

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Božana M. Čolović

**BIOMIMIČNO DIZAJNIRANJE NOSAČA
NA BAZI HIDROKSIAPATITA U CILJU
INKAPSULACIJE ANTIBIOTIKA SA
KONTROLISANIM OTPUŠTANJEM**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

BELGRADE UNIVERSITY
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Božana M. Čolović

**BIOMIMETIC DESIGNING OF
SCAFFOLDS BASED ON
HYDROXYAPATITE FOR
ENCAPSULATION OF ANTIBIOTICS
WITH CONTROLLED RELEASE**

PhD thesis

Belgrade, 2012

Mentor:

dr Branko Bugarski, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Članovi komisije:

dr Vukoman Jokanović, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke „Vinča“

dr Nevenka Bošković-Vragolović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

dr Srđan Pejanović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Datum odbrane: _____

Biomimično dizajniranje nosača na bazi hidroksiapatita u cilju inkapsulacije antibiotika sa kontrolisanim otpuštanjem

Rezime

Predmet ove doktorske disertacije proističe iz aktuelne problematike inženjerstva koštanog tkiva, vezane za procese osteointegracije, implantiranja, kao i rešavanja problema inflamacije na mestima ugradnje implanata.

Prvi deo disertacije posvećen je problemima vezanim za biokompatibilnost i osteointegraciju materijala koji se koriste kao implanti u inženjerstvu koštanog tkiva. S tim u vezi, ispitivano je formiranje bioaktivnih prevlaka kalcijum hidroksiapatita (HAP) na površini dve vrste potencijalnih implanata: metalnih i keramičkih, biomimičnom metodom. Ova metoda je pogodna jer omogućava dobijanje HAP-a sličnih strukturnih i morfoloških karakteristika kao prirodna kost. Zasnovana je na korišćenju rastvora sličnog jonskog sastava kao krvna plazma (poznatih kao simulirajući telesni fluidi-STF) pa su i uslovi nukleacije HAP-a slični uslovima nukleacije u biološkim sistemima. Površina metala (nerđajući čelik) prethodno je aktivirana nabacivanjem tankog sloja silicijum dioksida, sa ugrađenim OH grupama koje služe kao aktivni centri heterogene nukleacije apatita. Keramički supstrat- porozni HAP tretiran je u biomimičnom medijumu u cilju unapređenja nanotopologije unutrašnjih zidova poroznog nosača koja je optimalna za rast i aktivaciju ćelija koštanog tkiva. Tri različita polimera (PLGA, celuloza i alginat) korišćena su za funkcionalizaciju zidova poroznog nosača radi njegovog dodatnog nanodizajniranja i povećanja njegove aktivnosti na površini. STF, kao i STF kombinovan sa serumom iz fetusa govečeta i Iglovim medijumom korišćeni su kao bioaktivni tečni medijumi u kojima se odvija biomimična nukleacija apatita.

Analizom faza formiranih u biomimičnom medijumu, metodom difrakcije X-zraka, potvrđeno je da je HAP formiran na površini svih uzoraka. Infracrvenom spektroskopijom je utvrđeno da se radi o HAP-u blago promenjene stehiometrije. Mikroskopija atomskih sila ukazala je na mehanizam nukleacije, dok je skenirajuća elektronska mikroskopija ukazala na morfologiju nukleirane faze. Merenjema mase, uz korekcije zapremine urađene BET metodom, pokazano je da debljina filma nukleiranog

HAP-a zavisi od vremena boravka uzoraka u biomimičnom medijumu, kao i od vrste izabranog biomimičnog medijuma. Ispitana je i bioprihvatljivost ovih materijala u *in vitro* i *in vivo* uslovima, pri čemu su dobijeni veoma dobri rezultati.

U drugom delu disertacije pažnja je usmerena ka iznalaženju rešenja za probleme učestalih inflamacija koje se javljaju prilikom ugradnje implanata, kao i za tretiranje oboljenja koštanog tkiva na lokalnom nivou, kontrolisanim otpuštanjem leka na obolelo mesto. Cilj je da se razvije takav implantni materijal koji će imati odgovarajuće osobine osteokondukcije i osteoindukcije i istovremeno oslobađati biološki aktivne molekule na međupovršinu živog tkiva i implanta. Veliki potencijal za takvu primenu pokazao je hidroksiapatit koji je jedan od najzastupljenijih materijala u inženjerstvu koštanog tkiva, zbog čega je i izabran kao model-sistem za ispitivanje kinetike otpuštanja antibiotika koji se koriste za lečenje infekcija koštanog tkiva. Antibiotici su inkapsulirani u dva različita sistema: u polimer koji je zatim deponovan na porozni apatitni nosač i u tablete dobijene kompresijom praškastog apatita. Pored apatitnih nosača, kreiran je i nosač za kontrolisano otpuštanje lekova na bazi SiO₂, i to metodom sprej sušenja koja omogućava dobijanje SiO₂ čestica složenog strukturnog dizajna uz istovremenu imobilizaciju leka na česticama. Zatim je praćena brzina otpuštanja antibiotika iz ovih sistema. Utvrđeno je da pogodno dizajnirani porozni nosači mogu zadržati lek dovoljno dugo vremena da bi se kontrolisao proces lokalne inflamacije.

Ključne reči: biomimetika, porozni hidroksiapatni nosač, SiO₂, nosači lekova, kinetika otpuštanja lekova

Naučna oblast: Prirodno-matematička

Uža naučna oblast: Hemija i hemijska tehnologija

UDK broj: 615.33 : 616-003.94 : 66.097.8

Biomimetic designing of scaffolds based on hydroxyapatite for encapsulation of antibiotics with controlled release

Summary

The subject of this PhD thesis is derived from current problems of bone tissue engineering, related to processes of osteointegration, implantation and resolution of the problems arising from the implantation site inflammation.

The first part of the thesis examines problems of biocompatibility and osteointegration of materials used as implants in bone tissue engineering. Thus, the formation of bioactive coatings of calcium hydroxyapatite (CHA) on two potential types of implants, metal and ceramic, using biomimetic method, was investigated. This method is appropriate because it enables formation of CHA with similar structural and morphological properties of a natural bone. It is based on the use of the solution of similar ionic composition as human plasma (they are known as simulated body fluids-SBF) and the conditions of CHA nucleation are similar to the conditions found in biological systems. The metal surface (stainless steel) was previously activated by spraying with the thin silica film, with OH groups that act as active centers of heterogeneous nucleation of apatite. Ceramic substrate- porous CHA scaffold was treated in biomimetic medium in order to improve nanotopology of scaffold inner walls, optimal for growth and activation of bone tissue cells. Three different polymers (PLGA, cellulose and alginate) were used for the functionalization of the scaffold walls in order to achieve its additional nanodesigning and increase of its surface activity. SBF, as well as the SBF combined with fetal calf serum and Eagle's minimal essential medium, were used as bioactive liquid medium, where biomimetic nucleation of apatite occurs.

The analysis of the phases formed in the biomimetic medium, using X ray diffraction method, confirmed that CHA was formed on the surface of all samples. Infrared spectroscopy showed that this is CHA of slightly shifted stoichiometry. Atomic force microscopy pointed the mechanism of nucleation, while scanning electron microscopy showed the morphology of nucleated phases. Mass measurements, with volume corrections made using the BET method, showed that the thickness of nucleated CHA film depends on the aging time of samples in SBF and the type of selected

biomimetic medium. Also, bio-acceptability of these materials was investigated *in vitro* and *in vivo* and very good results were obtained.

The second part of the thesis focuses on resolving the problem of frequent inflammation that occurs during implantation, as well as the problem of local treatment of bone tissue diseases, using controlled drug delivery to the affected area. The goal is to develop such an implant material that will have required osteoinductive and osteoconductive properties and simultaneously release biologically active molecules at the interface of living tissue and the implant. Hydroxyapatite, as the one of the most common materials in bone tissue engineering, showed a great potential for this applications, and therefore it was chosen as a model system to study release kinetics of antibiotics that are used in treatments of bone tissue infections. Antibiotics were encapsulated in two different systems: in the polymer that was later incorporated in CHA scaffold and tablets obtained by compression of apatite powder. Besides apatite carriers, carrier for controlled drug delivery based on SiO₂ was also created, using the spray drying method that allows obtaining the SiO₂ particles of complex structural design with simultaneous drug immobilization on these particles. Afterwards, the release rate of antibiotics from these systems was measured. It was concluded that suitably designed porous carriers can sustain a drug long enough to control the process of local inflammation.

Key words: biomimetics, hydroxyapatite scaffold, SiO₂, drug carriers, drug release kinetics

Scientific field: Natural sciences and mathematics

Specialized scientific field: Chemistry and chemical technology

UDC number: 615.33 : 616-003.94 : 66.097.8

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Biomimična mineralizacija	1
1.1.1. Simulirajući telesni fluid	1
1.1.2. Primena biomimične metode za dobijanje bioaktivnih prevlaka	4
1.1.2.1. Bioaktivne prevlake na metalnim implantima	4
1.1.2.2. Biomimična metoda i dizajniranje poroznih nosača	5
1.2. Kontrolisano otpuštanje lekova u inženjerstvu koštanog tkiva.....	8
1.2.1. Materijali u inženjerstvu koštanog tkiva	8
1.2.2. Značaj kontrolisanog otpuštanja lekova u inženjerstvu koštanog tkiva.....	10
1.2.3. Hidroksiapatit	11
1.2.3.1. Hidroksiapatit kao nosač lekova	12
1.2.4. Polimeri u inženjerstvu koštanog tkiva	13
1.2.5. Silicijum dioksid	14
1.2.6. Antibiotici za lečenje infekcija koštanog tkiva	15
1.2.7. Kinetika otpuštanja lekova- najčešći pristupi	19
1.2.8. Teorijski model dizajniranja nanosistema dobijenih u periodičnom ultrazvučnom polju.....	22
1.2.8.1. Predviđanje veličine kapljica i čestica	22
1.2.8.2. Predviđanje veličine sub-kapljica i sub-čestica	23
1.2.8.3. Predviđanje veličine pora	24
Cilj disertacije.....	25
2. MATERIJALI I METODE	26
2.1. Biomimična metoda	26
2.1.1. Priprema supstrata	26
2.1.1.1. Priprema metalnog supstrata	26
2.1.1.2. Priprema keramičkog supstrata	27
2.1.2. Priprema biomimičnog medijuma	28
2.1.3. Formiranje sloja biomimičnog HAP-a	28
2.2. Kontrolisano otpuštanje antibiotika	29
2.2.1. Materijali	29

2.2.2. Inkapsulacija antibiotika	29
2.2.2.1. Inkapsulacija antibiotika u polimer	29
2.2.2.2. Dobijanje tableta.....	31
2.2.2.3. Inkapsulacija antibiotika metodom ultrazvučnog sprej sušenja.....	31
2.3. Metode karakterizacije	31
3. REZULTATI I DISKUSIJA.....	35
3.1. Biomimična metoda	35
3.1.1. Metalni/SiO ₂ supstrat.....	35
3.1.1.1. Rezultati FT- IC analize	35
3.1.1.2. Rezultati XRD analize	36
3.1.1.3. Rezultati SEM mikroskopije	36
3.1.1.4. Rezultati AFM mikroskopije.....	38
3.1.1.5. Debljina filma nukleiranog HAP-a.....	40
3.1.1.6. Mehanizam nukleacije HAP-a na SiO ₂	40
3.1.2. Keramički/polimerni supstrat	42
3.1.2.1. Strukturne i morfološke karakteristike apatitnog praha i apatitnog poroznog nosača	42
3.1.2.2. Rezultati FT- IC analize	44
3.1.2.3. Rezultati XRD i EDS analize	45
3.1.2.4. Rezultati SEM mikroskopije	46
3.1.2.5. Mehanizam nukleacije HAP-a na polimerima	48
3.1.2.6. Ispitivanja na ćelijama i animalnom modelu.....	49
3.2. Kontrolisano otpuštanje antibiotika	52
3.2.1. Karakterizacija nosača antibiotika	52
3.2.1.1. Osobine sintetisanog praha HAP-a.....	52
3.2.1.2. Poroznost tableta	53
3.2.1.3. Karakterizacija SiO ₂	55
3.2.1.3.1. TEM analiza čestica SiO ₂ sola.....	56
3.2.1.3.2. IC analiza SiO ₂ praha dobijenog sprej sušenjem	57
3.2.1.3.3. SEM analiza čestica SiO ₂ dobijenih sprej sušenjem.....	57
3.2.1.3.4. Modelna istraživanja	59
3.2.2. Otpuštanje antibiotika	62
3.2.2.1. Otpuštanje iz PLGA inkorporiranog u porozni apatitni nosač	62

3.2.2.2. Otpuštanje iz tableta	63
3.2.2.2.1. Modelovanje kinetike otpuštanja antibiotika iz tableta	67
3.2.2.2.2. Određivanje koeficijenata difuzije	72
3.2.2.3. Otpuštanje leka iz SiO ₂	75
3.2.2.3.1. Raspodela veličine pora i kinetika otpuštanja leka.....	77
3.2.2.3.1.1. Veza između brzine otpuštanja leka i raspodele veličine pora određena iz eksperimentalnih podataka	77
3.2.2.3.1.2. Veza između brzine otpuštanja leka i raspodele veličine pora određena primenom modela.....	78
3.2.2.3.1.3. Poređenje eksperimentalnih i teorijskih podataka o raspodeli veličine pora i odgovarajućih brzina otpuštanja leka.....	79
3.2.2.3.1.4. Diskusija.....	80
3.2.2.3.1.5. Mehanizam otpuštanja leka sa aspekta različitih faktora koji utiču na brzinu otpuštanja	81
4. Zaključak.....	85
5. Literatura	87
Prilog A. Teorijski model za određivanje strukture sekundarnih čestica SiO₂.....	101

1. UVOD

1.1. Biomimična mineralizacija

Fasciniran raznovrsnošću i složenošću prirodnih oblika i funkcionalnošću prirodnih materijala, čovek pokušava da kopira prirodu i razvije nove načine sinteze koji imitiraju prirodne procese. Pri tome, glavni cilj nije samo da se oponašaju određeni biološki sistemi, već da se iskoriste njima inspirisane ideje da bi se sintetisali novi materijali. Tako se, zasnovana na ovim idejama, razvila nova istraživačka oblast- bioinspirisana ili biomimična hemija materijala [1, 2].

Biomimični materijali imaju sposobnost da izazovu specifične odgovore (adhezija, signalizacija, stimulacija) u telu tako što inkorporiraju peptide, nukleinske kiseline, faktore rasta, ćelijske receptore ili bilo koji aktivni biomolekul. Među ovim materijalima, posebnu pažnju privlače biominerali zbog svoje složene morfologije, uređene na nekoliko hijerarhijskih nivoa, izuzetnih funkcionalnih osobina i biokompatibilnosti, pa se unutar širokog područja biomimike razvila grana koja se bavi kreiranjem superstruktura sličnih prirodnim biomineralima. Po ugledu na proces prirodne biomineralizacije u kome živi organizmi luče neorganske minerale u obliku skeleta, školjki, zuba i dr., razvijen je proces biomimične mineralizacije, koja predstavlja moćan pristup sintezi materijala kompleksnog oblika, hijerarhijske organizacije i kontrolisane veličine i oblika, u vodenoj sredini pod sobnim uslovima [1, 3].

1.1.1. Simulirajući telesni fluid

Biomimična metoda se zasniva na korišćenju presićenih vodenih rastvora, poznatih kao simulirajući telesni fluidi (STF) koji imaju jonski sastav sličan onom kod ljudske krvne plazme [4]. STF se široko koristi za *in vitro* procenu bioaktivnosti veštačkih materijala ispitivanjem mogućnosti formiranja apatita na njihovoj površini kada se urone u ovaj rastvor, kao i za pripremu bioaktivnih prevlaka formiranjem

apatita, sličnog onom prirodno prisutnom u kostima, na različitim tipovima supstrata [4-6].

Henč (L.L.Hench) i sar. (1972) su prvi pokazali da stakla u $\text{Na}_2\text{O-CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ i $\text{Na}_2\text{O-SiO}_2$ sistemima, koja imaju sposobnost vezivanja za kost, formiraju kalcijum-fosfatni sloj na svojim površinama kada se implantiraju u živi organizam, preko koga i ostvaruju vezu sa tkivom kosti [7]. Takođe su otkrili da se kalcijum-fosfatni sloj može formirati na ovim staklima i *in vitro* uslovima, u rastvoru čija je pH vrednost podešena na 7.4 dodatkom tris(hidroksimetil)amina i hlorovodonične kiseline (Tris puffer). Kasnije su i Kitsugi (T. Kitsugi) i sar. pokazali da se kalcijum fosfatni sloj formira na površini A-W staklo-keramike u živom telu, omogućavajući vezivanje za kost [8, 9]. Ovaj sloj je XRD analizom identifikovan kao kristalni apatit. Kokubo (T. Kokubo) i sar. [10] su pokazali da se *in vivo* formiranje apatita može reprodukovati u STF-u sa jonskim koncentracijama skoro jednakim onima u ljudskoj krvnoj plazmi i bez dodatka organskih supstanci. Potvrđeno je i formiranje apatita na površini stakla tipa Bioglass 45S5 u STF-u, čijom je detaljnom analizom ustanovljeno da je sličan koštanom mineralu po svom sastavu i strukturi [10, 11].

Na osnovu ovih rezultata, Kokubo i saradnici [12, 13] predložili su da se STF koristi za *in vitro* procenu bioaktivnosti veštačkih materijala. Oni su kao osnovni preduslov za vezivanje veštačkog materijala za živu kost istakli formiranje apatita sličnog koštanom, na njegovoj površini kada se implantira u živo telo. Takođe su predložili da se ovo *in vivo* formiranje apatita može reprodukovati u STF-u sa koncentracijama jona skoro jednakim onima u ljudskoj krvnoj plazmi. To dalje znači da je moguće predvideti *in vivo* bioaktivnost nekog materijala nakon implanatacije u kost, na osnovu formiranja apatita na njegovoj površini u STF-u [12-14].

Prvu formulaciju STF-a predložio je Kokubo i ona nije sadržala sulfatne jone, kojih inače ima u krvnoj plazmi, pa je Kokubo uskoro korigovao ovu prvobitnu recepturu (Tabela 1) [7, 12, 15]. Ova korigovana receptura za STF je usvojena i široko korišćena od strane mnogih istraživača. Korigovani STF, kao što se vidi iz tabele, je bogatiji hloridnim a siromašniji hidrogenkarbonatnim jonima, u odnosu na krvnu plazmu. Tas (A.C. Tas) [16] je u svojim radovima koristio STF u kome je koncentracija hidrogenkarbonatnih jona ista kao u krvnoj plazmi, a koncentracija hloridnih jona nešto niža nego u Kokubovom STF-u (Tabela1). Ojan (A. Oyane) i sar. su zatim predložili

recepturu po kojoj su koncentracije i hloridnih i hidrogenkarbonatnih jona iste kao u krvnoj plazmi [5]. Međutim, dolazilo je do taloženja kalcijum karbonata prilikom testiranja ili samog čuvanja ovog rastvora STF-a, pošto je presićen ne samo u odnosu na hidroksiapatit, već i u odnosu na kalcijum karbonat. Kasnije su Takadama (H. Takadama) i sar. predložili novi sastav STF-a, u kome su koncentracije hloridnih jona iste kao u krvnoj plazmi, ali su koncentracije hidrogenkarbonatnih jona iste kao po korigovanoj Kokubovoj recepturi [17]. Stabilnost ovog STF-a, kao i reproduktivnost formiranja apatita na veštačkim materijalima, poređeni su sa Kokubovim korigovanim STF-om, i nikakve razlike nisu uočene. Korigovani STF je 2007. godine odobren od strane Međunarodne organizacije za standardizaciju, kao rešenje za *in vitro* procenu sposobnosti formiranja apatita na implantima.

Tabela 1. Koncentracije jona u nekim STF rastvorima i krvnoj plazmi

	Koncentracija jona, mM							
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Krvna plazma	142.0	5.0	1.5	2.5	103	27	1.0	0.5
Prvi STF	142.0	5.0	1.5	2.5	148.8	4.2	1.0	0
Korigovani STF	142.0	5.0	1.5	2.5	147.8	4.2	1.0	0.5
STF/ A.C. Tas	142.0	5.0	1.5	2.5	125	27	1.0	0.5
STF/ Ojan	142.0	5.0	1.5	2.5	103	27	1.0	0.5
STF/ Takadama	142.0	5.0	1.5	2.5	103	4.2	1.0	0.5

Menjanjem sastava STF-a može da se menja i sastav i struktura u njemu proizvedenog apatita. Kim i sar. su pokazali da se apatit proizveden u konvencionalnom STF-u razlikuje od koštanog i oni ovu razliku pripisuju višoj koncentraciji Cl⁻ i nižoj koncentraciji HCO₃⁻ jona u STF-u, u poređenju sa krvnom plazmom [18]. Takođe su pokazali da se apatit sa sastavom i strukturom jednakim ili bliskim, koštanom apatitu formira u STF-u ukoliko su koncentracije jona jednake ili bliske onima u krvnoj plazmi [5, 14].

1.1.2. Primena biomimične metode za dobijanje bioaktivnih prevlaka

Kao što je već rečeno, biomimična metoda se koristi za dobijanje apatitnih prevlaka na različitim tipovima supstrata. Mogućnost formiranja prevlaka na materijalima kompleksnog oblika, dobijanje apatita sličnih strukturnih i morfoloških karakteristika kao kod prirodne kosti i blagi eksperimentalni uslovi, samo su neke od prednosti ove metode [4, 6].

1.1.2.1. Bioaktivne prevlake na metalnim implantima

Biomimična metoda može da se iskoristi kao jedna od metoda za dobijanje bioaktivnih prevlaka na metalnim implantima koji se široko koriste u stomatologiji i ortopediji zbog svojih dobrih mehaničkih osobina, biokompatibilnosti i otpornosti na koroziju [19]. Ali, u mnogim slučajevima odgovor kosti nije bio zadovoljavajući zato što korišćeni materijal nije mogao da stvori adekvatne veze sa ćelijama koštanog tkiva [20]. Neke prethodne studije su pokazale da prisustvo kalcijum fosfatnih prevlaka na površini metalnih implanata ubrzava i poboljšava osteointegraciju, zbog njihove bioaktivnosti i osteokonduktivnosti [13, 21, 22]. Postoje mnoge tehnike [23, 24] za nanošenje takvih prevlaka na površinu metalnih implanata ali biomimična metoda je jedna od najpogodnijih, pošto podražava proces mineralizacije koji se inače odvija u kostima [4, 16, 25]. Međutim, mali broj materijala kao što su titanijumove legure, silikatna stakla i neke staklo-keramike, imaju sposobnost formiranja apatita na svojoj površini [4, 26-31]. Henč je pokazao da silikatni materijali mogu inicirati formiranje apatita, što kasnije utiče na vezivanje za kost [32], pretpostavljajući da je kombinacija alkalnog pH i silanolnih grupa na površini dovoljna za akumulaciju kalcijumovih i fosfatnih jona iz STF-a, nukleaciju i rast apatitnog sloja [33]. Kokubo i saradnici su takođe potvrdili značajnu ulogu SiOH grupa u iniciranju nukleacije apatita [26]. Li (P. Li) i sar. su ispitivali uticaj temperature sinterovanja silike na sposobnost formiranja apatita i zaključili su da kristalizacija apatita na površini silike zavisi od brzine hidrolize na ovoj površini, odnosno da je određeno prisustvo silanolnih grupa neophodno da bi se pokrenula heterogena nukleacija apatita iz metastabilnog STF-a [34].

Iz svih ovih studija može se zaključiti da se formiranje apatita na površini metala može ubrzati prethodnim prevlačenjem površine metala tankim slojem oksida (SiO_2 , TiO_2), sa ugrađenim OH grupama unutar oksidnog sloja koje služe kao aktivatori heterogene nukleacije apatita prilikom taloženja kalcijumovih i fosfatnih jona iz presičenog STF-a [28, 32].

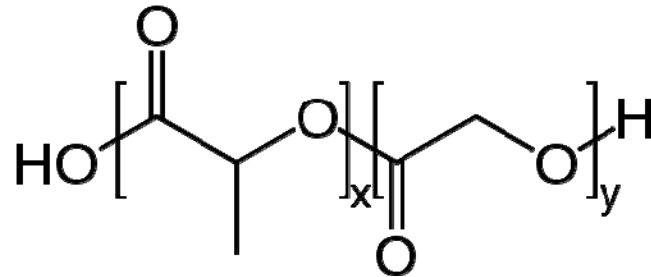
1.1.2.2. Biomimična metoda i dizajniranje poroznih nosača

Biomimična metoda se čini pogodnom i za dodatno dizajniranje poroznih apatitnih nosača, prethodno sintetskih bilo kojom metodom, pošto se pokazalo da na ovaj način nastaju strukture slične onima u prirodnoj kosti [35, 36]. Adekvatna nanotopologija unutrašnjih zidova poroznih nosača je bitna za normalan rast ćelija, zbog čega je njihov biomimični tretman u STF-u često neophodan [6].

U sklopu inženjerstva koštanog tkiva velika pažnja se poklanja sintezi aktivnih, poroznih keramičkih struktura/nosača dobro definisane morfologije unutrašnjih zidova. Ove strukture se uglavnom izgrađene od kalcijum hidroksiapatita (HAP, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) malo promenjene stehiometrije. Nosači na bazi HAP-a se široko koriste u stomatologiji i ortopediji zbog biokompatibilnosti i osteokonduktivnosti [37, 38], a zbog svoje arhitekture slične onoj kod prirodne kosti, porozni HAP se koristi kao materijal za punjenje koštanih defekata [39]. U kombinaciji sa odgovarajućim polimernim/biopolimernim tankim filmovima (zbog njihove biokompatibilnosti, mehaničkih osobina i biodegradabilnosti), ovi nosači mogu da pruže dobru osnovu za pokretanje rasta i aktivnosti koštanih ćelija [40]. Međutim, pored poroznosti i raspodele veličine pora nosača, topologija pora, tj. raspored strukturnih elemenata koji čine zidove pora na nanonivou, je takođe veoma važna. Odgovarajuća morfologija zidova nosača može se postići pomoću biomimičnog medijuma, samonukleacijom čestica HAP-a na površini keramičkog nosača funkcionalizovanog odgovarajućim polimernim filmovima [6].

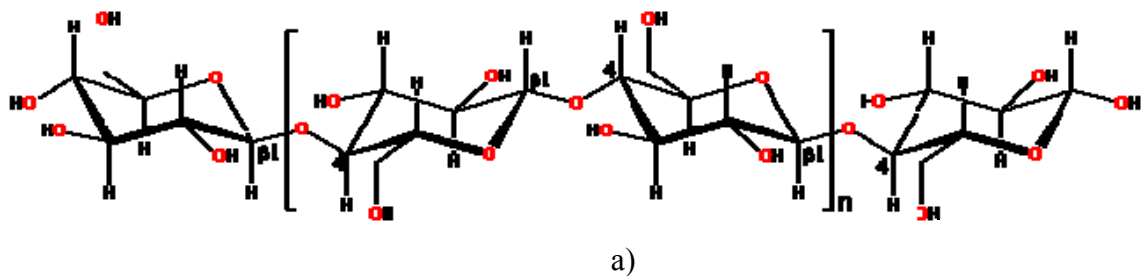
Primenom polimera prilikom dizajniranja nosača poboljšava se nanotopologija unutrašnjih zidova nosača što omogućava efikasnije aktiviranje ćelija i olakšava proces ćelijske proliferacije i rasta. Jedan od najčešće korišćenih polimera u poslednjoj deceniji je poli(laktid-ko-glikolid), PLGA (kopolimer poli mlečne kiseline (PLA) i poli glikolne kiseline (PGA)) zbog svog medicinski odobrenog statusa i mogućnosti kontrolisanja

brzine degradacije menjanjem odnosa kopolimera [41-43]. Strukturna formula PLGA prikazana je na slici 1.

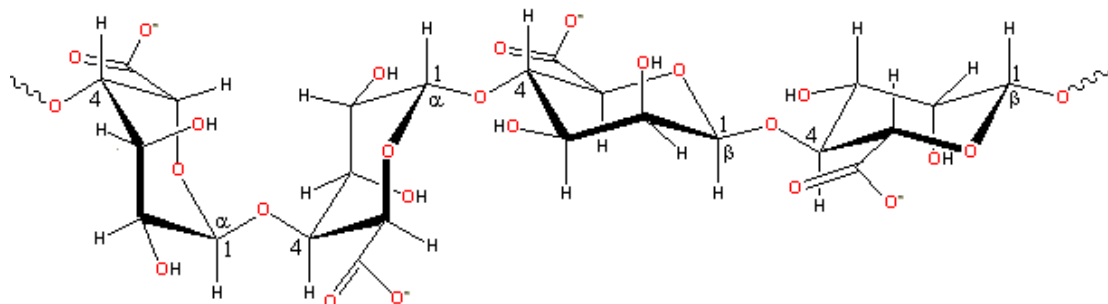


Slika 1. Strukturna formula PLGA (wikipedia.org)

Takođe, prirodni polisaharidi, sa svojom supramolekulskom samoorganizacijom u polisaharidne lance, su obećavajući materijali za usmeravanje biomimetične mineralizacije kalcijum fosfatnih keramika na nanonivou, kao i formiranje kalupa sa arhitekturom povoljnom za rast ćelija (slika 2). Strukturne matrice na bazi polisaharida mogu da posluže za poboljšanje hemijskih i funkcionalnih osobina različitih keramičkih struktura, važnih za adheziju i rast ćelija [44].



a)



b)

Slika 2. Strukturna formula: a) celuloze, b) alginata (lsbu.ac.uk)

Jedan od najčešće ispitivanih polisaharida za sintezu nosača u inženjerstvu koštanog tkiva je celuloza (slika 2a), zbog veoma dobre biokompatibilnosti, male brzine degradacije i mogućnosti manipulisanja brzinom degradacije u zavisnosti od dužine lanca i stepena kristalnosti [44-46]. Pored celuloze, iz grupe polisaharida pogodnih za ove namene izdvaja se i alginat (slika 2b) koji se uglavnom koristi za inkapsulaciju i imobilizaciju različitih ćelija i lekova, ali se pokazao efikasnim i kada se koristi u inženjerstvu koštanog tkiva [47-51].

Dakle, nanotopologija unutrašnjih zidova HAP/polimer kompozitnog nosača mogla bi da se unapredi biomimičnim tretmanom u STF-u. Dobijene *in vitro* strukture, pored toga što bi poboljšale nanostrukturni dizajn unutrašnjih zidova 3D nosača, takođe daju ideju o mogućem razvoju takvih struktura u *in vivo* uslovima [8, 12, 52].

1.2. Kontrolisano otpuštanje lekova u inženjerstvu koštanog tkiva

Sa produženjem životnog veka u novije vreme, u odnosu na ranije kada tehnike lečenja nisu bile toliko razvijene, primećuje se trend porasta poremećaja u funkcionisanju mišićno-skeletnog sistema. Povrede kostiju i hrskavice javljaju se usled degenerativnih, hirurških ili traumatičnih procesa i značajno ugrožavaju kvalitet života. Autologna transplantacija se dugo smatrala zlatnim standardom zbog imunokompatibilnosti, iako postoji nekoliko ograničenja kao što su neophodnost sekundarne operacije i ograničena količina donorskog tkiva. Alograftovi ili ksenograftovi, koji podrazumevaju transplantaciju tkiva dobijenog od ljudskog donatora odnosno neke druge vrste, su opcioni tretmani, ali tu se javljaju problemi poput mogućeg prenosa patogena od donatora, imunogeni odgovor i visok rizik od infekcije. Stoga se razvija inženjerstvo tkiva, kao disciplina koja istražuje veštačke materijale koji bi se koristili kao alternativa pomenutim tipovima implanata i načine njihove sinteze, kao i terapijske procese za lečenje teško povređenih pacijenata minimalno invazivnim tehnikama. Strategije inženjerstva koštanog tkiva uglavnom se zasnivaju na sintezi koštanih nosača koji imaju višestruku ulogu: daju potporu oštećenom koštanom tkivu, služe kao privremeni supstrat i trodimenzionalna matrica za rast i diferencijaciju ćelija i istovremeno deluju kao lokalni regulatori koji kontrolišu brzinu otpuštanja biološki aktivnih supstanci u okolno tkivo. [53]

1.2.1. Materijali u inženjerstvu koštanog tkiva

Iako izgleda beživotno, kost čini veoma živa, porozna struktura koja se neprekidno obnavlja. Kost predstavlja kompozitni materijal sastavljen od organske i neorganske komponente. Mineralnu tj. neorgansku fazu čini više od 60 % ukupne mase suve kosti a osnovni gradivni element je apatitni kalcijum fosfat, uz prisustvo karbonata i malih količina natrijuma i magnezijuma. Koštano tkivo se obnavlja uz pomoć ćelija osteoklasta koje luče kiseline koje rastvaraju hidroksiapatit i enzime koji razgrađuju kolagen. To rezultira oslobađanjem kalcijuma i proteina koji omogućavaju drugim ćelijama-osteoblastima da formiraju novi matriks koji mineralizuje formirajući

hidroksiapatit i kolagen. U normalnim uslovima potrebna gustina kosti se održava zahvaljujući dinamičkoj ravnoteži u funkcionisanju osteoklasta i osteoblasta [54].

Narušavanje ove ravnoteže dovodi do neusklađenosti između resorpcije kosti i njenog formiranja, što dalje vodi smanjenju gustine kosti i javljanju bolesti poznate kao osteoporoza. Pored osteoporoze postoji i niz drugih bolesti koje napadaju koštano tkivo kao što su osteomijelitis, artritis, reumatizam, kancer, a tu su i mehaničke povrede kostiju. Zbog svega ovoga bilo je potrebno razviti materijal koji će služiti kao zamena za prirodnu kost, tj. koji će ispuniti defekte u kosti nastale hiruškom intervencijom bolesnog koštanog tkiva.

Da bi se neki materijal smatrao idealnim zamenikom kosti treba da [55, 56]:

- bude biokompatibilan i biodegradibilan,
- ima optimalnu poroznost da bi se olakšala vaskularizacija prilikom obnavljanja kosti,
- ima dovoljnu mehaničku jačinu da podnese opterećenje,
- bude resorbovan u prirodnom procesu i da potpomogne formiranje nove kosti od strane osteoblasta.

Biokompatibilnost sa humanom okolinom je najbitnija i ona podrazumeva da je materijal hemijski inertan, nekancerogen, hipoalergen i mehanički stabilan na mestu implantacije. Takođe, materijal ne sme biti fizički ili hemijski modifikovan od strane okolnog tkiva i ne sme izazvati inflamatornu reakciju na mestu implantacije. Razvoj ovakvog materijala je kompleksan proces i zahteva višestruka testiranja biokompatibilnosti i stabilnosti [57].

Poslednjih godina, u inženjerstvu koštanih tkiva, posebna pažnja se pridaje dizajniranju i procesiranju poroznih, biodegradabilnih trodimenzionalnih nosača, kao što je već pomenuto u poglavlju 1.1.2.2 [58]. Ovi nosači visoke poroznosti trebalo bi da obezbede potporu ćelijama i novoformirajućem tkivu, da privremeno preuzmu ulogu ekstracelularnog matriksa i indukuju prirodni proces regeneracije kosti [53]. Trodimenzionalni bioaktivni koštani nosači mogu biti sačinjeni od biokeramika, biodegradabilnih polimera ili njihovih kompozita [59].

Danas se kao koštani implantanti najčešće koriste ili sintetski polimeri (polimetil metakrilat, polilaktid, poliglikolid) ili neorganski materijali, pre svega, kalcijum hidroksiapatit iz različitih izvora.

