Ag/hitozan/PVA hidrogelova [221]. Hidrogelovi Ag/hitozan/PVA [221] su ispoljili antibakterijska i antifungalna svojstva prema *E. coli*, *S. aureus*, *Aspergillus flavus* i *Candida albicans*, dok su testovi biokompatibilnosti u *in vitro* uslovima ukazali na dobru hemokompatibilnost i nizak stepen trombogenezе, odnosno tendencije ka formiranju krvnih ugrušaka. Ag/hitozan/alginat/PVP hidrogelovi [203] dobijeni radijacionom sintezom pokazali su značajna antibakterijska svojstva prema brojnim bakterijskim vrstama (*E. coli*, *S. aureus*, MRSA, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, vankomicin-rezistentnim vrstama roda *Enterococcus*). U istoj studiji [203], izvršeno je i poređenje antibakterijske aktivnosti i biokompatibilnosti novosintetisanih hidrogelova sa nanočesticama srebra sa nekoliko komercijalno dostupnih obloga za rane na bazi srebra, tj. ACTICOAT™, Algivon® i Suprasorb® A+Ag. Rezultati su pokazali da su komercijalni materijali ispoljili istu ili sličnu efikasnost prema bakterijskim infekcijama koje izazivaju sojevi *E. coli* i meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* – MRSA sojevi, ali da je istovremeno biokompatibilnost ovih komercijalnih obloga bila drastično lošija u poređenju sa novosintetisanim materijalom na bazi hitozana – vijabilnost L929, HaCaT i HDFa ćelija je čak bila niža i od 20-30 %. Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da postojeći komercijalni proizvodi imaju čitav niz nedostataka, te da stoga postoji ogroman potencijal poboljšanja njihovih svojstava, a na prvom mestu biokompatibilnosti, sintezom novih materijala za obloge za rane. Osim toga ovi rezultati su takođe pokazali da se poznata citotoksičnost nanočestica srebra može izbeći ili kontrolisati primenom manjih doza i pogodnim izborom polimerne matrice koja će pružiti mogućnost za njihovo kontrolisano otpuštanje [202], što je svakako važan faktor prilikom dizajniranja obloga za rane, koji može uticati kako na citotoksičnost i biokompatibilnost materijala, tako i na dugovečnost obloge za rane. Radijacione metode se, osim za sintezu nanočestica srebra, veoma često primenjuju i za simultano umrežavanje polimera, te se na taj način mogu dobiti hidrogelovi sintetskih polimera, kao što je polivinil-pirolidon (PVP) [208]. Umrežavanje putem izlaganja polimernog sola γ -zračenju se ostvaruje raskidanjem hemijskih veza unutar polimera pod dejstvom radijacije i nastajanja vrlo reaktivnih slobodnih radikala, koji zatim lančano reaguju sa polimernim lancima, čime se ostvaruje formiranje novih intermakromolekulskih hemijskih veza i nastajanje centara umreženja [8]. Variranjem doze zračenja i ostalih parametara, mogu se precizno kontrolisati kako stepen umreženja, tako i druga strukturna i fizičko-hemijska svojstva hidrogela [234], a hidrogelovi dobijeni ovim putem pokazuju odlična mehanička svojstva, čvrstoću i elastičnost [234]. Međutim, radijacioni postupci umrežavanja hidrogelova, kao i sinteze nanočestica srebra, iako prihvatljivi sa tačke gledišta biokompatibilnosti, svakako nisu jednostavni i zahtevaju specijalizovana postrojenja sa visokoobučanim osobljem, što može uticati na finansijske aspekte, a takođe predstavljaju bezbednosni rizik usled korišćenja izvora visokoenergetskog zračenja. Zato su interesantniji alternativni postupci koji podrazumevaju bezbedniji postupak, jeftiniju opremu i jednostavnije rukovanje njom. Jedna od takvih mogućnosti svakako je fotohemijska redukcija jona Ag^+ pod difuznim zračenjem sunčeve svetlosti, koja je primenjena za sintezu nanočestica

srebra u rastvoru hitozana, koji je nakon toga nanet na membrane polikaprolaktona (PCL) dobijene elektropredenjem, a ovako dobijeni hidrogelovi su takođe pokazali jaku antibakterijsku aktivnost, sa minimalnom inhibitornom koncentracijom (eng. *minimum inhibitory concentration*, MIC) od oko 20 µg/mL prema *E. coli*, a čak manje od 5 µg/mL prema *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *Staphylococcus sciuri* [201]. Osim toga, elektrohemijaska sinteza, kao ekološki prihvatljivija alternativa hemijskim metodama, takođe ima visok potencijal za primene u sintezi antibakterijskih nanočestica srebra. Reicha i saradnici [213] su izvršili sintezu nanočestica srebra u rastvoru CHI putem elektrohemijaskog rastvaranja žrtvujuće Ag anode (2 V, 6-24 h), praćenog redukcijom UV zračenjem (254 nm, 1-6 h). Tako dobijeni filmovi Ag/CHI su takođe pokazali dobra antibakterijska svojstva prema sojevima *P. aeruginosa* i *Bacillus thuringiensis* [213]. Međutim, iako je postupak jednostavan i ne zahteva primenu bilo kakvih hemikalija, jako duga vremena sinteze (12-30 h) mogu predstavljati problem usled povećanih troškova električne energije. Alternativu elektrohemijaskoj sintezi nanočestica srebra primenom žrtvujuće anode, mogle bi da predstavljaju metode zasnovane na naponostatskoj redukciji Ag⁺ jona unutar matrice hidrogela, koje su do sada korišćene za dobijanje Ag/PVP [62,63] i Ag/PVA [59,60] hidrogelova, jer podrazumevaju značajno kraće vreme sinteze i *in situ* redukciju u jednom koraku.

Na osnovu svih literaturnih podataka, izloženih u gornjem tekstu i u tabeli 2.1, može se zaključiti da je kombinacija hitozana, kao prirodnog, antibakterijskog polimera sa sintetskim biokompatibilnim polimerom PVA, i sa nanočesticama srebra kao jakim antibakterijskim sredstvom širokog spektra, optimalna za dobijanje hidrogelova za primene u obliku obloga za rane. Usled prisustva brojnih -OH i -NH₂ grupa, hitozan omogućava dobru stabilizaciju nanočestica srebra i njihovu imobilizaciju putem interakcija sa funkcionalnim grupama na lancu polimera a doprinosi i antibakterijskoj efikasnosti obloge za rane i potpomaže zarastanje. PVA takođe doprinosi stabilizaciji nanočestica, ali i omogućava formiranje umreženog hidrogela fizičkim putem, bez primene toksičnih reagenasa, dok nanočestice srebra pružaju izuzetnu mogućnost održavanja sterilnosti obloge i obezbeđuju antibakterijsko dejstvo prema velikom broju vrsta mikroorganizama tokom dugog perioda primene. U nekoliko studija je ispitivana i mogućnost primene obloga za rane na bazi hitozana u *in vivo* uslovima, koje su potvrdile da ovi materijali imaju sposobnost da ubrzaju i pospeše zarastanje rana [205,210,212,220,228,230], te samim tim pokazuju i odličan potencijal za navedene primene.

Tabela 2.1. Pregled istraživanja materijala za obloge za rane na bazi hitozana (samostalno ili u kombinaciji sa PVA i drugim polimerima) sa nanočesticama srebra, uz poređenje različitih metoda sinteze hidrogelova i nanočestica srebra, kao i antibakterijskih i ostalih bioloških svojstava

Hidrogel	Postupak sinteze hidrogela	Sinteza nanočestica srebra	Antibakterijska aktivnost	Drugi biološki testovi	Ref.
Hitozan	Zamrzavanje/odmrzavanje u 3 ciklusa, rastvor: hitozan+ LiOH+KOH+urea+H ₂ O	Hemijska sinteza pomoću Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ u hidrogelovima nabubrelim u AgNO ₃	3,0 g/ml AgNP – 99,86±0,12% i 99,94 ± 0,10% inhibicija rasta bakterijskih sojeva <i>E. coli</i> i <i>S. aureus</i>	Smanjenje obima rane >99% nakon 14 dana u <i>in vivo</i> uslovima	[212]
Hitozan/PVP mikrosfere	Mikročestice CHI/PVP dobijene ukapavanjem rastvora smeše polimera sa 0,3% epihlorohidrina u 2 M NaOH	Adsorpcija Ag ⁺ na CHI mikrosferama, hemijska redukcija pomoću Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	10 mm širina zone inhibicije prema <i>E. coli</i> i <i>S. aureus</i>	/	[223]
Hitozan/želatin	Fotoumrežavanje UV zračenjem uz prisustvo umreživača (PEG-diakrilat) i fotoinicijatora (2-hidroksi-2-metilpropiofenon)	Hemijska redukcija pomoću NaBH ₄ (<i>ex situ</i>), stabilizacija pomoću PVP	Širioka zona inhibicije prema <i>S. aureus</i> , bez antibakterijske aktivnosti prema <i>E. faecalis</i>	MTT test na humanim ćelijama dermalnih fibroblasta: Vijabilnost > 90% do 5 mL Ag	[200]
Tiolisani hitozan/dekstran modifikovan maleinskom kiselinom	Direktno formiranje hidrogela mešanjem rastvora polimera (CS-Nac i Dex-Ma)	Hemijska redukcija pomoću NaBH ₄ ; nakon toga mešanje sa rastvorom polimera	LIVE/DEAD test prema <i>S. aureus</i> i <i>P. aeruginosa</i> ; skoro 100% učinak nakon 1 h; sinergistički efekat AgNP@CNDM (762 µg AgNP)	Ubrzano zarastanje dijabetičkih rana u <i>in vivo</i> uslovima; vijabilnost ćelija NIH 3T3 >80%, niža citotoksičnost nego za čiste AgNP	[202]
Karboksimetil hitozan-PVA	Hemijsko umrežavanje rastvora polimera pomoću ECH (80 °C, 2 h)	Hemijska redukcija pomoću NaBH ₄ u hidrogelovima nabubrelim u AgNO ₃	Širine zona inhibicije do 20 mm prema <i>E. coli</i> i 23 mm prema <i>S. aureus</i>	/	[209]
Hitozan/PVA	Elektropredenje praćeno sušenjem preko noći (40 °C)	Hemijska redukcija pomoću mravlje kiseline u rastvoru polimera	Širine zona inhibicije: 11,78 mm - <i>E. coli</i> , 9,78 mm - <i>P. aeruginosa</i> , 8,25 mm - <i>S. aureus</i>	<i>In vivo</i> uslovi: ≈90 % smanjenje površine rane nakon 7 dana (kontrola - ≈50 % nakon 20 dana)	[224]
Hitozan	Formiranje gela dodatkom glicerola u rastvor polimera	Hemijska sinteza pomoću galne kiseline (<i>ex situ</i>); nakon toga mešanje sa rastvorom CHI	Sprečava nastanak biofilma MRSA (100 ppm AgNP, 6-log smanjenje broja bakterijskih ćelija) i <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1000 ppm AgNP, 3-log smanjenje broja bakterijskih ćelija)	Dozno-zavisna citotoksičnost prema humanim fibroblastima (75% vijabilnost ćelija za 500 ppm AgNP)	[225]
Hitozan	Formiranje gela dodatkom glicerola u rastvor polimera	Hemijska redukcija pomoću galne kiseline (<i>ex situ</i>), naknadno dodavanje u rastvor polimera	Snažna antibiofilmska aktivnost (smanjenje broja bakterijskih ćelija za 8-10 logaritamskih jedinica) prema kliničkim sojevima bakterija <i>S. epidermidis</i> , <i>A. baumannii</i> , vankomicin-rezistentnom soju <i>E. faecium</i> , uzorkovanih kod pacijenata sa centralnim venskim kateterima	Citotoksičnost (LIVE/DEAD test): >95 % preživljavanja humanih demalnih fibroblasta (izolovanih kod pacijenata)	[214]
Hitozan	Sinteza mikročestica hidrogela pomoću mikrofluida u jednom koraku (ekstruzijom rastvora polimera i AgNO ₃ u 20% NaOH)	Hemijska redukcija pomoću glukoze u rastvoru hitozana; istovremeno sa formiranjem gela	>90% smanjenje broja bakterijskih ćelija <i>E. coli</i> nakon 5 dana (15 mM AgNP); sinergistički efekat AgNP i hitozana	Vijabilnost ćelija MCF-7 i NIH 3T3 (MTT test): > 80% do koncentracije 1000 µg/mL	[226]
Hitozan/PVA	Elektropredenje rastvora hitozan/PVA/nanočestice Ag; naknadno umrežavanje dobijenih vlakana pomoću glutaraldehida	Hemijska redukcija pomoću glukoze u rastvoru hitozana (3–12 h, 25–95 °C)	Baktericidno dejstvo prema <i>E. coli</i> (100 % smanjenje broja bakterijskih ćelija nakon 12 h inkubacije); pojačan antibakterijski efekat sa povećanjem sadržaja hitozana i nanočestica Ag u hidrogelovima	/	[20]

Tabela 2.1. (nastavak)

Hidrogel	Postupak sinteze hidrogela	Sinteza nanočestica srebra	Antibakterijska aktivnost	Drugi biološki testovi	Ref.
Hitozan	Formiranje gela dodatkom propilen-glikola u rastvor polimera sa nanočesticama srebra	Biosinteza pomoću biomase plesni <i>F. verticillioides</i> ASU1; naknadno dodavanje AgNP u rastvor hitozana	MBC: 7,50, 3,75 i 7,50 µg/mL prema MSSA, MRSA i <i>E. coli</i> , redom (10 mM AgNP); Širine zona inhibicije: ≈20 mm (MSSA, MRSA), ≈15 mm (<i>E. coli</i>) za CHI-AgNP hidrogel	/ [Na-CMC – 100% zarastanje nakon 10 dana u <i>in vivo</i> uslovima]	[227]
Hitozan; PVA (zasebno)	Bez umrežavanja, izlivanje filmova CHI-Ag (16 h, 60 °C) i PVA-Ag (4 h, 60 °C)	Biosinteza (<i>ex situ</i>) pomoću <i>Enterobacter cloacae</i> , naknadno dodavanje u rastvor polimera	Širine zona inhibicije: ≈21-33 mm (PVA-Ag), odn. ≈8-14 mm (CHI-Ag), prema različitim sojevima vrsta <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> Antibiofilmska aktivnost: 90-92 % prema <i>S. epidermidis</i> , 76-78 % prema <i>S. aureus</i>	MTT test: ≈100 % preživljavanja ćelija humanog kancera jetre; najniži stepen citotoksičnosti PVA-Ag nanokompozita	[229]
Hitozan-g-poliakril-amid	Graft-kopolimerizacija hitozana i akrilamida praćena dehidratacijom gela u etanolu; hidroliza u 1 N NaOH (2h, 95 °C) i sušenje (60 °C)	Biosinteza pomoću ekstrakta biljke <i>Curcuma longa</i> unutar hidrogela nabubrelog u rastvoru prekursora AgNO ₃	>98-99% smanjenje broja bakterijskih ćelja <i>E. coli</i> i <i>S. aureus</i> nakon 24 h	/	[206]
Hitozan	Bez umrežavanja, izlivanje filmova praćeno liofilizacijom (48 h, -20 °C)	Biosinteza - redukcija i stabilizacija pomoću polisaharida <i>Sanghuangporus sanghuang</i> ; naknadno dodavanje u rastvor CHI	70-80% smanjenje broja bakterijskih ćelja <i>E. coli</i> i <i>S. aureus</i> (25 h); uništenje morfologije i ćelijske strukture (SEM mikroskopija)	Vijabilnost ćelija L929 >80% (24 h); poboljšano zarastanje rana u <i>in vivo</i> uslovima, u poređenju sa čistim CHI	[228]
Hitozan/alginat- <i>Aloe vera</i>	Bez umrežavanja, izlivanje filmova praćeno liofilizacijom (24 h, 0 °C)	Komercijalne; inkorporacija u hidrogel bubrenjem u rastvoru nanočestica Ag	Širine zona inhibicije: ≈27 mm prema <i>P. aeruginosa</i> i <i>S. aureus</i>	/	[204]
Hitozan i siloksan (intrapenetrirajuća mreža)	Hemijsko katjonsko umrežavanje pomoću TEOS; izlivanje filma i sušenje (40 °C)	Direktna (<i>in situ</i>) redukcija u rastvoru polimera	Test vezivanja kristalvioleta prema <i>E. coli</i> – 80% smanjenje vezivanja, u poređenju sa čistim CHI	/	[219]
Hitozan-L-glutaminska kiselina/hijaluronska kiselina	Rastvaranje hitozana u rastvoru L-glutaminske kiseline; umrežavanje dodatkom hijaluronske kiseline	Direktna (<i>in situ</i>) redukcija u rastvoru polimera	Širine zona inhibicije: 15-20 mm prema <i>S. aureus</i> i 20-25 mm prema <i>E. coli</i>	Vijabilnost ćelija L929 75-80% (24 h) u <i>in vitro</i> uslovima; poboljšano zarastanje rana u <i>in vivo</i> uslovima	[205]
Hitozan-PEG	Hemijsko umrežavanje blende CHI-PEG pomoću glutaraldehida	Direktna (<i>in situ</i>) redukcija u rastvoru polimera	Širine zona inhibicije >20 mm; 100% smanjenje broja bakterijskih ćelja <i>E. coli</i> i <i>S. aureus</i> (24 h); sinergistički efekat AgNP i hitozana	Ubrzano zarastanje rana u <i>in vivo</i> uslovima; 100% smanjenje obima rane nakon 12 dana	[220]
Hitozan /sericin	Priprema sericin-CHI-Ag mikročestica liofilizacijom, nakon toga su dodate u poliakrilatni hidrogel	Direktna (<i>in situ</i>) redukcija u rastvoru polimera (24 h)	Širine zona inhibicije: >15 mm prema <i>S. aureus</i> i >20 mm prema <i>E. coli</i>	60% smanjenje obima rane nakon 14 dana u <i>in vivo</i> uslovima	[230]
Hitozan	Direktno umrežavanje hitozana nakon dodavanja rastvora AgNO ₃	Direktna (<i>in situ</i>) redukcija hitozanom u rastvoru polimera (sobna temp., 5 min–24 h)	Širine zona inhibicije ≈10 mm prema <i>Bacillus subtilis</i> i <i>E. coli</i> ; značajno smanjenje broja bakterijskih ćelija (≈90 %) nakon 24 h inkubacije prema istim bakterijskim sojevima	/	[32]
Hitozan	Bez umrežavanja, izlivanje filmova CHI-Ag (18 h, 60 °C), neutralizacija pomoću NaOH	Direktna (<i>in situ</i>) redukcija hitozanom u rastvoru polimera (12 h, 95 °C)	MIC=10 µg ml ⁻¹ ; >99 % smanjenje broja bakterijskih ćelija nakon 5 min prema <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> i <i>E. coli</i> ; koncentracija nanočestica Ag: 40 µg ml ⁻¹ ; baktericidno dejstvo CHI-Ag filmova i do 20 dana (trajni efekat)	/	[30]

Tabela 2.1. (nastavak)

Hidrogel	Postupak sinteze hidrogela	Sinteza nanočestica srebra	Antibakterijska aktivnost	Drugi biološki testovi	Ref.
Hitozan/PVA	Elektropredenje praćeno termiĉkim tretmanom (16 h, 130 °C); umreŹavanje glutaraldehidom (sobna temp., 6 h)	Redukcija hitozanom uz istovremeno formiranje hidrogelnih vlakana elektropredenjem i termiĉkim tretmanom	Potpuna redukcija bakterijskih ćelija <i>E. coli</i> nakon 6 h inkubacije sa hidrogelovima sa nanoćesticama Ag	/	[215]
Hitozan	Izliavanje filmova (90 min, 100 °C) uz dodatak glicerina	Redukcija hitozanom uz mikrotalasno zraćenje	Širine zona inhibicije: 1,89–2,57 mm prema <i>E. coli</i> ; 1,04–1,23 mm prema <i>S. aureus</i>	/	[233]
Hitozan/PVA	Mikrotalasno zraćenje, zatim liofilizacija	Redukcija hitozanom uz mikrotalasno zraćenje	Širine zona inhibicije: 29 mm prema <i>P. aeruginosa</i> ; 23–29 mm prema <i>S. aureus</i>	MTT test: vijabilnost L929 ćelija 70-92 % u zavisnosti od koncentracije Ag; Zarastanje rana u <i>in vivo</i> uslovima: potpuna reepitelizacija nakon 15 dana, smanjena inflamacija kod rana tretiranih hidrogelovima	[210]
Hitozan/alginat/PVP	UmreŹavanje gama-zraćenjem	Redukcija gama-zraćenjem (istovremeno umreŹavanje i redukcija Ag ⁺ jona iz prekursora AgNO ₃ u rastvoru polimera)	Širine zona inhibicije (15 mM Ag): <i>E. coli</i> – 1 mm, <i>S. aureus</i> – 1 mm, MRSA – 0 mm, <i>P. aeruginosa</i> – 3,9 mm, <i>A. baumannii</i> – 2,3 mm, <i>S. epidermidis</i> – 1,8 mm, <i>E. faecalis</i> – 1 mm, VRE – 3,5 mm; <i>E. coli</i> i MRSA: >99% smanjenja broja bakterijskih ćelija nakon 24 h (10 mM i 15 mM Ag)	MTT test: vijabilnost ćelija L929, HDFa, HaCaT >100 % do 10 mM Ag (hidrogel od 15 mM je citotoksiĉan, ≈50% preŹivljavanje); vijabilnost ćelija u kontaktu sa komercijalnim oblogama (ACTICOAT™, Algivon®, Suprasorb® A + Ag) <60-70%, u nekim sluĉajevima i >30 %	[203]
Hitozan/PVA	UmreŹavanje glutaraldehidom, praćeno zamrzavanjem i odmrzavanjem (2 h) i sušenjem na sobnoj temp. (72 h)	Redukcija gama-zraćenjem u osušenim kserogelovima (prekursor AgNO ₃ dodat u rastvor polimera pre sinteze gela)	Antibakterijska i antifungalna svojstva – širine zona inhibicije: 23-28 mm <i>E. coli</i> , 21-27 mm <i>S. aureus</i> , 11-15 mm <i>Aspergillus flavus</i> , 13-16 mm <i>Candida albicans</i>	Hemokompatibilnost: smanjena adhezija krvnih ćelija, niŹi stepen trombogeneze, blago hemolitiĉko dejstvo (hemolitiĉki indeks ≈2 %); Citotoksiĉnost (DET test, tripan-plavo) – 100 % preŹivljavanje EAC ćelija do koncentracije 5 mg ml ⁻¹	[216]
Hitozan/PVA	UmreŹavanje gama-zraćenjem	Redukcija gama-zraćenjem (prekursor AgNO ₃ dodat u rastvor polimera pre sinteze gela)	/	/	[221]
Hitozan-PCL	PCL membrane dobijene elektropredenjem, zatim uronjene u rastvor CHI-Ag, sušenje 24 h	Fotohemijska redukcija pod difuznim zraćenjem sunĉeve svetlosti	MIC: ≈20 µg/mL prema <i>E. coli</i> ; <5 µg/mL prema <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. sciuri</i>	/	[201]
Hitozan	Bez umreŹavanja, izliavanje filmova CHI-Ag (48 h, 50 °C)	Elektrohemijska sinteza: elektrohemijsko rastvaranje Źrtvujuće Ag anode u rastvoru CHI (2 V, 6-24 h), praćeno redukcijom UV zraćenjem (254 nm, 1-6 h)	Širine zona inhibicije: 27-55 mm prema <i>P. aeruginosa</i> , 30-47 mm prema <i>Bacillus thuringiensis</i>	/	[213]

skraćenice: AgNP- nanoćestice srebra; CHI- hitozan; PVA- polivinil-alkohol; PVP- polivinil-pirolidon; PEG- polietilen-glikol; PCL- polikaprolakton; ECH- epihlorohidrin (umreŹivaĉ); TEOS- tetraetoksisilan (umreŹivaĉ); MSSA- meticilin-osetljivi sojevi *Staphylococcus aureus*; MRSA- meticilin-rezistentni sojevi *Staphylococcus aureus*; VRE- vankomicin-rezistentne vrste roda *Enterococcus*; MTT- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolijum-bromid; Na-CMC- natrijum-karboksimetil celuloza; L929- miŹji fibroblasti subkutanog vezivnog tkiva; MCF-7- ćelije kancera dojke; NIH 3T3- miŹji embrionski fibroblasti; MRC-5- plućni fibroblasti humanog porekla; HDFa- primarni dermalni fibroblasti humanog porekla; HaCaT- humani keratinociti; EAC – ćelije Erlihovog ascitnog karcinoma; MIC- minimalna inhibitorna koncentracija

2.4 FIZIČKO-HEMIJSKE I BIOLOŠKE METODE KARAKTERIZACIJE HIDROGELOVA

Novi materijali za biomedicinske primene podležu zahtevima za detaljnom karakterizacijom, kako u pogledu njihove strukture, fizičko-hemijskih i mehaničkih svojstava, tako i utvrđivanja biološke aktivnosti, tj. antibakterijskih svojstava i biokompatibilnosti u *in vitro* i *in vivo* uslovima. Strukturna karakterizacija hidrogelova podrazumeva ispitivanje nastajanja polimerne mreže, stepena umreženja, prisustva funkcionalnih grupa i njihovih interakcija putem kojih nastaje matrica hidrogela, ali svakako i ispitivanje morfologije hidrogela, uključujući i poroznost. Za ovakve vrste ispitivanja koriste se standardne metode hemijske analize, kao što su spektroskopske metode (npr. infracrvena i Ramanova spektroskopija), rendgenska difrakcija (ukoliko je potrebna analiza kristalne strukture), rendgenska fotoelektronska spektroskopija (za ispitivanje površinskog sastava elemenata i strukturnih veza u samom materijalu), kao i brojne mikroskopske tehnike, od optičke, do skenirajuće i transmisione elektronske mikroskopije [57,212,224,235,236]. Međutim, specifični zahtevi izabrane oblasti primene novosintetisanog materijala zahtevaju svakako i detaljnije analize u pogledu ciljnih osobina, direktno vezanih za datu primenu. U slučaju obloga za rane, neka od osnovnih svojstava koja treba ispitati (povezana, naravno, sa funkcionalnim zahtevima koje materijali za obloge za rane moraju da ispune, a o kojima je bilo reči u prethodnom tekstu (potpoglavlje 2.2)), obuhvataju sposobnost apsorpcije eksudata i sposobnost održavanja lokalne vlažnosti (odn. sposobnost bubrenja), permeabilnost za gasove, mehanička i termička svojstva, adhezivnost, sposobnost otpuštanja aktivne supstance, dok su među biološkim svojstvima ključne interakcije sa zdravim tkivima i ćelijama, tj. biokompatibilnost, kao sterilnost i barijerna svojstva prema prodiranju različitih vrsta patogenih bakterija, odnosno antibakterijska svojstva [108,213,214,224,229,237].

Pored toga, izbor komponenata, odnosno sastava polimera i inkorporisane aktivne supstance unutar obloga za rane, diktira i potrebu za posebnim fizičko-hemijskim karakterizacijama. Recimo, kada su u pitanju nanočestice srebra, neophodno je izvršiti dodatnu karakterizaciju materijala kako bi se potvrdila inkorporacija, kao i utvrdile njihove dimenzije, oblik, i distribucija, odnosno uniformnost raspodele unutar matrice hidrogela. Struktura, dimenzije i svojstva nanočestica se generalno određuju pomoću transmisione elektronske mikroskopije [212,225,238–241], dok se njihove dimenzije i raspodela dimenzija precizno mogu odrediti metodom dinamičkog rasipanja svetlosti u rastvoru [236,242,243].

Otpuštanje aktivne supstance u *in vitro* uslovima, tj. pod simuliranim fiziološkim uslovima svakako je jedna od važnih karakteristika materijala za obloge za rane, jer kontrolisano otpuštanje određuje i osnovnu antibakterijsku funkciju aktivnih obloga. Kada je u pitanju otpuštanje srebra, generalno ne postoje standardizovani uslovi pod kojima bi trebalo izvoditi ovakve eksperimente, mada su neki od osnovnih zahteva korišćenje nekog fiziološki relevantnog medijuma, koji bi trebalo da sadži sastav soli sličan krvnoj plazmi, limfi ili drugim telesnim tečnostima, kao i kontrolisana stabilna pH vrednost (obično 7,4), i temperatura (37 °C). Merenja otpuštanja srebra obično su praćena i još jednom dodatnom komplikacijom, a to je veoma nizak proizvod rastvorljivosti srebro-hlorida ($\approx 1,8 \cdot 10^{-10}$), koji lako pada kao talog u svim rastvorima koji sadrže hloridne i jone srebra. Kako gotovo svi fiziološki relevantni medijumi sadrže značajne koncentracije hloridnih jona, ovaj problem je svakako neophodno uzeti u obzir prilikom dizajna eksperimenta otpuštanja. Neke od strategija obuhvataju uračunavanje nastajanja taloga AgCl u sam eksperiment, i njegovo rastvaranje pre nego što će se određivati koncentracija Ag⁺ jona [244], ili pak priprema modifikovanih puferskih medijuma koji neće sadržati hloridne jone, kao što je recimo modifikovani fosfatni puffer koji se sastoji od KH₂PO₄ i K₂HPO₄ [10,60,63]. Većina hidrogelova sa nanočesticama srebra ispoljava karakteristične oblike profila otpuštanja, sa dobro poznatim efektom „naglog otpuštanja” u početnom periodu (koji može trajati duže ili kraće vreme, u zavisnosti od strukture polimerne matrice, ali i od uslova pod kojima se otpuštanje izvodi), praćenim dugotrajnijim periodom sporijeg otpuštanja i dostizanjem platoa u određenom trenutku

[57–60,63]. Ovaj efekat naglog početnog otpuštanja svakako je povoljan jer omogućava dostavljanje velike količine aktivne supstance na samom početku lečenja rane, što obezbeđuje inicijalnu sterilnost obloge i sprečava prodiranje bakterija, kao i njihovo razmnožavanje na mestu rane i formiranje biofilma, dok, sa druge strane, kasnije lagano otpuštanje obezbeđuje održavanje antibakterijskih svojstava obloge tokom dužeg vremenskog perioda [245,246]. Takođe, trajanje početnog perioda „naglog” otpuštanja, svakako je jedan od faktora koji uslovljava trajnost obloge, odnosno učestalost njene zamene i potrebe za ponovnim previjanjem, pa je svakako poželjno da ovaj period traje što duže jer se time smanjuje potreba za čestim zamenama obloge, čime se rana može oštetiti ili iritirati. U sučaju, recimo, hidrogelova polivinil-pirolidona sa nanočesticama srebra [63], kao i srebro/polivinil-alkohol i srebro/polivinil-alkohol/grafen hidrogelova [58–60,63], završetak perioda naglog otpuštanja i dostizanje platoa je primećeno u prvih 3-4 dana, što ujedno predstavlja i rok trajanja obloge, odn. period nakon koga bi oblogu trebalo zameniti [10]. S druge strane, naravno, uvek se mora uzeti u obzir potencijalna citotoksičnost nanočestica srebra, koja je dozno-zavisna, pa se i koncentracija otpuštenog srebra u svakom trenutku mora održavati ispod nivoa citotoksičnosti, što je posebno važno u početnom periodu naglog otpuštanja. Pored interakcija nanočestice-hidrogel, na ponašanje prilikom otpuštanja značajno može uticati i raspodela nanočestica srebra unutar polimerne matrice. Očigledno je da se brže otpuštaju nanočestice koje se nalaze blizu spoljašnje, tj. granične površine hidrogela, jer će one ranije doći u kontakt sa medijumom i njihova će difuzija biti olakšana u odnosu na nanočestice koje se nalaze u unutrašnjosti samog hidrogela, što verovatno doprinosi i efektu naglog otpuštanja. S druge strane, sa stanovišta fizičko-hemijskih svojstava samog materijala, pogodnije je da nanočestice budu uniformno distribuisane po čitavoj zapremini hidrogela, jer se time postiže homogenost svih svojstava, uključujući svakako i biološka svojstva i otpuštanje. Prilikom bilo koje *in situ* sinteze nanočestica, pa tako i prilikom njihove elektrohemije sinteze, teško je pouzdano utvrditi raspodelu nanočestica srebra po zapremini hidrogela. Daleko je jednostavnije odrediti njihove dimenzije i raspodele dimenzija, ali prostorna uniformnost bi se morala posebno ispitivati. Za vizualizaciju i ispitivanje svojstava nanočestica neprikosnovena je tehnika transmisione elektronske mikroskopije (TEM) sa detektorima visoke rezolucije, kojom se mogu snimiti nanočestice veoma sitnih dimenzija, čak i do 2-3 nm [247]. Međutim, ovakva karakterizacija je samo ilustrativna, ukoliko se uzorci ne pripreme na takav način da bi dobijene mikrofografije mogle da se smatraju reprezentativnim za prostornu raspodelu nanočestica srebra unutar hidrogela. Dobijanje poprečnih preseka poroznih hidrogelnih matrica sa veoma velikom količinom tečnosti je poseban izazov prilikom pripreme uzoraka za transmisionu elektronsku mikroskopiju, jer primena visokog vakuuma unutar samog instrumenta nalaže potrebu da se uzorci potpuno osuše, a takođe je neophodno uzorke iseći dovoljno tanko, kako bi bili propusni za elektronski snop. Upravo ovaj korak je i ključan kod pripreme uzoraka za TEM, jer se sušenjem hidrogelova pod „uobičajenim” uslovima, tj. slobodnim nekontrolisanim sušenjem bilo na sobnoj bilo na povišenoj temperaturi, narušava porozna struktura umrežene polimerne matrice. Posebno u slučaju hidrogelova, kada je rastvarač voda, zbog visokog površinskog napona ove tečnosti dolazi do povećanja napreznja polimerne matrice, pa samim tim i do narušavanja strukture pora u polimernoj mreži. Zato se za uklanjanje rastvarača iz hidrogelova najčešće koristi metoda liofilizacije [248,249], mada se pokazalo da čak i ovakvi postupci mogu uticati na strukturu polimerne matrice [250]. Najnaprednije tehnike sušenja podrazumevaju natkritično sušenje, pri čemu se rastvarač (voda) uklanja direktnim prevođenjem u gasovito stanje pod uslovima temperature i pritiska iznad trojne tačke, što omogućava izbegavanje prelaza granica faza i obezbeđuje najbolje moguće očuvanje strukture hidrogelne mreže [251,252]. Osim sušenja, još jedan od izazova prilikom pripreme uzoraka za TEM analizu je sečenje dovoljno tankih komada. Prilikom sečenja kserogelova na dimenzije tanke svega nekoliko desetina nanometara, pomoću uobičajenih metoda kao što je mikrotomija ili sečenje jonskim snopom, može se značajno oštetiti struktura hidrogela [253], pa se u poslednje vreme istraživači češće okreću naprednim tehnikama poput usmerenog jonskog snopa (eng. *focused ion beam*, FIB) koja omogućava izbegavanje većine

problema vezanih za pripremu mekih polimernih uzoraka za transmisionu elektronsku mikroskopiju [253,254].

Ponašanje prilikom bubrenja i moć sorpcije tečnosti, još jedno je važno svojstvo hidrogelnih materijala za obloge za rane, koje je u direktnoj vezi sa njihovom sposobnošću da održavaju vlažnost u okolini rane, apsorbuju i uklanjaju eksudate rana i delove nekrotičnog tkiva, ali potpomaže i sprečavanje prekomerne adhezije obloge za novonastalo tkivo, kao i termoregulaciju okoline rane, jer hidrogelne obloge koje sadrže tečnost mogu da hlade ranu, čime se postiže blagi analgetski efekat i povećava komfor pacijenta [69]. Zato su eksperimenti ispitivanja bubrenja veoma važni. Kao i otpuštanje srebra, kinetika bubrenja se može pratiti u različitim fiziološki relevantnim medijumima, a često se, pored standardnih fizioloških uslova (pH 7,4; 37°C) ispituje i uticaj pH i temperature [5,68,255,256]. Najčešće se na osnovu dobijenih izoterma bubrenja ispituju difuziona svojstva medijuma za bubrenje, a koeficijent difuzije (D_{medium}) se obično određuje fitovanjem eksperimentalnih rezultata pomoću teorijskih literaturnih modela. Jedan od najčešće primenjivanih modela je aproksimacija ranog vremena (eng. *early-time approximation*, ETA) [63,257], na osnovu koje se D_{medium} računa iz nagiba redukovane sorpcione krive, tj. zavisnosti količine apsorbovanog medijuma od kvadratnog korena vremena u početnom periodu bubrenja. Pomenuti ETA model takođe podleže određenim modifikacijama u zavisnosti od geometrije hidrogela, pa su tako Ritger i Peppas [258] predložili različite jednačine ETA modela za bubrenje tankih filmova i cilindričnih diskova hidrogelova nezanemarljive debljine, koje su izvedene iz drugog Fikovog zakona difuzije uz određene polazne pretpostavke i uvođenje graničnih uslova. Pored ETA modela, često se primenjuje i aproksimacija kasnog vremena (eng. *late-time approximation*, LTA), koja obično važi za poslednji period od oko 40 % bubrenja [257,259,260], dok se Eters aproksimacija može primeniti na čitavu izotermu bubrenja u svim periodima [259], te se i vrednosti D_{medium} dobijene na osnovu nje mogu smatrati prosečnim za proces bubrenja od početka do kraja. Dobijene vrednosti D_{medium} zavise kako od vrste medijuma, korišćenog za bubrenje, tako i od karakteristika same polimerne matrice, uključujući vrstu polimera, način i gustinu umrežavanja, itd. Na primer, vrednosti koeficijenta difuzije medijuma za hidrogelove PVP su bile najviše (reda veličine $\approx 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) [63], dok su za polimerne matrice hidrogelova na bazi PVA dobijene vrednosti $\approx 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [60], što ukazuje na to da najveću brzinu bubrenja pokazuju radijaciono umreženi hidrogelovi PVP, dok PVA utiče na usporavanje kinetike bubrenja polimerne matrice hidrogela.

Zahtevi u pogledu mehaničkih svojstava materijala za obloge za rane mogu se čak i dosta razlikovati u zavisnosti od njihove konkretne primene, vrste rane koja se leči, funkcije obloge (samostalno ili uz dodatno previjanje), kao i potrebe za trajnošću same obloge, koja se svakako može razlikovati u slučaju lečenja hroničnih i akutnih rana. U svakom slučaju, obloge za rane bi trebalo da poseduju zadovoljavajuću mehaničku čvrstoću koja bi im omogućila očuvanje povoljnih svojstava tokom čitavog perioda primene, ali svakako i određeni stepen elastičnosti, kako bi se obloga mogla prilagoditi obliku rane i kako bi bilo lakše njom rukovati. Takođe bi bilo poželjno da njena mehanička svojstva budu što sličnija karakteristikama epidermisa i drugih tkiva kože u *in vivo* uslovima, kako bi se izbegli negativni uticaji obloge za ranu i opterećenje novonaraslog tkiva usled razlike u modulu elastičnosti obloge i same kože [261]. Ispitivanja torzije uzoraka ljudske kože različitog pola i godišta u *in vivo* uslovima, ukazala su da se Jungov moduo elastičnosti zdrave kože kreće u opsegu 0,42-0,85 MPa, dok je povećanje vrednosti ovog modula (koje je praćeno porastom krivosti, odnosno smanjenjem elastičnosti kože) primećeno u uzorcima kože koji potiču od pacijenata starijih starosnih grupa [262]. Mehanička svojstva hidrogelnih materijala za obloge za rane se najčešće ispituju u *in vitro* uslovima, pomoću univerzalnih testova istezanja, torzije, kompresije, itd. [58,263], ali je takođe za ove svrhe vrlo rasporostranjena primena bioreaktora, kao *in vitro* modela koji su u stanju da imitiraju *in vivo* uslove dinamičke kompresije [10,57,63,264], pri čemu se dobijaju podaci o biomehaničkim svojstvima materijala pod simuliranim fiziološkim uslovima.

Prilikom ispitivanja bioloških svojstava biomedicinskih materijala u *in vitro* uslovima, najčešće je neophodno utvrditi njihovu biokompatibilnost, odnosno netoksičnost prema zdravim tkivima i ćelijama. U ove svrhe razvijeni su i standardizovani brojni testovi i eksperimentalne procedure, koji se uglavnom zasnivaju na kvantitativnom određivanju vijabilnosti ćelijskih linija u prisustvu, odnosno nakon dugotrajnog ili kratkotrajnog kontakta sa uzorcima ispitivanog materijala. Svi testovi ovog tipa se zasnivaju na merenju nekog od osnovnih metaboličkih procesa ili enzimske aktivnosti, koje mogu poslužiti kao markeri vijabilnosti ćelija, pri čemu procedure podrazumevaju „bojenje” vijabilnih ćelija inkubacijom sa određenim hemijskim jedinjenjima koja imaju svojstvo fluorescencije i podležu reakcijama pod dejstvom ćelijskog metabolizma, kao što su recimo redukcija resazurina ili tetrazolijuma [265]. Upravo jedan od ovakvih testova, i svakako jedan od najzastupljenijih, je i MTT test, koji je ime dobio po organskoj soli 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid (MTT), koja se koristi za kvantifikaciju ćelijske vijabilnosti u ovom testu. Procedura je zasnovana na redukciji MTT soli unutar mitohondrija zdravih ćelija, pri čemu kao osnovni produkt nastaje formazan, koji je obojen ljubičasto i nerastvoran, te se akumulira unutar ćelije [265]. Zahvaljujući tome, kolorimetrijskim merenjem intenziteta obojenja na oko 570 nm određuje se broj vijabilnih ćelija u datom uzorku.

Pored biokompatibilnosti, ako su u pitanju materijali sa aktivnom antibakterijskom funkcijom, takođe se u *in vitro* uslovima ispituje i njihova antibakterijska efikasnost, putem određenih kvantitativnih i semikvantitativnih procedura, među kojima su najčešće primenjivani agar-difuzioni test i kvantitativni test kojim se prati kinetika antibakterijske aktivnosti uzoraka u suspenziji koja sadrži ispitivani soj bakterije. Agar difuzioni test se izvodi tako što se na hranljivu agarnu podlogu, zasejanu sa bakterijskom kulturom, smeštaju uzorci ispitivanog materijala, i nakon određenog perioda (najčešće 24 h) inkubacije na 37 °C, mere se širine zona inhibicije oko svakog uzorka, na osnovu kojih se mogu dobiti semi-kvantitativni podaci o jačini antibakterijske aktivnosti datog uzorka [266–268]. Zonama inhibicije nazivaju se delovi agarne podloge u kojima nije došlo do rasta ispitivanog soja bakterije [266,268], a njihove dimenzije su, između ostalog, i u korelaciji sa sposobnošću ispitivanog materijala da otpušta inkorporisani antibakterijski agens [267,268]. Ispitivanjem kinetike antibakterijske aktivnosti, s druge strane, mogu se dobiti precizniji kvantitativni podaci o vijabilnosti bakterijskih ćelija, odnosno o stepenu njihovog preživaljavanja, za vreme kontakta sa ispitivanim materijalom tokom različitog perioda inkubacije [266,268]. Brojne su vrste i sojevi bakterija koje se koriste tokom ovakvih ispitivanja, a izbor najviše zavisi od ciljne oblasti primene datog materijala. Kada su u pitanju aktivne obloge za rane, dve najčešće ispitivane vrste su Gram-pozitivni *Staphylococcus aureus*, koji je i jedan od najčešćih uzročnika kožnih infekcija [269], kao i Gram-negativna vrsta *Escherichia coli*. Pokazalo se da antibakterijska svojstva materijala koji sadrže aktivne supstance na bazi srebra umnogome zavise od vrste, strukture i oblika samog materijala, kao i od kinetike otpuštanja srebra i efikasnosti interakcija sa bakterijskim kulturama [168,183].

3 CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada je elektrohemijaska sinteza srebro/polivinil-alkohol/hitozan (Ag/PVA/CHI) i srebro/polivinil-alkohol/hitozan/grafen (Ag/PVA/CHI/Gr) nanokompozitnih hidrogelova sa različitim sadržajima hitozana. Karakterizacija dobijenih nanokompozitnih hidrogelova biće izvršena u cilju ispitivanja potencijalne biomedicinske primene u obliku aktivnih obloga za rane koje nisu toksične i imaju antibakterijska svojstva, sledećim metodama:

- (1) Gravimetrijsko određivanje sadržaja gel-frakcije u dobijenim umreženim hidrogelovima,
- (2) UV-vidljiva spektroskopija za dokazivanje prisustva nanočestica srebra,
- (3) Skenirajuća elektronska mikroskopija (FE-SEM) sa energetsom disperzionom spektroskopijom (EDS) za ispitivanje morfologije i površinskog sastava hidrogelova,
- (4) Dinamičko rasipanje svetlosti (DLS), kojim će se odrediti srednji prečnik i statistička raspodela dimenzija nanočestica srebra u polimernoj matrici,
- (5) Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM), za ispitivanje oblika, strukture i dimenzija nanočestica srebra,
- (6) Rendgenska fotoelektronska spektroskopija (XPS) za identifikaciju prisutnih elemenata,
- (7) Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR) za određivanje strukture hidrogelova i prisutnih funkcionalnih grupa,
- (8) Ramanova spektroskopija za dokazivanje prisustva grafena i ispitivanje strukture hidrogelova,
- (9) Ciklična voltometrija (CV) za ispitivanje redoks reakcija u hidrogelovima,
- (10) Termogravimetrijska analiza (TGA) i diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) za određivanje termičke stabilnosti dobijenih hidrogelova,
- (11) Testovi istezanja u cilju određivanja mehaničkih svojstava,
- (12) Gravimetrijska metoda praćenja sorpcije kako bi se utvrdio ravnotežni stepen bubrenja hidrogelova na 37 °C u fosfatnom puferu,
- (13) Atomska apsorpciona spektroskopija (AAS) za praćenje kinetike otpuštanja srebra u fiziološkim uslovima (37 °C, fosfatni pufer) tokom 28 dana,
- (14) Fitovanje dobijenih profila bubrenja i otpuštanja srebra različitim teorijskim difuzionim i kinetičkim modelima kako bi se ispitali mehanizmi i kinetika ovih procesa,
- (15) Agar-difuzioni test i određivanje kinetike antibakterijske aktivnosti, za ispitivanje antibakterijske aktivnosti nanokompozitnih hidrogelova,
- (16) MTT i DET testovi citotoksičnosti za utvrđivanje biokompatibilnosti i citotoksičnosti nanokompozitnih hidrogelova.

4 EKSPERIMENTALNI DEO

4.1 MATERIJAL

U okviru eksperimentalnog rada su korišćene sledeće hemikalije (čistoće *pro analysi*): potpuno hidrolizovani polivinil-alkohol (prah, molarne mase 70-100 kDa, Sigma Aldrich, SAD); hitozan (prah, srednje molarne mase 190-310 kDa, stepena deacetilacije 75-85 %, Sigma Aldrich, SAD); kalijum-nitrat (Centrohem, Srbija); srebro-nitrat (Sigma Aldrich, SAD); glacijalna sirćetna kiselina (Beta Hem, Srbija); azotna kiselina (Centrohem, Srbija); KH_2PO_4 (Centrohem, Srbija) i K_2HPO_4 (Sigma Aldrich, SAD); grafen (nanoprah, čistoće 99,2%, Graphene Supermarket, SAD). Za ispitivanje antibakterijskih svojstava hidrogelova korišćen je sledeći materijal: KH_2PO_4 (Centrohem, Srbija), K_2HPO_4 , NaCl (Sigma Aldrich, SAD), tripton, agar, ekstrakt kvasca, hranljivi bujon (Torlak, Srbija), kao i Gram-negativni bakterijski soj *Escherichia coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection, SAD) i Gram-pozitivni soj *Staphylococcus aureus* TL (Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd). Za sejanje i uzgajanje ćelijskih kultura i ispitivanje citotoksičnosti, korišćene su ćelijske linije humanih plućnih fibroblasta MRC-5 (ATCC[®] CCL-171[™]) i L929 (ATCC[®] CRL-6364[™]), kao i sledeće hemikalije i medijumi: MTT tetrazolijumova so, medijum DMEM (eng. *Dulbecco Modified Eagle's Medium*), EDTA, fetalni teleći serum i rastvor antibiotika i antimikotika (Sigma Aldrich, SAD). Svi rastvori su pripremani pomoću ultra-čiste dejonizovane vode (18 M Ω , Millipore, SAD).

4.2 PRIPREMA KOLOIDNIH DISPERZIJA POLIVINIL-ALKOHOL/HITIZAN I POLIVINIL-ALKOHOL/HITIZAN/GRAFEN

Koloidne disperzije polivinil-alkohol/hitozan su pripremljene rastvaranjem praha PVA u destilovanoj vodi na 90 °C, dok je prah hitozana rastvoren u 2 vol.% rastvoru sirćetne kiseline na sobnoj temperaturi, uz neprestano mešanje. Nakon hlađenja, rastvor hitozana je postepeno dodavan u rastvor PVA uz neprekidno mešanje, a dobijene koloidne disperzije su mešane na magnetnoj mešalici još 2-3 h do potpune homogenizacije. Dobijene su dve koloidne disperzije, koje su sadržale 10 mas.% PVA i 0,1 mas.% CHI (PVA/0.1CHI), odn. 10 mas.% PVA i 0,5 mas. % CHI (PVA/0.5CHI), redom.

Koloidne disperzije polivinil-alkohol/hitozan/grafen su pripremljene na isti način, osim što je, nakon homogenizacije, u koloidne disperzije PVA i CHI dodavana odgovarajuća masa nanopraha grafena, i tako dobijene koloidne disperzije su mešane pomoću ultrazvučnog kupatila 30 min, a zatim i pomoću magnetne mešalice 2-3 h do potpune homogenizacije. Tako su dobijene još dve koloidne disperzije, koje su sadržale 10 mas.% PVA i 0,1 mas.% CHI i 0,01 mas.% Gr, odn. 10 mas.% PVA, 0,5 mas.% CHI i 0,01 mas.% Gr (PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr, redom).

4.3 DOBIJANJE HIDROGELOVA POLIVINIL-ALKOHOL/HITIZAN I POLIVINIL-ALKOHOL/HITIZAN/GRAFEN

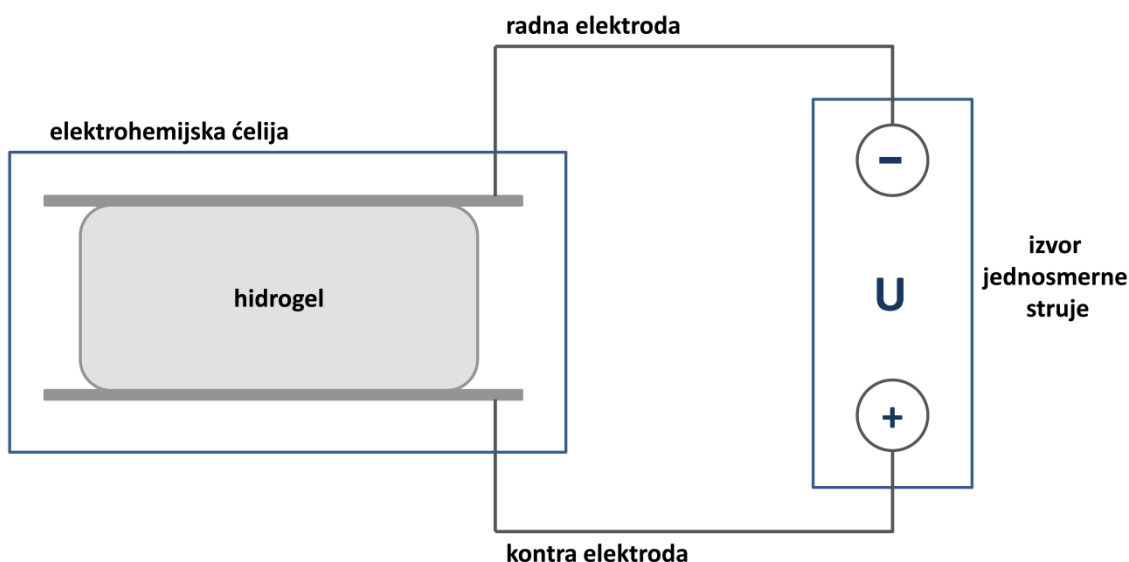
Četiri koloidne disperzije, dobijene opisanim postupkom (PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr), podvrgnute su fizičkom procesu umrežavanja metodom zamrzavanja i odmrzavanja kako bi se dobili hidrogelovi. Koloidne disperzije su odmah nakon pripreme izlivena u Petri šolje prečnika 8,5 cm do visine od 5 mm, a zatim su zamrznute na temperaturi od -18 °C tokom 16 h. Nakon toga, usledilo je pet ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja:

jedan ciklus se sastojao od 16 h na -18 °C i 8 h na +4 °C. Dobijeni hidrogelovi su čuvani na -18 °C do sledećeg korišćenja.

4.4 ELEKTROHEMIJSKA SINTEZA NANOČESTICA SREBRA U HIDROGELOVIMA POLIVINIL-ALKOHOL/HITIZAN I POLIVINIL-ALKOHOL/HITIZAN/GRAFEN

Pre elektrohemijske sinteze nanočestica srebra, dobijeni hidrogelovi su bubrili u rastvoru AgNO_3 , kao prekursoru Ag^+ jona. Za potrebe sinteze, hidrogelovi su isečeni na diskove debljine 5 mm i prečnika ~10-12 mm, nakon čega su potopljeni u rastvore $\text{AgNO}_3 + \text{KNO}_3$. Korišćene su dve različite koncentracije rastvora za bubrenje – 0,25 mM $\text{AgNO}_3 + 0,1 \text{ M KNO}_3$ i 3,9 mM $\text{AgNO}_3 + 0,1 \text{ M KNO}_3$. Kalijum-nitrat je dodavan u velikom višku u odnosu na srebro-nitrat, i služio je kao osnovni elektrolit kako bi se poboljšala provodljivost rastvora. Hidrogelovi su bubrili u ovim rastvorima tokom 48 h na tamnom mestu, nakon čega je vršena elektrohemijska *in situ* sinteza nanočestica srebra.

Nabubrela hidrogelovi su smešteni u posebno dizajniranu staklenu elektrohemijsku ćeliju, između dve platinske elektrode, koje su povezane na izvor jednosmerne struje MA8903 Electrophoresis power supply (Iskra, Slovenija). Aparatura za elektrohemijsku sintezu nanočestica srebra u hidrogelovima polivinil-alkohol/hitizan i polivinil-alkohol/hitizan/grafen prikazana je shematski na slici 4.1. Elektrohemijska sinteza nanočestica srebra je izvođena pod uslovima konstantnog napona, na 90 V, tokom 4 min, a polaritet radne i kontra elektrode je menjan na svakih 60 s, kako bi se izbeglo prekomerno taloženje (kao i postiglo rastvaranje već istaloženog filma) metalnog srebra na katodi, koje predstavlja neželjenu reakciju i dovodi do smanjenja prinosa nanočestica. Pre i nakon svake sinteze, Pt elektrode i ćelija su ispirane u 1:1 (v/v) HNO_3 , a zatim i u destilovanoj vodi.



Slika 4.1. Shema elektrohemijske sinteze nanočestica srebra u hidrogelovima polivinil-alkohol/hitizan i polivinil-alkohol/hitizan/grafen

Nazivi uzoraka su utvrđeni prema sastavu hidrogelova sa nanočesticama srebra, kao i prema koncentraciji AgNO_3 u polaznim rastvorima za bubrenje koji su korišćeni za elektrohemijsku sintezu nanočestica srebra. Radi bolje preglednosti, nazivi svih sintetisanih uzoraka su predstavljani u tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Nazivi različitih uzoraka nanokompozitnih hidrogelova, prema sadržaju hitozana i grafena, kao i prema koncentraciji AgNO₃ u rastvorima za bubrenje, korišćenim za elektrohemijisku sintezu nanočestica srebra u hidrogelovima

Naziv uzorka	Sadržaj hitozana	Sadržaj grafena	Koncentracija AgNO ₃ u rastvoru za bubrenje
0.25Ag/PVA/0.1CHI	0,1 mas.% CHI	/	0,25 mM
0.25Ag/PVA/0.5CHI	0,5 mas.% CHI	/	0,25 mM
3.9Ag/PVA/0.1CHI	0,1 mas.% CHI	/	3,9 mM
3.9Ag/PVA/0.5CHI	0,5 mas.% CHI	/	3,9 mM
0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr	0,1 mas.% CHI	0,01 mas.% Gr	0,25 mM
0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr	0,5 mas.% CHI	0,01 mas.% Gr	0,25 mM
3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr	0,1 mas.% CHI	0,01 mas.% Gr	3,9 mM
3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr	0,5 mas.% CHI	0,01 mas.% Gr	3,9 mM

4.5 FIZIČKO-HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA HIDROGELOVA

Fizičko-hemijska karakterizacija nanokompozitnih hidrogelova 0.25Ag/PVA/0.1CHI, 0.25Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9Ag/PVA/0.5CHI, 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr, 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr, kao i referentnih uzoraka – hidrogelova bez nanočestica srebra (PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr), izvršena je pomoću različitih metoda, koje su detaljno opisane u daljem tekstu, kako bi se ispitala struktura, svojstva i ponašanje dobijenih materijala.