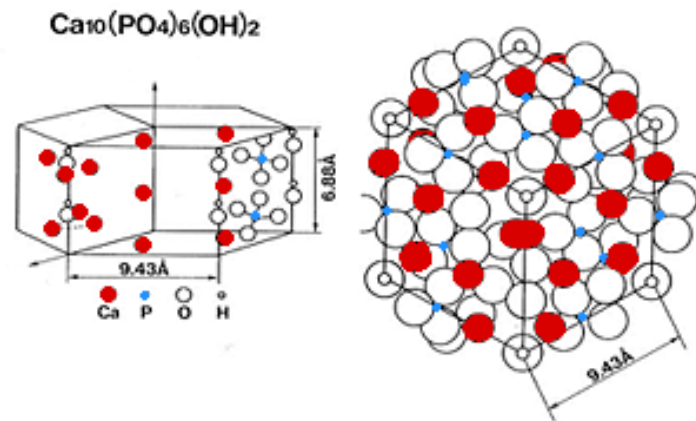
1.2.2. Značaj kontrolisanog otpuštanja lekova u inženjerstvu koštanog tkiva

Tokom implantacije zamenika kosti u koštane defekte često dolazi do bakterijske infekcije što predstavlja glavno ograničenje za njihovu širu upotrebu [60]. Ovakve infekcije dalje vode nepotpunoj integraciji i nedovoljnoj kompatibilnosti površine biomaterijala sa tkivom kosti [61]. Preventivna upotreba antibiotika u ortopedskoj hirurgiji pokazala se korisnom [62]. Korišćenje konvencionalnih metoda distribucije antibiotika ima za posledicu nizak nivo antibiotika u koštanom tkivu, zbog ograničene cirkulacije krvi do ovog tkiva ili limitirane penetracije antibiotika u kost [63]. Međutim, ubacivanjem antibiotika direktno u biomaterijal koji se koristi kao implant, može se postići visoka lokalna koncentracija antibiotika. Otpuštanje antibiotika iz implanta obezbeđuje zaštitu od bakterijske infekcije od trenutka operacije pa kroz duži postoperativni period, koji može trajati od nekoliko dana do nekoliko nedelja; iako neki autori smatraju da antibiotici ne treba da budu primenjivani duže od 24 sata nakon hiruške intervencije [62, 64]. Sa druge strane, ostatak tela je zaštićen od visoke koncentracije antibiotika preko krvno-koštane barijere [62]. Ono što je bitno, prilikom dizajniranja sistema za kontrolisano otpuštanje lekova, jeste podesiti optimalnu brzinu otpuštanja leka. Ako je brzina otpuštanja velika, može se desiti da ce celokupna količina leka otpusti pre nego što je infekcija zaustavljena; ako je brzina mala infekcija može uznapredovati zbog nedovoljne količine antibiotika [65, 66].

Da bi se neka supstanca koristila kao nosač lekova mora da ima sposobnost da inkorporira lek, da ga zadrži na specifičnom mestu i da ga otpušta progresivno sa vremenom u okolno tkivo. Dodatne prednosti su injektabilnost i biodegradibilnost materijala [37]. Cilj je razviti implantni materijal sa odgovarajućom strukturom i mehaničkim osobinama koji će omogućiti odvijanje osteokondukcije i osteoprodukcije i istovremeno oslobađati biološki aktivne molekule na međupovršinu živog tkiva i implanta [39]. Već pomenuti, bioaktivni keramički porozni nosači korišćeni u inženjerstvu koštanih tkiva mogu poslužiti i kao nosači za kontrolisano otpuštanje lekova, ali je u tom slučaju teško kontrolisati režim otpuštanja leka [38]. Dalji razvoj ovih nosača, pored obezbeđivanja optimalnih fizičko-hemijskih i strukturnih uslova potrebnih za regeneraciju kosti, treba da ide u smeru kreiranja lokalnog regulatora brzine otpuštanja terapeutika, bez primene dodatnih sistema za otpuštanje [67].

1.2.3. Hidroksiapatit

Termin "apatit" označava čitavu grupu jedinjenja koja imaju sličnu strukturu ali ne i isti sastav. Kalcijum hidroksiapatit (HAP), hemijske formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, sa stehiometrijskim odnosom $\text{Ca}/\text{P} = 1.67$, ima heksagonalnu kristalografsku strukturu (slika 3). Zamena jona u strukturi apatita (npr. Sr umesto Ca, Mg umesto Ca, F umesto OH, CO_3 umesto PO_4 ili OH) utiču na njegove osobine, kao što su parametri rešetke, spektralne osobine, veličina i morfologija kristalita, što dalje utiče na njegovu hemijsku stabilnost (rastvorljivost) i termičku stabilnost, pri čemu stepen uticaja zavisi od veličine i količine jona-supstituenta [68].



Slika 3. Kristalna struktura kalcijum hidroksiapatita (exflow.com)

Biološki apatiti se nalaze u sastavu neorganske ili mineralne faze normalno kalcifikovanih tkiva (zuba i kostiju), a nalaze se i u nekim patološkim kalcifikacijama (zubni kamenac, kalcifikacije srca, mokraćni kamenac, kalcifikacije mekih tkiva, itd.). Biološki apatiti, za razliku od čistog HAP-a, sadrže supstituente u manjim količinama (npr. CO_3^{2-} , Na^+ , Mg^{2+}) i oni se obično nazivaju karbonatni apatiti, približne formule $(\text{Ca}, \text{Mg}, \text{Na})_{10}(\text{PO}_4, \text{HPO}_4, \text{CO}_3)(\text{OH})_2$ [68].

HAP, bilo prirodni (iz kostiju životinja), bilo sintetski, se široko koristi za razne namene kao što su: hromatografija proteina, defluorizacija vode, kao komponenta stomatoloških proizvoda (kao abrazivni ili mineralizujući agens) itd [68]. Što se tiče primene u medicini, do osamdesetih godina prošlog veka korišćen je uglavnom za oblaganje ortopedskih metalnih implanata, na mestima gde je potrebna jaka interakcija sa tkivom kosti (kuk, koleno, butna kost) [69]. Ubrzo, osteokonduktivne osobine

fosfatnih keramika bivaju potvrđene i počinju da se koriste kao sintetski zamenici kostiju kao alternativa autogenim i alogenim zamenicima [70]. Trenutno se biološki HAP (iz korala, goveđe kosti ili morskih algi) ili sintetski HAP dosta koriste za reparaciju i regeneraciju koštanog tkiva u formi granula, blokova ili poroznih nosača, sami ili u kompozitima sa polimerima ili drugim keramikama [68].

Kao glavne prednosti HAP-a ističu se činjenica da ima isti elementarni hemijski sastav kao prirodna kost i zubi i njegov veliki afinitet prema koštanom tkivu [55]. Ispitivanjem novoformirane kosti nakon implanatacije HAP-a pokazano je da je mineral u novoformiranoj kosti takođe hidroksiapatit kao i da su hidroksiapatitni kristali na novostvorenoj kosti iste veličine i forme kao oni u normalnoj kosti. Netoksičnost, nekancerogenost i odsustvo alergene reakcije ukazuju na biokompatibilnost HAP-a [57]. Pažljivom kontrolom arhitekture HAP keramike može se postići adekvatna makroporoznost koja omogućava prorastanje mekim i čvrstim tkivima kao i pristup biološkim fluidima, a zatim i mikroporoznost koja kontroliše adheziju ćelija i brzinu resorpcije kalcijum fosfata čime se obezbeđuje izvor kalcijuma i fosfora za rekonstrukciju kosti [57].

1.2.3.1. Hidroksiapatit kao nosač lekova

Osim biokompatibilnosti sa koštanim tkivom, HAP ima još neke značajne osobine, kao što je sposobnost da adsorbuje različite hemijske vrste, zbog čega može da posluži kao vrlo efikasan nosač lekova. Smeštanjem antibiotika u apatitni implant moguće je obezbediti potrebnu koncentraciju antibiotika na mestu implantacije, gde se bakterijska infekcija i javlja. Na taj način mogu se tretirati i oboljenja kosti poput osteoporoze, osteomijelitisa kao i koštani tumori koji inače zahtevaju duge i bolne terapije. [71-73]

HAP se već godinama proučava kao nosač lekova, bilo u formi poroznog nosača kada je lek adsorbovan na površini, bilo u formi cementa gde je lek raspoređen po čitavoj zapremini materijala što produžava vreme otpuštanja leka. Posebno je izučavano otpuštanje antibiotika, zbog široke oblasti njihove primene bilo u prevenciji infekcija izazvanih hiruškim intervencijama, bilo generalno u lečenju infekcija koštanog tkiva [72]. Do sada nije primećeno ozbiljnije toksično dejstvo na ostatak tela [72]. Rezultati su u uglavnom pokazali konstantan terapijski nivo antibiotika na mestu infekcije kao i

bržu regeneraciju kosti [74]. Apatitni sistemi su korišćeni i za isporuku testosterona direktno na mesto preloma kosti, pošto se pokazalo da androgeni stimulišu osteoblaste i ubrzavaju zarastanje kosti, *in vivo*. Kada se primenjuju intramuskularno ili potkožno u velikim dozama, ovi hormoni mogu izazvati mnoge neželjene efekte kao što je nekroza jetre, međutim kada su dozirani preko apatitnog sistema, ovi efekti su bili eliminisani, dok je adekvatna doza steroida dospela na mesto preloma kosti [75]. Korkusuz (F. Korkusuz) i saradnici pokazali su da su apatitne sfere impregnirane gentamicinom efikasne u iskorenjivanju infekcija kod hroničnog osteomijelitisa [76]. Takođe, Justen (U. Joosten) i saradnici su izučavali HAP kao nosač za vankomicin u svrhu lečenja hroničnog osteomijelitisa [73]. Pokazalo se da ovaj sistem otpušta visoke koncentracije antibiotika tokom dužeg perioda vremena i time obezbeđuje vrlo efikasnu lokalnu antimikrobnu aktivnost. Ovi autori čak predlažu HAP kao nosač antibiotika i kod lečenja refraktornih infekcija izazvanih sa *Staphylococcus aureus*. Pored toga, HAP je široko primenjivan za kontrolisano otpuštanje gena [77], proteina [37] i različitih lekova zbog svoje netoksičnosti i odlične biokompatibilnosti [78-81].

1.2.4. Polimeri u inženjerstvu koštanog tkiva

Prema brojnim autorima, uprkos svojim odličnim osobinama, loša mehanička jačina i lomljivost HAP-a ograničavaju njegovu upotrebu kao nosača u inženjerstvu koštanog tkiva [82-85]. Jedan od načina da se prevaziđu ovi nedostaci je da se apatitni nosači prevuku slojem odgovarajućeg polimera, a na taj način se povećava i kapacitet isporuke biološki aktivnih supstanci i pospešuje interakcija sa okolnim tkivom [82, 84, 86-88]. Ovi HAP-polimer kompoziti široko se ispituju za primenu u inženjerstvu tkiva i mogu biti dizajnirani tako da se dobiju materijali sa nizom prednosti koji pored ostalog, služe da usklade vezivanje i rast ćelija, kao i morfogenezu tkiva [41, 78, 82, 87-93].

Većina polimera korišćenih do danas pripadaju grupi sintetskih poliestera, kao što su poli(α -hidroksi kiseline): poli(L-mlečna kiselina) (PLLA), poli(glikolna kiselina) (PGA) i njihov kopolimer poli(mlečna-ko-glikolna kiselina) (PLGA) ili grupi prirodnih polimera, kao što su alginat, hitozan, kolagen i fibrin [83, 86, 89, 92-96].

Polimeri mlečne i glikolne kiseline su najviše korišćeni sintetski polimeri u inženjerstvu, kako mekih tako i tvrdih tkiva i u kontrolisanom otpuštanju lekova, s

obzirom da su biokompatibilni i degradiraju do oligomera i monomera, rastvorljivih u vodi, koji se eliminišu sa mesta implantacije. Korišćenje ovih polimera u obliku mikrosfera za kontrolisano otpuštanje lekova je odobreno od strane Američke agencije za hranu i lekove. Posebna prednost ovih polimera leži u tome što njihova brzina degradacije može biti kontrolisana i na taj način prilagođena specifičnim zahtevima raznih tipova tkiva. Pošto period degradacije može potencijalno varirati između nekoliko meseci do nekoliko godina mogu da se koriste za sinhronizovanu resorpciju sa odgovarajućim razvojnim fazama u rastu tkiva. Ispitivana su i njihova osteogena svojstva i utvrđeno je da je kod koštanih defekata, u koje su implantirani ovi polimeri, došlo do bržeg zarastanja u poređenju sa netretiranim defektima. [89, 93, 97-102]

1.2.5. Silicijum dioksid

Mezoporozni silikatni materijali se široko ispituju i koriste u mnogim oblastima (kataliza, adsorpcija, optika, itd.) zbog svoje porozne strukture i visoke specifične površine [103, 104]. Pored toga, ovi materijali su se pokazali kao netoksični i biokompatibilni pa se u poslednje vreme sve više ispituje njihova primena u biomedicini [105, 106]. Tako se SiO₂ često koristi za oblaganje neorganskih nanočestica kako bi se omogućila biološka primena toksičnih nanosistema, formiranjem silikatne barijere između takvih sistema i tkiva. Na primer, pokazalo se da silicijum dioksidom obložene poluprovodničke kvantne tačke, kao što su kadmijum sulfid ili selenid poseduju visoku stabilnost, hemijsku prilagodljivost i biokompatibilnost, što je od presudnog značaja za mnoge biomedicinske primene [106]. Takođe, silika se koristi u formulacijama veštačkih implanata zbog osteogenih osobina svojih kompozita [105, 107].

Pored svega toga, mezoporozni silikatni materijali se sve više ispituju kao potencijalni nosači za kontrolisano otpuštanje lekova, u cilju produženja vremena otpuštanja i boljeg kontrolisanja brzine otpuštanja [108-110]. Pogodno dizajnirani, takvi materijali poseduju veliku zapreminu pora, usku raspodelu veličine pora, i veoma visoku specifičnu površinu, što ih čini pogodnim za inkapsulaciju i otpuštanje malih molekula biološki aktivnih supstanci [108]. Već je, u brojnim istraživanjima, ispitivana mogućnost imobilizacije lekova u konvencionalne mezoporozne silikatne materijale i brzina njihovog otpuštanja iz istih [108, 111-114], i pokazalo da se da su ovi materijali

sposobni da uskladište i postepeno otpuštaju terapijske agense [115-117]. Oni, takođe, mogu da poboljšaju biokompatibilnost nekih drugih sistema za isporuku lekova, kao što su biopolimeri, micelle i magnetne nanočestice [105, 106, 118, 119].

Posebno su zanimljivi SiO₂ prahovi, organizovani na više hijerarhijskih nivoa, koji su sintetisani kombinovanjem metoda hidrotermalne sinteze i ultrazvučnog sprej sušenja. Na taj način je postignuta precizno dizajnirana struktura silikatnih čestica, u rasponu od čestica i sub-čestica do nivoa nano-čestica sola i njihovih konstituenata, silikatnih lanaca i tetraedara. Ovaj pristup, detaljno opisan u referencama [120] i [121], jasno podržava elemente molekularnog inženjerstva i nano-inženjerstva, što može biti od suštinske važnosti u budućim istraživanjima sistema za isporuku lekova.

Zbog toga je, SiO₂ sistem dobijen kombinacijom hidrotermalne metode i ultrazvučnog sprej sušenja, izabran kao vrlo pogodan model sistem za inkapsulaciju antibiotika, kao i za teorijska i eksperimentalna ispitivanja uticaja geometrije bilo kog sistema na kapacitet inkapsulacije leka i brzinu njegovog otpuštanja. Rezultati dobijeni korišćenjem ovog pristupa mogu biti veoma važni sa aspekta projektovanja budućih sistema za kontrolisano otpuštanje lekova. Sve ovo, zajedno sa mogućnošću dalje površinske modifikacije SiO₂ sistema, čini ih veoma obećavajućim u razvoju ciljanih sistema isporuke lekova. Potpuno predviđanje načina na koji će se odvijati otpuštanje leka moguće je definisati zahvaljujući razvijenom teorijskom modelu dizajniranja i sub-dizajniranja nanosistema dobijenih u periodičnim fizičkim poljima (ultrazvučno), tokom prethodnih istraživanja V. Jokanovića i saradnika na brojnim keramičkim sistemima, o kome će više reči biti kasnije [120, 121].

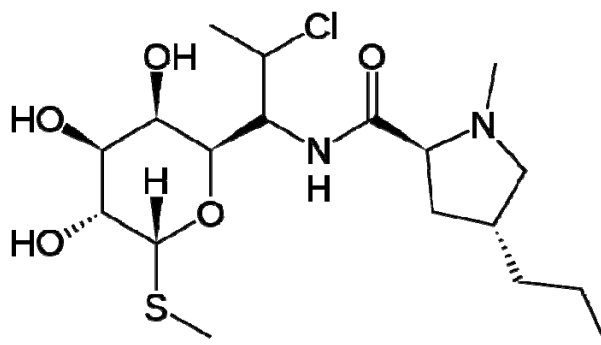
1.2.6. Antibiotici za lečenje infekcija koštanog tkiva

Infekcija se definiše kao homeostatska neravnoteža između tkiva domaćina i prisutnih mikroorganizama u koncentraciji koja prelazi 10⁵ organizama po gramu tkiva ili kao prisustvo beta-hemolitičkih streptokoka [66]. Glavni cilj lečenja infekcija rana je da se redukuje bakterijska populacija na rani do nivoa pri kome proces zarastanja rane može da se odvija. Bakterijske infekcije predstavljaju glavni problem na polju primene medicinskih implanata [67, 122].

Mikroorganizmi mogu izazvati infekciju na mestu implantacije na tri načina: tako što će kolonizovati implant direktnom inokulacijom za vreme implantacije, širenjem putem krvi ili iz spoljnog obližnjeg izvora infekcije. Najčešći uzročnici ovih infekcija su *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*, posebno kada su u pitanju operacije ugradnje veštačkog kuka ili kolena [122]. *Staphylococcus aureus* je najčešći izazivač infekcija koštanog tkiva kod ljudi. Ova bakterija izlučuje nekoliko adhezina koji olakšavaju vezivanje bakterije za koštani matriks, kao i za biomaterijale koji se koriste kao koštani implantati. Ovi adhezini prepoznaju athezivne makromolekule matriksa i ti specifični makromolekuli su uključeni u infekcije kosti i koštanih preloma [123].

U cilju lečenja ovih infekcija razvijen je čitav niz različitih antibiotika. U daljem tekstu dat je kratak opis antibiotika koji se koriste za tretiranje infekcija koštanog tkiva, a koji su korišćeni u istraživanjima prikazanim u ovoj disertaciji.

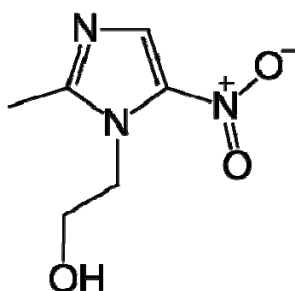
Klindamicin (slika 4) je antibiotik iz grupe linkozamina sa primarno bakteriostatskim delovanjem protiv gram pozitivnih aeroba i protiv širokog spektra anaerobnih bakterija. Od gram pozitivnih aeroba klindamicin deluje na streptokoke, stafilokoke i pneumokoke. Koristi se za lečenje infekcija izazvanih osetljivim mikroorganizmima, efikasan je u lečenju teških infekcija izazvanih stafilokokama kao sto su septični artritis, osteomijelitis, teške infekcije nekih tkiva itd. Deluje i na infekcije izazvane sa *Staphylococcus aureus*, rezistentne na meticilin. Neki autori ga smatraju najznačajnijim antibiotikom na polju stomatologije [124].



Slika 4. Strukturna formula klindamicina

Metronidazol (slika 5) je nitroimidazolni antinfektivni lek koji se uglavnom koristi za tretiranje infekcija prouzrokovanih susceptibilnim organizmima, pre svega

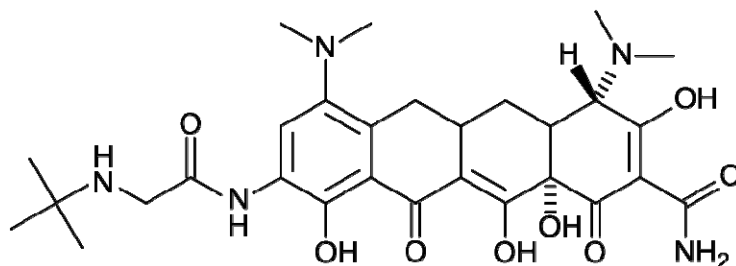
anaerobnim bakterijama i protozoama. Nakon primene biva selektivno apsorbovan od strane anaerobnih bakterija i protozoa, gde se neenzimatski redukuje pri čemu se stvaraju produkti toksični za anaerobne ćelije. Ovi produkti prodiru u bakterijsku DNK i formiraju nestabilne molekule. Ovaj proces se dešava samo pri delimičnoj redukciji metronidazola koja se upravo odvija u anaerobnim ćelijama, tako da su mali negativni efekti na humane ćelije ili aerobne bakterije. Tretiranjem karioznog dentina 10-ppm metronidazolom pokazalo se da se uništi više od 99% bakterija [125, 126].



Slika 5. *Strukturna formula metronidazola*

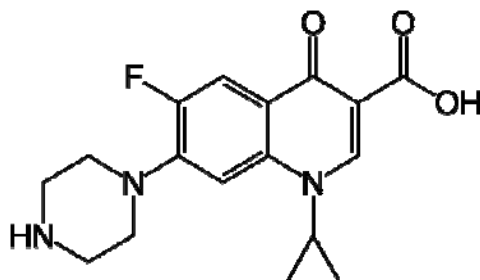
Infekcije opasne po zdravlje izazvane su sve češće multirezistentnim Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama i stoga su potrebni novi lekovi da suzbiju ovakve infekcije. Gliciciklinski antibiotici su nova klasa antimikrobnih agenasa, i prvi koji je licenciran je tigecklin (slika 6). Oni predstavljaju bakteriostatske agense koji inhibiraju sintezu bakterijskog proteina tako što se reverzibilno vezuju za 30S ribozomalnu podjedinicu. Ova klasa antibiotika razvijena je sa ciljem da se prevaziđu dva glavna mehanizma rezistencije na tetracikline, ribozomalna protekcija i efluks, proces gde aktivni transportni sistemi unutar bakterije uklanjaju antibiotike i druge toksične materije iz ćelije. Trenutno je licenciran samo za lečenje komplikovanih infekcija kože i mekih tkiva i za lečenje intra-abdominalnih infekcija. Dostupan je jedino kao intravenozni preparat [127]. Ima širok spektar dejstva protiv Gram-pozitivnih, Gram-negativnih, atipičnih, anaerobnih i bakterija rezistentnih na antibiotike. Upotreba tigecklina kao i ostalih antibiotika i antimikrobnih agenasa za lečenje koštanih bolesti nije šire ispitivana zbog nedostatka informacija o njihovim osobinama i vezi između koncentracije u kostima i farmakokinetičkih efekata. Nakon primene kod čoveka, tigecklin je široko raspoređen po telu i ima dugo vreme poluraspada, ali se pokazalo da je koncentracija tigecklina u kosti relativno niska u

poređenju sa serumom [128-130]. Nekoliko studija na animalnim modelima pokazale su efikasnost tigeciklina u lečenju osteomijelitisa, arterijskog endokarditisa, upale pluća i peritonitisa [131].



Slika 6. Strukturna formula tigeciklina

Ciprofloksacin (ciprocinal) (slika 7) je sintetski antibiotik koji pripada grupi fluorokinolona, antibiotika širokog spektra delovanja. Deluje baktericidno tako što se vezuje za enzime koji učestvuju u sintezi DNK i proteina. Ovaj antibiotik lincenciran je za korišćenje u tretiranju bakterijskih infekcija kao što su: infekcije urinarnog trakta, respiratorne infekcije, akutni sinusitis, kožne infekcije, infekcije koštanog tkiva, gonoreja itd. Ciprofloksacin se najviše od svih fluorokinolona koristi za lečenje bakterijskih infekcija koštanog tkiva pošto je njegova minimalna inhibitorna koncentracija niska za većinu patogena koji uzrokuju osteomijelitis kao što su *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis* [132, 133]. Neka ispitivanja su ukazala na potencijalnu efikasnost kinolona u sistemima za lokalno otpuštanje lekova dizajniranih za tretman koštanih infekcija, pri čemu su kao nosači korišćeni hidroksiapatit u kombinaciji sa kolagenom, biodegradabilni polimeri ili kalcijum fosfat i smeša biodegradabilnih polimera [134-136].



Slika 7. Strukturna formula ciprofloksacina

1.2.7. Kinetika otpuštanja lekova- najčešći pristupi

Kinetika otpuštanja leka, iz bilo kog nosača, zavisi od mikrostrukture nosača, rastvorljivosti leka, tipa veze između leka i nosača, i ukoliko nosač degradira, od mehanizma degradacije.

Kalcijum fosfatni nosači se svrstavaju u klasu nosača kod kojih je otpuštanje leka kontrolisano difuzijom, što znači da je lek smešten u ne-biorazgradivu matricu kroz koju treba da difunduje. Iako su neki kalcijum fosfatni materijali resorbabilni, u većini studija u kojima su proučavani kao nosači lekova potvrđeno je da je brzina njihove degradacije mnogo manja od brzine otpuštanja leka. Iz tog razloga je moguće pretpostaviti da je brzina otpuštanja leka uglavnom kontrolisana procesom difuzije kroz kalcijum fosfatnu matricu, a ne degradacijom iste [37].

Osnovne jednačine za masenu difuziju dao je Fik (Fick) još 1855. godine. Teorija difuzije kroz izotropne supstance se zasniva na hipotezi da fluks J ili brzina difuzije (količina Q_t - u trenutku t) kroz jedinicu površine je proporcionalan gradijentu koncentracije, što je iskazano prvim Fikovim zakonom:

$$J = \frac{dQ_t}{dt} = -D \frac{dC}{dx}, \quad (1.1.2.7.)$$

gde je D koeficijent proporcionalnosti, poznat kao koeficijent difuzije ili molekulska difuzivnost komponente.

U uslovima nestacionarne difuzije, tj. prenosa mase gde se stalno menja koncentracija komponente, koristi se drugi Fikov zakon:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D \frac{\partial C}{\partial x} \right). \quad (2.1.2.7)$$

Ova jednačina omogućava da se odredi promena koncentracije u bilo kojoj tački zapremine u funkciji vremena i u većini literature koja se bavi prenosom mase se koristi kao polazna jednačina koja se zatim rešava za različite početne i granične uslove.

Prilikom otpuštanja leka iz matrice difuzijom u spoljni medijum, desorpcija leka iz matrice podrazumeva pomeranje difuzionog fronta. Za razmatranje se najčešće uzima najjednostavniji slučaj kada je jedan pokretni difuzioni front sa vremenski zavisnim položajem $R(t)$ u krutoj pločastoj matrici (debljine h), bez bubrenja ili erozije površine matrice. Pri tome se pretpostavljaju savršeni uslovi uranjanja u medijum prijemnik. Kod dispergovanog leka u matrici, što je od posebnog interesa za

kontrolisano otpuštanje lekova, sadržaj leka po jedinici zapremine C_0 je veći od rastvorljivosti leka C_s u matrici, ($C_0 > C_s$). Pod ovim uslovima, početni i granični uslovi za drugi Fikov zakon su [137]:

$$R(0)=h \quad C(h, t)=0 \quad C(R, t)=C_s \quad \text{i} \quad D \frac{\partial C(x, t)}{\partial x} \Big|_{x=R(t)} = (C_0 - C_s) \frac{dR}{dt}. \quad (3.1.2.7)$$

Razvijeno je nekoliko korisnih približnih analitičkih rešenja ove jednačine. Dobro poznati primer je Higučijeva (Higuchi) jednačina, zasnovana na pretpostavci stacionarnog stanja otpuštanja leka:

$$Q_t = \sqrt{C_s (2C_0 - C_s) Dt}, \quad (4.1.2.7)$$

gde je Q_t masa otpuštenog leka po jedinici površine u vremenu t , ili:

$$M_t = A \sqrt{C_s (2C_0 - C_s) Dt}, \quad (5.1.2.7)$$

gde je M_t masa otpuštenog leka u vremenu t i A je površina nosača [37, 138].

Ova jednačina je uglavnom primenjiva samo u početnoj fazi otpuštanja, dok se ne otpusti oko 60% imobilisanog leka.

Nešto precizniju aproksimaciju izveo je Li (Lee):

$$Q_t = \left(\frac{1+H}{\sqrt{3H}} \right) \sqrt{Dt}, \quad (6.1.2.7)$$

gde je $H = 5 \left(\frac{C_0}{C_s} \right) - 4 + \sqrt{\left(\frac{C_0}{C_s} \right) - 1}$.

Oba pristupa se zasnivaju na pretpostavci da je rastvaranje leka brzo u poređenju sa njegovom difuzijom, i oba predviđaju otpuštanje leka koje je linearno sa \sqrt{t} . Ovo je posledica povećanog difuzionog rastojanja na difuzionom frontu, kako otpuštanje leka napreduje.

Ukoliko je početna koncentracija leka u matrici manja ili jednaka njegovoj rastvorljivosti u matrici ($C_0 \leq C_s$), rešavanjem II Fikovog zakona, pod tim uslovima, pod pretpostavkom polu-beskonačne geometrije difuzije, dobija se izraz:

$$Q_t = 2C_0 \sqrt{\frac{Dt}{\pi}}, \quad (7.1.2.7)$$

odnosno:

$$M_t = 2AC_0 \sqrt{\frac{Dt}{\pi}}. \quad (8.1.2.7)$$

Tungov (Tung) model [139] podrazumeva da posle početne faze u kojoj je količina otpuštenog leka srazmerna kvadratnom korenu iz vremena (Higučijev zakon) sledi druga faza u kojoj je otpuštanje leka proporcionalno vremenu i zatim treća faza u kojoj je otpuštanje leka stabilizuje kako se koncentracija antibiotika u okruženju povećava. Po ovom modelu, postojanje druge faze zavisi od vrste antibiotika i njegove rastvorljivosti. Kinetika otpuštanja leka u drugoj fazi mogla bi se objasniti niskom rastvorljivošću leka, gde je otpuštanje kontrolisano rastvaranjem, proporcionalno vremenu [37, 139].

Ukoliko je matrica koja sadrži lek porozna, kao što je to slučaj sa kalcijum fosfatnim materijalima, u obzir bi se trebala uzeti i njena poroznost. Poroznost može da varira u zavisnosti od polaznih materijala i uslova, ali je uglavnom veća od 30 %. Pore mogu biti različitih veličina, ali uglavnom su u mikro i nano opsegu, i obično su manje od 10 μm . U ovom slučaju, može se pretpostaviti da će efektivni koeficijent difuzije leka iz matrice biti srazmeran poroznosti matrice i obrnuto srazmeran zakrivljenosti njenih pora [37]. Imajući sve to u vidu, Otsuka (Otsuka) i sar. su predložili sledeću jednačinu za opisivanje kinetike oslobađanja leka iz porozne matrice [140, 141]:

$$M_t = AM_0 [D' \varepsilon / \tau C_s (2C_0 - C_s) t]^{1/2} \quad (9.1.2.7)$$

gde je M_t količina otpuštenog leka u vremenu t ; M_0 je ukupna količina leka; A je površina nosača; D' je koeficijent difuzije leka kroz nosač; ε je poroznost nosača, τ je zakrivljenost pora, C_s je rastvorljivost leka u nosaču; C_0 je početna koncentracija leka u nosaču.

Korsmajer-Pepasov (Korsmeyer–Peppas) model [142] je opštiji i primenjuje se i na matrice koje degradiraju i kod kojih mehanizam otpuštanja leka često odstupa od Fikovog zakona i sledi anomalno ponašanje opisano sledećom jednačinom:

$$M_t/M_\infty = kt^n, \quad (10.1.2.7)$$

gde je M_t ukupna količina leka otpuštena tokom vremena t , M_∞ količina leka otpuštena posle beskonačnog vremena, k kinetička konstanta, n eksponent otpuštanja. Za cilindrične matrice: $n=0.43-0.5$ – kada važi Fikov zakon (difuzija kontroliše otpuštanje), dok kod anomalnog transporta kod koga je $0.50 < n < 1.0$ ne važi Fikov zakon. Korsmajer-Pepasov model uglavnom nije primenjiv ispod $0.6(M_t/M_\infty)$.

1.2.8. Teorijski model dizajniranja nanosistema dobijenih u periodičnom ultrazvučnom polju

Teorijski model dizajniranja strukture nanosistema [120, 121], dobijenih u periodičnom ultrazvučnom polju, se pokazao efikasnim za povezivanje hijerarhijske strukture sistema i brzine otpuštanja leka, što je po prvi put u literaturi primenjeno u ovoj disertaciji, na primeru otpuštanja antibiotika iz SiO₂ dobijenog ultrazvučnim sprej sušenjem.

Ovaj model omogućava da se definiše struktura nanosistema na različitim hijerarhijskim nivoima, što podrazumeva mogućnost predviđanja veličine kapljica aerosola, nastalih ultrazvučnom atomizacijom, veličine sub-kapljica nastalih u procesu pobude unutar kapljice, kao i iz njih izvedene raspodele veličine čestica i sub-čestica, te udela svake od tih veličina u ukupnoj raspodeli. Model je adaptiran tako da može da se odredi i veličina nanopora između čestica i njihova raspodela, kao uslov za modelna kinetička razmatranja brzine otpuštanja leka. Takva razmatranja, po prvi put u literaturi, izvedena su u ovom radu. To je od izuzetne važnosti jer omogućava precizno modelovanje procesa otpuštanja lekova iz keramičkih sistema.

Teorijske osnove za predviđanje veličine kapljica aerosola i veličine čestica nastalih sušenjem ovih kapljica, date su detaljno u prilogu disertacije. Ovde će biti prikazane samo jednačine bitne za proračun raznih strukturnih elemenata SiO₂ sistema, ispitivanog kao model sistema za otpuštanje lekova.

1.2.8.1. Predviđanje veličine kapljica i čestica

Prečnik kapljica aerosola, nastalih ultrazvučnom atomizacijom rastvora prekursora-silikatnog sola, moguće je odrediti korišćenjem jednačine (1.1.2.8) koja opisuje raspodelu veličine prečnika kapljica SiO₂ sola:

$$d_n = \frac{1}{\pi} \left(\frac{2\sigma\pi}{\rho f^2} \right)^{\frac{1}{3}} [l(l-1)(l+2)]^{\frac{1}{3}}, \quad (1.1.2.8)$$

gde je d_n prečnik kapljice aerosola, σ je površinski napon prekursora, ρ je gustina prekursora, f je frekvencija ultrazvučnog atomizera, a l je ceo broj, $l \geq 2$.

Prečnik čestica SiO₂ praha, nastalih sušenjem aerosola, određuje se pomoću jednačine (2.1.2.8) koja definiše faktor redukcije pri transformaciji kapljice aerosola u česticu:

$$d_p = d_n \left(\frac{c_{pr} M_p}{\rho_p M_{pr}} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (2.1.2.8)$$

gde je d_p prečnik čestice praha, ρ_p – gustina praha, M_p – molarna masa praha, c_{pr} – koncentracija rastvora prekursora i M_{pr} je molarna masa prekursora.

Da bi se odredio udeo svake od diskretnih vrednosti prečnika čestica, koristi se jednačina (3.1.2.8):

$$I_{01} : I_{02} : \dots : I_{0N} = \frac{1}{\Delta f_1} : \frac{1}{\Delta f_2} : \dots : \frac{1}{\Delta f_n}, \quad (3.1.2.8)$$

gde su I_{01}, I_{02}, I_{0N} brojne vrednosti koje definišu frekvenciju (učestalost) pojavljivanja pojedinih diskretnih vrednosti prečnika čestica, dok $\Delta f_1, \Delta f_2, \dots, \Delta f_n$ predstavljaju razliku između stvarnih vrednosti frekvencije od prinudne frekvencije ultrazvučnog generatora. Kada se sve dobijene učestalosti pojavljivanja pojedinih vrednosti prečnika normalizuju na jedinicu, dobija se relacija za izračunavanje učestalosti pojavljivanja svake od tih vrednosti (jednačina 4.1.2.8):

$$I_{01} + I_{02} + \dots + I_{0N} = 1. \quad (4.1.2.8)$$

Jednačine (2.1.2.8), (3.1.2.8) i (4.1.2.8) omogućavaju kvantitativno određivanje veličine i udela svih diskretnih vrednosti prečnika SiO₂ čestica.

1.2.8.2. Predviđanje veličine sub-kapljica i sub-čestica

Nakon određivanja veličine kapljica i čestica, sledeći korak u definisanju strukture sistema je određivanje veličine sub-kapljica nastalih u procesu pobude unutar kapljice i odatle veličine sub-čestica.

Na osnovu modela o sub-dizajnu kapljica aerosola, datog u prilogu disertacije, prečnik sub-kapljica aerosola, određuje se pomoću jednačine (5.1.2.8):

$$d_{sd} = \frac{2Nc}{f}, \quad (5.1.2.8)$$

gde je N brojna konstanta, c je brzina propagacije ultrazvučnih talasa kroz kapljicu aerosola i f je frekvencija ultrazvučnih talasa.

Znajući vrednosti prečnika sub-kapljica, prečnik sub-čestica se računa korišćenjem jednačine (2.1.2.8). Raspodela veličina sub-čestica se računa tako što se brojnoj konstanti N mogu pripisati različite vrednosti (1,21; 1,72; 2,23 itd.), čija varijacija je uslovljena specifičnošću forme sub-kapljica a time i sub-čestica, od sferne, kojoj odgovara najmanji stepen pobude, do elipsoidne, različitih ekcentriciteta, zavisno od stepena pobude.

1.2.8.3. Predviđanje veličine pora

Za razmatranje brzine otpuštanja leka iz SiO₂ sistema, potrebno odrediti i veličinu nanopora između sub-čestica. Da bi se odredila raspodela veličine pora, polazi se od jednačina (1.1.2.8) i (5.1.2.8), koje definišu strukturni dizajn nanositema i jednačine za određivanje ukupne zapremine pora V_p:

$$V_p = 8r^3 - \frac{6}{4} \left(\frac{4}{3} \right) r_{sp}^3 \pi = 2r_{sp}^3 (4 - \pi) \approx 1,72r_{sp}^3 \pi, \quad (6.1.2.8)$$

gde je r_{sp} srednji poluprečnih sub-čestica.

Sa druge strane, srednji poluprečnik pora r_{pora} može da se izrazi jednačinom:

$$\frac{4}{3} r_{pora}^3 \pi = 1,72r_{sp}^3. \quad (7.1.2.8)$$

Za izračunavanje veličine pora, iz eksperimentalnih i teorijskih vrednosti za veličinu sub-čestica koristi se jednačina (8.1.2.8):

$$r_{pora} = \left(\frac{5,16}{4\pi} \right)^{1/3} r_{sp} \approx 0,41r_{sp}. \quad (8.1.2.8)$$

Cilj disertacije

U prvom delu rada ispitivaće se mehanizam formiranja biomimičnog HAP-a na površini dva različita supstrata, metalnog i keramičkog. Čelične trake će biti korišćene kao metalni supstrat na koje će biti naneti tanki filmovi silicijum dioksida, dok će kao keramički supstrat biti korišćen visoko porozni hidroksiapatitini nosač na koji će biti naneti tanki polimerni filmovi (alginat, celuloza, PLGA). Simulirajući telesni fluid (STF), kao i STF kombinovan sa serumom iz fetusa govečeta i sa Iglovim medijumom biće korišćeni kao bioaktivni tečni medijum u kome će se odvijati biomimična nukleacija apatita. Analiziraće se fazni sastav i morfologija nukleiranih faza, kao i zavisnost debljine nukleiranog apatitnog filma od vrste medijuma i vremena boravka u medijumu. Pored toga, biće sprovedena ispitivanja bioprihvatljivosti ovih materijala kroz testove na ćelijskim linijama fibroblasta i na animalnim modelima, od strane saradnika iz bioloških i medicinskih institucija.

U drugom delu rada ispitivaće se brzine otpuštanja antibiotika iz apatitnih i SiO_2 nosača, kao i iz kompozitnih nosača HAP/polimer, koji bi istovremeno služili i kao zamenici kosti u koštanim defektima. Ispitivanja će obuhvatiti dve vrste apatitnih sistema: apatitni porozni nosači (u svojstvu nosača polimera-PLGA u koji je lek inkorporiran) i tablete dobijene kompresijom hidrotermalno dobijenog praha apatita. Pratiće se otpuštanje četiri različita antibiotika koji deluju na bakterijske uzročnike infekcija koštanog tkiva. Ispitaće se primenjivost nekih, već postojećih, jednačina koje opisuju kinetiku otpuštanja lekova. I na kraju, dobijeni podaci o brzini otpuštanja leka biće interpretirani sa aspekta poroznosti nosača, odnosno raspodele veličine pora. Dubinsko povezivanje hijerarhijske strukture sistema i brzine otpuštanja leka biće izvedeno na SiO_2 , dobijenom postupkom sprej sušenja, kao model sistemu.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Biomimična metoda

2.1.1. Priprema supstrata

Pripremljena su dva različita supstrata na kojima će se odvijati biomimična depozicija apatita u bioaktivnom medijumu: metalni- čelične trake na koje su prethodno deponovani silicijum dioksidni filmovi i keramički- porozni apatitni nosač na koji su prethodno naneti tanki polimerni filmovi.

2.1.1.1. Priprema metalnog supstrata

Na trake od nerđajućeg čelika (Sandvik OC 404, debljina 35 μm , širina 3 cm, dužina 10 cm) deponovani su filmovi silicijum dioksida koristešćenjem dvofluidne mlaznice za raspršavanje. Kao prekursor je korišćen silikatni (SiO_2) sol pripremljen na sledeći način:

Vodeni rastvor stakla $\text{Na}_2\text{O}\cdot 3\text{SiO}_2$ je pomešan sa 0,1M rastvorom HCl rastvorom, ukapavanjem rastvora HCl u vodeni rastvor stakla, uz snažno mešanje na magnetnoj mešalici, na temperaturi od 80 °C. U tako pripremljenoj smeši, odnos čvrste i tečne faze bio je 1:4. Posle toga, smeša je prebačena u autoklav i tretirana 3 h na temperaturi od 120 °C i pritisku od 3 bara. Posle ovog tretmana, talog silicijumove kiseline je odvojen od rastvora ultracentrifugiranjem na 10000 obrtaja u minuti, a zatim je dodata dejonizovana voda kako bi se odnos tečne i čvrste faze podesio na 4:1. Takođe je dodata i mala količina HCl. Zatim je ova smeša opet prebačena u autoklav, radi daljeg tretmana pod istim uslovima kao i u prethodnom slučaju. Konačno, talog silicijumove kiseline je odvojen od tečne faze pomoću ultracentrifuge. U drugom koraku pripreme talog silicijumove kiseline je transformisan u sol. To je učinjeno mešanjem 20 g dobijene silicijumove kiseline i 200 ml dejonizovane vode, uz podešavanje pH na 10, dodatkom 0,1M NaOH. Sistem je intenzivno mešan 2 h na 80 °C i pH vrednost je ponovo podešena na 10 dodavanjem 0,1M rastvora NaOH. Ova smeša

je potom prebačena u autoklav i dalje tretirana 8 h na temperaturi od 120° C i pritisku od 3 bara. Nakon hidrotermalne obrade pH vrednost SiO₂ sola bila je 9 .

Tako pripremljeni SiO₂ sol je razblažen do koncentracije od 13,5 %, uveden u staklenu mlaznicu i atomizovan uvođenjem vazduha u mlaznicu kontrolisanim protokom. Mlaznica je pomerana iznad čelične trake, raspršujući rastvor po njenoj površini. Početna temperatura čelične trake iznosila je 420 °C, ali je nakon raspršavanja rastvora spuštена na oko 100 °C. Brzina i smer mlaznice kontrolisani su uz pomoć računara. Brzina mlaznice od 1 cm s⁻¹ obezbedila je dovoljno vremena da deponovane kapi rastvora prekursora prođu kroz nekoliko uzastopnih procesa: otparavanje rastvarača, taloženje prekursora, sušenje, piroliza prekursora i rast filma. Vreme raspršavanja je iznosilo 30 minuta. Debljina deponovanog SiO₂ filma iznosila je 22,5 μm [36].

2.1.1.2. Priprema keramičkog supstrata

Visoko porozni apatit pripremljen je na sledeći način:

Prvo je praškasti hidroksiapatit sintetisan hidrotermalnim postupkom u autoklavu iz (NH₄)₂HPO₄ (Zorka, Šabac) i Ca(OH)₂ (Gramma Libero). Rastvor (NH₄)₂HPO₄ (c=0,05 mol/dm³) je sipan u rastvor Ca(OH)₂ (c=0.06 mol/dm³) uz dinamično mešanje, a pH tako pripremljenog rastvora je podešen na 7,4 dodatkom 0,1M HCl ili (NH₄)OH. U ovu smešu dodata je zatim površinski aktivna supstanca, koja ima zadatak da razdvaja apatitne čestice, a deluje i kao dispergujući agens. Zatim je ovaj rastvor autoklaviran na temperaturi od 150 °C pod pritiskom od 5 bar, u trajanju od 8 h. Posle hidrotermalnog tretmana u autoklavu, precipitat je odvojen dekantovanjem, sušen na 80 °C tokom 48 h, mleven, ispran dejonizovanom vodom i ultracentrifugiran u cilju dobijanja najčistijeg mogućeg HAP-a [143]. Zatim je ovaj dobijeni prah dispergovan u vodi i tretiran mehanohemijski da se smanji veličina zrna.

Dobijanje poroznih apatitnih nosača izvedeno je primenom matrice od poliuretanske pene, ogovarajuće poroznosti, na koju je izvedeno deponovanje apatitne keramičke faze.

Potom je supstrat za biomimičnu depoziciju HAP-a pripremljen na sledeći način: na staklene pločice nanesen je tanak sloj granula poroznog HAP-a (dimenzija 300 μm), a zatim su preko apatitnog sloja naneti tanki filmovi jednog od tri odabrana polimera:

- alginat, Protanal LF 20/40 (FMC Biopolimer),
- hidroksietil celuloza 30000 (SE Tylose GmbH & Co. KG) ili
- PLGA, 50:50 (Durect Corporation).

Pre nanošenja alginat i celuloza su rastvoreni u vodi, a PLGA u hloroformu, tako da se dobiju rastvori koncentracije 1 % w/w.

2.1.2. Priprema biomimičnog medijuma

Kao biomimični medijum korišćen je STF, kao i STF sa dodatkom seruma iz fetusa govečeta (Fetal Calf Serum-FCS) ili Iglvog medijuma (Eagle's Minimum Essential Medium-EMEM). FCS i EMEM su dodati u cilju ubrzavanja nukleacije apatita.

STF je pripremljen po nešto izmenjenoj recepturi, u odnosu na originalni STF, pri čemu su koncentracije pojedinih jona bile: $c(\text{Cl}^-) = 0,054 \text{ mol dm}^{-3}$; $c(\text{Na}^+) = 0,0542 \text{ mol dm}^{-3}$; $c(\text{Ca}^{2+}) = 0,0025 \text{ mol dm}^{-3}$; $c(\text{PO}_4^{3-}) = 0,001 \text{ mol dm}^{-3}$; $c(\text{Mg}^{2+}) = 0,0003 \text{ mol dm}^{-3}$; $c(\text{NO}_3^-) = 0,0006 \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\text{K}^+) = 0,0014 \text{ mol dm}^{-3}$. Koncentracije PO_4^{3-} i Ca^{2+} jona su bile iste, dok su koncentracije ostalih jona nešto manje nego kod originalnog STF-a. pH vrednost STF-a podešena je na 7,4.

2.1.3. Formiranje sloja biomimičnog HAP-a

Čelične trake sa deponovanim SiO_2 filmom su isečene na deliće, od kojih je jedan deo potopljen u STF, drugi deo u STF sa dodatkom FCS-a, dok je treći deo potopljen u STF sa dodatkom EMEM-a. Uzorci su uronjeni u medijum, gde su držani do isteka određenog vremena (10, 14, 20, 33 i 43 dana) na sobnoj temperaturi, pri čemu je dolazilo do nukleacije HAP-a na njihovoj površini.

Pločice sa nanetim granulama poroznog HAP-a, prekrivenim polimernim filmovima, potopljene su u STF gde su držane 6 nedelja na sobnoj temperaturi, u cilju formiranja sloja biomimičnog HAP-a na njihovoj površini.

2.2. Kontrolisano otpuštanje antibiotika

2.2.1. Materijali

Praškasti i porozni hidroksiapatit, koji će biti korišćeni kao nosači antibiotika, sintetisani su po proceduri opisanoj u poglavlju 2.1.1.2.

SiO₂ sol dobijen je hidrotermalnom metodom koja je detaljno objašnjena u poglavlju 2.1.1.1.

Kao polimerni nosač antibiotika korišćena je poli(DL-mlečna-ko-glikolna kiselina), PLGA, sa odnosom ko-polimera 50:50 i opsegom viskoznosti 0,76-0,94 dL/g (Durect corporation, SAD). Pri sintezi sistema za otpuštanje na bazi PLGA, korišćene su i sledeće hemikalije:

- glicerol triacetat (triacetin) - Alfa Aesar, Nemačka
- polietilenglikol 400 (PEG 400) - Alfa Aesar, Nemačka
- polisorbat 80 (Tween 80) - Alfa Aesar, Nemačka
- sorbitan monostearat (SPAN 80) - Alfa Aesar, Nemačka
- Migliol 812 - Axo Industry, Belgija.

Praćeno je otpuštanje četiri različita antibiotika iz pomenutih apatitnih sistema:

- Metronidazol (komercijalni naziv Orvagil, Galenika, Beograd)
- Ciprofloksacin (kom. naziv Ciprocinal, Zdravlje, Leskovac)
- Klindamicin fosfat (kom. naziv Klindamicin, Hemofarm, Vršac)
- Tigeciklin (Wyet Europa Ltd., Velika Britanija)

2.2.2. Inkapsulacija antibiotika

2.2.2.1. Inkapsulacija antibiotika u polimer

Antibiotik (metronidazol) je inkapsuliran u polimernu matricu PLGA, koja je zatim inkorporirana u porozni nosač. Inkapsulacija antibiotika u polimer urađena je na dva različita načina.

Prvi način podrazumeva mehaničku inkorporaciju antibiotika u polimer, koja je izvedena u mlinu sa kuglama. Granule PLGA su zajedno sa antibiotikom ubačene u mlin sa kuglama, uz dodatak male količine acetonitrila i mlevene do potpune

homogenizacije. Dobijena gumolika masa naneta je preko granula poroznog apatita, koje su zatim stavljene u peć na temperaturu od 150 °C (prethodno je utvrđeno da lek ostaje stabilan na toj temperaturi), da bi se polimer otopio i tako bolje penetrirao u pore poroznog HAP-a. Nakon hlađenja polimer je očvrstnuo i tako je dobijen kompozitni nosač antibiotika koji čini porozna apatitna matrica unutar čijih pora je inkorporiran PLGA sa inkapsuliranim antibiotikom.

Drugi način podrazumeva pripremu mikrosfera PLGA u koje je inkapsuliran antibiotik. Mikrosfere su pripremljene metodom *in situ* očvršćavanja polimera, koja podrazumeva prvo pripremu disperzije PLGA mikroglobula u kojoj se nalazi i antibiotik, a zatim injektiranje ove disperzije u vodu ili PBS pri čemu dolazi do očvršćavanja mikroglobula i nastaju mikrosfere koje sadrže zarobljen antibiotik. Disperzija je pripremljena na sledeći način:

PLGA je rastvoren u triacetinu uz mešanje na magnetnoj mešalici i zagrevanje na temperaturi od 65 °C. Rastvor je ohlađen na sobnu temperaturu i u njega je dodat antibiotik tigecikli, rastvoren u PEG-u 400. Ova smeša je mešana na magnetnoj mešalici 5 minuta, zatim je dodat Tween 80 i mešanje je nastavljeno narednih 5 minuta da bi se formirala uljna faza 1. Span 80 je rastvoren u Migliolu 812, što predstavlja uljnu fazu 2. Uljna faza 1 je u kapima dodavana u uljnu fazu 2, uz homogenizaciju centrifugiranjem na 10 000 o/min da bi se formirala disperzija PLGA mikroglobula u kontinualnoj fazi koju čine triacetin, PEG 400 i Migliol 812, i koja je stabilizovana prisustvom Tween-a 80 i Span-a 80.

Mikroglobule PLGA su izdvojene iz ove disperzije dekantovanjem i nanete na granule poroznog apatita, koje su zatim uronjene u fosfatni pufer (PBS- phosphate buffered saline), gde je došlo do očvršćavanja PLGA. Tako je postignuto da se unutar pora apatitnog nosača nalazi PLGA sa inkapsuliranim antibiotikom.

Stepen inkapsulacije izračunat je poređenjem mase inkapsuliranog leka i ukupne mase leka ($m_{in}/m_{uk} * 100$). Masa inkapsuliranog leka određena je oduzimanjem mase neinkapsuliranog leka od ukupne mase leka, dok je masa neinkapsuliranog leka (zaostala količina leka u vodenoj fazi) nakon inkapsulacije određena UV-VIS spektrofotmetrijom.

2.2.2.2. Dobijanje tableta

Tablete su dobijene kompresijom apatitnog praha pomešanog sa antibiotikom, u praškastom obliku, na hidrauličnoj presi, pod različitim pritiscima (16, 62, 94, 125 i 156 MPa). Pre kompresije praškasta smeša apatita i antibiotika homogenizovana je u avanu sa tučkom. Dobijene tablete bile su prečnika 10 mm i debljine 2 mm.

Antibiotici su dodavani u količini od 0,5 mas. %, u odnosu na masu apatita. Pored toga, u slučaju tigeciklina, napravljeno je više različitih sastava (1, 2, 3 i 5 mas. %), da bi se ispitaio uticaj koncentracije antibiotika na brzinu njegovog otpuštanja iz tableta.

2.2.2.3. Inkapsulacija antibiotika metodom ultrazvučnog sprej sušenja

Rastvor prekursora za ultrazvučno sprej sušenje pripremljen je razređivanjem silikatnog sola vodom, do koncentracije od 18 mg/ml. U tako pripremljen rastvor dodat je antibiotik metronidazol ($c=0,18$ mg/ml). Ovaj rastvor je zatim raspršavan u aerosol pomoću ultrazvučnog atomizera i nošen strujom vazduha kroz cevnu peć, a dobijeni prah je prikupljan na kraju cevi. Eksperimentalni uslovi bili su sledeći: frekvencija ultrazvučnog raspršivača – 1,7 MHz, radna temperatura u cevnoj peći - 300 °C i protok gasa nosača/ vazduha – 0,011 m/s.

2.3. Metode karakterizacije

Infracrvena spektroskopija je korišćena za analizu faza biomimično nukleiranih na površini metalnog i keramičkog supstrata, kao i za karakterizaciju apatitnog praha i praha SiO₂, dobijenog sprej sušenjem. Nukleirane faze analizirane su pomoću IC spektrofotometra sa Furijeovom transformacijom (Nicollet 380 FT-IR, Termo Electron Corporation) tehnikom ometene totalne refleksije (ATR) dok je IC spektrofotometar (PERKIN ELMER 983G), sa KBr pastilom, korišćen je za karakterizaciju apatitnog praha i praha SiO₂, dobijenog sprej sušenjem. IC spektri snimani su u spektralnom opsegu od 4000 do 400 cm⁻¹.

Difrakcija rentgenskih zraka (XRD) je korišćena za analizu biomimetično dobijenih faza, kao i za faznu analizu hidrotermalno dobijenog praha apatita i određivanje veličine kristalita i parametara rešetke. Merenja su vršena na instrumentu Philips PW 1050 sa Cu-K α 1-2 lampom. Podaci su prikupljeni u opsegu 2 θ od 9 do 67°, sa korakom od 5° i vremenom ekspozicije od 2 sekunde po koraku. Veličina kristalita računata je po Šererovoj formuli:

$$d = K\lambda/B\cos\theta,$$

gde je d (nm) srednji prečnik kristalita, K je faktor oblika, B je širina (121) difrakcionog pika na polovini maksimalne visine, λ je talasna dužina primenjenih X-zraka i θ je Bregov difrakcioni ugao.

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) korišćena je za ispitivanje morfologije i mikrostrukture supstrata i apatita nukleiranog na njegovoj površini, za analizu morfologije i raspodele veličine čestica praškastog apatita i za analizu mikrostrukture zidova pora poroznog apatita, kao i za ispitivanje morfologije silicijum dioksidnih čestica i njihove hijerarhijske strukture, posebno sa stanovišta raspodele veličine pora. Uzorci su prevučeni zlatom i posmatrani pod mikroskopom JEOL JSM-5300.

Mikroskopija atomskih sila (atomic force microscopy- AFM) korišćena je za ispitivanje morfologije i strukture tankih filmova SiO₂, kao i filmova HAP-a nukleiranih na SiO₂ filmovima nakon različitih perioda nukleacije. AFM ispitivanja su rađena korišćenjem mikroskopa tipa Quesant, u polu-kontaktom režimu rada (tapping mode), u vazduhu i na sobnoj temperaturi. Pri tome su korišćene standardne silikonske igle i konstantna sila od 40 N m⁻¹. Tačnost određivanja srednjeg prečnika čestica poboljšana je dekonvolucijom, korišćenjem Quesant SMP (Scanning Probe Microscope) programa.

Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM) korišćena je za ispitivanje raspodele veličine čestica SiO₂ sola i njihove sub-strukture. Uzorak je pripremljen razblaživanjem SiO₂ sola do koncentracije koja omogućava posmatranje pojedinačnih čestica, a zatim je nanet na karbonsku mrežicu i posmatran pod mikroskopom JOEL JEM 2000 FX.

Dinamičko rasejanje svetlosti je korišćeno za određivanje veličine čestica SiO₂ sola. Merenja su vršena korišćenjem intenzivne laserske ekscitacije od 135 mW, na 514,5 nm i uglom detekcije od 90° (Light Scattering System BI-200SM, Brookhaven Instruments). Raspodela veličina čestica je izračunata korišćenjem softvera za izračunavanje veličine čestica (Brookhaven Instruments Particle sizing software).

Energetski disperziona rentgen spektroskopija (Energy dispersive X-ray spectrophotometry- EDS, KKS 2000 - Oxford instruments) u kombinaciji sa skenirajućom elektronskim mikroskopom i višekanalnim analizatorom korišćena je za elementarnu analizu, u cilju procene hemijske homogenosti samonukleiranog HAP-a. Ca/P odnos je određen korišćenjem ZAF (Link Company) softverskog paketa.

BET metoda je korišćena za određivanje debljine apatitnog filma, nukleiranog u biomimetičnom medijumu, kao i za određivanje parametara poroznosti tableta i nepresovanog praha apatita, od koga su napravljene. Specifična površina uzoraka merena je na osnovu adsorpcije azota na -196 °C, koristeći Varian Aerograf (model 920) gasni hromatograf opremljen TCD detektorom. Instrument je visoko osetljiv i omogućava merenje veoma malih površina (i do 0,1 m²). Pre merenja, uzorci su tretirani 2 h na 150 °C u struji helijuma, u cilju potpunog degaziranja. Nakon toga, gasna smeša od 27 vol.% azota u helijumu je puštena preko uzorka (protokom 30 cm³/min) i ćelija sa uzorkom je ohlađena potapanjem u tečni azot. Hladeći se, uzorak je adsorbovao određenu količinu azota iz gasne struje dok adsorpciona ravnoteža nije postignuta. Posle uklanjanja kupatila sa tečnim azotom, uzorak je zagrejan i adsorbovani azot se oslobodio, što je registrovano na TCD detektoru. Kad je desorpcija završena, poznata zapremina azota (0,5 cm³) je dodata u struju gasne smeše azot-helijum. Poređenjem desorpcionih i kalibracionih pikova, zapremina adsorbovanog azota po uzorku je izračunata i specifična površina uzorka je određena pomoću BET (Brunauer, Emmett, Teller) metode (zasnovane na korelaciji $p/(V_{ads}(p_0 - p))$ vs. p/p_0 , gde je p_0 pritisak zasićenja, p je ravnotežni pritisak i V_{ads} je apsorbovana zapremina azota). Srednji i maksimalni poluprečnik pora i kumulativna zapremina svih pora određeni su korišćenjem Leklo-Pirarove (Lecloux, Pirard) metode zasnovane na Dolimor-Hilovoj (Dollimore, Heal) standardnoj apsorpcionoj izotermi za određivanje veličine pora [144]. Debljina nukleiranih apatitnih filmova je dalje izračunata iz podataka o masi filma i

ukupnoj zapremini pora u filmu. Prilikom određivanja parametara poroznosti praha apatita, pretpostavljeno je da su sintetisane čestice praha sferoidi, što je omogućilo izračunanje srednjeg prečnika čestica ($dBET = 6/\rho Sp$), gde je Sp specifična površina i $\rho = 3.156 \text{ g/cm}^3$ je teorijska gustina apatitnog praha.

Živina porozimetrija korišćena je za određivanje raspodele veličine pora u tabletama dobijenim presovanjem praha apatita. Merenja su urađena na porozimetru Carlo Erba Porosimeter 2000 koristeći softverski sistem Milestone 200. Ovaj porozimetar radi u opsegu pritisaka od 0,1 do 200 MPa, omogućavajući detektovanje pora veličine od 7,5 do 15000 nm.

UV-VIS spektrofotometrija je korišćena za praćenje brzine otpuštanja antibiotika iz nosača u koje su inkapsulirani. U cilju praćenja otpuštanja antibiotika komadi poroznog nosača, odnosno tablete potapani su u PBS (pH=7,4), na temperaturi od 37 °C, uz stalno mešanje na magnetnoj mešalici. Zapremina PBS u slučaju poroznog nosača iznosila je 50 ml, a u slučaju tableta 40 ml. Otpuštanje metronidazola iz SiO₂ praha, praćeno je nakon potapanja ovog praha u 10 ml PBS-a, na 37 °C uz stalno mešanje. Prah je prethodno upakovan u papirnu membranu, kako bi bio fizički odvojen od medijuma za otpuštanje. Otpuštanje, tj. promena koncentracije leka u datoj zapremini PBS-a, praćeno je uz pomoć UV-VIS spektrofotometra (Shimadzu 1800), merenjem apsorbance na određenoj talasnoj dužini (metronidazol- 320 nm, ciprofloxacin- 271 nm, klindamicin- 200 nm i tigeciklin 245 nm), u određenim vremenskim intervalima. U svrhu merenja apsorbance uziman je alikvot od 3 ml rastvora, a dodavano je 3 ml svežeg PBS-a, kako bi se simulirao stalni tok telesnog fluida u organizmu. Iz izmerene apsorbance koncentracija je određivana na osnovu kalibracionih krivih, koje povezuju ove dve veličine.

3. REZULTATI I DISKUSIJA

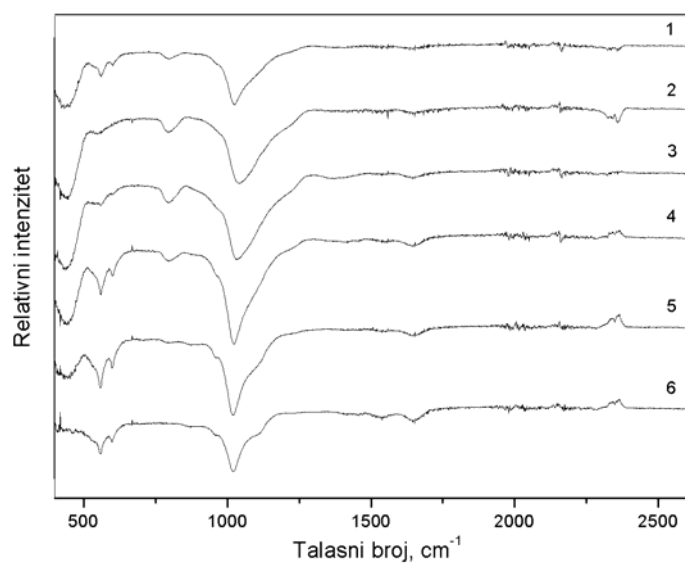
3.1. Biomimična metoda

3.1.1. Metalni/SiO₂ supstrat

Faze, nukleirane tokom biomičnog tretmana supstrata u STF-u, ispitane su korišćenjem metoda IC spektroskopije, difrakcije X zraka, AFM i SEM mikroskopije.

3.1.1.1. Rezultati FT-IC analize

FT-IC spektri nukleiranog apatitnog filma nakon različitog vremena boravka u STF-u, prikazani su na slici 8.



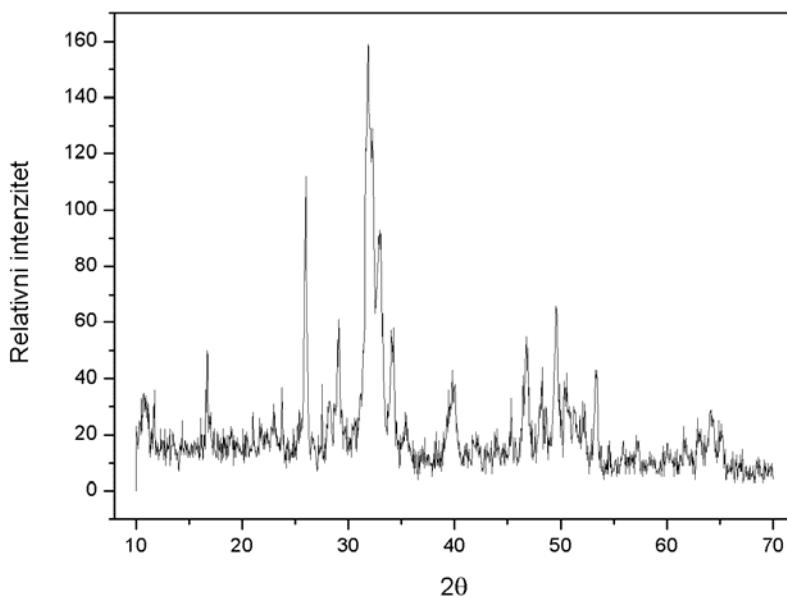
Slika 8. FT-IC spektri nukleiranog apatitnog filma nakon različitog vremena boravka u STF-u: 1- 10 dana; 2- 20 dana; 3- 33 dana; 4- 43 dana; 5- 14 dana, dodatak EMEM-a; 6- 14 dana, dodatak FCS-a

Trake uočljive na spektru na 2340 cm⁻¹ mogu se pripisati istežućim vibracijama OH⁻ grupa koje se nalaze na krajevima SiO₂ lanaca. Trake od 1643 do 1649 cm⁻¹ odgovaraju savijajućim vibracijama OH⁻ grupa i iz SiO₂ lanaca i iz HAP-a, a trake na 600 do 662 cm⁻¹ slobodnim vibracijama OH⁻ grupa. Trake između 1018 i 1043 cm⁻¹

odgovaraju transverzalnim asimetričnim vibracijama Si-O-Si lanaca, a trake od 791 do 802 cm^{-1} pripadaju ljuljajućim vibracijama Si-O-Si lanaca, dok trake od 432 do 451 cm^{-1} odgovaraju transverzalnim ljuljajućim vibracijama Si-O-Si lanaca. Trake koje se pojavljuju na 1018 do 1043 cm^{-1} pripadaju asimetričnim istežućim vibracijama PO_4^{3-} grupa, dok trake od 550 do 563 cm^{-1} potiču od ν_2 simetričnih istežućih vibracija. Trake od 432 do 451 cm^{-1} delom pripadaju ν_2 simetričnim vibracijama PO_4^{3-} grupa [36].

3.1.1.2. Rezultati XRD analize

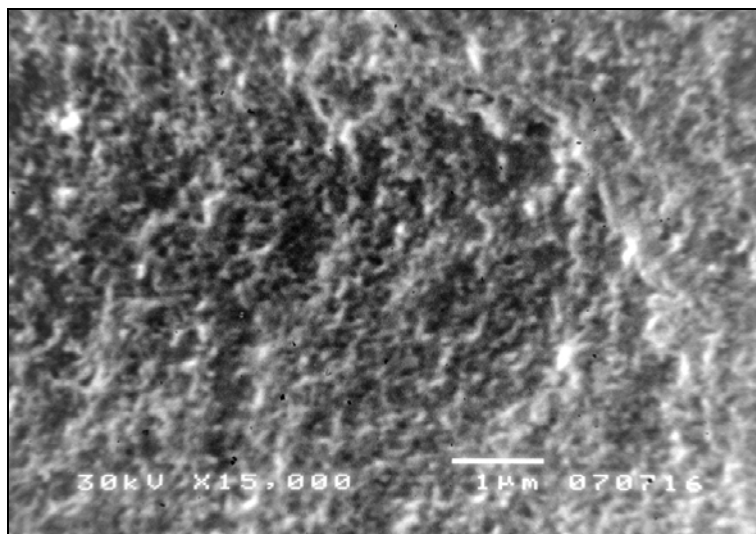
Karakteristični difrakcioni pikovi na 28,95; 31,86; 49,56 i 53,32° (slika 9), koji odgovaraju (121), (120), (123) i (004) ravnima, pokazuju da faza, nukleirana na površini SiO_2 filma, predstavlja hidroksiapatit. Veličina kristalita, izračunata pomoću Šererove formule, posmatrajući ravan (121), iznosi 9,3 nm.



Slika 9. Difraktogram nukleiranog HAP-a na SiO_2 filmu

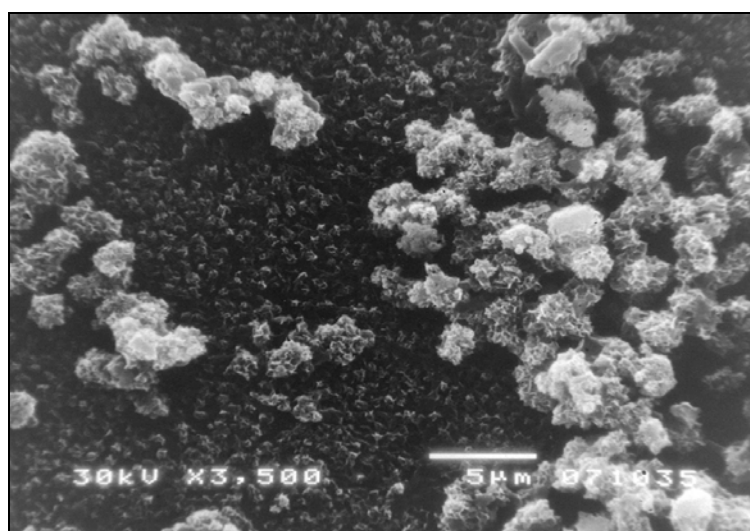
3.1.1.3. Rezultati SEM mikroskopije

SEM snimak silicijum-dioksidnog filma, nanetog na čeličnu traku, prikazan je na slici 10. Može se uočiti kako slojevi filma naležu jedan preko drugog, kao i jako fina poroznost filma sa porama veličine od 100 -150 nm.

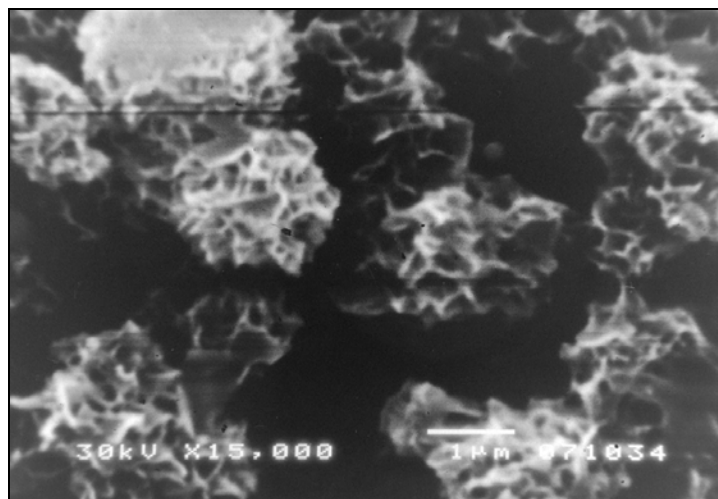


Slika 10. SEM snimak SiO₂ filma

Struktura i morfologija nukleiranog apatita na površini SiO₂ filma mogu se videti na SEM snimcima, prikazanim na slici 11. Način nukleacije apatita sedimentiranjem slojeva jedan na drugi sve do završne debljine apatitnog filma jasno se vidi na slici 11a. Srednji prečnik čestica iznosi oko 1,5 µm. Na slici 11b se može uočiti jako razvijena morfologija nukleiranih čestica koje su oblika cveta maslačka. Pore na površini čestica nepravilnog su oblika i njihove dimenzije se kreću od 120 do 340 nm.



a)



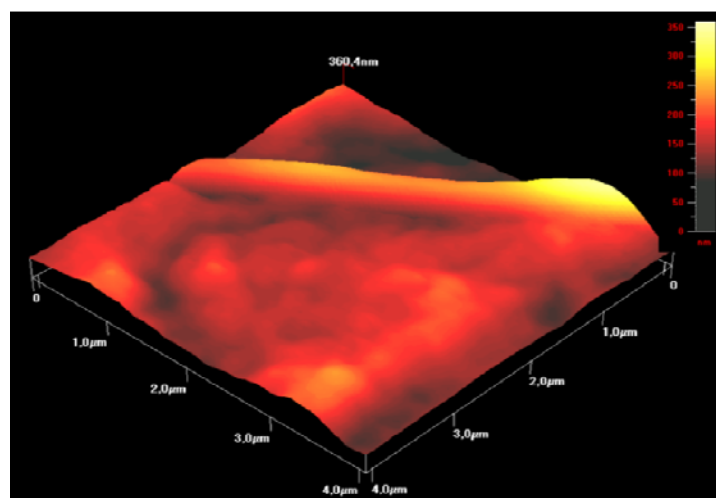
b)

Slika 11. SEM snimci nukleiranog apatitnog sloja na površini SiO_2 filma

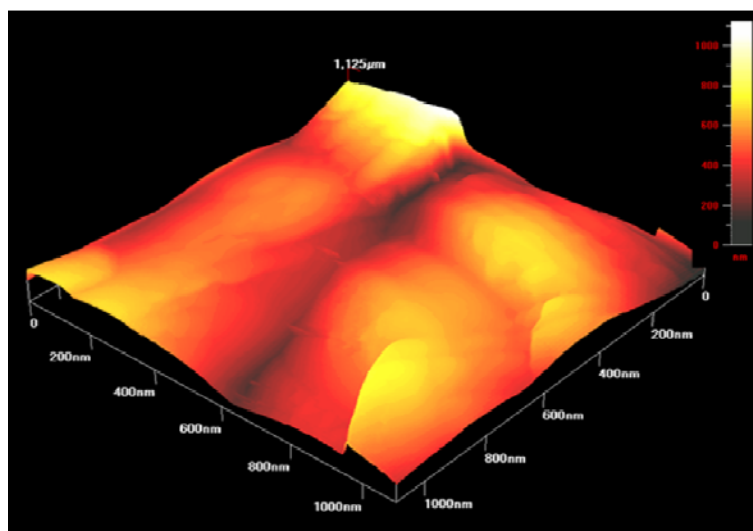
3.1.1.4. Rezultati AFM mikroskopije

Pred SEM mikroskopije, za izučavanje morfologije SiO_2 filma, kao i nukleiranog apatitnog filma, korišćena je AFM mikroskopija jer daje bolji uvid u trodimenzionalnu strukturu uzorka, što olakšava objašnjavanje mehanizma nukleacije HAP-a.