4.5.1 Određivanje udela gel-frakcije u hidrogelu

Udeo gel-frakcije u hidrogelovima (W_g) je određen eksperimentalno na sledeći način. Hidrogelovi su prvo osušeni na temperaturi od 37 °C do postizanja konstantne mase, nakon čega su tako dobijeni kserogelovi potopljeni u fosfatni pufer (K₂HPO₄ + KH₂PO₄, pH 7,4, 37 °C) do postizanja ravnotežnog stepena bubrenja, čime je postignuta ekstrakcija/rastvaranje neumreženih polimernih lanaca u medijumu za bubrenje. Ponovno nabubrela hidrogelovi su osušeni i po drugi put do konstantne mase, a zatim je udeo gel frakcije, W_g , izračunat kao odnos mase suvog kserogela na početku eksperimenta (m_0) i mase kserogela na kraju eksperimenta, tj. nakon bubrenja i ponovnog sušenja (m_1), prema jednačini (4.1). Merenja su vršena u triplicatu, a dobijeni rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

$$W_g = \frac{m_1}{m_0} \quad (4.1)$$

4.5.2 UV-vidljiva spektroskopija

Prisustvo nanočestica srebra u hidrogelovima nakon elektrohemijske sinteze je potvrđeno metodom UV-vidljive spektroskopije. Za snimanje UV-vidljivih spektara, uzorci hidrogelova su rastvoreni u destilovanoj vodi na povišenoj temperaturi (80-90 °C) u masenom odnosu 1/7 (hidrogel/voda). UV-vidljivi spektri rastvora 0.25Ag/PVA/0.1CHI, 0.25Ag/PVA/0.5CHI, 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr, kao i 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelova su snimljeni u opsegu talasnih dužina 300-800 nm, na instrumentima 3100 Spectrophotometer (Mapada, Kina) i LLG-uniSPEC 2 Spectrophotometer (LLG Labware, Nemačka). Nula instrumenta je podešena pomoću destilovane vode, dok su snimljeni i UV-vidljivi spektri hidrogelova bez nanočestica srebra (PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr), u istom opsegu talasnih dužina, koji su služili kao referentni uzorci. Svi eksperimenti su rađeni u triplikatu, a dobijeni spektri su prikazani kao srednja vrednost tri merenja.

4.5.3 Skenirajuća elektronska mikroskopija (FE-SEM) i energetska disperziona spektroskopija (EDS)

Pre snimanja skenirajućom elektronskom mikroskopijom sa emisijom polja (eng. *field-emission scanning electron microscopy*, FE-SEM), svi uzorci hidrogelova su osušeni u sušnici do kserogela (100 °C, 48 h), kako bi se u potpunosti uklonila voda iz polimerne matrice. Površinske mikrofotografije PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr, kao i 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelova su snimljene pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa LEO SUPRA 55 (Carl Zeiss AG, Nemačka), pri naponu ubrzanja od 10 kV, sa InLens detektorom u kombinovanom modalitetu detekcije sekundarnih i povratno rasutih elektrona (SE/BSE). Površinski sastav elemenata određen je energetskom disperzionom spektroskopijom (eng. *energy dispersion spectroscopy*, EDS) pomoću uređaja EDAX GENESIS 2000 (EDAX Inc., SAD) na FE-SEM instrumentu.

4.5.4 Dinamičko rasipanje svetlosti (DLS)

Metoda dinamičkog rasipanja svetlosti (eng. *dynamic light scattering*, DLS) je primenjena kako bi se odredila srednja vrednost prečnika i raspodela dimenzija nanočestica srebra u hidrogelovima 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr. Uzorci su pripremljeni na isti način kao za UV-vidljivu spektroskopiju, dakle rastvaranjem diskova hidrogelova u destilovanoj vodi, u masenom odnosu 1/7. Merenja su vršena na instrumentu Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, UK), sa He-Ne laserom kao izvorom monohromatske svetlosti (633 nm), kao i sa optičkim detektorom povratno rasute svetlosti pod uglom od 173°. Srednje vrednosti hidrodinamičkih prečnika (D_H) i indeksi polidisperznosti (eng. *polydispersity index*, PDI), kao i krive raspodele veličina nanočestica srebra, su izračunati kao srednja vrednost 5 pojedinačnih merenja, od kojih je svako ponovljeno 15 puta.

4.5.5 Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)

Transmisiona elektronska mikroskopija (eng. *transmission electron microscopy*, TEM) je izvršena kako bi se dobila vizuelna potvrda prisustva, dimenzija i oblika nanočestica srebra u hidrogelovima 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr. Slično kao za UV-vis i DLS merenja, hidrogelovi su prethodno rastvoreni u destilovanoj vodi, s tim što je u slučaju TEM analize odnos mase hidrogela i vode iznosio 1/20, kako bi se smanjila koncentracija polimera u rastvoru i postigla zadovoljavajuća transparentnost za elektronski snop. Rastvoreni hidrogelovi (15 μ l) su nakapani na Cu TEM mrežice („400 mesh”) sa karbonskom prevlakom (SPI supplies, SAD), koje su ostavljene na vazduhu i na sobnoj

temperaturi tokom 24 h, kako bi isparila voda. TEM analiza je izvršena na transmissionom elektronskom mikroskopu visoke rezolucije Talos F200X G2 (FEI-Thermo Fisher Scientific, SAD) pri naponu od 200 keV. Obrada i analiza dobijenih mikrofotografija je izvršena pomoću softvera DigitalMicrograph (Gatan Inc., Nemačka) i ImageJ2 (pod Fiji distribucijom, softver otvorenog koda-„open-source“) [270,271].

4.5.6 Rendgenska fotoelektronska spektroskopija (XPS)

Za potrebe snimanja rendgenskom fotoelektronskom spektroskopijom (eng. *X-ray photoelectron spectroscopy*, XPS), hidrogelovi PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr, kao i 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr su osušeni u sušnici (100 °C, 48 h) kako bi se uklonila tečnost iz polimerne matrice. XPS analiza je izvršena pomoću instrumenta K-Alpha System Spectroscopy (Thermo Electron, SAD), sa mikrofokusiranim monohromatskim izvorom X-zračenja Al K α linije (1486,6 eV). Energetska skala instrumenta je kalibrisana pomoću standardnih referentnih elemenata Au4f_{7/2} (83,96 eV), Ag3d_{5/2} (368,2 eV) i Cu2p_{3/2} (932,6 eV). Energija prolaza od 200 eV je korišćena za snimanje XPS spektara, a 50 eV za snimanje spektara visoke rezolucije.

4.5.7 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

Za potrebe merenja infracrvenom spektroskopijom sa Furijeovom transformacijom (eng. *Fourier-transform infrared spectroscopy*, FTIR), uzorci diskova hidrogelova (sa i bez nanočestica srebra) su osušeni u sušnici (suvom sterilizatoru) na 37 °C tokom 48 h, kako bi se uklonila voda iz hidrogela. FTIR spektri tako dobijenih PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr, kao i 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr kserogelova su snimljeni u opsegu talasnih brojeva od 450–4000 cm⁻¹, pomoću instrumenta Spectrum One (Perkin Elmer Inc., SAD) i Nicolet iS10 (Thermo Fisher Scientific, SAD).

4.5.8 Ramanova spektroskopija

Ramanovi spektri hidrogelova sa grafenom (PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr) su snimljeni pomoću instrumenta Invia Raman spectrophotometer (Renishaw plc, UK) sa argonovim laserom kao izvorom monohromatske svetlosti talasne dužine 514 nm.

4.5.9 Ciklična voltametrijia

Merenja cikličnom voltametrijom su izvršena pomoću potencioštata GAMRY Reference 600 (Gamry Instruments Inc., SAD), u elektrohemijskoj ćeliji sa tri elektrode. Diskovi hidrogelova su smešteni između dve platinske pločice koje su služile kao radna i kontra elektroda, dok je kao referentna korišćena zasićena kalomelova elektroda (ZKE). Kao elektrolit je korišćen 0,1 M KNO₃. Ciklični voltamogrami su snimani u opsegu potencijala od -0,3 V do 1,0 V, brzinom od 50 mV s⁻¹. Ciklični voltamogrami Pt elektrode u hidrogelovima sa nanočesticama srebra su snimani 24 h i 5 dana nakon elektrohemijske sinteze nanočestica srebra. Sve vrednosti potencijala u radu su prikazane u odnosu na ZKE.

4.5.10 Termogravimetrijska analiza (TGA) i diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Termogravimetrijska analiza (eng. *thermogravimetric analysis*, TGA) i diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (eng. *differential scanning calorimetry*, DSC) PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr, kao i 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelova je izvršena pomoću instrumenta TGA

Q5000 IR/SDT Q600 (TA Instruments, SAD), u opsegu temperatura od 20–600 °C, sa brzinom zagrevanja od 20 °C/min u atmosferi N₂ (50 mL/min). Diferencijalne termogravimetrijske krive (DTG) su dobijene diferenciranjem eksperimentalnih TGA krivih u datom opsegu temperatura, pomoću softvera MATLAB[®] R2009b (MathWorks, Inc., SAD).

4.5.11 Ispitivanje mehaničkih svojstava

Mehanička svojstva, odnosno elastičnost i zatezna čvrstoća, ispitivani su sa ciljem utvrđivanja efekta inkorporacije grafena unutar polimerne matrice. U ove svrhe su ispitivani samo uzorci bez srebra, tj. PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr; međutim, ovi uzorci su, usled specifičnosti instrumenta na kome su vršena merenja, pripremljeni u obliku filmova, umesto u formi hidrogelova. Priprema filmova je izvršena na sličan način kao što je opisano u poglavlju 4.2, tj. pripremom koloidnih disperzija polimera sa i bez grafena, a jedina razlika je bila to što su, umesto umrežavanja zamrzavanjem i odmrzavanjem, dobijene disperzije izlivena na ravnu površinu i osušene do konstantne mase (prvih 24 h na 60 °C, a zatim na sobnoj temperaturi). Merenja su vršena na univerzalnoj kitalici (Kyung Hee Univerzitet-KHU, Južna Koreja), pri sili od 100 kp (981 N) i sa brzinom istezanja od 0.5 mm/min.

4.6 ISPITIVANJE BUBRENJA I OTPUŠTANJA SREBRA

Kinetika bubrenja i otpuštanja srebra je ispitivana na 37 °C, u rastvoru fosfatnog pufera (6,1 mM K₂HPO₄ + 3,9 mM KH₂PO₄, pH≈7,4).

4.6.1 Kinetika bubrenja

Bubrenje hidrogelova PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, 0.25Ag/PVA/0.1CHI, 0.25Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI, kao i PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr, 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr, je ispitivano u izotermnim uslovima, kako bi se utvrdila kinetika sorpcije vodenog medijuma i izračunao ravnotežni stepen bubrenja hidrogelova. Pre početka eksperimenta, hidrogelovi su osušeni do konstantne mase kserogela na 37 °C, njihova masa je izmerena, a zatim su potopljeni u 10 ml fosfatnog pufera (pH≈7,4) i čuvani na 37 °C. U prethodno utvrđenim vremenskim intervalima (svakih 1 h tokom prvih 10 h, a zatim nakon 24, 27, 30, 48, 50, 52 i 72 h), hidrogelovi su vađeni iz medijuma i merena je njihova masa, nakon što je višak tečnosti uklonjen sa njihove površine pomoću filter papira.

Proračun stepena bubrenja, q_t , je izvršen gravimetrijskom metodom na osnovu jednačine (4.2), kao odnos mase apsorbovane tečnosti (dobijene na osnovu razlike masa hidrogela u određenom vremenu t , m_t , i suvog kserogela na početku eksperimenta, m_0) i početne mase kserogela, izmerene pre početka bubrenja, m_0 . Sva merenja su vršena u triplikatu, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Ravnotežni stepen bubrenja, q_{eq} , određen je kao stepen bubrenja u trenutku kada proces bubrenja dostiže ravnotežu, odnosno kada se javi plato na profilu bubrenja.

$$q_t = \frac{m_t - m_0}{m_0} \quad (4.2)$$

Dobijeni eksperimentalni profili bubrenja prikazani su kao zavisnost odnosa srednje vrednosti trenutnog i ravnotežnog stepena bubrenja (q_t/q_{eq}) od vremena.

4.6.2 Kinetika otpuštanja srebra

Diskovi hidrogelova 0.25Ag/PVA/0.1CHI, 0.25Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9Ag/PVA/0.5CHI, kao i 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr, 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr, su potopljeni u 10 ml medijuma (fosfatnog pufera), koji je vađen iz bočica i menjan svežim rastvorom u prethodno određenim vremenskim periodima (na svakih 24 h tokom prvih 7 dana, a zatim na 3-5 dana, do kraja ispitivanog vremenskog perioda od 28 dana). Izvađeni rastvori fosfatnog pufera su čuvani u dobro zaptivenim epruvetama na 4 °C, do početka merenja. Nakon 28 dana, hidrogelovi su rastvoreni u 10 ml 1:1 (v/v) HNO₃, kako bi se odredila količina srebra preostala u hidrogelu nakon 28 dana otpuštanja. Merenja koncentracije jona srebra u svim rastvorima, prethodno zakiseljenim sa par kapi 1:1 (v/v) HNO₃, su vršena metodom atomske apsorpcione spektroskopije (AAS), pomoću instrumenta PYU UNICAM SP9 (Philips, Holandija). Metodom AAS su dobijeni podaci o koncentracijama jona srebra u 10 ml medijuma za otpuštanje, na osnovu čega je izračunata masa srebra otpuštena iz hidrogela, a zatim i koncentracija srebra po zapremini hidrogela, koja je korišćena za dalji proračun. Zapremina hidrogelova, korišćena u ovom proračunu, dobijena je na osnovu merenja dimenzija (prečnika i debljine) svakog uzorka. Na osnovu koncentracija srebra otpuštenog iz hidrogelova, profili otpuštanja su dalje određeni kumulativno, sabiranjem svih koncentracija do datog dana. Ukupna početna koncentracija srebra u hidrogelovima pre otpuštanja, preračunata je sabiranjem svih koncentracija otpuštenog srebra, sa koncentracijom srebra preostalom u hidrogelu nakon 28 dana. Profili otpuštanja su u većini slučajeva prikazani kao zavisnost udela otpuštenog srebra (tj. odnosa koncentracije srebra otpuštenog do datog trenutka i početne koncentracije srebra u hidrogelu, $c_{Ag,t}/c_{Ag,0}$) od vremena, jer takav način prikazivanja omogućava normiranje rezultata na procentualno otpuštanje i samim tim jednostavnije poređenje različitih uzoraka. Izuzetak od ovog pravila je bio proračun i fitovanje kinetičkim modelima, koji svojom postavkom zahtevaju prikazivanje zavisnosti različitih funkcija koncentracije srebra preostalog u hidrogelu od vremena. Svi eksperimenti su izvođeni u triplikatu, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

4.7 BIOLOŠKA KARAKTERIZACIJA HIDROGELOVA

4.7.1 Antibakterijska svojstva

Antibakterijska aktivnost PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, 0.25Ag/PVA/0.1CHI, 0.25Ag/PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelova je ispitivana prema Gram-negativnom bakterijskom soju *Escherichia coli* ATCC 25922 i Gram-pozitivnom soju *Staphylococcus aureus* TL, pomoću agar-difuzionog testa i određivanjem kinetike antibakterijske aktivnosti, koji će biti detaljnije opisani u daljem tekstu.

4.7.1.1 Agar-difuzioni test

Pre izvođenja eksperimenata, diskovi hidrogelova su sterilisani pod UV-C lampom u laminarnoj komori (po 30 min sa obe strane uzorka, rastojanje lampe od uzorka 60 cm). Bakterijske kulture (150 µl), koje su uzgajane preko noći u hranljivom bujonu (18 h), dodate su u 15 ml hranljivog top agara (0,7 mas.%), prethodno sterilisanog u autoklavu (temperatura 121 °C, pritisak 1,3 bar, 30 min), a zatim ohlađenog do ~55 °C. Tako zasejani hranljivi top agar preleven je preko sloja hranljivog agara (1,5 mas.%) koji se nalazio u sterilnim Petri šoljama. Broj bakterijskih ćelija u hranljivom top agaru iznosio je oko $\sim 10^6$ CFU ml⁻¹. Nakon očvršćavanja hranljivog top agara, diskovi hidrogelova su smešteni na njegovu površinu, a širine zona inhibicije oko diskova su izmerene nakon inkubacije od 24 h na 37 °C. Zone inhibicije su izmerene tako što su Petri šolje

fotografisane digitalnim fotoaparatom a zatim obrađene pomoću programa AutoCAD® 2016 (Autodesk, Inc., SAD).

4.7.1.2 Kinetika antibakterijske aktivnosti

Za određivanje kinetike antibakterijske aktivnosti, uzorci hidrogelova su isečeni na kocke dimenzija $\sim 2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$, a zatim sterilisani 30 min pod UV-C lampom u laminarnoj komori. Bakterijske suspenzije (broj bakterijskih ćelija $\sim 10^6 \text{ CFU ml}^{-1}$) su pripremljene dodavanjem prekonocne bakterijske kulture (18 h stare) u fosfatni pufer istog sastava kao onaj koji je korišćen i za eksperimente bubrenja i otpuštanja srebra ($\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7,4). Oko 2 g hidrogela je dodato u laboratorijske balone zapremine 50 ml, u koje je takođe sipano 10 ml bakterijske suspenzije, dok je čist medijum (fosfatni pufer sa ćelijama bakterija i bez uzoraka hidrogelova) služio kao kontrola. Inkubacija je vršena u vodenom kupatilu sa šejkerom (62 rpm) na 37°C . Promena broja bakterijskih ćelija u suspenzijama praćena je nakon 15 min, 1 h, 3 h i 24 h. U istopljeni sterilni hranljivi agar (1,5 mas.%, 55°C) dodato je 100 μl bakterijske suspenzije uzorka odgovarajućeg razblaženja, a zatim je tako dobijeni sadržaj promešan i izliven u Petri šolje, koje su inkubirane 24 h, na 37°C . Nakon inkubacije, broj preživelih bakterijskih ćelija određen je brojanjem formiranih kolonija na hranljivom agaru i izražen kao logaritama broja formiranih kolonija ($\log(\text{CFU ml}^{-1})$, CFU – eng. *colony forming unit*).

4.7.2 Citotoksičnost

4.7.2.1 Ćelijske linije

Citotoksičnost hidrogelova sa i bez nanočestica srebra (PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, 0.25Ag/PVA/0.1CHI, 0.25Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9Ag/PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr) je ispitivana prema dve ćelijske linije ožiljnog tkiva – fibroblasta: L929 (ATCC CRL-6364, mišji fibroblasti) i MRC-5 (ATCC CCL-171, humani fibroblasti). Ćelijske kulture su uzgajane u DMEM medijumu sa 4,5 % glukoze, suplementiranom sa 10 %-nim fetalnim telećim serumom, antibiotikom i antimikotikom. Kulture su presejavane dva puta nedeljno, a ćelijske suspenzije su pripremljene pomoću 0,1 % rastvora tripsina u EDTA. Ćelijske kulture su čuvane u standardnim flaskovima (25 cm^2) na 37°C u atmosferi 5 % CO_2 (100 % vlažnosti). Prikupljane su samo vijabilne ćelije (vijabilnost $> 90\%$), koje su brojane odbacivanjem boje 0,1 % tripan plavo [272]. Samo ćelije u eksponencijalnom rastu su korišćene u svim eksperimentima.

4.7.2.2 Test odbacivanja boje tripan-plavo (DET)

Vijabilnost i broj ćelija su određivani testom odbacivanja boje (eng. *dye-exclusion test*, DET) sa bojom tripan plavo [272]. Test je izvršen tako što su vijabilne ćelije zasejavane u posudama za ćelijske kulture sa 12 otvora ravnog dna (Costar, Corning Inc., SAD) u koncentraciji od $10^5/\text{ml}$. Kontrolni uzorci su sadržali samo ćelije. Uzorci hidrogelova su isečeni na kocke dimenzija $\approx 2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$, koje su postavljene u Petri šolje sa zasejanim odgovarajućim ćelijskim kulturama. Inkubacija je vršena u standardnoj atmosferi za ćelijske kulture (37°C , 5 % CO_2) tokom 48 h. Nakon perioda inkubacije, ćelije su odvojene od uzoraka tretirajući ih tripsinom (tripsinizacijom). Tako dobijena suspenzija ćelija je razblažena pomoću 0,5 % rastvora boje tripan plavo, a zatim je izlivena u Neuerbauerovu komoru-hemocitometar, nakon čega su vijabilne (neobojene) i mrtve (obojene plavo) ćelije direktno izbrojane pomoću invertnog mikroskopa. Vijabilnost ćelija je izračunata kao odnos broja preživelih i ukupnog broja ćelija.

4.7.2.3 MTT test

Inhibicija rasta ćelija je ispitivana kolorimetrijskim MTT testom, zasnovanom na redukciji tetrazolijumove soli 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid (MTT) do formazana pod uticajem mitohondrijskih dehidrogenaza u vijabilnim ćelijama.

Mikrotitar ploče sa uzorcima hidrogelova ($\approx 2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$) i zasejanim ćelijama su inkubirane 48 h u standardnoj atmosferi za ćelijske kulture ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO_2). Nakon inkubacije, ćelije su odvojene od uzoraka tretiranjem tripsinom (tripsinizacijom). Kontrolni uzorci su sadržali samo ćelije, bez uzoraka hidrogelova. Ćelijska suspenzija je nakon tripsinizacije centrifugirana 10 minuta na 1500 o/min, a ćelijski talog je resuspendovan u svežem medijumu. Nakon toga su određivani broj ćelija i njihova vijabilnost u 0,1% tripan plavom. Vijabilne ćelije su posejane u mikrotitar ploče sa 96 otvora ravnog dna pri optimalnoj gustini od $5 \cdot 10^3$ ćelija po otvoru, i inkubirane tokom 48 h na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Tri sata pre isteka inkubacije, u sve otvore je dodato po 10 μl rastvora MTT soli. MTT so je rastvorena u medijumu u koncentraciji 5 mg ml^{-1} , a zatim je izvršena filtracija kako bi se uklonile eventualne nerastvorne komponente. Po isteku 3 h u svaki otvor je dodato po 100 μl 0,04 mol/l HCl u izopropanolu. Apsorbancija je očitavana odmah po isteku inkubacije na čitaču za mikrotitar ploče (Multiscan, MCC/340) na test talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj talasnoj dužini od 690 nm. Otvori na ploči koji su sadržavali samo medijum i MTT, ali ne i ćelije, služili su kao slepa proba ("blank").

4.7.2.4 Statistička analiza

Svi eksperimenti citotoksičnosti su rađeni u triplikatu. Statistička analiza eksperimentalnih rezultata urađena je pomoću jednofaktorske analize varijanse (ANOVA), praćene post-hoc testom višestrukog poređenja, kako bi se ispitala statistička značajnost razlika između pojedinih uzoraka. Statistički značajnim rezultatima smatrani su oni za koje je verovatnoća tačnosti (p) nulte hipoteze u ANOVA testu bila niža od ranije zadatog nivoa značajnosti ($\alpha = 0,05$). Statistička obrada rezultata izvršena je pomoću programa MATLAB[®] R2014b (MathWorks Inc., SAD).

5 REZULTATI I DISKUSIJA

5.1 SINTEZA HIDROGELOVA SREBRO/POLIVINIL-ALKOHOL/ HITIZAN I SREBRO/POLIVINIL-ALKOHOL/HITIZAN/GRAFEN

5.1.1 Mehanizam formiranja hidrogelova

Fizičko umrežavanje hidrogelova PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr je postignuto postupkom zamrzavanja i odmrzavanja, koji je detaljno opisan u eksperimentalnom delu. Tipičan primer izgleda hidrogela PVA/0.5CHI/Gr prikazan je na slici 5.1a. Metoda zamrzavanja i odmrzavanja omogućuje jednostavno dobijanje hidrogelova u nekoliko ciklusa [273,274]. Kao fizički postupak umrežavanja, ova metoda ima ključnu prednost u odnosu na uobičajene postupke hemijskog umrežavanja (koji podrazumevaju primenu hemijskih umrežavajućih agenasa – toksičnih hemikalija poput aldehida [275]), s obzirom na to da se ne upotrebljavaju potencijalno opasne ili toksične hemikalije i reagensi, pa je samim tim obezbeđeno efikasno i ekološki prihvatljivo dobijanje biokompatibilnih hidrogelnih biomaterijala [276]. Pored netoksičnosti, prednost fizičkih metoda umrežavanja je svakako i reverzibilnost tako nastalih hidrogelova, koji se pod odgovarajućim uslovima mogu vratiti u stanje sola ili rastvoriti u pogodnom rastvaraču pod određenim uslovima, što doprinosi biodegradabilnosti ovih materijala [276]. S druge strane, fizički postupci umrežavanja se u značajnoj meri oslanjaju na karakteristike i svojstva konkretnog izabranog polimera, što donekle ograničava mogućnosti kontrole strukture dobijenog (hidro)gela, kao i širinu moguće primene date metode, za razliku od hemijskih postupaka umrežavanja [90]. Takođe, ovom metodom nije moguće dobiti hidrogelove svih polimera – pokazano je da čist PVP [277] ne može formirati hidrogel ovim putem, dok PVA može [139], a takođe se mogu dobiti i hidrogelovi polimernih blendi PVP i CHI sa polivinil-alkoholom [277,278].

Mehanizam postupka umrežavanja hidrogelova metodom zamrzavanja i odmrzavanja je predmet brojnih naučnih istraživanja, i najčešće se objašnjava kombinacijom nekoliko procesa, koji se odigravaju paralelno i/ili uzastopno, tokom nekoliko ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja. Smatra se da su polimerni lanci u gel fazi hidrogela povezani inter- i intramolekulskim vodoničnim vezama [139], što obezbeđuje reverzibilnost ovako dobijenih hidrogelova, tako da je moguć povratak u stanje sola bez raskidanja hemijskih veza. Kako oba polimera koji su predmet ovog rada, tj. i PVA i CHI, sadrže veliki broj funkcionalnih grupa na svom lancu koje su sposobne da formiraju vodonične veze (tj. –OH i –NH₂ grupe), metoda zamrzavanja i odmrzavanja je pogodna za dobijanje hidrogelova ovih polimera. Nastajanje umrežene polimerne matrice se najverovatnije odigrava putem procesa razdvajanja faza tečno-čvrsto (eng. *liquid-solid phase separation*, LSPS) i tečno-tečno (eng. *liquid-liquid phase separation*, LLPS) [139,222]. Mehanizam razdvajanja faza čvrsto-tečno podrazumeva difuziju molekula vode između polimernih lanaca, pa prilikom faze zamrzavanja dolazi do formiranja oblasti u kojima nastaju kristali leda, čime dolazi do razdvajanja polimernih lanaca (tj. čvrste faze) od tečne faze u kojoj se nalazi voda. U ovim oblastima čvrste faze, dolazi do uspostavljanja vodoničnih veza između makromolekulskih lanaca polimera, koji na taj način ostaju umreženi i tokom faze odmrzavanja [279]. Tako se sa svakim novim ciklusom zamrzavanja i odmrzavanja sve više razdvajaju čvrsta i tečna faza, što dovodi do nastajanja porozne matrice hidrogela, dok voda kao rastvarač ostaje zarobljena unutar pora ove umrežene strukture. Ponavljanjem ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja ostvaruje se veći stepen umreženja i formiranje polimerne matrice, koja predstavlja čvrstu fazu, dok se pore hidrogela oformljavaju u

oblastima kristala leda tokom zamrzavanja. Kada se hidrogel odmrzne, tečna vodena faza zauzima ovaj prostor u hidrogelu, a voda može biti slobodna, apsorbirana u porama gela, ili vezana za polimernu matricu. Osim vodoničnih veza, mogući mehanizmi umrežavanja polimernih lanaca u oblastima čvrste faze su formiranje uređenih mikrokristalnih oblasti, kao i nastajanje semipermanentnih prepletaja, koji omogućuju formiranje i ojačavanje novonastale umrežene matrice. Sve ove interakcije su fizičke prirode, pa ovim putem nastaje reverzibilna matrica hidrogela, koja se pod odgovarajućim uslovima može ponovo vratiti u stanje sola, bez raskidanja hemijskih veza i degradacije strukture samih polimera [276]. Drugi mehanizam nastajanja hidrogela, tj. razdvajanje tečnih faza – LLPS, se odigrava putem razdvajanja tečne koloidne disperzije na dve tečne faze od kojih je jedna sa većim, a druga sa nižim sadržajem polimera, tj. spinoidalnim razlaganjem koloidnog rastvora na oblasti bogate i osiromašene polimerom [279]. U oblastima tečne faze bogate polimerom, umrežena matrica hidrogela nastaje vodoničnim vezivanjem makromolekulskih lanaca PVA i CHI, dok se u osiromašenim oblastima odvija dalje razdvajanje faza, sve dok se, ponavljanjem više ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja, ne uspostavi stabilna matrica hidrogela [279]. Najverovatnije je da stvarni mehanizam formiranja hidrogela u određenoj meri obuhvata kombinaciju svih pomenutih procesa. Fizičko-hemijska svojstva hidrogelova dobijenih fizičkim umrežavanjem postupkom zamrzavanja i odmrzavanja, kao i njihova struktura, kinetika bubrenja i brojna druga svojstva, direktno zavise od uslova pod kojima se izvodi umrežavanje, tj. od broja i trajanja ciklusa, kao i od radne temperature zamrzavanja i odmrzavanja [273].

Uspešnost formiranja dobro umrežene matrice hidrogela je ispitana određivanjem udela gel-frakcije u hidrogelu, koje je izvršeno na ranije opisani način (poglavljje 4.5.1), a W_g je izračunat na osnovu jednačine (4.1). Dobijeni rezultati (tabela 5.1) su pokazali da su hidrogelovi sa većim sadržajem hitozana (0,5 mas.% CHI) imali i nešto viši udeo gel-frakcije, odnosno veći stepen umreženja od hidrogelova sa 0,1 mas.% CHI, što se moglo i očekivati jer hitozan poseduje veći broj funkcionalnih grupa sa sposobnošću formiranja vodoničnih veza, pa je i uspešnost formiranja gela donekle poboljšana sa povećanjem sadržaja CHI.

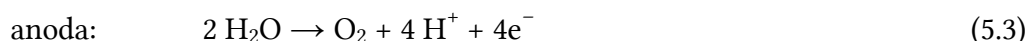
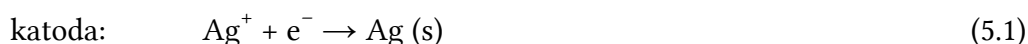
Tabela 5.1. Eksperimentalno određeni udeli gel-frakcije u hidrogelovima polivinil-alkohol/hitozan i polivinil-alkohol/hitozan/grafen

Hidrogel	W_g (%)
PVA/0.1CHI	94,0 ± 2,0
PVA/0.5CHI	95,6 ± 0,8
PVA/0.1CHI/Gr	88,0 ± 9,3
PVA/0.5CHI/Gr	94,0 ± 0,2

5.1.2 Elektrohemijska sinteza nanočestica srebra u hidrogelovima

U ovom radu je izabrana elektrohemijska metoda sinteze nanočestica srebra, zbog netoksičnosti dobijenih hidrogelova sa nanočesticama srebra. Elektrohemijska *in situ* sinteza nanočestica srebra se izvodi direktno u polimernoj matrici hidrogelova, prethodno nabubrelih u rastvoru $AgNO_3$ kao prekursora jona Ag^+ (sa dodatim KNO_3 u višku kao osnovnog elektrolita radi poboljšanja električne provodljivosti). Mehanizam sinteze nanočestica srebra nije u potpunosti poznat, ali se mogu utvrditi i opisati elektrohemijske i hemijske reakcije koje se odigravaju na elektrodama i u sistemu. Reakcije koje se odigravaju (pH ≈ 6,5) prikazane su jednačinama (5.1), (5.2), (5.3) i (5.4). Pre svega, prilikom redukcije Ag^+ jona, na površini katode se taloži tanak sloj metalnog srebra

(jedn. (5.1)) [280]. Ova reakcija je očigledno nepoželjna, jer se njenim odigravanjem smanjuje koncentracija Ag^+ jona unutar hidrogela, dostupnih za redukciju i nastajanje centara nukleacije nanočestica srebra, što očito dovodi do smanjenja prinosa sinteze [280–282]. Zbog toga se, tokom sinteze, polaritet elektroda periodično menja, čime se ostvaruje anodno rastvaranje istaloženog sloja metalnog srebra na površini Pt elektrode, a joni Ag^+ se vraćaju u oksidovano stanje unutar hidrogela, pa se ostvaruju i uslovi za povećanje prinosa nanočestica srebra [280–283]. Druga, vrlo važna i neizbežna, redoks reakcija u sistemu je reakcija elektrolize vode, pri kojoj se na elektrodama odigravaju elektrohemijske reakcije izdvajanja vodonika (jedn. (5.2)) i kiseonika (jedn. (5.3)). Osim navedenih reakcija (jednačine (5.1)–(5.3)), moguće je da se na elektrodama odigravaju i reakcije oksidacije i redukcije polimera, tj. polivinil-alkohola i hitozana.



Izdvajanje vodonika na katodi (jedn. (5.2)) je veoma intenzivno na visokim naponima, te je stoga najverovatnije da se redukcija jona srebra i nastajanje nanočestica u unutrašnjosti polimerne matrice odigrava upravo pomoću vodonika, putem hemijske reakcije (5.4) [284,285]:



Poznato je da se nanočestice srebra, kao i polimerni nanokompoziti sa nanočesticama srebra, mogu sintetisati putem hemijske redukcije u atmosferi H_2 [286–288], a usled veoma intenzivnog izdvajanja mehurića gasa u katodnom delu elektrohemijske ćelije, koji zatim prolaze kroz hidrogel čitavom zapreminom, verovatno je da se nukleacija nanočestica Ag i u ovakvom sistemu odigrava upravo ovim putem. Osim toga, redukcija Ag^+ jona i formiranje centara nukleacije unutar polimerne matrice hidrogela, bi se mogla ostvariti i drugim hemijskim oksidoredukcionim reakcijama u kojima učestvuju i sami polimeri. Hitozan ima sposobnost i da deluje kao redukciono sredstvo, te je moguće dobijanje nanokompozita hitozana i srebra direktnom redukcijom jona Ag^+ do nanočestica uz pomoć hitozana [30,32,231,289]. U tom smislu se svakako može očekivati veća uspešnost sinteze nanočestica srebra u hidrogelovima sa CHI, u odnosu na PVA hidrogelove bez hitozana. Pored CHI, moguće je da i PVA učestvuje u reakcijama koje dovode do nastajanja nanočestica srebra, jer PVA kao sekundarni alkohol sadrži veliki broj $-\text{OH}$ grupa, koje pod određenim uslovima (povišena temperatura, bazna sredina) mogu delovati kao redukciono sredstvo u reakciji sa Ag^+ [290–292], pri čemu bi produkti reakcija na elektrodama, lokalno povećanje pH u prikatodnom sloju, ili toplota koja se razvije tokom reakcije na 90 V, mogli da deluju kao katalizator za ovakvu redukciju Ag^+ pomoću hidroksilnih grupa.

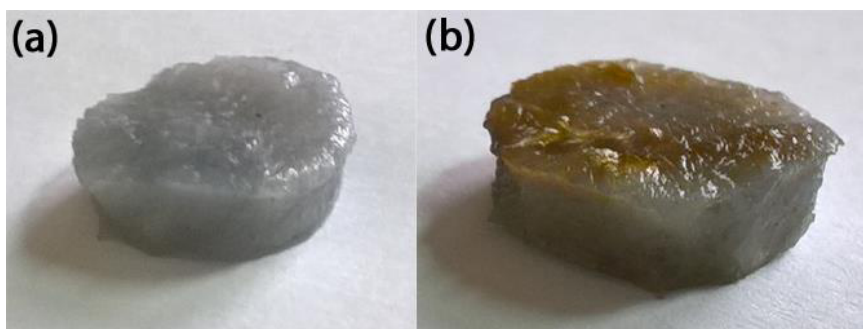
Osim anodne reakcije izdvajanja kiseonika (jedn. (5.3)), na anodi je moguće i formiranje reaktivnih čestica kiseonika, poput OH^* radikala, koji bi imali sposobnost da oksiduju $-\text{OH}$ grupe na lancu PVA. Produkti oksidacije $-\text{OH}$ grupa u alkoholima mogu biti aldehidi ili ketoni, pri čemu aldehidi takođe imaju redukciona svojstva, te bi mogli doprineti i redukciji srebra i nastajanju nanočestica. Međutim, hidroksilne grupe u sekundarnim alkoholima se najčešće oksiduju do keto-grupa ($\text{R}_2\text{C}=\text{O}$), a eventualno nastajanje reaktivnijih aldehydskih grupa (RCHO) bi podrazumevalo i raskidanje polimernih lanaca PVA, što je svakako moguće u tečnoj fazi [293,294], ali je verovatno značajno manje zastupljeno u čvrstom hidrogelu. Takođe je poznato da oksidacija PVA u vodenim rastvorima uglavnom vodi do nastajanja keto-grupa [293], koje su manje reaktivne i ne bi mogle da dovedu do redukcije Ag^+ , ali bi mogle doprineti stabilizaciji srebra, jer je pokazano da tzv. poli(enol-ketoni), nastali oksidacijom PVA, imaju značajnu sposobnost formiranja helatnih kompleksa sa dvovalentnim katjonima metala [293]. Dakle, PVA bi svakako mogao da doprinese *in situ* redukciji Ag^+ jona do nanočestica srebra, ali se ove reakcije verovatno odigravaju manje

intenzivno, u poređenju sa izdvajanjem vodonika u katodnoj polureakciji elektrolize vodenog rastvora.

In situ redukcija jona srebra, tj. nastajanje centara nukleacije u unutrašnjosti hidrogela, rezultuje daljim rastom nanočestica srebra, koji je ograničen interakcijama sa polimernim lancima u hidrogelu, čime se sprečava prekomeran rast i aglomeracija, te nanočestice ostaju vezane i stabilizovane unutar polimerne matrice [59,60,165]. Prema tome, prednost svih *in situ* postupaka sinteze nanočestica srebra, među koje spada i elektrohemijaska sinteza u polimernim hidrogelovima, ogleda se u mogućnosti direktne inkorporacije nanočestica u polimernoj matrici, čime se može ostvariti bolja stabilizacija i jače interakcije, nego što bi to bio slučaj sa različitim *ex situ* postupcima. Stabilizacija nanočestica srebra u polimernoj matrici hidrogela se ostvaruje putem jon-dipol interakcija sa funkcionalnim grupama na lancima polimera, sa elektron-donorskim atomima kao što su kiseonik i azot u hidroksilnim i amino grupama na lancima PVA i CHI [295]. Može se očekivati i formiranje koordinativnih veza i nastajanje polimer-metal kompleksa između jona srebra i funkcionalnih grupa na lancima polivinil-alkohola i hitozana, koji bi se mogli označiti kao $[PVA-Ag_n]^{n+}$ i $[CHI-Ag_m]^{m+}$, gde su n i m brojevi jona srebra vezanih za lanac PVA, odnosno CHI. Brojne studije su pokazale da hitozan, kao polikatjonski polisaharid koji sadrži veliki broj $-NH_2$ i $-OH$ grupa, ima sposobnost uspostavljanja interakcija sa jonima i nanočesticama srebra, čime se postiže njihova stabilizacija u koloidnoj disperziji, filmu ili hidrogelu hitozana [28–32,213,215,295].

In situ elektrohemijaski postupak sinteze je već ranije korišćen za dobijanje nanočestica srebra u hidrogelovima PVP [62,63] i PVA [59–61], a u ovom radu će biti ispitan i uticaj dodatka hitozana u blendi sa PVA, na elektrohemijasku sintezu nanočestica srebra, kao i na njihova fizičko-hemijaska i biološka svojstva, pri čemu će biti upotrebljene različite koncentracije hitozana za dobijanje pomenutih hidrogelova.

Prva, vizuelna, potvrda uspešne sinteze nanočestica srebra unutar polimerne matrice hidrogela, je pojava karakterističnog žutog obojenja nakon elektrohemijanske sinteze, koja potiče od jedinstvenih optičkih svojstava nanočestica srebra. Na slici 5.1b prikazan je primer izgleda 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogela nakon elektrohemijanske sinteze, koji pokazuje karakteristično žuto obojenje usled prisustva nanočestica srebra.



Slika 5.1. Reprezentativne fotografije hidrogelova (a) PVA/0.5CHI/Gr i (b) 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr

5.2 FIZIČKO-HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA HIDROGELOVA

5.2.1 UV-vidljiva spektroskopija

UV-vidljiva spektroskopija je veoma korisna metoda za karakterizaciju nanočestica srebra, koje ispoljavaju karakteristične maksimume apsorpcije, A , na granici vidljive oblasti elektromagnetnog spektra (talasne dužine, λ , oko 400 nm), usled pojave fenomena rezonancije površinskog plazmona, koji je objašnjen u poglavlju 2.2.3.1.

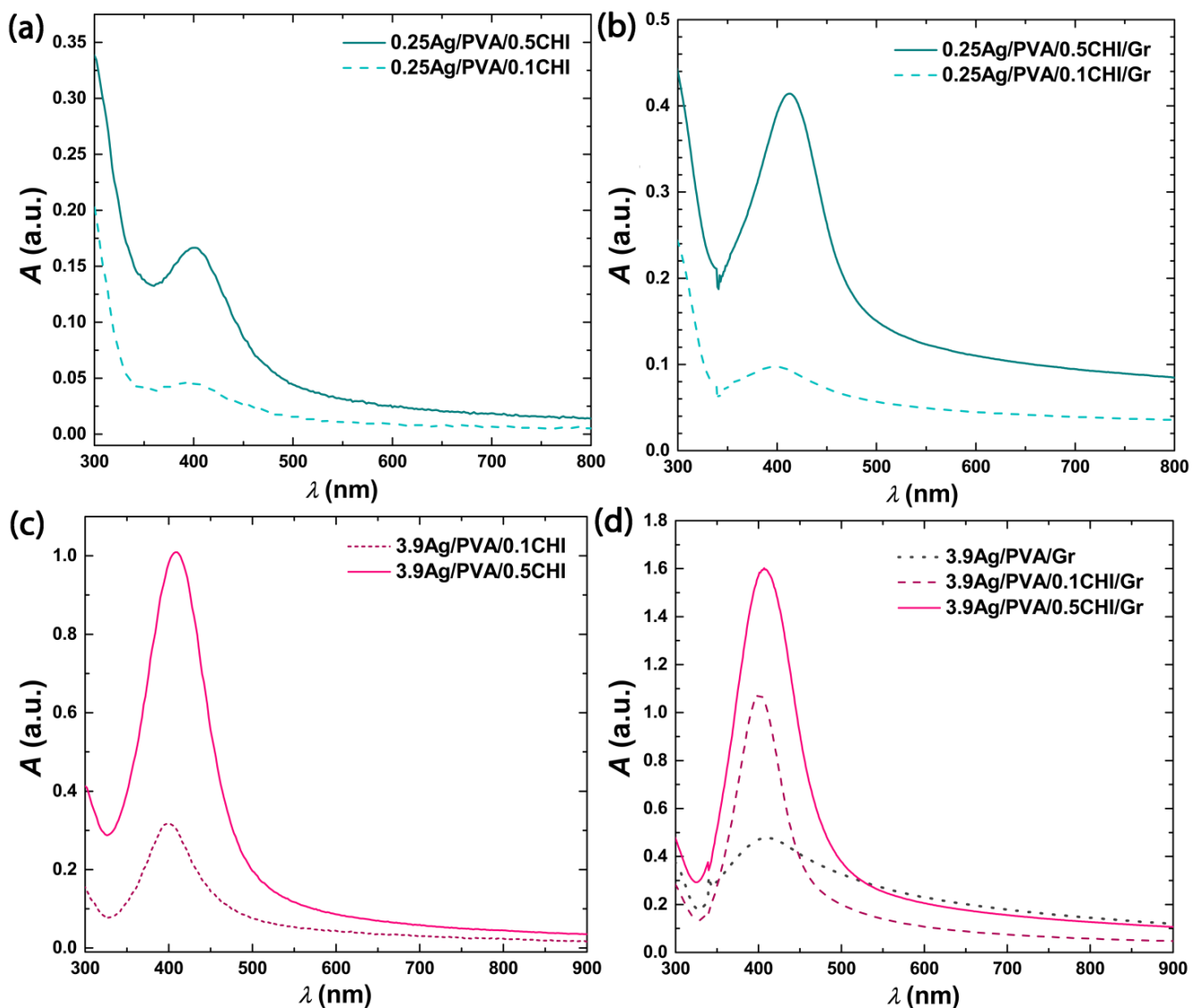
UV-vidljivi spektri hidrogelova sa nanočesticama srebra, dobijenim elektrohemijom nakon bubrenja u rastvorima AgNO_3 različitih koncentracija (0,25 mM i 3,9 mM) – 25Ag/PVA/0.1CHI, 0.25Ag/PVA/0.5CHI, 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr, 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr – su prikazani na slici 5.2. Svi ovi spektri pokazuju karakterističan maksimum nanočestica srebra (SPR pik) dok spektri hidrogelova bez nanočestica srebra (PVA, PVA/Gr, PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr), prikazani radi poređenja na slici 5.3, nisu sadržali ovakav pik, što je direktna potvrda uspešne inkorporacije nanočestica srebra unutar polimerne matrice. Trebalo bi napomenuti da su spektri hidrogelova sa nanočesticama srebra, prikazani na slici 5.2, dobijeni oduzimanjem odgovarajućih referentnih spektara (hidrogelova PVA/Gr, PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr, slika 5.3), tako da prikazani spektri predstavljaju samo apsorpcije koje potiču od strane nanočestica srebra u hidrogelovima, te se one mogu porediti u pogledu koncentracije nanočestica u uzorcima, u skladu sa Lamber-Berovim zakonom.

Hidrogelovi sa nanočesticama srebra sintetisanim korišćenjem 0,25 mM AgNO_3 rastvora za bubrenje (slike 5.2a i 5.2b) su pokazali znatno niže vrednosti maksimalne apsorpcije, A_{max} , u poređenju sa hidrogelovima dobijenim korišćenjem 3,9 mM AgNO_3 rastvora za bubrenje (slike 5.2c i 5.2d). Ovakvi rezultati nisu iznenađujući, s obzirom na to da je vrednost apsorpcije pika proporcionalna koncentraciji ispitivane supstance, prema Lamber-Berovom zakonu, pa je i očekivano da će koncentracija nanočestica biti veća u hidrogelovima sintetisanim iz rastvora sa većom koncentracijom prekursora Ag^+ . S druge strane, još jedan interesantan, i donekle neočekivan trend, primećen je poređenjem vrednosti A_{max} za hidrogelove sa različitim sadržajem hitozana. Sa slike 5.2 se jasno može uočiti značajno povećanje vrednosti A_{max} na spektrima hidrogelova sa 0,5 mas.% CHI, što ukazuje na veću koncentraciju nanočestica srebra, odnosno na veći prinos i uspešnost sinteze sa povećanjem sadržaja hitozana u hidrogelu. Ovo bi se moglo objasniti činjenicom da hitozan ispoljava redukciona svojstva [28,32], što može doprineti bržoj i efikasnijoj redukciji Ag^+ i samim tim nastajanju većeg broja nanočestica. U literaturi se često sreću protokoli pripreme nanokompozitnih hidrogelova i filmova hitozana sa nanočesticama srebra, pri čemu se redukcija jonskog srebra postiže samo hitozanom, mada je ovaj proces prilično dugotrajan i zametan [32,204]. U cilju bolje ilustracije uticaja sadržaja hitozana u hidrogelu na intenzitet maksimuma apsorpcije, na slici 5.2d je, pored spektara 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr, prikazan i UV-vidljivi spektar hidrogela 3.9Ag/PVA/Gr bez hitozana, i sa date slike se jasno može uočiti porast A_{max} u smeru 0 mas.% CHI \rightarrow 0,1 mas.% CHI \rightarrow 0,5 mas.% CHI. Pored redukcionih svojstava CHI, povećanje A_{max} , odn. koncentracije nanočestica srebra u hidrogelovima sa većim sadržajem hitozana, moglo bi biti i posledica veće sposobnosti bubrenja (poglavlje 5.3.1), tj. apsorpcione moći ovih uzoraka, koji su tokom 48 h bubrenja u rastvoru AgNO_3 , pre elektrohemijske sinteze, apsorbovali i vezali veću količinu Ag^+ jona, što bi moglo da rezultuje i redukcijom veće količine jona srebra i nastajanjem većeg broja nanočestica, nakon elektrohemijske sinteze. Sa slike 5.2 se takođe može primetiti i da su hidrogelovi sa grafenom (slike 5.2b i 5.2d), pokazali veću vrednost maksimalne apsorpcije, u poređenju sa hidrogelovima bez grafena (slike 5.2a i 5.2c). Ovo ukazuje na povoljan efekat prisustva grafena na sintezu

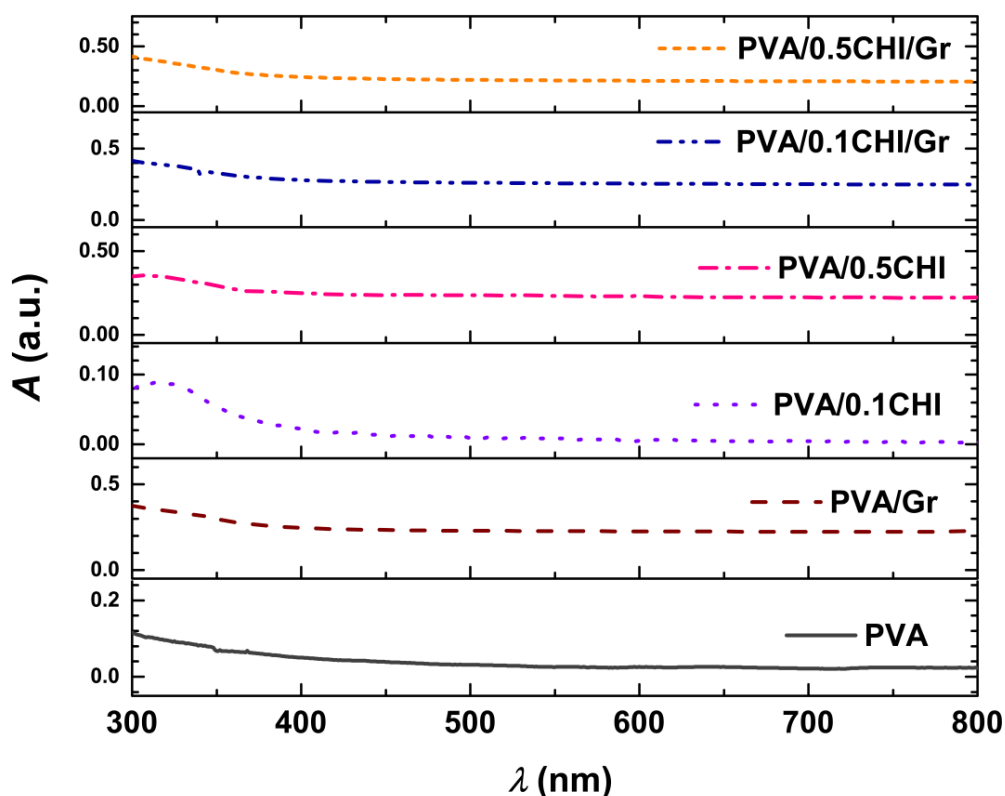
nanočestica srebra, koji bi se mogao objasniti povećanom provodnošću hidrogelova sa Gr, što bi moglo doprineti efikasnosti i bržem odigravanju elektrohemijske sinteze nanočestica srebra.

Oblik i položaj SPR pika, tj. talasna dužina na kojoj se javlja maksimalna apsorpcija, λ_{max} , na UV-vidljivim spektrima takođe značajno zavise od različitih svojstava nanočestica srebra, kao što su njihove dimenzije (uključujući i raspodelu veličina), oblik i stepen aglomeracije, ali i od dielektričnih svojstava (pa samim tim i indeksa prelamanja) samog medijuma u kome su nanočestice dispergovane [169,171,172]. Sferene nanočestice srebra, čiji su prečnici u opsegu od oko 5-50 nm, se obično nalaze u oblasti talasnih dužina od oko 400–420 nm [172]. U slučaju spektara prikazanih na slici 5.2, položaji maksimuma su bili: 400 nm (0.25Ag/PVA/0.1CHI), 402 nm (0.25Ag/PVA/0.5CHI), 400 nm (0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr), 411 nm (0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr), 400 nm (3.9Ag/PVA/0.1CHI), 408 nm (3.9Ag/PVA/0.5CHI), 401 nm (3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr), 407 nm (3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr) i 411 nm (3.9Ag/PVA/Gr). Na osnovu prikazanih rezultata, i poređenjem sa literaturnim podacima [172], može se zaključiti da su dobijene nanočestice srebra bile malih dimenzija, sa prečnicima u opsegu 5-50 nm. Osim toga, odsustvo na svim spektrima pikova na većim talasnim dužinama (>500 nm), ukazuje na nizak stepen aglomeracije nanočestica srebra i odsustvo krupnijih aglomerata [296,297], što se može objasniti dobrom stabilizacijom nanočestica srebra interakcijama sa –OH and –NH₂ grupama na polimernim lancima PVA i CHI u hidrogelu. Međutim, za precizno utvrđivanje dimenzija i raspodele veličina nanočestica srebra, neophodno je bilo primeniti i druge metode analize, koje će biti prikazane i diskutovane u narednim poglavljima.

Dakle, može se zaključiti da je UV-vidljivom spektroskopijom potvrđeno prisustvo čestica srebra nanometarskih dimenzija u svim nanokompozitnim hidrogelovima, a takođe je i utvrđen značajan uticaj hitozana na prinos elektrohemijske sinteze nanočestica. U daljem radu će biti prikazana detaljnija karakterizacija kako nanočestica srebra, tako i samih hidrogelova, u pogledu njihovih fizičko-hemijskih i bioloških svojstava. Imajući u vidu da su hidrogelovi sintetisani iz 3,9 mM AgNO₃ rastvora za bubrenje sadržali značajno veću koncentraciju nanočestica srebra, ovi uzorci su izabrani za fizičko-hemijska ispitivanja kako bi se obezbedila dovoljna koncentracija nanočestica i izbegla eventualna ograničenja u pogledu osetljivosti određenih tehnika, dok su hidrogelovi dobijeni iz 0,25 mM AgNO₃ rastvora za bubrenje korišćeni za biološku karakterizaciju, jer je za biomedicinske primene uvek poželjno izabrati najmanju moguću koncentraciju Ag koja daje zadovoljavajući antibakterijski efekat, usled potencijalnih problema sa citotoksičnošću nanočestica srebra, što će biti detaljnije razmatrano u kasnijim poglavljima. Naravno, u svim slučajevima kada je to bilo neophodno, izvršeno je poređenje rezultata za hidrogelove sa obe različite koncentracije srebra.



Slika 5.2. UV-vidljivi spektri hidrogelova sa nanočesticama srebra: (a) 0.25Ag/PVA/0.1CHI i 0.25Ag/PVA/0.5CHI, (b) 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr, (c) 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI, (d) 3.9Ag/PVA/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr



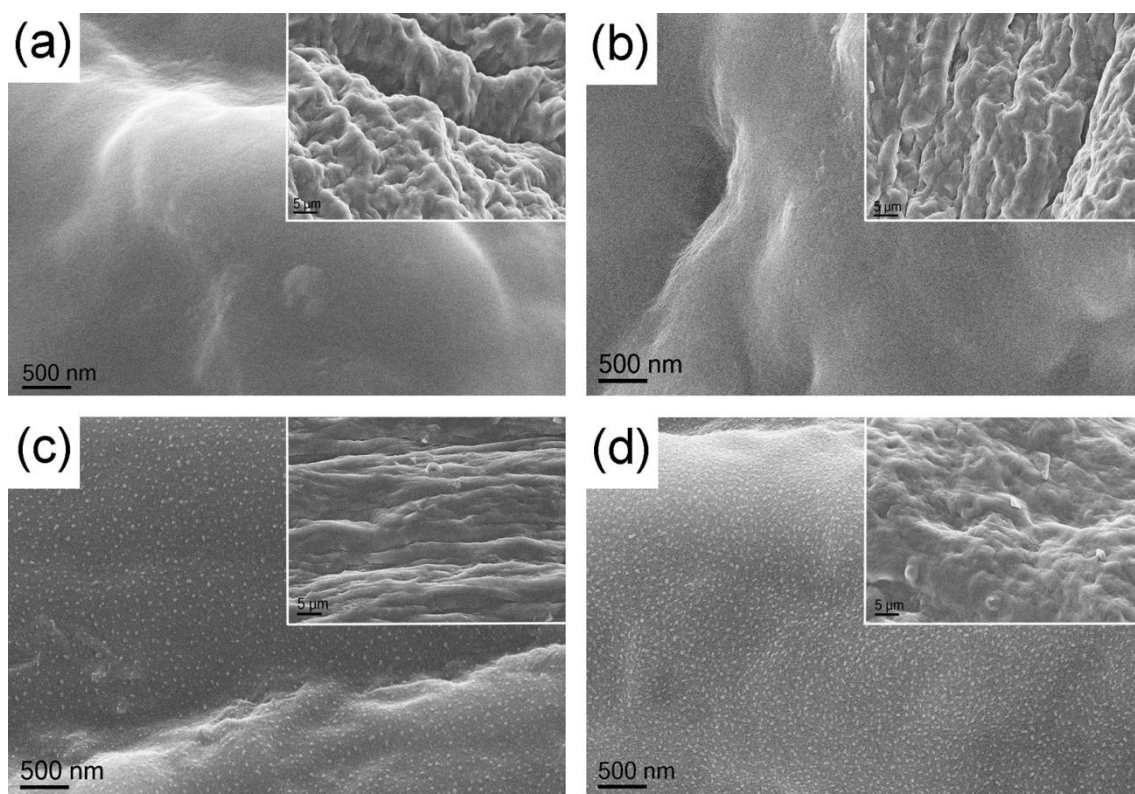
Slika 5.3. UV-vidljivi spektri hidrogelova bez nanočestica srebra: PVA, PVA/Gr, PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr

5.2.2 Skenirajuća elektronska mikroskopija (FE-SEM) i energetska disperziona spektroskopija (EDS)

Metoda skenirajuće elektronske mikroskopije je upotrebljena kako bi se ispitala površinska morfologija hidrogelova sa i bez nanočestica srebra, tj. PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr. Dobijene mikrofotografije su prikazane na slikama 5.4 i 5.5.

Mikrofotografije hidrogelova PVA/0.1CHI i PVA/0.5CHI (slike 5.4a i 5.4b) pri većem uveličanju ($50\ 000\times$) su ukazale na relativno glatku površinu hidrogelova, što potvrđuje homogeno mešanje polimera i njihovu uniformnu distribuciju u novonastaloj matrici hidrogela. S druge strane, mikrofotografije pri nižem uveličanju ($5\ 000\times$) (inserti na slikama 5.4a i 5.4b) su ukazale na mikroporoznu strukturu hidrogelova, što je poželjno svojstvo materijala za obloge za rane, a takođe i pogodno za bolju inkorporaciju i stabilizaciju nanočestica srebra.

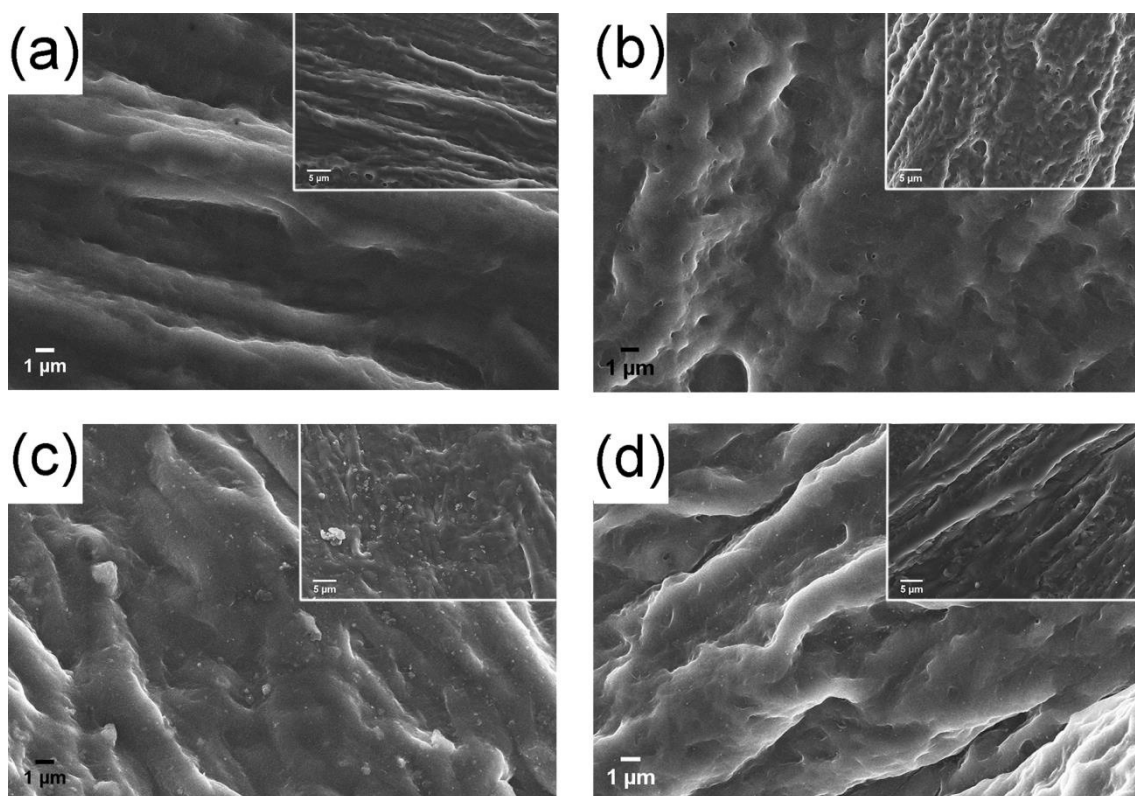
Prisustvo nanočestica srebra u 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI hidrogelovima, potvrđeno je i FE-SEM mikrofotografijama ovih uzoraka (slike 5.4c i 5.4d). Slično kao u slučaju hidrogelova bez srebra, mikrofotografije pri uveličanju od $50\ 000\times$ su pokazale da je struktura polimerne matrice bila pretežno homogena, a takođe su potvrdile i uspešnu inkorporaciju nanočestica srebra, dok su mikrofotografije pri nižem uveličanju ($5\ 000\times$) (inserti na slikama 5.4c i 5.4d) potvrdile poroznost hidrogelova, kao i činjenicu da inkorporacija nanočestica srebra nije značajno uticala na njihovu strukturu.



Slika 5.4. Skenirajuće elektronske mikrofotografije: (a) PVA/0.1CHI, (b) PVA/0.5CHI, (c) 3.9Ag/PVA/0.1CHI i (d) 3.9Ag/PVA/0.5CHI hidrogelova

Mikrofotografije hidrogelova sa grafenom (PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr) su prikazane na slikama 5.5a i 5.5b, i takođe su potvrdile glatku i homogenu strukturu polimerne matrice hidrogela, kao što je to bio slučaj i kod hidrogelova bez Gr, dok su mikrofotografije pri nižem uveličanju (inserti na slikama 5.5a i 5.5b) ukazale na određeni stepen poroznosti samog hidrogela. Osim toga, može se primetiti i da je hidrogel sa većim sadržajem CHI (slika 5.5b) pokazao veći stepen poroznosti, u odnosu na PVA/0.1CHI/Gr.

FE-SEM mikrofotografije hidrogelova sa srebrom (3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr) pri većem (slike 5.5c i 5.5d) i manjem uveličanju (inserti na slikama 5.5c i 5.5d) su potvrdile inkorporaciju nanočestica srebra u nanokompozitnim hidrogelovima, dimenzija manjih od 100 nm. I u slučaju hidrogelova sa srebrom, uzorak sa većim sadržajem CHI (0,5 mas.%) je ispoljio i veću poroznost, što ukazuje na značajan uticaj hitozana na morfologiju hidrogela. Veća mikroporoznost svakako je poželjna za bolju imobilizaciju nanočestica srebra u polimernoj matrici.



Slika 5.5. Skenirajuće elektronske mikrofotografije (a) PVA/0.1CHI/Gr, (b) PVA/0.5CHI/Gr, (c) 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i (d) 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelova

EDS analizom je ispitan površinski sastav hidrogelova sa i bez srebra, a rezultati su prikazani u tabeli 5.2. Sadržaj C, O i N elemenata u svim hidrogelovima odgovara sastavu očekivanom na osnovu strukture polimera, i nije se značajno razlikovao od uzorka do uzorka. Svi uzorci sa većim sadržajem CHI (0,5 mas.%) su imali i veću količinu N, u odnosu na uzorke sa 0,1 mas.% CHI, što je takođe bilo očekivano, s obzirom na veliki broj amino grupa u strukturi hitozana.

Inkorporacija nanočestica srebra je takođe potvrđena i EDS analizom, jer su svi uzorci sa srebrom ispoljili određeni sadržaj Ag. Osim toga, hidrogelovi sa 0,5 mas.% CHI su posedovali i veću količinu srebra – 0,25 at.% (3.9Ag/PVA/0.5CHI) i 0,49 at.% (3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr), u poređenju sa 0,17 at.% (3.9Ag/PVA/0.1CHI) i 0,21 at.% (3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr). Ovi rezultati su ukazali na veći stepen uspešnosti elektrohemijske sinteze nanočestica srebra u hidrogelovima sa većim sadržajem CHI, što se slaže i sa rezultatima UV-vidljive spektroskopije, prikazanim u prethodnom poglavlju. Na kraju, sadržaj elementa Ag u svim hidrogelovima je bio prilično nizak (<0,5 at.%), međutim ni ovo nije previše iznenađujuće, imajući u vidu da EDS tehnika nije veoma osetljiva, kao i da se svrstava samo u površinske tehnike, pa je na osnovu EDS rezultata nemoguće izvući zaključke o sastavu hidrogela po čitavoj zapremini. Zato su ovi rezultati samo ilustrativni i kvalitativni, a preciznije kvantitativno određivanje ukupne količine srebra u hidrogelovima, biće prikazano u kasnijim poglavljima, u okviru ispitivanja procesa otpuštanja srebra metodom atomske apsorpcione spektroskopije.

Tabela 5.2. Površinski sadržaj elemenata (C, O, N, Ag) određen EDS analizom PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9Ag/PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelova

	PVA/0.1CHI	PVA/0.5CHI	3.9Ag/PVA/0.1CHI	3.9Ag/PVA/0.5CHI
C	68,79	67,48	67,02	66,37
N	3,50	4,78	3,88	5,68
O	27,72	27,74	28,93	27,71
Ag	/	/	0,17	0,25
	PVA/0.1CHI/Gr	PVA/0.5CHI/Gr	3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr	3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr
C	66,99	55,44	64,61	63,68
N	4,53	9,97	4,80	7,28
O	28,48	34,59	30,38	28,55
Ag	/	/	0,21	0,49

5.2.3 Dinamičko rasipanje svetlosti (DLS)

Detaljnije ispitivanje prisustva i određivanje srednje raspodele dimenzija nanočestica srebra, inkorporisanih u 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelovima je izvršeno metodom dinamičkog rasipanja svetlosti. DLS je optička metoda koja se zasniva na fenomenu Rejljevog rasipanja svetlosti (monohromatske svetlosti u crveno-narandžastom delu vidljivog spektra, 633 nm) od strane nanočestica, na osnovu čega se može odrediti srednji hidrodinamički prečnik, D_H , nanočestica srebra u rastvoru, kao i kriva raspodele njihovih dimenzija.

Dobijene krive raspodele dimenzija nanočestica srebra, za sva četiri ispitivana hidrogela, su prikazane na slici 5.6. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da su raspodele dimenzija nanočestica bile prilično uske i monomodalne za većinu uzoraka, sa očekivanom srednjom vrednošću manjom od 10 nm. Raspodele dimenzija na osnovu intenziteta svetlosti, I , rasute od strane nanočestica (slike 5.6a i 5.6b), su pokazale da se 99,3 % nanočestica srebra u hidrogelu 3.9Ag/PVA/0.1CHI nalazi u grupi veličine 9,09 nm, dok se u slučaju 3.9Ag/PVA/0.5CHI hidrogela većina nanočestica (98,6 %) nalazila u grupi prečnika 8,14 nm. U slučaju hidrogelova sa grafenom (slika 5.6b), 96,7 % nanočestica srebra je bilo u grupi 9,97 nm (3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr), dok je hidrogel sa većim sadržajem hitozana (3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr) zapravo pokazao bimodalnu raspodelu dimenzija nanočestica, sa dva pika na 1,76 nm (9,3 %) i 8,22 nm (80,7 %), redom. Ovi rezultati su pokazali da su hidrogelovi sa 0,5 mas.% hitozana sadržali i nanočestice srebra manjih dimenzija, što je naročito primetno u slučaju hidrogela sa grafenom, 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr, koji je sadržao i određeni udeo nanočestica čak i manjih od 2 nm. Na dobijene krive raspodele veličina se može primeniti Debajeva teorija rasipanja svetlosti, pomoću koje se, na osnovu izmerenog intenziteta rasute svetlosti, može odrediti zapremina nanočestica srebra. Na ovaj način se mogu dobiti krive raspodele dimenzija nanočestica srebra, koje ukazuju na to koliki udeo u ukupnoj zapremini zauzimaju nanočestice određenih dimenzija. Razlika u ova dva načina predstavljanja raspodele dimenzija sastoji se u tome što intenzitet rasute svetlosti raste sa porastom dimenzija nanočestica srebra, te će i pikovi krupnijih nanočestica srebra biti veći na krivama raspodele na osnovu intenziteta rasute svetlosti. S druge strane, ako se u rastvoru nalazi veći broj sitnijih nanočestica srebra, prelazak na raspodelu dimenzija na osnovu njihove zapremine će pokazati veće pikove za nanočestice manjih dimenzija, pa se na taj način može ostvariti detaljniji uvid u realan broj nanočestica srebra određenih dimenzija u datom sistemu, naravno pod pretpostavkom da su one sfernog oblika (što je potvrđeno UV-vidljivom spektroskopijom i TEM merenjima,

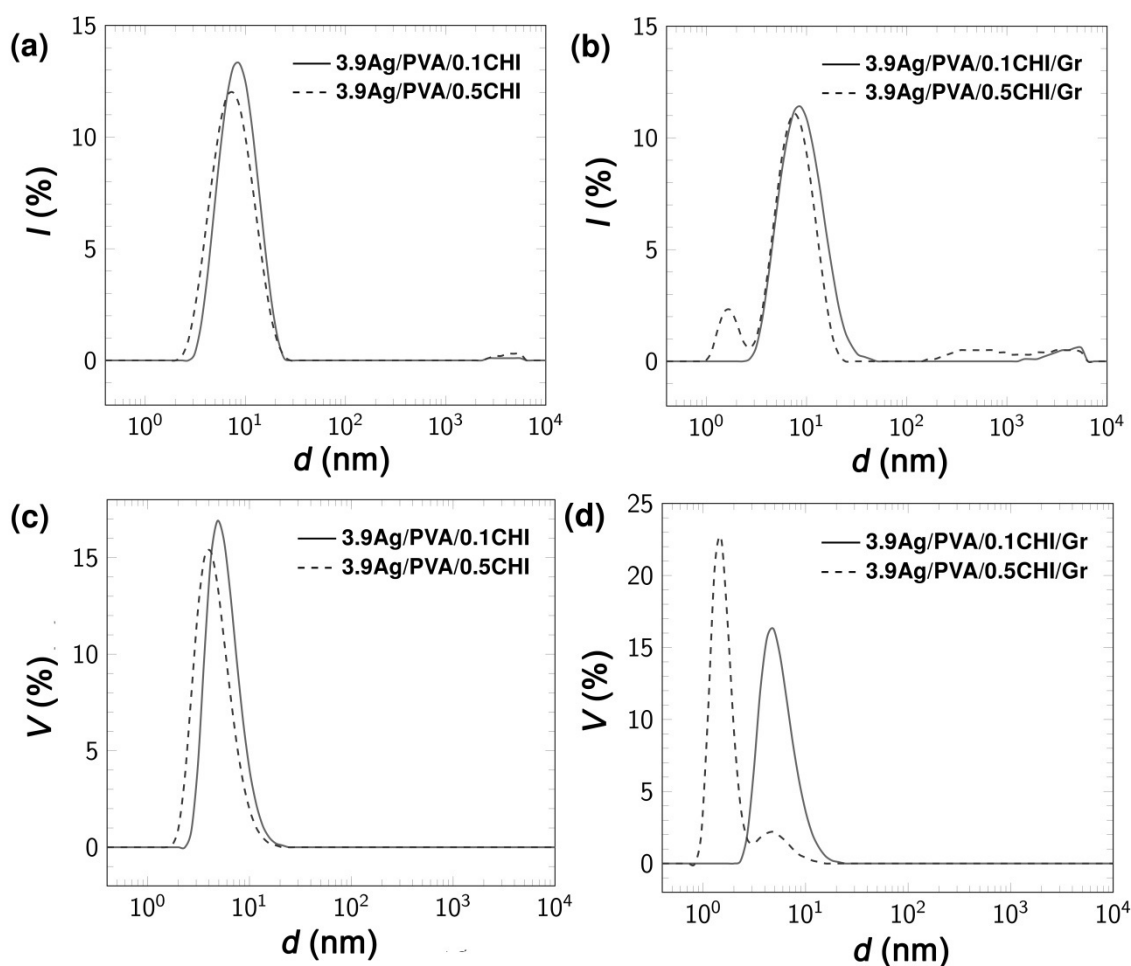
poglavlja 5.2.1 i 5.2.4, redom). Transformacijom krivih raspodela dimenzija na osnovu zapremine nanočestica, V , grupa veoma sitnih nanočestica u 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelu (slika 5.6d) postaje još dominantnija – 87,0 % (zapreminskih) nanočestica srebra se nalazi u grupi sa pikom na oko ~1,57 nm (ostalih 13 % nanočestica je bilo u grupi 5,43 nm). Slična transformacija na zapreminsku osnovu prikazivanja krivih raspodele dimenzija se može izvršiti i za ostale uzorke (slike 5.6c i 5.6d), pa tako zapreminski udeli broja nanočestica srebra iznose 100 % u grupama od 5,92 nm (3.9Ag/PVA/0.1CHI) i 4,78 nm (3.9Ag/PVA/0.5CHI). Ovakvim sagledavanjem rezultata može se zaključiti da su zapravo sve nanočestice srebra u oblasti nano-dimenzija, kao i da je efekat aglomeracije zanemarljiv, iako su na krivim raspodela dimenzija po intenzitetu (slike 5.6a i 5.6b) primećeni i pikovi znatno većih prečnika (~3000 nm). Prelaskom na zapreminske udele broja nanočestica ovi pikovi su nestali, što ukazuje na to da se ukupan broj takvih aglomerata praktično može zanemariti, kao i da ovi pikovi najverovatnije potiču od isprepletanih makromolekulskih lanaca u rastvoru hidrogela. Ova pretpostavka je proverena tako što su DLS merenja izvršena i na rastvorima hidrogelova bez nanočestica srebra. Dobijene krive raspodele dimenzija za ove uzorke su pokazale veoma haotičan izgled i multimodalnu raspodelu dimenzija sa velikim brojem pikova različitih dimenzija, uključujući i one veće od 100 nm i 1000 nm, i sa veoma velikom vrednošću indeksa polidisperznosti ($PDI \approx 1$). Osim toga, položaj, broj i oblik pikova se značajno razlikovao od merenja do merenja za jedan isti uzorak, što ukazuje na to da ovi pikovi najverovatnije potiču od isprepletanih polimernih lanaca, koji se dinamički prepliću i raspliću i u rastvoru se nalaze u obliku statističkog klupka.

Srednje vrednosti hidrodinamičkih prečnika (D_H) i indeksa polidisperznosti (PDI) su prikazane u tabeli 5.3. Dobijene srednje vrednosti D_H se dobro slažu sa dobijenim raspodelama dimenzija nanočestica srebra, i takođe ukazuju na trend manjih dimenzija nanočestica u hidrogelovima sa većim sadržajem hitozana, što ide u prilog pretpostavci da prisustvo hitozana u hidrogelu umnogome doprinosi stabilizaciji nanočestica. Vrednosti indeksa polidisperznosti su bile relativno visoke, a posebno u slučaju hidrogelova sa grafenom, što ukazuje na činjenicu da nanočestice srebra nisu bile monodisperzne ni u jednom od uzoraka. Međutim, moguće je da su pikovi krupnijih agregata, prisutnih na krivim raspodela veličina nanočestica u svim hidrogelovima (slike 5.6a i 5.6b), doprineli povećanju vrednosti PDI. Kao što je već spomenuto, ovi pikovi najverovatnije potiču od makromolekulskih lanaca samih polimera, a ne od nanočestica srebra, tako da je moguće da su stvarne vrednosti PDI za raspodele dimenzija samih nanočestica nešto niže.

Rezultati DLS merenja su nedvosmisleno potvrdili uspešnu elektrohemijsku sintezu nanočestica srebra veoma malih dimenzija unutar polimernih matrica hidrogelova, što je svakako poželjno imajući u vidu da sitnije nanočestice srebra obično pokazuju jaču antibakterijsku aktivnost [298]. Vizuelna potvrda uspešne elektrohemijske sinteze i izgleda i dimenzija dobijenih nanočestica je dalje izvršena pomoću transmisiona elektronske mikroskopije, koja će biti prikazana u narednom poglavlju.

Tabela 5.3. Srednje vrednosti hidrodinamičkih prečnika nanočestica srebra i indeksi polidisperznosti (PDI) raspodela njihovih dimenzija u hidrogelovima 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr, određene metodom DLS

Hidrogel	D_H (nm)	PDI
3.9Ag/PVA/0.1CHI	7,33 ± 0,088	0,211 ± 0,013
3.9Ag/PVA/0.5CHI	6,11 ± 0,10	0,269 ± 0,009
3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr	8,06 ± 0,098	0,265 ± 0,032
3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr	6,38 ± 0,12	0,387 ± 0,079



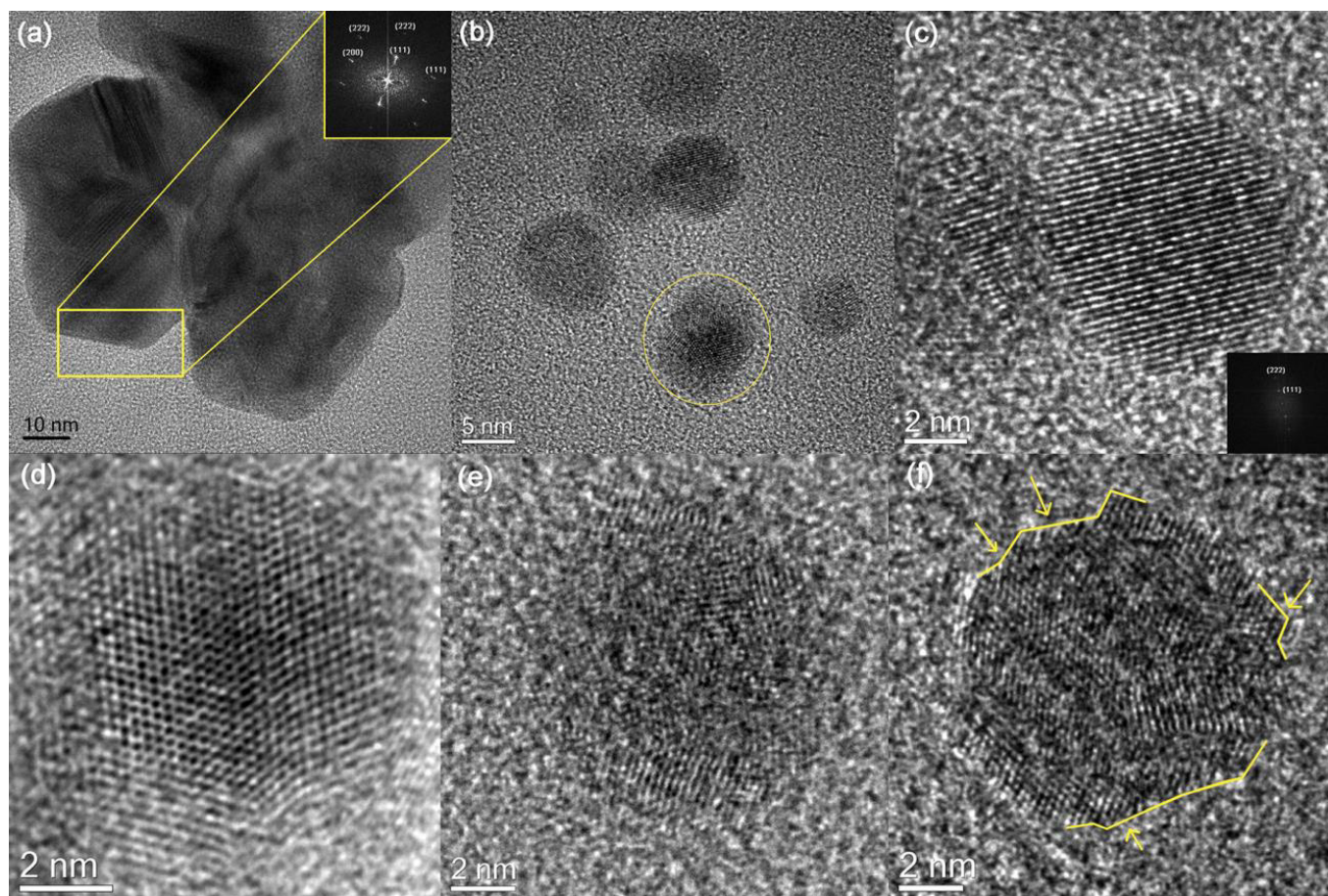
Slika 5.6. Raspodele veličina nanočestica srebra u hidrogelovima (a,c) 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI, (b,d) 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr, preračunate na osnovu (a,b) intenziteta rasute svetlosti, (c,d) zapremine nanočestica

5.2.4 Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)

Na slici 5.7 su prikazane TEM mikrofotografije hidrogelova 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9Ag/PVA/0.5CHI, a na slici 5.8 – hidrogelova 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr. Kod svih uzoraka, primećene su nanočestice malih dimenzija, ali i određeni broj krupnijih aglomerata, za koje je moguće da su nastali rastom nanočestica tokom elektrohemijske sinteze ili aglomeracijom u hidrogelu tokom stajanja, ali mogu biti i posledica procesa pripreme uzoraka za TEM (rastvaranje hidrogelova, nakapavanje na Cu mrežice i sušenje). Na primer, aglomerat u 3.9Ag/PVA/0.1CHI hidrogelu (slika 5.7a) se zapravo sastoji od nekoliko pojedinačnih nanočestica sa oštro izraženim fasetama, paralelnim sa ravnima $\{111\}$ i $\{100\}$. Slike dobijene brzo Furijeovom transformacijom (eng. *fast Fourier transform*, FFT) (insert na slici 5.7a) su potvrdile površinski centrirano kubnu (PCK) strukturu kristalne rešetke nanočestica srebra. U ovom uzorku su takođe pronađene i sitnije, polikristalne nanočestice (5-10 nm) (slika 5.7b), koje su imale pretežno dekaedarski oblik, sa neregularnim petostrukim srastanjem kristala („kristalni dvojnici”). Ovakva morfologija je očekivana i tipična za nanočestice manjih dimenzija (<20 nm) usled njihove težnje ka najpovoljnijem energetskom stanju [247]. Dok su nanočestice krupnije od 5-10 nm imale pretežno polikristalnu strukturu sa izraženim stepenom srastanja, one sitnije (≈ 5 nm i manje) su bile uglavnom monokristalne, kao npr. nanočestica na slici 5.7c, koja je monokristalna i ima kuboktaedarski oblik. Moguće je da ovakva monokristalna struktura sitnijih nanočestica srebra ukazuje na povoljne interakcije nanočestica sa polimernim lancima u hidrogelu, koje bi mogle da

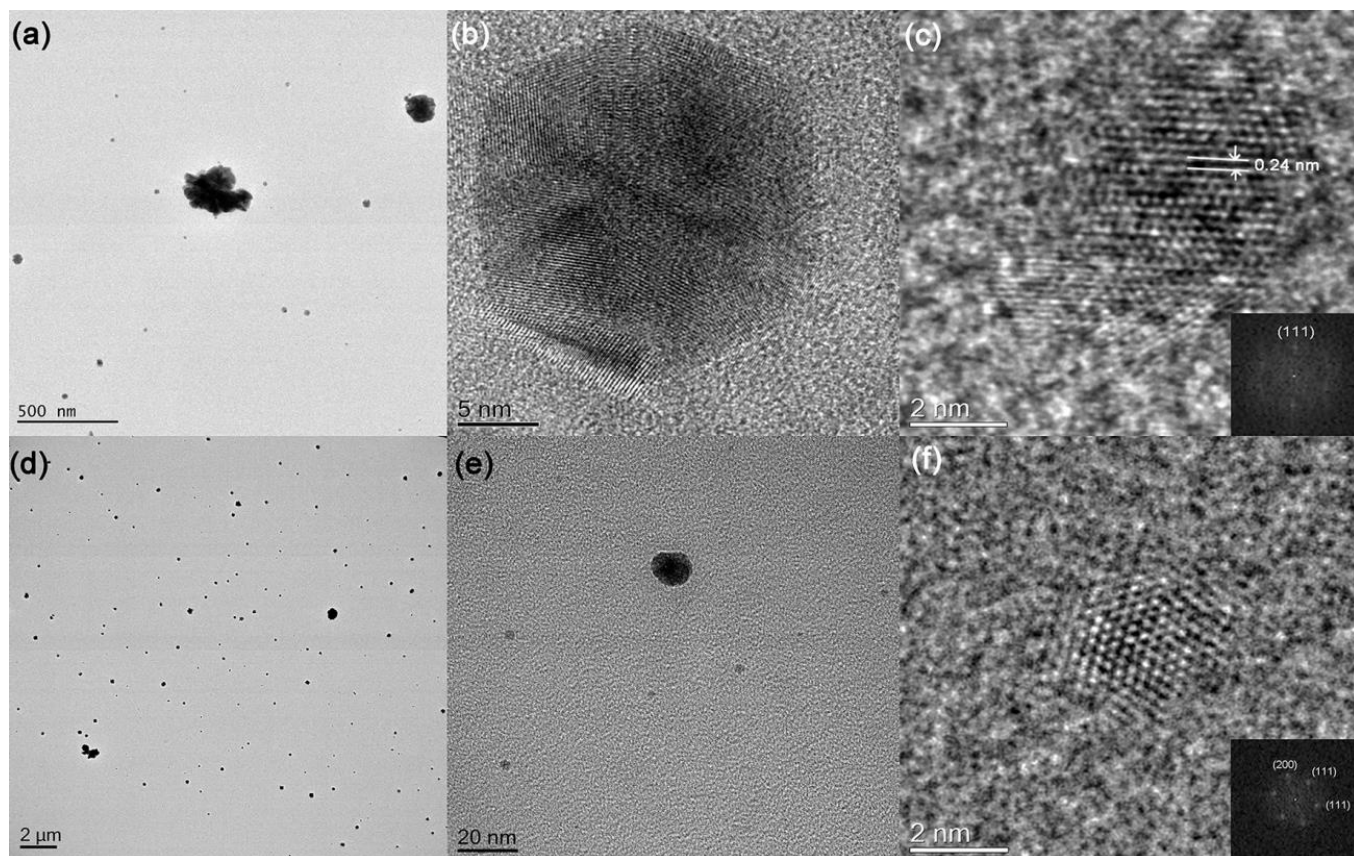
potpomognu smanjenje površinske energije nanočestica i doprinesu njihovoj stabilizaciji, usled čega je moguće formiranje inače visokoenergetskih struktura.

U slučaju 3.9AgPVA/0.5CHI hidrogela (slika 5.7d-f), primećen je veći broj nanočestica srebra veoma malih dimenzija (slika 5.7d), kao i manji broj aglomerata, što bi moglo biti posledica bolje stabilizacije nanočestica srebra u hidrogelovima sa većim sadržajem CHI [295,299]. Krupnije nanočestice ($\geq 5-10$ nm) su bile polikristalne, i sastojale su se od većeg broja kristalita, bez posebno uređene poliedarske strukture (slika 5.7e). Takođe su primećene i nanočestice sa oštrim ivicama i nepravilnim površinama, što je ukazano strelicama na slici 5.7f. Ranije je pokazano da nanočestice sa površinskim defektima ispoljavaju jači citotoksičan efekat prema ćelijama ribljih škrga, u poređenju sa nanočesticama regularne strukture [197]. Na osnovu toga, neregularnost strukture nanočestica srebra u 3.9AgPVA/0.5CHI hidrogelu bi mogla da utiče kako na citotoksičnost, tako i na antibakterijsku aktivnost hidrogela. Osim toga, površinski defekti kao što su oštre ivice, uglovi i površinska naelektrisanja, su se pokazali kao bitan faktor u mehanizmu antibakterijske aktivnosti nanočestica ZnO [300], jer pospešuju nastajanje reaktivnih vrsta kiseonika (eng. *reactive oxygen species*, ROS) [301]. Nastajanje ROS jedinjenja se takođe često spominje u istraživanjima kao jedan od mogućih mehanizama antibakterijske aktivnosti nanočestica srebra [302,303]. Postojanje defekata na površini nanočestica srebra bi tako moglo dovesti do pojačanog formiranja ROS jedinjenja, pa i do poboljšanja antibakterijske aktivnosti. Takođe je pokazano i da sitnije nanočestice ispoljavaju značajno jaču antibakterijsku aktivnost [298], što je nesumnjivo pogodno za primenu hidrogelova u obliku aktivnih materijala za obloge za rane.



Slika 5.7. Transmisione elektronske mikrofotografije nanočestica srebra u (a,b,c) 3.9Ag/PVA/0.1CHI i (d,e,f) 3.9Ag/PVA/0.5CHI hidrogelovima

Što se tiče hidrogelova sa grafenom (3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr), primećeni su slični trendovi u obliku i strukturi nanočestica srebra, kao i u slučaju hidrogelova bez Gr. Nanočestice srebra su imale pretežno sitne dimenzije, kako u 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr, tako i u 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr, ali i uz određeni stepen aglomeracije (slike 5.8a i 5.8d). Tipičan primer nanočestice u hidrogelu 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr (slika 5.8b), je ukazao na kuboktaedarsku strukturu sa cikličnim šestostrukim srastanjem kristalnih dvojnika. Osim toga, u ovom hidrogelu su primećene i nanočestice još manjih dimenzija (≈ 5 nm) (slika 5.8c) sa rastojanjem kristalnih ravni od 0,24 nm, što odgovara familiji ravni {111} površinski centrirane kubne kristalne rešetke srebra, što je utvrđeno FFT transformacijom mikrofotografije (insert na slici 5.8c). S druge strane, u strukturi 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogela je primećen značajno veći broj veoma sitnih nanočestica, dimenzija čak i do ≈ 2 nm (slika 5.8f), koje su se nalazile u okolini nešto krupnijih nanočestica 10-20 nm (slika 5.8e), ili čak i većih agregata (>200 nm). FFT transformacijom slike 5.8f, izmerena su rastojanja između kristalnih ravni od 0,24 nm i 0,20 nm, koja odgovaraju familijama kristalnih ravni {111} i {200}. Dakle, slično kao u slučaju hidrogelova bez Gr, i ovde je primećen trend smanjenja dimenzija nanočestica srebra sa povećanjem sadržaja hitozana u hidrogelu, što svakako pogoduje poboljšanju antibakterijskih svojstava nanokompozitnih hidrogelova. Ovi zaključci se takođe dobro slažu i sa rezultatima DLS analize (poglavlje 5.2.3).



Slika 5.8. Transmisione elektronske mikrofotografije nanočestica srebra u (a,b,c) 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i (d,e,f) 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelovima

5.2.5 Rendgenska fotoelektronska spektroskopija (XPS)

Rendgenska fotoelektronska spektroskopija je korišćena kako bi se ispitala struktura hidrogelova, prirode veza, kao i površinski sastav elemenata u hidrogelovima PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9AgPVA/0.5CHI, kao i PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9AgPVA/0.5CHI/Gr. XPS spektri visoke rezolucije za C1s, N1s, O1s i Ag3d linije su prikazani na slikama 5.9, 5.10, 5.11 i 5.12, redom. Svaki od spektara visoke rezolucije fitovan je kako bi se izvršila dekonvolucija pikova i utvrdile prirode veza od kojih potiče svaki spektar. Dekonvolucija i fitovanje pikova dobijenih spektara visoke rezolucije je izvršeno pomoću programa OriginPro 8.5 (OriginLab Corp., SAD). Korekcija energetske skale usled naelektrisanja površine je izvršena na spektralnoj liniji za ugljenične nečistoće na energiji veze od 284,8 eV. Svi pikovi su fitovani krivama Gausovog (*Gauss*) i Figt (*Voigt*) tipa, dok je korekcija bazne linije izvršena metodama Širli (*Shirley*) i Tugard (*Tougaard*). Ograničenja parametara pikova su podešena tako da se u okviru spektra visoke rezolucije jednog nivoa, širine na poluisini (eng. *full width at half maximum*, FWHM) svih pikova razlikuju za maksimalno $\pm 0,2$ eV (ili da budu potpuno jednake). Za dublete Ag3d pikova, uvedena su dodatna ograničenja tako da su odnosi površina pikova ($\text{Ag3d}_{3/2} : \text{Ag3d}_{5/2}$) iznosili 2:3.

C1s spektar visoke rezolucije (slika 5.9) razložen u slučaju svih hidrogelova na četiri glavna pika, za koje su vrednosti energije veze (E_b) prikazane u tabeli 5.4, uz pripisane odgovarajuće veze koje se javljaju na datim energijama, tj. C-C/C-H, C-O/C-OH, C-N i C=O [304,305]. Sve ove veze potiču od osnovnih polimernih lanaca i funkcionalnih grupa. Vrednosti energije veze na kojima se nalaze ovi pikovi nisu se značajno promenile od uzorka do uzorka (tabela 5.4), i rezultati pokazuju dobro slaganje dobijenih vrednosti za različite hidrogelove.

U slučaju N1s spektralne linije (slika 5.10), pre svega je primećen prvi pik na energijama veze oko 399-400 eV (tabela 5.4), koji se može pripisati N-H vezama iz primarnih amino grupa na lancu CHI [306]. U slučaju PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr (slika 5.10b), hidrogelova, primećen je i drugi pik na nešto višim energijama veze (402,3 i 402,1 eV, redom, tabela 5.4), koji se može pripisati N-(C=O)- vezama iz amidnih grupa hitozana [307], ili pak N-H vezama iz protonovanih amina, koji se obično javljaju na sličnim energijama veze [308]. Pojava novog pika je takođe primećena i u slučaju 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9AgPVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9AgPVA/0.5CHI/Gr hidrogelova (tabela 5.4); međutim, više energije veza ovih pikova ukazuju na to da oni ne potiču od amidnih grupa, već od N-O veza u nitratnim grupama ($-\text{NO}_3$) [309], koje potiču od zaostalih soli nakon bubrenja hidrogelova u rastvoru $\text{AgNO}_3/\text{KNO}_3$ pre elektrohemijske sinteze nanočestica srebra.

O1s spektralne linije (slika 5.11) su fitovane pomoću 3 pika (tabela 5.4), čije su pozicije odgovarale vezama C-O, C-OH i C=O, redom, što potvrđuje prisustvo navedenih veza koje je već utvrđeno analizom C1s spektara. Položaji ovih pikova se nisu značajno razlikovali među različitim uzorcima (tabela 5.4). Međutim, površina pikova C-OH (slika 5.11) je bila značajno veća od ostalih pikova za sve hidrogelove, što je moglo biti i očekivano usled velikog broja hidroksilnih grupa na lancima oba polimera.

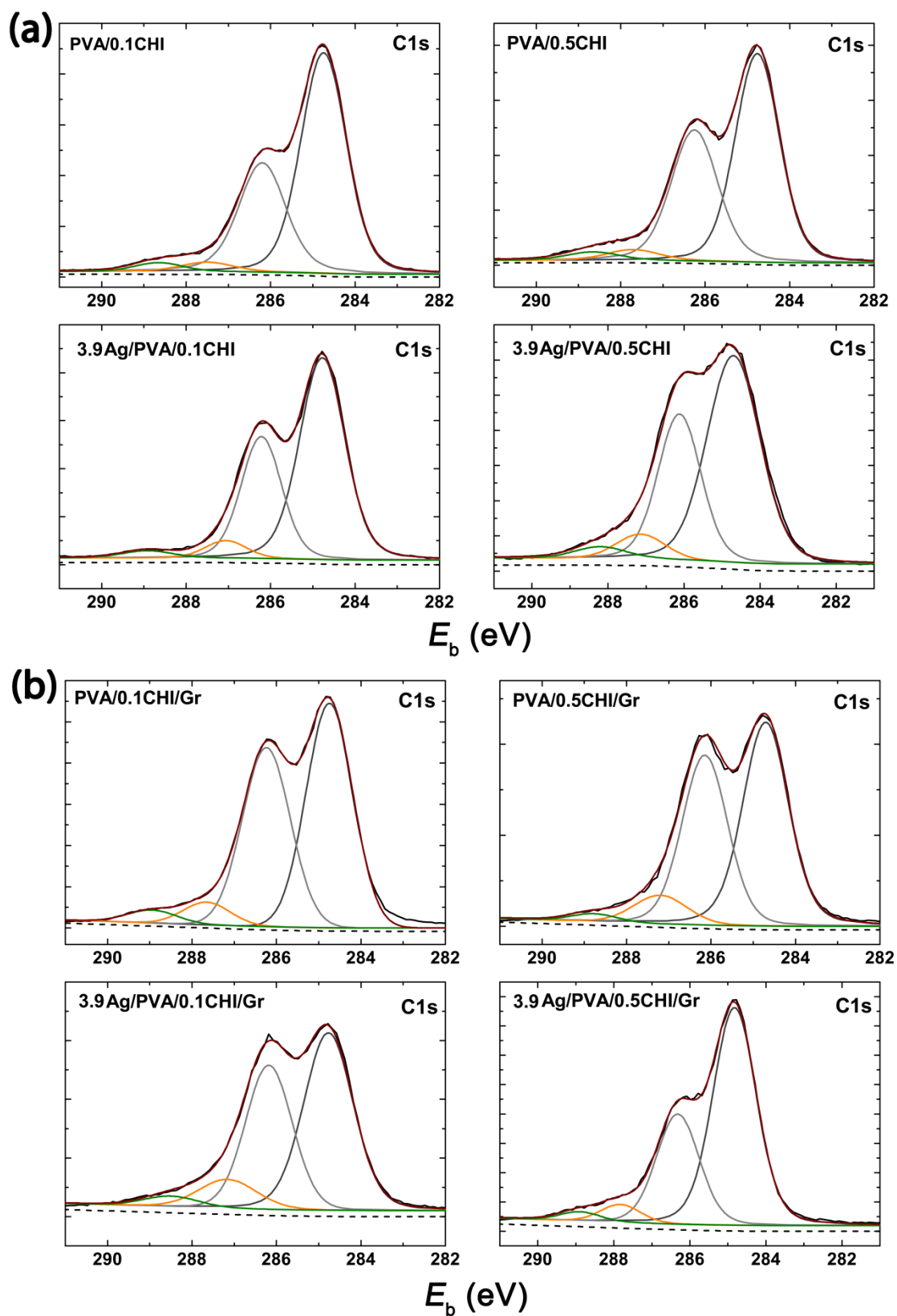
Prisustvo metalnog srebra, odnosno uspešna sinteza nanočestica srebra, potvrđena je karakterističnim izgledom Ag3d spektralnih linija (slika 5.12). Karakteristična pojava dubleta ovih pikova – $\text{Ag3d}_{5/2}$ i $\text{Ag3d}_{3/2}$ na energijama veze od oko 368 i 374 eV, redom (tabela 5.4), potvrđuje prisustva metala u elementarnom stanju, a posledica je spin-orbitalnog razdvajanja pikova [310–312], koji se nalaze na razmaku od oko ≈ 6 eV u spektrima svih hidrogelova (3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9AgPVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9AgPVA/0.5CHI/Gr).

Relativan površinski sadržaj C, O, N i Ag elemenata u hidrogelovima je izračunat na osnovu površina pikova na spektrima visoke rezolucije, a uzimajući u obzir srednje relativne faktore osetljivosti (eng. *average matrix relative sensitivity factors*, AMRSF) za odgovarajuće spektralne

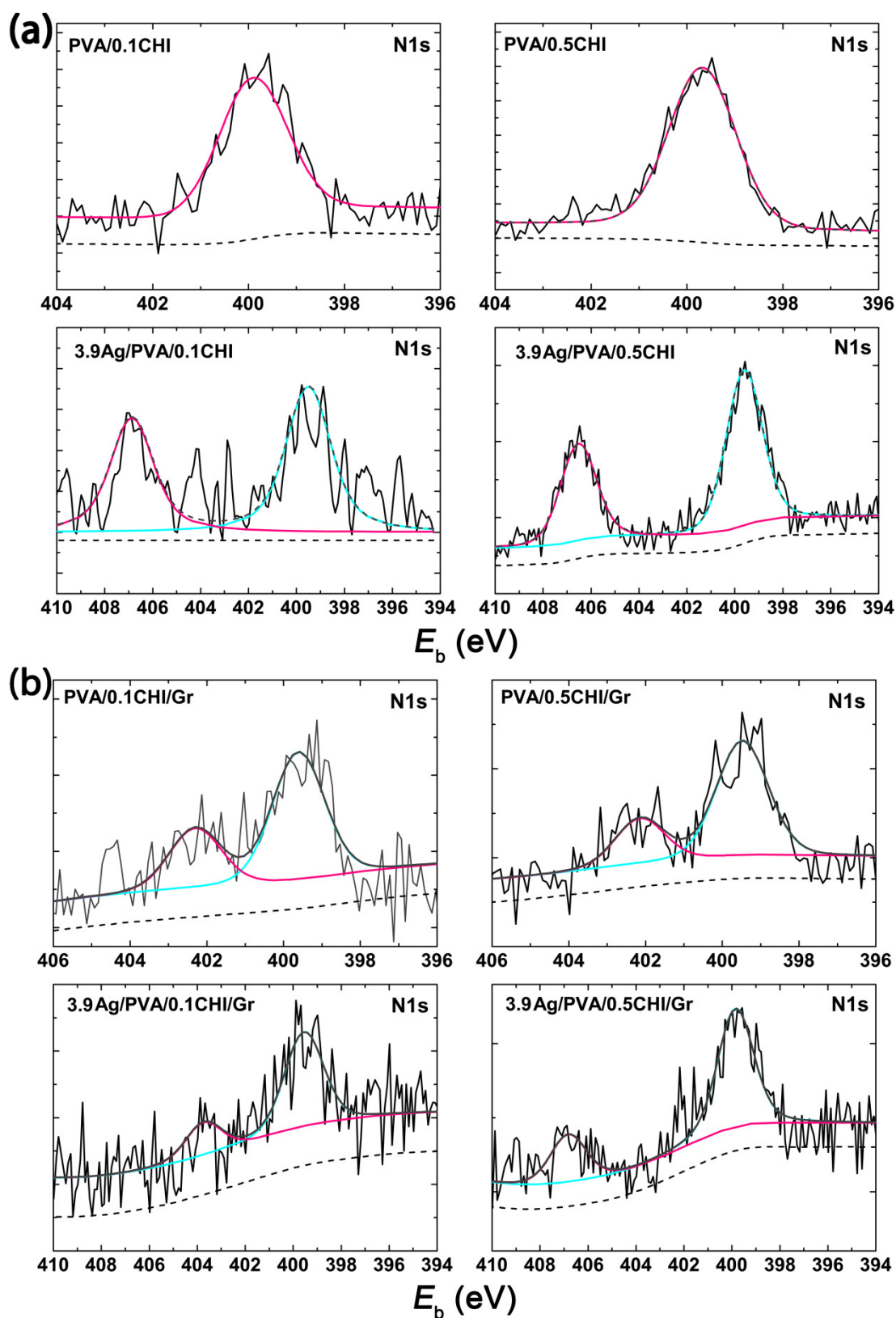
linije i za Al izvor X-zraka [313]. Proračun je izvršen tako što je određena površina svakog od pikova visoke rezolucije (C1s, O1s, N1s i Ag3d), koje su zatim podeljene sa odgovarajućim AMRSF faktorima za dati element, preuzetim iz literaturnih tablica, te su tako dobijene normirane površine pikova. Atomski udeo svakog od elemenata određen je deljenjem normirane površine datog pika sa sumom normiranih površina svih pikova za jedan uzorak. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 5.5. Prilikom interpretacije rezultata sadržaja elemenata određenog XPS analizom, trebalo bi uvek imati na umu da oni ne moraju odražavati stvarni sastav hidrogelova, jer je XPS površinska tehnika sa relativno niskom dubinom analize (≈ 10 nm), pa se i dobijeni rezultati odnose samo na neposrednu površinu uzorka (zbog čega se i nazivaju „relativnim” sadržajem elemenata). Sadržaj N, C i O je bio generalno dobro uravnotežen i u skladu sa očekivanim sastavom za sve uzorke, a hidrogelovi sa višim sadržajem CHI (0,5 mas.%) su sadržali veću količinu N, što je takođe bilo očekivano. Sadržaj Ag, s druge strane, nije dao rezultate koji su bili očekivani na osnovu UV-vidlive spektroskopije (poglavlje 5.2.1), koja je pokazala da hidrogelovi sa 0,5 mas.% sadrže i značajno veću koncentraciju nanočestica srebra. Rezultati XPS analize su pokazali obrnuto, tj. 3.9AgPVA/0.5CHI hidrogel je sadržao manji udeo Ag (1,9 at.%), u poređenju sa 3.9AgPVA/0.1CHI (2,6 at.%). U slučaju hidrogelova 3.9AgPVA/0.5CHI/Gr (1,6 at.%) i 3.9AgPVA/0.1CHI/Gr (1,5 at.%), situacija je bila bliža očekivanoj, ali su razlike između dva uzorka bile gotovo zanemarljive (tabela 5.5). Međutim, imajući u vidu činjenicu da se rezultati XPS analize odnose samo na površinski sastav hidrogelova, kao i da su atomski udeli Ag bili vrlo niski pa su moguće veće greške i varijacije usled granice osetljivosti instrumenta, ove rezultate treba uzeti sa rezervom, a kvantitativno određivanje sadržaja srebra u hidrogelovima je takođe izvršeno i drugim, pogodnijim tehnikama, čiji će rezultati biti prikazani u nastavku rada. Ono što je XPS analiza nedvosmisleno pokazala je da su nanočestice srebra zaista prisutne u hidrogelovima, što je u skladu i sa UV-vidljivom spektroskopijom.

Tabela 5.4. Položaji (energije veze, E_b) karakterističnih pikova na C1s, N1s, O1s i Ag3d spektrima visoke rezolucije, za hidrogelove PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9Ag/PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr, određeni metodom rendgenske fotoelektronske spektroskopije

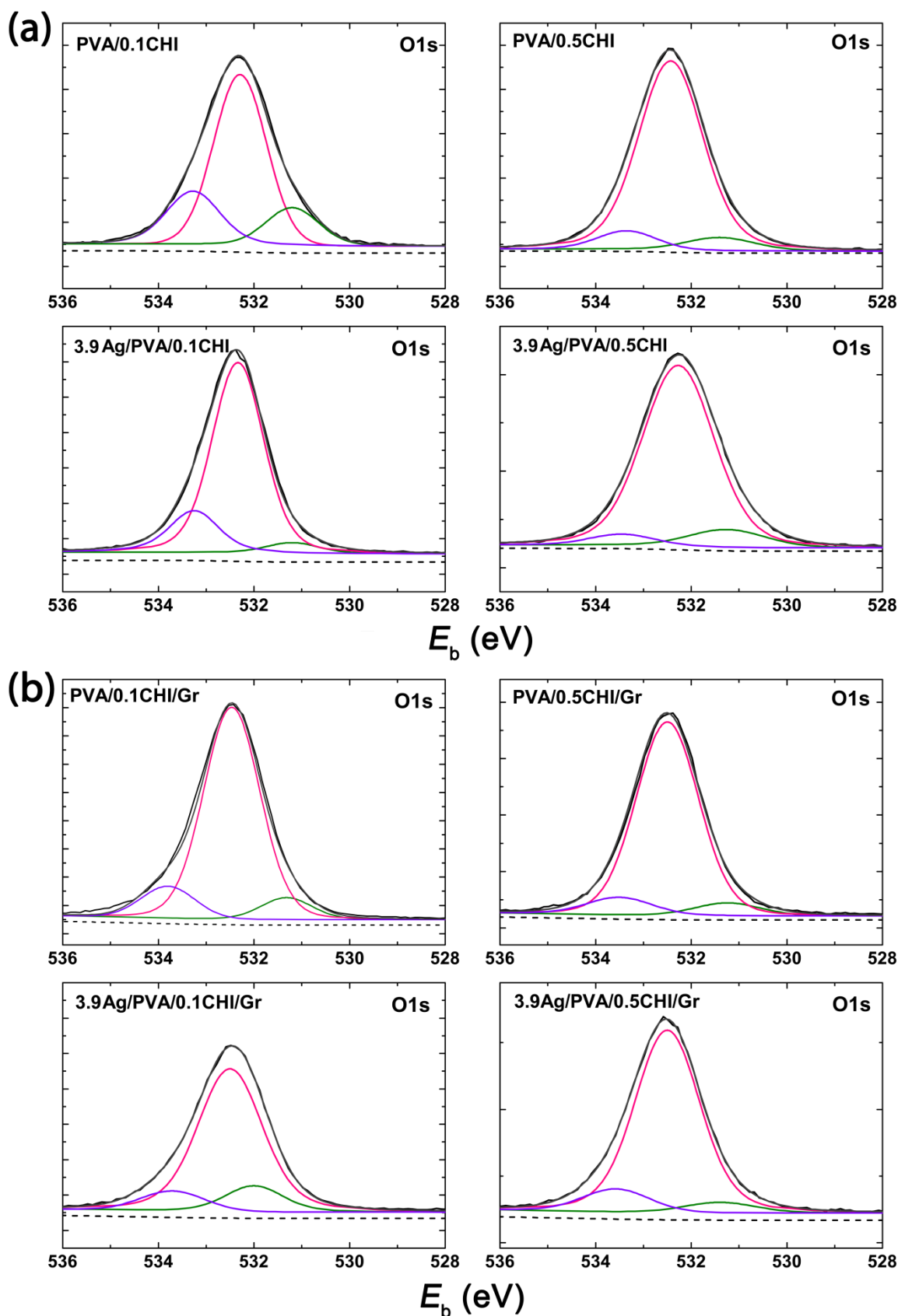
	E_b (eV)							
veza	PVA/0.1CHI	PVA/0.5CHI	3.9Ag/PVA/0.1CHI	3.9Ag/PVA/0.5CHI	PVA/0.1CHI/Gr	PVA/0.5CHI/Gr	3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr	3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr
C1s								
C-C/ C-H	284,7	284,8	284,8	284,7	284,7	284,8	284,8	284,7
C-O/ C-OH	286,2	286,2	286,2	286,1	286,2	286,1	286,2	286,3
C-N	287,5	287,7	287,1	287,1	287,6	287,2	287,2	287,8
C=O	288,6	288,7	288,9	288,2	288,9	288,8	288,5	288,9
N1s								
N-H	399,9	399,7	399,5	399,6	399,6	399,5	399,5	399,8
N-(C=O)- (ili N-H iz NH_3^+)	/	/	/	/	402,3	402,1	/	/
N-O (iz NO_3)	/	/	≈407	≈406,5	/	/	≈404	≈407
O1s								
C-O	531,2	531,4	531,2	531,3	531,3	531,2	532,0	531,4
C-OH	532,3	532,4	532,3	532,3	532,5	532,5	532,5	532,5
C=O	533,3	533,4	533,2	533,5	533,8	533,5	533,7	533,6
Ag3d								
Ag3d _{5/2}	/	/	368	368	/	/	368	368
Ag3d _{3/2}	/	/	374	374	/	/	374	374



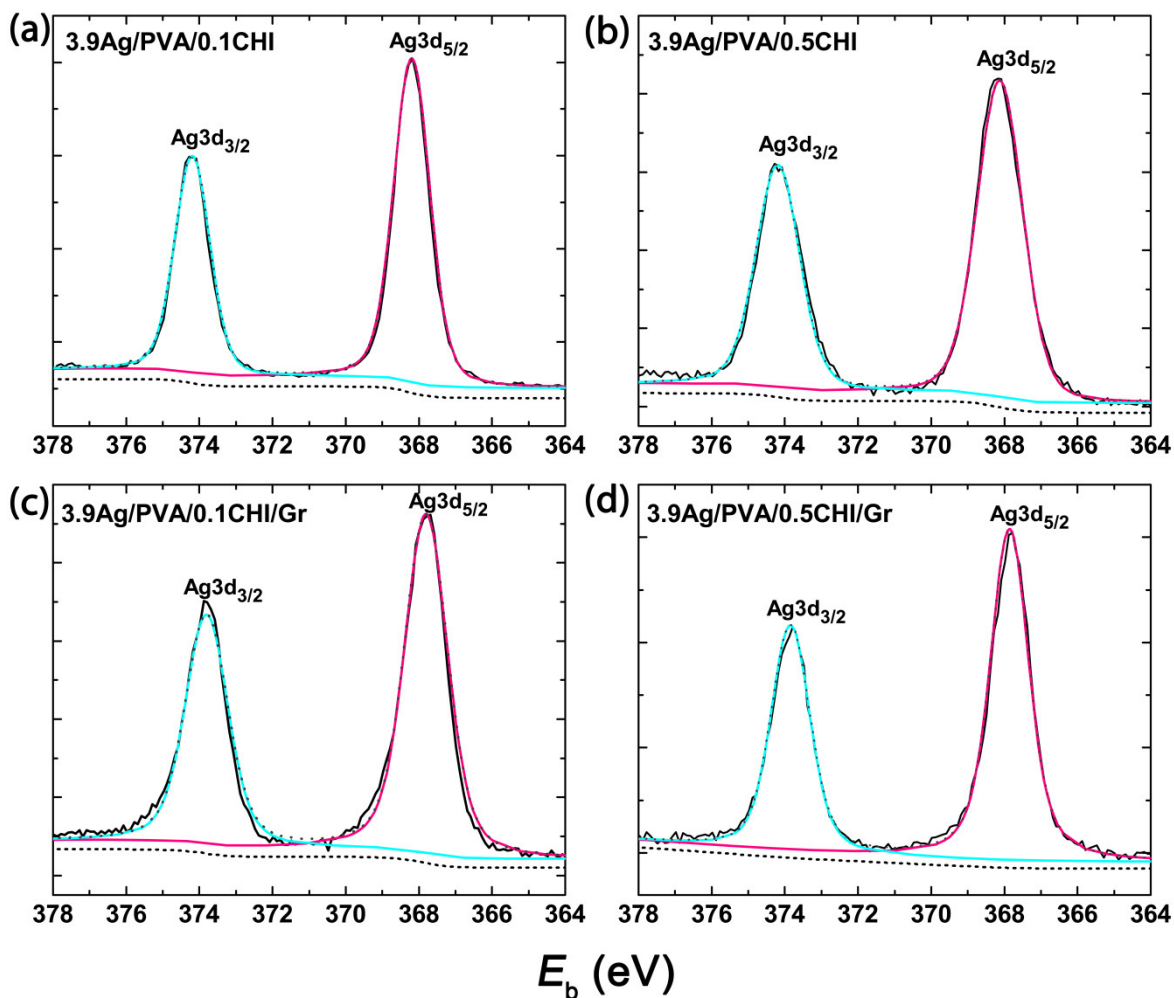
Slika 5.9. XPS spektri visoke rezolucije C1s pika za hidrogelove: (a) PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI i (b) PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr



Slika 5.10. XPS spektri visoke rezolucije N1s pika za hidrogelove: (a) PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI i (b) PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr



Slika 5.11. XPS spektri visoke rezolucije O1s pika za hidrogelove: (a) PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI i (b) PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr



Slika 5.12. XPS spektri visoke rezolucije Ag3d pika za hidrogelove: (a) 3.9Ag/PVA/0.1CHI, (b) 3.9Ag/PVA/0.5CHI, (c) 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i (d) 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr

Tabela 5.5. Površinski sadržaji elemenata (C, O, N, Ag) u hidrogelovima PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9Ag/PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr, određeni metodom rendgenske fotoelektronske spektroskopije

	PVA/0.1CHI	PVA/0.5CHI	3.9Ag/PVA/0.1CHI	3.9AgPVA/0.5CHI
C 1s	75,2	72,2	69,1	65,4
O 1s	23,7	26,3	26,8	29,2
N 1s	1,1	1,5	1,5	3,5
Ag 3d	/	/	2,6	1,9
	PVA/0.1CHI/Gr	PVA/0.5CHI/Gr	3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr	3.9AgPVA/0.5CHI/Gr
C 1s	75,1	71,1	70,5	73,6
O 1s	24,4	28,1	27,4	23,4
N 1s	0,50	0,80	0,60	1,4
Ag 3d	/	/	1,5	1,6

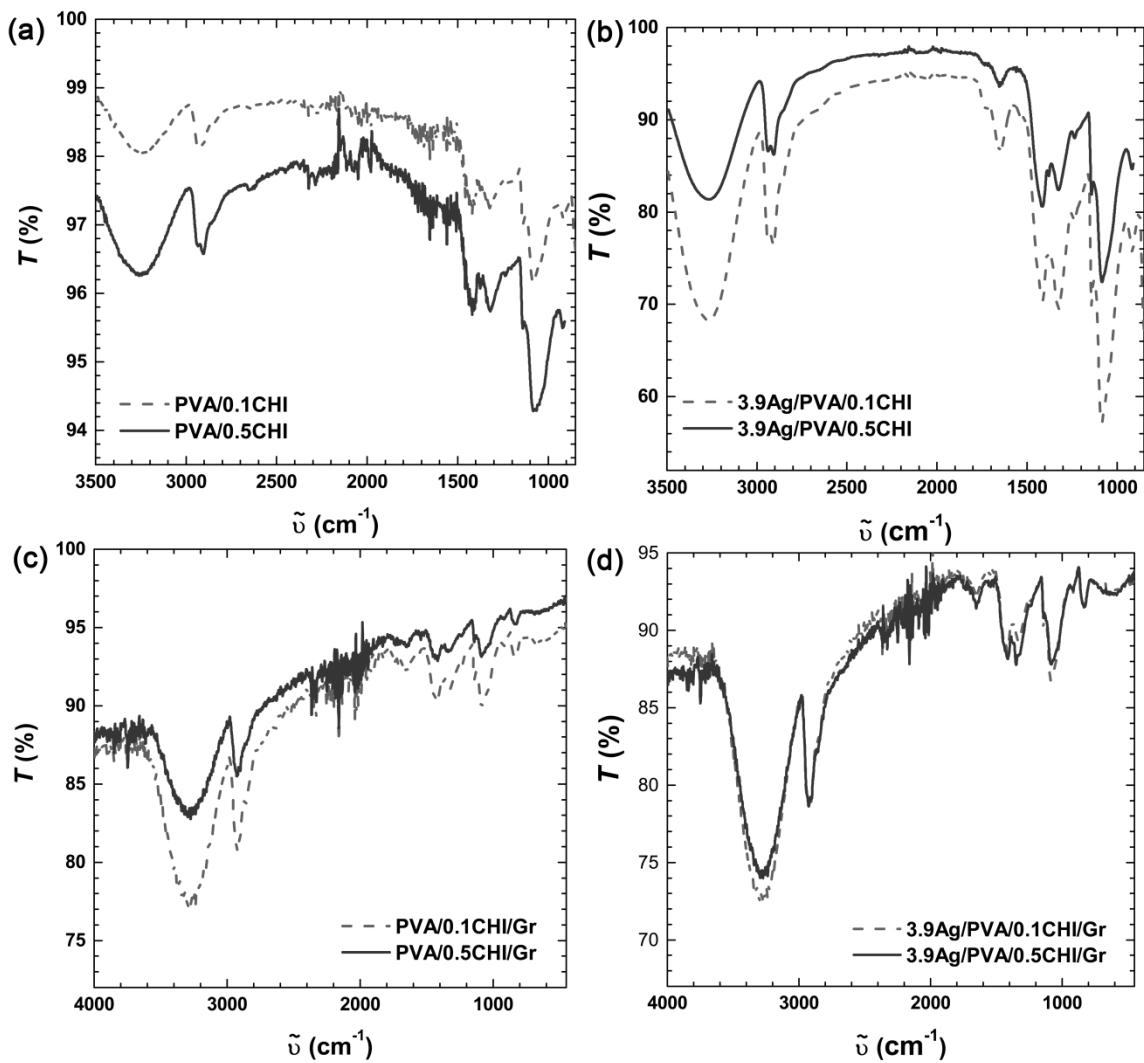
5.2.6 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

FTIR spektri hidrogelova PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9AgPVA/0.5CHI, kao i PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9AgPVA/0.5CHI/Gr su prikazani na slici 5.13, dok su karakteristične trake i njima odgovarajuće vibracije veza navedene u tabelama 5.6 i 5.7, redom.