Tipičan izgled tankog filma SiO_2 , debljine $22,5 \mu\text{m}$, deponovanog na površinu čelične trake, prikazan je na slici 12, dok se na slici 13 može videti tipičan izgled nukleiranog apatitnog filma na površini SiO_2 filma, nakon 33 dana nukleacije u STF-u.

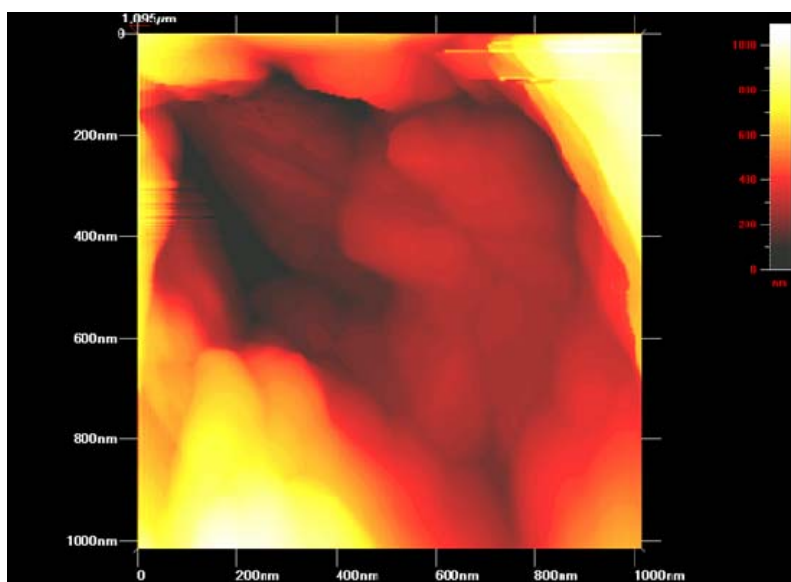


Slika 12. AFM snimak SiO_2 filma



Slika 13. AFM: Tipičan izgled nukleiranog filma HAP-a

Na slici 14 mogu se videti čestice sekundarnog HAP-a, nukleiranog u šupljinama prvobitno formiranog apatitnog filma. Takođe, slike 13 i 14 ukazuju na mehanizam nukleacije apatitnog filma, koje se taloži sloj po sloj, formirajući “ostrva”, različitog oblika i veličine. Belom bojom su predstavljene oblasti sa najvećom debljinom apatitnog sloja.



Slika 14. AFM: Tipičan izgled sekundarno nukleiranog HAP-a unutar šupljina u primarno nukleiranom filmu

3.1.1.5. Debljina filma nukleiranog HAP-a

Masa nukleiranog apatitnog filma zavisi od vremena boravka metalnih traka prevučениh filmom silicijum dioksida u STF-u, kao i od vrste korišćenog medijuma, kao što se može videti u Tabeli 2.

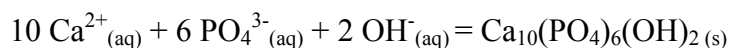
Tabela 2. Debljine nukleiranog apatitnog filma na površini SiO_2 filma

Medijum	Vreme nukleacije apatita, dani	Masa apatitnog filma, mg	Specifična površina filma, m^2/g	Specifična zapremina pora, cm^3/g	Debljina apatitnog filma, μm
STF	10	0,2	-	-	-
	20	0,6	94	0,116	2,7
	33	1,2	102	0,107	4,9
	43	1,4	112	0,097	6,2
STF+EMEM	14	1,3	110	0,100	4,8
STF+FCS	14	1,1	105	0,110	4,1

Debljina nukleiranih apatitnih filmova je određena na osnovu podataka o masi filma i ukupnoj zapremini pora u filmu, koristeći Lecloux-Pirar-ovu metodu, i ona je iznosila od 2.7 – 6.2 μm . Najveća vrednost (6.2 μm) odgovara najdužem periodu nukleacije (43 dana), dok najmanja, bliska nuli, odgovara vremenu nukleacije od 10 dana. Takođe, može se primetiti značajan uticaj FCS-a i EMEM-a na proces nukleacije. Debljina filma dobijena za period nukleacije od 14 dana, u STF-u sa dodatkom FCS-a ili EMEM-a slična je po vrednosti debljini filma postignutoj za 33 dana, u čistom STF-u. Ovo znači da vreme nukleacije može biti značajno skraćeno dodatkom ovih bioaktivnih medijuma.

3.1.1.6. Mehanizam nukleacije HAP-a na SiO_2

Do nukleacije dolazi kada se čelične trake prevučene sa SiO_2 potope u STF koji sadrži Na^+ jone [145]. Ovi joni se inkorporiraju u nano-pore tankog SiO_2 filma uslovljavajući porast lokalne pH vrednosti na površini filma. Rezultujuća alkalna pH vrednost favorizuje heterogenu nukleaciju HAP-a koja se odvija po sledećoj reakciji:



Reakcija otpočinje privlačenjem pozitivno naelektrisanih Ca^{2+} jona na površinu SiO_2 filma. U sledećem koraku, negativno naelektrisani PO_4^{3-} joni bivaju privučeni na površinu i to dovodi do stvaranja kalcijum fosfata. Kada je HAP formiran na površini, presićenost STF-a favorizuje dalju nukleaciju HAP-a, jer je energija aktivacije heterogene nukleacije HAP-a na površini manja od energije potrebne za homogenu nukleaciju u STF-u [146]. Dakle, apatitni film nastavlja da se formira na prvobitno formiranom sloju apatita, sloj po sloj, i spontano raste uzimajući kalcijumove i fosfatne jone iz STF-a [147].

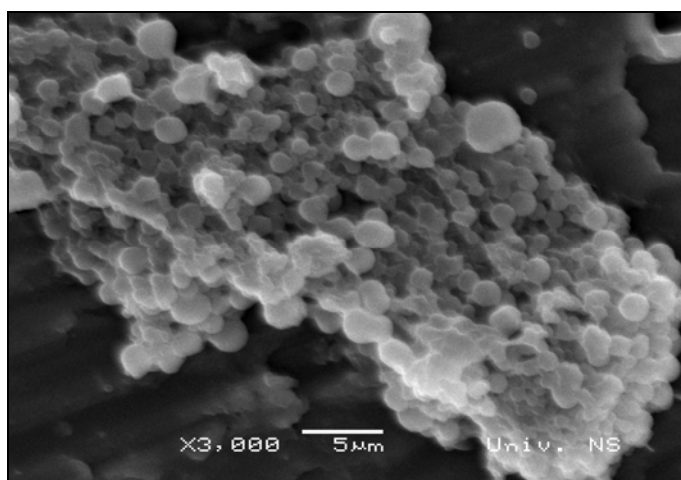
Sledeću fazu nukleacije HAP-a se najverovatnije pokreću kapilarne sile izazvane malim prečnikom kanala između ostrva formiranog HAP-a (slika 13). Ova sila prouzrokuje klizanje ivica apatitnih ostrva u kanale. To favorizuje proces sekundarne nukleacije unutar već formiranih tankih filmova HAP-a. Do sličnih zaključaka, došli su i Song i sar. [147], koji su utvrdili da su apatitna jezgra formirana nakon otprilike dve nedelje od potapanja supstrata u STF. Oni su zaključili da formirana jezgra HAP-a nastavljaju da rastu i da dolazi do popunjavanja praznina na površini supstrata, ali nisu objasnili kako se to tačno dešava. Predloženi mehanizam klizanja je verovatno odgovoran za pokretanje sekundarne nukleacije. Mada, proces sekundarne nukleacije može uključiti oba mehanizma: prvi izazvan kapilarnim silama i drugi, već pomenut, tipičan za formiranje ostrva (slika 14).

Dodatkom seruma iz fetusa govečeta i Iglovog medijuma u STF, pored nukleacije čiji je mehanizam već opisan prethodno, značajan je i uticaj prisutnih amino grupa u FCS-u i delova naelektrisanih proteina u EMEM-u. Oni deluju kao dodatni i vrlo efikasni centri nukleacije svojim polarnim dejstvom, koje po mehanizmu „PILP“ (polymer induced liquid precursor-polimer indukovani tečni prekursor) uslovljava ubrzanu nukleaciju apatita kroz proces vezivanja kalcijumovih jona na datim aktivnim centrima, a potom simultanim vezivanjem fosfatnih jona.

3.1.2. Keramički/polimerni supstrat

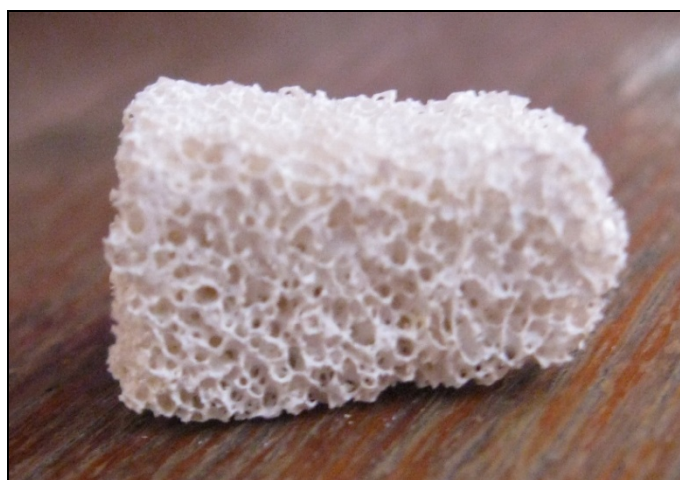
3.1.2.1. Strukturne i morfološke karakteristike apatitnog praha i apatitnog poroznog nosača

Praškasti HAP, korišćen za sintezu poroznog HAP-a, ima veoma finu strukturu, koja se sastoji od aglomerata, sličnih po obliku i veličini (1 - 5 μ m) i koji su izgrađeni od čestica veličine 200 nm, kao što se može videti na SEM snimku prikazanom na slici 15.



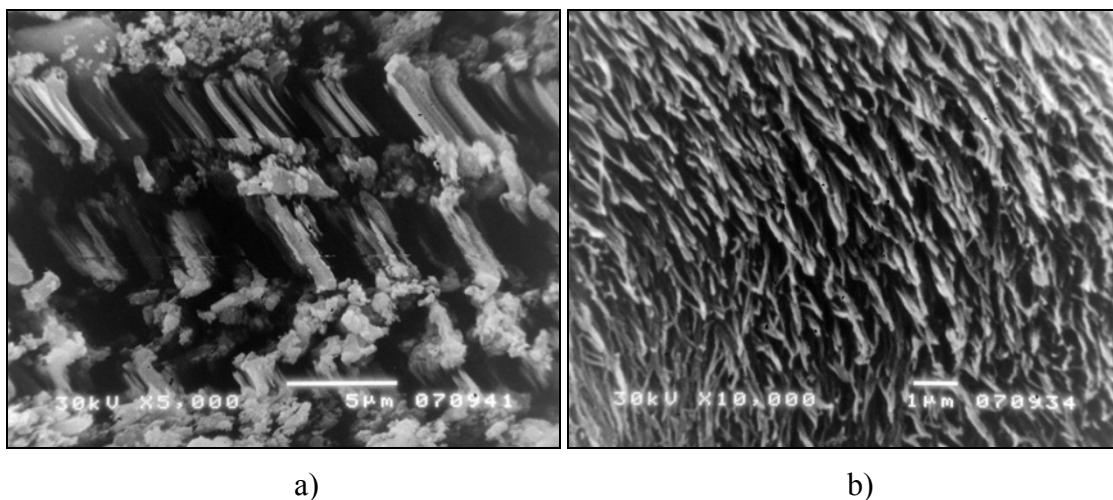
Slika 15. SEM snimak apatitnog praha

Apatitni nosač, sintetisan iz praškastog apatita, ima veoma poroznu 3D strukturu (slika 16). Pore su cilindrične i međusobno povezane, prečnika od 0,1 do 1 mm, a najbrojnije su one sa prečnikom od 0,2 do 0,3 mm.



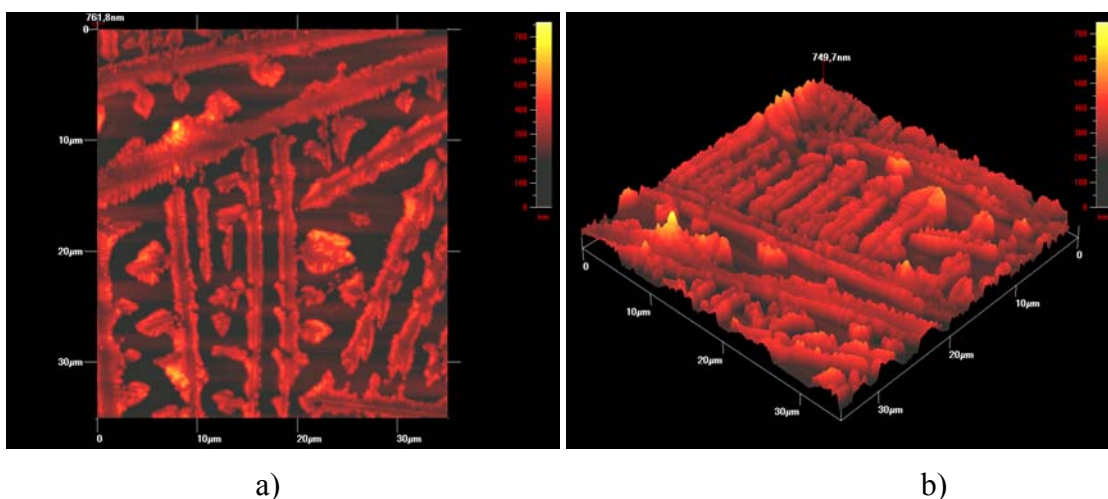
Slika 16. Fotografija poroznog HAP-a

Takođe, sintetisani porozni HAP poseduje veoma definisanu unutrašnju geometriju-poroznost, sa porama prečnika od 200 nm do 1 μm (slika 17). Na slici 17b može se videti igličasta struktura zidova pora, sa dužinom iglica od 1 μm i prečnikom 50 nm.



Slika 17. SEM: Tipičan izgled zidova poroznog HAP-a

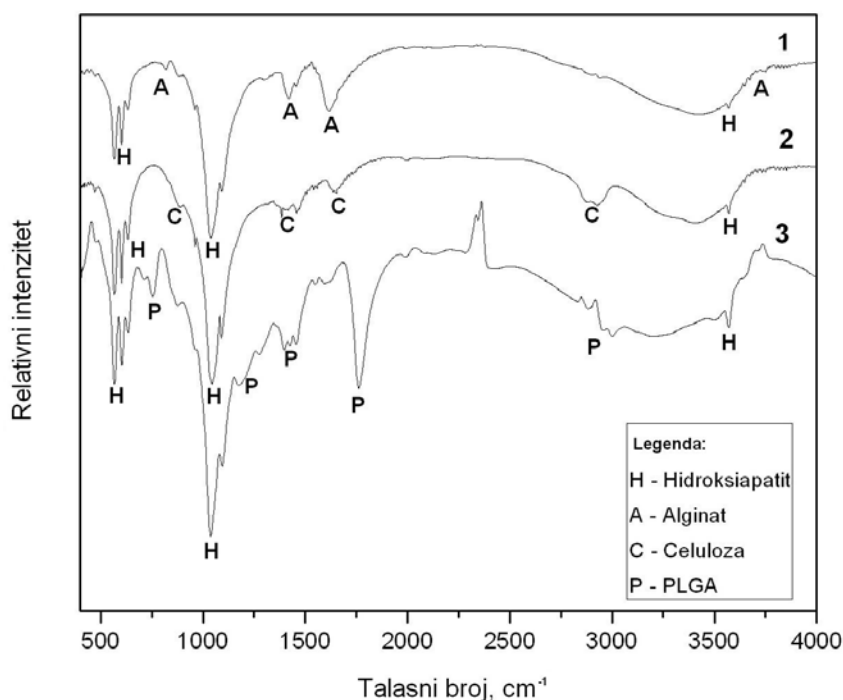
Na AFM snimcima se može videti orijentacija pora dirigovana matricom od polimerne pene (slika 18), pri čemu su dimenzije grana između njih: dužina- 30 μm , širina- 3 μm i debljina 3-5 μm .



Slika 18. AFM snimci poroznog HAP-a: a) 2D snimak, b) 3D snimak

3.1.2.2. Rezultati FT-IC analize

Analiziranjem FT-IC spektra zaključeno je da faza, formirana biomimično na površini HAP/polimer kompozita, hidroksiapatit blago promenjene stehiometrije (slika 19). Sva tri IR spektra na slici 19 pokazuju trake karakteristične za HAP: slab pik koji odgovara istežanju OH⁻ grupa uočen je na oko 3570 cm⁻¹; trake na oko 1640 cm⁻¹ odgovaraju savijajućim vibracijama OH⁻ grupa, a trake na 600 do 650 cm⁻¹ slobodnim vibracijama OH⁻ grupa; trake koje se javljaju na 970-1090 cm⁻¹ pripadaju asimetričnim istežućim vibracijama PO₄³⁻ grupa, dok trake od 550 do 640 cm⁻¹ potiču od simetričnih istežućih vibracija PO₄³⁻ grupa; trake od 430 do 450 cm⁻¹ delom pripadaju v₂ simetričnim vibracijama PO₄³⁻ grupa.



Slika 19. FT-IC spektri nukleiranog apatitnog filma na poroznom HAP-u prevučenom različitim polimernim filmovima: 1- alginat, 2 – celuloza, 3 – PLGA

Trake karakteristične za svaki od polimera su takođe prisutne na odgovarajućim IC spektrima:

Alginat: trake prisutne na oko 3500-3700 cm⁻¹ pripisuju se istežućim vibracijama OH⁻ grupa; trake na 1615-1420 cm⁻¹ odgovaraju asimetričnom i simetričnom istežanju COO⁻ grupa, respektivno; trake na oko 1640 cm⁻¹ se mogu

pripisati vodi vezanoj za polimer; trake na oko 1300 cm^{-1} odgovaraju vibracijama polimernog lanca; trake koje pripadaju asimetričnom istezanju C-O-C na oko $1080 - 1020\text{ cm}^{-1}$ su delimično skrivene trakama koje odgovaraju apatitu; trake prisutne na oko 820 cm^{-1} pripisuju se kombinaciji sledećih vibracija: savijajuće vibracije - CCO i - CCH grupa i uvijajuće vibracije C=O grupe [148, 149].

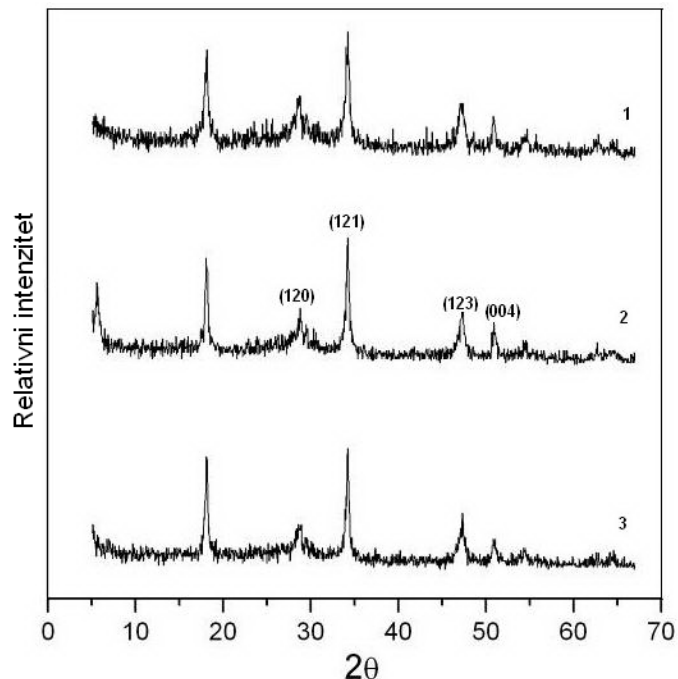
Celuloza: trake na 2920 i 2940 cm^{-1} odgovaraju istezanju C=O i C-H grupa, respektivno; trake oko 2900 cm^{-1} pripadaju O-H istezanju, dok trake na 1640 cm^{-1} odgovaraju savijanju O-H iz apsorbirane vode; trake na 1590 cm^{-1} potvrđuju prisustvo COO^- grupe; trake na oko 1430 cm^{-1} se pripisuju HCH i OCH savijajućim deformacijama u ravni dok traka na oko 1380 cm^{-1} odgovara C-H savijanju; trake na oko 900 cm^{-1} pripadaju COC, CCO i CCH deformacijama i istežućim vibracijama koje odgovaraju pomeranjima of C-5 and C-6 atoma [150, 151].

PLGA: trake registrovane na 2995 cm^{-1} odgovaraju C-H asimetričnom istezanju, dok trake na oko 2950 i 2880 cm^{-1} pripadaju C-H simetričnom istezanju; izražena traka na 1760 cm^{-1} se pripisuje C=O istezanju; trake na oko $1100 - 1280\text{ cm}^{-1}$ odgovaraju C-O-C istezanju, trake uočene od 1400 do 1500 cm^{-1} odgovaraju CH_2 , CH_3 , i CH deformacijama; traka na oko 750 cm^{-1} pripada ljuļajućim vibracijama dugog CH_2 lanca [152, 153].

3.1.2.3. Rezultati XRD i EDS analize

Prisustvo difrakcionih pikova koji odgovaraju ravnima (121), (120), (123) i (004) jasno pokazuje da je HAP formiran na površini svih ispitivanih polimernih filmova (celuloza, alginat i PLGA), deponovanih na površinu poroznog apatitnog nosača (slika 20).

Računanjem veličine kristalita, po Šererovoj formuli, pokazalo da postoje veoma male razlike u stepenu kristalnosti između različitih uzoraka (prosečna veličina kristalita je: za celulozu 20 nm alginat 22 nm i PLGA 24 nm). Iako je najmanja vrednost veličine kristalita dobijena za HAP samonukleiran na površini od celuloze, a najveća vrednost za PLGA, ove razlike su zanemarljive.



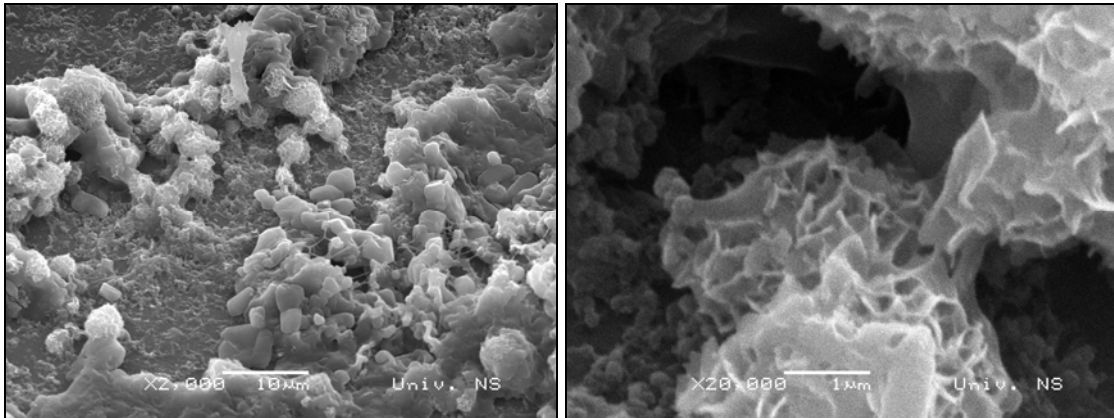
Slika 20. Difraktogram HAP-a samonukleiranog na različitim polimernim filmovima: 1-celuloza, 2-alginat, 3- PLGA

Pored toga, polu-kvantitativna hemijska analiza, urađena EDS-om, pokazala je da su vrednosti odnosa Ca/P, za HAP formiran na površini svih polimera, slični vrednosti za stehiometrijski HAP (za celulozu 1,58; alginat 1,62 i PLGA 1,65) .

3.1.2.4. Rezultati SEM mikroskopije

SEM snimci su pokazali jako razvijenu morfologiju čestica HAP-a, nukleiranog na površini polimernih filmova nanetih na porozni apatit (slike 21, 22 i 23).

Kao što se vidi na slici 21, čestice HAP-a nukleiranog na alginatu su prisutne u dva oblika- oblik cveta maslačka i poligonalni oblik. Čestice poligonalnog oblika su manje; prečnik najmanjih čestica je oko 1 μm , dok su najveće dimenzija oko 5 μm . Raspodela veličina čestica oblika maslačka je od 3 do 5 μm . Širina igličastih struktura na površini ovih čestica je 18-25 nm, dok je rastojanje između njih 150-500 μm .

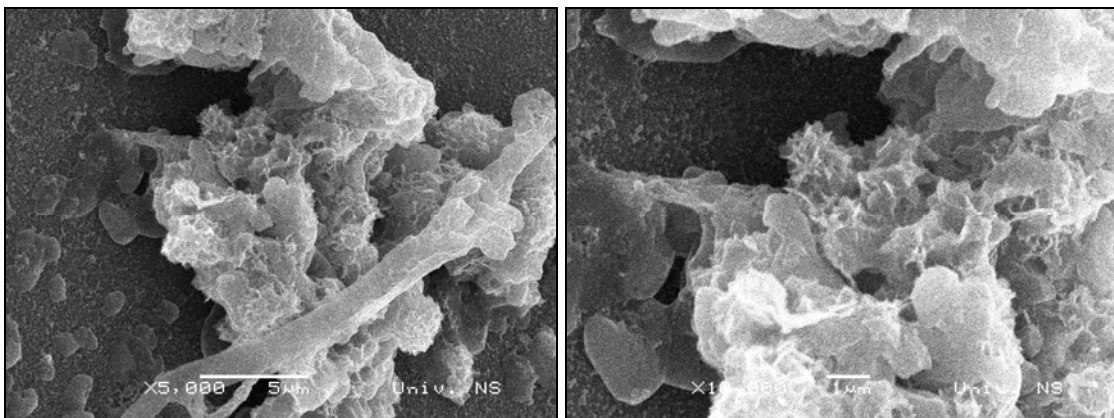


a)

b)

Slika 21. SEM snimci nukleiranog apatitnog filma na alginatu: a) manje uvećanje i b) veće uvećanje

Na slici 22 vidi se raznolika morfologija čestica hidroksiapatita nukleiranog na hidroksietil celulozi. Srednji prečnik čestica je oko 3 μm dok su najmanje čestice veličine oko 1 μm. Igljaste i tanjiraste strukture se uočavaju na površini čestica i njihova širina je od 30 do 150 nm.

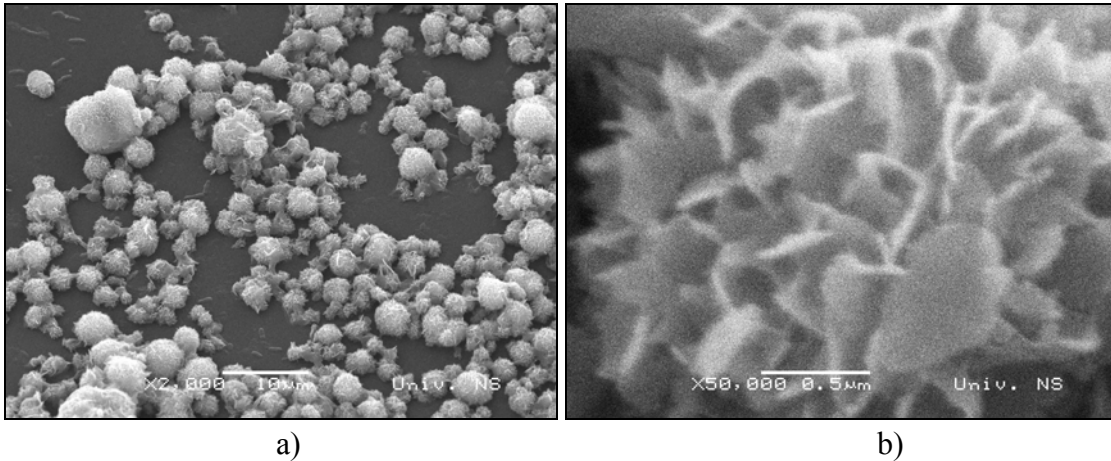


a)

b)

Slika 22. SEM snimci nukleiranog apatitnog filma na celulozi: a) manje uvećanje i b) veće uvećanje

Apatit nukleiran na površini PLGA filma prikazan je na SEM snimcima na slici 23. Može se uočiti da su čestice oblika cveta maslačka sa jako razvijenom morfologijom površine gde su prisutne laticaste strukture. Veličina čestica se uglavnom kreće u opsegu od 2,5 do 3,5 μm, ali su prisutne i znatno sitnije čestice (0,7 – 1,5 μm) kao i manji broj krupnijih (4,3 – 8,5 μm). Širina laticastih struktura na površini čestica je 15-20 nm.



Slika 23. SEM snimci nukleiranog apatitnog filma na PLGA: a) manje uvećanje i b) veće uvećanje

3.1.2.5. Mehanizam nukleacije HAP-a na polimerima

Razumevanje mehanizma biomimetičke nukleacije HAP-a u STF-u, bitno je zbog unapređenja istraživanja u oblasti formiranja bioaktivnih prevlaka, koje može biti postignuto izborom odgovarajućih polimera za funkcionalizaciju poroznog apatitnog nosača. Karboksilne/ hidroksilne grupe, prisutne u lancima alginata, celuloze i PLGA deluju kao aktivni centri koji iniciraju nukleaciju (alginat poseduje i karboksilne i hidroksilne grupe, dok celuloza poseduje samo hidroksilne, a PLGA samo karboksilne grupe (slike 1, 2 i 3 u poglavlju 1.1.2.2)). Ove negativno naelektrisane grupe, u prvom stupnju nukleacije, privlače Ca^{2+} jone iz STF-a, koji zatim bivaju prikačeni na površinu polimernog filma. U sledećem stupnju, negativni PO_4^{3-} joni bivaju privučeni od pozitivnih Ca^{2+} jona. Sledi da se proces nukleacije kalcijum fosfata dešava vezivanjem Ca^{2+} na aktivna mesta polimera i simultanim vezivanjem PO_4^{3-} jona za kalcijumove jone. Kao što je već pokazano [36, 44, 155], koncentracija karboksilnih/hidroksilnih grupa (tj. nukleacionih centara) na površini polimera verovatno igra važnu ulogu u procesu nukleacije kalcijum fosfata [155]. Gustina nukleacionih centara može takođe da utiče na veličinu aglomerata i njihovu morfologiju, što potvrđuju i rezultati ovde prikazanih istraživanja. Naime, najveća gustina nukleiranih čestica dobijena je na alginatnom filmu, kao što se može videti na slici 21. To je najverovatnije prouzrokovano velikom gustiom karboksilnih i/ili hidroksilnih grupa u lancima alginata. U slučaju nukleacije sa PLGA, može se uočiti relativno mala gustina nukleiranih čestica

(slika 23), što odgovara niskoj koncentraciji aktivnih karboksilnih grupa u PLGA lancu, u poređenju sa alginatom. U slučaju celuloze, ako se posmatra prostorni raspored hidroksilnih grupa, može se videti da su relativno blizu jedna drugoj. Usled toga, aglomerati sa susednih nukleacionih centara se spajaju formirajući izdužene strukture, kao što se vidi na slici 22a.

Što se tiče veličine čestica, u uzorcima gde su alginat i celuloza korišćeni za funkcionalizaciju poroznog nosača, dobijene su manje čestice (1-5 μm). Razlog tome može biti veliki broj nukleacionih centara. Veći aglomerati (neki veći i od 8 μm) su uočeni u slučaju kada je korišćen PLGA, koji poseduje manji broj nukleacionih centara od kojih zavisi dalji rast nukleusa, kao i čestica kalcijum fosfata.

Samo-formirane nanostrukture dobijene u ovom istraživanju, mogu biti od velikog značaja za rast ćelija na površini poroznog nosača. Rezultati dobijeni FT-IC spektroskopijom (slika 19) koji pokazuju da je nukleirana faza karbonatni apatit, pretežno tipa B, koji je inače prisutan u biološkim sistemima, potvrđuju ovu pretpostavku. Nekoliko istraživanja u kojima je ispitivano ponašanje ćelija na apatitu, formiranom na površini polimera, potvrđuju njegovu sposobnost da favorizuje rast osteoblastnih ćelija i njihovu funkcionalnost [43, 48, 49, 156].

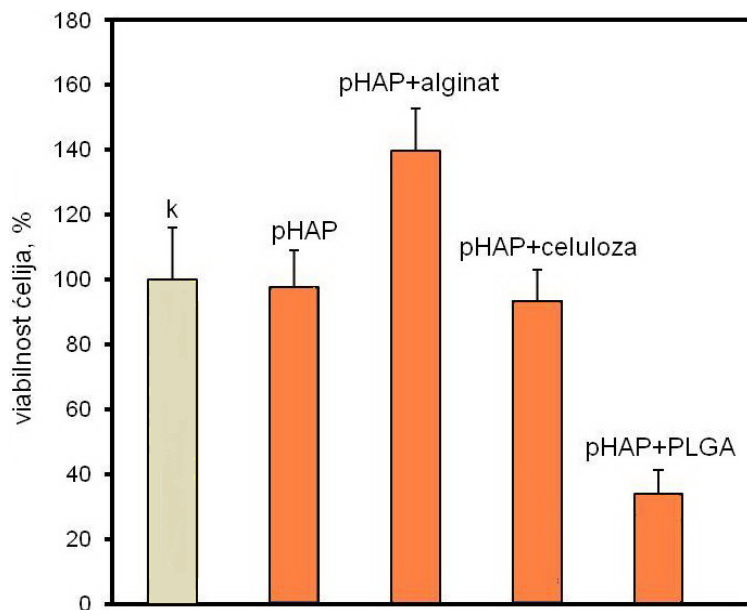
3.1.2.6. Ispitivanja na ćelijama i animalnom modelu

Paralelna istraživanja, rađena na temu bioprihvatljivosti materijala kroz testove na ćelijskim linijama fibroblasta i na animalnim modelima, od strane saradnika iz bioloških i medicinskih institucija [157], pokazala su dobre rezultate, što čini i rezultate ove teze još značajnijim.