Najizraženiji pik, odn. vrednost transmitancije, T , na svim spektrima se nalazi na talasnim brojevima, $\tilde{\nu}$, oko $\approx 3250\text{-}3290\text{ cm}^{-1}$, tj. konkretno na 3251 cm^{-1} (PVA/0.1CHI), 3257 cm^{-1} (PVA/0.5CHI), 3271 cm^{-1} (3.9Ag/PVA/0.1CHI) i 3268 cm^{-1} (3.9Ag/PVA/0.5CHI) (tabela 5.6), odnosno na 3295 cm^{-1} (PVA/0.1CHI/Gr), 3275 cm^{-1} (PVA/0.5CHI/Gr), 3294 cm^{-1} (3.9Ag/PVA/0.1CHI) i 3274 cm^{-1} (3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr) (tabela 5.7). Ova vibraciona traka odgovara valentnim vibracijama, tj. istežanju u ravni, O–H veze iz hidroksilnih grupa na lancu polimera. Položaji ove trake O–H istežanja su ukazali na to da –OH grupe intenzivno učestvuju u vodoničnim vezama, s obzirom na to da se traka javlja na znatno nižim talasnim brojevima ($<3300\text{ cm}^{-1}$), u odnosu na literaturnu vrednost od $3700\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$, koja je očekivana za slobodne –OH grupe [314]. Vodonične veze između –OH grupa na polimernim lancima PVA i –OH i –NH₂ grupa na lancima CHI imaju značajnu ulogu u nastajanju polimerne matrice hidrogela prilikom procesa umrežavanja, kao što je objašnjeno ranije (poglavlje 5.1.1). Osim toga, istežuće vibracije N–H veza (koje potiču od –NH₂ grupa hitozana) se takođe mogu očekivati u ovoj oblasti talasnih brojeva [315], tako da je moguće i određeno preklapanje traka koje potiču od vibracija ove dve grupe.

Određene karakteristične trake su primećene i u oblasti otiska prsta na FTIR spektrima (oblast nižih talasnih brojeva, $<1500\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$) (tabele 5.6 i 5.7): traka istežućih vibracija C=O veze iz sekundarnih amida (tzv. amid–I traka na $\sim 1654\text{ cm}^{-1}$ [316]), traka deformacionih vibracija (savijanje u ravni) C–H veze iz vinilnih grupa ($\sim 1415\text{ cm}^{-1}$), savijanje u ravni O–H veze iz sekundarnih alkohola ($\sim 1322\text{-}1325\text{ cm}^{-1}$), istežanje C–OH veza ($\sim 1236\text{-}1240\text{ cm}^{-1}$), kao i simetrično istežanje C–C veza iz alifatičnog lanca polimera ($\sim 1140\text{ cm}^{-1}$). Istežuće vibracije C–O veza iz sekundarnih alkohola (PVA) su primećene na 1083 cm^{-1} (PVA/0.1CHI), 1076 cm^{-1} (PVA/0.5CHI), 1087 cm^{-1} (3.9Ag/PVA/0.1CHI) i 1083 cm^{-1} (3.9Ag/PVA/0.5CHI), kao i na 1087 cm^{-1} (PVA/0.1CHI/Gr), 1088 cm^{-1} (PVA/0.5CHI/Gr), 1086 cm^{-1} (3.9A PVA/0.1CHI/Gr), i 1080 cm^{-1} (3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr). Određena pomeranja ovih traka u spektrima hidrogelova sa nanočesticama srebra, mogu ukazati na interakcije nanočestica srebra sa –OH grupama, što dovodi do promene vibracija C–O veze i pomeranja maksimuma na spektru. Takođe, određeno pomeranje položaja ove trake ka nižim talasnim brojevima u spektrima većine hidrogelova sa višim sadržajem CHI, može biti posledica vodoničnog vezivanja između –OH grupa na lancu PVA, i –OH i –NH₂ grupa na lancu hitozana, kao što je razmatrano ranije.

Slaba, ali oštra traka, koja potiče od simetričnog istežanja C–C veze u osnovnom lancu PVA, primećena je na 1142 cm^{-1} (PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, i 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr) i na 1140 cm^{-1} (3.9AgPVA/0.5CHI) (tabela 5.6), kao i na 1143 cm^{-1} (PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr), 1142 cm^{-1} (3.9A PVA/0.1CHI/Gr) i 1141 cm^{-1} (3.9AgPVA/0.5CHI/Gr) (tabela 5.7). Kako su položaj i intenzitet ove trake osetljivi na kristaliničnost polimera [317], može se pretpostaviti da prisustvo nanočestica srebra donekle utiče na kristalnu strukturu lanca PVA. Istežanje karbonilnih veza (C=O) u sekundarnim amidima (R–CO–NH–R') je primećeno na oko 1650 cm^{-1} (amid–I traka) [304,316]. Položaj ove trake je pomeren ka nešto nižim talasnim brojevima u spektrima hidrogelova sa nanočesticama srebra (tabele 5.6 i 5.7), što može ukazati na interakcije nanočestica sa polimernim lancem hitozana, koje su značajne za stabilizaciju nanočestica u polimernoj matrici hidrogela.



Slika 5.13. FTIR spektri (a) PVA/0.1CHI i PVA/0.5CHI, (b) 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI, (c) PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr, (d) 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelova

Tabela 5.6. Karakteristične vibracione trake u FTIR spektrima PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI hidrogelova

Talasni broj, $\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)				vibracije veza [304,314–317]
PVA/0.1CHI	PVA/0.5CHI	3.9Ag/PVA/0.1CHI	3.9Ag/PVA/0.5CHI	
3251	3257	3271	3268	O–H istežanje
2925	2915	2925	2925	asimetrično istežanje –CH ₂ i istežanje alifatičnih C–H veza
1654	1654	1651	1651	C=O istežanje u sekundarnim amidima
1415	1412	1415	1415	vinil (C–H) savijanje u ravni
1322	1322	1325	1325	O–H savijanje u ravni (sekundarni alkoholi)
1236	1239	1236	1236	C–O(H) istežanje
1142	1142	1142	1140	simetrično istežanje C–C
1083	1076	1087	1083	C–O istežanje (sekundarni alkoholi)
918	921	914	918	vinil (C–H) savijanje van ravni

Tabela 5.7. Karakteristične vibracione trake u FTIR spektrima PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelova

Talasni broj, $\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)				vibracije veza [304,314–317]
PVA/0.1CHI/Gr	PVA/0.5CHI/Gr	3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr	3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr	
3295	3275	3294	3274	O–H istezanje
2925	2927	2927	2925	asimetrično istezanje –CH ₂ i istezanje alifatičnih C–H veza
1654	1652	1655	1654	C=O istezanje u sekundarnim amidima
1416	1417	1417	1413	vinil (C–H) savijanje u ravni
1331	1336	1336	1349	O–H savijanje u ravni (sekundarni alkoholi)
1236	1240	1235	1237	C–O(H) istezanje
1143	1143	1142	1141	simetrično istezanje C–C
1087	1088	1086	1080	C–O istezanje (sekundarni alkoholi)
919	919	916	916	vinil (C–H) savijanje van ravni
830	833	829	831	–NH ₂ (1° amini) savijanje van ravni (klanjanje i uvijanje)

5.2.7 Ramanova spektroskopija

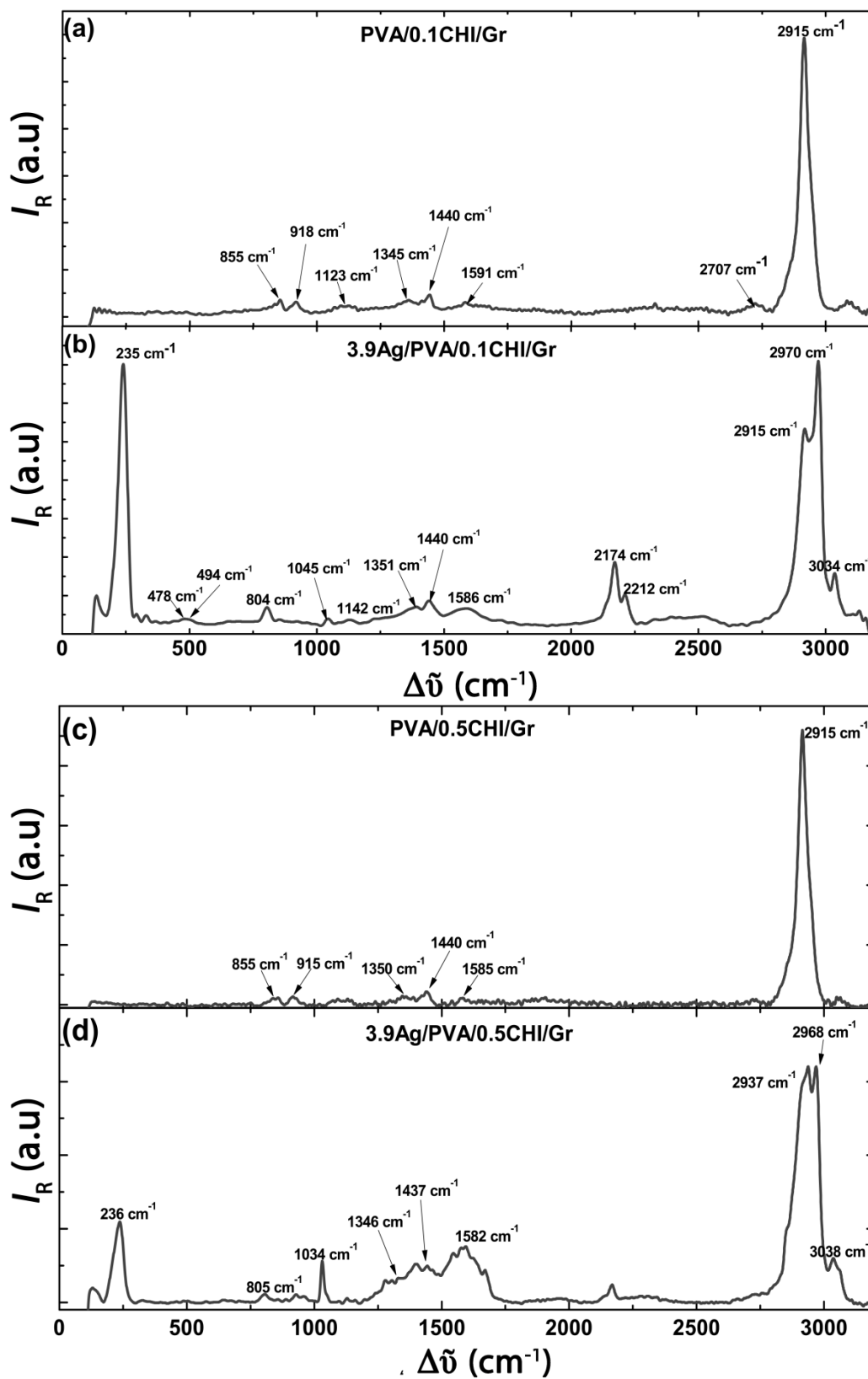
Ramanovi spektri su snimljeni za uzorke hidrogelova sa grafenom (PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr), jer je Ramanova spektroskopija poznata kao pouzdana tehnika za ispitivanje strukture i svojstava grafena. Međutim, Ramanovi spektri takođe mogu dati veoma korisne informacije i o strukturi polimerne matrice. Ramanovi spektri za sva četiri navedena hidrogela su prikazani na slici 5.14, dok su položaji karakterističnih traka i odgovarajuće vibracije veza predstavljeni u tabeli 5.8.

Inkorporacija grafena u svim hidrogelovima je potvrđena pojavom karakterističnih traka na Ramanovim spektrima. Prva od njih je tzv. D-traka na vrednostima Ramanovog pomeraja, $\Delta \tilde{\nu}$, od 1345 cm^{-1} (PVA/0.1CHI/Gr), 1350 cm^{-1} (PVA/0.5CHI/Gr), 1351 cm^{-1} (3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr) i 1346 cm^{-1} (3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr) (slika 5.14). Prisustvo ove trake se obično pripisuje pojavi neuređene strukture, defekata i oštih ivica u grafenskim slojevima [318,319]. Druga, tzv. G-traka, na 1591 cm^{-1} (PVA/0.1CHI/Gr), 1585 cm^{-1} (PVA/0.5CHI/Gr), 1586 cm^{-1} (3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr) i 1592 cm^{-1} (3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr), odgovara vibracijama u ravni sp^2 -hibridizovanih C-atoma. Stepenn neuređenosti i količina defekata u strukturi grafena se često procenjuje na osnovu odnosa intenziteta rasute svetlosti u Ramanovom spektru, I_R , za D i G trake ($I_R(D)/I_R(G)$) [319]. Međutim, u slučaju grafena inkorporisanog u polimernoj matrici, moguće je i preklapanje D i G traka grafena sa drugim trakama koje odgovaraju vibracijama veza u određenim funkcionalnim grupama na polimernim lancima. Tako se, na primer, položaj G-trake preklapa sa savijanjem u ravni (deformacionim vibracijama) veza u $-\text{NH}_2$ grupi hitozana [320]. Intenzitet ove trake je značajno veći u slučaju 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogela, u poređenju sa PVA/0.5CHI/Gr, što je takođe primećeno, iako u manjoj meri, u slučaju 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr hidrogela, u poređenju sa PVA/0.1CHI/Gr (slika 5.14). Osim toga, došlo je i do promene položaja ovih traka u spektrima hidrogelova sa nanočesticama srebra, što može ukazati na interakcije nanočestica sa $-\text{NH}_2$ grupama hitozana.

Ostale trake u Ramanovim spektrima potiču od vibracija veza u polimernoj matrici hidrogelova (tabela 5.8). Najizraženiji pik na svim spektrima se nalazi na oko $\approx 2915 \text{ cm}^{-1}$ i potiče od simetričnog istezanja C–H veza iz CH_2 grupa na polimernim lancima [316,321,322]. U slučaju 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr hidrogela (slici 5.14b), ova traka je razdvojena na dva pika na 2915 i 2970 cm^{-1} , dok se javlja i slabiji maksimum na 3034 cm^{-1} . Slično, u spektru 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogela (slici 5.14d) je ova traka nešto šira i podeljena u dva maksimuma, pa oblast talasnih brojeva od $2900\text{--}3100 \text{ cm}^{-1}$ sadrži pikove na 2937 i 2968 cm^{-1} , kao i jedan slabijeg intenziteta na 3038 cm^{-1} . Ova oblast se generalno odnosi na istezanje veza u CH i CH_2 grupama, tako da se sve ove trake mogu pripisati različitim valentnim vrtracijama C–H veza [316] u strukturi PVA i CHI.

Trake na 1440 cm^{-1} (PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr) i na 1437 cm^{-1} (3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr) potiču od deformacionih vibracija (savijanja) u ravni u C–H₂ i O–H veza [321,322]. Jedino pomeranje ove trake ka nižim talasnim brojevima (crveni pomeraj) je primećeno u slučaju 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogela, što ukazuje na moguće interakcije nanočestica srebra sa $-\text{OH}$ grupama, koje mogu biti izraženije u slučaju ovog hidrogela usled povećanja koncentracije nanočestica srebra, što je pokazano rezultatima UV-vidljive spektroskopije (poglavlje 5.2.1).

U spektrima 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelova (slike 5.14b i 5.14d, redom) javlja se izražena traka na 235 cm^{-1} , odnosno na 236 cm^{-1} , redom, koja nije prisutna u spektrima PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr, što ukazuje na to da ova traka verovatno potiče od prisustva nanočestica srebra u hidrogelovima. U literaturi se pojava ove trake na $\approx 230 \text{ cm}^{-1}$ pripisuje istežućim vibracijama Ag–O veza koje potiču od interakcija nanočestica srebra sa $-\text{OH}$ grupama na polimernim lancima [322], što potvrđuje pretpostavku o stabilizaciji nanočestica srebra putem ovakvih interakcija sa polimernim lancima.



Slika 5.14. Ramanovi spektri (a) PVA/0.1CHI/Gr, (b) 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr, (c) PVA/0.5CHI/Gr i (d) 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelova

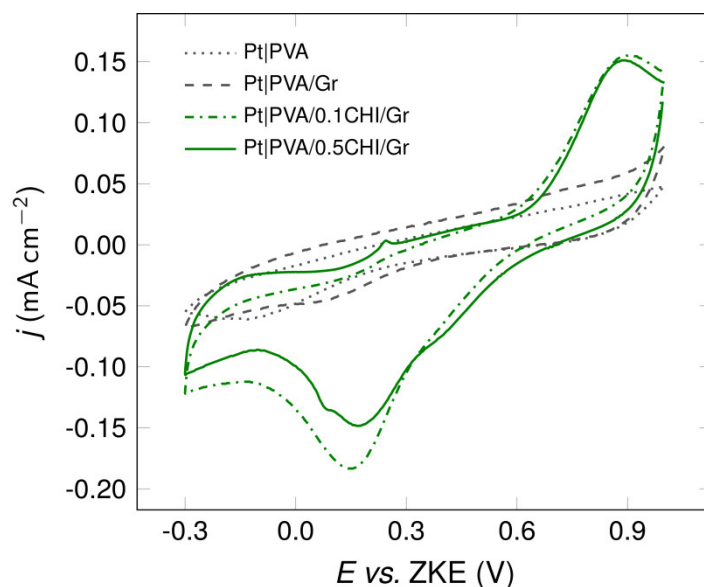
Tabela 5.8. Karakteristične trake u Ramanovim spektrima PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelova i odgovarajuće vibracije veza

Ramanov pomeraaj, $\Delta \tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)				vibracije veza [316,320–324]
PVA/0.1CHI/Gr	PVA/0.5CHI/Gr	3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr	3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr	
--	--	235 j	236 j	$\nu(\text{Ag-polimer})$
--	--	478 vs	--	$\delta(\text{CO-NH}) + \delta(\text{C-CH}_3)$,
--	--	494 vs	--	$\delta(\text{C-O-C})$
--	--	804 sr	805 s	$\gamma_r(\text{CH}_2)$
855 s	855 s	--	--	$\gamma_r(\text{CH}_2)$; skeletalne vibracije
918 s	915 s	--	--	$\nu(\text{C-C})$
1123 s	--	--	--	C-OH valentine vibracije u asimetričnom prstenu
--	--	1045 s	1034 j	$\gamma_t(\text{CH}_3) + \nu(\text{CH}) + \nu(\text{OH})$
--	--	1142 vs, š	1136 vs	$\nu(\text{C-C}), \nu(\text{C-O})$
1345 vs	1350 vs	1351 vs	1346 vs	D-traka grafena
1440 s	1440 s	1440 s	1437 s	$\delta(\text{CH}_2), \delta(\text{OH})$
1591 s	1585 s	1586 š	1582 š	G-traka grafena + $\delta(\text{NH}_2)$
2707 š	--	--	--	$\nu(\text{C=O})$ iz rezidualne acetatne grupe
2915 j	2915 j	2915 j	2937 j	$\nu_s(\text{CH})$ iz CH ₂
--	--	2970 j	2968 j	
--	--	3034 sr	3038 sr	$\nu_a(\text{CH})$ iz CH ₂

ν – istežanje (valentine vibracije); δ – savijanje u ravni (deformacione vibracije); γ_r – savijanje van ravni (deformacione vibracije); γ_t – uvijanje van ravni (deformacione vibracije); j – jaka traka; sr – srednja; s – slaba; vs – veoma slaba; š – široka

5.2.8 Ciklična voltametrija

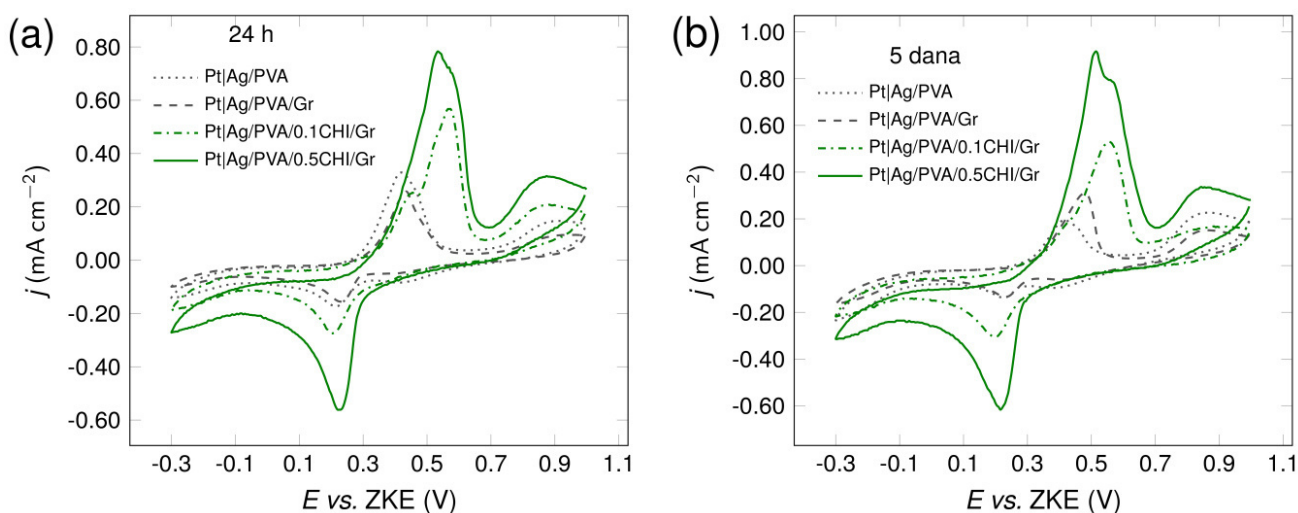
Ciklični voltamogrami hidrogelova PVA, PVA/Gr, PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr su prikazani na slici 5.15. Na ovim cikličnim voltamogramima primećeni su široki katodni pikovi na potencijalima, E , od oko -100 mV (PVA), 100 mV (PVA/Gr), i oko 150 - 200 mV (PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr), koji bi se mogli pripisati redukciji polimera – PVA i hitozana u hidrogelovima. U poređenju sa cikličnim voltamogramima hidrogelova PVA i PVA/Gr bez hitozana, katodne gustine struja, j , pikova PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr hidrogelova su značajno više, a potencijali pikova su pomereni ka pozitivnijim vrednostima, što ukazuje na to da je moguća katodna reakcija u hidrogelovima sa CHI, redukcija hitozana na površini Pt elektrode. Ciklični voltamogrami hidrogelova PVA i PVA/Gr se nisu međusobno značajno razlikovali, osim što su gustine struje u čitavom opsegu potencijala bile nešto više u slučaju PVA/Gr, što može biti izazvano povećanjem električne provodljivosti hidrogela sa dodatkom grafena.



Slika 5.15. Ciklični voltamogrami PVA, PVA/Gr, PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr hidrogelova, snimljeni sa brzinom promene potencijala od 50 mV s^{-1}

Na slici 5.16a su prikazani ciklični voltamogrami 3.9Ag/PVA , 3.9Ag/PVA/Gr , $3.9\text{Ag/PVA/0.1CHI/Gr}$ i $3.9\text{Ag/PVA/0.5CHI/Gr}$ hidrogelova, 24 h nakon elektrohemijske sinteze nanočestica srebra. U katodnoj oblasti potencijala su zapaženi pikovi na 215 mV za 3.9Ag/PVA , 230 mV za 3.9Ag/PVA/Gr , 205 mV za $3.9\text{Ag/PVA/0.1CHI/Gr}$ i na 209 mV za $3.9\text{Ag/PVA/0.5CHI/Gr}$, koji se mogu pripisati reakciji redukcije Ag^+ jona (koji potiču od neredukovanih jona zaostalih u hidrogelu nakon sinteze nanočestica srebra) i taloženju tankog sloja metalnog srebra na platinskoj elektrodi. Veće katodne gustine struje ovog pika u slučaju hidrogela sa $0,5$ mas.% CHI ukazuju na veću koncentraciju Ag^+ jona dostupnih za redukciju na površini elektrode. To može biti posledica veće sposobnosti bubrenja hidrogelova sa $0,5$ mas.% CHI (poglavlje 5.3.1), koji su tokom 48 h bubrenja u rastvoru AgNO_3 , pre elektrohemijske sinteze, apsorbovali i vezali veću količinu Ag^+ jona. S druge strane, katodne gustine struje ovih pikova na cikličnim voltamogramima za 3.9Ag/PVA i 3.9Ag/PVA/Gr hidrogelove se nisu značajno razlikovale, što ukazuje na to da prisustvo grafena nije bitno uticalo na katodnu reakciju koja se odigrava u ovoj oblasti potencijala. Svi ciklični voltamogrami sadrže dobro izražene anodne pikove na 415 mV (za 3.9Ag/PVA), 435 mV (za 3.9Ag/PVA/Gr), 570 mV (za $3.9\text{Ag/PVA/0.1CHI/Gr}$) i 594 mV (za $3.9\text{Ag/PVA/0.5CHI/Gr}$), koji verovatno potiču od reakcije oksidacije sloja metalnog srebra na površini Pt, nastalog tokom katodnog ciklusa. Porast anodne gustine struje ovih pikova u smeru 0 mas.% CHI \rightarrow $0,1$ mas.% CHI \rightarrow $0,5$ mas.% CHI ukazuje na veću koncentraciju vrste

koja se oksiduje na ovim potencijalima u hidrogelovima sa većim sadržajem CHI. Imajući u vidu da je katodni pik redukcije Ag^+ jona takođe imao najviše vrednosti gustine struje u slučaju hidrogela sa 0,5 mas.% CHI, može se pretpostaviti da se u katodnom ciklusu istaložila i najveća količina srebra na Pt elektrodi, što je moglo izazvati i porast gustine struje anodnog pika u odnosu na hidrogelove sa manjim sadržajem hitozana. Izgled i položaji navedenih pikova se nisu značajno razlikovali nakon 5 dana (slika 5.16b), u poređenju sa 24 h nakon sinteze (slika 5.16a), te su karakteristični pikovi primećeni na cikličnim voltamogramima 3.9Ag/PVA, 3.9Ag/PVA/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelova, u katodnoj (230 mV, 230 mV, 195 mV i 215 mV, redom) i anodnoj (420 mV, 480 mV, 544 mV i 515 mV, redom) oblasti.

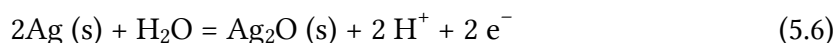


Slika 5.16. Ciklični voltamogrami (treći ciklus) 3.9Ag/PVA, 3.9Ag/PVA/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelova (a) 24 h i (b) 5 dana nakon sinteze, snimljeni brzinom promene potencijala od 50 mV s^{-1}

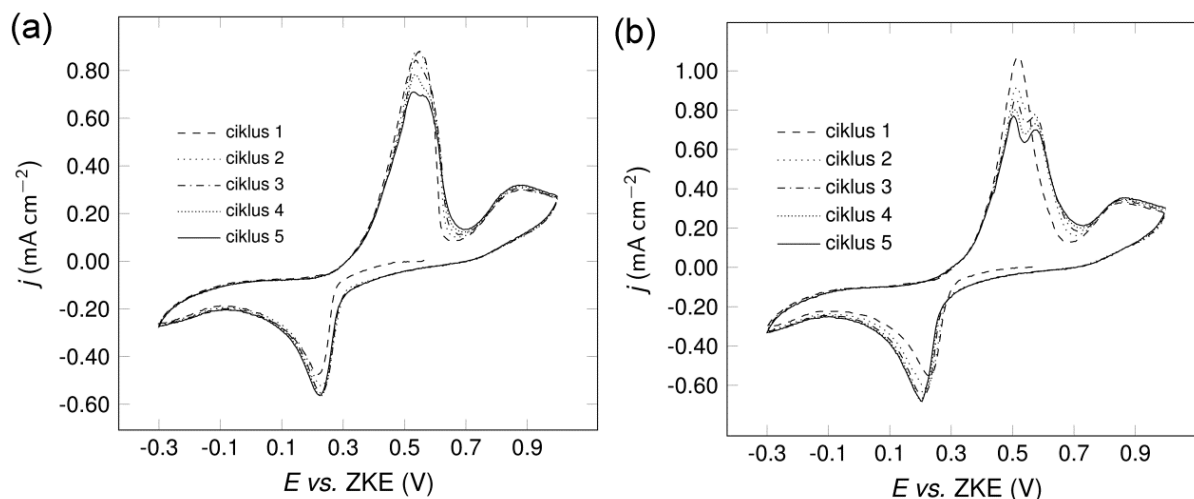
Na slici 5.17 je prikazano 5 ciklusa cikličnih voltamograma 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogela, 24 h i 5 dana nakon sinteze. U katodnoj oblasti svi voltamogrami sadrže pikove redukcije Ag^+ jona na oko 200 mV, koji su uglavnom ostali nepromenjeni tokom svih 5 ciklusa. Kao što je već spomenuto, redukcija Ag^+ jona u ovoj oblasti potencijala rezultuje taloženjem tankog sloja metalnog srebra na površini Pt elektrode. U anodnoj oblasti je primetan oštar pik u oblasti potencijala 400–600 mV. Na voltamogramima snimljenim 24 h nakon sinteze (slika 5.17a), potencijal maksimuma ovog anodnog pika (435 mV) se nije značajno promenio tokom 5 ciklusa, ali je primećeno neznatno smanjenje vrednosti anodne gustine struje. Ovaj anodni pik se može pripisati reakciji oksidacije tankog sloja metalnog srebra, istaloženog tokom katodnog poluciklusa na Pt elektrodi, koja se može predstaviti jednačinom (5.5). Teorijski elektrodni potencijal za reakciju (5.5), izračunat pomoću Nernstove jednačine iznosi 420 mV vs. ZKE.



Pet dana nakon sinteze (slika 5.17b), pomenuti anodni pik, pripisan reakciji (5.5), se nalazi na potencijalu od 504 mV; međutim, u kasnijim ciklusima se primećuje i pojava novog anodnog pika na potencijalu od $\approx 575 \text{ mV}$. S obzirom na to da se ova dva pika nalaze na bliskim potencijalima, može se zaključiti da oni potiču od srodnih procesa oksidacije sloja srebra na Pt elektrodi i nastajanja novih oksidovanih vrsta srebra. Tako se drugi pik, na pozitivnijim potencijalima, može opisati reakcijom (5.6), koja predstavlja nastajanje srebro(I)-oksida na površini Pt elektrode. Primenom Nernstove jednačine na reakciju (5.6) (uzevši $\text{pH} \approx 6.5$) dobija se teorijska vrednost potencijala od 545 mV vs. ZKE.



Sve vrednosti potencijala pikova na voltamogramima se dobro slažu sa teorijskim proračunatim vrednostima, a varijacije u vrednostima potencijala pikova u odnosu na teorijske vrednosti se mogu pripisati drugačijoj prirodi reakcija u prisustvu polimernog hidrogela, lokalnim promenama pH vrednosti ili uticaju prenosa mase na odvijanje navedenih reakcija.



Slika 5.17. Ciklični voltamogrami (5 ciklusa) 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogela (a) 24 h i (b) 5 dana nakon sinteze, snimljeni brzinom promene potencijala od 50 mV s^{-1}

5.2.9 Termogravimetrijska analiza (TGA) i diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

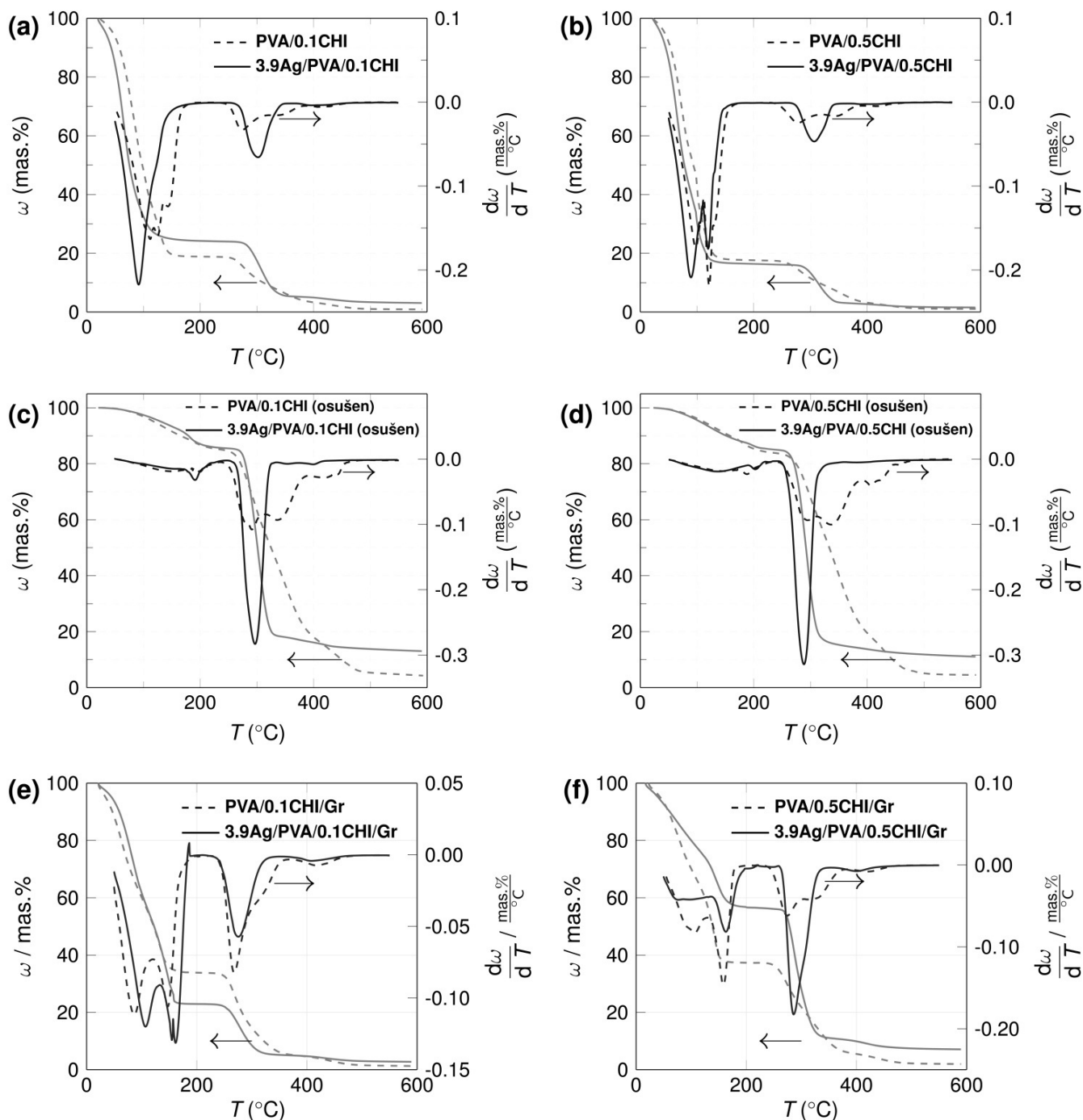
Termogravimetrijska analiza PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI, kao i PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelova izvršena je sa ciljem ispitivanja uticaja različitih komponenata na termičku stabilnost hidrogelova. Eksperimentalne TGA krive (zavisnost masenog udela, ω , od temperature) i odgovarajuće diferencijalne termogravimetrijske krive (DTG), koje predstavljaju izvod TGA krivih, tj. zavisnost promene masenog udela, $\frac{d\omega}{dT}$, od temperature, prikazane su na slici 5.18. Hidrogelovi PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI su takođe snimljeni i u osušenom stanju (kserogela), kako bi se ispitao i uticaj prisustva apsorbovane vode na izgled TGA i DTG krivih (slike 5.18c i 5.18d). Gubitak mase sa porastom temperature se na TGA krivama odigrava u više faza. Prva faza je obično gubitak vode iz matrice hidrogela, koji se odvija u širem opsegu temperatura i obuhvata nekoliko stupnjeva. U slučaju PVA/0.1CHI hidrogela (slika 5.18a) primećena su tri glavna stupnja gubitka vode u oblastima temperatura 42–95 °C, 95–107 °C i 107–143 °C, sa pikovima na DTG krivoj na 89 °C, 105 °C i 126 °C, redom (tabela 5.9). Ukupan gubitak mase u ovoj oblasti temperatura iznosio je blizu 80 mas.%, što ukazuje na to da je ovaj hidrogel sadržao veliku količinu vode. Činjenica da je temperaturna oblast gubitka vode podeljena u nekoliko stupnjeva sa više pikova na DTG krivoj, ukazuje na različita stanja vode u hidrogelu – odnosno da u matrici postoji apsorbovana, slabije vezana i jako vezana voda. Slobodna voda, koja je samo apsorbovana u porama hidrogela, isparava na nižim temperaturama [325–327] (što je u ovom slučaju ispod 100 °C), dok se gubitak vezane vode odigrava na višim temperaturama (105 °C i slab DTG pik na 126 °C). Termin „vezana voda” se odnosi na orijentisane dipole vode i molekule H_2O koji su čvrsto vezani za polimerne lance u hidrogelu (putem vodoničnog vezivanja za funkcionalne $-\text{OH}$ i $-\text{NH}_2$ grupe na lancu PVA i CHI), pa ih je zbog toga teže ukloniti iz

polimerne matrice [325,327–329]. U slučaju PVA/0.5CHI (slika 5.18b), navedeni stupnjevi gubitka apsorbirane i vezane vode se nalaze u oblastima 40–98 °C i 98–127 °C (DTG pikovi na 76 °C i 103 °C, redom) (tabela 5.9). Gubitak vode iz hidrogelova sa nanočesticama srebra se odigrava u sličnim opsezima temperatura, što se može primetiti na osnovu podataka datih u tabeli 5.9. Na osnovu procentualnih gubitaka mase u navedenim oblastima, sa TGA krivih se može odrediti i udeo, odnosno odnos slobodne i vezane vode u svakom od hidrogelova. U svim hidrogelovima je slobodna voda zauzimala gotovo oko 50 % ukupne mase (tabela 5.9), dok je ukupan sadržaj vode od ≈80 % svedoči o visokoj moći upijanja ovih hidrogelova. PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI kserogelovi (slike 5.18c i 5.18d), koji su bili osušeni pre TGA merenja, ipak su pokazali oblast gubitka vode na TGA i DTG krivama, što potvrđuje konstataciju da su gelovi vrlo higroskopni i da sadrže uvek jedan deo vode čvrsto vezane za polimerne lance, koju je teško ukloniti iz polimerne matrice. Tome u prilog svedoče i visoke temperature (>100–200 °C) na kojima se dešavao gubitak vode iz ovih kserogelova (tabela 5.9). U ovim oblastima je došlo do gubitka mase od oko 14–16 mas.% za sve kserogelove (tabela 5.9).

Što se tiče hidrogelova sa grafenom, tj. PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr (slike 5.18e i 5.18f, redom), gubitak slobodne, tj. apsorbirane vode se odigravao u oblastima 40–90 °C (DTG pik na ≈60 °C) i 50–95 °C (DTG pik na ≈82 °C), redom, dok je do gubitka vezane vode došlo u oblasti od 95–160 °C (DTG pik na 129 °C) i 115–154 °C (DTG pik na 143 °C), redom (tabela 5.9). Za 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelove (tabela 5.9), oblasti gubitka slobodne vode su bile na oko 50–95 °C i 40–90 °C redom, uz pojavu DTG pikova na 83 °C i 70 °C, redom, dok je gubitak vezane vode primećen u obliku DTG pikova na 148 °C (3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr) i 143 °C (3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr), na kojima se isparavanje vode odigrava maksimalnom brzinom. Ove temperature gubitka vode iz hidrogelova sa grafenom, bile su nešto više u poređenju sa hidrogelovima bez grafena (slike 5.18a i 5.18b, tabela 5.9), što ukazuje na primetan uticaj grafena na sposobnost hidrogela da apsorbuje i veže vodu. Ukupan sadržaj vode u ovim hidrogelovima je, ipak, bio nešto niži nego što je to bio slučaj sa hidrogelovima bez Gr (tabela 5.9). Niži udeo ukupne, kao i pojedinačni udeli slobodne i vezane vode u hidrogelovima sa grafenom, ukazuju na nešto slabiju sposobnost sorpcije i bubrenja ovih hidrogelova u poređenju sa hidrogelovima bez Gr, što može biti izazvano prisustvom grafena u polimernoj matrici koji doprinosi povećanju njene čvrstoće ali zato i smanjenju elastičnosti (rezultati ispitivanja mehaničkih svojstava prikazani su u narednom poglavlju – 5.2.10), tako da matrica postaje rigidnija i manje podložna širenju i sorpciji veće količine tečnosti.

Druga oblast gubitka mase, pretežno iznad 250 °C (slike 5.18a–f), odnosi se na početak dekompozicije, odnosno raspadanja polimerne matrice i termičke degradacije samih polimernih komponenata, a odgovarajuće oblasti temperature i položaji DTG pikova za sve ispitivane hidrogelove prikazani su u tabeli 5.9. Termička degradacija polimera PVA je endoterman proces, koji se odigrava putem direktne degradacije polimernog lanca, dok je raspadanje hitozana proces iz nekoliko faza i obuhvata prvo uništenje amino grupa, praćeno raskidanjem glikozidnih veza, a zatim i depolimerizacijom samih makromolekulskih lanaca i degradacijom piranoznih prstenova na nešto višim temperaturama [263,326–328,330–332]. Poslednji stupanj termičke degradacije hidrogelova odigrava se na temperaturama između 400 i 500 °C, i najverovatnije obuhvata termičku dekompoziciju zaostale polimerne strukture, kao moguću termičku oksidaciju inkorporisanog grafena, naravno u slučaju hidrogelova sa Gr [333]. Na 600 °C, suvi čvrsti ostatak je iznosio 0,84 mas.% za PVA/0.1CHI, 1,12 mas.% za PVA/0.5CHI, 3,2 mas.% za 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 1,72 mas.% za 3.9Ag/PVA/0.5CHI, odnosno 1,4 mas.% za PVA/0.1CHI/Gr, 2,0 mas.% za PVA/0.5CHI/Gr, 4,4 mas.% za 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 7,2 mas.% za 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelove (tabela 5.9). Očigledno je da su hidrogelovi sa Gr sadržali veći udeo suvog ostatka, što ukazuje na povoljan uticaj grafena na termičku stabilnost hidrogelne matrice. Osim toga, i hidrogelovi sa nanočesticama srebra su pokazali nešto veći sadržaj ostatka u odnosu na hidrogelove bez srebra, pa je takođe moguće zaključiti i da se inkorporacijom nanočestica srebra mogu poboljšati termička svojstva hidrogelova, što je u skladu i sa ranijim istraživanjima [36,334].

Slično se pokazalo i u slučaju kserogelova, kod kojih su uzorci sa nanočesticama srebra sadržali značajno veći udeo suvog ostatka (tabela 5.9). Veći opšti udeo suvog ostatka kod osušenih kserogelova u odnosu na iste hidrogelove (tabela 5.9) dobijen je zbog toga što su kserogelovi sadržali značajno manju količinu vode u ukupnoj masi, te je i relativni udeo suvog ostatka bio očekivano viši za ove uzorke.



Slika 5.18. Termogravimetrijske krive i diferencijalni termogrami za hidrogelove: (a) PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.1CHI, (b) PVA/0.5CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI hidrogelove, (c) PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.1CHI, (d) PVA/0.5CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI kserogelove, (e) PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr, (f) PVA/0.5CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelove

Tabela 5.9. Stupnjevi gubitka mase, određeni na osnovu TGA analize, sa odgovarajućim DTG pikovima, udelima slobodne i vezane vode, kao i suvim ostacima na 600 °C za hidrogelove PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9Ag/PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr, kao i kserogelove PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI

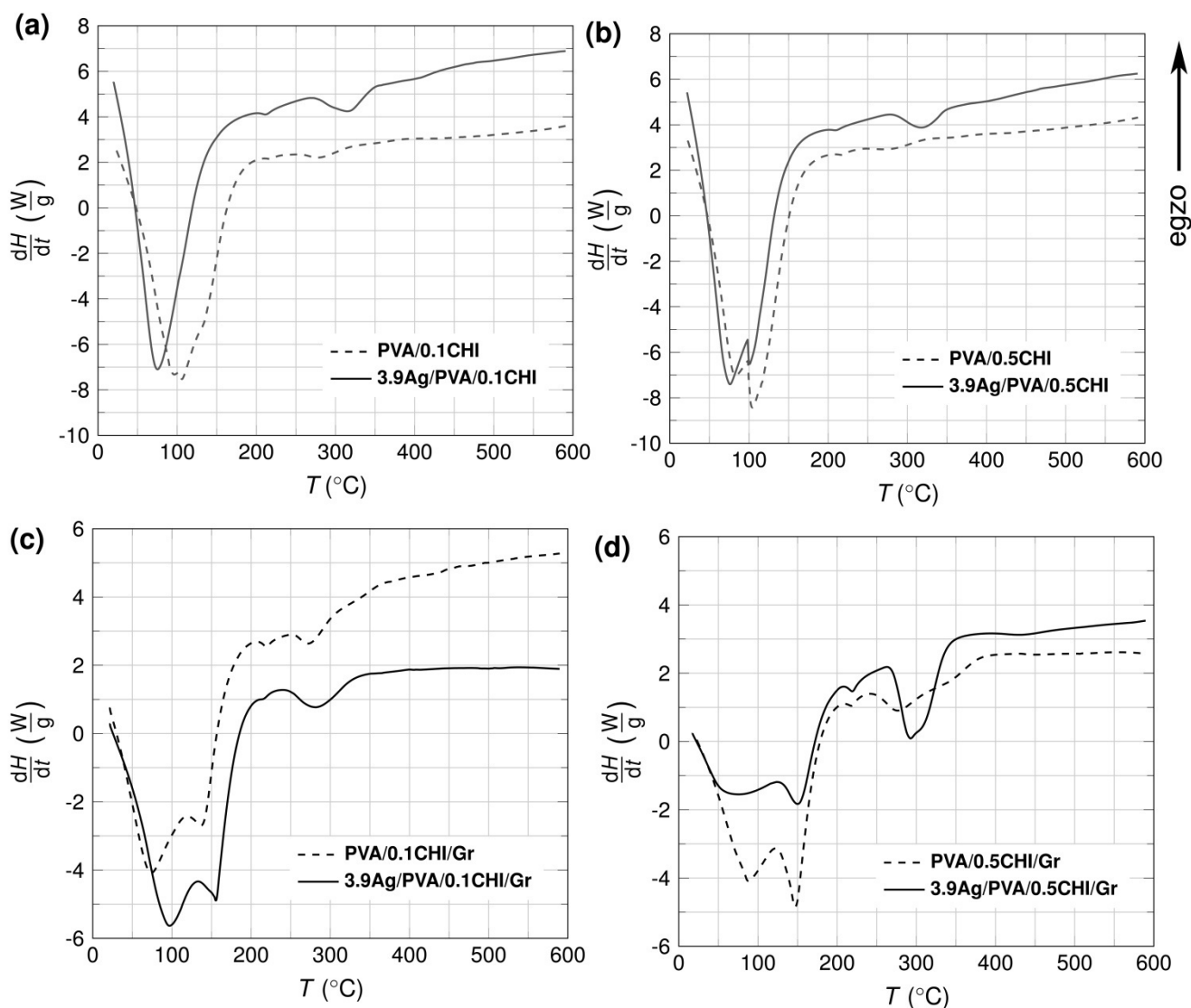
Hidrogel	Gubitak vode						Degradacija polimerne matrice		Udeo slobodne vode (mas.%)	Udeo vezane vode (mas.%)	Suvi ostatak na 600 °C (mas.%)
	I (slobodna)		II (vezana)		III (vezana)		IV				
	Opseg T (°C)	DTG pik (°C)	Opseg T (°C)	DTG pik (°C)	Opseg T (°C)	DTG pik (°C)	Opseg T (°C)	DTG pik (°C)			
PVA/0.1CHI	42–95	89	95–107	105	107–143	126	260–373	275; 356	47,0	31,5	0,84
PVA/0.5CHI	40–98	76	98–127	103	/	/	257–379	280; 362	52,5	28,8	1,12
3.9Ag/PVA/0.1CHI	34–76	67	76–115	104	/	/	282–334	309	50,0	23,0	3,2
3.9Ag/PVA/0.5CHI	34–76	66	76–119	101	/	/	129–280	315	49,0	33,0	1,72
PVA/0.1CHI (osušen)	/	/	/	/	do 235	134	235–389	297; 347	/	14-16	4,8
PVA/0.5CHI (osušen)	/	/	/	/	do 223	179	223–395	301; 349	/	14-16	4,7
3.9Ag/PVA/0.1CHI (osušen)	/	/	/	/	do 223	182	223–339	303	/	14-16	13,4
3.9Ag/PVA/0.5CHI (osušen)	/	/	/	/	do 221	118; 197	221–322	292	/	14-16	11,5
PVA/0.1CHI/Gr	40–90	60	95–160	129	/	/	220–360	267	35,0	31,0	1,4
PVA/0.5CHI/Gr	50–95	82	115–154	143	/	/	250–374	268	28,6	34,1	2,0
3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr	50–95	83	113–177	148	/	/	220–330	272	37,0	40,0	4,4
3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr	40–90	70	110–178	143	/	/	260–346	288	15,0	29,0	7,2

DSC krive, tj. zavisnosti toplotnog protoka, $\frac{dH}{dt}$, od temperature, za PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr, kao i PVA/0.5CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelove su prikazane na slici 5.19. Svi pikovi na krivama su bili endotermne prirode.

Prvi proces koji se odigrava, a koji je opisan velikim endotermnim pikom sa dva maksimuma, odnosi se na isparavanje, odn. na gubitak vode iz polimerne matrice hidrogela. Kao što je već komentarisano u tekstu iznad, voda u hidrogelu može biti u različitim stanjima, u zavisnosti od orijentacije dipola kao i od stepena i jačine interakcija sa polimernom matricom [325,328,329]. Slobodna voda je samo apsorbirana u porama hidrogela, bez bilo kakvih drugih interakcija, ona obično obuhvata najveći udeo vode u hidrogelu, lako mrzne i isparava na nižim temperaturama. Slabije ili jače vezani oblici vode se sastoje od polarizovanih i orijentisanih dipola koji su organizovani u okolini naelektrisanih grupa, kao i od molekula H₂O vodonično vezanih za funkcionalne grupe ili organizovanih u solvatacionim kavezima oko hidrofobnih segmenata polimernih lanaca [325]. Početna dva pika na DSC krivama su se odnosila na gubitak upravo ova dva vida vode – slobodne i vezane. U slučaju hidrogelova bez grafena (slike 5.19a i 5.19b), ovi pikovi su bili bliži i slabije razdvojeni, uz veći stepen preklapanja, dok su hidrogelovi sa Gr ispoljili dva dobro razdvojena pika, od kojih je drugi bio na nešto višim temperaturama (slike 5.19c i 5.19d). Rezultati TGA analize, koji su diskutovani u prethodnom delu teksta u ovom poglavlju, pokazali su da hidrogelovi sa Gr generalno imaju slabiju moć bubrenja i manji udeo slobodne vode, pa samim tim i relativno veći udeo vezane vode, što može objasniti i razlike u izgledu DSC krivih hidrogelova sa i bez Gr. DSC pikovi gubitka slobodne i vezane vode, redom, primećeni su kao prva dva endotermna pika na slikama 5.19a–d, dok su njihovi položaji, odn. odgovarajući temperaturni opsezi, navedeni u tabeli 5.10. Dok hidrogelovi bez grafena nisu pokazali značajnije razlike u obliku i položaju pikova od uzorka do uzorka (tabela 5.10), u slučaju hidrogelova sa grafenom primećena je promena površine i položaja ovih pikova sa porastom sadržaja hitozana, tj. površina drugog pika je porasla u slučaju hidrogelova sa 0,5 mas.% CHI (slika 5.19d), u poređenju sa 0,1 mas.% CHI (slika 5.19c). Ovo ukazuje na to da je odnos vezane i slobodne vode bio veći u hidrogelovima sa višim sadržajem CHI, što je potvrđeno i TGA analizom koja je pokazala da su hidrogelovi PVA/0.5CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr imali veći sadržaj vezane, nego slobodne vode, za razliku od PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr (tabela 5.9). Slično je TGA analiza pokazala i u slučaju hidrogelova bez Gr, gde je 3.9Ag/PVA/0.5CHI hidrogel imao značajno veći sadržaj vezane vode (33 mas.%) u poređenju sa 3.9Ag/PVA/0.1CHI (23 mas.%) (tabela 5.9); međutim, kako su ovi gelovi imali značajno veću sposobnost bubrenja i veći udeo slobodne vode (≈50 %), to je dovelo do smanjenja razlika na DSC krivama, koje zato nisu toliko uočljive kao za hidrogelove sa Gr. Veći udeo vezane vode u hidrogelovima sa većim sadržajem hitozana bi se mogao objasniti porastom broja polarnih hidrofilnih grupa (–NH₂, –OH), koje mogu da stupe u interakcije sa dipolima vode i izazovu njihovu orijentaciju i uređenje, kao i da nagrade više vodoničnih veza, što sve favorizuje povećanje sadržaja vezane vode u odnosu na slobodnu [325]. Takođe je moguće da je usled toga došlo i do efekta povišenja temperature pikova gubitka vode u slučaju PVA/0.5CHI/Gr hidrogela (88 i 147 °C), u poređenju sa PVA/0.1CHI/Gr (74 i 137 °C).

Još neke razlike primećene su na DSC krivama hidrogelova sa nanočesticama srebra, u poređenju sa PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr. Pikovi gubitka vode su se nalazili na višim temperaturama i imali veću površinu u slučaju 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr, u poređenju sa PVA/0.1CHI/Gr, što ukazuje na to da je hidrogel sa srebrom sadržao veću ukupnu količinu vode, odnosno imao veću moć bubrenja. Ovo bi se moglo objasniti dodatnim efektom solvatacije nanočestica srebra u hidrogelu, koje vezuju veću količinu molekula vode, organizovanih u solvatacionim kavezima, ali i rastezanjem polimerne matrice usled inkorporacije nanočestica. Međutim, situacija je bila obrnuta u slučaju hidrogelova sa 0,5 mas.% CHI, gde su površine pikova bile niže u slučaju 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr, u poređenju sa PVA/0.5CHI/Gr, sa pikom isparavanja slobodne vode na nižoj temperaturi (80 °C za 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr i 88 °C za PVA/0.5CHI/Gr). Neto i saradnici [326] su pretpostavili da se

interakcije dipola vode sa različitim polarnim grupama razlikuju po jačini, tačnije da je vezivanje vode za amino grupe hitozana slabije nego vezivanje za hidroksilne grupe, tako da se voda vezana za $-\text{NH}_2$ može lakše ukloniti. Ovo bi moglo objasniti veći udeo vezane vode u hidrogelovima sa nanočesticama srebra, jer je pretpostavka da se njihova stabilizacija odigrava vezivanjem za $-\text{NH}_2$ grupe, što uslovljava vezivanje molekula vode za $-\text{OH}$ grupe jačim interakcijama i dovodi do povećanja sadržaja vezane vode. Ovaj efekat uticaja nanočestica srebra je značajniji u hidrogelovima sa većom koncentracijom nanočestica, a to je 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogel, kao što je pokazano UV-vidljivom spektroskopijom (poglavlje 5.2.1). Nanočestice se stabilizuju vezivanjem za $-\text{OH}$ i $-\text{NH}_2$ grupe, što smanjuje broj polarnih grupa dostupnih za vezivanje molekula i dipola vode. Osim toga, inkorporacija velike količine nanočestica može doprineti i povećanju krutosti polimerne matrice 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogela, što takođe može uticati na njenu sposobnost sorpcije tečnosti.



Slika 5.19. DSC krive za: (a) PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.1CHI, (b) PVA/0.5CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI, (c) PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr, (d) PVA/0.5CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelove

Preostali pikovi na DSC krivama se mogu povezati sa topljenjem polimerne matrice i početkom njene degradacije. Ova dva pika (slika 5.19) se nalaze u opsegu od oko 210–220 °C i 275–295 °C, redom, za sve ispitivane hidrogelove (tabela 5.10). Tačka topljenja (T_t) čistog PVA se obično nalazi u oblasti 202–218 °C, u zavisnosti od stepena kristaliničnosti, gustine umreženja i načina pripreme uzorka [335–337], što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom radu. Termička degradacija oba polimera, PVA i CHI počinje obično blizu 300 °C, ali je mehanizam degradacije ova dva polimera različit, kao što je detaljnije objašnjeno u ranijem tekstu. Usled značajno većeg sadržaja PVA u hidrogelu, ovi pikovi se verovatno pretežno odnose na endotermno razlaganje lanaca PVA kroz reakcije raskidanja hemijskih veza [330,331]. Blag porast temperature degradacije u slučaju hidrogelova sa većim sadržajem CHI (0,5 mas.%), takođe je u skladu sa literaturnim podacima [46], i može se pripisati uticaju hitozana, čija se termička degradacija odigrava putem umrežavanja lanaca izazvanog slobodnim radikalima i raspadanjem amino grupa [327,328]. Depolimerizacija lanaca CHI se može nastaviti sve do temperature od 400 °C putem dehidracije, deaminacije i, konačno, razlaganja piranoznih prstenova [327], što se takođe da primetiti i na slici 5.19 u obliku širokih pikova i ramena na višim T . Položaj pika degradacije polimerne matrice je očigledno pomeren ka višim temperaturama (tabela 5.10) u slučaju svih hidrogelova sa nanočesticama srebra, tj. 3.9Ag/PVA/0.1CHI (317 °C), 3.9Ag/PVA/0.5CHI (320 °C), 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr (282 °C) i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr (293 °C), što ukazuje na poboljšanje termičke stabilnosti hidrogelova sa srebrom, a takođe je u skladu i sa rezultatima TGA. Konačno, na temperaturama višim od 400 °C, DSC krive su bile glatke i bez pikova, što ukazuje na zaostali suvi ostatak koji je termički stabilan.

Tabela 5.10. DSC pikovi (endotermni) za hidrogelove PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI, PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr

	Gubitak vode		Topljenje i degradacija polimerne matrice	
	pik I (slobodna)	pik II (vezana)	pik III	pik IV
Hidrogel	T (°C)	T (°C)	T (°C)	T (°C)
PVA/0.1CHI	95,7	107	219	282
PVA/0.5CHI	82	105	217	284
3.9Ag/PVA/0.1CHI	75,2	110	213	317
3.9Ag/PVA/0.5CHI	75,2	104	212	320
PVA/0.1CHI/Gr	74	137	220	272
PVA/0.5CHI/Gr	88	147	218	276
3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr	97	156	215	282
3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr	80	150	219	293

5.2.10 Ispitivanje mehaničkih svojstava

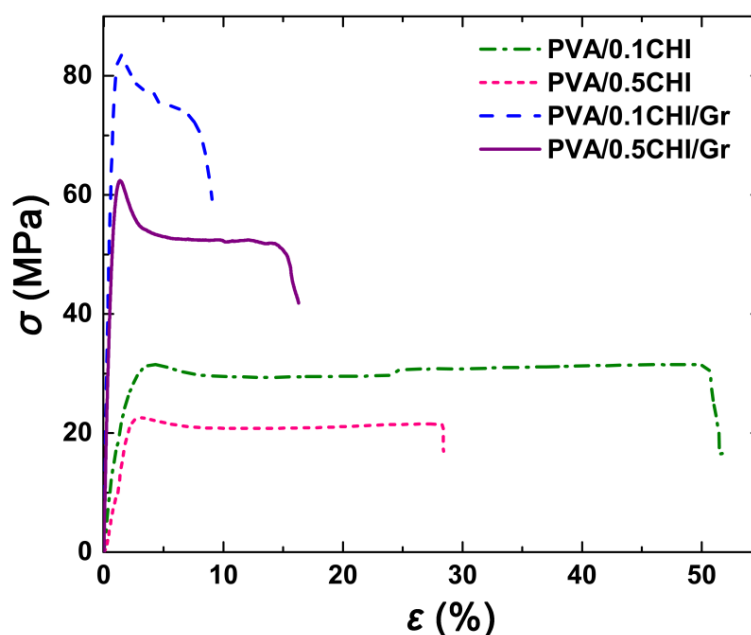
Na slici 5.20 su prikazane krive napon-deformacija za PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr filmove, dok su različiti parametri mehaničkih svojstava, izračunati na osnovu datih krivih, predstavljeni u tabeli 5.11. Ispitivanje mehaničkih svojstava uzoraka je izvršeno u cilju ispitivanja uticaja inkorporacije grafena na karakteristike polimerne matrice, a uzorci su za potrebe ovih ispitivanja pripremljeni u formi filma, umesto hidrogela, kako bi se jednostavnije napravila epruveta odgovarajućih dimenzija za rad na kidalici, kao što je objašnjeno u eksperimentalnom delu (poglavlje 4.5.11).

Sa slike 5.20 se vidi da je prisustvo grafena značajno poboljšalo mehanička svojstva uzoraka, sa bitno većom zateznom čvrstoćom, σ_Z , (83,5 i 62,3 MPa) i naponom pri kidanju, σ_K , (60,2 i 49,4 MPa) za PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr, redom, u poređenju sa PVA/0.1CHI i PVA/0.5CHI (σ_Z od 31,5 i 22,6MPa, redom i σ_K od 30,9 i 21,3 MPa, redom) (tabela 5.11). Takođe se može zaključiti da su filmovi sa većim sadržajem hitozana (PVA/0.5CHI i PVA/0.5CHI/Gr) imali nešto lošija mehanička svojstva, tj. nešto niže vrednosti σ_Z i σ_K , u poređenju sa PVA/0.1CHI i PVA/0.1CHI/Gr (tabela 5.11). Poznato je da sam hitozan, odnosno njegovi filmovi i hidrogelovi, imaju generalno slabija mehanička svojstva [338], pa ni ovi rezultati ne predstavljaju iznenađenje. Nasuprot tome, potvrđeno je da prisustvo grafena može značajno poboljšati mehanička svojstva kompozitnih materijala na bazi hitozana, čak i kada se Gr dodaje u vrlo malim količinama [339], što je u skladu i sa rezultatima ovog rada, gde je korišćen 0,01 mas.% Gr.

Nasuprot tome, deformacije na granici elastičnosti i pri kidanju, ϵ_Z i ϵ_K , su se pokazale nešto nižim za hidrogelove sa grafenom, a višim u hidrogelovima sa većim sadržajem CHI (tabela 5.11), što ukazuje na to da dodatak grafena smanjuje elastičnost filmova, dok je prisustvo veće količine hitozana poboljšava. Sa ovim su u skladu i dobijene vrednosti Jungovog modula elastičnosti, E_J , koje su bile više za PVA/0.1CHI/Gr (110,7 MPa) i PVA/0.5CHI/Gr (82,7 MPa), čime je potvrđeno da su ovi uzorci krtiji, odnosno manje elastični nego PVA/0.1CHI (14,7 MPa) i PVA/0.5CHI (10,6 MPa).

Tabela 5.11. Mehanička svojstva PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr filmova: σ_Z – zatezna čvrstoća, ϵ_Z –deformacija na granici elastičnosti, E_J – Jungov moduo elastičnosti, σ_K – čvrstoća pri kidanju, ϵ_K – deformacija pri kidanju

	σ_Z (MPa)	ϵ_Z (%)	E_J (MPa)	σ_K (MPa)	ϵ_K (%)
PVA/0.1CHI	31,5	4,08	14,7	30,9	50,6
PVA/0.5CHI	22,6	3,08	10,6	21,3	28,4
PVA/0.1CHI/Gr	83,5	1,41	110,7	60,2	9,0
PVA/0.5CHI/Gr	62,3	1,36	82,7	49,4	15,4



Slika 5.20. Krive napon-deformacija za PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr filmove

5.3 ISPITIVANJE BUBRENJA I OTPUŠTANJA SREBRA

5.3.1 Kinetika bubrenja

Sposobnost bubrenja je jedno od najvažnijih svojstava hidrogelnih materijala, posebno za primene kao obloge za rane. Hidrogelovi bi trebalo da imaju visok stepen bubrenja, kako bi se ostvarilo efikasno upijanje i uklanjanje eksudata rane, uz istovremeno održavanje lokalne vlažnosti na području rane, čime se sprečava lepljenje obloge za tkivo rane i ponovne ozlede prilikom previjanja [1]. U ovom radu su ispitivana svojstva bubrenja svih hidrogelova – dakle, onih bez nanočestica srebra (PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr), kao i hidrogelova sa različitim koncentracijama srebra (0.25Ag/PVA/0.1CHI, 0.25Ag/PVA/0.5CHI, 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr, 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr).

Dobijeni rezultati, odnosno profili bubrenja za hidrogelove bez srebra, PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, prikazani su na slici 5.21, dok su vrednosti ravnotežnog stepena bubrenja, q_{eq} , kao i koeficijent difuzije, dobijenih fitovanjem različitim modelima, prikazane u tabelama 5.12 i 5.13. Eksperimentalni profili bubrenja, koji predstavljaju zavisnost odnosa trenutnog i ravnotežnog stepena bubrenja (q_t/q_{eq}) od vremena, fitovani su pomoću nekoliko teorijskih modela, u cilju utvrđivanja difuzionih i kinetičkih parametara procesa bubrenja. Izabrani su modeli koji se najčešće sreću u literaturi, odnosno aproksimacija ranog vremena (eng. *early time approximation*, ETA), aproksimacija kasnog vremena (eng. *late time approximation*, LTA), i Eters model [257,259,260,340]. U slučaju ETA modela, primenjene su dve različite jednačine, kako bi se uporedili standardni ETA model (jedn. (5.7)), koji se najčešće primenjuje u većini istraživanja [257,259,260], kao i modifikovana ETA jednačina (jedn. (5.8)), koju su Ritger i Peppas predložili, a koja je izvedena iz drugog Fikovog zakona difuzije i uzima u obzir geometriju uzorka, tj. difuziju u dva pravca (aksijalnom i radijalnom) [258]. Standardni ETA model se često pogrešno primenjuje na diskove hidrogelova koji imaju porediv prečnik i debljinu ($2r/\delta \approx 1$), iako je u njegovom izvođenju zanemarena difuzija po omotaču cilindra (diska), što je validno samo za tanke filmove (u aproksimaciji $2r/\delta > 100$), dok modifikovani ETA model uzima i ovaj faktor u razmatranje prilikom rešavanja drugog Fikovog zakona difuzije. Zato standardni ETA model uglavnom pokazuje slaganje sa eksperimentalnim podacima maksimalno u početnih 60 % bubrenja, dok slaganje modifikovanog ETA modela može dostići i 80-90 % od ravnotežnog stepena bubrenja [258].

$$\frac{q_t}{q_{eq}} = 4 \left(\frac{D_{ETA} t}{\pi \delta^2} \right)^{1/2} \quad (5.7)$$

$$\frac{q_t}{q_{eq}} = 4 \left(\frac{D_{ETA} t}{\pi r^2} \right)^{1/2} - \pi \left(\frac{D_{ETA} t}{\pi r^2} \right) - \frac{\pi}{3} \left(\frac{D_{ETA} t}{\pi r^2} \right)^{3/2} + 4 \left(\frac{D_{ETA} t}{\pi \delta^2} \right)^{1/2} - \frac{2r}{\delta} \left[8 \left(\frac{D_{ETA} t}{\pi r^2} \right) - 2\pi \left(\frac{D_{ETA} t}{\pi r^2} \right)^{3/2} - \frac{2\pi}{3} \left(\frac{D_{ETA} t}{\pi r^2} \right)^2 \right] \quad (5.8)$$

U jednačinama (5.7) i (5.8), predstavljene su sledeće fizičke veličine: D_{ETA} – koeficijent difuzije medijuma za bubrenje (indeks “ETA” predstavlja ETA model), t – vreme bubrenja, q_t – stepen bubrenja u vremenu t , δ – debljina hidrogela, r – poluprečnik hidrogela.

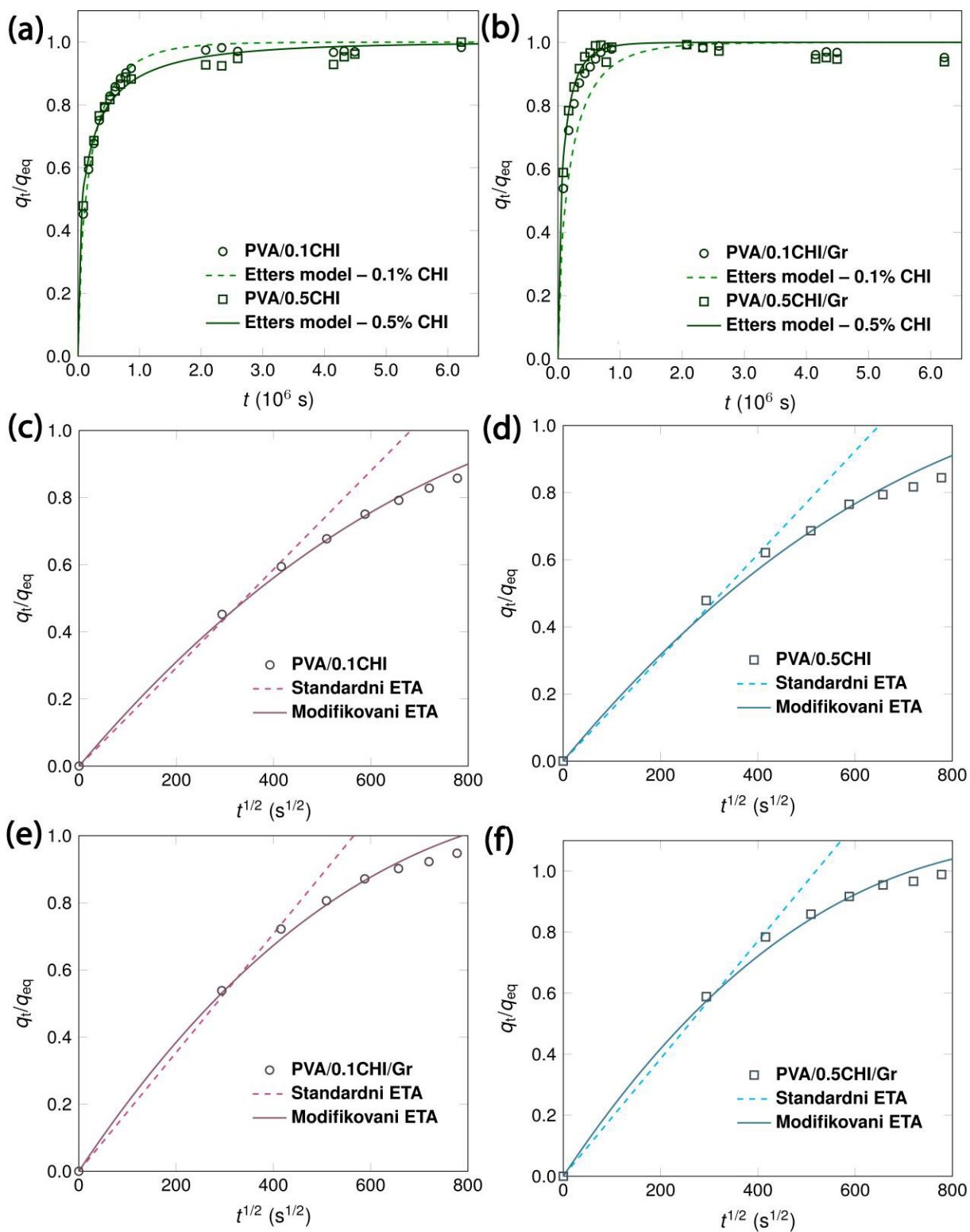
LTA model (jedn. (5.9)) se obično primenjuje za fitovanje poslednjih 40 % bubrenja, dok validnost Eters modela (jedn. (5.10)) obuhvata čitav period bubrenja. Značenje fizičkih veličina u jednačinama (5.9) i (5.10) je sledeće: D_{LTA} – koeficijent difuzije medijuma za bubrenje (indeks “LTA” predstavlja LTA model), D – koeficijent difuzije medijuma za bubrenje određen na osnovu Eters modela, a , b , k – Eters konstante, a ostale veličine imaju ranije definisano značenje.

$$\frac{q_t}{q_{eq}} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \exp\left(-\frac{D_{LTA} \pi^2 t}{\delta^2}\right) \quad (5.9)$$

$$\frac{q_t}{q_{eq}} = 1 - \exp\left[-k \left(\frac{D t}{\delta^2}\right)^a\right]^{1/b} \quad (5.10)$$

Etters modeli (slike 5.21a i 5.21b) su pokazali dobro slaganje sa eksperimentalnim profilima tokom čitavog perioda bubrenja, a dobijeni koeficijenti difuzije, D (tabele 5.12 i 5.13), su bili viši u slučaju hidrogelova sa grafenom ($3,12 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ za PVA/0.1CHI/Gr i $3,54 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ za PVA/0.5CHI/Gr), u poređenju sa uzorcima bez grafena ($1,80 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ za PVA/0.1CHI i $1,57 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ za PVA/0.5CHI), što ukazuje na povoljan uticaj prisustva grafena na bubrenje polimerne matrice, jer hidrogelovi sa Gr bubre brže nego uzorci bez Gr. S druge strane, maksimalni ravnotežni stepen bubrenja je bio viši u slučaju hidrogelova bez grafena (tabela 5.12), a takođe je primećen i porast q_{eq} sa povećanjem sadržaja hitozana u hidrogelu (tabele 5.12 i 5.13), što takođe ukazuje na povoljan uticaj hitozana na stepen bubrenja polimerne matrice hidrogela. Ovaj efekat može biti posledica prisustva velikog broja $-\text{OH}$ i $-\text{NH}_2$ grupa na lancu CHI, koje učestvuju u vodoničnom vezivanju sa molekulima vode. Molekuli vode grade jače vodonične veze sa amino gurpama, pa hidrogelovi sa većim sadržajem hitozana generalno postižu bolju apsorpciju vode [325]. Veća sposobnost sorpcije hidrogelova sa većim sadržajem CHI je takođe potvrđena i rezultatima DSC analize (poglavlje 5.2.9).

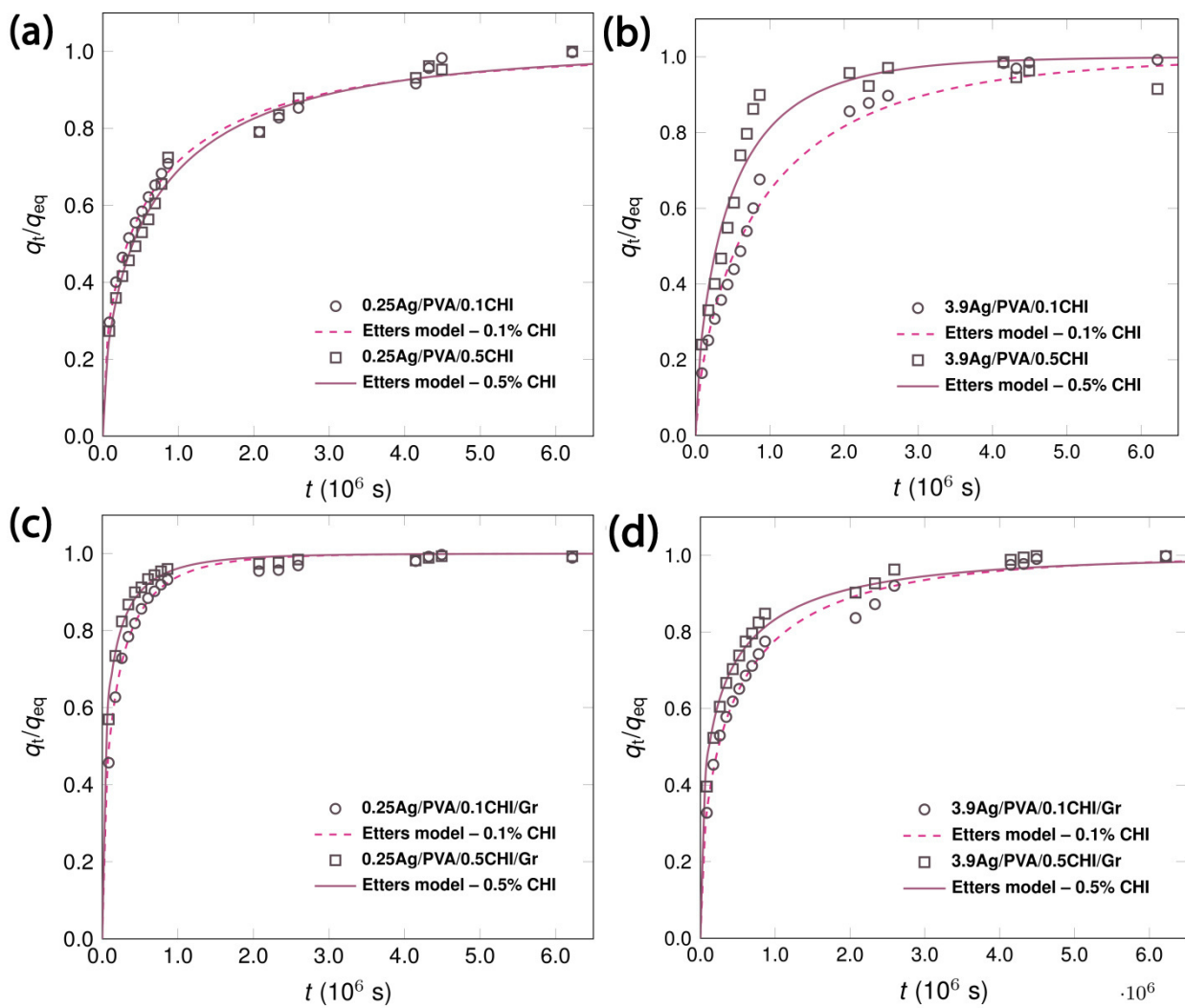
Fitovanjem su ispitana dva modela aproksimacije ranog vremena – standardni i modifikovani ETA model (jednačine (5.7) i (5.8), redom). Na slikama 5.21c-f je prikazano poređenje ova dva modela i očigledno je daleko bolje slaganje modifikovanog ETA modela (jednačina (5.8)) sa eksperimentalnim rezultatima, što je i očekivano usled specifične geometrije diskova hidrogelova. Za navedeni modifikovani ETA model Ritger i Peppas tvrde da pokazuje slaganje sa profilima bubrenja čak i do 80-90 % [258], što je potvrđeno i rezultatima ovog rada (slike 5.21c-f). Model LTA je pokazao nešto slabije slaganje sa eksperimentalnim rezultatima, u poređenju sa Etters i ETA modelima, što je potvrđeno i nešto nižim vrednostima R^2 parametra kvaliteta fita (tabele 5.12 i 5.13). Ovo nije iznenađujuće, s obzirom na to da se ovaj model odnosi samo na završni period bubrenja polimerne matrice. Na kraju, poređenjem vrednosti koeficijenata difuzije medijuma za bubrenje, dobijenih iz različitih modela i prikazanih u tabelama 5.12 i 5.13, može se zaključiti da su vrednosti D dobijene na osnovu Etters modela bile nešto više od vrednosti iz ETA, a niže od vrednosti iz LTA modela, što potvrđuje da je Etters model najobjektivniji za fitovanje čitavog perioda bubrenja.



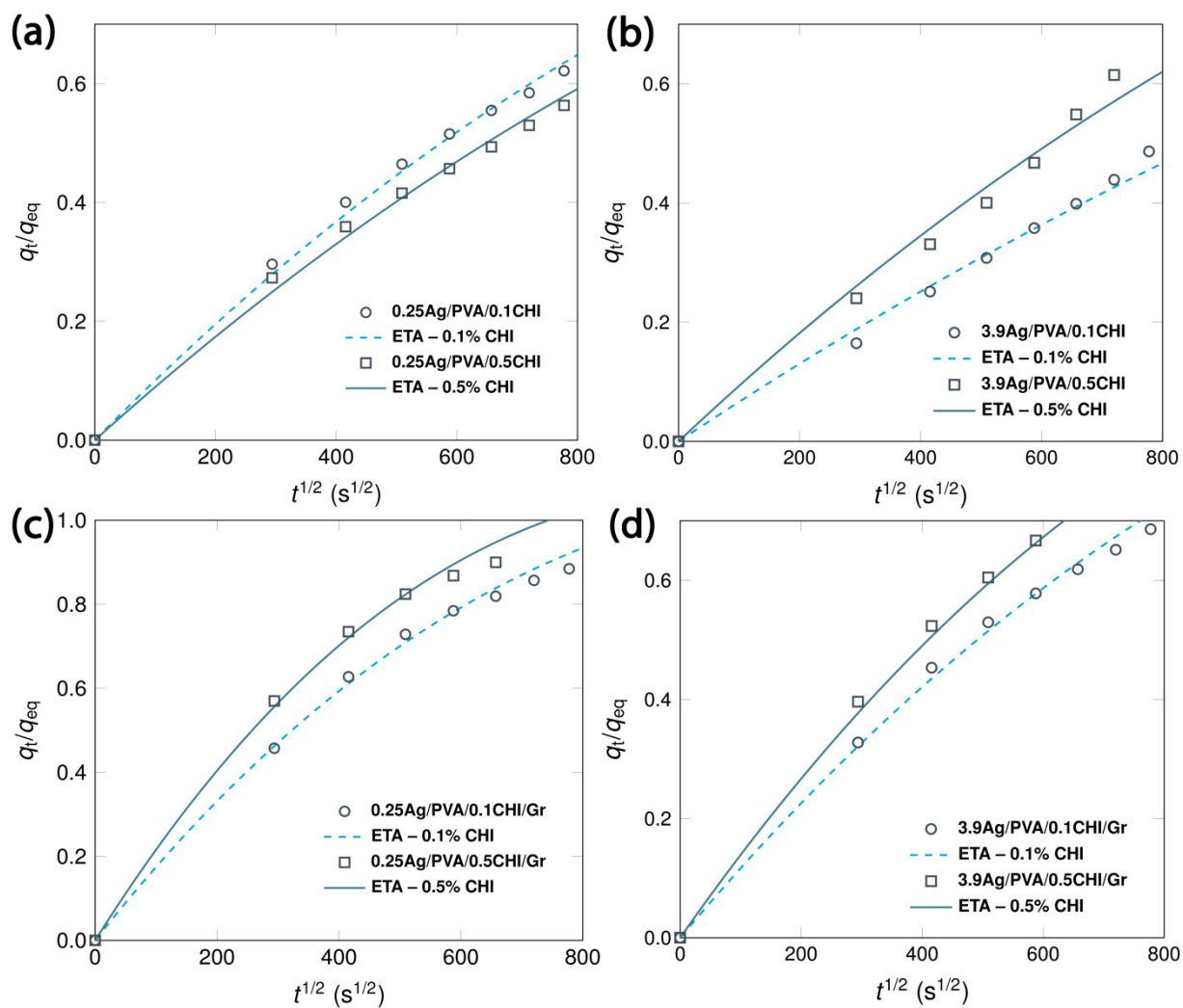
Slika 5.21. Profili bubrenja u fosfatnom puferu za hidrogelove bez srebra (PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr): (a,b) Etters modeli bubrenja, (c,d,e,f) uporedni prikaz standardne i modifikovane aproksimacije ranog vremena

U slučaju hidrogelova sa nanočesticama srebra, primećeni su slični trendovi ponašanja prilikom bubrenja u fosfatnom puferu. Profili bubrenja, zajedno sa Eters modelima, prikazani su za ove hidrogelove na slici 5.22, dok su ETA modeli (samo modifikovani ETA, koji su se pokazali kao relevantniji za bubrenje hidrogelova poredive debljine i prečnika), prikazani na slici 5.23. Kvantitativne vrednosti parametara bubrenja su prikazane u tabelama 5.12 i 5.13. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da su hidrogelovi sa inkorporisanim nanočesticama srebra generalno imali veću sposobnost bubrenja, što se ogleda u većim vrednostima q_{eq} u odnosu na PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI (tabela 5.12), PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr (tabela 5.13), kao i u porastu ovih vrednosti sa porastom koncentracije nanočestica srebra u hidrogelu. Ovakvo ponašanje nanokompozitnih hidrogelova bi moglo biti uzrokovano rastezanjem polimerne matrice nakon inkorporacije nanočestica srebra između polimernih lanaca, ali i solvatacijom samih nanočestica srebra, usled čega dolazi do apsorpcije većeg broja molekula vode, koji se vezuju za nanočestice formirajući oko njih solvatacioni omotač. Ovi efekti su razmatrani i na osnovu rezultata DSC analize (poglavlje 5.2.9). Takođe je, kao i kod hidrogelova bez srebra, primećeno povećanje ravnotežnog stepena bubrenja sa porastom sadržaja hitozana u hidrogelu, kao i smanjenje koeficijenta difuzije medijuma za bubrenje kroz nanokompozitne hidrogelove, u poređenju sa PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI (tabela 5.12), PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr (tabela 5.13), što ukazuje na to da hidrogelovi sa nanočesticama srebra bubre sporije, ali dostižu zato viši maksimalni stepen bubrenja. Na kraju, i za hidrogelove sa nanočesticama srebra je primećeno da su vrednosti koeficijenata difuzije, dobijene na osnovu Eters modela, bile između onih dobijenih iz ETA i LTA (tabele 5.12 i 5.13), što ukazuje na najbolju primenljivost ovog modela na bubrenje polimerne matrice tokom čitavog ispitivanog perioda.

Mehanizam bubrenja hidrofилnih polimernih gelova, odnosno sorpcije pogodnog medijuma u unutrašnjost polimerne matrice, kompleksan je proces, a posebno u slučaju polimera koji sadrže funkcionalne grupe podložne jonizaciji, kao što su amino grupe na polimernom lancu hitozana. Ovaj proces se obično odvija u nekoliko etapa, pri čemu je početna apsorpcija u pore hidrogela brz proces, praćen sporijom difuzijom molekula rastvarača unutar polimerne matrice, za koji je pogonska sila gradijent koncentracije medijuma za bubrenje unutar hidrogela. Na ovaj način dolazi do formiranja pokretne granice između nabubrela i još uvek nesolvatisane oblasti u matrici hidrogela [341]. Početnom apsorpcijom molekula vode, ili drugog pogodnog medijuma za bubrenje, kao i njihovom difuzijom u unutrašnjost polimerne matrice, dolazi do pomeranja ove granice, ka unutrašnjosti matrice hidrogela. U poslednjoj fazi bubrenja, mehanizam sorpcije se pretežno odvija kvašenjem makromolekulskih lanaca tik ispred pokretne granice, usled prisustva molekula rastvarača, što rezultuje povećanjem zapremine polimerne matrice [341,342].



Slika 5.22. Etters modeli bubrenja za hidrogelove sa srebrom: (a) 0.25Ag/PVA/0.1CHI i 0.25Ag/PVA/0.5CHI, (b) 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI, (c) 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr, (d) 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr



Slika 5.23. Aproksimacije ranog vremena za profile bubrenja za hidrogelove sa srebrom: (a) 0.25Ag/PVA/0.1CHI i 0.25Ag/PVA/0.5CHI, (b) 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI, (c) 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr, (d) 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr

Tabela 5.12. Koeficijenti difuzije, D , medijuma za bujenje kroz polimernu matricu hidrogelova PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, 0.25Ag/PVA/0.1CHI, 0.25Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI i ostali difuzioni parametri, određeni fitovanjem eksperimentalnih podataka pomoću modela ETA, Etters i LTA

model		PVA/0.1CHI	PVA/0.5CHI	0.25Ag/PVA/0.1CHI	0.25Ag/PVA/0.5CHI	3.9Ag/PVA/0.1CHI	3.9Ag/PVA/0.5CHI
	q_{eq} (%)	234 ± 6,0	258 ± 4,0	290 ± 21	328 ± 14	396 ± 87	413 ± 20
ETA	D_{ETA} ($10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	1,22	1,28	0,446	0,350	0,311	0,624
	R^2	0,998	0,991	0,996	0,993	0,994	0,983
Etters	D ($10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	1,80	1,57	0,828	0,738	1,42	2,20
	a	0,681	0,454	0,525	0,570	0,700	0,700
	b	0,095	0,121	0,084	0,083	0,082	0,081
	k	0,626	0,500	0,303	0,331	0,396	0,450
	R^2	0,994	0,988	0,992	0,991	0,990	0,956
LTA	D_{LTA} ($10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	2,15	2,16	0,772	0,641	0,513	1,03
	R^2	0,950	0,910	0,911	0,942	0,968	0,938

Tabela 5.13. Koeficijenti difuzije, D , medijuma za burenje kroz polimernu matricu hidrogelova PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr, 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr i ostali difuzioni parametri, određeni fitovanjem eksperimentalnih podataka pomoću modela ETA, Etters i LTA

model		PVA/0.1CHI/Gr	PVA/0.5CHI/Gr	0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr	0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr	3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr	3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr
	q_{eq} (%)	182 ± 33	212 ± 14	187 ± 12	199 ± 16	273 ± 40	261 ± 21
ETA	D_{ETA} ($10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	0,186	2,401	1,412	2,217	0,610	0,876
	R^2	0,989	0,989	0,997	0,998	0,996	0,996
Etters	D ($10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	3,12	3,54	1,74	2,36	0,940	0,983
	a	0,688	0,650	0,592	0,497	0,544	0,442
	b	0,095	0,220	0,080	0,081	0,083	0,083
	k	0,640	1,506	0,480	0,426	0,350	0,335
	R^2	0,994	0,985	0,996	0,995	0,994	0,990
LTA	D_{LTA} ($10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	3,62	4,65	2,39	3,70	1,04	1,50
	R^2	0,953	0,945	0,950	0,947	0,927	0,939

5.3.2 Kinetika otpuštanja srebra

Otpuštanje srebra iz polimerne matrice je jedno od najvažnijih svojstava hidrogelnih obloga za rane, jer je ovaj proces tesno povezan sa antibakterijskim svojstvima, kao i citotoksičnošću hidrogelova. Proces otpuštanja srebra je najčešće difuziono kontrolisan, ali na njega takođe mogu uticati i drugi faktori, kao što je bubrenje matrice hidrogela, relaksacija polimernih lanaca, erozija, odn. rastvaranje ili raspadanje polimernog nosača, ili kombinacija više navedenih procesa [258].

Otpuštanje srebra iz polimerne matrice hidrogelova je ispitivano tokom 28 dana u fosfatnom puferu na 37 °C, a dobijeni profili za hidrogelove 0.25Ag/PVA/0.1CHI, 0.25Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI (slika 5.24), kao i 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr, 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr (slika 5.25) fitovani su različitim teorijskim modelima otpuštanja srebra, u cilju ispitivanja difuzionih parametara i kinetike otpuštanja srebra. Primenjeni su već pomenuti modeli aproksimacije ranog vremena, standardni (jedn. (5.11)) i modifikovani (jedn. (5.12)) ETA [258], koji su, slično kao u slučaju ispitivanja bubrenja (poglavlje 5.3.1), međusobno upoređeni kako bi se ispitala njihova relevantnost i slaganje sa eksperimentalnim rezultatima. U jednačinama (5.11) i (5.12), $c_{Ag,t}$ predstavlja koncentraciju srebra otpuštenog do vremena t , $c_{Ag,uk}$ – ukupnu (početnu) koncentraciju srebra u hidrogelu, D_{Ag} – koeficijent difuzije srebra iz matrice hidrogela, a ostale fizičke veličine imaju ranije definisana značenja.

$$\frac{c_{Ag,t}}{c_{Ag,uk}} = 4 \left(\frac{D_{Ag}t}{\pi \delta^2} \right)^{1/2} \quad (5.11)$$

$$\begin{aligned} \frac{c_{Ag,t}}{c_{Ag,uk}} = & 4 \left(\frac{D_{Ag}t}{\pi r^2} \right)^{\frac{1}{2}} - \pi \left(\frac{D_{Ag}t}{\pi r^2} \right) - \frac{\pi}{3} \left(\frac{D_{Ag}t}{\pi r^2} \right)^{\frac{3}{2}} + 4 \left(\frac{D_{Ag}t}{\pi \delta^2} \right)^{\frac{1}{2}} - \frac{2r}{\delta} \left[8 \left(\frac{D_{Ag}t}{\pi r^2} \right) - \right. \\ & \left. - 2\pi \left(\frac{D_{Ag}t}{\pi r^2} \right)^{3/2} - \frac{2\pi}{3} \left(\frac{D_{Ag}t}{\pi r^2} \right)^2 \right] \quad (5.12) \end{aligned}$$

Dobijeni profili otpuštanja (zavisnost udela otpuštenog srebra, tj., odnosa koncentracije srebra otpuštenog do datog trenutka i početne koncentracije srebra u hidrogelu, $c_{Ag,t}/c_{Ag,uk}$, od vremena) su takođe fitovani pomoću tri difuziona modela –Makoid-Banakar [343,344] (jedn. (5.13)), Korsmeyer-Peppas [345] (jedn. (5.14)) i Kopcha [346,347] (jedn. (5.15)).

$$\frac{c_{Ag,t}}{c_{Ag,uk}} = k_{MB} \cdot t^n \cdot \exp(-c \cdot t) \quad (5.13)$$

$$\frac{c_{Ag,t}}{c_{Ag,uk}} = k_{KP} \cdot t^n \quad (5.14)$$

$$\frac{c_{Ag,t}}{c_{Ag,uk}} = A \cdot t^{1/2} + B \cdot t \quad (5.15)$$

U jednačinama (5.13), (5.14) i (5.15) su predstavljene sledeće fizičke veličine: k_{MB} – Makoid-Banakar konstanta; c – Makoid-Banakar parametar koji potiče od ograničenja rastvorljivosti otpuštenog jedinjenja u graničnom slučaju kada Makoid-Banakar funkcija teži maksimumu; k_{KP} – Korsmeyer-Peppas konstanta; n – koeficijent u modelima Korsmeyer-Peppas i Makoid-Banakar, koji opisuje mehanizam prenosa mase prilikom otpuštanja ($n < 0,5$ – Fikova difuzija, $n > 0,5$ – ne-Fikova/anomalna difuzija, $n = 1$ – prenos mase druge vrste [345]); A i B – Kopcha konstante koje zavise od dominantnog mehanizma prenosa mase tokom otpuštanja (koeficijent A se odnosi na udeo uticaja difuzionih procesa tokom otpuštanja, a B na uticaj relaksacije polimerne matrice)

[257]. Kvantitativni rezultati fitovanja, odnosno vrednosti dobijenih parametara fita, prikazani su u tabelama 5.14 i 5.15, za hidrogelove bez i sa Gr, redom.

Na osnovu rezultata fita, mogu se izvesti određeni zaključci o procesu otpuštanja srebra. Pre svega, na osnovu slika 5.24 i 5.25, može se zaključiti da je farmakokinetički model Makoid-Banakar pokazao najbolje slaganje sa eksperimentalnim rezultatima, iako su svi modeli generalno veoma dobro fitovali eksperimentalne podatke što je potvrđeno i visokim vrednostima parametra kvaliteta fita, R^2 (tabele 5.14 i 5.15). Osim toga, na osnovu eksponenta n iz Korsmeyer-Peppas modela, zaključeno je da je proces otpuštanja bio difuziono kontrolisan, jer je za sve hidrogelove vrednost n bila manja od 0,5 [345]. Ovo je takođe potvrđeno i na osnovu rezultata Kopcha modela, u kome je vrednost parametra A bila veća od $|B|$ za sve uzorke hidrogelova (tabele 5.14 i 5.15), što ukazuje na značajniji uticaj difuzionih procesa na otpuštanje srebra iz hidrogela, u poređenju sa efektom relaksacije polimerne matrice [257], kao i činjenicom da su vrednosti eksponenta n iz Makoid-Banakar modela bile bliske 0,5, što takođe ukazuje na difuziono kontrolisan proces. Vrednosti empirijskog parametra c iz Makoid-Banakar modela (koji se odnosi na uvođenje graničnog slučaja u modelu, za koji se potpuno rastvaranje otpuštene supstance dostiže u trenutku kada Makoid-Banakar funkcija dostiže svoj maksimum) su generalno bile niske i bliske 0 za sve uzorke hidrogelova (tabele 5.14 i 5.15), što ukazuje na dobro slaganje rezultata ovog modela sa Korsmeyer-Peppas modelom, jer praktično, poređenjem jednačina (5.13) i (5.14), očigledno je da za $c \rightarrow 0$, Makoid-Banakar model postaje jednak modelu Korsmeyer-Peppas. Na osnovu rezultata fitovanja pomoću navedena tri modela, može se zaključiti da je otpuštanje srebra iz polimerne matrice hidrogelova dominantno difuziono kontrolisan proces, te da se podvrgava Fikovom zakonu difuzije.

Kako je utvrđeno da je difuzija glavni pokretač za otpuštanje srebra iz matrice hidrogelova, navedeni profili, tačnije početni delovi krivih otpuštanja, fitovani su još jednim modelom – aproksimacijom ranog vremena, ETA, koja se odnosi generalno na početni period do 60 % otpuštanja [59,257], a koja je dobijena rešavanjem drugog Fikovog zakona difuzije za karakterističnu vrstu nosača. Ova aproksimacija je slična kao model koji je korišćen za ispitivanje bubrenja (poglavlje 5.3.1), pa su i u ovom slučaju korišćene dve jednačine – standardna ETA (jedn. (5.11)), koja se odnosi na uprošćen slučaj jednodimenzionog otpuštanja iz tankih filmova, kao i modifikovana ETA (jedn. (5.12)) [258], koja uzima u obzir cilindričnu geometriju diskova hidrogelova, koji imaju porediv prečnik (d) i debljinu (δ) i za koje važi $d/\delta \approx 1$, pa se difuzija odigrava u dva pravca – aksijalno i radijalno. Kako su hidrogelovi u ovom radu imali oblik diskova prečnika $d \approx 10$ -12 mm i debljine (visine) $\delta \approx 5$ mm, bilo je očekivano da će modifikovani ETA model pokazati bolje slaganje sa eksperimentalnim podacima, što je i potvrđeno fitovanjem, pa su na slici 5.26 radi preglednosti prikazani samo fitovi ovim modelom. U tabelama 5.14 i 5.15 takođe su prikazane vrednosti koeficijenta difuzije srebra kroz polimernu matricu, D_{Ag} , kao i vrednosti parametra kvaliteta fita (R^2). Dobijene vrednosti D_{Ag} su generalno bile za red veličine veće za hidrogelove sa većom koncentracijom nanočestica srebra (3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr), u poređenju sa 0.25Ag/PVA/0.1CHI, 0.25Ag/PVA/0.5CHI, 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelovima, što ukazuje na brže otpuštanje iz hidrogelova sa većom količinom srebra i može se objasniti većim gradijentom koncentracije, odnosno većom pogonskom silom za difuziju i otpuštanje Ag iz polimerne matrice. Takođe je, u slučaju većine hidrogelova, niža vrednost koeficijenta difuzije izračunata u slučaju uzoraka sa većim sadržajem hitozana ($11,4 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ za 3.9Ag/PVA/0.5CHI, prema $14,3 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ za 3.9Ag/PVA/0.1CHI (tabela 5.14); $7,93 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ za 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr, u poređenju sa $84,0 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ za 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i $1,22 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ za 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr, prema $3,63 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ za 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr (tabela 5.15)), što ukazuje na efekat hitozana u stabilizaciji nanočestica srebra koji dovodi do sporijeg otpuštanja iz hidrogelova sa 0,5 mas.% CHI. Jedini izuzetak su hidrogelovi 0.25Ag/PVA/0.1CHI ($2,85 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) i 0.25Ag/PVA/0.5CHI ($3,94 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) (tabela 5.14), ali

u ovom slučaju dobijene razlike su manje i ne toliko značajne kao kod ostalih uzoraka, pa se može pretpostaviti da je koncentracija srebra u ovim hidrogelovima bila nedovoljno visoka da bi se mogao primetiti značajniji efekat sadržaja hitozana na otpuštanje. Ovo takođe potvrđuje i činjenica da profili otpuštanja srebra iz 0.25Ag/PVA/0.1CHI i 0.25Ag/PVA/0.5CHI hidrogelova nisu bili međusobno značajno različiti (slike 5.24a i 5.24b).

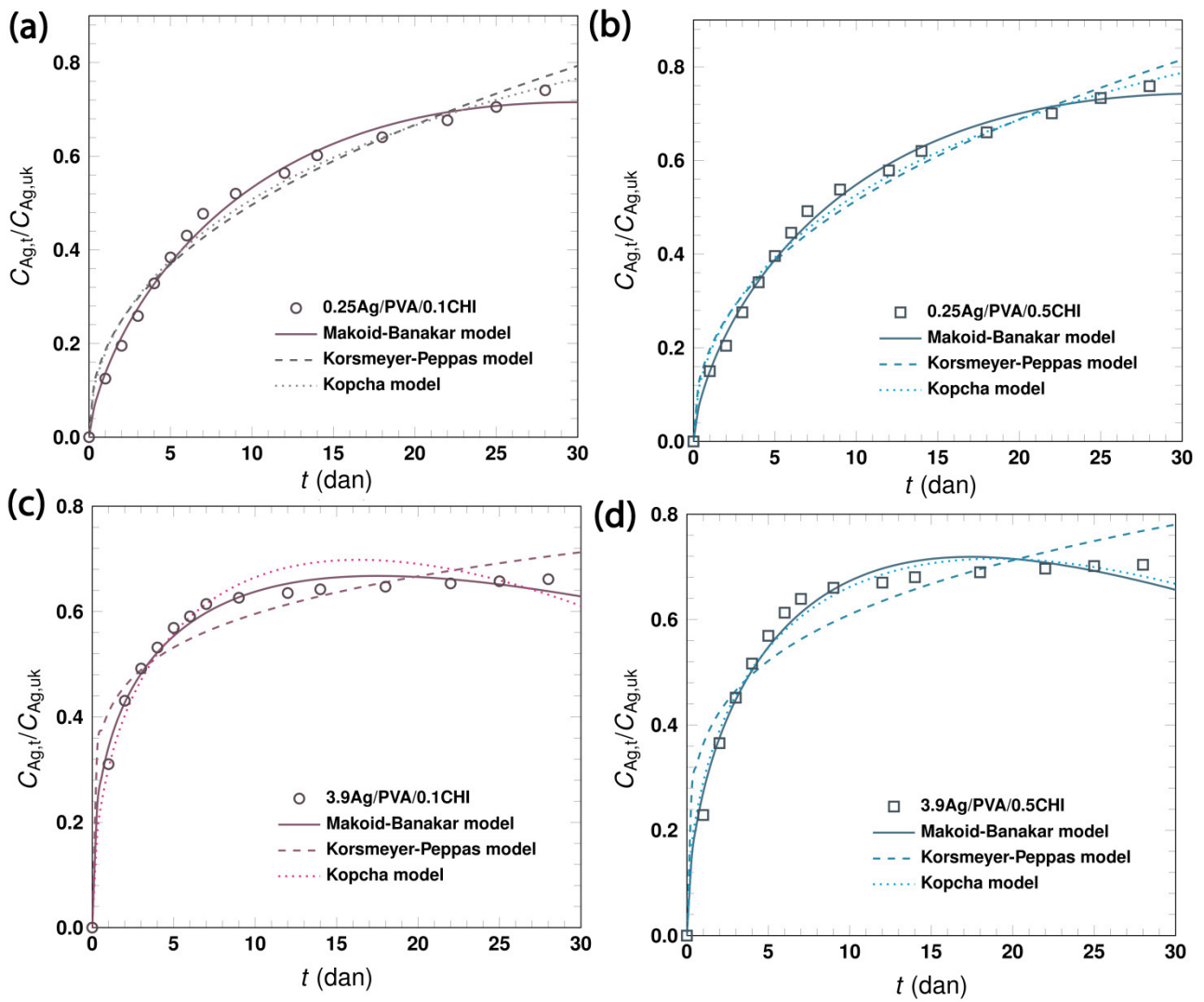
Poređenjem profila otpuštanja, hidrogelovi 0.25Ag/PVA/0.1CHI i 0.25Ag/PVA/0.5CHI (slike 5.24a i 5.24b) su se ponašali veoma slično, ispoljivši brzo otpuštanje u početnom periodu (~5 dana), koje se zatim usporilo i do kraja posmatranog perioda je otpušteno oko 80 % od ukupne početne koncentracije srebra u hidrogelu. Slično ponašanje je zapaženo i u slučaju profila 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI hidrogelova (slike 5.24c i 5.24d), koji se nisu značajno razlikovali tokom čitavog perioda otpuštanja, ali su ispoljili značajno brže otpuštanje u početnom periodu (gotovo 60 % ukupne koncentracije srebra je otpušteno tokom prvih 5 dana) i samim tim i brže dostizanje platoa, u poređenju sa hidrogelovima sa nižom koncentracijom nanočestica srebra, tj. 0.25Ag/PVA/0.1CHI i 0.25Ag/PVA/0.5CHI. Ovakvi rezultati su takođe u skladu sa dobijenim vrednostima D_{Ag} , koji su razmatrani nešto ranije, a mogu ukazati na to da sadržaj srebra u hidrogelu ima značajan uticaj na proces otpuštanja.

S druge strane, hidrogelovi sa grafenom su pokazali nešto sporije otpuštanje, i veće razlike između pojedinih uzoraka. Nakon 28 dana, u 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr hidrogelu je preostalo 49,6 % početne koncentracije srebra (slika 5.25a), dok je 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogel zadržao 61,8% (slika 5.25b), što je značajno više od oko 20 % zadržavanja u slučaju 0.25Ag/PVA/0.1CHI i 0.25Ag/PVA/0.5CHI (slike 5.24a i 5.24b, redom). Ovi podaci se takođe mogu uporediti sa 0.25Ag/PVA/Gr hidrogelom bez hitozana, koji je nakon 28 dana zadržao oko 34,2 % ukupne koncentracije srebra [60]. Iz ovih podataka se može zaključiti da hidrogelovi sa grafenom i sa većim sadržajem hitozana zadržavaju veću količinu srebra nakon otpuštanja, što je i u skladu sa zaključkom da isti uzorci generalno sporije otpuštaju srebro, na osnovu dobijenih vrednosti koeficijenta difuzije D_{Ag} . U slučaju 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelova (slike 5.25c i 5.25d, redom), takođe su primećeni karakteristični periodi početnog naglog otpuštanja u prvih 3-5 dana, praćeni sporijim otpuštanjem tokom dužeg vremenskog perioda i dostizanjem platoa na profilu otpuštanja. Slično kao kod 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelova, hidrogel sa većim sadržajem CHI (3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr) je zadržao značajno veću količinu srebra nakon 28 dana (≈ 43 %), u poređenju sa 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr (≈ 12 %), što ukazuje na bolju stabilizaciju nanočestica srebra u prisustvu veće količine hitozana.

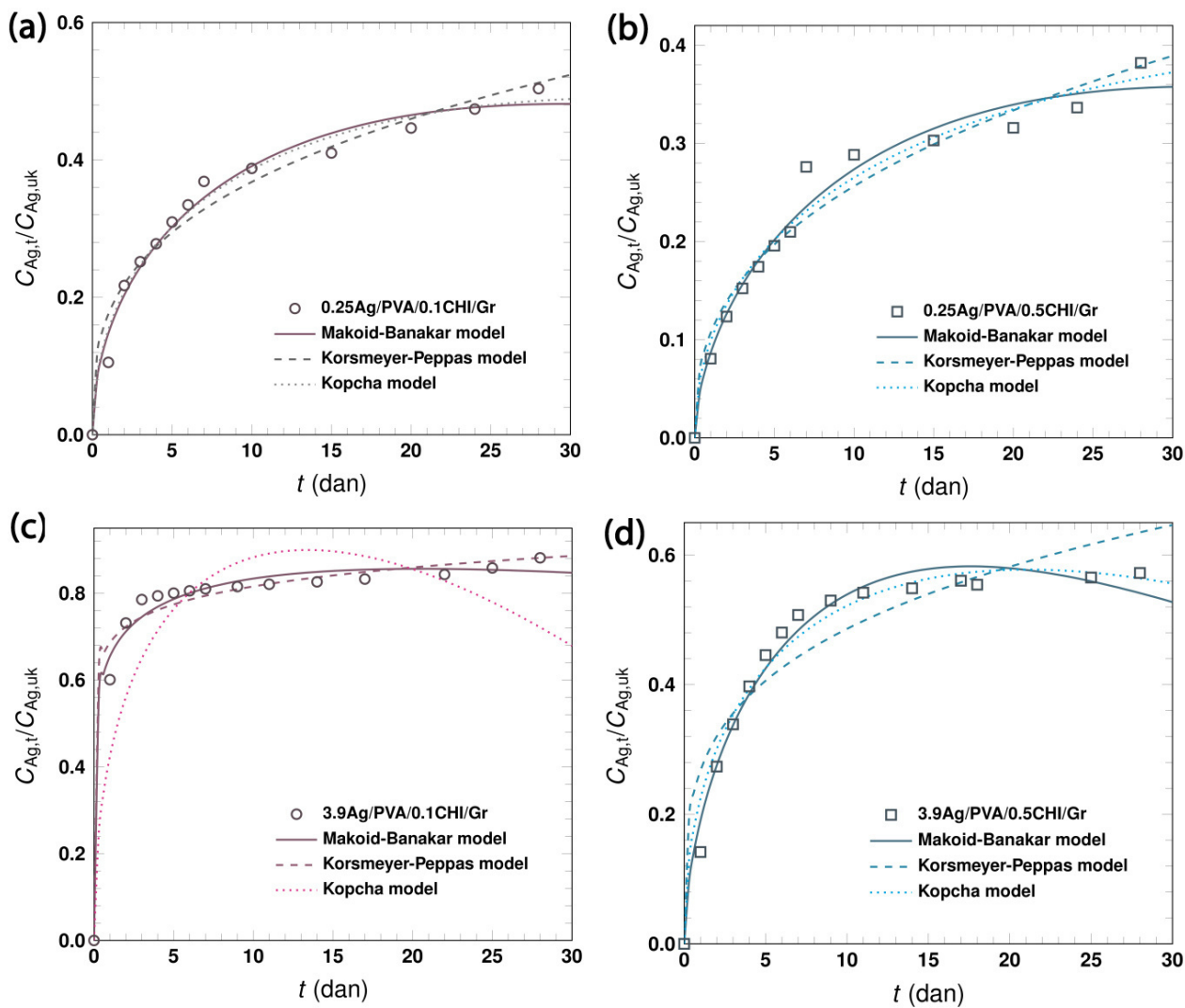
Ovakva pojava naglog otpuštanja u početnom periodu je veoma povoljna u pogledu primene hidrogelova kao obloga za rane, jer bi dostavljanje velike količine antibakterijskog agensa na mesto povrede u samom početku sigurno pogodovalo sprečavanju inicijalne adhezije bakterijskih kolonija i eventualne pojave i nastajanja biofilma, dok se sporijim otpuštanjem u kasnijim periodima omogućuje održavanje sterilnosti obloge i sprečava pojava recidivne infekcije tokom dugotrajnog lečenja rane [10,245,246]. Međutim, kinetika otpuštanja srebra i trajanje ovog početnog perioda brzog otpuštanja srebra takođe može diktirati i životni vek obloge za ranu, odnosno njenu trajnost i vreme nakon koga će biti potrebno ponovno previjanje. Posebno u slučaju lečenja rana podložnih infekcijama, preporučljivo je menjati oblogu baš u trenutku dostizanja platoa na profilu otpuštanja, kako bi se u svakom trenutku obezbedilo dostavljanje optimalne koncentracije antibakterijskog agensa [10]. U slučaju hidrogelova predstavljenih u ovom radu, potreba za zamenom obloga javila bi se u roku od 5-7 dana, kada se i dostiže plato na svim profilima otpuštanja, što je prilično dug period i omogućio bi optimalnu zaštitu rane od infekcije uz neometano zarastanje i bez čestih previjanja. Takođe bi trebalo naglasiti da je koncentracija srebra, čak i u delovima profila koji obuhvataju najveću brzinu otpuštanja, dovoljna da izazove antibakterijski efekat, ali istovremeno i dovoljno niska, tako da ne postoji opasnost od toksičnosti po zdravo tkivo [6]. Sa ovim svojstvima je svakako povezan i izbor vrste hidrogela koji

bi bio optimalan kandidat za obloge za rane, pri čemu treba imati u vidu da hidrogelovi sa većom koncentracijom srebra, iako sigurno pokazuju veoma jak i efikasan antibakterijski efekat, uvek predstavljaju i određenu opasnost po zdrave ćelije, jer je pored direktne toksičnosti bitno razmotriti i efekat akumulacije srebra [168,192]. U tom slučaju je svakako uputnije odlučiti se za najnižu moguću koncentraciju srebra koja daje zadovoljavajući antibakterijski efekat, što će biti detaljnije razmotreno u narednim poglavljima u okviru rezultata biološke karakterizacije.