Citotoksičnost je ispitana u indirektnom kontaktu materijala (granule poroznog apatita (pHAP), kao i pHAP u kombinaciji sa polimerima (alginat, celuloza, PLGA)) sa ćelijskom kulturom fibroblasta miša (NCTC clone L929). Kvantitativna evaluacija dobijenih rezultata vršena je uz pomoć MTT testa, uz korišćenje ekstrakta ispitivanih materijala u različitim koncentracijama i u različitim vremenima. Eksperimenti su izvedeni na statistički relevantnom broju uzoraka.

Rezultati MTT testa (slika 24) izraženi su kao procenat preživelih ćelija, u poređenju sa kontrolom- čistom ćelijskom kulturom L929 fibroblasta, bez dodatka ispitivanih materijala. Viabilnost ćelija u kontrolnoj grupi bila je 100%. Za pHAP, bez

dodatka polimera, dobijen je sličan rezultat kao za kontrolnu grupu, što ukazuje na njegovu inertnost u odnosu na ćelijsku kulturu. pHAP sa dodatim alginatom, pokazao je najbolji rezultat, viabilnost ćelija bila je za 40 % veća u odnosu na kontrolu, dok pHAP sa dodatkom celuloze nije pokazao značajne razlike u broju ćelija, u odnosu na čisti pHAP. Nijedan od ispitivanih materijala nije pokazao potpunu citotoksičnost na ćelijskoj kulturi fibroblasta miša.



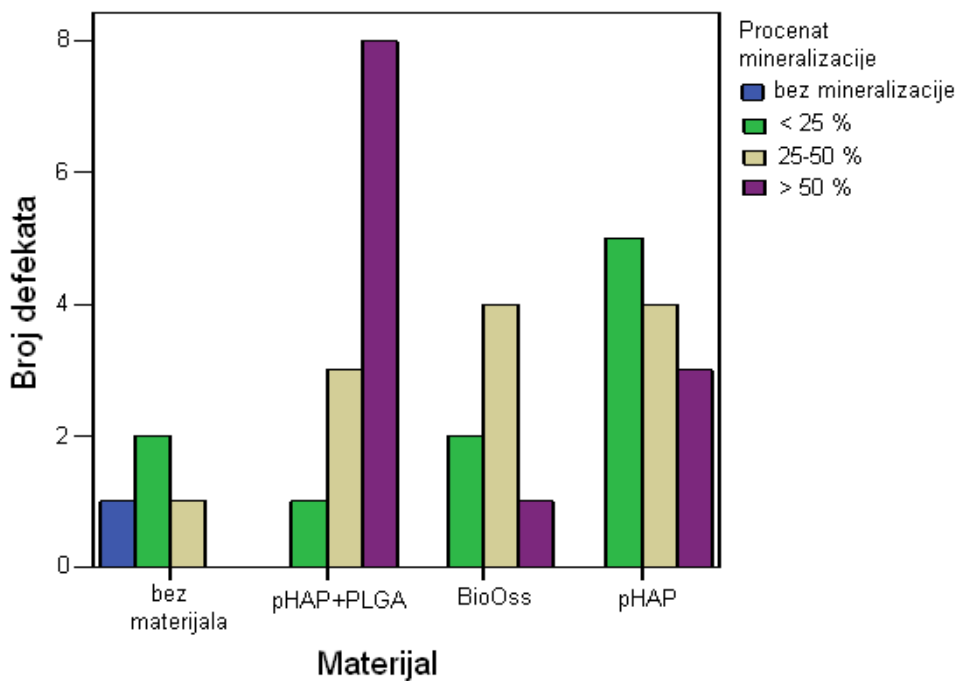
Slika 24. Broj preživelih L929 ćelija, u poređenju sa kontrolom

Ispitana je i biofunktionalnost materijala, u *in vivo* predkliničkim testovima na animalnom modelu. Dosadašnja ispitivanja su obuhvatila samo pHAP i pHAP sa PLGA, dok su ispitivanja ostalih materijala u toku. Eksperimenti su urađeni na kunićima (12 životinja oba pola, iz različitih legla, starosti oko 4 meseca, telesne mase oko 3 kg).

Napomena: Eksperimenti su odobreni od strane Etičkog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama Stomatološkog fakulteta u Beogradu (br. 36/12 od 23.11.2009. godine), i sprovedeni u saglasnosti sa principima Vodiča Nacionalnog Instituta za zdravlje, za brigu i korišćenje laboratorijskih životinja, kao i prema međunarodnim standardima ISO10993-2: zahtevi za blagostanje životinja.

U defekte kritične veličine (defekti koji ne mogu sponatno zarasti) implantirani su ispitivani materijali: pHAP, pHAP sa PLGA i komercijalni proizvod Geistlich BioOss (deproteinizovani goveđi koštani materijal), koji se koristi kao zlatni standard.

Kao negativna kontrola korišćeni su defekti kosti u koje se nije postavljao materijal. Ocenjivano je stvaranje nove kosti, kao i procenat mineralizacije tokom vremena (slika 25). Maksimalno vreme ocenjivanja iznosilo je 12 nedelja.



Slika 25. Procenat mineralizacije

Na slici 25 predstavljen je procenat mineralizacije u zavisnosti od vrste ispitivanog materijala. Na ordinatu je nanet broj kritičnih defekata, ispunjenih ispitivanim materijalom. Rezultati pokazuju da je nova kost formirana u mnogo većoj meri kada su, kao implantni materijali, korišćeni porozni HAP i pHAP u kombinaciji sa PLGA, nego u slučaju korišćenja komercijalnog proizvoda BioOss-a. Posebno dobri rezultati postignuti su u slučaju korišćenja pHAP-a kombinovanog sa PLGA, kada je u najvećem broju defekata procenat mineralizacije bio veći od 50 %.

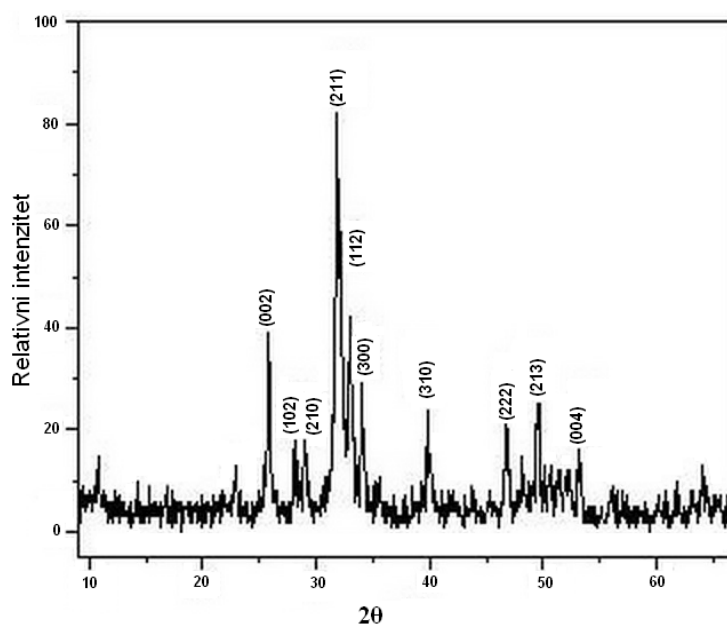
3.2. Kontrolisano otpuštanje antibiotika

3.2.1. Karakterizacija nosača antibiotika

Pre izučavanja kinetike otpuštanja antibiotika iz apatitnog i SiO₂ nosača, urađene su fazna i strukturna analiza ovih sistema.

3.2.1.1. Osobine sintetisanog praha HAP-a

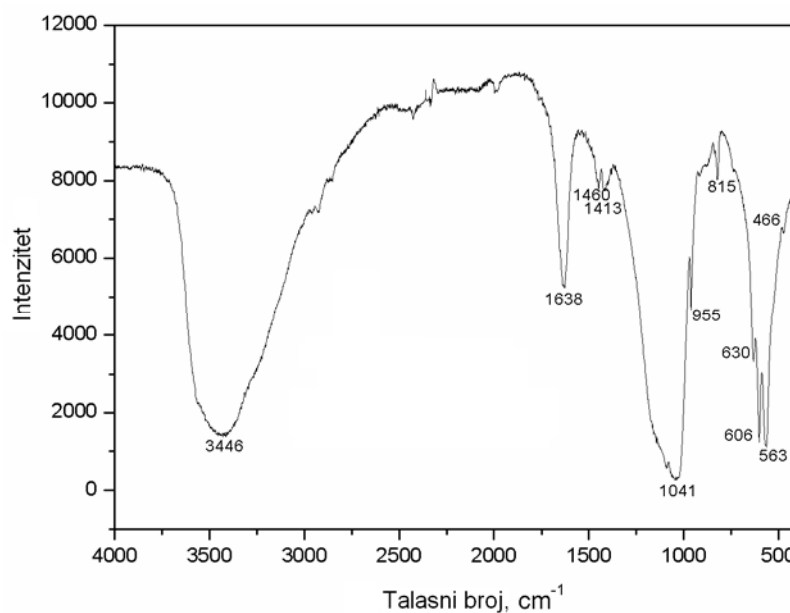
Dobijeni XRD spektar (slika 26) pokazuje da hidrotermalno sintetisani prah odgovara karbonatnom kalcijum hidroksiapatitu Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ (JCPDS 9-432). Svi karakteristični difrakcioni pikovi su prisutni: (211) na 2θ=31,9°; (112) na 2θ=32,26°, (300) na 2θ=33,12°, (002) na 2θ=25,86°, (222) at 2θ=46,86° i (213) na 2θ = 49,58° [144]. Veličina kristalita, računata po Šererovoj formuli, iznosi 8-22 nm.



Slika 26. Difraktogram sintetisanog praha HAP-a

IC spektar sintetisanog praha (slika 27) pokazuje trake karakteristične za HAP. Trake na oko 1092 i 1042 cm⁻¹ odgovaraju asimetričnim istežućim (ν₃), dok trake na oko 603 i 569 cm⁻¹ odgovaraju savijajućim (ν₄) vibracijama PO₄³⁻ grupa. Trake na 957 i 473 cm⁻¹ potiču od simetričnih istežućih vibracija (ν₁ and ν₂) PO₄³⁻ grupa. Oslobođajuće i istežuće vibracije OH⁻ grupa detektovane su na oko 630 i 1626 cm⁻¹,

redom. Istežuće vibracije CO_3^{2-} grupe na 1442 , 1406 i 875 cm^{-1} su takođe prisutne, što ukazuje na inkorporaciju karbonatnih grupa u strukturu apatita. Traka na 630 cm^{-1} se pripisuje oslobađajućim vibracijama OH^- grupa. Evidentno je da je dobijen karbonatni apatit B tipa i da zamena na položajima OH^- jona, uočena na osnovu promene oblika i položaja trake na 3658 cm^{-1} , nije dominantno prouzrokovana zamenom OH^- jona CO_3^{2-} jonima.



Slika 27. IC spektar sintetisanog praha HAP-a

Rezultati SEM analize kako apatitnog praha, tako i poroznog apatita, već su prikazani u poglavlju 3.1.2.1.

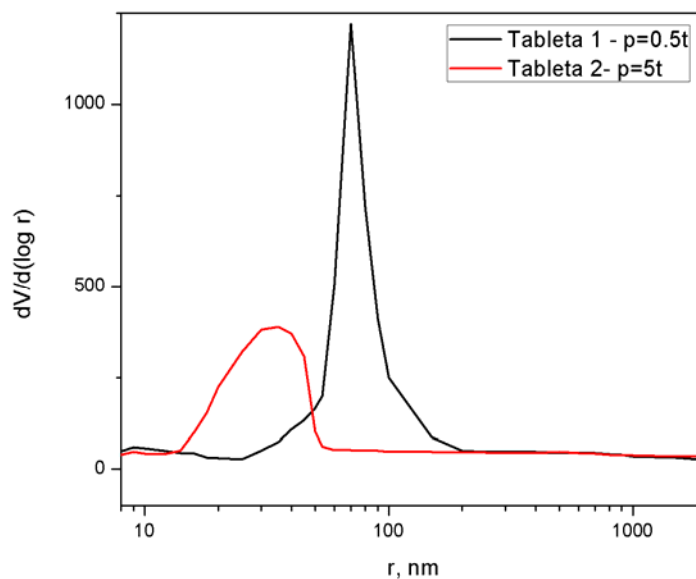
3.2.1.2. Poroznost tableta

Parametri poroznosti apatitnog praha i tableta dobijenih primenom pritiska od 16 i 156 MPa (Tabela 3) određeni su BET metodom. Inače, pore se klasifikuju po IUPAC-ovoj klasifikaciji pora, gde su makropore definisane kao pore veće od 50 nm, mezopore su veličine od 50–2 nm, a mikropore su pore manje od 2 nm. Prečnik čestica praha HAP-a, izračunat iz specifične površine, iznosi 160 nm.

Tabela 3. Parametri poroznosti određeni BET metodom

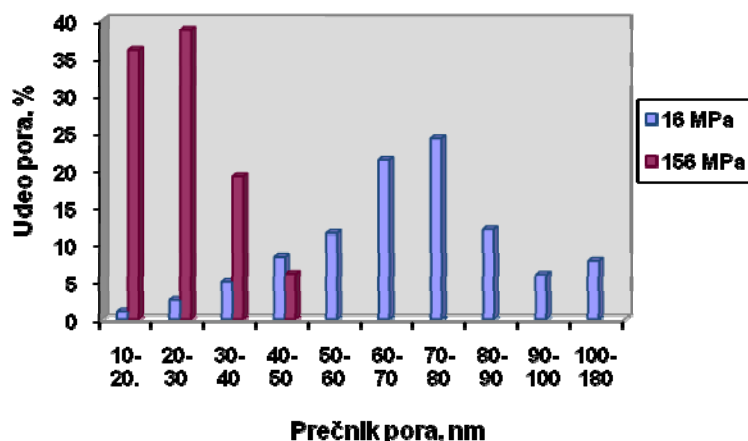
Uzorak	Specifična površina pora, m ² /g	Specifična zapremina pora, cm ³ /g	Srednji prečnik pora, nm	Udeo mezopora, %	Udeo makropora, %
HAP- prah	12	1,00	310	10	90
Tableta 1, p=16 MPa	13	0,39	75	36	64
Tableta 2, p=156 MPa	11	0,17	35	65	35

Sa aspekta proučavanja brzine otpuštanje leka najvažnija je kriva koja definiše raspodelu veličine pora (veličinu diferencijalnih zapremina pora) (slika 28). Korišćen je diferencijalni oblik prikazivanja da bi se istakle male promene zapremine sa prečnikom. Ova kriva daje detaljne podatke o veličini diskretnih prečnika pora i njihovom udelu u posmatranom sistemu (HAP), u koga se inkorporira lek.



Slika 28. Diferencijalna zapremina pora

Na osnovu diferencijalne zapremine pora u tableti 1 i tableti 2, jasno je da su pore većih prečnika dominantno prisutne u tableti 1, iz čega sledi da će i brzina otpuštanja leka iz tog uzorka biti veća (slike 28 i 29). Na slici 29 očigledno je da je kod tablete 1 gotovo ceo spektar raspodele veličine pora pomenen ka vrednostima većim od 40 nm, za razliku od tablete 2 gde se ceo spektar raspodele nalazi u intervalu 10-50 nm.



Slika 29. Raspodela veličine pora i njihov udeo u ukupnoj zapremini pora za tablete 1 i 2

Multimodalna raspodela veličine pora potiče od različitih tipova pora: najveće pore koje se formiraju za vreme kompresije praha u tablete, nešto manje pore između agregata čestica praha, još manje pore između čestica (posebno između manjih čestica u aglomeratima) i najmanje pore između osnovnih čestica, koje su u nekim slučajevima reda veličine kristalita unutar osnovnih čestica (osnovne čestice su najmanje čestice u sistemu čija je veličina određena BET metodom, dok je veličina kristalita određena XRD metodom). Na osnovu slike 29, uočava se da su pore prečnika 10-20 nm zastupljene u tableti 2 sa 36 %, a u tableti 1 samo 1.2 %. U tableti 2 najzastupljenije su pore prečnika 20-30 nm, dok su u tableti 1 najbrojnije one sa prečnikom između 60 i 80 nm.

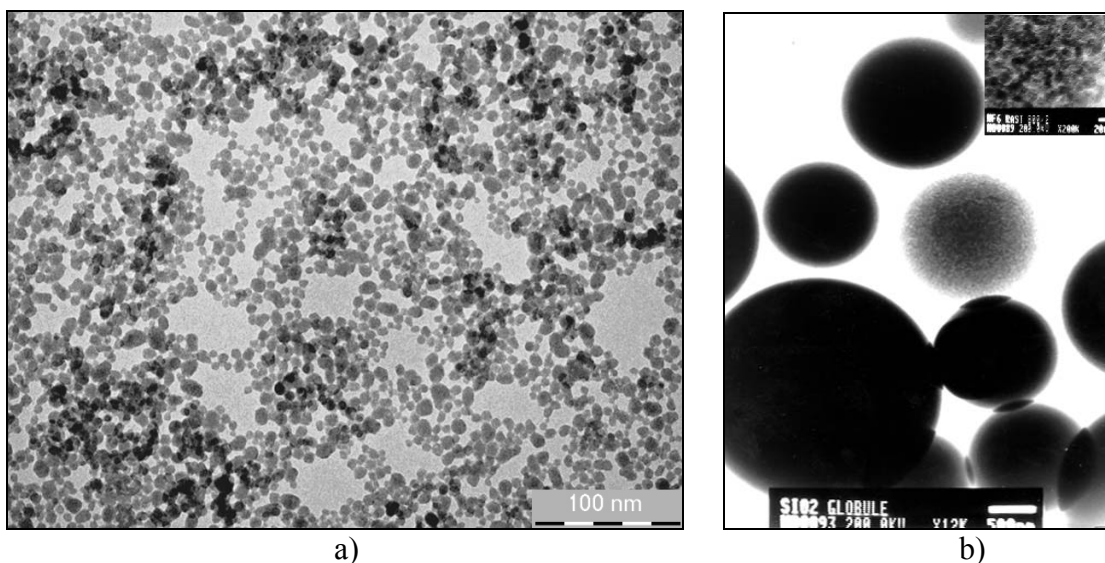
3.2.1.3. Karakterizacija SiO_2

SiO_2 sol, sintetisan prema proceduri opisanoj u poglavlju 2.1.1.1, pokazao se kao pogodan kandidat za inkapsulaciju lekova. Osnovni razlozi za to vezani su za njegovu potpuno uniformnu raspodelu (TEM, dinamičko rasejanje svetlosti) i za veoma visoku koncentraciju čestica unutar rastvora sola (30 % čvrste materije) [120]. Poznavajući mehanizme umrežavanja koloidnih sistema, jasno je da solovi sa ovako visokim koncentracijama u procesima sprej sušenja daju zapreminski precipitirane čestice. To znači da SiO_2 sol ima visok potencijal za inkapsulaciju leka i njegovo sporo otpuštanje, što je i provereno istraživanjima u okviru ove teze. Pored toga, raspodela veličine

čestica u kojoj 90% čestica ima iste dimenzije čini takav sistem idealnim za modelna proučavanja, što je takođe iskorišćeno za izvođenje originalnog modela diskretnog otpuštanja leka iz sistema koji su organizovani na više nivoa. Zbog svega toga detaljna karakterizacija sola SiO_2 bila je neophodna. Ovakav pristup koji kombinuje modelna istraživanja i eksperimentalne rezultate prvi put izveden u okviru ove teze, bio je moguć zahvaljujući dobro definisanoj strukturi i podstrukturi čestica dobijenih sprej sušenjem (SEM analiza).

3.2.1.3.1. TEM analiza čestica SiO_2 sola

TEM istraživanja SiO_2 sola pokazuju da su čestice uglavnom sfernog oblika i da je srednja veličina čestica oko 7 nm (slika 30a). Jasno se vidi da je raspodela veličine čestica uniformna. To je potvrđeno i merenjima dinamičkog rasejanja svetlosti, čiji rezultati pokazuju da je čak 98 % čestica iste veličine ($d=7,7$ nm), što ga čini idealnim model sistemom.



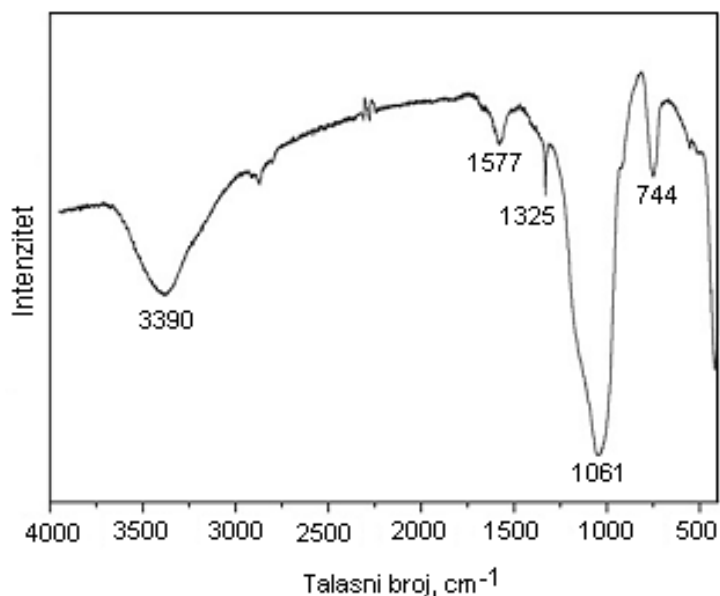
Slika 30. TEM snimci: a) čestice SiO_2 sola, b) SiO_2 čestice; insert u gornjem desnom uglu pokazuje sub-strukturu površine čestice

Struktura i sub-struktura SiO_2 čestica dobijenih ultrazvučnom sprej pirolizom, takođe su ispitivane TEM mikroskopijom. TEM snimak (slika 30b) jasno pokazuje da su sve čestice poseduju punu gustinu (čestice, kao i svi njihovi delovi su bili neprozirni za elektronski snop). Samo najmanje čestice su delimično providne, sa najtamnijim

delovima u svojim centrima. Ovo se može smatrati kao dokaz da je došlo do njihove zapreminske precipitacije.

3.2.1.3.2. IC analiza SiO_2 praha dobijenog sprej sušenjem

IC spektar SiO_2 praha, dobijenog metodom sprej sušenja, prikazan je na slici 31. Apsorpcione trake na oko 3390 cm^{-1} odgovaraju proširenoj vibraciji silanolnih grupa (Si-OH), dok traka na 1577 cm^{-1} potiče od uvijajuće vibracije OH grupe iz molekulske vode. Traka na 1325 cm^{-1} odgovara transverzalnim i longitudinalnim vibracijama u SiO_2 tetraedronima, traka na oko 1060 cm^{-1} pripisuje se transverzalnim asimetričnim vibracijama Si-O-Si lanca, dok trake na 744 i 416 cm^{-1} odgovaraju ljuľjajućim vibracijama u Si-O-Si lancima.



Slika 31. IC spektar SiO_2 praha

3.2.1.3.3. SEM analiza čestica SiO_2 dobijenih sprej sušenjem

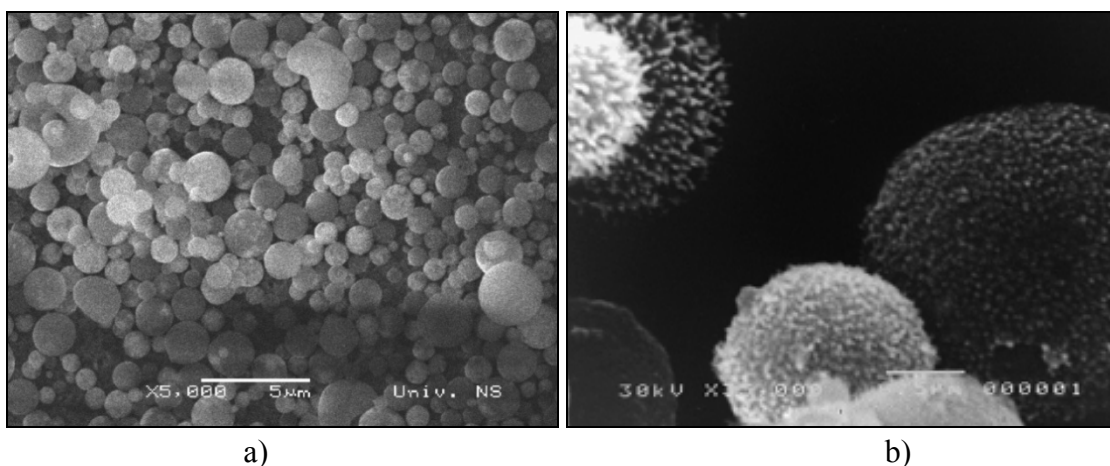
SEM ispitivanjima ustanovljena je veoma složena struktura i sub-struktura SiO_2 čestica, dobijenih sprej sušenjem (slika 30).

Čestice su uglavnom sfernog oblika, sa visokim stepenom sferičnosti. Raspodela veličine čestica, izražena preko prečnika čestica, nalazi se u opsegu od 1 do $3,5\text{ }\mu\text{m}$ (slike 32a i 33a). Većina čestica (93 %) su u opsegu $1,25\text{-}2,5\text{ }\mu\text{m}$. Podaci navedeni na

slici 33a su eksperimentalno određeni, brojanjem čestica koje imaju diskretnu vrednost i izračunavanjem udela tog broja čestica u ukupnom broju čestica, u uzorku od 200 čestica. Na osnovu ovih podataka, srednja veličina čestica je određena pomoću jednačine:

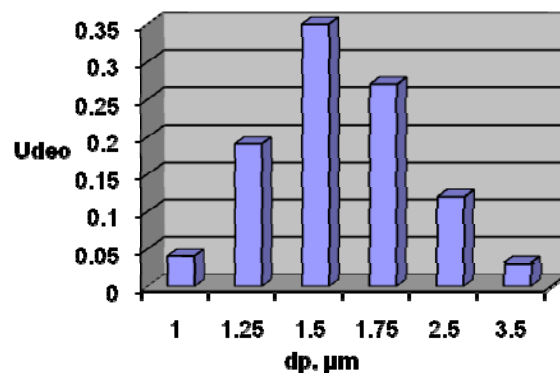
$$d_a = \frac{\sum_{i=1}^n n_i d_i}{\sum_{i=1}^n n_i}, \quad (1.3.2.1.3)$$

gde je n_i ukupan broj čestica i-te frakcije, d_i je prečnik čestica i-te frakcije, a Σ je suma svih elemenata u sistemu kao celini. Izračunat srednji prečnik čestica iznosio je 1,7 μm .

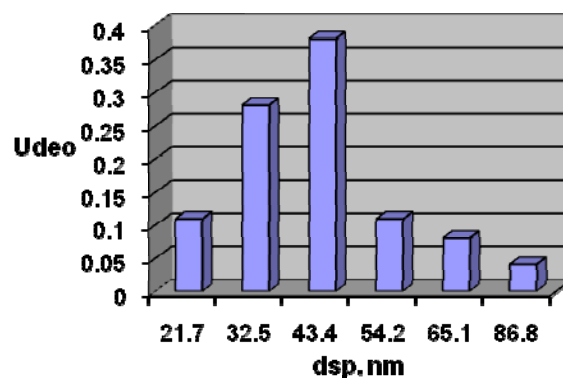


Slika 32. SEM: a) Tipična raspodela i b) Sub-struktura SiO_2 čestica dobijenih sprej sušenjem

Morfologija čestica, a posebno oblik i veličina sub-čestica su jasno vidljivi na slici 32b. Sub-čestice su uglavnom (više ili manje) sferične sa uskim raspodelom veličine (slika 33b). Izmereni prečnik sub-čestica kreće se u opsegu 22-89 nm, sa prosečnom vrednošću od 37 nm. Većina sub-čestica ima prečnik od 43 nm (38 %), dok je udeo najvećih od njih je veoma nizak (4 %).



a)



b)

Slika 33. Raspodela veličine eksperimentalno dobijenih: a) čestica, b) sub-čestica

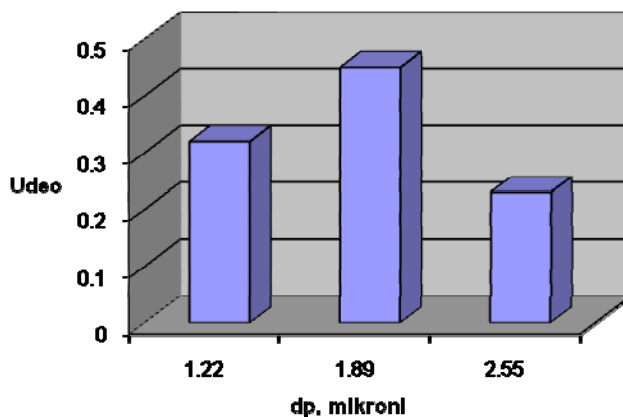
3.2.1.3.4. Modelna istraživanja

Modelna istraživanja izvedena su prema modelu V. Jokanovića i saradnika, detaljnije datog u prilogu disertacije. Tim modelom moguće je predvideti veličinu kapljica i sub-kapljica aerosola i njihovu distribuciju, a samim tim iz njih izvedenu veličinu čestica i sub-čestica SiO_2 , kao i njihovu raspodelu. Model je poslužio i kao osnova za definisanje veličine pora u česticama i njihove distribucije.

Predviđanje veličine kapljica i čestica. Dobijeni parovi vrednosti (diskretne vrednosti date jednačinama (1.1.2.8) i (2.1.2.8) i njihovi pojedinačni udeli dati jednačinama (3.1.2.8) i (4.1.2.8)) u potpunosti definišu spektar raspodele čestica u sistemu (slika 34).

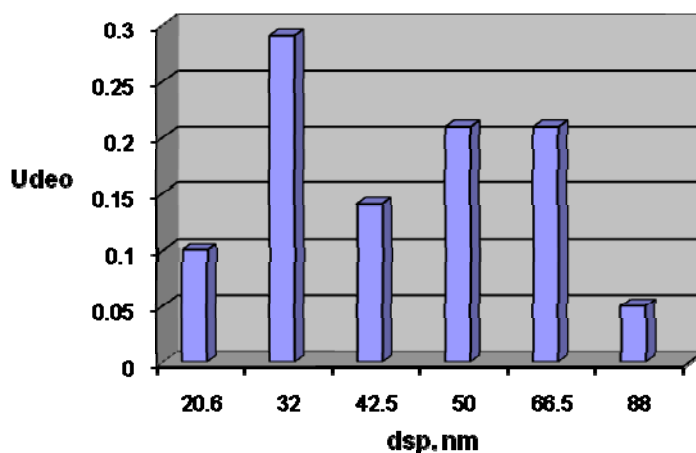
Kao što je prikazano na slici 18, prečnici čestica se nalaze u opsegu od 1,22 do 2,55 μm , što je u veoma dobroj saglasnosti sa odgovarajućim eksperimentalnim

vrednostima (1,25-2,5 μm). Srednji prečnik čestica, određen korišćenjem jednačina (1.1.2.8) - (4.1.2.8) i jednačine (1.3.2), je 1,82 μm , dok je eksperimentalno dobijena vrednost 1,7 μm . Ove vrednosti su u dobroj saglasnosti (odstupanje je samo 7 %).



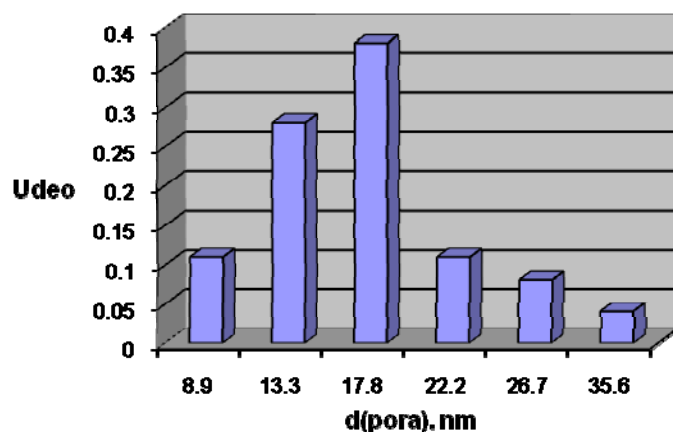
Slika 34. Teorijska raspodela veličine čestica

Predviđanje veličine sub-kapljica i sub-čestica. Prečnici sub-kapljica i sub-čestica izračunati se po proceduri opisanoj u poglavlju 1.2.8.2. Vrednosti prečnika sub-kapljica su prikazani sa različitim verovatnoćama, odakle se dalje dobijaju udeli diskretnih vrednosti prečnika sub-čestica (slika 35). Dobijena raspodela veličine sub-čestica je u opsegu 20,6-88 nm, dok je većina sub-čestica (85 %) u opsegu 32-66,5 nm. Srednja vrednost prečnika sub-čestica je 38,4 nm, što je u dobroj saglasnosti sa rezultatima SEM mikroskopije (37 nm).



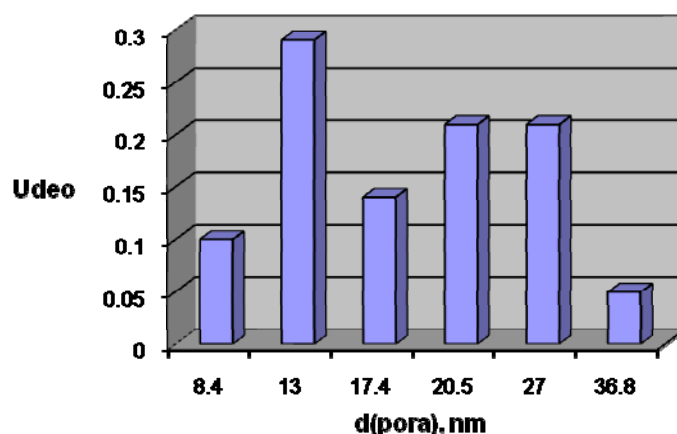
Slika 35. Teorijska raspodela veličine sub-čestica

Određivanje veličine pora. Zamenom vrednosti prečnika sub-čestica, određenog pomoću SEM-a, u jednačinu (8.1.2.8), određena je veličina pora između sub-čestica (slika 36). Srednja veličina pora, izračunata pomoću jednačine (1.3.2), iznosi 16,3 nm.



Slika 36. Raspodela veličine pora određena iz eksperimentalnih podataka

Na sličan način, teorijska raspodela veličine pora je određena zamenom teorijskih vrednosti prečnika sub-čestica u jednačinu (8.1.2.8). Kao što se može videti na slici 37, raspodela veličine pora je u rasponu 8,4-36,8 nm. Srednji prečnik pora, određen pomoću jednačine (1.3.2.), iznosi 18,9 nm.



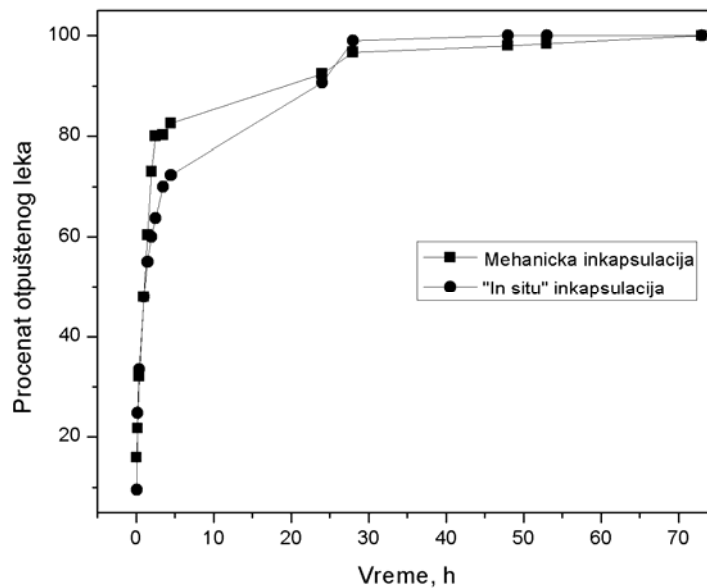
Slika 37. Teorijska raspodela veličine pora

3.2.2. Otpuštanje antibiotika

3.2.2.1. Otpuštanje iz PLGA inkorporiranog u porozni apatitni nosač

Prethodnom inkapsulacijom antibiotika u PLGA, koji je zatim inkorporiran u strukturu poroznog apatita, postignuti su zadovoljavajući rezultati. U okviru ove disertacije praćeno je otpuštanje malih polarnih molekula, koji najčešće nisu tema istraživanja datih u literaturi zbog toga što je takve molekule izuzetno teško zadržati unutar bilo koje matrice. Provera izvesnog broja referenci [86, 97], vezanih za primenu metoda emulzije voda/ulje i voda/ulje/voda, ne daje zadovoljavajuće rezultate upravo zbog korišćenja veoma malih molekula leka. Primena navedenih metoda na većim molekulima verovatno bi dala bolje rezultate. Takvi rezultati ne bi imali pravi praktični značaj zbog toga što je većina lekova polarnog karaktera i pripada malim molekulima. Zbog toga su korišćeni modifikovani postupci pripreme polimera kojima se postiže da lek bude vezan silama koje nisu zanemarljive u odnosu na kapilarne sile i da se na taj način uspori otpuštanje leka, do nekih realnih vremena potrebnih za njegovo efikasno dejstvo.