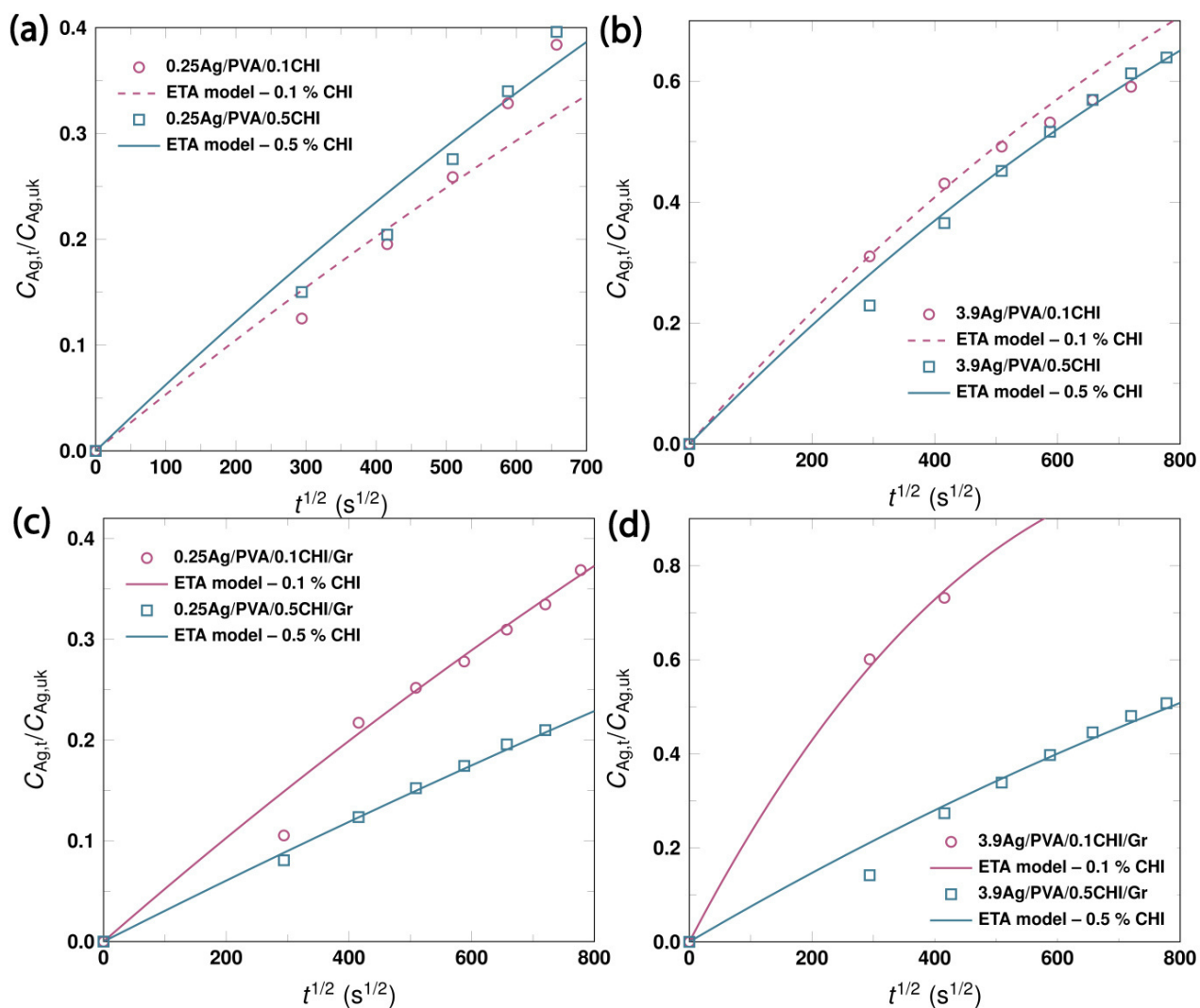
Kada se govori o koncentraciji srebra u hidrogelu, treba podsetiti da su oznake „0.25” i „3.9” samo ilustrativne i da se one odnose na koncentraciju AgNO_3 prekursora (0,25 i 3,9 mM) u rastvoru za bubrenje u kojima su hidrogelovi bubrili pre elektrohemijske sinteze, a ne stvarna koncentracija srebra u hidrogelu. Taj podatak, međutim, je kvantitativno dobijen u okviru eksperimentalnih merenja otpuštanja srebra metodom atomske apsorpcione spektroskopije, sabiranjem svih koncentracija otpuštenog srebra, kao i koncentracije preostale u hidrogelu nakon 28 dana otpuštanja. Dobijene vrednosti ukupne koncentracije srebra po zapremini hidrogela, $c_{\text{Ag,uk}}$, prikazane su u tabeli 5.16. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je, kao što je i bilo očekivano, koncentracija srebra značajno veća u hidrogelovima dobijenim iz 3,9 mM AgNO_3 rastvora za bubrenje, ali i da je ukupna količina srebra takođe rasla sa porastom sadržaja hitozana u hidrogelovima (0,5 mas.%). Ovi rezultati se slažu sa rezultatima UV-vidljive spektroskopije (poglavlje 5.2.1), koja je ukazala na značajno veću koncentraciju nanočestica srebra u hidrogelovima sa 0,5 mas.% CHI. Ovome u prilog takođe ide i činjenica da su svi navedeni uzorci sadržali veću količinu srebra u poređenju sa 0.25Ag/PVA/Gr hidrogelom bez hitozana ($28,3 \pm 1,7 \text{ mg dm}^{-3}$ [60]).



Slika 5.24. Profili i teorijski modeli otpuštanja srebra za hidrogelove bez grafena: (a) 0.25Ag/PVA/0.1CHI, (b) 0.25Ag/PVA/0.5CHI, (c) 3.9Ag/PVA/0.1CHI i (d) 3.9Ag/PVA/0.5CHI



Slika 5.25. Profili i teorijski modeli otpuštanja srebra za hidrogelove sa grafenom: (a) 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr, (b) 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr, (c) 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i (d) 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr



Slika 5.26. Aproksimacija ranog vremena za profile otpuštanja srebra iz hidrogelova: (a) 0.25Ag/PVA/0.1CHI i 0.25Ag/PVA/0.5CHI, (b) 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI, (c) 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr, (d) 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr

Tabela 5.14. Parametri otpuštanja srebra iz hidrogelova 0.25Ag/PVA/0.1CHI, 0.25Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI, dobijeni fitovanjem teorijskim modelima Korsmeyer-Peppas, Makoid-Banakar, Kopcha i ETA

model		0.25Ag/PVA/0.1CHI	0.25Ag/PVA/0.5CHI	3.9Ag/PVA/0.1CHI	3.9Ag/PVA/0.5CHI
Korsmeyer-Peppas	$k_{kp} (s^{-n})$	0,186	0,196	0,409	0,363
	n	0,427	0,419	0,163	0,225
	R^2	0,975	0,979	0,949	0,918
Makoid-Banakar	$k_{mb} (s^{-n})$	0,140	0,152	0,349	0,280
	n	0,678	0,645	0,347	0,509
	c	0,0225	0,0203	0,0198	0,0292
	R^2	0,994	0,995	0,992	0,987
Kopcha	$A (s^{-1/2})$	0,189	0,198	0,342	0,329
	$B (s^{-1})$	-0,0089	-0,0098	-0,0427	-0,0377
	R^2	0,983	0,987	0,978	0,984
ETA	$D_{Ag} (10^{-9} cm^2 s^{-1})$	2,85	3,94	14,3	11,4
	R^2	0,974	0,966	0,999	0,990

Tabela 5.15. Parametri otpuštanja srebra iz hidrogelova 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr, 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr, dobijeni fitovanjem teorijskim modelima Korsmeyer-Peppas, Makoid-Banakar, Kopcha i ETA

model		0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr	0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr	3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr	3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr
Korsmeyer-Peppas	$k_{kp} (s^{-n})$	0,175	0,107	0,686	0,267
	n	0,321	0,380	0,0752	0,259
	R^2	0,967	0,962	0,980	0,906
Makoid-Banakar	$k_{mb} (s^{-n})$	0,150	0,0882	0,659	0,197
	n	0,487	0,569	0,130	0,581
	c	0,0163	0,0178	0,0063	0,0330
	R^2	0,982	0,975	0,987	0,983
Kopcha	$A (s^{-1/2})$	0,167	0,105	0,491	0,252
	$B (s^{-1})$	-0,0142	-0,0068	-0,0671	-0,0274
	R^2	0,983	0,972	0,782	0,973
ETA	$D_{Ag} (10^{-9} cm^2 s^{-1})$	3,63	1,22	84,0	7,93
	R^2	0,980	0,997	0,998	0,974

Tabela 5.16. Ukupne (početne) koncentracije srebra ($c_{Ag,uk}$) u hidrogelovima 0.25Ag/PVA/0.1CHI, 0.25Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr, 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr, određene metodom atomske apsorpcione spektroskopije

Hidrogel	$c_{Ag,uk}$ (mg dm ⁻³)
0.25Ag/PVA/0.1CHI	81,5 ± 10
0.25Ag/PVA/0.5CHI	87,3 ± 6,7
3.9Ag/PVA/0.1CHI	577 ± 111
3.9Ag/PVA/0.5CHI	705 ± 43
0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr	54,7 ± 5,3
0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr	80,3 ± 6,3
3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr	556 ± 10
3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr	563 ± 6,7

Osim difuzionim modelima, proces otpuštanja srebra je fitovan i različitim kinetičkim modelima prema zakonima brzine nultog, prvog i drugog reda, kako bi se ispitala kinetika procesa otpuštanja srebra iz različitih hidrogelova. Kinetika zakona brzine nultog reda se može opisati jednačinom (5.16), gde je $c_{Ag,uk}$ ukupna (početna) koncentracija srebra u hidrogelu, c_{Ag} je koncentracija srebra koja je preostala u hidrogelu nakon otpuštanja tokom vremena t , a k_0 je konstanta brzine nultog reda.

$$c_{Ag} = c_{Ag,uk} - k_0 \cdot t \quad (5.16)$$

Zakon brzine prvog reda se može opisati jednačinom (5.17), odn. jednačinom (5.18) u linearnom obliku, gde je k_1 konstanta brzine prvog reda, a ostale fizičke veličine imaju ranije definisano značenje.

$$c_{Ag} = c_{Ag,uk} \cdot \exp(-k_1 \cdot t) \quad (5.17)$$

$$\ln c_{Ag} = \ln c_{Ag,uk} - k_1 \cdot t \quad (5.18)$$

Konačno, brzina procesa koji prati kinetiku zakona brzine drugog reda se može predstaviti jednačinom (5.19), gde k_2 predstavlja konstantu brzine drugog reda, dok ostale fizičke veličine imaju ranije definisano značenje.

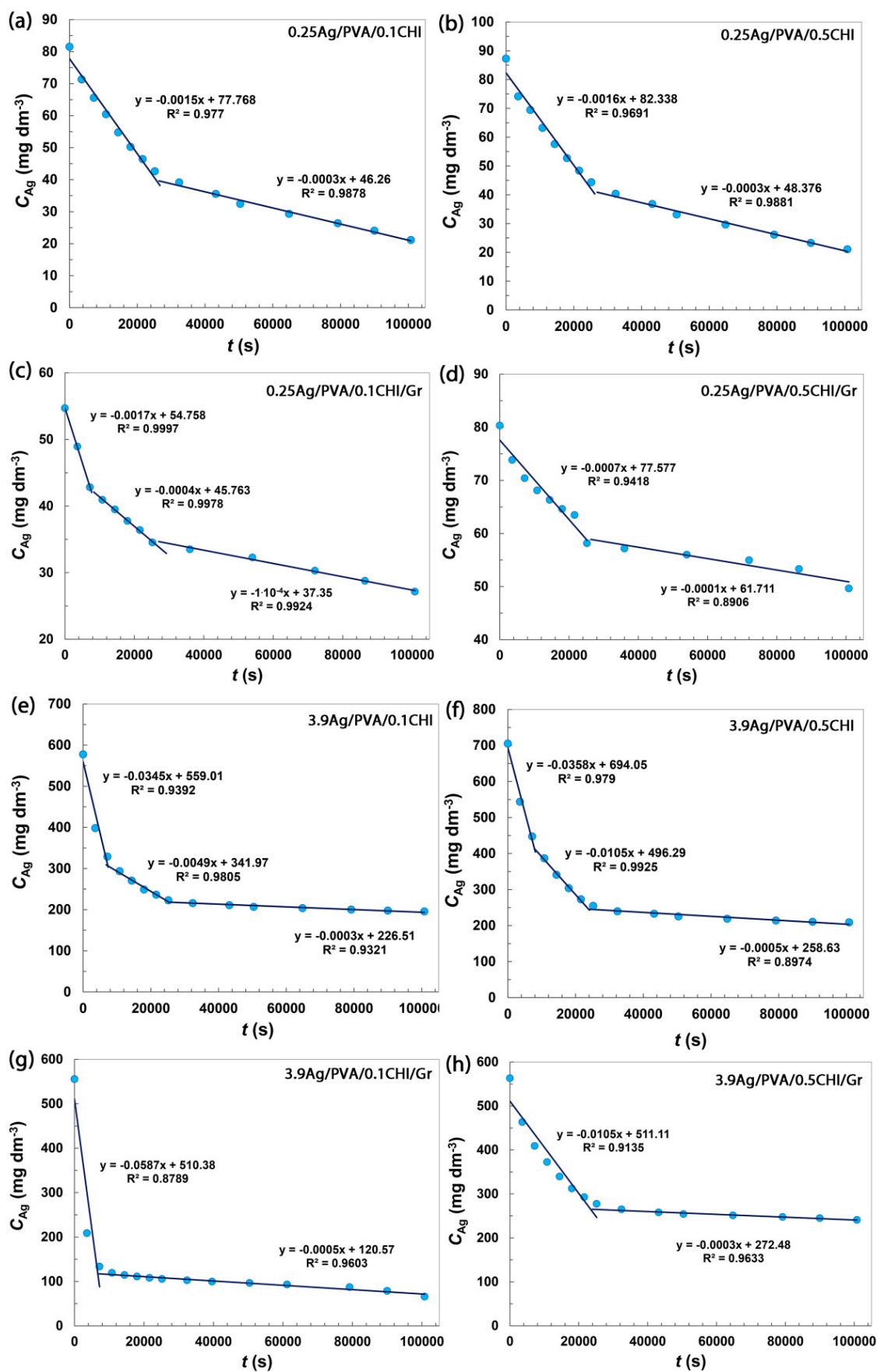
$$\frac{1}{c_{Ag}} = \frac{1}{c_{Ag,uk}} + k_2 \cdot t \quad (5.19)$$

Rezultati ovog fitovanja su grafički prikazani na slikama 5.27 (nulti red), 5.28 (prvi red) i 5.29 (drugi red).

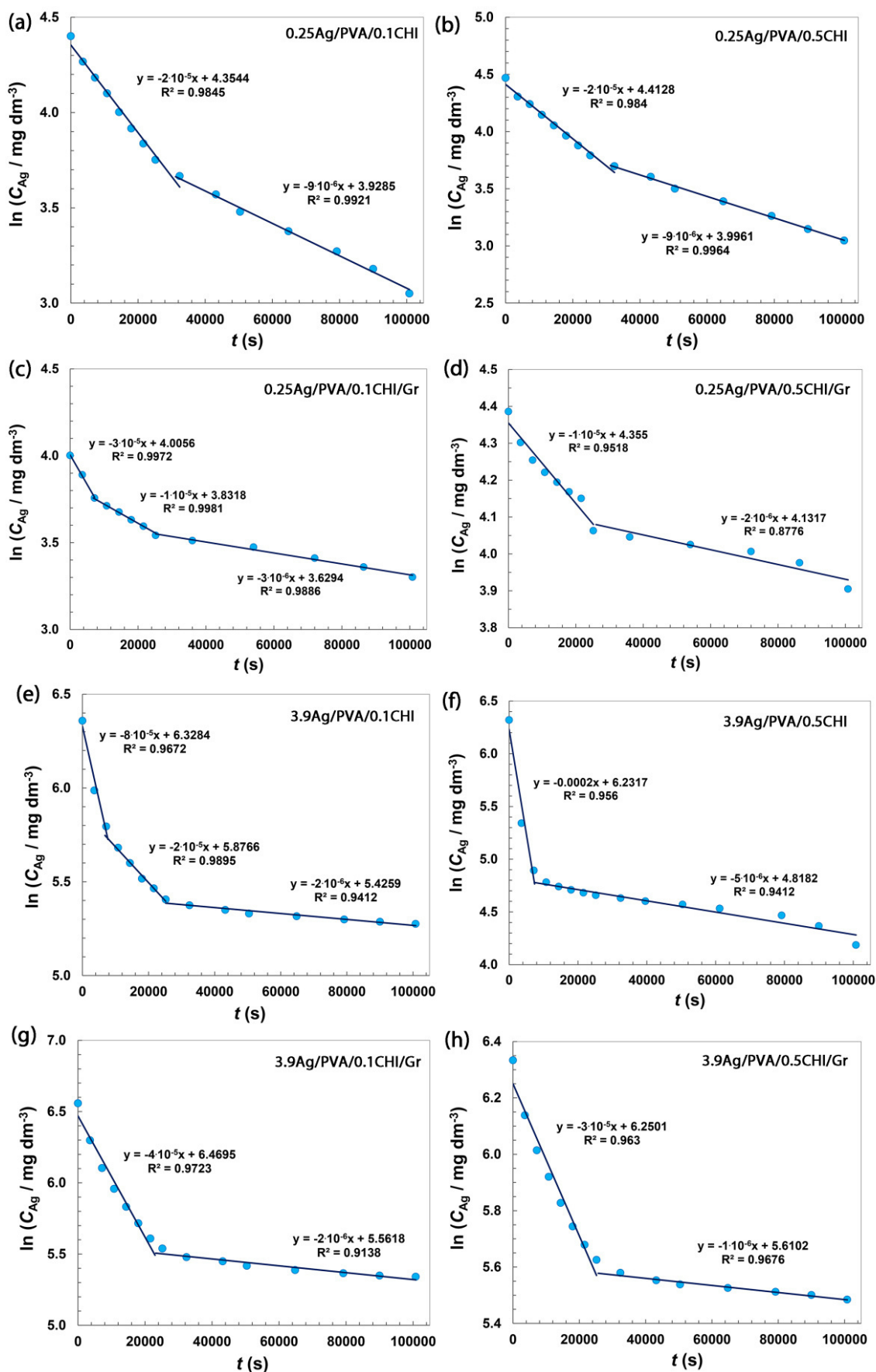
Za potrebe fitovanja modelima prema zakonima brzine nultog i prvog reda, kao i modela prema zakonu brzine drugog reda za većinu uzoraka, nije bilo moguće fitovati ceo profil otpuštanja

jednom linearizovanom jednačinom, već su celokupni profili podeljeni na 2 ili 3 odgovarajuća perioda otpuštanja (slike 5.27, 5.28, 5.29, redom). Ovi periodi otpuštanja odgovaraju oblasti naglog početnog otpuštanja, praćenoj sporijim otpuštanjem i dostizanjem platoa pri dužim vremenskim periodima. Tri oblasti na profilu otpuštanja (npr. slike 5.27c,e,f, 5.28c,f i 5.29c,e,g), odgovarale su karakterističnom izgledu profila gde plato nije dostignut odmah nakon inicijalnog naglog otpuštanja, već je postojao jedan prelazni period sporijeg otpuštanja.

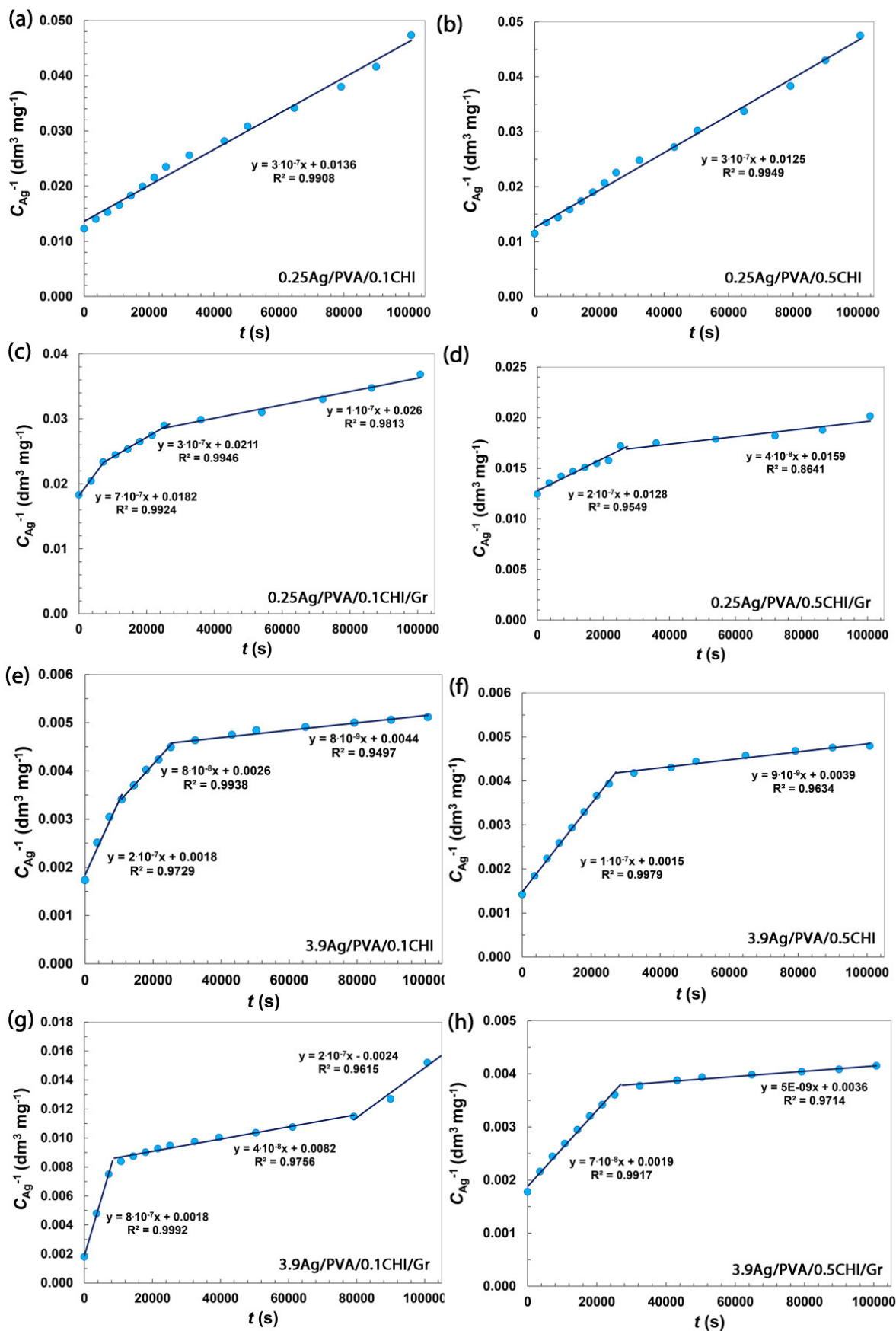
Kako fitovani profili otpuštanja na slikama 5.27–5.29 nisu pokazali linearnu zavisnost, može se konstatovati da kinetika otpuštanja iz većine hidrogelova ne sledi zakone brzine nultog, prvog, niti drugog reda, što ukazuje na složeni mehanizam procesa otpuštanja srebra, izuzev za hidrogelove 0.25Ag/PVA/0.1CHI i 0.25Ag/PVA/0.5CHI (slike 5.29a i 5.29b), za koje je potvrđena kinetika zakona brzine drugog reda. Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da na kinetiku otpuštanja srebra utiče kako ukupna početna koncentracija Ag, tako i sastav samog hidrogela u pogledu broja i vrste komponenata. Složeni mehanizam otpuštanja srebra iz polimernih matrica takođe potvrđuje da je kinetika otpuštanja srebra različita u početnom periodu naglog otpuštanja, u odnosu na kasnije faze kada se otpuštanje usporava, da bi se dostigao plato pred kraj posmatranog vremenskog perioda.



Slika 5.27. Kinetički modeli otpuštanja srebra prema zakonu brzine nultog reda za hidrogelove: (a) 0.25Ag/PVA/0.1CHI, (b) 0.25Ag/PVA/0.5CHI, (c) 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr, (d) 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr, (e) 3.9Ag/PVA/0.1CHI, (f) 3.9Ag/PVA/0.5CHI, (g) 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i (h) 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr



Slika 5.28. Kinetički modeli otpuštanja srebra prema zakonu brzine prvog reda za hidrogelove: (a) 0.25Ag/PVA/0.1CHI, (b) 0.25Ag/PVA/0.5CHI, (c) 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr, (d) 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr, (e) 3.9Ag/PVA/0.1CHI, (f) 3.9Ag/PVA/0.5CHI, (g) 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i (h) 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr



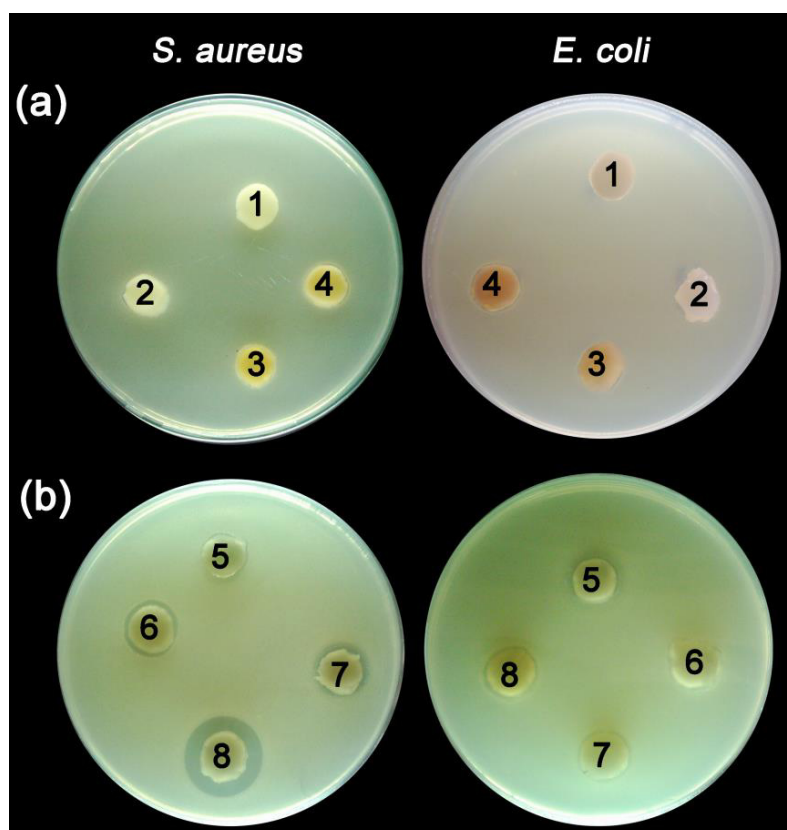
Slika 5.29. Kinetički modeli otpuštanja srebra prema zakonu brzine drugog reda za hidrogelove: (a) 0.25Ag/PVA/0.1CHI, (b) 0.25Ag/PVA/0.5CHI, (c) 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr, (d) 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr, (e) 3.9Ag/PVA/0.1CHI, (f) 3.9Ag/PVA/0.5CHI, (g) 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i (h) 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr

5.4.1 Antibakterijska svojstva

5.4.1.1 Agar-difuzioni test

Rezultati agar-difuzionog testa za PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, 0.25Ag/PVA/0.1CHI i 0.25Ag/PVA/0.5CHI, kao i za PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelove prema bakterijskim sojevima *Staphylococcus aureus* TL i *Escherichia coli* ATCC 25922 su prikazani na slici 5.30, dok su srednje širine zona inhibicije (mm) oko pojedinih uzoraka navedene u tabeli 5.17. Na osnovu semikvantitativnih rezultata agar-difuzionog testa, svi hidrogelovi su pokazali određenu antibakterijsku aktivnost, a pritom su uzorci hidrogelova sa grafenom (slika 5.30b) ispoljili jači efekat nego hidrogelovi bez Gr (slika 5.30a). Ovakvi rezultati mogu se povezati sa prisustvom grafena, za koji je utvrđeno da ima određena antibakterijska svojstva, koja bi ipak bilo neophodno potvrditi daljim dodatnim ispitivanjima [163]; međutim, to može biti i usled samih eksperimentalnih uslova izvođenja testa [266–268], jer idealno prijanjanje hidrogela za agarnu podlogu i optimalnu kontaktnu površinu nije uvek moguće postići tako da u nekim slučajevima zona inhibicije obuhvata samo prečnik uzorka. Takođe, manje varijacije u dimenzijama samih uzoraka mogu imati uticaja na izmerene širine zona prikazane u tabeli 5.17. Zbog navedenih faktora se rezultati agar-difuzionog testa razmatraju samo ilustrativno, dok će kvantitativno ispitivanje kinetike antibakterijske aktivnosti biti prikazano u narednom odeljku.

U svakom slučaju, iz rezultata prikazanih na slici 5.30 i u tabeli 5.17, može se zaključiti da su svi hidrogelovi, čak i oni bez srebra, pokazali izvesna antibakterijska svojstva, što može biti usled poznatih antibakterijskih svojstava hitozana. Ovaj efekat prisustva hitozana je takođe primetan i očigledan na osnovu povećanja širine zone inhibicije u slučaju hidrogelova sa većim sadržajem CHI (0,5 mas.%), što je posebno zapaženo u slučaju hidrogelova 0.25Ag/PVA/0.5CHI i 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr (tabela 5.17). Ranija istraživanja su takođe pokazala da hitozan poseduje antibakterijska svojstva, kako prema Gram pozitivnim, tako i prema Gram negativnim vrstama bakterija [26,348]. Osim toga, neka istraživanja su pokazala i da PVA/CHI hidrogelovi [92] i membrane [216] poseduju veoma jaku antibakterijsku aktivnost prema sojevima *E. coli* i *S. aureus*. U slučaju hidrogelova sa nanočesticama srebra, vrlo je važan potencijalni sinergistički efekat hitozana i nanočestica srebra, koji je takođe potvrđen u ranijim studijama [349], a koji može značajno doprineti poboljšanju antibakterijske aktivnosti hidrogelova, uz primenu manjih doza srebra, što značajno smanjuje rizik citotoksičnosti. Detaljnije, kvantitativno razmatranje antibakterijskog efekta nanokompozitnih hidrogelova biće detaljnije opisano u narednom odeljku.



Slika 5.30. Agar-difuzioni test antibakterijskih svojstava hidrogelova: 1- PVA/0.1CHI, 2- PVA/0.1CHI, 3-0.25Ag/PVA/0.1CHI, 4-0.25Ag/PVA/0.5CHI, 5- PVA/0.1CHI/Gr, 6- PVA/0.5CHI/Gr, 7-0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 8-0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr prema bakterijskim sojevima *S. aureus* TL i *E. coli* ATCC 25922

Tabela 5.17. Širine zona inhibicije za PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, 0.25Ag/PVA/0.1CHI, 0.25Ag/PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelove, prema bakterijskim sojevima *S. aureus* TL i *E. coli* ATCC 25922

Hidrogel	Širina zone inhibicije (mm)	
	<i>S. aureus</i> TL	<i>E. coli</i> ATCC 25922
PVA/0.1CHI	11,2	10,9
PVA/0.5CHI	10,4	11,2
0.25AgPVA/0.1CHI	10,7	10,7
0.25AgPVA/0.5CHI	12,0	12,6
PVA/0.1CHI/Gr	12,0	11,5
PVA/0.5CHI/Gr	13,3	12,9
0.25AgPVA/0.1CHI/Gr	13,2	13,1
0.25AgPVA/0.5CHI/Gr	19,5	13,5

5.4.1.2 Kinetika antibakterijske aktivnosti

Na slici 5.31 prikazani su rezultati ispitivanja kinetike antibakterijske aktivnosti za PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, 0.25Ag/PVA/0.1CHI i 0.25AgPVA/0.5CHI, kao i PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 0.25AgPVA/0.5CHI/Gr hidrogelove prema bakterijskim sojevima *Staphylococcus aureus* TL i *Escherichia coli* ATCC 25922. U slučaju hidrogelova sa nanočesticama srebra, izabrani su oni sa nižom koncentracijom srebra (dobijeni pomoću 0,25 mM AgNO₃ rastvora za bubrenje) zbog toga što je vrlo važno uzeti u obzir i potencijalni citotoksični efekat nanočestica srebra. Ranija istraživanja su pokazala da hidrogelovi dobijeni elektrohemijom sintezom iz 0,25 mM AgNO₃ rastvora za bubrenje ispoljavaju dobra antibakterijska svojstva uz odsustvo citotoksičnosti, pa je upravo ova koncentracija uzeta kao optimalna [60].

Antibakterijska svojstva dobijenih hidrogelova praćena su određivanjem broja preživelih bakterijskih ćelija tokom perioda inkubacije od 24 h i izražena su kao logaritam broja formiranih kolonija (eng. *colony forming unit*, CFU) po mililitru ($\log(\text{CFU ml}^{-1})$). Sa slike 5.31 je očigledno da su svi hidrogelovi sa nanočesticama srebra (0.25Ag/PVA/0.1CHI, 0.25AgPVA/0.5CHI, 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 0.25AgPVA/0.5CHI/Gr) pokazali jako antibakterijsko dejstvo, jer posle 1 h inkubacije nisu pronađene žive ćelije ni kod jednog od ispitivanih sojeva bakterija. Čak je i posle svega 15 min kod soja *S. aureus* TL primećeno da dolazi do naglog smanjenja broja preživelih ćelija, posebno u slučaju 0.25Ag/PVA/0.1CHI i 0.25Ag/PVA/0.5CHI hidrogelova (slika 5.31a), ali i kod 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 0.25AgPVA/0.5CHI/Gr (slika 5.31c). Ovako efikasno antibakterijsko dejstvo u kratkom vremenskom intervalu je veoma važno da se bi se sprečilo razmnožavanje bakterijskih ćelija i formiranje biofilma, koji se najčešće navodi kao problem kod lečenja hroničnih rana [350]. Hidrogelovi bez nanočestica srebra su pokazali nešto slabiju efikasnost ali su ipak pokazali baktericidni efekat prema soju *S. aureus* TL već nakon 1 h (slike 5.31a i 5.31c). S druge strane, PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr hidrogelovi nisu pokazali značajno dejstvo prema soju *E. coli* ATCC 25922, pa je tek nakon 24 h primećeno značajno smanjenje broja preživelih ćelija za ≈ 4 i ≈ 5 logaritamskih jedinica, i to u prisustvu hidrogelova PVA/0.5CHI i PVA/0.5CHI/Gr, redom. Dakle, kada su u pitanju hidrogelovi bez nanočestica srebra, samo oni sa većim sadržajem hitozana su pokazali slabo antibakterijsko dejstvo prema *E. coli*. Bakterijski soj *E. coli* ATCC 25922 se u ovom radu generalno pokazao rezistentnijim u poređenju sa *S. aureus* TL što je takođe primećeno i u ranijim istraživanjima sa istim sojevima [60,282,351]. Ove razlike u osetljivosti bakterijskih sojeva bi se mogle pripisati različitom poreklu sojeva – *E. coli* ATCC 25922 je soj koji pripada Američkoj kolekciji mikroorganizama (eng. *American Type Culture Collection*, ATCC), dok je soj *S. aureus* TL klinički izolat. S druge strane, ove razlike u jačini antibakterijskog dejstva prema *S. aureus* i *E. coli* mogle bi se pripisati i efektu hitozana u hidrogelovima, jer su hidrogelovi sa nanočesticama srebra pokazali baktericidni efekat prema oba soja već nakon 1 h, tako da su oba soja podjednako osetljiva na dejstvo srebra. Istraživanja su pokazala da hitozan zaista pokazuje različito antibakterijsko dejstvo prema *S. aureus* i *E. coli*, usled različite strukture ćelijskog zida ovih bakterijskih vrsta. Konkretno, pokazano je da hitozan visoke molarne mase poseduje jaču antibakterijsku aktivnost prema *S. aureus* nego prema *E. coli* [27], a istraživači su ovo zapažanje objasnili različitim mehanizmom dejstva CHI na bakterijske ćelije. Hitozan, kao polikatjonski polisaharid, poznat je po svojim prirodnim antibakterijskim svojstvima [154,352], a poseduje veliki broj pozitivno naelektrisanih funkcionalnih grupa pri vrednostima pH < 6, usled protonovanja –NH₂ grupa. S druge strane, površina ćelijskog zida bakterijskih ćelija je pretežno negativno naelektrisana u fiziološkim uslovima [352], pa se glavnim mehanizmom antibakterijskog dejstva hitozana smatra vezivanje za spoljašnju površinu membrane, što dovodi do njenog oštećenja, curenja citoplazme i gubitka funkcionalnih proteina i ostalog unutarćelijskog sadržaja [352]. Utvrđeno je da u osnovi mehanizma antibakterijskog dejstva CHI prema soju *S. aureus* leže upravo ove interakcije pozitivno naelektrisanih makromolekula sa negativno naelektrisanom površinom bakterijske ćelije, što dovodi do adsorpcije polimera na površini ćelijske membrane, čime su ometeni normalni procesi respiracije i sprečeno dostavljanje

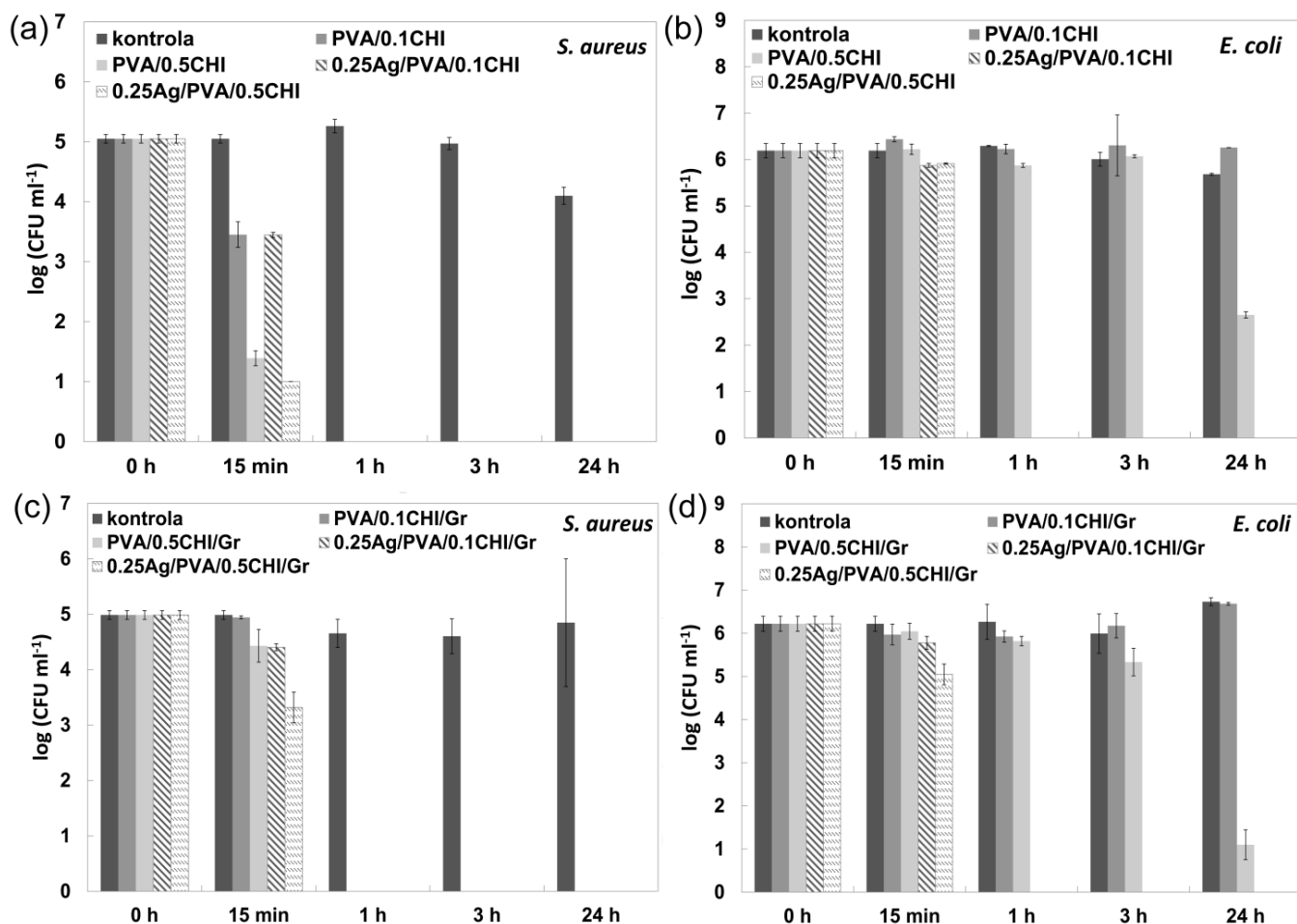
nutrijenata u unutrašnjost bakterijske ćelije. S druge strane, CHI deluje na ćelije *E. coli* prodiranjem kroz citoplazmatsku membranu i ulaskom u unutrašnjost same ćelije, što je favorizovano u slučaju makromolekulskih lanaca niže molarne mase [27]. Osim toga, interakcija hitozana sa bakterijskom citoplazmatskom membranom može izazvati i njeno pucanje [353]. Na osnovu ovih razmatranja, moglo bi se zaključiti da je hitozan koji je korišćen u ovom radu (molarne mase 190-310 kDa) pratio pretežno prvi mehanizam, što objašnjava efikasno dejstvo prema *S. aureus*, dok je prema *E. coli* postignuto slabije dejstvo jer su polimerni lanci CHI bili preveliki da bi se ostvarilo efikasno prodiranje kroz citoplazmatsku membranu i ulazak u unutrašnjost ćelija *E. coli*, tako da je antibakterijski efekat nakon 24 h zapažen tek u slučaju hidrogelova sa većim sadržajem hitozana (PVA/0.5CHI i PVA/0.5CHI/Gr).

Bez obzira na konkretnu vrstu goreopisanih interakcija, većina istraživanja se slaže u zaključku da je upravo prisustvo brojnih $-NH_3^+$ grupa na polimernom lancu CHI glavni uzrok njegovih prirodnih antibakterijskih svojstava, a ovim tvrdnjama u prilog ide i činjenica da, blokiranjem $-NH_3^+$ grupa kroz nastajanje polielektrolitnih kompleksa hitozana sa polianjonskim polisaharidom alginatom, dolazi i do gubitka antibakterijskog dejstva CHI [181,203,207]. Naime, pozitivno naelektrisane $-NH_3^+$ grupe hitozana reaguju sa negativno naelektrisanim COO^- grupama alginata, smanjujući količinu pozitivnog naelektrisanja makromolekula CHI, što dovodi do smanjenja njihove antibakterijske aktivnosti [181]. Osim toga, istraživanja su pokazala i da antibakterijsko dejstvo hitozana može biti vremenski ograničeno, jer su eksperimenti sa filmovima CHI pokazali da prilikom njihove dugotrajne primene dolazi do zasićenja površine filma usled adsorpcije mrtvih bakterijskih ćelija, što nakon određenog vremenskog perioda dovodi do inaktivacije površine CHI i do gubitka povoljnih antibakterijskih svojstava [30].

Mehanizam antibakterijskog dejstva nanočestica srebra, iako predmet mnogobrojnih istraživanja, još uvek nije u potpunosti rasvetljen, što može biti delimično i zbog dejstva nanočestica prema velikom broju bakterijskih vrsta, ali i prema drugim grupama mikroorganizama. Neki od predloženih mehanizama obuhvataju interakcije nanočestica sa citoplazmatskom membranom bakterijske ćelije, što dovodi do formiranja pukotina, akumuliranja nanočestica na površini membrane, pa samim tim i do njenog oštećenja [180,182]. Drugu mogućnost predstavlja prodiranje nanočestica u unutrašnjost same ćelije, gde dolazi do vezivanja za funkcionalne grupe koje sadrže sumpor, kao i za DNK lance sa fosforom, što dovodi do smetnji u respiratornim funkcijama ćelije i replikaciji DNK [180]. Reakcijom nanočestica srebra takođe može doći do sinteze velikog broja slobodnih radikala i tzv. reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *reactive oxygen species*, ROS) što može dovesti do dodatnog oštećenja membrane [48]. Na kraju, nanočestice srebra, takođe, u fiziološkoj sredini aktivno otpuštaju Ag^+ jone, koji pokazuju antibakterijsku aktivnost, pa tako mogu doprineti antibakterijskoj aktivnosti zajedno sa nanočesticama Ag [180]. Takođe je pokazano da antibakterijsko dejstvo nanočestica srebra zavisi od vrste bakterije, i da čak i različiti sojevi iste vrste mogu ispoljiti različitu osetljivost prema nanočesticama srebra [187]. Ispitivanja su pokazala i da bakterijski sojevi vrsta *S. aureus* i *E. coli* pokazuju različitu osetljivost prema nanočesticama srebra, mada se rezultati dosta razlikuju od studije do studije, pa su tako određena istraživanja otkrila veću osetljivost sojeva *E. coli* u poređenju sa sojevima *S. aureus* [48,187], dok su druga zaključila upravo suprotno [188]. Tačan mehanizam i uzrok ovakvih pojava nije potpuno razjašnjen, mada se pretpostavlja da bi one mogle biti posledica različite strukture ćelijskog zida kod Gram-pozitivnih i Gram-negativnih vrsta bakterija [48].

U svakom slučaju, hidrogelovi sa nanočesticama srebra su pokazali veoma jako i efikasno antibakterijsko dejstvo prema oba soja, već nakon 1 h inkubacije u fosfatnom puferu na 37 °C. Takođe je primećen i značajan sinergistički efekat između hitozana i nanočestica srebra, jer su hidrogelovi sa nanočesticama i većim sadržajem CHI (0,5 mas.%) pokazali bolji antibakterijski efekat već nakon 15 min, u poređenju sa hidrogelovima sa 0,1 mas.% CHI (slika 5.31). Ovi rezultati su u skladu sa ranijim studijama [20,30,215,216], koje su potvrdile značajno poboljšanje antibakterijske aktivnosti kompozitnih materijala hitozana sa nanočesticama srebra. Takođe,

kinetika antibakterijske aktivnosti može se uporediti sa rezultatima otpuštanja srebra (poglavlje 5.3.2), koji su pokazali efekat naglog otpuštanja u početnom periodu, što doprinosi veoma brzom i efikasnom antibakterijskom dejstvu. Očigledno je da otpuštanje nanočestica srebra, a samim tim i verovatno otpuštanje Ag^+ jona značajno doprinosi antibakterijskim svojstvima dobijenih nanokompozitnih hidrogelova.



Slika 5.31. Antibakterijska svojstva hidrogelova: (a,b) PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, 0.25Ag/PVA/0.1CHI i 0.25Ag/PVA/0.5CHI, i (c,d) PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr, određena merenjem kinetike antibakterijske aktivnosti prema bakterijskim sojevima (a,c) *S. aureus* TL i (b,d) *E. coli* ATCC 25922

5.4.2 Citotoksičnost

Prilikom definisanja novih biomaterijala sa ciljem njihove primene u biomedicinske svrhe, neophodno je detaljno ispitati njihovu biokompatibilnost, odnosno potencijalni uticaj na zdrava tkiva i ćelije, i potvrditi da ne predstavljaju opasnost prema zdravlju pacijenata. Ovo je posebno važno u slučaju nanokompozitnih materijala u kojima ulogu antibakterijskog agensa igra srebro (bilo jonsko ili nanočestično), koje se pokazalo kao odlična zamena za antibiotike u slučaju lokalnih primena kao što je lečenje rana, ali je takođe dobro poznato da srebro može biti i toksično prema zdravim ćelijama. Zbog toga je neophodno, pre bilo kakvih *in vivo* ili kliničkih ispitivanja, potvrditi necitotoksičnost i biokompatibilnost nanokompozitnih materijala sa nanočesticama srebra, pomoću standardizovanih testova citotoksičnosti, među kojima su i test odbacivanja boje tripan plavo (eng. *dye exclusion test*, DET), kao i 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid (MTT) test.

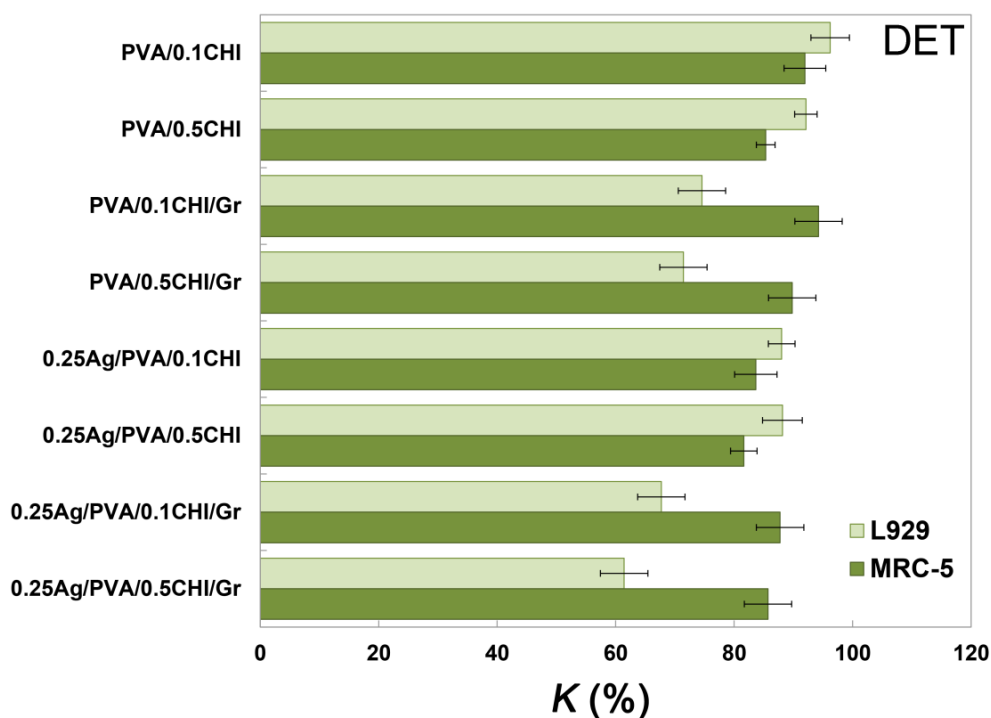
5.4.2.1 Test odbacivanja boje tripan-plavo (DET)

Pomoću DET testa citotoksičnosti ispitani su uzorci hidrogelova PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 0.25Ag/PVA/0.1CHI, 0.25Ag/PVA/0.5CHI, 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr. Izabrani su hidrogelovi sa nižom koncentracijom nanočestica srebra, jer su se oni u prethodnom istraživanju Ag/PVA/Gr nanokompozita bez hitozana pokazali kao optimalni, imajući u vidu zadovoljavajuća antibakterijska svojstva, a istovremeno dovoljno nisku koncentraciju srebra koja ne izaziva citotoksičan odgovor [60]. Osim toga, u ovom radu su hidrogelovi 0.25Ag/PVA/0.1CHI, 0.25Ag/PVA/0.5CHI, 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr pokazali veoma dobra antibakterijska svojstva, kao što je prikazano u prethodnom tekstu (poglavlje 5.4.1).

Citotoksičnost ispitivanih hidrogelova je određivana prema dve relevantne ćelijske linije – MRC-5 (humani fibroblasti) i L929 (mišji fibroblasti). Testom odbacivanja boje se određuje stepen direktne citotoksičnosti materijala, merenjem broja preživelih ćelija nakon kontakta sa uzorcima, pri čemu boja tripan plavo ulazi u ćeliju ukoliko joj je narušen integritet ćelijske membrane. Pri tome se mrtve ćelije boje u plavo, dok vijabilne ćelije ostaju nebojene [272]. Inhibicija rasta ćelija, K , je izražena u procentima u odnosu na kontrolu, prema jednačini (5.20), gde je N_K broj ćelija kontrolnog uzorka, a N_S je broj živih ćelija nakon inkubacije sa datim uzorkom.

$$K = \frac{N_S}{N_K} \cdot 100 \% \quad (5.20)$$

Rezultati DET testa za sve uzorke hidrogelova, prema obe ćelijske linije, prikazani su grafički na slici 5.32. Vijabilnost MRC-5 ćelija u kontaktu sa svim vrstama hidrogelova (i sa i bez srebra) bila je viša od 80 %, što potvrđuje necitotoksičnost (vijabilnost >90 %) ili blagu citotoksičnost (vijabilnost 80-90 %) ispitivanih uzoraka prema fibroblastima humanog porekla, prema skali citotoksičnosti iz literature [354]. Vijabilnost L929 ćelija je bila nešto niža, ali i dalje >80 % za PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, 0.25Ag/PVA/0.1CHI i 0.25Ag/PVA/0.5CHI hidrogelove, dok su ove vrednosti za PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelove bile između 60-70 %, što se može klasifikovati kao umerena citotoksičnost, prema ranije navedenoj skali. Nešto niži stepen preživljavanja L929 ćelija se može objasniti i generalno većom osetljivošću ove ćelijske linije prema različitim faktorima. U svakom slučaju, prikazani rezultati su ukazali na visok stepen biokompatibilnosti dobijenih hidrogelova, koji se tako mogu smatrati bezbednim za primene u obliku obloga za rane.



Slika 5.32. Citotoksičnost PVA/0.1CHI, PVA/0.1CHI, PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 0.25Ag/PVA/0.1CHI, 0.25Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI 3.9Ag/PVA/0.5CHI, 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelova, određena DET testom prema ćelijskim linijama MRC-5 i L929 fibroblasta

5.4.2.2 MTT test

Biokompatibilnost svih ispitivanih hidrogelova je takođe potvrđena i MTT testom citotoksičnosti prema ćelijskim linijama MRC-5 i L929. MTT testom su ispitani i 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI hidrogelovi, kako bi se utvrdio i stepen (ne)citotoksičnosti hidrogelova sa većim sadržajem nanočestica srebra, iako je za biološka ispitivanja izabrana niža koncentracija srebra kao najpogodnija, imajući u vidu veoma dobra antibakterijska svojstva, kao što je istaknuto i ranije.

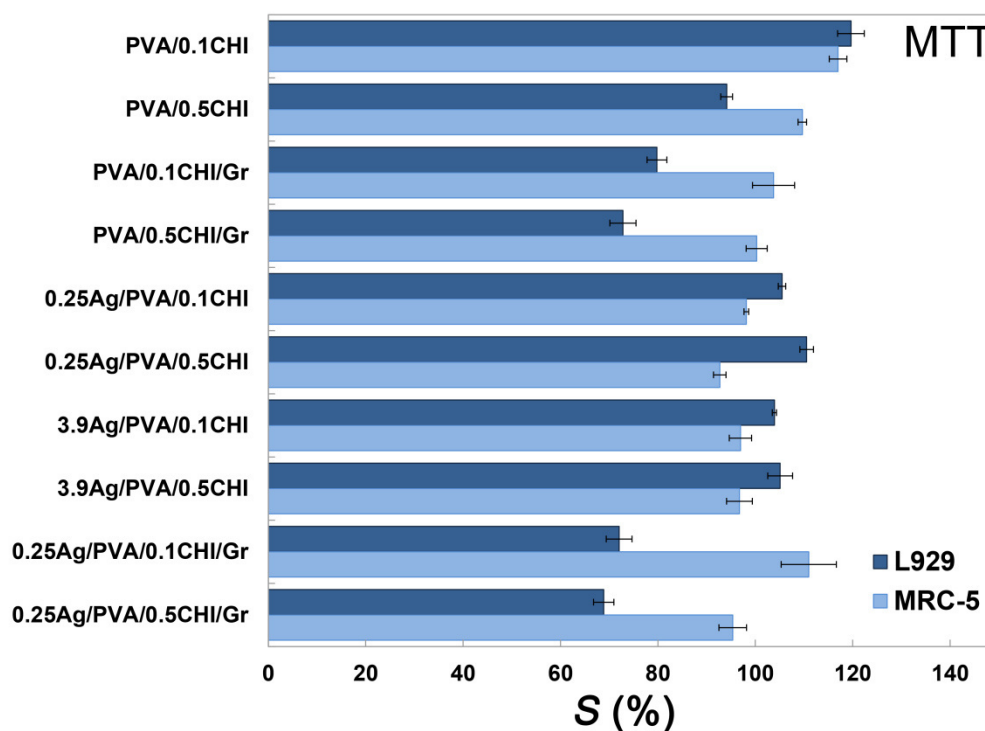
Vijabilnost ćelija, S , izražena je procentualno u odnosu na kontrolu prema jednačini (5.21), gde su A_u i A_c vrednosti apsorbancije na talasnim dužinama 540 nm i 690 nm (vidljiva svetlost) ispitivanog uzorka sa ćelijama i kontrole, redom.

$$S = \frac{A_u}{A_c} \cdot 100 \% \quad (5.21)$$

Rezultati MTT testa, prikazani na slici 5.33, ukazuju na visok stepen preživljavanja obe ćelijske linije nakon kontakta sa uzorcima hidrogelova, a u nekim slučajevima čak i aktivnu proliferaciju ćelija, tj. vijabilnosti $>100\%$ za PVA/0.1CHI, 0.25Ag/PVA/0.1CHI, 0.25Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9Ag/PVA/0.5CHI (ćelijska linija L929) i PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr, 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr, (ćelijska linija MRC-5). Ovi rezultati ukazuju na potencijalnu sposobnost hidrogelova da izazovu ili pospeše proliferaciju i rast ćelija, tokom vremenskog perioda posmatranog prilikom izvođenja MTT testa. Posebno u slučaju hidrogelova sa grafenom, L929 ćelije su ispoljile nešto nižu vijabilnost (60-70%), kao što je bio slučaj i sa rezultatima DET testa, što se može objasniti nešto izraženijom osetljivošću korišćenih mišjih fibroblasta, ali i eventualnim uticajem inkorporacije grafena, za koji

je pokazano da pod određenim uslovima može izazvati blagu citotoksičnost [355]. Takođe je statističkom obradom rezultata utvrđeno da dolazi do statistički značajnog ($p < 0,05$) smanjenja vijabilnosti MRC-5 ćelija u kontaktu sa hidrogelovima sa nanočesticama srebra, što je i očekivano usled dobro poznate citotoksičnosti materijala na bazi Ag, a takođe i do određenog smanjenja stepena preživljavanja sa povećanjem sadržaja hitozana u hidrogelu. Ranije studije su pokazale da hitozan može izazvati blago toksičan efekat prema MRC-5 ćelijskoj liniji [356], iako je taj efekat nedovoljno izražen da bi se mogao smatrati citotoksičnim. Takođe, TEM analizom je pokazano da nanočestice srebra u hidrogelovima sa 0,5 mas.% CHI sadrže određene površinske nepravilnosti i defekte, koji su se pokazali kao faktor koji doprinosi citotoksičnosti prema ćelijama ribljih škrga [197]. Svi ovi razlozi bi mogli da uzrokuju smanjenje vijabilnosti ćelija u kontaktu sa hidrogelovima sa nanočesticama srebra, kao i sa hidrogelom PVA/0.5CHI, u poređenju sa PVA/0.1CHI. Ipak, u slučaju svih uzoraka je vijabilnost MRC-5 ćelija premašila 90 %, čak i kod 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI hidrogelova (sa značajno višom koncentracijom nanočestica srebra), pa se prema tome svi uzorci hidrogelova mogu smatrati necitotoksičnim i pogodnim za biomedicinske primene.

Međutim, iako su se i hidrogelovi sa nižom, i oni sa višom koncentracijom nanočestica srebra pokazali kao necitotoksični na osnovu rezultata MTT testa, kada se dizajnira novi materijal za biološke ili biomedicinske primene, uvek je uputno voditi se pre svega bezbednošću i optimizovati najmanju moguću koncentraciju aktivne supstance koja daje zadovoljavajuće antibakterijske rezultate bez toksičnog odgovora u zdravim ćelijama. Tim pre, što su rizici povezani sa potencijalnim štetnim efektima dugoročne primene srebra dobro poznati, a pokazano je da nanočestice srebra mogu da se akumuliraju u moždanim ćelijama u zavisnosti kako od vremena primene, tako i od primenjene doze [192], dok su ponovljene doze nanočestica srebra izazvale toksičnost kod miševa u *in vivo* uslovima [357]. Zbog toga u ovom radu izbor optimalnog sistema pada na 0.25Ag/PVA/0.1CHI i 0.25Ag/PVA/0.5CHI hidrogelove, koji su pokazali izuzetnu antibakterijsku aktivnost (poglavlje 5.4.1), bez obzira na to što su se i 3.9Ag/PVA/0.1CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI hidrogelovi pokazali kao necitotoksični.



Slika 5.33. Citotoksičnost PVA/0.1CHI, PVA/0.1CHI, PVA/0.1CHI/Gr, PVA/0.5CHI/Gr, 0.25Ag/PVA/0.1CHI, 0.25Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI 3.9Ag/PVA/0.5CHI, 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelova, određena MTT testom prema ćelijskim linijama MRC-5 i L929 fibroblasta

6 ZAKLJUČAK

U ovoj doktorskoj disertaciji, uspešno su dobijeni hidrogelovi polivinil-alkohola i hitozana, sa i bez grafena, u kojima je izvršena elektrohemijaska sinteza nanočestica srebra, te su formirani nanokompozitni polimerni materijali sa aktivnim antibakterijskim svojstvima. Ispitan je uticaj sadržaja hitozana na sintezu i inkorporaciju nanočestica srebra u polimernoj matrici, kao i na svojstva i antibakterijsku aktivnost sintetisanih hidrogelova. Na osnovu opsežnih ispitivanja fizičko-hemijskih svojstava dobijenih materijala, kinetike bubrenja i otpuštanja srebra, kao i njihovih bioloških svojstava u *in vitro* uslovima – antibakterijske aktivnosti i citotoksičnosti, može se zaključiti sledeće:

- Uspešno je izvršeno umrežavanje PVA/0.1CHI, PVA/0.5CHI, PVA/0.1CHI/Gr i PVA/0.5CHI/Gr hidrogelova, fizičkom metodom zamrzavanja i odmravanja u pet uzastopnih ciklusa, a dobijeni hidrogelovi su sadržali visok udeo gel frakcije ($94,0 \pm 2,0$ %, $95,6 \pm 0,84$ %, $88,0 \pm 9,3$ % i $94,0 \pm 0,2$ %, redom).
- Elektrohemijaska *in situ* sinteza nanočestica srebra je izvršena metodom konstantnog napona (90 V), unutar polimernih matrica hidrogelova, prethodno nabubrelih u rastvoru 0,25 mM ili 3,9 mM AgNO₃, pri čemu su sintetisani hidrogelovi sa različitim sadržajem hitozana (0,1 mas.% i 0,5 mas.%), kao i sa različitim koncentracijama nanočestica srebra (0.25Ag/PVA/0.1CHI, 0.25Ag/PVA/0.5CHI, 0.25Ag/PVA/0.1CHI/Gr, 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr).
- Metodom UV-vidljive spektroskopije potvrđena je inkorporacija nanočestica srebra u svim sintetisanim hidrogelovima, kao i da su hidrogelovi sa 0,5 mas.% CHI (0.25Ag/PVA/0.5CHI, 0.25Ag/PVA/0.5CHI/Gr, 3.9Ag/PVA/0.5CHI i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr) sadržali i veću koncentraciju nanočestica srebra u poređenju sa hidrogelovima sa 0,1 mas.% CHI, što je u skladu sa rezultatima atomske apsorpcione spektroskopije. To je pokazalo da hitozan ima značajnu ulogu u povećanju količine inkorporisanih nanočestica srebra.
- Rendgenskom fotoelektronskom spektroskopijom je takođe potvrđena uspešna sinteza nanočestica srebra, pojavom karakterističnog dubleta Ag3d_{5/2} i Ag3d_{3/2} pikova na energijama veze od 368 eV i 374 eV, redom.
- FTIR spektroskopija je ukazala na to da vodonične veze između –OH grupa na polimernim lancima PVA i –OH i –NH₂ grupa na lancima CHI imaju značajnu ulogu u nastajanju polimerne matrice hidrogela prilikom procesa umrežavanja, što je zaključeno na osnovu karakterističnog položaja trake valentnih vibracija O–H veza iz hidroksilnih grupa (<3300 cm⁻¹). Karakteristične funkcionalne grupe –OH i –NH₂ na lancima CHI i PVA doprinose i stabilizaciji nanočestica srebra putem interakcija i vezivanja nanočestica za polimernu matricu, što se ogleda u promeni položaja i intenziteta vibracionih traka –OH i –NH₂ grupa na FTIR spektrima hidrogelova sa nanočesticama srebra.
- Ramanova spektroskopija je takođe pokazala da se stabilizacija nanočestica srebra ostvaruje putem interakcija sa –OH grupama, pojavom karakterističnih vibracionih traka na ≈ 235 cm⁻¹ na Ramanovim spektrima 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelova.
- Transmissionom elektronskom mikroskopijom su izmerene dimenzije dobijenih nanočestica srebra, elektrohemijaski sintetisanih unutar polimernih matrica 3.9Ag/PVA/0.1CHI, 3.9Ag/PVA/0.5CHI, 3.9Ag/PVA/0.1CHI/Gr i 3.9Ag/PVA/0.5CHI/Gr hidrogelova, koje su bile pretežno manje od 10 nm, ali su varirale i u opsegu 5-20 nm, uz prisustvo i krupnijih aglomerata (>50 -100 nm). Takođe je pokazano da su nanočestice srebra bile pretežno polikristalne, sa zapaženom tendencijom ka neregularnom srastanju kristala i formiranju „kristalnih dvojnika”, kao i sa brojnim ostrim ivicama i površinskim

neravninama. Međutim, primećene su i veoma sitne nanočestice (<5 nm), koje su bile monokristalne i kuboktaedarskog oblika. Obradom dobijenih mikrofotografija brzom Furijeovom transformacijom utvrđena je površinski centrirana kubna (PCK) struktura kristalne rešetke nanočestica srebra, sa rastojanjem između kristalnih ravni od 0,24 nm, što odgovara {111} familiji ravni.

- Veličine srednjih vrednosti hidrodinamičkih prečnika nanočestica srebra, određene metodom dinamičkog rasipanja svetlosti, su bile u opsegu od 6,0–9,0 nm, a nanočestice srebra su ispoljile polidisperznu raspodelu veličina, sa vrednostima indeksa polidisperznosti oko 0,2–0,4.
- Na osnovu ispitivanja mehaničkih svojstava, uticaj grafena na strukturu i svojstva polimernih matrica se ogledao u značajnom povećanju zatezne čvrstoće, dok je povećanje sadržaja hitozana dovelo do poboljšanja elastičnosti, tj. do smanjenja Jungovog modula elastičnosti hidrogelova sa 0,5 mas.% CHI.
- Metodama termogravimetrijske analize i diferencijalne skenirajuće kalorimetrije ispitana su termička svojstva hidrogelova, a takođe i određen odnos i sadržaj vezane i slobodne vode unutar polimernih matrica dobijenih hidrogelova. Svi hidrogelovi su sadržali ≈80 % vode, dok je slobodna voda zauzimala gotovo 50 % ukupne mase hidrogelova, što je ukazalo na njihovu visoku moć upijanja. Na 600 °C, hidrogelovi sa Gr su sadržali veći udeo suvog ostatka, a i hidrogelovi sa nanočesticama srebra su imali nešto veći sadržaj ostatka u odnosu na hidrogelove bez srebra, što ukazuje na povoljan uticaj grafena i nanočestica srebra na termičku stabilnost polimerne matrice.
- Gravimetrijskom metodom praćenja kinetike bubrenja sintetisanih hidrogelova, izračunat je ravnotežni stepen bubrenja u rastvoru fosfatnog pufera ($K_2HPO_4+KH_2PO_4$, pH 7,4) na 37 °C. Rezultati su pokazali da hidrogelovi sa inkorporisanim nanočesticama srebra imaju veću sposobnost bubrenja, odnosno veću moć apsorpcije tečnosti, u poređenju sa hidrogelovima bez srebra, što je u skladu sa rezultatima diferencijalne skenirajuće kalorimetrije.
- Dobijeni profili bubrenja, tj. zavisnosti odnosa trenutnog i ravnotežnog stepena bubrenja (q_t/q_{eq}) od vremena, fitovani su pomoću nekoliko teorijskih modela (ETA, LTA, Eters), na osnovu kojih je utvrđen difuziono-kontrolisani mehanizam bubrenja hidrogelova i određeni koeficijenti difuzije medijuma za bubrenje kroz polimernu matricu. Eters modeli su pokazali najbolje slaganje sa eksperimentalnim profilima tokom čitavog perioda bubrenja. Koeficijenti difuzije, D , izračunati na osnovu Eters modela, imali su veće vrednosti u slučaju hidrogelova sa grafenom, u poređenju sa hidrogelovima bez grafena, što ukazuje na veću brzinu bubrenja polimerne matrice u prisustvu Gr.
- Kinetika otpuštanja srebra ispitivana je u imitiranim fiziološkim uslovima, praćenjem otpuštanja srebra iz hidrogelova u rastvoru fosfatnog pufera ($K_2HPO_4+KH_2PO_4$, pH 7,4) na 37 °C. Dobijeni profili otpuštanja srebra (zavisnosti udela otpuštenog srebra od vremena) su ispoljili karakterističan efekat naglog početnog otpuštanja tokom prvih 3-5 dana. Hidrogelovi sa većim sadržajem hitozana (0,5 mas.%) su sporije otpuštali srebro, usled bolje stabilizacije nanočestica srebra putem interakcija sa funkcionalnim grupama hitozana. Osim toga, brzina otpuštanja srebra je bila veća u slučaju hidrogelova sa većom koncentracijom nanočestica srebra.
- Svi dobijeni profili otpuštanja srebra fitovani su različitim teorijskim difuzionim modelima (ETA, Makoid-Banakar, Korsmeyer-Peppas, Kopcha), pri čemu je utvrđeno da je mehanizam otpuštanja difuziono kontrolisan i da podleže Fikovom zakonu difuzije, što je potvrđeno na osnovu vrednosti vremenskog eksponenta n iz Korsmeyer-Peppas modela, koji je bio niži od 0,5 za sve ispitivane uzorke. Vrednosti koeficijenta difuzije, D_{Ag} , izračunate na osnovu modela aproksimacije ranog vremena bile su za red veličine više za hidrogelove sa većom koncentracijom nanočestica srebra, što ukazuje na brže otpuštanje iz hidrogelova sa većom količinom srebra. Hidrogelovi sa većim sadržajem hitozana su pokazali niže vrednosti koeficijenta difuzije, što ukazuje na sporije otpuštanje iz

hidrogelova sa 0,5 mas.% CHI usled stabilizacije nanočestica srebra putem interakcija sa hitozanom.

- Profili otpuštanja srebra su fitovani i pomoću kinetičkih modela prema zakonima brzine nultog, prvog i drugog reda, koji su pokazali da se kinetika ovog procesa razlikovala u različitim vremenskim periodima otpuštanja. Jedino su 0.25Ag/PVA/0.1CHI i 0.25Ag/PVA/0.5CHI hidrogelovi imali linearnu zavisnost tokom čitavog perioda otpuštanja, kojom je potvrđena kinetika zakona brzine drugog reda, dok je u slučaju svih ostalih hidrogelova proces otpuštanja srebra pratio složeni mehanizam, na čiju kinetiku utiče više faktora, uključujući ukupnu početnu koncentraciju srebra, kao i sastav samog hidrogela u pogledu broja i vrste komponenata. Složeni mehanizam otpuštanja srebra iz polimernih matrica podrazumeva različitu kinetiku otpuštanja srebra u početnom periodu naglog otpuštanja, u odnosu na kasnije faze kada se otpuštanje usporava pre dostizanja platoa na profilu otpuštanja pred kraj posmatranog vremenskog perioda.
- Agar difuzioni test i kinetika antibakterijske aktivnosti su pokazali da sve vrste hidrogelova sa inkorporisanim nanočesticama srebra poseduju baktericidnu aktivnost prema sojevima *S. aureus* TL i *E. coli* ATCC 25922. Kod Gram-pozitivnog soja *S. aureus* TL, značajno smanjenje ($\approx 3-4$ logaritamske jedinice) broja bakterijskih ćelija uočeno je već nakon 15 min inkubacije na temperaturi od 37 °C. Pored toga, određena antibakterijska aktivnost uočena je i kod hidrogelova bez nanočestica srebra, a jači antibakterijski efekat je primećen u slučaju hidrogelova sa većim sadržajem hitozana (0,5 mas.%), koji su, takođe, pokazali baktericidni efekat prema soju *S. aureus* TL već nakon 1 h inkubacije, usled prirodne antibakterijske aktivnosti CHI, i njegovog sinergističkog efekta sa nanočesticama srebra.
- Netoksičnost i biokompatibilnost hidrogelova sa i bez nanočestica srebra je potvrđena u *in vitro* uslovima MTT i DET testovima prema dve ćelijske linije fibroblasta – humanoj MRC-5 i mišjoj L929 ćelijskoj liniji. Prema rezultatima DET testa, vijabilnost MRC-5 ćelija u kontaktu sa svim vrstama hidrogelova (i sa i bez srebra) bila je viša od 80 %, što potvrđuje necitotoksičnost ili blagu citotoksičnost ispitivanih uzoraka prema fibroblastima humanog porekla, dok su rezultati MTT testa potvrdili visok stepen preživljavanja MRC-5 ćelija, a u nekim slučajevima čak i vijabilnosti >100 %, što ukazuje na aktivnu proliferaciju ćelija u prisustvu uzoraka hidrogelova. Vijabilnost L929 ćelija nakon kontakta sa hidrogelovima sa grafenom je bila nešto niža prema oba testa, ali i dalje >80 % (MTT), odnosno 60-70 % (DET), što se može klasifikovati kao blaga do umerena citotoksičnost, prema kvantitativnoj skali.
- Dobijeni nanokompozitni hidrogelovi srebro/polivinil-alkohol/hitozan i srebro/polivinil-alkohol/hitozan/grafen imaju odličan potencijal za primenu u biomedicinske svrhe, pre svega zbog snažnog antibakterijskog efekta, koji se postiže kontrolisanim otpuštanjem elektrohemijski sintetisanih nanočestica srebra. Hitozan ispoljava značajan povoljan efekat, kako na količinu inkorporisanih nanočestica srebra, tako i na fizičko-hemijska i antibakterijska svojstva sintetisanih hidrogelova, te se ovi materijali mogu smatrati pogodnim kandidatima za dalja istraživanja u oblasti biomaterijala.

7 LITERATURA

- [1] Koehler J., Brandl F.P., Goepperich A.M.: *Hydrogel wound dressings for bioactive treatment of acute and chronic wounds*. European Polymer Journal, Vol 100, 2018, pp. 1–11.
- [2] Stashak T.S., Farstvedt E., Othic A.: *Update on Wound Dressings: Indications and Best Use*. Clinical Techniques in Equine Practice, Vol 3, No 2, 2004, pp. 148–63.
- [3] Blair J.M.A., Webber M.A., Baylay A.J., Ogbolu D.O., Piddock L.J. V.: *Molecular mechanisms of antibiotic resistance*. Nature Reviews Microbiology, Vol 13, No 1, 2015, pp. 42–51.
- [4] Caló E., Khutoryanskiy V. V.: *Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products*. European Polymer Journal, Vol 65, 2015, pp. 252–67.
- [5] Noori S., Kokabi M., Hassan Z.M.: *Poly(vinyl alcohol)/chitosan/honey/clay responsive nanocomposite hydrogel wound dressing*. Journal of Applied Polymer Science, Vol 46311, 2018, pp. 1–12.
- [6] Bhowmick S., Koul V.: *Assessment of PVA/silver nanocomposite hydrogel patch as antimicrobial dressing scaffold: Synthesis, characterization and biological evaluation*. Materials Science and Engineering: C, Vol 59, 2016, pp. 109–19.
- [7] Hong K.H.: *Preparation and Properties of Electrospun Poly (vinyl alcohol)/Silver Fiber Web as Wound Dressings*. Polymer Engineering and Science, Vol 47, 2007, pp. 43–9.
- [8] Jovanović Ž., Krklješ A., Stojkowska J., Tomić S., Obradović B., Mišković-Stanković V., Kacarevic-Popovic Z.: *Synthesis and characterization of silver/poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogel nanocomposite obtained by in situ radiolytic method*. Radiation Physics and Chemistry, Vol 80, No 11, 2011, pp. 1208–15.
- [9] Torres-Giner S., Perez-Masia R., Lagaron J.M.: *A Review on Electrospun Polymer Nanostructures as Advanced Bioactive Platforms*. Polymer Engineering and Science, Vol 56, 2016, pp. 500–27.
- [10] Jovanović Ž., Radosavljević A., Kačarević-Popović Z., Stojkowska J., Perić-Grujić A., Ristić M., Matić I.Z., Juranic Z.D., Obradovic B., Mišković-Stankovic V.: *Bioreactor validation and biocompatibility of Ag/poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogel nanocomposites*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol 105, 2013, pp. 230–5.
- [11] Sun J., Tan H.: *Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications*. Materials, Vol 6, No 4, 2013, pp. 1285–309.
- [12] Diniz F.R., Maia R.C.A.P., Rannier L., Andrade L.N., Chaud M. V., da Silva C.F., Corrêa C.B., de Albuquerque Junior R.L.C., da Costa L.P., Shin S.R., et al.: *Silver nanoparticles-composing alginate/gelatine hydrogel improves wound healing in vivo*. Nanomaterials, Vol 10, No 2, 2020, pp. 390.
- [13] Hebeish A., Hashem M., El-Hady M.M.A., Sharaf S.: *Development of CMC hydrogels loaded with silver nano-particles for medical applications*. Carbohydrate Polymers, Vol 92, No 1, 2013, pp. 407–13.
- [14] Jayakumar R., Prabakaran M., Sudheesh Kumar P.T., Nair S. V., Tamura H.: *Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications*. Biotechnology Advances, Vol 29, No 3, 2011, pp. 322–37.
- [15] Alves N.O., Da Silva G.T., Weber D.M., Luchese C., Wilhelm E.A., Fajardo A.R.: *Chitosan/poly(vinyl alcohol)/bovine bone powder biocomposites: A potential biomaterial for the treatment of atopic dermatitis-like skin lesions*. Carbohydrate Polymers, Vol 148, 2016, pp. 115–24.
- [16] Nguyen T.T.T., Tae B., Park J.S.: *Synthesis and characterization of nanofiber webs of chitosan/poly(vinyl alcohol) blends incorporated with silver nanoparticles*. Journal of Materials Science, Vol 46, No 20, 2011, pp. 6528–37.
- [17] Bal A., Çepni F.E., Çakir Ö., Acar I., Güçlü G.: *Synthesis and Characterization of Copolymeric and Terpolymeric Hydrogel-Silver Nanocomposites Based on Acrylic Acid , Acrylamide and*

- Itaconic Acid: Investigation of Their Antibacterial Activity Against Gram-Negative Bacteria.* Brazilian Journal of Chemical Engineering, Vol 32, No 02, 2015, pp. 509–18.
- [18] Zhou Y., Dong Q., Yang H., Liu X., Yin X., Tao Y., Bai Z., Xu W.: *Photocrosslinked maleilated chitosan/methacrylated poly (vinyl alcohol) bicomponent nanofibrous scaffolds for use as potential wound dressings.* Carbohydrate Polymers, Vol 168, 2017, pp. 220–6.
- [19] Zhang D., Zhou W., Wei B., Wang X., Tang R., Nie J., Wang J.: *Carboxyl-modified poly(vinyl alcohol)-crosslinked chitosan hydrogel films for potential wound dressing.* Carbohydrate Polymers, Vol 125, 2015, pp. 189–99.
- [20] Abdelgawad A.M., Hudson S.M., Rojas O.J.: *Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems.* Carbohydrate Polymers, Vol 100, 2014, pp. 166–78.
- [21] Ghasemzadeh H., Ghanaat F.: *Antimicrobial alginate/PVA silver nanocomposite hydrogel, synthesis and characterization.* Journal of Polymer Research, Vol 21, No 3, 2014, pp. 355.
- [22] Usman A., Hussain Z., Riaz A., Khan A.N.: *Enhanced mechanical, thermal and antimicrobial properties of poly(vinyl alcohol)/graphene oxide/starch/silver nanocomposites films.* Carbohydrate Polymers, Vol 153, 2016, pp. 592–9.
- [23] Fan L., Yang H., Yang J., Peng M., Hu J.: *Preparation and characterization of chitosan/gelatin/PVA hydrogel for wound dressings.* Carbohydrate Polymers, Vol 146, 2016, pp. 427–34.
- [24] Huang W.F., Tsui C.P., Tang C.Y., Yang M., Gu L.: *Surface charge switchable and pH-responsive chitosan / polymer core-shell composite nanoparticles for drug delivery application.* Composites Part B: Engineering, Vol 121, 2017, pp. 83–91.
- [25] Liu X.F., Guan Y.L., Yang D.Z., Li Z., Yao K.D.: *Antibacterial Action of Chitosan and Carboxymethylated Chitosan.* Journal of Applied Polymer Science, Vol 79, 2001, pp. 1324–35.
- [26] Chung Y., Su Y., Chen C., Jia G., Wang H., Wu J.C.G., Lin J.: *Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall.* Acta Pharmacologica Sinica, Vol 25, No 7, 2004, pp. 932–6.
- [27] Zheng L.Y., Zhu J.F.: *Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights.* Carbohydrate Polymers, Vol 54, No 4, 2003, pp. 527–30.
- [28] Twu Y.-K., Chen Y.-W., Shih C.-M.: *Preparation of silver nanoparticles using chitosan suspensions.* Powder Technology, Vol 185, No 3, 2008, pp. 251–7.
- [29] Wei D., Qian W.: *Facile synthesis of Ag and Au nanoparticles utilizing chitosan as a mediator agent.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol 62, No 1, 2008, pp. 136–42.
- [30] Wei D., Sun W., Qian W., Ye Y., Ma X.: *The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity.* Carbohydrate Research, Vol 344, No 17, 2009, pp. 2375–82.
- [31] Regiel A., Irusta S., Kyziol A., Arruebo M., Santamaria J.: *Preparation and characterization of chitosan-silver nanocomposite films and their antibacterial activity against Staphylococcus aureus.* Nanotechnology, Vol 24, No 1, 2013, pp. 015101.
- [32] Kozicki M., Kołodziejczyk M., Szyrkowska M., Pawlaczyk A., Leśniewska E., Matusiak A., Adamus A., Karolczak A.: *Hydrogels made from chitosan and silver nitrate.* Carbohydrate Polymers, Vol 140, 2016, pp. 74–87.
- [33] Mittal G., Rhee K.Y., Park S.J., Hui D.: *Generation of the pores on graphene surface and their reinforcement effects on the thermal and mechanical properties of chitosan-based composites.* Composites Part B: Engineering, Vol 114, 2017, pp. 348–55.
- [34] Yenier Z., Seki Y., Şen I., Sever K., Mermer Ö., Sarikanat M.: *Manufacturing and mechanical, thermal and electrical characterization of graphene loaded chitosan composites.* Composites Part B: Engineering, Vol 98, 2016, pp. 281–7.
- [35] Liu Y., Wu K., Luo F., Lu M., Xiao F., Du X., Zhang S., Liang L., Lu M.: *Significantly enhanced thermal conductivity in polyvinyl alcohol composites enabled by dopamine modified graphene nanoplatelets.* Composites Part A: Applied Science and Manufacturing, Vol 117, No September 2018, 2019, pp. 134–43.

- [36] Shen J., Zhang P., Song L., Li J., Ji B., Li J., Chen L.: *Polyethylene glycol supported by phosphorylated polyvinyl alcohol/graphene aerogel as a high thermal stability phase change material*. *Composites Part B: Engineering*, Vol 179, No August, 2019, pp. 107545.
- [37] Yang L., Chen Y., Wang M., Shi S., Jing J.: *Fused Deposition Modeling 3D Printing of Novel Poly(vinyl alcohol)/Graphene Nanocomposite with Enhanced Mechanical and Electromagnetic Interference Shielding Properties*. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, Vol 59, No 16, 2020, pp. 8066–77.
- [38] Wang Y., Yang G., Wang W., Zhu S., Guo L., Zhang Z., Li P.: *Effects of different functional groups in graphene nanofiber on the mechanical property of polyvinyl alcohol composites by the molecular dynamic simulations*. *Journal of Molecular Liquids*, Vol 277, 2019, pp. 261–8.
- [39] Van der Schueren B., El Marouazi H., Mohanty A., Lévêque P., Sutter C., Romero T., Janowska I.: *Polyvinyl alcohol-few layer graphene composite films prepared from aqueous colloids. Investigations of mechanical, conductive and gas barrier properties*. *Nanomaterials*, Vol 10, No 5, 2020.
- [40] Xiang J., Shen L., Hong Y.: *Status and future scope of hydrogels in wound healing: Synthesis, materials and evaluation*. *European Polymer Journal*, Vol 130, 2020, pp. 109609.
- [41] Zhang A., Liu Y., Qin D., Sun M., Wang T., Chen X.: *Research status of self-healing hydrogel for wound management: A review*. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol 164, 2020, pp. 2108–23.
- [42] Chen J., Peng Q., Peng X., Han L., Wang X., Wang J., Zeng H.: *Recent Advances in Mechano-Responsive Hydrogels for Biomedical Applications*. *ACS Applied Polymer Materials*, Vol 2, No 3, 2020, pp. 1092–107.
- [43] Dreiss C.A.: *Hydrogel design strategies for drug delivery*. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, Vol 48, 2020, pp. 1–17.
- [44] Sun Z., Song C., Wang C., Hu Y., Wu J.: *Hydrogel-Based Controlled Drug Delivery for Cancer Treatment: A Review*. *Molecular Pharmaceutics*, Vol 17, No 2, 2020, pp. 373–91.
- [45] Degors I.M.S., Wang C., Rehman Z.U., Zuhorn I.S.: *Carriers break barriers in drug delivery: endocytosis and endosomal escape of gene delivery vectors*. *Accounts of Chemical Research*, Vol 52, No 7, 2019, pp. 1750–60.
- [46] Peers S., Montembault A., Ladavière C.: *Chitosan hydrogels for sustained drug delivery*. *Journal of Controlled Release*, Vol 326, 2020, pp. 150–63.
- [47] Rai M., Yadav A., Gade A.: *Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials*. *Biotechnology Advances*, Vol 27, No 1, 2009, pp. 76–83.
- [48] Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J.H., Park S.J., Lee H.J., Kim S.H., Park Y.K., Park Y.H., Hwang C.Y., et al.: *Antimicrobial effects of silver nanoparticles*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, Vol 3, No 1, 2007, pp. 95–101.
- [49] Feng Q.L., Wu J., Chen G.Q., Cui F.Z., Kim T.N., Kim J.O.: *A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol 52, No 4, 2000, pp. 662–8.
- [50] Duran N., Duran M., de Jesus M.B., Seabra A.B., Favaro W.J., Nakazato G.: *Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, Vol 12, No 3, 2016, pp. 789–99.
- [51] Konop M., Damps T., Misicka A., Rudnicka L.: *Certain Aspects of Silver and Silver Nanoparticles in Wound Care: A Minireview*. *Journal of Nanomaterials*, Vol 2016, 2016, pp. 7614753.
- [52] Dai L., Nadeau B., An X., Cheng D., Long Z., Ni Y.: *Silver nanoparticles-containing dual-function hydrogels based on a guar gum-sodium borohydride system*. *Scientific Reports*, Vol 6, 2016, pp. 7–12.
- [53] Lu L., Kobayashi A., Tawa K., Ozaki Y.: *Silver nanoplates with special shapes: Controlled synthesis and their surface plasmon resonance and surface-enhanced Raman scattering properties*. *Chemistry of Materials*, Vol 18, No 20, 2006, pp. 4894–901.
- [54] Montoro S.R., Medeiros S. de F., Alves G.M.: *Nanostructured Hydrogels*. *Nanostructured*

Polymer Blends, Elsevier Inc.; 2013, p. 325–55.

- [55] Spasojevic J., Radosavljevic A., Krstic J., Mitric M., Popovic M., Rakocevic Z., Kalagasidis-Krusic M., Kacarevic-Popovic Z.: *Structural Characteristics and Bonding Environment of Ag Nanoparticles Synthesized by Gamma Irradiation Within Thermo-Responsive Poly(N-isopropylacrylamide) Hydrogel*. Polymer Composites, Vol 38, 2017, pp. 1014–26.
- [56] Jovanović Ž., Stojkowska J., Obradović B., Miskovic-Stankovic V.: *Alginate hydrogel microbeads incorporated with Ag nanoparticles obtained by electrochemical method*. Materials Chemistry and Physics, Vol 133, No 1, 2012, pp. 182–9.
- [57] Stojkowska J., Kostić D., Jovanović Ž., Vukašinović-Sekulić M., Mišković-Stanković V., Obradović B.: *A comprehensive approach to in vitro functional evaluation of Ag/alginate nanocomposite hydrogels*. Carbohydrate Polymers, Vol 111, 2014, pp. 305–14.
- [58] Surudžić R., Janković A., Bibić N., Vukašinović-Sekulić M., Perić-Grujić A., Mišković-Stanković V., Park S.J., Rhee K.Y.: *Physico-chemical and mechanical properties and antibacterial activity of silver/poly(vinyl alcohol)/graphene nanocomposites obtained by electrochemical method*. Composites Part B: Engineering, Vol 85, 2016, pp. 102–12.
- [59] Abudabbus M.M., Jevremović I., Nešović K., Perić-Grujić A., Rhee K.Y., Mišković-Stanković V.: *In situ electrochemical synthesis of silver-doped poly(vinyl alcohol)/graphene composite hydrogels and their physico-chemical and thermal properties*. Composites Part B: Engineering, Vol 140, 2018, pp. 99–107.
- [60] Abudabbus M.M., Jevremović I., Janković A., Perić-Grujić A., Matić I., Vukašinović-Sekulić M., Hui D., Rhee K.Y., Mišković-Stanković V.: *Biological activity of electrochemically synthesized silver doped polyvinyl alcohol / graphene composite hydrogel discs for biomedical applications*. Composites Part B: Engineering, Vol 104, 2016, pp. 26–34.
- [61] Nešović K., Abudabbus M.M., Rhee K.Y., Mišković-Stanković V.: *Graphene based composite hydrogel for biomedical applications*. Croatica Chemica Acta, Vol 90, No 2, 2017, pp. 207.
- [62] Jovanovic Z., Radosavljevic A., Kacarevic-Popovic Z., Miskovic-Stankovic V.: *Silver/poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) nanocomposites obtained by the electrochemical synthesis*. Hemijska Industrija, Vol 65, No 6, 2011, pp. 687–96.
- [63] Jovanovic Z., Radosavljevic A., Stojkowska J., Nikolic B., Obradovic B., Kacarevic-Popovic Z., Miskovic-Stankovic V.: *Silver/Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) Hydrogel Nanocomposites Obtained by Electrochemical Synthesis of Silver Nanoparticles Inside the Polymer Hydrogel Aimed for Biomedical Applications*. Polymer Composites, Vol 35, 2014, pp. 217–26.
- [64] Hoare T.R., Kohane D.S.: *Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges*. Polymer, Vol 49, No 8, 2008, pp. 1993–2007.
- [65] Su E., Yurtsever M., Okay O.: *A Self-Healing and Highly Stretchable Polyelectrolyte Hydrogel via Cooperative Hydrogen Bonding as a Superabsorbent Polymer*. Macromolecules, Vol 52, No 9, 2019, pp. 3257–67.
- [66] Yang F., Fan X., Zhang M., Wang C., Zhao W., Zhao C.: *A template-hatched method towards poly(acrylic acid) hydrogel spheres with ultrahigh ion exchange capacity and robust adsorption of environmental toxins*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, Vol 69, 2019, pp. 422–31.
- [67] Lv H., Wang X., Fu Q., Si Y., Yin X., Li X., Sun G., Yu J., Ding B.: *A versatile method for fabricating ion-exchange hydrogel nanofibrous membranes with superb biomolecule adsorption and separation properties*. Journal of Colloid and Interface Science, Vol 506, 2017, pp. 442–51.
- [68] Rehman T.U., Shah L.A., Khan M., Irfan M., Khattak N.S.: *Zwitterionic superabsorbent polymer hydrogels for efficient and selective removal of organic dyes*. RSC Advances, Vol 9, No 32, 2019, pp. 18565–77.
- [69] Boateng J.S., Matthews K.H., Stevens H.N.E., Eccleston G.M.: *Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review*. Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol 97, 2008, pp. 2892–923.
- [70] Peppas N.A., Hilt J.Z., Khademhosseini A., Langer R.: *Hydrogels in biology and medicine:*

- From molecular principles to bionanotechnology*. *Advanced Materials*, Vol 18, No 11, 2006, pp. 1345–60.
- [71] Qi X., Su T., Zhang M., Tong X., Pan W., Zeng Q., Zhou Z., Shen L., He X., Shen J.: *Macroporous Hydrogel Scaffolds with Tunable Physicochemical Properties for Tissue Engineering Constructed Using Renewable Polysaccharides*. *ACS Applied Materials and Interfaces*, Vol 12, No 11, 2020, pp. 13256–64.
- [72] Jordan A.M., Kim S.E., Van De Voorde K., Pokorski J.K., Korley L.T.J.: *In Situ Fabrication of Fiber Reinforced Three-Dimensional Hydrogel Tissue Engineering Scaffolds*. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, Vol 3, No 8, 2017, pp. 1869–79.
- [73] Yan S., Wang T., Feng L., Zhu J., Zhang K., Chen X., Cui L., Yin J.: *Injectable in situ self-cross-linking hydrogels based on poly(l -glutamic acid) and alginate for cartilage tissue engineering*. *Biomacromolecules*, Vol 15, No 12, 2014, pp. 4495–508.
- [74] Huang J., Frauenlob M., Shibata Y., Wang L., Nakajima T., Nonoyama T., Tsuda M., Tanaka S., Kurokawa T., Gong J.P.: *Chitin-Based Double-Network Hydrogel as Potential Superficial Soft-Tissue-Repairing Materials*. *Biomacromolecules*, Vol 21, No 10, 2020, pp. 4220–30.
- [75] Lee K.Y., Mooney D.J.: *Hydrogels for tissue engineering*. *Chemical Reviews*, Vol 101, No 7, 2001, pp. 1869–79.
- [76] Kim Y.M., Kim C.H., Song S.C.: *Injectable Ternary Nanocomplex Hydrogel for Long-Term Chemical Drug/Gene Dual Delivery*. *ACS Macro Letters*, Vol 5, No 3, 2016, pp. 297–300.
- [77] Zhou Y., Ye H., Chen Y., Zhu R., Yin L.: *Photoresponsive Drug/Gene Delivery Systems*. *Biomacromolecules*, Vol 19, No 6, 2018, pp. 1840–57.
- [78] Silva D., de Sousa H.C., Gil M.H., Santos L.F., Amaral R.A., Saraiva J.A., Salema-Oom M., Alvarez-Lorenzo C., Serro A.P., Saramago B.: *Imprinted hydrogels with LbL coating for dual drug release from soft contact lenses materials*. *Materials Science and Engineering C*, Vol 120, 2020, pp. 111687.
- [79] Mayet N., Choonara Y.E., Kumar P., Tomar L.K., Tyagi C., Du Toit L.C., Pillay V.: *A comprehensive review of advanced biopolymeric wound healing systems*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol 103, No 8, 2014, pp. 2211–30.
- [80] Naseri-Nosar M., Ziora Z.M.: *Wound dressings from naturally-occurring polymers: A review on homopolysaccharide-based composites*. *Carbohydrate Polymers*, Vol 189, 2018, pp. 379–98.
- [81] Zhong Y., Xiao H., Seidi F., Jin Y.: *Natural Polymer-Based Antimicrobial Hydrogels without Synthetic Antibiotics as Wound Dressings*. *Biomacromolecules*, Vol 21, No 8, 2020, pp. 2983–3006.
- [82] Gupta A., Kowalczyk M., Heaselgrave W., Britland S.T., Martin C., Radecka I.: *The production and application of hydrogels for wound management: A review*. *European Polymer Journal*, Vol 111, 2019, pp. 134–51.
- [83] Shah S.A., Sohail M., Khan S., Minhas M.U., de Matas M., Sikstone V., Hussain Z., Abbasi M., Kousar M.: *Biopolymer-based biomaterials for accelerated diabetic wound healing: A critical review*. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol 139, 2019, pp. 975–93.
- [84] Ng V.W.L., Chan J.M.W., Sardon H., Ono R.J., García J.M., Yang Y.Y., Hedrick J.L.: *Antimicrobial hydrogels: A new weapon in the arsenal against multidrug-resistant infections*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol 78, 2014, pp. 46–62.
- [85] Bhattacharya D., Ghosh B., Mukhopadhyay M.: *Development of nanotechnology for advancement and application in wound healing: A review*. *IET Nanobiotechnology*, Vol 13, No 8, 2019, pp. 778–85.
- [86] Haraguchi K.: *Nanocomposite hydrogels*. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, Vol 11, No 3–4, 2007, pp. 47–54.
- [87] Ma L., Su W., Ran Y., Ma X., Yi Z., Chen G., Chen X., Deng Z., Tong Q., Wang X., et al.: *Synthesis and characterization of injectable self-healing hydrogels based on oxidized alginate-hybrid-hydroxyapatite nanoparticles and carboxymethyl chitosan*. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol 165, 2020, pp. 1164–74.

- [88] Mahdavinia G.R., Karimi M.H., Soltaniniya M., Massoumi B.: *In vitro evaluation of sustained ciprofloxacin release from κ -carrageenan-crosslinked chitosan/hydroxyapatite hydrogel nanocomposites*. International Journal of Biological Macromolecules, Vol 126, 2019, pp. 443–53.
- [89] Ulijn R. V., Bibi N., Jayawarna V., Thornton P.D., Todd S.J., Mart R.J., Smith A.M., Gough J.E.: *Bioresponsive hydrogels*. Materials Today, Vol 10, No 4, 2007, pp. 40–8.
- [90] Zhang Y.S., Khademhosseini A.: *Advances in engineering hydrogels*. Science, Vol 356, No 6337, 2017.
- [91] Huang H., Xu J., Wei K., Xu Y.J., Choi C.K.K., Zhu M., Bian L.: *Bioactive Nanocomposite Poly (Ethylene Glycol) Hydrogels Crosslinked by Multifunctional Layered Double Hydroxides Nanocrosslinkers*. Macromolecular Bioscience, 2016, pp. 1019–26.
- [92] Yang W., Fortunati E., Bertoglio F., Owczarek J.S., Bruni G., Kozanecki M., Kenny J.M., Torre L., Visai L., Puglia D.: *Polyvinyl alcohol/chitosan hydrogels with enhanced antioxidant and antibacterial properties induced by lignin nanoparticles*. Carbohydrate Polymers, Vol 181, 2018, pp. 275–84.
- [93] S. S., A. S.K., Nair P.D., Thomas L. V.: *A nonadherent chitosan-polyvinyl alcohol absorbent wound dressing prepared via controlled freeze-dry technology*. International Journal of Biological Macromolecules, Vol 150, 2020, pp. 129–40.
- [94] Polo Fonseca L., Trinca R.B., Felisberti M.I.: *Amphiphilic polyurethane hydrogels as smart carriers for acidic hydrophobic drugs*. International Journal of Pharmaceutics, Vol 546, No 1–2, 2018, pp. 106–14.
- [95] Macková H., Plichta Z., Hlídková H., Sedláček O., Konefal R., Sadakbayeva Z., Dušková-Smrčková M., Horák D., Kubinová Š.: *Reductively Degradable Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Hydrogels with Oriented Porosity for Tissue Engineering Applications*. ACS Applied Materials and Interfaces, Vol 9, No 12, 2017, pp. 10544–53.
- [96] Botelho da Silva S., Krolicka M., van den Broek L.A.M., Frissen A.E., Boeriu C.G.: *Water-soluble chitosan derivatives and pH-responsive hydrogels by selective C-6 oxidation mediated by TEMPO-laccase redox system*. Carbohydrate Polymers, Vol 186, 2018, pp. 299–309.
- [97] Chen K., Ling Y., Cao C., Li X., Chen X., Wang X.: *Chitosan derivatives/reduced graphene oxide/alginate beads for small-molecule drug delivery*. Materials Science and Engineering C, Vol 69, 2016, pp. 1222–8.
- [98] Yar M., Shahzad S., Shahzadi L., Shahzad S.A., Mahmood N., Chaudhry A.A., Rehman I. ur, MacNeil S.: *Heparin binding chitosan derivatives for production of pro-angiogenic hydrogels for promoting tissue healing*. Materials Science and Engineering C, Vol 74, 2017, pp. 347–56.
- [99] Patrúlea V., Laurent-Applegate L.A., Ostafe V., Borchard G., Jordan O.: *Polyelectrolyte nanocomplexes based on chitosan derivatives for wound healing application*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Vol 140, 2019, pp. 100–8.
- [100] Sacco P., Furlani F., de Marzo G., Marsich E., Paoletti S., Donati I.: *Concepts for Developing Physical Gels of Chitosan and of Chitosan Derivatives*. Gels, Vol 4, No 3, 2018, pp. 67.
- [101] Shen Y., Li X., Huang Y., Chang G., Cao K., Yang J., Zhang R., Sheng X., Ye X.: *pH and redox dual stimuli-responsive injectable hydrogels based on carboxymethyl cellulose derivatives*. Macromolecular Research, Vol 24, No 7, 2016, pp. 602–8.
- [102] Tam R.Y., Fisher S.A., Baker A.E.G., Shoichet M.S.: *Transparent Porous Polysaccharide Cryogels Provide Biochemically Defined, Biomimetic Matrices for Tunable 3D Cell Culture*. Chemistry of Materials, Vol 28, No 11, 2016, pp. 3762–70.
- [103] Ning H., Wu X., Wu Q., Yu W., Wang H., Zheng S., Chen Y., Li Y., Su J.: *Microfiber-Reinforced Composite Hydrogels Loaded with Rat Adipose-Derived Stem Cells and BMP-2 for the Treatment of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw in a Rat Model*. ACS Biomaterials Science and Engineering, Vol 5, No 5, 2019, pp. 2430–43.
- [104] Rai M., Ingle A.P., Gupta I., Brandelli A.: *Bioactivity of noble metal nanoparticles decorated with biopolymers and their application in drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics, Vol 496, No 2, 2015, pp. 159–72.

- [105] Rana A., Yadav K., Jagadevan S.: *A comprehensive review on green synthesis of nature-inspired metal nanoparticles: Mechanism, application and toxicity*. Journal of Cleaner Production, Vol 272, 2020, pp. 122880.
- [106] Jiang X., Du B., Huang Y., Zheng J.: *Ultrasmall noble metal nanoparticles: Breakthroughs and biomedical implications*. Nano Today, Vol 21, 2018, pp. 106–25.
- [107] Azharuddin M., Zhu G.H., Das D., Ozgur E., Uzun L., Turner A.P.F., Patra H.K.: *A repertoire of biomedical applications of noble metal nanoparticles*. Chemical Communications, Vol 55, No 49, 2019, pp. 6964–96.
- [108] Opt Veld R.C., Walboomers X.F., Jansen J.A., Wagener F.A.D.T.G.: *Design Considerations for Hydrogel Wound Dressings: Strategic and Molecular Advances*. Tissue Engineering - Part B: Reviews, Vol 26, No 3, 2020, pp. 230–48.
- [109] Bianchera A., Catanzano O., Boateng J., Elviri L.: *The Place of Biomaterials in Wound Healing*. In: Boateng J, editor. Therapeutic Dressings and Wound Healing Applications, London: John Wiley and Sons Ltd; 2020, p. 337–66.
- [110] Shi C., Wang C., Liu H., Li Q., Li R., Zhang Y., Liu Y., Shao Y., Wang J.: *Selection of Appropriate Wound Dressing for Various Wounds*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, Vol 8, 2020, pp. 1–17.
- [111] Percival S.L., Bowler P., Woods E.J.: *Assessing the effect of an antimicrobial wound dressing on biofilms*. Wound Repair and Regeneration, Vol 16, No 1, 2008, pp. 52–7.
- [112] Broussard K.C., Powers J.G.: *Wound dressings: Selecting the most appropriate type*. American Journal of Clinical Dermatology, Vol 14, No 6, 2013, pp. 449–59.
- [113] Powers J.G., Morton L.M., Phillips T.J.: *Dressings for chronic wounds*. Dermatologic Therapy, Vol 26, No 3, 2013, pp. 197–206.
- [114] Kim M.S., Oh G.W., Jang Y.M., Ko S.C., Park W.S., Choi I.W., Kim Y.M., Jung W.K.: *Antimicrobial hydrogels based on PVA and diphlorethohydroxycarmalol (DPHC) derived from brown alga Ishige okamurae: An in vitro and in vivo study for wound dressing application*. Materials Science and Engineering C, Vol 107, 2020, pp. 110352.
- [115] Alipour R., Khorshidi A., Shojaei A.F., Mashayekhi F., Moghaddam M.J.M.: *Skin wound healing acceleration by Ag nanoparticles embedded in PVA/PVP/Pectin/Mafenide acetate composite nanofibers*. Polymer Testing, Vol 79, 2019, pp. 106022.
- [116] Augustine R., Hasan A., Yadu Nath V.K., Thomas J., Augustine A., Kalarikkal N., Moustafa A.E. Al, Thomas S.: *Electrospun polyvinyl alcohol membranes incorporated with green synthesized silver nanoparticles for wound dressing applications*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, Vol 29, No 11, 2018, pp. 163.
- [117] Salehi-Abari M., Koupaei N., Hassanzadeh-Tabrizi S.A.: *Synthesis and Characterisation of semi-interpenetrating network of Polycaprolactone/polyethylene glycol diacrylate/zeolite-CuO as wound dressing*. Materials Technology, Vol 35, No 5, 2020, pp. 290–9.
- [118] Maleki H., Mathur S.: *Antibacterial Ag containing core-shell polyvinyl alcohol- poly (lactic acid) nanofibers for biomedical applications*. Polymer Engineering and Science, Vol 60, 2020, pp. 1221–30.
- [119] Bajpai S.K., Chand N., Mahendra M.: *In Situ Formation of Silver Nanoparticles in Poly(methacrylic acid) Hydrogel for Antibacterial Applications*. Polymer Engineering and Science, Vol 53, 2013, pp. 1751–9.
- [120] Zhu J., Li F., Wang X., Yu J., Wu D.: *Hyaluronic Acid and Polyethylene Glycol Hybrid Hydrogel Encapsulating Nanogel with Hemostasis and Sustainable Antibacterial Property for Wound Healing*. ACS Applied Materials and Interfaces, Vol 10, No 16, 2018, pp. 13304–16.
- [121] Matica M.A., Aachmann F.L., Tøndervik A., Sletta H., Ostafe V.: *Chitosan as a wound dressing starting material: Antimicrobial properties and mode of action*. International Journal of Molecular Sciences, Vol 20, No 23, 2019, pp. 1–33.
- [122] Kenawy E., Omer A.M., Tamer T.M., Elmeligy M.A., Eldin M.S.M.: *Fabrication of biodegradable gelatin/chitosan/cinnamaldehyde crosslinked membranes for antibacterial wound dressing applications*. International Journal of Biological Macromolecules, Vol 139,

2019, pp. 440–8.

- [123] Rubina M.S., Said-Galiev E.E., Naumkin A. V., Shulenina A. V., Belyakova O.A., Vasil'kov A.Y.: *Preparation and characterization of biomedical collagen–chitosan scaffolds with entrapped ibuprofen and silver nanoparticles*. Polymer Engineering and Science, Vol 59, No 12, 2019, pp. 2479–87.
- [124] Stojkowska J., Djurdjevic Z., Jancic I., Bufan B., Milenkovic M., Jankovic R., Miskovic-Stankovic V., Obradovic B.: *Comparative in vivo evaluation of novel formulations based on alginate and silver nanoparticles for wound treatments*. Journal of Biomaterials Applications, Vol 32, No 9, 2018, pp. 1197–211.
- [125] Nuutila K., Grolman J., Yang L., Broomhead M., Lipsitz S., Onderdonk A., Mooney D., Eriksson E.: *Immediate Treatment of Burn Wounds with High Concentrations of Topical Antibiotics in an Alginate Hydrogel Using a Platform Wound Device*. Advances in Wound Care, Vol 9, No 2, 2020, pp. 48–60.
- [126] Chuysinuan P., Chimnoi N., Reuk-Ngam N., Khlaychan P., Makarasen A., Wetprasit N., Dechtrirat D., Supaphol P., Techasakul S.: *Development of gelatin hydrogel pads incorporated with Eupatorium adenophorum essential oil as antibacterial wound dressing*. Polymer Bulletin, Vol 76, No 2, 2019, pp. 701–24.
- [127] Du Y., Li L., Peng H., Zheng H., Cao S., Lv G., Yang A., Li H., Liu T.: *A Spray-Filming Self-Healing Hydrogel Fabricated from Modified Sodium Alginate and Gelatin as a Bacterial Barrier*. Macromolecular Bioscience, Vol 20, No 2, 2019, pp. 1900303.
- [128] Gupta A., Briffa S.M., Swingler S., Gibson H., Kannappan V., Adamus G., Kowalczyk M., Martin C., Radecka I.: *Synthesis of Silver Nanoparticles Using Curcumin–Cyclodextrins Loaded into Bacterial Cellulose-Based Hydrogels for Wound Dressing Applications*. Biomacromolecules, Vol 21, No 5, 2020, pp. 1802–1811.
- [129] Koivuniemi R., Hakkarainen T., Kiiskinen J., Kosonen M., Vuola J., Valtonen J., Luukko K., Kavola H., Yliperttula M.: *Clinical Study of Nanofibrillar Cellulose Hydrogel Dressing for Skin Graft Donor Site Treatment*. Advances in Wound Care, Vol 9, No 4, 2019, pp. 199–210.
- [130] Yang X., Liu W., Xi G., Wang M., Liang B., Shi Y., Feng Y., Ren X., Shi C.: *Fabricating antimicrobial peptide-immobilized starch sponges for hemorrhage control and antibacterial treatment*. Carbohydrate Polymers, Vol 222, No April, 2019, pp. 115012.
- [131] Gharibi R., Kazemi S., Yeganeh H., Tafakori V.: *Utilizing dextran to improve hemocompatibility of antimicrobial wound dressings with embedded quaternary ammonium salts*. International Journal of Biological Macromolecules, Vol 131, 2019, pp. 1044–56.
- [132] Innocenti Malini R., Lesage J., Toncelli C., Fortunato G., Rossi R.M., Spano F.: *Crosslinking dextran electrospun nanofibers via borate chemistry: Proof of concept for wound patches*. European Polymer Journal, Vol 110, 2019, pp. 276–82.
- [133] Ying H., Zhou J., Wang M., Su D., Ma Q., Lv G., Chen J.: *In situ formed collagen-hyaluronic acid hydrogel as biomimetic dressing for promoting spontaneous wound healing*. Materials Science and Engineering C, Vol 101, 2019, pp. 487–98.
- [134] Zhang S., Hou J., Yuan Q., Xin P., Cheng H., Gu Z., Wu J.: *Arginine derivatives assist dopamine-hyaluronic acid hybrid hydrogels to have enhanced antioxidant activity for wound healing*. Chemical Engineering Journal, Vol 392, 2019, pp. 123775.
- [135] Lin Z., Wu T., Wang W., Li B., Wang M., Chen L., Xia H., Zhang T.: *Biofunctions of antimicrobial peptide-conjugated alginate/hyaluronic acid/collagen wound dressings promote wound healing of a mixed-bacteria-infected wound*. International Journal of Biological Macromolecules, Vol 140, 2019, pp. 330–42.
- [136] Li W., Gao F., Kan J., Deng J., Wang B., Hao S.: *Synthesis and fabrication of a keratin-conjugated insulin hydrogel for the enhancement of wound healing*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol 175, 2019, pp. 436–44.
- [137] Gholipourmalekabadi M., Sapru S., Samadikuchaksaraei A., Reis R.L., Kaplan D.L., Kundu S.C.: *Silk fibroin for skin injury repair: Where do things stand?*. Advanced Drug Delivery Reviews, Vol 153, 2019, pp. 28–53.