Kod obe primenjene metode za inkorporiranje antibiotika u polimer (mehanohemijaska u kombinaciji sa rastapanjem polimera i metoda *in situ* očvršćavanja polimera) dobijeni su dobri rezultati. Krive prikazane na slici 38 pokazuju slične rezultate za obe metode inkapsulacije. Početna brzina otpuštanja bila je velika u oba slučaja; polovina od celokupne količine inkapsuliranog leka otpuštena je za nešto više od sat vremena. Male razlike u dinamici otpuštanja se primećuju posle isteka prvog sata, kada je otpuštanje iz *in situ* očvršnute matrice nešto sporije. Ipak, ukupno vreme otpuštanja iz polimera gde je antibiotik mehanički inkapsuliran bilo je duže za 24 h, u poređenju sa metodom *in situ* očvršćavanja polimera. Pored dužeg vremena otpuštanja, mehanohemijaska metoda je efikasnija sa aspekta stepena inkapsulacije leka. Primenom ove metode stepen inkapsulacije je približno 100 %, dok je u slučaju *in situ* polimerizacije postignuti stepen inkapsulacije iznosio svega 35 %.



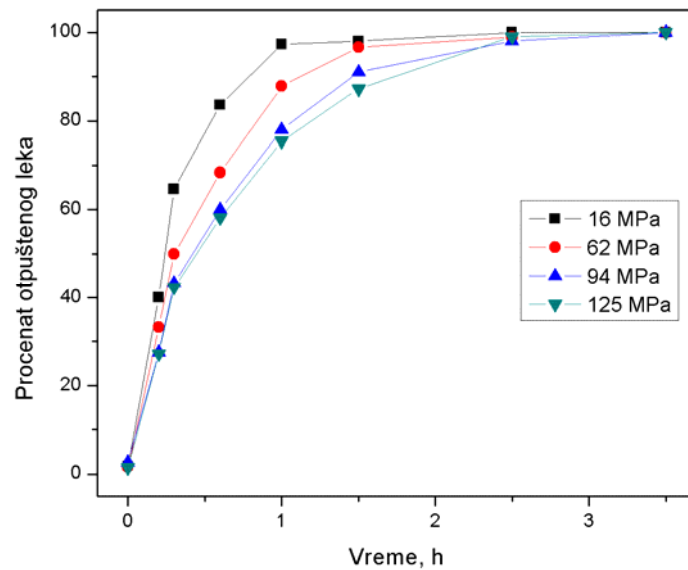
Slika 38. Krive otpuštanja metronidazola iz PLGA inkorporiranog u porozni nosač

Dobijeni podaci pokazuju da dolazi do brzog otpuštanja iz površinskih slojeva polimera, nanetog na porozni nosač i da verovatno dužina difuzionog puta za lek je bitan parametar koji reguliše brzinu njegovog otpuštanja, pogotovo u polaznim fazama. Delovi leka koji su zarobljeni unutar zapremine tankih filmova i kapljica polimera iz kojih su deponovani ti filmovi otpuštaju se znatno kasnije, tako da kompletno otpuštanje traje i do 72 h.

3.2.2.2. Otpuštanje iz tableta

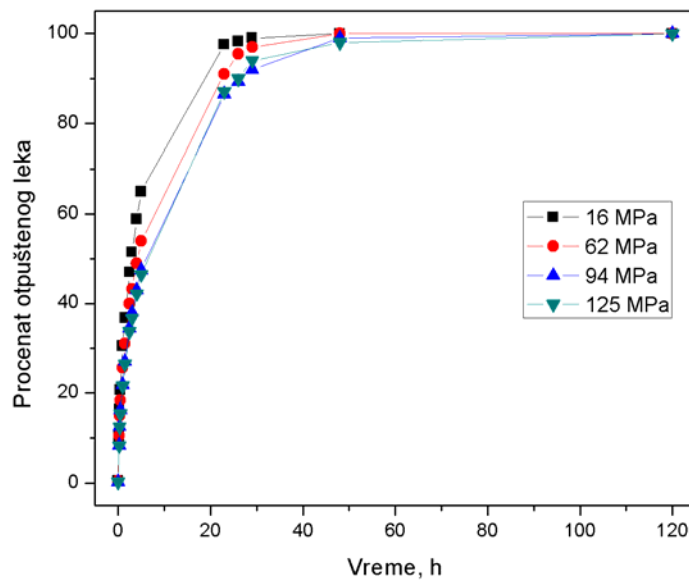
Brzina otpuštanja antibiotika iz tableta dobijenih presovanjem praha apatita, logično, pokazuje zavisnost brzine otpuštanja od raspodele veličine pora u tabletama 1 ($p=16$ MPa) i 2 ($p=156$ MPa). Ta brzina delimično zavisi od vrste ispitivanog leka, a zavisnost od raspodele veličine pora je u najužoj vezi sa primenjenim pritiskom prilikom presovanja tableta. Krive otpuštanja date su za svaki antibiotik, ponaosob.

Brzina otpuštanja metronidazola iz tableta presovanih pod pritiskom od 16, 62, 94 i 125 MPa, predstavljena je na slici 39. Otpuštanje se dešavalo brzo; celokupna količina antibiotika otpuštena je već nakon 3,5 sati, čak i u slučaju najvećeg primenjenog pritiska. Razlike u brzini otpuštanja u zavisnosti od pritiska značajne su samo u toku prva dva sata otpuštanja, dok su kasnije zanemarljive.

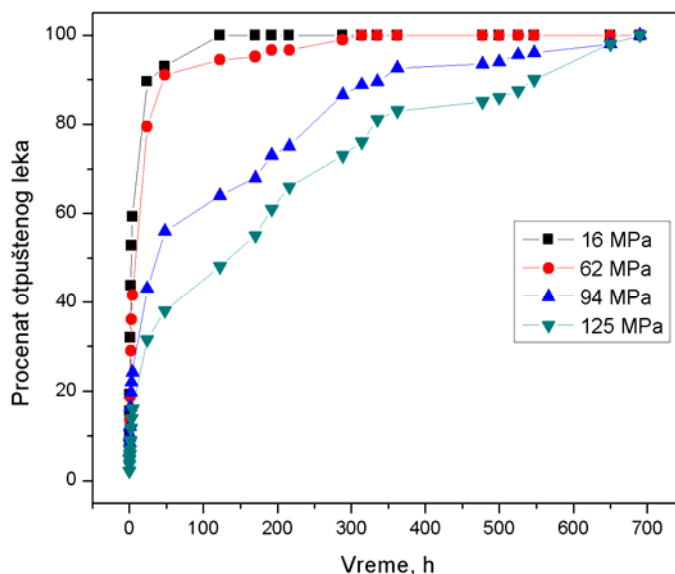


Slika 39. Krive otpuštanja metronidazola iz tableta presovanih pod različitim pritiscima

Brzine otpuštanja ciprocinola iz različitih tableta hidroksiapatita prikazane su na slici 40. Kao što se može videti, otpuštanje ciprocinola se dešavalo značajno sporije u odnosu na metronidazol. Za prvih pet sati otpušteno je od 45 do 65 % ukupne količine leka, u zavisnosti od primenjenog pritiska pri pravljenju tableta, dok je celokupna količina otpuštena za 48 do 120 sati.



Slika 40. Krive otpuštanja ciprocinola iz tableta presovanih pod različitim pritiscima

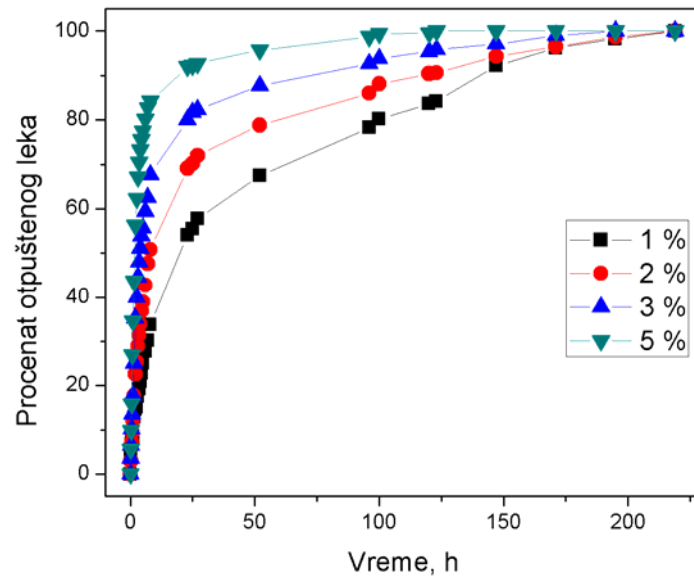


Slika 41. Krive otpuštanja tigeckiklina iz tableta presovanih pod različitim pritiscima

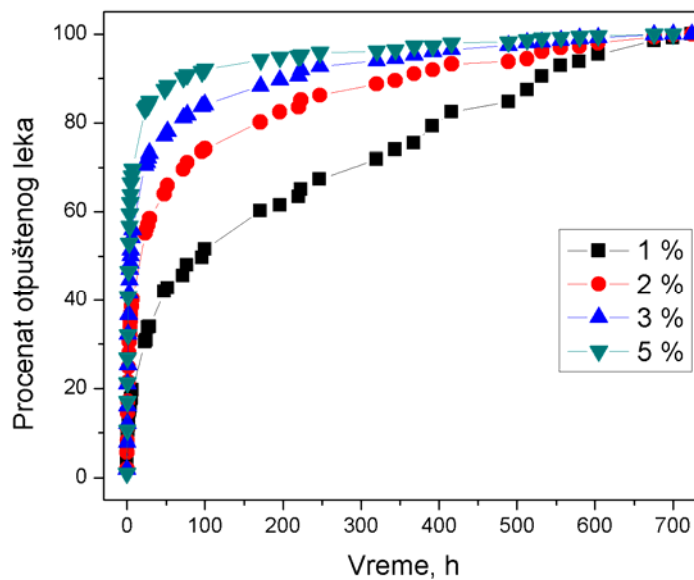
Otpuštanje tigeckiklina je bilo najsporije, u odnosu na ostale korišćene antibiotike (slika 41). Za prvih pet sati otpušteno je od 25 do 67 % leka, u zavisnosti od toga pod kojim pritiskom je tableta presovana. U slučaju primenjenog pritiska od 16 MPa, celokupna količina tigeckiklina otpuštena je za 120 sati, dok je u slučaju tablete presovane pod pritiskom od 156 MPa otpuštanje trajalo čak 25 dana.

Kao što se može videti sa slika 39-41, izgled krivih otpuštanja različitih antibiotika iz tableta hidroksiapatita zavisi od vrste antibiotika, tj. od njihove hemijske strukture. Zajedničko za sve antibiotike je postojanje početne, brze faze otpuštanja iza koje sledi faza sporijeg otpuštanja. Početna brzina otpuštanja zavisi od rastvorljivosti leka na površini nosača i od veličine njegovog molekula, njegovog polariteta i sposobnosti uspostavljanja odgovarajućih veza tipa konjugat-lek preko kojih, takođe može biti kontrolisana brzina otpuštanja [158]. Tako, primera radi, ciprofloksacin ima karboksilnu grupu, koja reaguje sa Ca iz hidroksiapatita pa biva jače vezan, dok metronidazol, koji nema ove grupe, brže difunduje kroz tabletu. Sledi da difuzivnost ovih lekova kroz tabletu varira u zavisnosti od hemijske strukture korišćenog leka [38].

Da bi se ispitaio uticaj koncentracije leka na brzinu otpuštanja, praćeno je otpuštanje tigeckiklina iz tableta sa različitim sadržajem ovog leka (1, 2, 3 i 5 mas. %). Tablete su presovane pod dva različita pritiska, 16 i 156 MPa. Profili otpuštanja tigeckiklina iz ovih tableta prikazani su na slici 42.



a)



b)

Slika 42. Krive otpuštanja tigecliklina iz tableta presovanih pod: a) $p=16$ MPa i b) 156 MPa, u zavisnosti od koncentracije tigecliklina

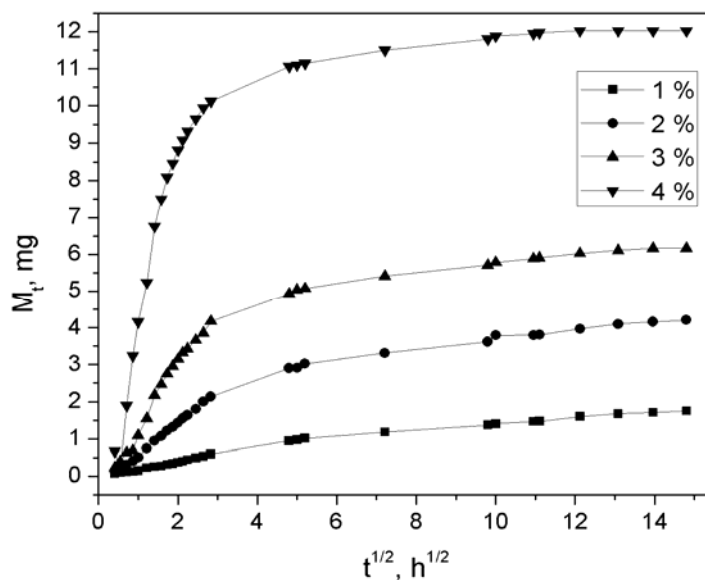
Tigecliklin, kao novi lek, izuzetno je važan za rešavanje akutnih i hroničnih inflamacija koštanog tkiva. Za procese hroničnih inflamacija vrlo je važno da se lek otpušta u što je moguće dužem vremenu. Dobijeni rezultati, koji pokazuju da otpuštanje može da traje i do mesec dana, upućuju na to da je potpuno realno očekivati da će njegovo delovanje na obolela tkiva biti efikasno kod teških koštanih inflamacija, kao što je osteomijelitis.

3.2.2.2.1. Modelovanje kinetike otpuštanja antibiotika iz tableta

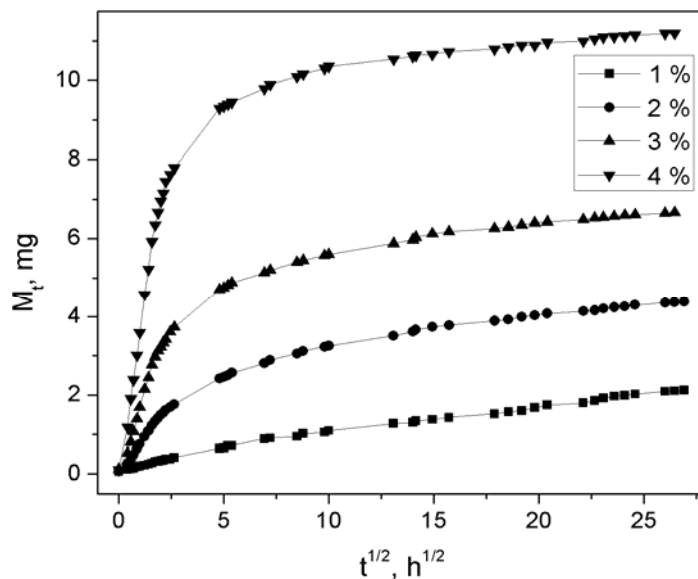
Da bi se definisala kinetika otpuštanja korišćeni su svi poznati pristupi iz literature, kao što su Higučijev i Korsmajer-Pepasov jer oni predstavljaju najčešće primenjivane kinetičke modele. Razmatrana su ograničenja datih modela i stepen njihove efikasnosti u odnosu na eksperimentalne podatke dobijene otpuštanjem leka.

Provera primenjivosti Higučijevog modela za opisivanje kinetike otpuštenih lekova iz apatitnih tableta izvedena je na primeru otpuštanja tigeciklina (inkapsuliranog u različitim koncentracijama) iz tableta presovanih pod pritiscima od 16 MPa (u daljem tekstu: tablete 1) i 156 MPa (u daljem tekstu: tablete 2). Dobijeni eksperimentalni rezultati, fitovani u Higučijevu jednačinu, trebalo bi da daju lineranu zavisnost. Na osnovu slike 43, očigledno je takvu zavisnost moguće uspostaviti u okviru malih vremenskih intervala. Iz toga sledi da je Higučijeva jednačina neprimenjiva na celokupno vreme otpuštanja leka.

To je u skladu sa literaturnim podacima, na osnovu kojih je Higučijeva jednačina primenjiva samo na početni period otpuštanja (linearni delovi krivih na slici 43). U konkretnom slučaju jednačina važi dok se ne otpusti 50-67 % leka iz tableta 1, odnosno 30-56 % leka iz tableta 2.



a)



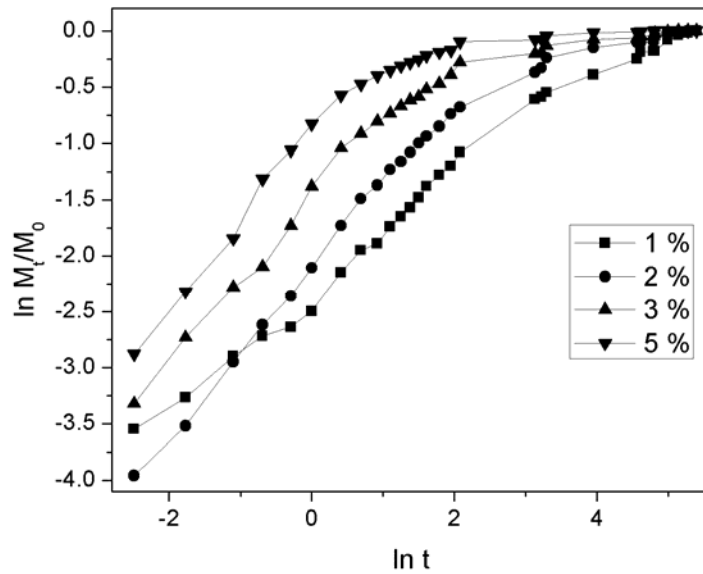
b)

Slika 43. *Primena Higučijeve jednačine na podatke o otpuštanju tigeciklina iz: a) tableta 1, b) tableta 2*

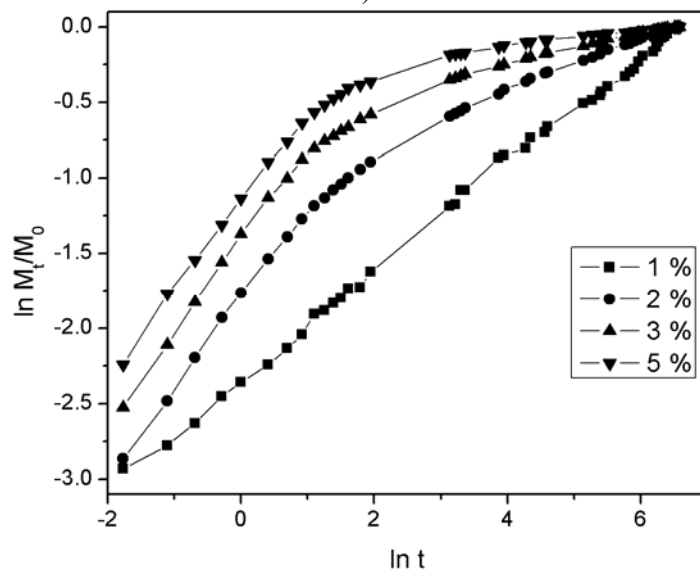
Primenom Korsmajer-Pepasove (KP) jednačine, u logaritamskom obliku, na eksperimentalne podatke o otpuštanju tigeciklina iz obe vrste tableta, potvrđeno je takođe da se ova jednačina može primeniti samo na početni period otpuštanja, dok se ne otpusti oko 60 % leka (slika 44).

Za tablete 1 i koncentraciju leka od 1%, koeficijent pravca linearnog dela krive, koji definiše vrednost eksponenta otpuštanja n , je 0,5. Vrednost n od 0,5 pokazuje da se KP jednačina svodi na Higučijevu jednačinu (količina otpuštenog leka proporcionalna kvadratnom korenu iz vremena). Ali, sa povećanjem koncentracije leka raste i vrednost eksponenta n (za koncentraciju leka od 2, 3 i 5 %, n ima vrednost 0,73; 0,87; odnosno 0,9).

Za tablete 2 i koncentraciju leka od 1%, KP jednačina se može primeniti na čitav period otpuštanja (slika 44b). Za koncentraciju leka od 2 %, koeficijent pravca linearnog dela krive je 0.5, dok za koncentracije od 3 i 5 %, n ima vrednost 0,6.



a)



b)

Slika 44. *Primena Korsmajer-Pepasove jednačine na podatke o otpuštanju tigeciklina iz: a) tableta 1, b) tableta 2*

Kao što je pokazano na prethodnom primeru, pomenute jednačine opisuju samo početnu fazu otpuštanja leka, dok je mehanizam otpuštanja u kasnijim fazama još uvek nepoznat. Kako hidroksiapatit korišćen za izradu tableta ima jako kompleksnu strukturu (aglomerati, čestice, subčestice, kristaliti) [144], postaje očigledno da je neophodno brzinu otpuštanja leka uporediti sa geometrijom apatitnog sistema, koja je definisana podacima datim na slici 29.

Da bi se na pravi način uspostavila veza između geometrije sistema i brzine otpuštanja leka, modifikovan je pristup primeni navedenih modela. Takav pristup podrazumeva da se posebno posmatra otpuštanje leka iz različitih pora, velikih, srednjih i malih, i da se pokuša da uspostavi veza između svake od tih geometrija i brzine otpuštanja leka. Na taj način bilo bi moguće u potpunosti opisati sled događaja koji je prisutan kod otpuštanja leka (kada se, odakle i u kojoj količini lek otpušta).

U skladu sa tim, krive otpuštanja leka iz obe vrste tableta interpretirane pomoću KP modela (slika 44) mogu biti podeljene u nekoliko linearnih segmenata (tako da se KP model može primeniti na svaki od njih ponaosob). Svaki od ovih segmenata karakteriše odgovarajući eksponent otpuštanja (koeficijent pravca linearnog segmenta), koji se pripisuje odgovarajućim brzinama otpuštanja leka. Broj ovih segmenata zavisi od koncentracije leka i skoro je isti za obe vrste tableta. Tako, za tablete sa koncentracijom leka od 2 % imamo tri linerana segmenta, a za koncentracije od 3 i 5 % četiri linerana segmenta. Jedina razlika je za koncentraciju od 1 %, gde za tabletu 1 imamo dva linearna segmenta, dok za tabletu 2 KP jednačina odgovara celom periodu otpuštanja leka.

Za tabletu 1 (slika 44a) i koncentraciju leka od 1 %, kriva otpuštanja može biti podeljena na dva linerana segmenta, sa eksponentima otpuštanja 0,5 i 0,27. Prvi od njih obuhvata period otpuštanja od 27 h, kada je otpušteno 58 % leka. Može se smatrati da je ova količina leka otpuštena iz pora prečnika 70-180 nm, čija zapremina čini 50 % ukupne zapremine pora. Drugi segment obuhvata period od 192 h, kada je otpušteno 42 % leka, što se pripisuje otpuštanju iz pora prečnika 10-70 nm (50 % ukupne zapremine pora).

Za koncentraciju leka od 2 %, kriva je podeljena na tri linearna segmenta. Otpuštanje je najbrže u početnoj fazi (eksponent $n=0,73$) i pripisuje se otpuštanju iz najvećih pora (prečnika 70-180 nm i čine 50 % ukupne zapremine pora). Tokom ovog perioda (8 h), otpušteno je oko 51 % od ukupne količine leka. Tokom sledećih 15 h, brzina otpuštanja je manja ($n=0,3$). Otpuštena količina leka (oko 18 %) povezuje se sa porama prečnika 60-70 nm, koje čine 21 % od ukupne zapremine pora. Poslednji linearni segment pokazuje najsporiju brzinu otpuštanja ($n=0,16$). Tokom ovog perioda (196 h) otpušteno je 31 % leka, što se može pripisati otpuštanju iz pora prečnika 10-60 nm (29 % ukupne zapremine pora).

Za koncentraciju leka od 3 %, u okviru prvog lineranog segmenta (4 h, $n=0,87$) otpušteno je 51 % leka, što se pripisuje otpuštanju iz pora prečnika 70-180 nm (50 %). Tokom sledećeg segmenta (4 h, $n=0,38$) oko 17 % leka je otpušteno, što se povezuje sa porama prečnika 60-70 nm (21 %). U toku trećeg segmenta (15 h, $n=0,16$) otpušteno je 12 % leka, što odgovara udelu pora prečnika 50-60 nm u ukupnoj zapremini pora (12 %). Tokom poslednjeg segmenta (172 h, $n=0,1$), otpuštena količina leka (20%) se povezuje sa porama prečnika 10-50 nm (17 %).

Za koncentraciju od 5 %, u toku prvog lineranog segmenta (3 h, $n=0,9$) otpušteno je 67 % leka, što se pripisuje otpuštanju iz pora prečnika 60-180 nm (71 %). Tokom sledećeg segmenta (5 h, $n=0,23$) oko 17 % leka je otpušteno, što se povezuje sa porama prečnika 50-60 nm (12 %). U toku trećeg segmenta i četvrtog segmenta (15 h, $n=0,08$ i 124 h, $n=0,05$) otpušteno je 8% leka, što odgovara udelu pora prečnika 40-50 nm (8 %), odnosno 10-40 nm (9 %).

Za tabletu 2 (slika 44b) i koncentraciju leka od 1%, kao što je rečeno ranije, KP jednačina odgovara eksperimentalnim podacima tokom čitavog perioda otpuštanja ($R^2=0.996$). EkspONENT otpuštanja, određen vrednošću koeficijenta pravca krive, ima vrednost 0,4.

Za koncentraciju od 2 % kriva je podeljena na tri linerna segmenta (7 h, $n=0,54$; 22 h, $n=0,24$ i 615 h, $n=0,16$). Otpuštene količine leka bile su 41, 18 odnosno 41 %, što se dovodi u vezu sa porama prečnika 25-50 (45 %), 20-25 (19 %), odnosno 10-20 nm (36%).

Za koncentraciju od 3 % kriva je podeljena na četiri linearna segmenta (3 h, $n=0,61$; 4 h, $n=0,27$; 22 h, $n=0,19$; odnosno 671 h, $n=0,097$). Otpuštene količine leka bile su 45, 11, 17, odnosno 27 %, što se dovodi u vezu sa porama prečnika 25-50 (45 %), 20-25 (19 %), 17.5-20 (13.5), odnosno 10-20 nm (22.5%).

Za koncentraciju od 5 % kriva je takođe podeljena na četiri linerana segmenta (3 h, $n=0,58$; 4 h, $n=0,25$; 22 h, $n=0,16$; odnosno 671 h, $n=0,049$). Otpuštene količine leka bile su 57, 13, 15, odnosno 25 %, što se dovodi u vezu sa porama prečnika 20-50 (63 %), 17.5-20 (13.5 %), 15-17.5 (11.5 %), odnosno 10-15 nm (11 %).

Iz prikazanih podataka vidi se da su, unutar jednog linearnog intervala, procenat otpuštenog leka i procenat u kome su je zapremina pora određenih dimenzija sadržana u ukupnoj zapremini pora, približno isti. Brzina otpuštanja je najveća u početnom periodu

kada se lek otpušta iz najvećih pora i opada sa smanjenjem dimenzija pora iz kojih se otpuštanje dešava. Iz toga se može zaključiti da brzina otpuštanja leka u presudnoj meri zavisi od veličine pora i njihove raspodele u nosaču.

3.2.2.2.2. *Određivanje koeficijenata difuzije*

Kao što je prikazano, Higučijeva jednačina se ne može se primeniti za obradu svih eksperimentalnih podataka. Ali ukoliko se eksperimentalni podaci najpre podele u nekoliko odgovarajućih setova jednačina se može uspešno primeniti na svaki set posebno. Svaki set karakteriše odgovarajuća brzina otpuštanja leka. To omogućava određivanje efektivnih koeficijenata difuzije, preko koeficijenata pravaca, određenih iz odgovarajućih setova podataka (podaci koji pripadaju jednom linearnom segmentu krive date na slici 44, koristeći jednačinu (8.1.2.7)).

Unutar jednog linearnog segmenta, može se uočiti veoma dobra veza između brzine otpuštanja leka i odgovarajuće veličine pora. Pore se mogu svrstati u tri grupe, za tablete 1: velike (60-180 nm), srednje (40-60 nm) i male (10-40 nm) i za tablete 2: 20-50 nm, 15-20 nm i 10-15 nm. Dobijeni podaci pokazuju da procenat leka, otpušten u okviru bilo kog linearnog segmenta odgovara udelu zapremine određene grupe pora u ukupnoj zapremini pora. Dakle, pokazale se da do otpuštanja leka dolazi postepeno, prvo iz najvećih pora, a zatim iz srednjih i konačno iz najmanjih.

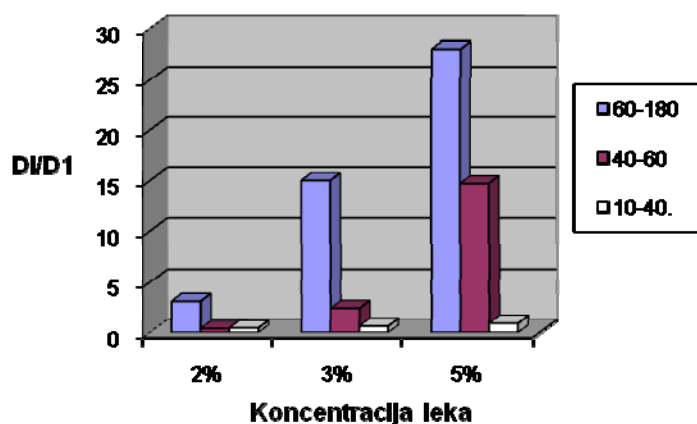
Zavisnost određenih efektivnih koeficijenata difuzije (D) od raspodele veličine pora i koncentracije leka, prikazana u Tabeli 4, posebno je analizirana sa aspekta uticaja ovih parametara na vrednost koeficijenta difuzije.

Tabela 4. *Koeficijenti difuzije za različite veličine pora i koncentracije leka*

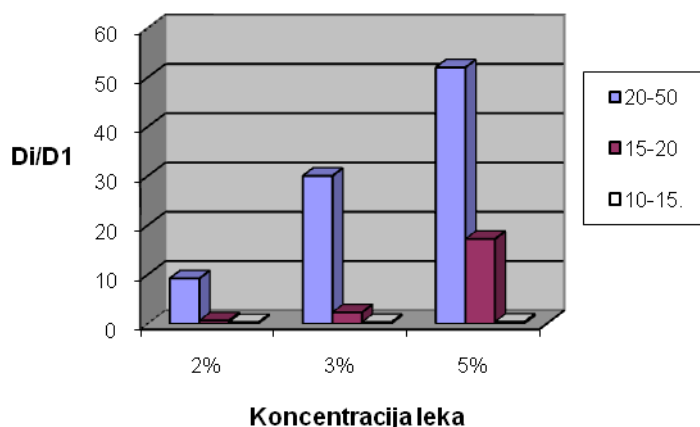
		$D \cdot 10^{-9}, \text{cm}^2/\text{s}$			
Primenjeni pritisak	Pore, nm	c=1 %	c=2 %	c=3 %	c=5 %
16 MPa	60-180	14	43	210	390
	40-60	3.2	1.3	7.8	47
	10-40	1.4	0.6	0.9	1.3
156 MPa	20-50	2.7	25	81	140
	15-20	1.1	73	2.5	19
	10-15	0.5	18	0.2	0.2

Kao što se može videti, koeficijent difuzije se povećava sa porastom koncentracije leka, ali takođe raste i sa povećanjem veličine pora, u okviru jedne posmatrane koncentracije.

Određen je i stepen promene koeficijenta difuzije sa koncentracijom za različite grupe pora. Najbolji način da se taj stepen promene izrazi je da se analizira odnos između koeficijenta difuzije za tablete sa visokom koncentracijom leka (2, 3 i 5 %) i koeficijenta difuzije za tablete sa najnižom koncentracijom leka (1%). Dobijeni podaci pokazuju da su promene koeficijenta difuzije sa koncentracijom naročito izražene za najveće pore, dok za manje pore, one postaju sve manje i manje (slika 45).



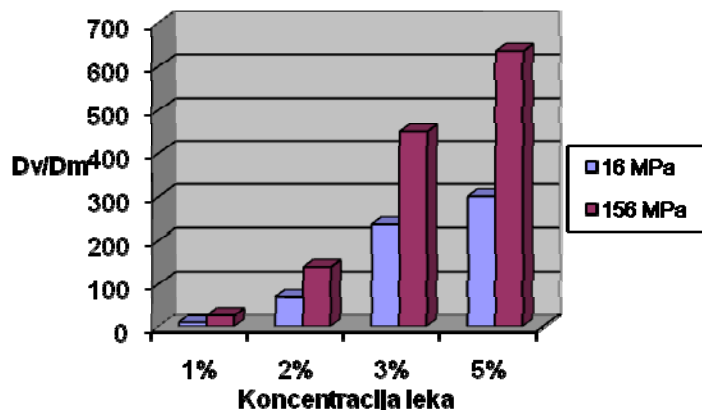
a)



b)

Slika 45. Odnos između koeficijenta difuzije za tablete sa većom koncentracijom leka (2, 3 i 5 %) i koeficijenta difuzije za tablete sa najmanjom koncentracijom leka (1%), za: a) tablete 1, b) tablete 2

Sa druge strane, razmatranje odnosa koeficijenta difuzije iz najvećih pora i koeficijenta difuzije iz najmanjih pora (slika 46) pokazuje da se razlika između njih povećava sa koncentracijom i posebno je izražena za tablete presovane pod većim pritiskom (156 MPa).



Slika 46. Zavisnost odnosa koeficijenta difuzije iz najvećih (D_v) i iz najmanjih (D_m) pora od koncentracije leka, za tablete presovane pod pritiskom od 16 i 156 MPa

U cilju da se utvrdi uticaj raspodele veličine pora i koncentracije leka na koeficijent difuzije, bilo je neophodno da se pronađe: a) odnos između koeficijenta difuzije iz tableta sa višim koncentracijama leka i koeficijenta difuzije iz tablete sa najnižom koncentracijom leka, za datu veličinu pora (slika 45), b) odnos između koeficijenta difuzije iz najvećih pora (tablete 1: 60-180 nm; tablete 2: 40-60 nm) i iz najsitnijih pora (tablete 1: 10-40 nm; i tablete 2: 10-15 nm) za datu koncentraciju leka (slika 46).

Poredeći vrednosti odnosa između koeficijenta difuzije koji se odnosi na više koncentracije (D_2 , D_3 i D_5 za koncentracije od 2, 3, odnosno 5%) i koeficijenta difuzije koji se odnosi na najnižu koncentraciju (1%, D_1), predstavljene na slici 45, najveće vrednosti su uočene za najveće pore: a) za tablete 1: $D_2/D_1=3.1$, $D_3/D_1=15$, $D_5/D_1=28$; i b) za tablete 2: $D_2/D_1=9.2$, $D_3/D_1=30$, $D_5/D_1=52$.

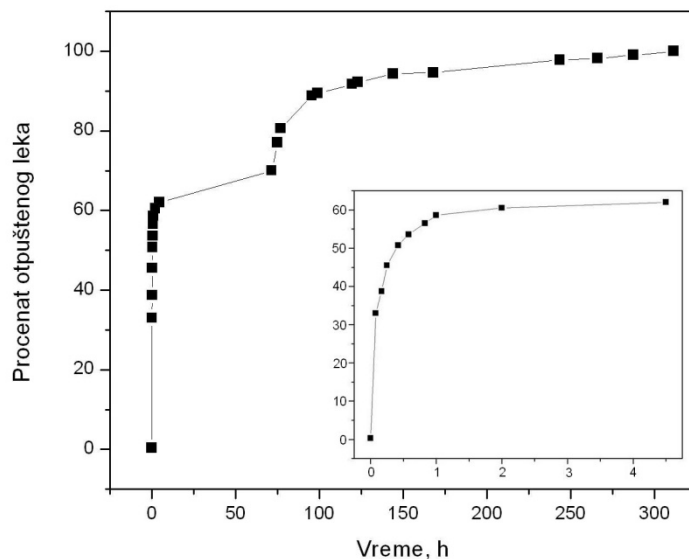
Sa druge strane, poredeći vrednosti odnosa koeficijenta difuzije iz najvećih pora i koeficijenta difuzije iz najmanjih pora, uočeno je: a) za tablete 1 ovi odnosi su 10, 68, 236 i 300 za koncentracije leka od 1, 2, 3, odnosno 5 %; b) za tablete 2 odnosi su 27, 139, 450 i 636, za koncentracije leka od 1, 2, 3, odnosno 5 %.

Najveće vrednosti odnosa koeficijenta difuzije za tablete sa većim koncentracijama i najmanjom koncentracijom, uočene su za najveće pore $D_5/D_1=28$ (tableta 1) i $D_5/D_1=52$ (tableta 2). Sa druge strane, najveće vrednosti odnosa D iz najvećih pora i D iz najmanjih pora, uočene su za najveću koncentraciju: 300 (tableta 1) i 636 (tableta 2). Očigledno je da su vrednosti koje odgovaraju konstantnoj koncentraciji više od deset puta veće nego vrednosti koje odgovaraju konstantnoj veličini pora. Odatle sledi da veličina pora ima dominantan uticaj na vrednost difuzionog koeficijenta. Iz datih podataka očigledno je da koncentracija leka ima najviše oko 10 % uticaja, a raspodela veličine pora oko 90 % uticaja na vrednost koeficijenta difuzije.

3.2.2.3. *Otpuštanje leka iz SiO₂*

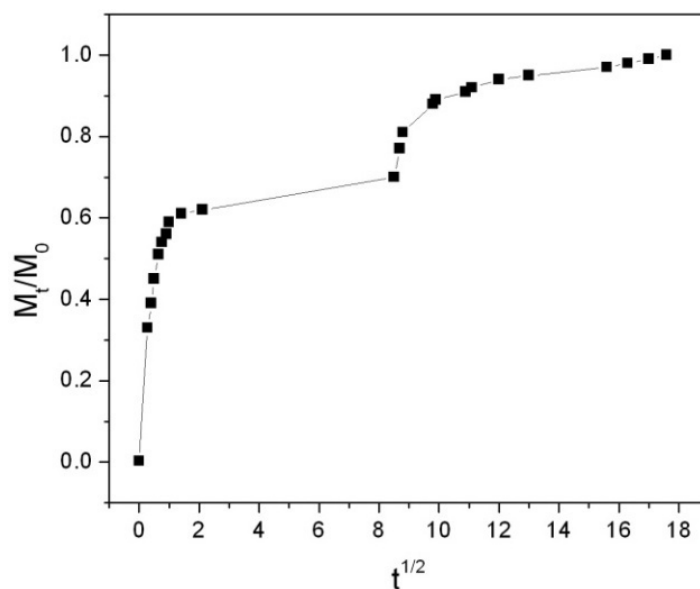
Metronidazol je inkorporiran u čestice SiO₂ tokom procesa ultrazvučnog sprej sušenja i njegovo otpuštanje je praćeno tokom vremena.

Na krivoj otpuštanja, prikazanoj na slici 47, možemo razlikovati dva parabolična dela: jedan koji obuhvata prvi period od 4,5 sati, kada je 62 % leka otpušteno, i drugi koji obuhvata period otpuštanja od 72 do 312 h, kada je 30 % leka otpušteno. Preostalih 8% leka je otpušteno u intervalu od 4,5 do 72 h.

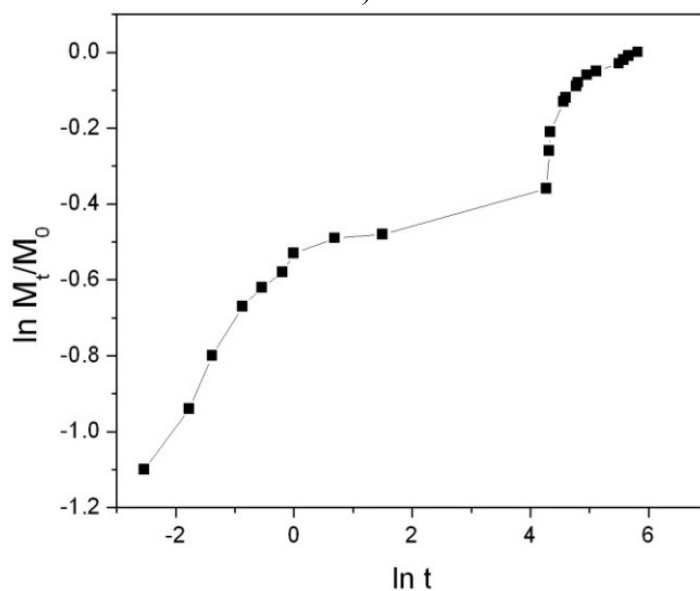


Slika 47. *Kriva otpuštanja metronidazola iz SiO₂ praha; insert u donjem desnom uglu predstavlja uvećan početni deo krive (0-4.5 h)*

Primenom Higučijeve i Korsmajer-Pepasove jednačine (slika 48), potvrđeno je da se ovi modeli mogu primeniti samo na početnu fazu otpuštanja leka (koja obuhvata period od samo jednog sata, kada je otpušteno 58 % leka). Pošto nijedna od ovih jednačina ne može opisati celu kinetiku otpuštanja leka, potrebno je drugo objašnjenje za mehanizam otpuštanja.



a)



b)

Slika 48. *Primena: a) Higučijeve, b) Korsmajer-Pepasove jednačine, na podatke o otpuštanju leka*

Kako SiO₂ čestice imaju veoma složenu strukturu i sub-strukturu, geometrija verovatno u velikoj meri utiče na brzinu otpuštanja leka. Stoga je bilo važno pronaći stepen korelacije između ova dva faktora, što je učinjeno poređenjem diskretnih vrednosti veličine pora, određenih u poglavlju 3.2.1.3.4 (slike 36 i 37) sa brzinom otpuštanja iz ovih pora.

Prvo je izračunata količina leka, koja može da se smesti u svaku od grupa pora (pore su grupisane prema veličini prečnika). Jednačine korišćene za izračunavanje raspodele veličine čestica (jednačine 2, 3 i 4), su takođe primenjene za izračunavanje udela zapremine pojedinih pora u ukupnoj zapremini pora. Koristeći ovu metodu, bilo je moguće izračunati zapreminu svake grupa pora ponaosob, kao i njihovu ukupnu zapreminu. Budući da je količina leka u ukupnoj zapremini pora poznata, na osnovu tog podatka i udela svake od grupa pora, količina leka otpuštenog iz bilo koje grupe je prilično tačno procenjena.

Za ovu analizu korišćena je i kriva na slici 48b, dobijena primenom Korsmajer-Pepasove jednačine na podatke o otpuštanju leka. Pošto se otpuštanje u prvih 15 minuta može smatrati kao otpuštanje sa površine čestica, što se dešava jako brzo (mnogo brže nego iz zapremine čestica), ono neće biti uključeno u dalja objašnjenja mehanizma otpuštanja leka. Ova metoda, koja omogućava egzaktn pristup kinetici i mehanizmu otpuštanja leka, zahteva podelu krive na slici 48b (samo deo koji odgovara periodu od prvih 15 min je isključen) u devet linearnih segmenata, koje opisuju devet različitih mehanizama i brzina otpuštanja leka (svaki koeficijent pravca, koji pripada određenom segmentu, može se posmatrati kao jedan poseban mehanizam). Ova metoda pokazuje kako su brzina otpuštanja leka povezane sa raspodelom veličine (izražene preko prečnika).

3.2.2.3.1. Raspodela veličine pora i kinetika otpuštanja leka

3.2.2.3.1.1. Veza između brzine otpuštanja leka i raspodele veličine pora određena iz eksperimentalnih podataka

Analiza krive na slici 48b pokazuje da prvi linearni segment obuhvata vreme otpuštanja od 15-og minuta do 1 sata, kada je otpušteno 0,068 mg leka. Poređenje eksperimentalno dobijene raspodele veličine pora (slika 36) sa odgovarajućim podacima

o otpuštanju leka pokazuje da je data količina leka otpuštena iz najvećih pora (35,6 nm), u kojima je (prema gore pomenutim proračunima) smešteno 0,069 mg leka. U toku narednih 27 h; 0,032 mg leka je otpušteno (ova vrednost odgovara drugom lineranom segmentu). Treći linearni segment obuhvata period otpuštanja od 28-og do 72-og sata, kada je 0,025 mg leka otpušteno. Tokom ova dva perioda otpušteno je ukupno 0,057 mg leka, što odgovara količini leka prisutnoj u porama prečnika 26,6 nm (koja, prema proračunu iznosi 0,058 mg). Sledeći linearni segment obuhvata period otpuštanja od 72-og do 77-og sata, kada je 0,057 mg leka otpušteno, što se može smatrati otpuštanjem iz pora prečnika 22,2 nm, koje po proračunu sadrže 0,046 mg leka. Peti linerani segment obuhvata period otpuštanja od 77-og do 99-og sata, kada je 0,045 mg leka otpušteno, a šesti od 99-og do 144-og, kada je otpušteno 0,026 mg leka. Tokom ova dva perioda ukupno je otpušteno 0,071 mg leka, što se može pripisati otpuštanju iz pora prečnika 17,8 nm (u kojima je smešteno 0,082 mg leka). Sedmi linerani segment obuhvata period otpuštanja od 144-og do 244-og sata, kada je 0,018 mg leka otpušteno, a osmi od 244-og do 288-og, kada je otpušteno 0,006 mg leka, što je ukupno 0,024 mg. Ova količina odgovara količini prisutnoj u porama prečnika 13,3 nm, koja, prema proračunu, iznosi 0,025 mg. Poslednji linerani segment obuhvata period otpuštanja od 288-og do 312-og sata, kada je otpušteno 0,005 mg leka, što se može smatrati otpuštanjem iz pora prečnika 8,9 nm, u kojima se nalazi 0,003 mg leka.

3.2.2.3.1.2. Veza između brzine otpuštanja leka i raspodele veličine pora određena primenom modela

Podaci o otpuštanju leka predstavljeni krivom na slici 48b poređeni su i sa raspodelom veličine pora, određenom pomoću teorijskog modela (slika 37). Prvi linearni segment krive na slici 48b obuhvata vreme otpuštanja od 15-og minuta do 1 sata, kada je otpušteno 0,068 mg leka, što odgovara količini smeštenoj u porama prečnika 36,8 nm (0,0712 mg). U toku narednih 27 h; 0,032 mg leka je otpušteno (drugi linerani segment). Treći linearni segment obuhvata period otpuštanja od 28-og do 72-og sata, kada je 0,025 mg leka otpušteno, a četvrti od 72-og do 77-og, kada je otpušteno 0,057 mg leka. Tokom ova tri perioda, ukupno je otpušteno 0,114 mg leka, što se može posmatrati kao otpuštanje iz pora prečnika 27 nm, unutar kojih se, po proračunu, nalazi 0,118 mg leka. Peti linerani segment obuhvata period otpuštanja od 77-og do 99-og sata,

kada je 0,045 mg leka otpušteno, što se poklapa sa količinom prisutnom u porama prečnika 20,5 nm (0,05 mg). U toku sledećeg segmenta (od 99-og do 144-og sata) je otpušteno 0,026 mg leka, što odgovara izračunatoj vrednosti) 0,021 mg), prisutnoj u porama prečnika 17,4 nm. Sedmi linerani segment obuhvata period otpuštanja od 144-og do 244-og sata, kada je 0,018 mg leka otpušteno, što se pripisuje otpuštanju iz pora prečnika 13 nm, u kojima se, kako je izračunato, nalazi 0,018 mg leka. Sledeći segment obuhvata period od 244-og do 288-og, kada je otpušteno 0,006 mg leka, dok je tokom poslednjeg (287,5-311,5 h), 0,005 mg leka otpušteno (ukupno 0,01 mg). Ovo se pripisuje otpuštanju iz pora prečnika 8,4 nm, gde je smešteno 0,0017 mg leka, po proračunu.

Ovde se javlja razlika između eksperimentalnih podataka i predviđanja pomoću modela, ali ona nije značajna, s obzirom da se radi o jako maloj količini leka (svega 3.5 % od ukupne količine). Ova količina nije pripisana nijednoj grupi pora, zbog toga što je ova količina verovatno otpuštena iz assembliranih delova silikatnog sola unutar sub-čestica, koji nisu uzeti u obzir u proračunima prilikom primene modela.

3.2.2.3.1.3. Poređenje eksperimentalnih i teorijskih podataka o raspodeli veličine pora i odgovarajućih brzina otpuštanja leka

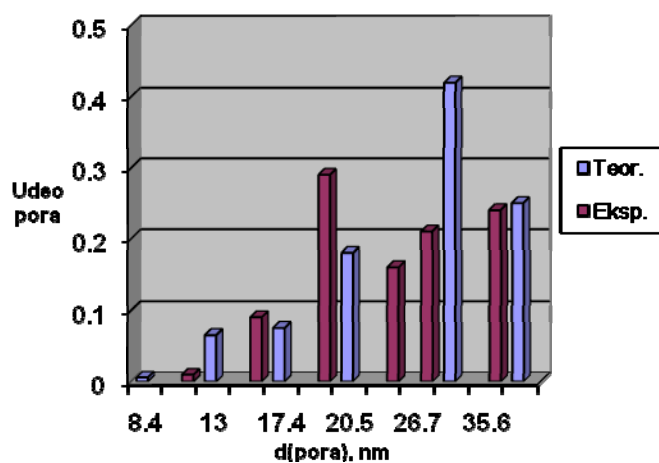
Kinetika otpuštanja leka je uslovljena veličinom pora; u različitim vremenskim periodima, otpuštanje se dešava iz pora različitih veličina. Tako, u toku prvog sata, lek se otpušta iz najvećih pora: eksperimentalno određena veličina pora- 35,6 nm i teorijski određena- 36,8 nm. U narednih 28 časova, lek se otpušta iz pora veličine 26,7 nm (eksperimentalno određeno)/ 27 nm (teorijski određeno). Do 77-og sata (sledećih 48 h) otpuštanje se dešava iz pora prečnika 22,2/ 20,5 nm. Otpuštanje u periodu do 144-og sata (sledećih 67 h) se dešava iz pora prečnika 17,8/ 17,4 nm, dok se u periodu 144-244 h lek otpušta iz pora prečnika 13,3/13 nm. I konačno, tokom poslednjeg perioda otpuštanja (244-312 h) lek se otpušta iz najmanjih pora (8,9/ 8,4 nm). Sve ove vrednosti su u veoma dobroj saglasnosti, čime se potvrđuje da je moguće predvideti kinetiku otpuštanja leka pomoću modela o dizajnu i čestica i sub-čestica.

3.2.2.3.1.4. Diskusija

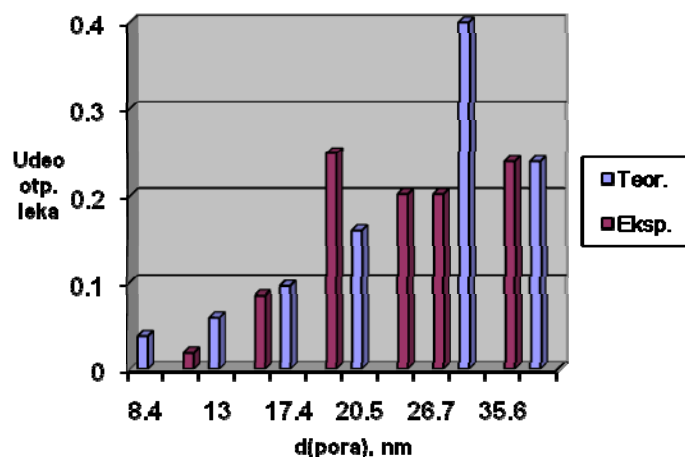
Gore navedeni podaci dati mogu biti prikazani u dva karakteristična grafikona, koji daju odnos između udela zapremine svake od diskretnih vrednosti pora u ukupnoj zapremini pora i udela leka, otpuštenog iz njih (slika 49). Pri tome su i teorijski i eksperimentalno određena veličina pora uzete u razmatranje.

Poređenjem grafikona na slici 49, evidentno je su udeo zapremine određenih pora i udeo leka otpuštenog iz njih kompatibilni, bez obzira da li su određeni teorijski ili eksperimentalno. U oba slučaja, lek se prvo otpušta iz najvećih pora (prečnika 27-36,8 nm (teorijski) ili 26,6-36,8 nm (eksperimentalno)), a zatim iz srednjih pora (17,4-20 nm ili 17,8-22,2 nm) i konačno iz onih najmanjih (8,4-13 nm ili 8,9-13,3 nm).

Sukcesivno otpuštanje leka iz pora daje jasan dokaz da je kinetika otpuštanja leka uslovljena veličinom pora, koja je uslovljena hijerarhijskom organizacijom sistema na više nivoa. Pokazalo se da je veličina pora ograničavajući faktor za kinetiku otpuštanja lekova. Budući da je veličina pore data kao skup diskretnih vrednosti, kinetika otpuštanja leka takođe može biti data kao niz odgovarajućih diskretnih vrednosti, i ova činjenica može biti od velikog značaja za dalji razvoj kinetike različitih farmaceutskih sistema, kako u teoriji tako i u praksi.



a)



b)

Slika 49. a) Udeo zapremine pora određenog prečnika u ukupnoj zapremini pora, b) Udeo leka, otpuštenog iz pora određenog prečnika

Veličina pora i njihov udeo u ukupnoj zapremini pora i kapacitet inkapsulacije leka i brzina njegovog otpuštanja imaju odgovarajuće diskretne vrednosti, koji jasno pokazuju da ova kinetika ima diskretan karakter. Mehanizam otpuštanja leka (definisano jednom ili sa više bliskih vrednosti koeficijenta pravca) se može predvideti iz strukture i sub-strukture sistema nosača leka. Modelovanje strukture i sub-strukture silikatnih čestica, u koje je inkapsuliran lek, ukazuje da, generalno, takav pristup može da bude veoma uspešan u modelovanju otpuštanja leka i njegovom kontrolisanju. Dati pristup pokazuje ne samo vezu između geometrije sistema i brzine otpuštanja leka, nego i nedvosmisleno upućuje na to da je ova kinetika zaista diskretna. On uključuje u sebe sve specifičnosti diskretnih sistema, koje potiču od dizajna strukture sistema.

3.2.2.3.1.5. Mehanizam otpuštanja leka sa aspekta različitih faktora koji utiču na brzinu otpuštanja

Pored raspodele veličine pora, treba razmotriti i nekoliko drugih faktora, koji utiču na kinetiku otpuštanja lekova, kao što su kvašenje, dužina difuzionog puta i promena hemijskog potencijala leka unutar pora tokom njegovog otpuštanja.

Otpuštanje leka se sastoji iz dva različita procesa. Prvi je kvašenje praha i drugi je difuzija „uzbrdo“, suprotno smeru kapilarnih sila odgovornih za kvašenje uzorka. U trenutku kada se dešava kvašenje uzorka, lek počinje da se otpušta sa površine i najvećih pora unutar uzorka. Ovi procesi se odvijaju paralelno, iako je na početku

otpuštanja leka, proces kvašenja u dubini uzorka verovatno sporiji, posebno unutar najmanjih pora. Kapilarne sile zavise od pora prečnika (oni se povećavaju sa smanjenjem prečnika pora, u skladu sa $F=\gamma/r$, gde je F kapilarna sila, γ je površinski napon i r je poluprečnik pora). Kapilarni pritisak unutar cilindrične cevi, izazvan kapilarnim silama, dat je izrazom:

$$p = \frac{2\gamma \cos \theta}{r},$$

gde je θ kontaktni ugao. Razlika u uglovima kvašenja za pore različitih prečnika se može zanemariti, jer površinski napon vode i karakteristike površine kvašenja su slične za različite veličine pora. Dakle, kapilarni pritisak pre svega zavisi od prečnika pora. Dobile vrednosti kapilarnog pritiska su između $3,5 \cdot 10^7$ Pa, za najmanje pore, i $7,9 \cdot 10^6$ Pa, za najveće pore.

Posle kvašenja pora u unutrašnjosti čestica praha, počinje proces difuzije i otpuštanja leka. Ovaj proces je uslovljen odgovarajućim hemijskim potencijalom leka, koji se može izraziti kao:

$$\mu = \mu_0 + RT \ln a,$$

gde je μ_0 – hemijski potencijal pri beskonačnom razblaženju, R – univerzalna gasna konstanta, a a – hemijska aktivnost leka. Ako pretpostavimo da je koeficijent aktivnosti blizak jedinici, onda se aktivnost leka može zameniti koncentracijom leka unutar pora. U uslovima termodinamičke ravnoteže, koncentracije leka u porama različitih veličina su skoro jednake.

Kinetika kvašenja za različite veličine pora je očigledno drugačija i zavisi od veličine pora i od rastojanja pora od površine čestice. Manje dimenzije pora i veća takva rastojanja prouzrokuju odloženo kvašenje za određeno vreme, jer je udaljenost od površine veoma važna sa aspekta dužine difuzionog puta, koji se može izraziti kao:

$$L_d = 2(Dt)^{1/2},$$

gde je D is koeficijent difuzije, a t je vreme difuzije. Odatle sledi da je vreme difuzije:

$$t = \frac{L_d^2}{4D},$$

i očigledno je da se ono povećava sa povećanjem difuzionog puta, odnosno sa udaljenošću pora od površine.

Koeficijent difuzije može da se izrazi iz prvog Fikovog zakona:

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x},$$

gde je J difuzioni fluks (g/m²s), D je koeficijent difuzije (m²/s), c je koncentracija leka (g/m³) i x je dužina difuzionog puta. Uzimajući zapreminu i površinu svih pora datog poluprečnika, za jedinični difuzioni put, koeficijent difuzije može se izračunati za različite grupe pora, odbranog prečnika. Prilikom ovih proračuna, stvarna geometrija pora (hiperboloidi) je uzeta u obzir. Usvojena je pretpostavka da su pore formirane između sub-čestica jednakih dimenzija. Uprkos datim pretpostavkama, koeficijenti difuzije dobijeni ovim proračunima su verovatno samo blizu njihovih realnih vrednosti (najveća vrednost za D je dobijena za najveće pore- 1,2·10⁻¹³ m²/s, dok je najmanja vrednost dobijena za najmanje pore- 1,0·10⁻¹⁶ m²/s, gradijent hemijskog potencijala je uzet u obzir u ovim proračunima).

Pored difuzivnosti i njenog uticaja na brzinu otpuštanja leka, promene u hemijskom potencijalu leka unutar pora različitih prečnika moraju biti uzete u obzir. Iako je u stvarnosti proces otpuštanja leka veoma složen, i ne može se tačno izraziti preko Fikovog prvog zakona; dati pristup može da obezbedi zaista prihvatljiv uvid u značaj veličine pora i odgovarajućih kašnjenja u promeni koncentracije unutar pora različitog prečnika. Da bi se navedena razmatranja pojednostavila, uzeto je da je gradijent koncentracije leka između manjih i većih pora jednak stvarnoj koncentraciji leka, izračunatoj na osnovu ukupne količine leka unutar pora određenog prečnika i ukupne zapremine ovih pora. Iako je hemijski potencijal promenljiv, jer proces otpuštanja počinje odmah nakon potapanja praha u PBS, brzina ovih promena u porama različitih veličina nije verovatno toliko visoka (gradijenti koncentracije posle jedan sat su nula za pore manje od 22,2 nm; posle 77 h, koncentracioni gradijent u najmanjim porama se smanjuje za 20 %, a nakon 144 h za 45%) i prema scenariju ovih postepenih promena, promene se prvo dešavaju u najvećim porama i na kraju u najmanjim. Shodno tome, hemijski potencijal postaje, više ili manje, niži u odnosu na početni. Najveće promene se javljaju na površini čestica i unutar najvećih pora. Dakle, proces otpuštanja leka je znatno sporiji iz pora manjeg prečnika, kao što je prikazano u prethodnoj diskusiji. Niži koeficijent difuzije odgovara difuziji leka iz pora manjeg prečnika. Smanjenje hemijskog potencijala, izazvano smanjenom koncentracijom leka unutar pora dovodi do smanjenja brzine difuzije. Svi ovi faktori utiču na brzinu otpuštanja leka i

vreme potrebno da se završi proces otpuštanja. Ipak, na osnovu dobijenih podataka, koji daju tesnu vezu između brzine otpuštanja leka i veličina pora, očigledno je da je veličina pora dominantan faktor koji utiče na kinetiku otpuštanja leka. Drugi, diskutovani faktori mogu imati određeni uticaj, koji se ne može zanemariti, ali oni očigledno nisu od suštinskog značaja za kinetiku otpuštanja lekova.

4. Zaključak

U okviru ove disertacije ispitana je mogućnost biomimičnog dizajniranja materijala koji bi se koristili kao implant/nosači u inženjerstvu koštanih tkiva, kao i mogućnost korišćenja nekih materijala, koji se već koriste kao zamenici koštanih tkiva, kao nosača za kontrolisano otpuštanje različitih antibiotika u ova tkiva, a proučavana je i kinetika njihovog otpuštanja.

U prvom delu disertacije ispitivano je formiranje bioaktivnih prevlaka kalcijum hidroksiapatita na površini dva različita supstrata, metalnog i keramičkog, biomimičnom metodom. Metalni supstrat je prethodno funkcionalizovan nabacivanjem tankog filma SiO_2 na njegovu površinu, dok je keramički supstrat funkcionalizovan nabacivanjem tankih polimernih filmova.

U slučaju oba supstrata, FT-IC metodom potvrđeno je prisustvo HAP-a na njihovoj površini posle određenog vremena nukleacije u STF-u. SEM mikroskopijom utvrđena je struktura samonukleiranog apatitnog filma. Merenjem mase uz korekcije zapremine, urađene BET metodom, pokazano je da debljina nukleiranog filma zavisi od vremena boravka supstrata u STF-u, kao i da dodatak bioaktivnih medijuma, FCS-a i EMEM-a, ubrzava proces samonukleacije apatitnog filma. Pokazano je da se biomimičnom metodom može dobiti apatit sličan onom kod prirodne kosti, što ukazuje da je ova metoda pogodna za nabacivanje bioaktivnih apatitnih prevlaka na implante koji se koriste u ortopedskoj hirurgiji, što bi doprinelo njihovom boljem vezivanju za kost. Pored toga, dobijene strukture upućuju na mogući mehanizam odvijanja nukleacije u *in vivo* uslovima. Biološka ispitivanja na ćelijama pokazala su da materijal nije citotoksičan, a test biofunkcionalnosti materijala na animalnom modelu pokazao je bolje rezultate u odnosu na komercijalni proizvod Geistlich Bio-Oss.

U drugom delu disertacije proučavana je kinetika otpuštanja antibiotika iz apatitnih i SiO_2 nosača, kao i iz kompozitnih nosača HAP/PLGA. Određivane su brzine otpuštanja antibiotika iz polimera inkorporiranog u porozni kalcijum hidroksiapatit, iz tableta dobijenih kompresijom praškastog apatita i iz SiO_2 praha, dobijenog sprej sušenjem.

Otpuštanje iz polimera inkorporiranog u porozni apatitni nosač trajalo je od 2 do 3 dana, u zavisnosti od primenjene metode inkapsulacije antibiotika u PLGA. Brzina

otpuštanja iz tableta razlikovala se u zavisnosti od vrste inkorporiranog antibiotika, tako je u slučaju metronidazola celokupna količina otpuštena za par sati dok je otpuštanje ciprocinola i tigeciklina trajalo danima. Takođe, značajne razlike u brzini otpuštanja javljale su se i u zavisnosti od toga pod kojim je pritiskom tableta presovana. Primenom Higučijeve i Korsmajer-Pepasove jednačine na dobijene rezultate pokazalo se da one odgovaraju samo u početnom periodu otpuštanja, dok se ne otpusti oko 65 % leka. Na primeru tableta sa inkorporiranim tigeciklinom analizirana je zavisnost brzine otpuštanja leka od raspodele veličine pora u uzorku, kao i od koncentracije leka i određeni su koeficijenti difuzije. Pokazalo se da brzina otpuštanja zavisi od koncentracije inkorporiranog leka ali da veličina pora i raspodela veličine pora imaju presudan uticaj na kinetiku otpuštanja. To dalje znači da, ukoliko je poroznost nosača precizno definisana, moguće je predvideti brzinu otpuštanja leka iz tog nosača.

Ispitivani SiO₂ sistem, kao potencijalni nosač za kontrolisano otpuštanje lekova, ima mnoge prednosti nad ostalim poznatim sistemima. Ovaj sistem može da obezbedi otpuštanje leka kroz veoma dugo vreme, kontrolisanom brzinom. Ponašanje ovakvog nosača je potpuno predvidivo i daje mnoge mogućnosti za modelna ispitivanja kinetike otpuštanja različitih aktivnih polarnih sistema sa malim molekulima, kao što su antibiotici. Značaj navedenih rezultata je potencijalno uspostavljanje kinetike diskretnih sistema, kao novog polja u kinetici, omogućeno teorijskim modelom o strukturnom dizajnu sistema na više nivoa.

5. *Literatura*

- [1] A.W. Xu, Y. Ma, H. Colfen, Biomimetic mineralization, *J. Mater. Chem.*, 17 (2007) 415–449.
- [2] E. Dujardin, S. Mann, Bio-inspired Materials Chemistry, *Adv. Mater.* 14 (2002) 775–788.
- [3] A.K. Dillow, A. M. Lowman: 'Preface', in *Biomimetic Materials and Design*, edited by Angela K. Dillow and Anthony M. Lowman, Marcel Dekker, Inc. New York · Basel, 2002.
- [4] A. Bigi, E. Boanini, B. Bracci, A. Facchini, S. Panzavolta, F. Segatti, L. Sturba, Nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium: a new fast biomimetic method, *Biomaterials* 26 (2005) 4085–4089.
- [5] A. Oyane, H.M. Kim, T. Furuya, T. Kokubo, T. Miyazaki, T. Nakamura, Preparation and assessment of revised simulated body fluids, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 65A (2003) 188–195.
- [6] T. Kokubo, Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment, *Acta mater.* 46 (1998) 2519-2527.
- [7] H. Takadama, T. Kokubo: 'In vitro evaluation of bone bioactivity', in: T. Kokubo, editor. *Bioceramics and their clinical applications*, p. 165-195; 2008, Woodhead Publishing Limited, Abington, England.
- [8] T. Kitsugi, T. Nakamura, T. Yamamuro, Kokubo T, T. Shibuya, M. Takagi, SEM-EPMA observation of three types of apatite containing glass ceramics implanted in bone: the variance of a Ca, P-rich layer. *J Biomed Mater Res* 21 (1987) 1255–1271.
- [9] T. Kokubo, C. Ohtsuki, S. Kotani, T. Kitsugi, T. Yamamuro, Surface structure of bioactive glass-ceramic A–W implanted into sheep and human vertebra. In: Heimke G, editor. *Bioceramics*, vol. 2. p. 113–21; 1990, Cologne: German Ceramic Society.
- [10] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, Solutions able to reproduce in vivo surface-structure change in bioactive glass-ceramic A–W. *J Biomed Mater Res* 24 (1990) 721–734.
- [11] M.R. Filgueiras, G.L. Torre, L.L. Hench, Solution effects on the surface reactions of a bioactive glass. *J Biomed Mater Res* 27 (1993) 445–453.

- [12] T. Kokubo, Bioactive glass ceramics: properties and applications, *Biomaterials* 12 (1991) 155–163.
- [13] T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity?, *Biomaterials* 27 (2006) 2907–2915.
- [14] H.M. Kim, K. Kishimoto, F. Miyaji, T. Kokubo, T. Yao, Y. Suetsugu, J. Tanaka, T. Nakamura, Composition and structure of apatite formed on organic polymer in simulated body fluid with a high content of carbonate ion, *J Mater Sci: Mater Med* 11 (2000) 421–426.
- [15] T. Kokubo, H. Kushitani, Y. Abe, Apatite coating on various substrates in simulated body fluids, *Bioceramics* 2 (1989) 235–242.
- [16] A. C. Tas, Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37⁰C in synthetic body fluids, *Biomaterials* 21 (2000) 1429-1438.
- [17] H. Takadama, M. Hashimoto, M. Mizuno, T. Kokubo, Round-robin test of SBF for *in vitro* measurement of apatite-forming ability of synthetic materials, *Phos. Res. Bull.* 17 (2004) 119–125.
- [18] H.M. Kim, K. Kishimoto, F. Miyaji, T. Kokubo, T. Yao, Y. Suetsugu, J. Tanaka, T. Nakamura, Composition and structure of the apatite formed on PET substrates in SBF modified with various ionic activity products, *J Biomed Mater Res* 46 (1999) 228 –235.
- [19] M. Niinomi, Recent metallic materials for biomedical applications, *Metal Mater Trans A* 33 (2002) 477-486.
- [20] T.J. Webster: ‘Nanophase ceramics: the future of orthopedic and dental implant material’, in: Ying JY, editor. *Nanostructured materials*, p. 125-166; 2001, New York: Academic Press.
- [21] E.S. Thian, J. Huang, S.M. Best, Z.H. Barber, R.A. Brooks, N. Rushton, W. Bonfield, The response of osteoblasts to nanocrystalline silicon-substituted hydroxyapatite thin films, *Biomaterials* 27 (2006) 2692-2698.
- [22] R.Z. LeGeros, Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates, *Clin Orthop Relat Res* 395 (2002) 81-98.
- [23] L. Su, C.C. Berndt, K.A. Gross, A. Kucuk, Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: a review. *J Biomed Mater Res Appl Biomat*, 58 (2001) 570-592.
- [24] V. Jokanović, B. Jokanović, D. Izvonar, B. Dačić, Thin films of SiO₂ and hydroxy-

apatite on titanium deposited by spray pyrolysis, *J.Mater.Sci.Mat. in Medicine* 8 (2008) 1871-1879.

[25] F. Barrere, C. M. van der Valk, R. A. J. Dalmeijer, C. A. van Blitterswijk, K. de Groot, P. Layrolle, In vitro and in vivo degradation of biomimetic octacalcium phosphate and carbonate apatite coatings on titanium implants, *J. Biomed. Mater. Res.* 64 (2003) 378-387.

[26] M. Uchida, H. M. Kim, T. Kokubo, T. Nakamura, Bonelike apatite formation induced on zirconia gel in simulated body fluid and its modified solutions, *J. Am. Ceram. Soc.* 84 (2001) 2041-2044.

[27] P. Li, C. Ohtsuki, T. Kokubo, Apatite formation induced by silica gel in a simulated body fluid, *J. Am. Ceram. Soc.* 75 (1992) 2094–2097.

[28] F. Yang, J. G. C. Wolke, J. A. Jansen, A role of hydrated silica, titania and alumina in forming biologically active bone-like apatite on implant, *Chemical Engineering Journal* 137 (2008) 154-161.

[29] L. L. Hench, *Bioceramics: From concept to clinic*, *J. Am. Ceram. Soc.*, 1991, 74, 1487.

[30] T. Kokubo, in: *Bone-bonding Biomaterials*, ed. P. Ducheyne, T. Kokubo and C. A. van Blitterswijk, p. 31; 1993, Reed Healthcare Communications, Leiderdorp, Netherlands.

[31] J. Xie, B. L. Luan, J. Wang, X. Y. Liu, C. Rorabeck, R. Bourne, Novel hydroxyapatite coating on new porous titanium and titanium-HDPE composite for hip implant, *Surface & Coatings Technology* 202 (2008) 2960–2968.

[32] L.L. Hench, in: *CRC Handbook of Bioactive Ceramics*, Vol. 1, ed. T. Yamamoro, L.L. Hench and J. Wilson, p. 7; 1990, CRC, Boca Raton, FL.

[33] L.L. Hench, in: *Ceramics in Substitutive and Reconstructive Surgery*, ed. P. Vincenzini, p. 259; 1991, Elsevier, Amsterdam.

[34] P. Li, I. Kangasniemi, K. de Groot, T. Kokubo, A.U. Yli-Urpo, Apatite crystallization from metastable calcium phosphate solution on sol-gel-prepared silica, *Journal of Non -Crystalline Solids* 168 (1994) 281 – 286.