- [138] Baker M.I., Walsh S.P., Schwartz Z., Boyan B.D.: *A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications*. Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials, Vol 100 B, No 5, 2012, pp. 1451–7.
- [139] Peppas N.A., Stauffer S.R.: *Reinforced uncrosslinked poly(vinyl alcohol) gels produced by cyclic freezing-thawing processes: a short review*. Journal of Controlled Release, Vol 16, No 3, 1991, pp. 305–10.
- [140] Stauffer S.R., Peppas N.A.: *Poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freezing-thawing cyclic processing*. Polymer, Vol 33, No 18, 1992, pp. 3932–6.
- [141] Aycan D., Yayla N.A., Aydin Y.A.: *Chitosan Polyvinyl Alcohol Blend Films for Ibuprofen Encapsulation: Fabrication, Characterization and Kinetics*. Polymer Degradation and Stability, Vol 181, 2020, pp. 109346.
- [142] Zou P., Lee W.H., Gao Z., Qin D., Wang Y., Liu J., Sun T., Gao Y.: *Wound dressing from polyvinyl alcohol/chitosan electrospun fiber membrane loaded with OH-CATH30 nanoparticles*. Carbohydrate Polymers, Vol 232, 2020, pp. 115786.
- [143] Menazea A.A., Ahmed M.K.: *Wound healing activity of Chitosan/Polyvinyl Alcohol embedded by gold nanoparticles prepared by nanosecond laser ablation*. Journal of Molecular Structure, Vol 1217, 2020, pp. 128401.
- [144] Hong K.H.: *Polyvinyl alcohol/tannic acid hydrogel prepared by a freeze-thawing process for wound dressing applications*. Polymer Bulletin, Vol 74, No 7, 2017, pp. 2861–72.
- [145] Salehi M., Farzamfar S., Ehterami A., Paknejad Z., Bastami F., Shirian S., Vahedi H., Koehkonan G.S., Goodarzi A.: *Kaolin-loaded chitosan/polyvinyl alcohol electrospun scaffold as a wound dressing material: In vitro and in vivo studies*. Journal of Wound Care, Vol 29, No 5, 2020, pp. 270–80.
- [146] Croisier F., Jerome C.: *Chitosan-based biomaterials for tissue engineering*. European Polymer Journal, Vol 49, No 4, 2013, pp. 780–92.
- [147] Rinaudo M.: *Chitin and chitosan: Properties and applications*. Progress in Polymer Science, Vol 31, No 7, 2006, pp. 603–32.
- [148] Bhattarai N., Gunn J., Zhang M.: *Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, Vol 62, No 1, 2010, pp. 83–99.
- [149] Hamed H., Moradi S., Hudson S.M., Tonelli A.E.: *Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review*. Carbohydrate Polymers, Vol 199, 2018, pp. 445–60.
- [150] Matshetshe K.I., Parani S., Manki S.M., Oluwafemi O.S.: *Preparation, characterization and in vitro release study of β -cyclodextrin/chitosan nanoparticles loaded Cinnamomum zeylanicum essential oil*. International Journal of Biological Macromolecules, Vol 118, 2018, pp. 676–82.
- [151] Kumar A., Jaiswal M.: *Design and in vitro investigation of nanocomposite hydrogel based in situ spray dressing for chronic wounds and synthesis of silver nanoparticles using green chemistry*. Journal of Applied Polymer Science, Vol 133, No 14, 2016, pp. 1–14.
- [152] Tsai G.-J., Su W.-H.: *Antibacterial activity of shrimp chitosan against Escherichia coli*. Journal of Food Protection, Vol 62, No 3, 1999, pp. 239–43.
- [153] Sanpui P., Murugadoss A., Prasad P.V.D., Ghosh S.S., Chattopadhyay A.: *The antibacterial properties of a novel chitosan-Ag-nanoparticle composite*. International Journal of Food Microbiology, Vol 124, No 2, 2008, pp. 142–6.
- [154] Kong M., Chen X.G., Xing K., Park H.J.: *Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review*. International Journal of Food Microbiology, Vol 144, No 1, 2010, pp. 51–63.
- [155] Paul W., Sharma C.: *Chitosan and alginate wound dressings: a short review*. Trends in Biomaterials and Artificial Organs, Vol 18, No 1, 2004, pp. 18–23.
- [156] Liu H., Du Y., Wang X., Sun L.: *Chitosan kills bacteria through cell membrane damage*. International Journal of Food Microbiology, Vol 95, No 2, 2004, pp. 147–55.
- [157] Hosseinnejad M., Mahdi S.: *Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan*. International Journal of Biological Macromolecules, Vol 85, 2016, pp. 467–75.

- [158] Kiew S.F., Kiew L.V., Lee H.B., Imae T., Chung L.Y.: *Assessing biocompatibility of graphene oxide-based nanocarriers: A review*. Journal of Controlled Release, Vol 226, 2016, pp. 217–28.
- [159] Geim A.K., Novoselov K.S.: *The rise of graphene*. Nature Materials, Vol 6, 2007, pp. 183–91.
- [160] Wang N., Chang P.R., Zheng P., Ma X.: *Graphene–poly(vinyl alcohol) composites: Fabrication, adsorption and electrochemical properties*. Applied Surface Science, Vol 314, 2014, pp. 815–21.
- [161] Liu S., Zeng T.H., Hofmann M., Burcombe E., Wei J., Jiang R.: *Antibacterial Activity of Graphite, Graphite Oxide, Graphene Oxide, and Reduced Graphene Oxide: Membrane and Oxidative Stress*. ACS Nano, Vol 5, No 9, 2011, pp. 6971–80.
- [162] Santos C.M., Mangadlao J., Ahmed F., Leon A., Advincula R.C., Rodrigues D.F.: *Graphene nanocomposite for biomedical applications: fabrication, antimicrobial and cytotoxic investigations*. Nanotechnology, Vol 23, No 39, 2012, pp. 395101.
- [163] Hegab H.M., Elmekawy A., Zou L., Mulcahy D., Saint C.P., Ginic-Markovic M.: *The controversial antibacterial activity of graphene-based materials*. Carbon, Vol 105, 2016, pp. 362–76.
- [164] Simões D., Miguel S.P., Ribeiro M.P., Coutinho P., Mendonça A.G., Correia I.J.: *Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Vol 127, 2018, pp. 130–41.
- [165] Kvítek L., Panáček A., Soukupova J., Kolar M., Vecerova R., Prucek R., Holecova M., Zboril R.: *Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles*. Journal of Physical Chemistry, Vol 112, No 15, 2008, pp. 5825–34.
- [166] Zare Y., Shabani I.: *Polymer/metal nanocomposites for biomedical applications*. Materials Science and Engineering C, Vol 60, No 28, 2016, pp. 195–203.
- [167] Rai M., Ingle A.P., Gupta I., Brandelli A.: *Bioactivity of noble metal nanoparticles decorated with biopolymers and their application in drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics, Vol 496, No 2, 2015, pp. 159–72.
- [168] Liao C., Li Y., Tjong S.C.: *Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles*. International Journal of Molecular Sciences, Vol 20, No 2, 2019, pp. 1–47.
- [169] Liz-Marzán L.M.: *Nanometals: formation and color*. Materials Today, Vol 7, No 2, 2004, pp. 26–31.
- [170] Mahmoud K.H.: *Synthesis, characterization, optical and antimicrobial studies of polyvinyl alcohol-silver nanocomposites*. Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy, Vol 138, 2015, pp. 434–40.
- [171] Slistan-Grijalva A., Herrera-Urbina R., Rivas-Silva J.F., Avalos-Borja M., Castillon-Barraza F.F., Posada-Amarillas A.: *Assessment of growth of silver nanoparticles synthesized from an ethylene glycol – silver nitrate – polyvinylpyrrolidone solution*. Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures, Vol 25, 2005, pp. 438–48.
- [172] Slistan-Grijalva A., Herrera-Urbina R., Rivas-Silva J.F., Avalos-Borja M., Castillon-Barraza F.F., Posada-Amarillas A.: *Classical theoretical characterization of the surface plasmon absorption band for silver spherical nanoparticles suspended in water and ethylene glycol*. Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures, Vol 27, No 1–2, 2005, pp. 104–12.
- [173] Evanoff D.D., Chumanov G.: *Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays*. ChemPhysChem, Vol 6, No 7, 2005, pp. 1221–31.
- [174] Laven P.: *MiePlot - A computer program for scattering of light from a sphere using Mie theory & the Debye series* 2015. <http://www.philiplaven.com/mieplot.htm#Download> MiePlot (accessed January 16, 2021).
- [175] Laven P.: *Rayleigh Scattering*. The Optics of a Water Drop: Mie Scattering and the Debye Series, 2003. <http://www.philiplaven.com/p8b.html> (accessed January 16, 2021).
- [176] Bohren C.F., Huffman D.R.: *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*. Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim; 1998.
- [177] Piazza R., Degiorgio V.: *Scattering, Rayleigh*. In: Bassani F, Liedl GL, Wyder P, editors. Encyclopedia of Condensed Matter Physics, Amsterdam, NL: Elsevier B.V.; 2005, p. 234–42.

- [178] Lockwood D.J.:Rayleigh and Mie Scattering. In: Shamey R, editor. *Encyclopedia of Color Science and Technology*, New York: Springer Science+Business Media LLC; 2015, p. 1–12.
- [179] Evanoff D.D., Chumanov G.:*Size-Controlled Synthesis of Nanoparticles. 2. Measurement of Extinction, Scattering, and Absorption Cross Sections*. *Journal of Physical Chemistry B*, Vol 108, No 37, 2004, pp. 13957–62.
- [180] Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ram J.T., Yacaman M.J.:*The bactericidal effect of silver nanoparticles*. *Nanotechnology*, No 16, 2005, pp. 2346–53.
- [181] Prabhu S., Poulose E.K.:*Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects*. *International Nano Letters*, Vol 2, No 1, 2012, pp. 32.
- [182] Sondi I., Salopek-Sondi B.:*Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria*. *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol 275, No 1, 2004, pp. 177–82.
- [183] Pareek V., Gupta R., Panwar J.:*Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and bactericidal action? A review*. *Materials Science and Engineering C*, Vol 90, 2018, pp. 739–49.
- [184] Helmlinger J., Sengstock C., Groß-Heitfeld C., Mayer C., Schildhauer T.A., Köller M., Epple M.:*Silver nanoparticles with different size and shape: Equal cytotoxicity, but different antibacterial effects*. *RSC Advances*, Vol 6, No 22, 2016, pp. 18490–501.
- [185] Le Ouay B., Stellacci F.:*Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight*. *Nano Today*, Vol 10, No 3, 2015, pp. 339–54.
- [186] Bondarenko O., Ivask A., Käkinen A., Kurvet I., Kahru A.:*Particle-Cell Contact Enhances Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles*. *PLoS ONE*, Vol 8, No 5, 2013.
- [187] Ruparelia J.P., Chatterjee A.K., Duttagupta S.P., Mukherji S.:*Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles*. *Acta Biomaterialia*, Vol 4, No 3, 2008, pp. 707–16.
- [188] Ingle A., Gade A., Pierrat S., Sonnichsen C., Rai M.:*Mycosynthesis of Silver Nanoparticles Using the Fungus Fusarium acuminatum and its Activity Against Some Human Pathogenic Bacteria*. *Current Nanoscience*, Vol 4, No 2, 2008, pp. 141–4.
- [189] Servier:*Servier Medical ART 2020*. <https://smart.servier.com/> (accessed September 25, 2021).
- [190] Scherer M.D., Sposito J.C.V., Falco W.F., Grisolia A.B., Andrade L.H.C., Lima S.M., Machado G., Nascimento V.A., Gonçalves D.A., Wender H., et al.:*Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles on meristematic cells of Allium cepa roots: A close analysis of particle size dependence*. *Science of the Total Environment*, Vol 660, 2019, pp. 459–67.
- [191] Ahamed M., AlSalhi M.S., Siddiqui M.K.J.:*Silver nanoparticle applications and human health*. *Clinica Chimica Acta*, Vol 411, No 23–24, 2010, pp. 1841–8.
- [192] Luther E.M., Koehler Y., Diendorf J., Epple M., Dringen R.:*Accumulation of silver nanoparticles by cultured primary brain astrocytes*. *Nanotechnology*, Vol 22, No 37, 2011, pp. 1.
- [193] Carlson C., Hussein S.M., Schrand A.M., Braydich-Stolle L.K., Hess K.L., Jones R.L., Schlager J.J.:*Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size-dependent generation of reactive oxygen species*. *Journal of Physical Chemistry B*, Vol 112, No 43, 2008, pp. 13608–19.
- [194] Gliga A.R., Skoglund S., Odnevall Wallinder I., Fadeel B., Karlsson H.L.:*Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: The role of cellular uptake, agglomeration and Ag release*. *Particle and Fibre Toxicology*, Vol 11, No 1, 2014, pp. 1–17.
- [195] Ivask A., Kurvet I., Kasemets K., Blinova I., Aruoja V., Suppi S., Vija H., Käkinen A., Titma T., Heinlaan M., et al.:*Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro*. *PLoS ONE*, Vol 9, No 7, 2014, pp. e102108.
- [196] Kim T.H., Kim M., Park H.S., Shin U.S., Gong M.S., Kim H.W.:*Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles*. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, Vol 100 A, No 4, 2012, pp. 1033–43.
- [197] George S., Lin S., Ji Z., Thomas C.R., Li L., Mecklenburg M., Meng H., Wang X., Zhang H.,

- Xia T., et al.: *Surface defects on plate-shaped silver nanoparticles contribute to its hazard potential in a fish gill cell line and zebrafish embryos*. ACS Nano, Vol 6, No 5, 2012, pp. 3745–59.
- [198] Deepthi S., Venkatesan J., Kim S.-K., Bumgardner J.D., Jayakumar R.: *An overview of chitin or chitosan/nano ceramic composite scaffolds for bone tissue engineering*. International Journal of Biological Macromolecules, Vol 93, 2016, pp. 1338–53.
- [199] Pellá M.C.G., Lima-Tenório M.K., Tenório-Neto E.T., Guilherme M.R., Muniz E.C., Rubira A.F.: *Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications*. Carbohydrate Polymers, Vol 196, 2018, pp. 233–45.
- [200] Tyliczszak B., Drabczyk A., Kudłacik-Kramarczyk S., Bialik-Wąs K., Kijkowska R., Sobczak-Kupiec A.: *Preparation and cytotoxicity of chitosan-based hydrogels modified with silver nanoparticles*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol 160, 2017, pp. 325–30.
- [201] Nguyen N.T.P., Nguyen L.V.H., Thanh N.T., Toi V. Van, Ngoc Quyen T., Tran P.A., David Wang H.M., Nguyen T.H.: *Stabilization of silver nanoparticles in chitosan and gelatin hydrogel and its applications*. Materials Letters, Vol 248, 2019, pp. 241–5.
- [202] Shi G., Chen W., Zhang Y., Dai X., Zhang X., Wu Z.: *An Antifouling Hydrogel Containing Silver Nanoparticles for Modulating the Therapeutic Immune Response in Chronic Wound Healing*. Langmuir, Vol 35, No 5, 2019, pp. 1837–45.
- [203] Khampiang T., Wongkittithavorn S., Chairwut S., Ekabutr P., Pavasant P., Supaphol P.: *Silver nanoparticles-based hydrogel: Characterization of material parameters for pressure ulcer dressing applications*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, Vol 44, 2018, pp. 91–100.
- [204] Chabala L.F.G., Cuartas C.E.E., López M.E.L. o.: *Release behavior and antibacterial activity of chitosan/alginate blends with aloe vera and silver nanoparticles*. Marine Drugs, Vol 15, No 10, 2017, pp. 328.
- [205] Lu B., Lu F., Zou Y., Liu J., Rong B., Li Z., Dai F., Wu D., Lan G.: *In situ reduction of silver nanoparticles by chitosan-L-glutamic acid/hyaluronic acid: Enhancing antimicrobial and wound-healing activity*. Carbohydrate Polymers, Vol 173, 2017, pp. 556–65.
- [206] Ferfera-Harrar H., Berdous D., Benhalima T.: *Hydrogel nanocomposites based on chitosan-g-polyacrylamide and silver nanoparticles synthesized using Curcuma longa for antibacterial applications*. Polymer Bulletin, Vol 75, No 7, 2018, pp. 2819–46.
- [207] Venkatesan J., Lee J.-Y., Kang D.S., Anil S., Kim S.-K., Shim M.S., Kim D.G.: *Antimicrobial and anticancer activities of porous chitosan-alginate- biosynthesized silver nanoparticles*. International Journal of Biological Macromolecules, Vol 98, 2017, pp. 515–25.
- [208] Mozalewska W., Czechowska-Biskup R., Olejnik A.K., Wach R.A., Ulański P., Rosiak J.M.: *Chitosan-containing hydrogel wound dressings prepared by radiation technique*. Radiation Physics and Chemistry, Vol 134, 2017, pp. 1–7.
- [209] Gholamali I., Asnaashariisfahani M., Alipour E.: *Silver Nanoparticles Incorporated in pH-Sensitive Nanocomposite Hydrogels Based on Carboxymethyl Chitosan-Poly (Vinyl Alcohol) for Use in a Drug Delivery System*. Regenerative Engineering and Translational Medicine, Vol 6, 2019, pp. 138–153.
- [210] Hiep N.T., Khon H.C., Niem V.V.T., Toi V. Van, Quyen T.N., Hai N.D., Ngoc M., Anh T.: *Microwave-Assisted Synthesis of Chitosan / Polyvinyl Alcohol Silver Nanoparticles Gel for Wound Dressing Applications*. International Journal of Polymer Science, Vol 2016, 2016, pp. 1.
- [211] Li D., Diao J., Zhang J., Liu J.: *Fabrication of New Chitosan-Based Composite Sponge Containing Silver Nanoparticles and Its Antibacterial Properties for Wound Dressing*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, Vol 11, No 6, 2011, pp. 4733–8.
- [212] Xie Y., Liao X., Zhang J., Yang F., Fan Z.: *Novel chitosan hydrogels reinforced by silver nanoparticles with ultrahigh mechanical and high antibacterial properties for accelerating wound healing*. International Journal of Biological Macromolecules, Vol 119, 2018, pp. 402–12.

- [213] Reicha F.M., Sarhan A., Abdel-Hamid M.I., El-Sherbiny I.M.: *Preparation of silver nanoparticles in the presence of chitosan by electrochemical method*. Carbohydrate Polymers, Vol 89, No 1, 2012, pp. 236–44.
- [214] Lopez-Carrizales M., Mendoza-Mendoza E., Peralta-Rodriguez R.D., Pérez-Díaz M.A., Portales-Pérez D., Magaña-Aquino M., Aragón-Piña A., Infante-Martínez R., Barriga-Castro E.D., Sánchez-Sánchez R., et al.: *Characterization, antibiofilm and biocompatibility properties of chitosan hydrogels loaded with silver nanoparticles and ampicillin: an alternative protection to central venous catheters*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol 196, 2020, pp. 111292.
- [215] Hang A.T., Tae B., Park J.S.: *Non-woven mats of poly(vinyl alcohol)/chitosan blends containing silver nanoparticles: Fabrication and characterization*. Carbohydrate Polymers, Vol 82, No 2, 2010, pp. 472–9.
- [216] Elbarbary A.M., El-Sawy N.M.: *Radiation synthesis and characterization of polyvinyl alcohol/chitosan/silver nanocomposite membranes: antimicrobial and blood compatibility studies*. Polymer Bulletin, Vol 74, No 1, 2017, pp. 195–212.
- [217] Ueno H., Mori T., Fujinaga T.: *Topical formulations and wound healing applications of chitosan*. Advanced Drug Delivery Reviews, Vol 52, 2001, pp. 105–15.
- [218] Nguyen N.-T., Liu J.-H.: *A green method for in situ synthesis of poly(vinyl alcohol)/chitosan hydrogel thin films with entrapped silver nanoparticles*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, Vol 45, No 5, 2014, pp. 2827–33.
- [219] Ryan C., Alcock E., Buttimer F., Schmidt M., Clarke D., Pemble M., Bardosova M.: *Synthesis and characterisation of cross-linked chitosan composites functionalised with silver and gold nanoparticles for antimicrobial applications*. Science and Technology of Advanced Materials, Vol 18, No 1, 2017, pp. 528–40.
- [220] Masood N., Ahmed R., Tariq M., Ahmed Z., Masoud M.S., Ali I., Asghar R., Andleeb A., Hasan A.: *Silver nanoparticle impregnated chitosan-PEG hydrogel enhances wound healing in diabetes induced rabbits*. International Journal of Pharmaceutics, Vol 559, 2019, pp. 23–36.
- [221] Krstić J., Spasojević J., Radosavljević A., Šiljegović M., Kačarević-Popović Z.: *Optical and structural properties of radiolytically in situ synthesized silver nanoparticles stabilized by chitosan/poly(vinyl alcohol) blends*. Radiation Physics and Chemistry, Vol 96, 2014, pp. 158–66.
- [222] Yokoyama F., Masada I., Shimamura K., Ikawa T., Monobe K.: *Morphology and structure of highly elastic poly(vinyl alcohol) hydrogel prepared by repeated freezing-and-melting*. Colloid & Polymer Science, Vol 264, No 7, 1986, pp. 595–601.
- [223] Pereira A.K. dos S., Reis D.T., Barbosa K.M., Scheidt G.N., da Costa L.S., Santos L.S.S.: *Antibacterial effects and ibuprofen release potential using chitosan microspheres loaded with silver nanoparticles*. Carbohydrate Research, Vol 488, 2020, pp. 107891.
- [224] Ganesh M., Aziz A.S., Ubaidulla U., Hemalatha P., Saravanakumar A., Ravikumar R., Peng M.M., Choi E.Y., Jang H.T.: *Sulfanilamide and silver nanoparticles-loaded polyvinyl alcohol-chitosan composite electrospun nanofibers: Synthesis and evaluation on synergism in wound healing*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, Vol 39, 2016, pp. 127–35.
- [225] Pérez-Díaz M., Alvarado-Gomez E., Magaña-Aquino M., Sánchez-Sánchez R., Velasquillo C., Gonzalez C., Ganem-Rondero A., Martínez-Castañón G., Zavala-Alonso N., Martínez-Gutierrez F.: *Anti-biofilm activity of chitosan gels formulated with silver nanoparticles and their cytotoxic effect on human fibroblasts*. Materials Science and Engineering C, Vol 60, 2016, pp. 317–23.
- [226] Yang C.H., Wang L.S., Chen S.Y., Huang M.C., Li Y.H., Lin Y.C., Chen P.F., Shaw J.F., Huang K.S.: *Microfluidic assisted synthesis of silver nanoparticle–chitosan composite microparticles for antibacterial applications*. International Journal of Pharmaceutics, Vol 510, No 2, 2016, pp. 493–500.
- [227] Mekawy A.I., El-Mokhtar M.A., Nafady N.A., Yousef N., Hamad M., El-Shanawany S.M., Ibrahim E.H., Elsabahy M.: *In vitro and in vivo evaluation of biologically synthesized silver nanoparticles for topical applications: Effect of surface coating and loading into hydrogels*.

International Journal of Nanomedicine, Vol 12, 2017, pp. 759–77.

- [228] Ran L., Zou Y., Cheng J., Lu F.: *Silver nanoparticles in situ synthesized by polysaccharides from Sanghuangporus sanghuang and composites with chitosan to prepare scaffolds for the regeneration of infected full-thickness skin defects*. International Journal of Biological Macromolecules, Vol 125, 2019, pp. 392–403.
- [229] Abdallah O.M., EL-Baghdady K.Z., Khalil M.M.H., El Borhamy M.I., Meligi G.A.: *Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities of biogenic polyvinyl alcohol-silver and chitosan-silver nanocomposites*. Journal of Polymer Research, Vol 27, No 3, 2020, pp. 1–9.
- [230] Verma J., Kanoujia J., Parashar P., Tripathi C.B., Saraf S.A.: *Wound healing applications of sericin/chitosan-capped silver nanoparticles incorporated hydrogel*. Drug Delivery and Translational Research, Vol 7, No 1, 2017, pp. 77–88.
- [231] Tran H.V., Tran L.D., Ba C.T., Vu H.D., Nguyen T.N., Pham D.G., Nguyen P.X.: *Synthesis, characterization, antibacterial and antiproliferative activities of monodisperse chitosan-based silver nanoparticles*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, Vol 360, No 1–3, 2010, pp. 32–40.
- [232] Wahid F., Wang H.S., Zhong C., Chu L.Q.: *Facile fabrication of moldable antibacterial carboxymethyl chitosan supramolecular hydrogels cross-linked by metal ions complexation*. Carbohydrate Polymers, Vol 165, 2017, pp. 455–61.
- [233] Raghavendra G.M., Jung J., kim D., Seo J.: *Microwave assisted antibacterial chitosan-silver nanocomposite films*. International Journal of Biological Macromolecules, Vol 84, 2016, pp. 281–8.
- [234] Duygu Sütekin S., Güven O.: *Application of radiation for the synthesis of poly(n-vinyl pyrrolidone) nanogels with controlled sizes from aqueous solutions*. Applied Radiation and Isotopes, Vol 145, 2019, pp. 161–9.
- [235] Yang L., Meng F., Qu X., Xia L., Huang F., Qin S., Zhang M., Xu F., Sun L., Liu H.: *Multiple-twinned silver nanoparticles supported on mesoporous graphene with enhanced antibacterial activity*. Carbon, Vol 155, 2019, pp. 397–402.
- [236] Rajeshkumar S., Bharath L.V., Geetha R.: *Broad spectrum antibacterial silver nanoparticle green synthesis: Characterization, and mechanism of action*. In: Shukla AK, Irvani S, editors. Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles, Amsterdam, NL: Elsevier Inc.; 2019, p. 429–44.
- [237] Ehterami A., Salehi M., Farzamfar S., Samadian H., Vaez A., Ghorbani S., Ai J., Sahrapeyma H.: *Chitosan/alginate hydrogels containing Alpha-tocopherol for wound healing in rat model*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, Vol 51, 2019, pp. 204–13.
- [238] Helmlinger J., Prymak O., Loza K., Gocyla M., Heggen M., Epple M.: *On the Crystallography of Silver Nanoparticles with Different Shapes*. Crystal Growth and Design, Vol 16, No 7, 2016, pp. 3677–87.
- [239] Ashrafi H., Azadi A.: *Chitosan-based hydrogel nanoparticle amazing behaviors during transmission electron microscopy*. International Journal of Biological Macromolecules, Vol 84, 2016, pp. 31–4.
- [240] Murph S.E.H., Murphy C.J., Leach A., Gall K.: *A Possible Oriented Attachment Growth Mechanism for Silver Nanowire Formation*. Crystal Growth & Design, Vol 15, No 4, 2015, pp. 1968–74.
- [241] Eisa W.H., Abdel-Moneam Y.K., Shabaka A.A., Hosam A.E.M.: *In situ approach induced growth of highly monodispersed Ag nanoparticles within free standing PVA/PVP films*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, Vol 95, 2012, pp. 341–6.
- [242] Liu J., Hurt R.H.: *Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids*. Environmental Science & Technology, Vol 44, No 6, 2010, pp. 2169–75.
- [243] Chang T.Y., Chen C.C., Cheng K.M., Chin C.Y., Chen Y.H., Chen X.A., Sun J.R., Young J.J., Chiueh T.S.: *Trimethyl chitosan-capped silver nanoparticles with positive surface charge: Their catalytic activity and antibacterial spectrum including multidrug-resistant strains of*

- Acinetobacter baumannii*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol 155, 2017, pp. 61–70.
- [244] Kostic D., Vidovic S., Obradovic B.: *Silver release from nanocomposite Ag/alginate hydrogels in the presence of chloride ions: experimental results and mathematical modeling*. Journal of Nanoparticle Research, Vol 18, No 3, 2016.
- [245] Reithofer M.R., Lakshmanan A., Ping A.T.K., Chin J.M., Hauser C.A.E.: *In situ synthesis of size-controlled, stable silver nanoparticles within ultrashort peptide hydrogels and their anti-bacterial properties*. Biomaterials, Vol 35, No 26, 2014, pp. 7535–42.
- [246] Jamuna-Thevi K., Bakar S.A., Ibrahim S., Shahab N., Toff M.R.M.: *Quantification of silver ion release, in vitro cytotoxicity and antibacterial properties of nanostructured Ag doped TiO₂ coatings on stainless steel deposited by RF magnetron sputtering*. Vacuum, Vol 86, No 3, 2011, pp. 235–41.
- [247] Wang Z.L.: *Transmission Electron Microscopy of Shape-Controlled Nanocrystals and Their Assemblies*. Journal of Physical Chemistry B, Vol 104, No 6, 2002, pp. 1153–75.
- [248] Grenier J., Duval H., Barou F., Lv P., David B., Letourneur D.: *Mechanisms of pore formation in hydrogel scaffolds textured by freeze-drying*. Acta Biomaterialia, Vol 94, 2019, pp. 195–203.
- [249] Shyna S., Shantikrishna A., Nair P.D., Thomas L. V.: *A nonadherent chitosan-polyvinyl alcohol absorbent wound dressing prepared via controlled freeze-dry technology*. International Journal of Biological Macromolecules, Vol 150, 2020, pp. 129–40.
- [250] Mears L.L.E., Draper E.R., Castilla A.M., Su H., Zhuola, Dietrich B., Nolan M.C., Smith G.N., Douth J., Rogers S., et al.: *Drying Affects the Fiber Network in Low Molecular Weight Hydrogels*. Biomacromolecules, Vol 18, No 11, 2017, pp. 3531–40.
- [251] Baldino L., Concilio S., Cardea S., Reverchon E.: *Interpenetration of natural polymer aerogels by supercritical drying*. Polymers, Vol 8, No 4, 2016.
- [252] Baldino L., Zuppolini S., Cardea S., Diodato L., Borriello A., Reverchon E., Nicolais L.: *Production of biodegradable superabsorbent aerogels using a supercritical CO₂ assisted drying*. Journal of Supercritical Fluids, Vol 156, 2020, pp. 104681.
- [253] Kim S., Liu G., Minor A.M.: *FIB Sample Preparation of Polymer Thin Films on Hard Substrates Using the Shadow-FIB Method*. Microscopy Today, Vol 17, No 6, 2009, pp. 20–3.
- [254] Miyagawa H., Chiou W., Daniel I.: *TEM Sample Preparation of Polymer Based Nanocomposites Using Focused Ion Beam Technique*. Microscopy and Microanalysis-New York, Vol 7, 2001, pp. 946–947.
- [255] Abdel-Mohsen A.M., Aly A.S., Hrdina R., Montaser A.S., Hebeish A.: *Eco-Synthesis of PVA/Chitosan Hydrogels for Biomedical Application*. Journal of Polymers and the Environment, Vol 19, No 4, 2011, pp. 1005–12.
- [256] Koetting M.C., Peters J.T., Steichen S.D., Peppas N.A.: *Stimulus-responsive hydrogels: Theory, modern advances, and applications*. Materials Science and Engineering: R: Reports, Vol 93, 2015, pp. 1–49.
- [257] Krstić J., Spasojević J., Radosavljević A., Perić-Grujić A., Đurić M., Kačarević-Popović Z., Popović S.: *In vitro silver ion release kinetics from nanosilver/poly(vinyl alcohol) hydrogels synthesized by gamma irradiation*. Journal of Applied Polymer Science, Vol 2014, 2014, pp. 40321.
- [258] Ritger P.L., Peppas N.A.: *A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs*. Journal of Controlled Release, Vol 5, No 1, 1987, pp. 23–36.
- [259] Mullarney M.P., Seery T.A.P., Weiss R.A.: *Drug diffusion in hydrophobically modified N,N-dimethylacrylamide hydrogels*. Polymer, Vol 47, No 11, 2006, pp. 3845–55.
- [260] Spasojević J., Radosavljević A., Krstić J., Jovanović D., Spasojević V., Kalagasidis-Krušić M., Kačarević-Popović Z.: *Dual responsive antibacterial Ag-poly(N-isopropylacrylamide/itaconic acid) hydrogel nanocomposites synthesized by gamma irradiation*. European Polymer Journal, Vol 69, 2015, pp. 168–85.
- [261] Sun F., Nordli H.R., Pukstad B., Kristofer Gamstedt E., Chinga-Carrasco G.: *Mechanical characteristics of nanocellulose-PEG bionanocomposite wound dressings in wet conditions*.

- Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, Vol 69, 2017, pp. 377–84.
- [262] Agache P.G., Monneur C., Leveque J.L., De Rigal J.: *Mechanical properties and Young's modulus of human skin in vivo*. Archives of Dermatological Research, Vol 269, No 3, 1980, pp. 221–32.
- [263] Surudžić R., Janković A., Mitrić M., Matić I., Juranić Z.D., Živković L., Mišković-Stanković V., Rhee K.Y., Park S.J., Hui D.: *The effect of graphene loading on mechanical, thermal and biological properties of poly(vinyl alcohol)/graphene nanocomposites*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, Vol 34, 2016, pp. 250–7.
- [264] Stojkowska J., Bugarski B., Obradovic B.: *Evaluation of alginate hydrogels under in vivo-like bioreactor conditions for cartilage tissue engineering*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, Vol 21, No 10, 2010, pp. 2869–79.
- [265] Riss T.L., Moravec R.A., Niles A.L., Duellman S., Benink H.A., Worzella T.J., Minor L.: Cell Viability Assays. In: Sittampalam G, Grossman A, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004, p. 1–25.
- [266] Schumacher A., Vranken T., Malhotra A., Arts J.J.C., Habibovic P.: *In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Vol 37, No 2, 2018, pp. 187–208.
- [267] Turnidge J.D.: Susceptibility Test Methods: General Considerations. In: Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G, Pfaller MA, Landry ML, Richter SS, Warnock DW, editors. Manual of Clinical Microbiology. 11th ed., Washington D.C.: ASM Press; 2015, p. 1246–52.
- [268] Jorgensen J.H., Turnidge J.D.: Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods. In: Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G, Pfaller MA, Landry ML, Richter SS, Warnock DW, editors. Manual of Clinical Microbiology. 11th ed., Washington D.C.: ASM Press; 2015, p. 1253–73.
- [269] Taylor T.A., Unakal C.G.: *Staphylococcus Aureus*. [Updated 2019 Mar 27]. In: StatPearls [Internet] Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/> (accessed January 16, 2020).
- [270] Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., et al.: *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nature Methods, Vol 9, No 7, 2012, pp. 676–82.
- [271] Schindelin J., Rueden C.T., Hiner M.C., Eliceiri K.W.: *The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis*. Molecular Reproduction and Development, Vol 82, No 7–8, 2015, pp. 518–29.
- [272] Phillips H.J.: Dye Exclusion Tests for Cell Viability. In: Kruse PJ, Patterson MJ, editors. Tissue Culture: Methods and Applications, vol. 678, Cambridge, MA: Academic Press, Inc.; 1973, p. 406–8.
- [273] Fukumori T., Nakaoki T.: *High-tensile-strength polyvinyl alcohol films prepared from freeze/thaw cycled gels*. Journal of Applied Polymer Science, Vol 131, No 15, 2014, pp. 1–8.
- [274] Hassan C.M., Peppas N.A.: *Structure and Applications of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods*. Advances in Polymer Science, Vol 153, 2000, pp. 37–65.
- [275] Hoffmann B., Seitz D., Mencke A., Kokott A., Ziegler G.: *Glutaraldehyde and oxidised dextran as crosslinker reagents for chitosan-based scaffolds for cartilage tissue engineering*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, Vol 20, No 7, 2009, pp. 1495–503.
- [276] Maitra J., Shukla V.K.: *Cross-linking in Hydrogel - A Review*. American Journal of Polymer Science, Vol 4, No 2, 2014, pp. 25–31.
- [277] Obradovic B., Stojkowska J., Jovanovic Z., Miskovic-Stankovic V.: *Novel alginate based nanocomposite hydrogels with incorporated silver nanoparticles*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, Vol 23, No 1, 2012, pp. 99–107.
- [278] Figueroa-Pizano M.D., Vélaz I., Peñas F.J., Zavala-Rivera P., Rosas-Durazo A.J., Maldonado-Arce A.D., Martínez-Barbosa M.E.: *Effect of freeze-thawing conditions for preparation of*

- chitosan-poly (vinyl alcohol) hydrogels and drug release studies*. Carbohydrate Polymers, Vol 195, 2018, pp. 476–85.
- [279] Kawanishi K., Komatsu M., Inoue T.: *Thermodynamic consideration of the sol-gel transition in polymer solutions*. Polymer, Vol 28, No 6, 1987, pp. 980–4.
- [280] Nešović K., Kojić V., Rhee K.Y., Mišković-Stanković V.: *Electrochemical synthesis and characterization of silver doped poly(vinyl alcohol)/chitosan hydrogels*. Corrosion, Vol 73, No 12, 2017, pp. 1437–47.
- [281] Nešović K., Janković A., Perić-Grujić A., Vukašinović-Sekulić M., Radetić T., Živković L., Park S.J., Yop Rhee K., Mišković-Stanković V.: *Kinetic models of swelling and thermal stability of silver/poly(vinyl alcohol)/chitosan/graphene hydrogels*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, Vol 77, 2019, pp. 83–96.
- [282] Nešović K., Janković A., Kojić V., Vukašinović-Sekulić M., Perić-Grujić A., Rhee K.Y., Mišković-Stanković V.: *Silver/poly(vinyl alcohol)/chitosan/graphene hydrogels – Synthesis, biological and physicochemical properties and silver release kinetics*. Composites Part B: Engineering, Vol 154, 2018, pp. 175–85.
- [283] Nešović K., Janković A., Radetić T., Vukašinović-Sekulić M., Kojić V., Živković L., Perić-Grujić A., Rhee K.Y., Mišković-Stanković V.: *Chitosan-based hydrogel wound dressings with electrochemically incorporated silver nanoparticles – In vitro study*. European Polymer Journal, Vol 121, 2019, pp. 109257.
- [284] Merga G., Wilson R., Lynn G., Milosavljevic B.H., Meisel D.: *Redox catalysis on “naked” silver nanoparticles*. Journal of Physical Chemistry C, Vol 111, No 33, 2007, pp. 12220–6.
- [285] Wang Y., Ren J., Li H., Deng M.: *Effect of hydrogen reduction of silver ions on the performance and structure of new solid polymer electrolyte PEI/Pebax2533/AgBF₄ composite membranes*. Chinese Journal of Chemical Engineering, Vol 21, No 6, 2013, pp. 683–90.
- [286] Wang T.C., Rubner M.F., Cohen R.E.: *Polyelectrolyte multilayer nanoreactors for preparing silver nanoparticle composites: Controlling metal concentration and nanoparticle size*. Langmuir, Vol 18, No 8, 2002, pp. 3370–5.
- [287] Xu X., Yang Q., Wang Y., Yu H., Chen X., Jing X.: *Biodegradable electrospun poly(l-lactide) fibers containing antibacterial silver nanoparticles*. European Polymer Journal, Vol 42, No 9, 2006, pp. 2081–7.
- [288] Evanoff D.D., Chumanov G.: *Size-controlled synthesis of nanoparticles. 1. “silver-only” aqueous suspensions via hydrogen reduction*. Journal of Physical Chemistry B, Vol 108, No 37, 2004, pp. 13948–56.
- [289] Biswas D.P., O’Brien-Simpson N.M., Reynolds E.C., O’Connor A.J., Tran P.A.: *Comparative study of novel in situ decorated porous chitosan-selenium scaffolds and porous chitosan-silver scaffolds towards antimicrobial wound dressing application*. Journal of Colloid and Interface Science, Vol 515, 2018, pp. 78–91.
- [290] Yuan B., Guo J., Bai S.: *In situ thermally induced reduction of silver nitrate by polyvinyl alcohol to prepare a three-dimensional porous Ag substrate with excellent adsorption and surface-enhanced Raman scattering properties*. Journal of Materials Chemistry C, Vol 8, No 19, 2020, pp. 6478–87.
- [291] Díaz-Cruz C., Alonso Nuñez G., Espinoza-Gómez H., Flores-López L.Z.: *Effect of molecular weight of PEG or PVA as reducing-stabilizing agent in the green synthesis of silver-nanoparticles*. European Polymer Journal, Vol 83, 2016, pp. 265–77.
- [292] Sagitha P., Sarada K., Muraleedharan K.: *One-pot synthesis of poly vinyl alcohol (PVA) supported silver nanoparticles and its efficiency in catalytic reduction of methylene blue*. Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition), Vol 26, No 10, 2016, pp. 2693–700.
- [293] Huang S.J., Wang I., Quinga E.: *Poly (Enol–Ketone) from the Oxidation of Poly (Vinyl Alcohol)*. In: Carraher CE, Moore JA, editors. Modification of Polymers. Polymer Science and Technology, Boston, MA.: Springer; 1983, p. 75–83.
- [294] Zimin Y.S., Borisov I.M., Borisova N.S., Mustafin A.G.: *Oxidation and destruction of polyvinyl*

- alcohol in the aqueous phase*. International Journal of Chemical Kinetics, Vol 45, No 12, 2013, pp. 821–31.
- [295] Huang H., Yuan Q., Yang X.: *Preparation and characterization of metal-chitosan nanocomposites*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol 39, No 1–2, 2004, pp. 31–7.
- [296] Mandal S., Gole A., Lala N., Gonnade R., Ganvir V., Sastry M.: *Studies on the Reversible Aggregation of Cysteine-Capped Colloidal Silver Particles Interconnected via Hydrogen Bonds*. Studies on the Reversible Aggregation of Cysteine-Capped Colloidal Silver Particles Interconnected via Hydrogen. Assembly, No 12, 2001, pp. 6262–8.
- [297] Zheng J., Stevenson M.S., Hikida R.S., Van Patten P.G.: *Influence of pH on dendrimer-protected nanoparticles*. Journal of Physical Chemistry B, Vol 106, No 6, 2002, pp. 1252–5.
- [298] Martinez-Castanon G.A., Niño-Martínez N., Martínez-Gutierrez F., Martínez-Mendoza J.R., Ruiz F.: *Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes*. Journal of Nanoparticle Research, Vol 10, No 8, 2008, pp. 1343–8.
- [299] Huang H., Yang X.: *Synthesis of chitosan-stabilized gold nanoparticles in the absence/presence of tripolyphosphate*. Biomacromolecules, Vol 5, No 6, 2004, pp. 2340–6.
- [300] Sirelkhatim A., Mahmud S., Seeni A., Kaus N.H.M., Ann L.C., Bakhori S.K.M., Hasan H., Mohamad D.: *Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism*. Nano-Micro Letters, Vol 7, No 3, 2015, pp. 219–42.
- [301] Lakshmi Prasanna V., Vijayaraghavan R.: *Insight into the Mechanism of Antibacterial Activity of ZnO: Surface Defects Mediated Reactive Oxygen Species even in the Dark*. Langmuir, Vol 31, No 33, 2015, pp. 9155–62.
- [302] Banerjee M., Mallick S., Paul A., Chattopadhyay A., Ghosh S.S.: *Heightened reactive oxygen species generation in the antimicrobial activity of a three component iodinated chitosan-silver nanoparticle composite*. Langmuir, Vol 26, No 8, 2010, pp. 5901–8.
- [303] Xu H., Qu F., Xu H., Lai W., Wang Y.A., Aguilar Z.P., Wei H.: *Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli O157:H7*. BioMetals, Vol 25, No 1, 2012, pp. 45–53.
- [304] Liu R., Xu X., Zhuang X., Cheng B.: *Solution blowing of chitosan / PVA hydrogel nanofiber mats*. Carbohydrate Polymers, Vol 101, 2014, pp. 1116–21.
- [305] Ma X., Su Y., Sun Q., Wang Y., Jiang Z.: *Enhancing the antifouling property of polyethersulfone ultrafiltration membranes through surface adsorption-crosslinking of poly(vinyl alcohol)*. Journal of Membrane Science, Vol 300, No 1–2, 2007, pp. 71–8.
- [306] Lawrie G., Keen I., Drew B., Chandler-Temple A., Rintoul L., Fredericks P., Grøndahl L.: *Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS*. Biomacromolecules, Vol 8, No 8, 2007, pp. 2533–41.
- [307] Biesinger M.C.: *N 1s for Organic Nitrogen Species*. X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) Reference Pages, 2020. <http://www.xpsfitting.com/search/label/Nitrogen> (accessed January 16, 2021).
- [308] Yang X., Tu Y., Li L., Shang S., Tao X.M.: *Well-dispersed chitosan/graphene oxide nanocomposites*. ACS Applied Materials and Interfaces, Vol 2, No 6, 2010, pp. 1707–13.
- [309] Wu M., Yang B., Lv Y., Fu Z., Xu J., Guo T., Zhao Y.: *Efficient one-pot synthesis of Ag nanoparticles loaded on N-doped multiphase TiO₂ hollow nanorod arrays with enhanced photocatalytic activity*. Applied Surface Science, Vol 256, No 23, 2010, pp. 7125–30.
- [310] Joshi A.C., Markad G.B., Haram S.K.: *Rudimentary simple method for the decoration of graphene oxide with silver nanoparticles: Their application for the amperometric detection of glucose in the human blood samples*. Electrochimica Acta, Vol 161, 2015, pp. 108–14.
- [311] Song J.Y., Kim B.S.: *Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts*. Bioprocess and Biosystems Engineering, Vol 32, No 1, 2009, pp. 79–84.
- [312] Larrude D.G., Maia da Costa M.E.H., Freire F.L.J.: *Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticle-Multiwalled Carbon Nanotube Composites*. Journal of Nanomaterials, Vol 2014, 2014, pp. 1–7.
- [313] Wagner C.D., Davis L.E., Zeller M. V., Taylor J.A., Raymond R.H., Gale L.H.: *Empirical*

- atomic sensitivity factors for quantitative analysis by electron spectroscopy for chemical analysis*. Surface and Interface Analysis, Vol 3, No 5, 1981, pp. 211–25.
- [314] Stuart B.H.: *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Ltd; 2004.
- [315] Sharma P., Mathur G., Dhakate S.R., Chand S., Goswami N., Sharma S.K., Mathur A.: *Evaluation of physicochemical and biological properties of chitosan/poly (vinyl alcohol) polymer blend membranes and their correlation for Vero cell growth*. Carbohydrate Polymers, Vol 137, 2016, pp. 576–83.
- [316] Mayo D., Miller F., Hannah R.: *Course Notes On The Interpretation Of Infrared And Raman Spectra*. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons Ltd; 2003.
- [317] Miya M., Iwamoto R., Mima S.: *FT-IR study of intermolecular interactions in polymer blends*. Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition, Vol 22, No 6, 1984, pp. 1149–51.
- [318] Ferrari A.C., Meyer J.C., Scardaci V., Casiraghi C., Lazzeri M., Mauri F., Piscanec S., Jiang D., Novoselov K.S., Roth S., et al.: *Raman spectrum of graphene and graphene layers*. Physical Review Letters, Vol 97, No 18, 2006, pp. 1–4.
- [319] Ni Z., Wang Y., Yu T., Shen Z.: *Raman spectroscopy and imaging of graphene*. Nano Research, Vol 1, No 4, 2008, pp. 273–91.
- [320] Zajac A., Hanuza J., Wandas M., Dymińska L.: *Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy*. Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, Vol 134, 2015, pp. 114–20.
- [321] Badr Y.A., Abd El-Kader K.M., Khafagy R.M.: *Raman spectroscopy study of CdS, PVA composite films*. Journal of Applied Polymer Science, Vol 92, No 3, 2004, pp. 1984–92.
- [322] Badr Y., Mahmoud M.A.: *Manifestation of the silver nanoparticles incorporated into the poly vinyl alcohol matrices*. Journal of Materials Science, Vol 41, No 12, 2006, pp. 3947–53.
- [323] Zhang K., Peschel D., Helm J., Groth T., Fischer S.: *FT Raman investigation of novel chitosan sulfates exhibiting osteogenic capacity*. Carbohydrate Polymers, Vol 83, No 1, 2011, pp. 60–5.
- [324] Souza N.L.G.D., Salles T.F., Brandão H.M., Edwards H.G.M., Oliveira L.F.C. de, Souza N.L.G.D., Salles T.F., Brandão H.M., Edwards H.G.M., Oliveira L.F.C. de: *Synthesis, Vibrational Spectroscopic and Thermal Properties of Oxocarbon Cross-Linked Chitosan*. Journal of the Brazilian Chemical Society, Vol 26, No 6, 2015, pp. 1247–56.
- [325] Wang T., Gunasekaran S.: *State of water in chitosan-PVA hydrogel*. Journal of Applied Polymer Science, Vol 101, No 5, 2006, pp. 3227–32.
- [326] Neto C.G.T., Giacometti J.A., Job A.E., Ferreira F.C., Fonseca J.L.C., Pereira M.R.: *Thermal analysis of chitosan based networks*. Carbohydrate Polymers, Vol 62, No 2, 2005, pp. 97–103.
- [327] Zawadzki J., Kaczmarek H.: *Thermal treatment of chitosan in various conditions*. Carbohydrate Polymers, Vol 80, No 2, 2010, pp. 395–401.
- [328] Koosha M., Mirzadeh H.: *Electrospinning, mechanical properties, and cell behavior study of chitosan/PVA nanofibers*. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, Vol 103, No 9, 2015, pp. 3081–93.
- [329] Mucha M., Pawlak A.: *Thermal analysis of chitosan and its blends*. Thermochimica Acta, Vol 427, No 1–2, 2005, pp. 69–76.
- [330] Tanpichai S., Oksman K.: *Cross-linked nanocomposite hydrogels based on cellulose nanocrystals and PVA: Mechanical properties and creep recovery*. Composites Part A: Applied Science and Manufacturing, Vol 88, 2016, pp. 226–33.
- [331] An Q., Beh C., Xiao H.: *Preparation and characterization of thermo-sensitive poly(vinyl alcohol)-based hydrogel as drug carrier*. Journal of Applied Polymer Science, Vol 131, No 1, 2014, pp. 1–9.
- [332] Yang J.M., Su W.Y., Leu T.L., Yang M.C.: *Evaluation of chitosan/PVA blended hydrogel membranes*. Journal of Membrane Science, Vol 236, No 1–2, 2004, pp. 39–51.
- [333] Neelgund G.M., Oki A., Luo Z.: *In situ deposition of hydroxyapatite on graphene nanosheets*. Materials Research Bulletin, Vol 48, No 2, 2013, pp. 175–9.
- [334] Khanna P.K., Singh N., Charan S., Subbarao V.V.V.S., Gokhale R., Mulik U.P.: *Synthesis and*

- characterization of Ag/PVA nanocomposite by chemical reduction method.* Materials Chemistry and Physics, Vol 93, No 1, 2005, pp. 117–21.
- [335] Feng H., Feng Z., Shen L.: *A high resolution solid-state n.m.r. and d.s.c. study of miscibility and crystallization behaviour of poly(vinyl alcohol)/poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) blends.* Polymer, Vol 34, No 12, 1993, pp. 2516–9.
- [336] Peppas N.A., Merrill E.W.: *Differential scanning calorimetry of crystallized PVA hydrogels.* Journal of Applied Polymer Science, Vol 20, No 6, 1976, pp. 1457–65.
- [337] Sudhamani S.R., Prasad M.S., Udaya Sankar K.: *DSC and FTIR studies on Gellan and polyvinyl alcohol (PVA) blend films.* Food Hydrocolloids, Vol 17, No 3, 2003, pp. 245–50.
- [338] Wang S.F., Shen L., Zhang W. De, Tong Y.J.: *Preparation and mechanical properties of chitosan/carbon nanotubes composites.* Biomacromolecules, Vol 6, No 6, 2005, pp. 3067–72.
- [339] Ge Z., Jin Z., Fan H., Zhao K., Wang L., Shi Z., Li N.: *Fabrication, Mechanical Properties, and Biocompatibility of Graphene-Reinforced Chitosan Composites.* Biomacromolecules, Vol 11, No 9, 2010, pp. 2345–51.
- [340] Ritger P.L., Peppas N.A.: *A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices.* Journal of Controlled Release, Vol 5, No 1, 1987, pp. 37–42.
- [341] Yao K. De, Peng T., Feng H.B., He Y.Y.: *Swelling kinetics and release characteristic of crosslinked chitosan: Polyether polymer network (semi-IPN) hydrogels.* Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, Vol 32, No 7, 1994, pp. 1213–23.
- [342] Yang X., Liu Q., Chen X., Yu F., Zhu Z.: *Investigation of PVA/ws-chitosan hydrogels prepared by combined γ -irradiation and freeze-thawing.* Carbohydrate Polymers, Vol 73, No 3, 2008, pp. 401–8.
- [343] Pais J.: *Intuiting Mathematical Objects Using Diagrams and Kinetigrams.* Journal of Online Mathematics and Its Applications, Vol 1, No 2, 2001.
- [344] Makoid M.C., Dufour A., Banakar U. V.: *Modelling of dissolution behaviour of controlled release systems.* STP Pharma Pratiques, Vol 3, No 1, 1993, pp. 49–58.
- [345] Korsmeyer R.W., Gurny R., Doelker E., Buri P., Peppas N.A.: *Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers.* International Journal of Pharmaceutics, Vol 15, No 1, 1983, pp. 25–35.
- [346] Kopcha M., Lordi N.G., Tojo K.J.: *Evaluation of Release from Selected Thermosoftening Vehicles.* Journal of Pharmacy and Pharmacology, Vol 43, No 6, 1991, pp. 382–7.
- [347] Kopcha M., Tojo K.J., Lordi N.G.: *Evaluation of Methodology for Assessing Release Characteristics of Thermosoftening Vehicles.* Journal of Pharmacy and Pharmacology, Vol 42, No 11, 1990, pp. 745–51.
- [348] No H.K., Park N.Y., Lee S.H., Meyers S.P.: *Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights.* International Journal of Food Microbiology, Vol 74, No 1–2, 2002, pp. 65–72.
- [349] Potara M., Jakab E., Damert A., Popescu O., Canpean V., Astilean S.: *Synergistic antibacterial activity of chitosan-silver nanocomposites on Staphylococcus aureus.* Nanotechnology, Vol 22, No 13, 2011, pp. 135101.
- [350] Percival S.L., Hill K.E., Williams D.W., Hooper S.J., Thomas D.W., Costerton J.W.: *A review of the scientific evidence for biofilms in wounds.* Wound Repair and Regeneration, Vol 20, No 5, 2012, pp. 647–57.
- [351] Stevanović M., Došić M., Janković A., Kojić V., Vukašinović-Sekulić M., Stojanović J., Odović J., Crevar Sakač M., Rhee K.Y., Misković-Stanković V.: *Gentamicin-Loaded Bioactive Hydroxyapatite/Chitosan Composite Coating Electrodeposited on Titanium.* ACS Biomaterials Science and Engineering, Vol 4, No 12, 2018, pp. 3994–4007.
- [352] Rabea E.I., Badawy M.E.-T., Stevens C. V., Smagghe G., Steurbaut W.: *Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action.* Biomacromolecules, Vol 4, No 6, 2003, pp. 1457–65.
- [353] Kong M., Chen X.G., Liu C.S., Liu C.G., Meng X.H., Yu L.J.: *Antibacterial mechanism of*

- chitosan microspheres in a solid dispersing system against E. coli*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol 65, No 2, 2008, pp. 197–202.
- [354] Sjögren G., Sletten G., Dahl J.E.: *Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by Millipore filter, agar overlay, and MTT tests*. Journal of Prosthetic Dentistry, Vol 84, No 2, 2000, pp. 229–36.
- [355] Liao K.H., Lin Y.S., MacOsco C.W., Haynes C.L.: *Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts*. ACS Applied Materials and Interfaces, Vol 3, No 7, 2011, pp. 2607–15.
- [356] Je J.Y., Cho Y.S., Kim S.K.: *Cytotoxic activities of water-soluble chitosan derivatives with different degree of deacetylation*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, Vol 16, No 8, 2006, pp. 2122–6.
- [357] Park E.J., Bae E., Yi J., Kim Y., Choi K., Lee S.H., Yoon J., Lee B.C., Park K.: *Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles*. Environmental Toxicology and Pharmacology, Vol 30, No 2, 2010, pp. 162–8.

BIOGRAFIJA KANDIDATA

Katarina Nešović je rođena 24.11.1992. u Beogradu. Završila je Matematičku gimnaziju u Beogradu, a zatim i osnovne i master akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu (TMF) Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Hemijsko inženjerstvo (izborno područje Elektrohemijsko inženjerstvo). Doktorske studije je upisala školske 2016/17. godine na TMF, na studijskom programu Hemijsko inženjerstvo. Od novembra 2016. zaposlena je u Inovacionom centru TMF. Bila je angažovana na projektu „Sinteza, razvoj tehnologija dobijanja i primena nanostrukturnih multifunkcionalnih materijala definisanih svojstava” (III45019) (2016-2019.), kao i na COST akciji TD1305-Improved Protection of Medical Devices Against Infection (iPROMEDAI) (2016-2018.). Učestvovala je i u projektima promocije nauke i TMF „Zavirite u elektrohemijsku ćeliju 1 i 2” (2019-2021.) i „Tech Case Study” (2020., 2021.). Na Katedri za fizičku hemiju i elektrohemiju TMF je bila angažovana u izvođenju nastave iz predmeta Fizička hemija 1 i 2 i Nemetalne prevlake na osnovnim i master studijama u periodu 2016-2021. godine. Učestvovala je u izradi četiri završna i tri master rada, kao i jedne doktorske disertacije. Do sada je objavila 14 radova u međunarodnim naučnim časopisima (12 kategorije M20, 2 van SCI liste), deset saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima (M34) i devet na nacionalnim (M64). Iz oblasti doktorske disertacije proisteklo je sedam naučnih radova (1M21a, 3M21, 1M22, 2 van SCI), na kojima je kandidat prvi autor. Takođe je recenzirala 17 naučnih radova u međunarodnim časopisima. Član je Srpskog hemijskog društva i Međunarodnog društva elektrohemije. Govori engleski i ruski jezik, služi se italijanskim i francuskim.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Име и презиме аутора Катарина Нешовић

Број индекса 4002/16

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Хидрогелови поливинил-алкохола и хитозана са електрохемијски синтетисаним наночестицама сребра за медицинске примене”

- 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, 20.05.2021.

Потпис аутора

Катарина Нешовић

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКОГ РАДА

Име и презиме аутора Катарина Нешовић

Број индекса 4002/16

Студијски програм Хемијско инжењерство

Наслов рада Хидрогелови поливинил-алкохола и хитозана са електрохемијски синтетисаним наночестицама сребра за медицинске примене

Ментор проф. др Весна Мишковић-Станковић

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 20.05.2021.



ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

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

„Хидрогелови поливинил-алкохола и хитозана са електрохемијски синтетисаним наночестицама сребра за медицинске примене”

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 20.05.2021.

Јаткарица Јекович

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

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 „Хидрогелови поливинил-алкохола и хитозана са електрохемијски синтетисаним наночестицама сребра за медицинске примене”, аутора Катарине Нешовић, констатујем да утврђено подударане текста износи 14 %. Овај степен подударности последица је општих места, личних имена и назива, дефиниција, устаљених фразе и стручних термина и израза, као што су називи инструмената и техника на српском и енглеском језику. Осим тога, део подударности обухвата и податке и називе/номенклатуру узорака из претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из ове докторске дисертације и чине њен саставни део, што је усклађено 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, 22.04.2021. године

Ментор


проф. др Весна Мишковић-Станковић