[35] B. Čolović, B. Todorović-Marković, Z. Marković, D. Marković, M. Plavšić and V. Jokanović, Nucleation of calcium hydroxyapatite thin films from simulated body fluid, *Surf. Eng.* 26 (2010) 532-535.

- [36] B. Čolović, V. Jokanović, B. Todorović-Marković, Z. Marković, AFM investigations of calcium hydroxyapatite thin films on the surface of thin silica films, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 11 (2009) 70-75.
- [37] M.P. Ginebra, T. Traykova, J.A. Planell, Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review, *J. Control. Release* 113 (2006) 102–110.
- [38] W.J.E.M. Habraken, J.G.C. Wolke, J.A. Jansen, Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering, *Adv. Drug Delivery Rev* 59 (2007) 234–248.
- [39] B. Palazzoa, M.C. Sidoti, N. Roveri, A. Tampieri, M. Sandri, L. Bertolazzi, F. Galbusera, G. Dubini, P. Vena, R. Contro, Controlled drug delivery from porous hydroxyapatite grafts: An experimental and theoretical approach, *Mater. Sci. Eng., C* 25 (2005) 207–213.
- [40] R. Zhang, P. X. Ma, Biomimetic Polymer/Apatite Composite Scaffolds for Mineralized Tissue Engineering, *Macromol. Biosci.* 4 (2004) 100–111.
- [41] S.S. Kim, M.S. Park, O. Jeon, C.Y. Choi, B.S. Kim, Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* 27 (2006) 1399–1409.
- [42] A.C. Jayasuriya, M. Assad, A. H. Jayatissa, N. A. Ebraheim, Dissolution behavior of biomimetic minerals on 3D PLGA scaffold, *Surf. Coat. Technol.* 200 (2006) 6336–6339.
- [43] M. Ngiam, S.Liao, A.J. Patil, Z. Cheng, C.K. Chan, S. Ramakrishna, The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering, *Bone* 45 (2009) 4–16.
- [44] I. Hofmann, L. Müller, P. Greil, F.A. Müller, Calcium phosphate nucleation on cellulose fabrics, *Surf. Coat. Technol.* 201 (2006) 2392–2398.
- [45] P. Cromme, C. Zollfrank, L. Müller, F.A. Müller, P. Greil, Biomimetic mineralization of apatites on Ca²⁺ activated cellulose templates, *Mater. Sci. Eng. C* 27 (2007) 1-7.
- [46] J.C. Fricain, P.L. Granja, M.A. Barbosa, B. de Jeso, N.Barthe, C.Baquey, Cellulose phosphates as biomaterials. In vivo biocompatibility studies, *Biomaterials* 23 (2002) 971–980.

- [47] M. Lee, W. Li, R.K. Siu, J. Whang, X. Zhang, C. Soo, K. Ting, B.M. Wu, Biomimetic apatite-coated alginate/chitosan microparticles as osteogenic protein carriers, *Biomaterials* 30 (2009) 6094–6101.
- [48] A. Tampieri, M. Sandri, E. Landi, G. Celotti, N. Roveri, M. Mattioli-Belmonte, L. Virgili, F. Gabbanelli, G. Biagini, HA/alginate hybrid composites prepared through bio-inspired nucleation, *Acta Biomaterialia* 1 (2005) 343–351.
- [49] L. Wang, R.M. Shelton, P.R. Cooper, M. Lawson, J.T. Triffitt, J.E. Barralet, Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering, *Biomaterials* 24 (2003) 3475–3481.
- [50] Z. Li, H.R. Ramay, K.D. Hauch, D. Xiao, M. Zhang, Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* 26 (2005) 3919–3928.
- [51] A. Tampieri, G. Celotti, E. Landi, From biomimetic apatites to biologically inspired composites, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 568–576.
- [52] X. Chen, B. Lei, Y. Wang, N. Zhao, Morphological control and in vitro bioactivity of nanoscale bioactive glasses, *Journal of Non-Crystalline Solids* 355 (2009) 791–796.
- [53] S. H. Lee, H. Shin, Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 339–359.
- [54] A. K. Jain, Ramesh Panchagnula, Skeletal drug delivery systems, *International Journal of Pharmaceutics* 206 (2000) 1–12.
- [55] H. Aoki, Science and Medical Applications of Hydroxyapatite, *Jpn. Ass. of Apatite Sci.*, Takayama Press. Sys. Cent. Co., Tokyo, (1991) 1–10.
- [56] S. K. Ritter, Boning up, *Chem. Eng. News* 25 (1997) 27–32.
- [57] S. Matić, A. Škundrić, Materijali u oralnoj implantologiji. *Oralna implantologija* 1, 1 (1996) 37-42.
- [58] D.W. Hutmacher, Polymeric scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials* 21 (2000) 2529–2543.
- [59] K. Rezwani, Q. Z. Chen, J. J. Blaker, A. R. Boccaccini, Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* 27 (2006) 3413–3431.
- [60] S. Lepretre, F. Chai, J.C. Hornez, Guillaume Vermet, C. Neut, M. Descamps, H. F. Hildebrand, B. Martel, Prolonged local antibiotics delivery from hydroxyapatite functionalized with cyclodextrin polymers, *Biomaterials* 30 (2009) 6086–6093.

- [61] A.G. Gristina, Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 237 (1987) 1588–1595.
- [62] N. Fletcher, D. Sofianos, M. B. Berkes, W. T. Obremsky, Prevention of perioperative infection, *J Bone Joint Surg Am* 89 (2007) 1605–1618.
- [63] A. Slosarczyk, J. Szymura-Oleksiak, B. Mycek, The kinetics of pentoxifylline release from drug-loaded hydroxyapatite implants, *Biomaterials* 21 (2000) 1215-1221.
- [64] M. Teller, U. Gopp, H.G. Neumann, K.D. Kühn, Release of Gentamicin From Bone Regenerative Materials: An In Vitro Study, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 81B (2007) 23-29.
- [65] H. S. Gold, R. S. Moellering Jr, Antimicrobial-drug resistance. *N. Engl. J. Med.* 335 (1996) 1445–1453.
- [66] M. Zilberman, J. J. Elsner, Antibiotic-eluting medical devices for various applications, *J. Control. Release* 130 (2008) 202–215.
- [67] V. Mourino, A.R. Boccaccini, Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds, *J. R. Soc. Interface* 7 (2010) 209–227.
- [68] R.Z. Legeros, J.P. Legeros: ‘Hydroxyapatite’, in T. Kokubo, editor. *Bioceramics and their clinical applications*, p. 367-393; 2008, Woodhead Publishing Limited, Abington, England.
- [69] J. Chevalier, L. Gremillard, Ceramics for medical applications: A picture for the next 20 years, *Journal of the European Ceramic Society* 29 (2009) 1245–1255.
- [70] L. Hench, Bioceramics, *J. Am. Ceram. Soc.*, 81 (1998) 1705–1727.
- [71] Y. Boonsongrit, H. Abea, K. Sato, M. Naito, M. Yoshimura, H. Ichikawa, Y. Fukumori, Controlled release of bovine serum albumin from hydroxyapatite microspheres for protein delivery system, *Materials Science and Engineering B* 148 (2008) 162–165.
- [72] M. Otsuka, Y. Matsuda, J.L. Fox, W.I. Higuchi, D. Yu, J. Wong, A novel skeletal drug delivery system for antibacterial drugs using self-setting hydroxyapatite cement, *Chem. Pharm. Bull.* 38 (1990) 3500–3502.
- [73] U. Joosten, A. Joist, G. Gosheger, U. Liljenqvist, B. Brandt, C. von Eiff, Effectiveness of hydroxyapatite - vancomycin bone cement in the treatment of *Staphylococcus aureus* induced chronic osteomyelitis, *Biomaterials* 26 (2005) 5251–5258.

- [74] D. Yu, J. Wong, Y. Matsuda, J. L. Fox, W. I. Higuchi, Self-setting hydroxyapatite cement: a novel skeletal drug-delivery system for antibiotics, *J. Pharm. Sci.* 81 (1992) 529–531.
- [75] A. K. Dash, G. C. Cudworth II, Therapeutic Applications of Implantable Drug Delivery Systems, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 40 (1998) 1–12.
- [76] F. Korkusuz, A. Uchida, Y. Shinto, N. Araki, K. Inoue, K. Ono, Experimental implant-related osteomyelitis treated by antibiotic- calcium hydroxyapatite ceramic composites. *J Bone Jt. Surg.* 75 (1993) 11–14.
- [77] P. Sibilla, A. Sereni, G. Aguiari, M. Banzi, E. Manzati, C. Mischiati, Effects of a hydroxyapatite-based biomaterial on gene expression in osteoblast-like cells, *J. Dent. Res.* 85 (2006) 354–358.
- [78] F. Ye, H. Guo, H. Zhang, X. He, Polymeric micelle-templated synthesis of hydroxyapatite hollow nanoparticles for a drug delivery system, *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 2212-2218.
- [79] T.Y. Liu, S.Y. Chen, D.M. Liu, S.C. Liou, On the study of BSA-loaded calcium-deficient hydroxyapatite nano-carriers for controlled drug delivery, *J. Control. Release* 107 (2005) 112–121.
- [80] B. Palazzo, M. Iafisco, M. Laforgia, N. Margiotta, G. Natile, C. L. Bianchi, Biomimetic hydroxyapatite-drug nanocrystals as potential bone substitutes with antitumor drug delivery properties, *Adv. Funct. Mater.* 17 (2007) 2180–2188.
- [81] Y.R. Cai, Y.K. Liu, W.Q. Yan, Q.H. Hu, J.H. Tao, M. Zhang et al., Role of hydroxyapatite nanoparticle size in bone cell proliferation. *J. Mater. Chem.* 17 (2007) 3780–3787.
- [82] H.W. Kim, J. C. Knowles, H.E. Kim, Hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery, *Biomaterials* 25 (2004) 1279–1287.
- [83] K. Rezwani, Q.Z. Chen, J.J. Blaker, Aldo Roberto Boccaccini, Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* 27 (2006) 3413–3431.
- [84] H.W. Kim, S.Y. Lee, C.J. Bae, Y.J. Noh, H.E. Kim, H.M. Kim, J.S. Ko, Porous ZrO_2 bone scaffold coated with hydroxyapatite with fluorapatite intermediate layer,

Biomaterials 24 (2003) 3277–3284.

[85] R. Holmes, R. Bucholz, V. Mooney, Porous hydroxyapatite as a bone-graft substitute in metaphyseal defects, a histometric study, *J. Bone Jt. Surg.* 68A (1986) 904.

[86] M.L. Ho, Y.C. Fu, G.J. Wang, H.T. Chen, J.K. Chang, T.H. Tsai, C.K. Wang, Controlled release carrier of BSA made by W/O/W emulsion method containing PLGA and hydroxyapatite, *Journal of Controlled Release* 128 (2008) 142–148.

[87] H.W. Kim, J.C. Knowles, H.E. Kim, Hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery, *Biomaterials* 25 (2004) 1279–1287.

[88] A.R. Boccaccini, J.J. Blaker, V. Maquet, R.M. Day, R. Jerome, Preparation and characterisation of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and PLGA/Bioglass(R) composite tubular foam scaffolds for tissue engineering applications, *Mater. Sci. Eng. C* 25 (2005) 23–31.

[89] M. Sokolsky-Papkov, K. Agashi, A. Olaye, K. Shakesheff, A. J. Domb, Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (2007) 187–206.

[90] V. Luginbuehl, L. Meinel, H.P. Merkle, B. Gander, Localized delivery of growth factors for bone repair, *Eur. J Pharm. Biopharm.* 58 (2004) 197–208.

[91] L. Di Silvio, W. Bonfield, Biodegradable drug delivery system for the treatment of bone infection and repair, *J. Mater. Sci.-Mater. Med.* 10 (1999) 653–658.

[92] M.E. Furth, A. Atala, M.E. Van Dyke, Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine, *Biomaterials* 28 (2007) 5068–5073.

[93] E. Ural, K. Kesenci, L. Fambri, C. Migliaresi, E. Piskin, Poly(D,L-lactide/ ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite composites, *Biomaterials* 21 (2000) 2147–2154.

[94] B.L. Seal, T.C. Otero, A. Panitch, Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration, *Mater. Sci. Eng. Rep.* 34 (2001) 147–230.

[95] J. Jagur-Grodzinski, Biomedical application of functional polymers, *Reactive Funct. Polym.* 39 (1999) 99–138.

[96] R. Langer, D.A. Tirrell, Designing materials for biology and medicine, *Nature* 428 (2004) 487–492.

[97] Y.Y. Yang, H.H. Chia, T.S. Chung, Effect of preparation temperature on the characteristics and release profiles of PLGA microspheres containing protein fabricated

by double-emulsion solvent extraction/evaporation method, *J. Control. Release* 69 (2000) 81–96.

[98] D. Klose, F. Siepmann, K. Elkharraz, J. Siepmann, PLGA-based drug delivery systems: Importance of the type of drug and device geometry, *International Journal of Pharmaceutics* 354 (2008) 95–103.

[99] G. Gasparini, R.G. Holdich, S.R. Kosvintsev, PLGA particle production for water-soluble drug encapsulation: Degradation and release behavior, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 75 (2010) 557–564.

[100] J.E. Babensee, J.M. Anderson, L.V. McIntire, A.G. Mikos, Host response to tissue engineered devices, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 33 (1998) 111–139.

[101] C.M. Agrawal, R.B. Ray, Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering, *J. Biomed. Mater. Res.* 55 (2001) 141–150.

[102] J.O. Hollinger, Preliminary report on the osteogenic potential of a biodegradable copolymer of polylactide (PLA) and polyglycolide (PGA), *J Biomed Mater Res* 17 (1983) 71.

[103] C. Yang, H. Sheu, K. Chao, Templated Synthesis and Structural Study of Densely Packed Metal Nanostructures in MCM-41 and MCM-48, *Adv. Funct. Mater.* 12 (2002) 143.

[104] L. Zhang, W. Zhang, J. Shi, Z. Hua, Y. Li, J. Yan, A new thioether functionalized organic–inorganic mesoporous composite as a highly selective and capacious Hg^{2+} adsorbent, *Chem. Commun.* 2 (2003) 210.

[105] J.M. Xue, M. Shi, PLGA/mesoporous silica hybrid structure for, controlled drug release, *Journal of Controlled Release* 98 (2004) 209–217.

[106] I.I. Slowing, J.L. Vivero-Escoto, C. Wu, V.S.Y. Lin, Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers, *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (2008) 1278–1288.

[107] S. Areva, V. Aeaeritalo, S. Tuusa, M. Jokinen, M. Linden, T. Peltola, Sol–gel-derived TiO_2 – SiO_2 implant coatings for direct tissue attachment. Part II: Evaluation of cell response, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 18 (2007) 1633–1642.

[108] Y. Zhu, J. Shi, Y. Li, H. Chen, W. Shen, X. Dong, Storage and release of ibuprofen drug molecules in hollow mesoporous silica spheres with modified pore surface, *Microporous and Mesoporous Materials* 85 (2005) 75–81.

- [109] D. Gerion, J. Herberg, R. Bok, E. Gjersing, E. Ramon, R. Maxwell, J. Kurhanewicz, T.F. Budinger, J.W. Gray, M.A. Shuman, F.F. Chen, Paramagnetic silica-coated nanocrystals as an advanced MRI contrast agent, *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 12542–12551.
- [110] C. Graf, S. Dembski, A. Hofmann, E. Ruehl, A general method for the controlled embedding of nanoparticles in silica colloids, *Langmuir* 22 (2006) 5604–5610.
- [111] M. Zhu, H. Wang, J. Liu, H. He, X. Hua, Q. He, L. Zhang, X. Ye, J. Shi, A mesoporous silica nanoparticulate/b-TCP/BG composite drug delivery system for osteoarticular tuberculosis therapy, *Biomaterials* 32 (2011) 1986–1995.
- [112] A.L. Doadrio, E.M.B. Sousa, J.C. Doadrio, J. Perez Pariente, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regi, Mesoporous SBA-15 HPLC evaluation for controlled gentamicin drug delivery, *Journal of Controlled Release* 97 (2004) 125–132.
- [113] N.K. Mal, M. Fujiwara, Y. Tanaka, Photocontrolled reversible release of guest molecules from coumarin-modified mesoporous silica, *Nature* 421 (2003) 350.
- [114] P. Horcajada, A. Ra´mila, I. Diaz, J. Perez-Pariente, M. Vallet-Regi, Influence of pore size of MCM-41 matrices on drug delivery rate, *Micropor. Mesopor. Mater.* 68 (2004) 105.
- [115] L. Meseguer-Olmo, M.J. Ros-Nicolas, V. Vicente-Ortega, M. Alcaraz-Banos, M. Clavel-Sainz, D. Arcos, C.V. Ragel, M. Vallet-Regi, C. Meseguer-Ortiz, A bioactive sol–gel glass implant for in vivo gentamicin release. Experimental model in rabbit, *J. Orthop. Res.* 24 (2006) 454–460.
- [116] S. Radin, G. El-Bassyouni, E.J. Vresilovic, E. Schepers, P. Ducheyne, In vivo tissue response to resorbable silica xerogels as controlled-release materials, *Biomater.* 26 (2004) 1043–1052.
- [117] P. Korteso, M. Ahola, S. Karlsson, I. Kangasniemi, A. Yli-Urpo, J. Kiesvaara, Silica xerogel as an implantable carrier for controlled drug delivery-evaluation of drug distribution and tissue effects after implantation, *Biomater.* 21 (1999) 193–198.
- [118] W. Zhao, J. Gu, L. Zhang, H. Chen, J. Shi, Fabrication of uniform magnetic nanocomposite spheres with a magnetic core/mesoporous silica shell structure, *J. Amer. Chem. Soc.* 127 (2005) 8916–8917.
- [119] J. Allouche, M. Boissiere, C. Helary, J. Livage, T. Coradin, Biomimetic core–shell gelatine/silica nanoparticles: a new example of biopolymer-based nanocomposites,

J. Mater. Chem. 16 (2006) 3120–3125.

[120] V. Jokanovic, M.D. Dramicanin, Z. Andric, B. Jokanovic, Z. Nedic, A.M. Spasic, Luminescence properties of SiO₂:Eu³⁺ nanopowders: Multi-step nano-designing, Journal of Alloys and Compounds 453 (2008) 253–260.

[121] V. Jokanovic, A.M. Spasic, D. Uskokovic, Designing of nanostructured hollow TiO₂ spheres obtained by ultrasonic spray pyrolysis, Journal of Colloid and Interface Science 278 (2004) 342–352.

[122] S. Esposito, S. Leone, Prosthetic joint infections: microbiology, diagnosis, management and prevention, International Journal of Antimicrobial Agents 32 (2008) 287–293.

[123] M.C. Hudson, W.K. Ramp, K.P. Frankenburg, Staphylococcus aureus adhesion to bone matrix and bone-associated biomaterials, FEMS Microbiology Letters 173 (1999) 279–284.

[124] I. Brook, M.A.O. Lewis, G.K.B. Sandor, M. Jeffcoat, L. P. Samaranayake, J. V. Rojas, Clindamycin in dentistry: More than just effective prophylaxis for endocarditis? Oral Surg Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 100 (2005) 550–558.

[125] E. Hoshino, K. Kota, M. Sato, M. Iwaku, Bacterial efficacy of metronidazole against bacteria of human carious dentine in vitro, Caries Res 22 (1988) 280–282.

[126] A. Akashi, Y. Matsuya, M. Unemori, A. Akamine, Release profile of antimicrobial agents from β-tricalciumphosphate cement, Biomaterials 22 (2001) 2713–2717.

[127] J. Hylands, Tigecycline: A new antibiotic, Intensive and Critical Care Nursing 24 (2008) 260–263.

[128] A.J. Ji, J.P. Saunders, N.D. Wadgaonkar, P.J. Petersen, K. O’Leary, W.E. McWilliams, P. Amorusi, M. Leal, E.N. Fluhler, A novel antibiotic bone assay by liquid chromatography/tandem mass spectrometry for quantitation of tigecycline in rat bone, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 44 (2007) 970–979.

[129] A.K. Meagher, P.G. Ambrose, T.H. Grasela, E.J. Ellis-Grosse, Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile for tigecycline- a new glycylycylcline antimicrobial agent, Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 52 (2005) 165–171.

[130] K.A. Rodvold, M.H. Gotfried, M. Cwik, J.M. Korth-Bradley, G. Dukart, E.J. Ellis-Grosse, J. Antimicrob. Chemother. 58 (2006) 1221–1229.

- [131] T. Doan, H.B. Fung, D. Mehta, P.E. Riska, Tigecycline: A Glycylcycline Antimicrobial Agent, *Clinical Therapeutics*, 28 (2006) 8.
- [132] C. Castro, C. Evora, M. Baro, I. Soriano, E. Sanchez, Two-month ciprofloxacin implants for multibacterial bone infections, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 60 (2005) 401–406.
- [133] E.P. Armstrong, V.A. Elsberry, Bone and joint infections in: J.T. Dipiro, R.L. Talbert, G.C. Yee, G.R. Matzke, B.G. Wells, L.M. Posey (Eds.), *Pharmacotherapy. A Pathophysiologic Approach* third ed., Aappleton and Lange, Stamford, CT, 1997, p. 111.
- [134] V.C. Martins, G. Goissis, Nonstoichiometric hydroxyapatite–anionic collagen composite, a support for the double sustained release of gentamicin and norfloxacin/ciprofloxacin, *Artif. Organs* 24 (2000) 224–230.
- [135] K. Kanellakopoulou, E.J. Giamarellos-Bourboulis, Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections, *Drugs* 59 (2000) 1223–1232.
- [136] C. Castro, E. Sanchez, A. Delgado, I. Soriano, P. Nunez, M. Baro, A. Perera, C. Evora, Ciprofloxacin implants for bone infection, In vitro–in vivo characterization, *J. Control Release* 93 (2003) 341–354.
- [137] P. Liu, T. Ju, Y. Qiu: ‘Diffusion-Controlled Drug Delivery Systems’, in: X. Li, B.R. Jasti, editors. *Design of Controlled Release Drug Delivery Systems*, p. 107-137; 2006, McGraw-Hill, USA.
- [138] M.P. Ginebra, T. Traykova, J.A. Planell, Calcium phosphate cements: Competitive drug carriers for the musculoskeletal system, *Biomaterials* 27 (2006) 2171-2177.
- [139] I.C. Tung, In-vitro drug release of antibiotic-loaded porous hydroxyapatite cement, *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 23 (1) (1995) 81–88.
- [140] M. Otsuka, Y. Nakahigashi, Y. Matsuda, J.L. Fox, W.I. Higuchi, Y. Sugiyama, A novel skeletal drug delivery system using self-setting calcium phosphate cement VIII: the relationship between in vitro and in vivo drug release from indomethacin-containing cement, *Journal of Controlled Release* 43 (1997) 115–122.
- [141] M. Otsuka, Y. Nakahigashi, Y. Matsuda, J.L. Fox, W.I. Higuchi, Y. Sugiyama, Effect of geometrical cement size on in vitro and in vivo indomethacin release from self-setting apatite cement, *Journal of Controlled Release* 52 (1998) 281–289.
- [142] R. W. Kormsmeier, R. Gurney, E. Doelker, P. Buri, N. A. Peppas, Mechanisms of

solute release from porous hydrophilic polymers, *International Journal of Pharmaceutics* 15 (1983) 25–35.

[143] V. Jokanović, B. Jokanović, D. Marković, V. Živojinović, S. Pašalić, D. Izvonar, M. Plavšić, Kinetics and sintering mechanisms of hydro-thermally obtained hydroxyapatite, *Materials Chemistry and Physics* 111 (2008) 180–185.

[144] V. Jokanović, D. Izvonar, M.D. Dramićanin, B. Jokanović, V. Živojinović, D. Marković, B. Dačić, Hydrothermal synthesis and nanostructure of carbonated calcium hydroxyapatite, *J. Mater. Sci.: Mat. in Medicine* 17 (2006) 539-546.

[145] X. Cheng, B. Nie, S. Kumar: *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* 18 (2008) 627-630.

[146] P. Li, I. Kangasniemi, K. de Grot, T. Kokubo: *J. Am. Ceram. Soc.* 77 (1994) 1307-1312.

[147] W. Song, Y. Jun, Y. Han, S. Hong, Biomimetic apatite coatings on micro-arc oxidized titania, *Biomaterials* 25 (2004) 3341-3349.

[148] B. Dupuy, A. Arien, A.P. Minnot, FT-IR membranes made with alginate/polylysine complexes. Variations with mannuronic or guluronic content of the polysaccharides. *Art Cells, Blood Subs. Immob Biotech* 20 (1994) 71–82.

[149] G. Lawrie, I. Keen, B. Drew, A. Chandler-Temple, L. Rintoul, P. Fredericks, L. Grøndahl, Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS, *Biomacromolecules* 8 (2007) 2533-2541.

[150] R.G. Zhabankov, S.P. Firsov, D.K. Buslov, N.A. Nikonenko, M.K. Marchewka, H. Ratajczak, Structural physico-chemistry of cellulose macromolecules. Vibrational spectra and structure of cellulose, *Journal of Molecular Structure* 614 (2002) 117–125.

[151] S.Y. Oh, D.I. Yoo, Y. Shin, G. Seo, FTIR analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide, *Carbohydrate Research* 340 (2005) 417-428.

[152] S.E. Petricca, K.G. Marra, P.N. Kumta, Chemical synthesis of poly(lactic-co-glycolic acid)/hydroxyapatite composites for orthopedics applications, *Acta Biomaterialia* 2 (2006) 277–286.

[153] H. Tai, C.E. Upton, L.J. White, R.Pini, G. Storti, M. Mazzotti, K.M. Shakesheff, S. M. Howdle, Studies on the interactions of CO₂ with biodegradable poly(DL-lactic acid) and poly(lactic acid-co-glycolic acid) copolymers using high pressure ATR-IR and high pressure rheology, *Polymer* 51 (2010) 1425–1431.

- [154] T. Nge, J. Sugiyama, Surface functional group dependent apatite formation on bacterial cellulose microfibrils network in a simulated body fluid, *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 81 (2007) 124-134.
- [155] M. Hashizume, H. Horii, J. Kikuchi, M. Kamitakahara, C. Ohtsuki, M. Tanihara, Effects of surface carboxylic acid groups of cerasomes, morphologically stable vesicles having a silica surface, on biomimetic deposition of hydroxyapatite in body fluid conditions, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 21 (2010) 11–19.
- [156] M. Tommila, A. Jokilampi, P. Terho, T. Wilson, R. Penttinen, E. Ekholm, Hydroxyapatite coating of cellulose sponges attracts bone-marrow-derived stem cells in rat subcutaneous tissue, *J. R. Soc. Interface* 6 (2009) 873-880.
- [157] M. Petrović, „Biološka aktivnost kompozitnih ćelijskih nosača na bazi visokoporoznih hidroksiapatita i njihov uticaj na tkivno inženjerstvo kosti“, Doktorska disertacija, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2012.
- [158] M. Oner, E. Yetiz, E. Ay, U. Uysal, Ibuprofen release from porous hydroxyapatite tablets, *Ceramics International* 37 (2011) 2117–2125.

Prilog A. Teorijski model za određivanje strukture sekundarnih čestica SiO₂

A1. Dizajn kapljica i čestica

Prinudna frekvencija ultrazvučnog oscilatora indukuje formiranje ekvivalentnih oscilacija unutar datog stuba tečnosti. Transverzalne oscilacije prostiru se normalno na ravan ultrazvučnog oscilatora, dok se longitudinalne prostiru paralelno sa ravni ultrazvučnog oscilatora. Oblik generisanih prostornih talasa zavisi od uslova superpozicije, definisanih površinskim naponom, viskozitetom tečnosti, dubinom tečnog stuba, oblikom posude i prinudnom frekvencijom ultrazvučnog oscilatora. Talasi su uglavnom elipsoidni, ali za dovoljno niske vrednosti dubine tečnog stuba, indukovani talasi imaju sferni oblik. U tom slučaju, faktor prigušenja za transverzalne talase može da se uporedi sa onim za longitudinalne talase, koji se prostiru kroz lamelarne granične slojeve sa gotovo zanemarljivim otporom. Za najjednostavniji slučaj generisanja sfernog talasa, pod pretpostavkom da je unutrašnji pritisak u tečnosti p mnogo veći od pritiska gasne faze iznad tečnosti p_0 , prema Laplasovoj jednačini, sledi:

$$p - p_0 = \sigma \left(\frac{\partial^2 \xi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \xi}{\partial z^2} \right), \quad (\text{A1})$$

gde je σ površinski napon, a $\xi(x, z)$ je amplituda stojećeg talasa formiranog na površini.

Prema Bernulijevoj jednačini, unutrašnji pritisak je dat jednačinom (A2):

$$p = -\rho g \xi - \rho \frac{\partial \phi}{\partial t}, \quad (\text{A2})$$

gde je ρ gustina tečnosti, g je gravitaciono ubrzanje, ϕ je potencijal brzine i t je vreme.

Kombinujući jednačine (A1) i (A2), dobija se jednačina (A3):

$$\rho g \xi + \rho \frac{\partial \phi}{\partial t} - \sigma \left(\frac{\partial^2 \xi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \xi}{\partial z^2} \right) = 0. \quad (\text{A3})$$

Veza između amplitude kapilarnog talasa ξ i potencijala brzine ϕ data je kao:

$$\frac{\partial \xi}{\partial t} = \frac{\partial \phi}{\partial y}. \quad (\text{A4})$$

Posle diferenciranja jednačine (A3) po vremenu i zamene jednačine (A4) u jednačinu (A3), dobija se jednačina:

$$\left\{ \rho g \frac{\partial \phi}{\partial z} + \rho \frac{\partial^2 \phi}{\partial t^2} - \sigma \left(\frac{\partial^2 \phi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \phi}{\partial z^2} \right)_{y=0} \right\} = 0, \quad (\text{A5})$$

čije je rešenje dato jednačinom (A6):

$$\phi = A e^{ky} \cos(kx - \omega t), \quad (\text{A6})$$

gde je k talasni broj stojećeg kapilarnog talasa, definisan kao $k=2\pi/\lambda$, a λ je talasna dužina kapilarnih talasa.

Za kratke talase, kao što su ultrazvučni (kada je moguće zanemariti uticaj gravitacionog polja), rešenje je dato jednačinom (A7):

$$\lambda = \left(\frac{8\pi\sigma}{\rho f^2} \right)^{1/3}, \quad (\text{A7})$$

gde je f frekvencija ultrazvučnog oscilatora.

Pod pretpostavkom da su talasi, formirani na tečnom meniskusu, stojeći kapilarni talasi i da su sve kapljice međusobno jednake, srednji prečnik kapljica (d_{da}) može da se izraziti kao polovina talasne dužine:

$$d_{da} = \frac{\lambda}{2}. \quad (\text{A8})$$

Posle odgovarajućih zamena, d_{da} je dat jednačinom (A9):

$$d_{da} = \left(\frac{\sigma\pi}{\rho f^2} \right)^{1/3}. \quad (\text{A9})$$

Ova formula je bila osnova za dobro poznatu Langeovu (Lange) formulu, koja se neznatno razlikuje od jednačine (A9), za empirijsku konstantu $k_L = 0,34$ (Jednačina A10).

$$d_{dL} = 0.34 \left(\frac{\pi\sigma}{\rho f^2} \right)^{1/3}. \quad (\text{A10})$$

Stojeći talas, u slučaju kad je elipsoidnog oblika, može biti predstavljen pomoću Laplasove jednačine, izražene u polarnim koordinatama:

$$\rho \frac{\partial^2 \phi}{\partial t^2} \Big|_{r=R} - \frac{\sigma}{R^2} \left\{ 2 \frac{\partial \phi}{\partial r} + \frac{\partial}{\partial r} \left[\frac{1}{\sin \theta} \frac{2 \left(\sin \theta \frac{\partial \phi}{\partial \theta} \right)}{2\theta} + \frac{1}{\sin^2 \theta} \frac{\partial^2 \phi}{\partial \theta^2} \right] \right\} = 0, \quad (\text{A11})$$

gde je r poluprečnik kapljice aerosola, a ε i θ su uglovi, koji odgovaraju polarnim koordinatama. Rešenje jednačine (A11) daje set vrednosti poluprečnika ekvivalentnih datom faktoru prigušenja talasa:

$$d = \frac{1}{\pi} \left(\frac{2\sigma\pi}{\rho f^2} \right)^{1/3} [l(l-1)(l+2)]^{1/3}, \quad (\text{A12})$$

gde je l ceo broj, $l \geq 2$.

Spektar raspodele, dobijen kao serije vrednosti, može biti dat u sledećem obliku:

$$d_{dn} = \frac{[2l(l-1)(l+2)]^{1/3}}{\pi} d_d, \quad (\text{A13})$$

gde je d_d vrednost koja odgovara rezonanci tečnog stuba i prinudne frekvencije oscilatora. Vrednost d_{dn} odgovara setu rezonantnih frekvencija tečnog stuba za različite oblike talasa (kapljica). Minimalna frekvencija dobijena iz serija izračunatih frekvencija, zbog degeneracije oblika prostornih talasa (kapljica) može da se predstavi kao:

$$f_{n0} = \frac{2\sqrt[3]{2}}{\pi} f_s. \quad (\text{A14})$$

Prema tome, prečnik kapljice aerosola (d_{n0}) dat je jednačinom (A15):

$$d_{n0} = 2 \frac{\sqrt[3]{2}}{\pi} \left(\frac{\sigma\pi}{\rho f^2} \right)^{1/3}. \quad (\text{A15})$$

Spektar raspodele sekundarnih čestica, za visinu tečnog stuba h ($h \ll a$, b i $a \approx b$), povezujući oba faktora degeneracije, faktor degeneracije prinudne frekvencije izazvan faktorom prigušenja talasa i faktor degeneracije karakteristične frekvencije izazvane promenom visine tečnog stuba, može se izraziti kao:

$$d_n = \frac{2}{\pi} \left[\frac{\pi\sigma h^2}{\rho p^2 c^2} \right]^{1/3} [l(l-1)(l+2)]^{1/3}. \quad (\text{A16})$$

Na osnovu dobijenih diskretnih vrednosti veličine kapljiva aerosola pomoću jednačine (A16), prečnik čestica praha (d_p) može se izračunati iz jednačine (A17):

$$d_p = d_n \left(\frac{c_{pr} M_p}{\rho_p M_{pr}} \right)^{1/3}, \quad (\text{A17})$$

gde je c_{pr} koncentracija prekursora (polazni rastvor), M_p je molekulska masa praha, ρ_p je gustina praha, i M_{pr} je molekulska masa prekursora.

A2. Dizajn sub-kapljica

Kapljica aerosola, nakon njenog otkidanja sa površine tečnog meniskusa, nastavlja da bude nosilac prenete ekscitacije, delujući se kao indukovani mehanički oscilator čija je karakteristična frekvencija određena geometrijom kapljice i frekvencijom ekscitacije. Centralno simetrični stojeći talas, formiran pod uticajem spoljašnjeg fizičkog polja, prostire se kroz kapljicu aerosola izazivajući formiranje velikog broja nanooscilatora- nanokapljica. Ove nanokapljice, na kraju procesa očvršćavanja, uzrokuju formiranje nanoelemenata/ sub-čestica.

Za određivanje prečnika ovih sub-čestica, koristi se talasna jednačina koja definiše prostiranje poremećaja kroz datu kapljicu:

$$\frac{\partial^2 \varphi}{\partial t^2} = c^2 \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial \varphi}{\partial r} \right), \quad (\text{A18})$$

gde je φ potencijal brzine, c je brzina prostiranja talasa kroz kapljicu, r je poluprečnik kapljice i t je vreme.

Rešenje jednačine (A18) je dato kao:

$$\varphi = \frac{f_{1r}(ct-r)}{r} + \frac{f_{2r}(ct+r)}{r}, \quad (\text{A19})$$

gde su f_{1r} i f_{2r} proizvoljne funkcije. Iz monohromatskog sfernog talasa, pošto svaka kapljica odgovara jednoj vrednosti frekvencije ekscitacije, moguće je dobiti krajnje rešenje jednačine (A16):

$$\varphi = A e^{-2\pi f t} \frac{\sin kr}{r}, \quad (\text{A20})$$

gde je f frekvencija ekscitacije kapljice, A je talasna amplituda i $k = \omega/c$ je talasni broj (ω je kružna frekvencija).

Granični uslovi su $\partial \phi / \partial r = 0$ i $r = R$, pa se jednačina transformiše u:

$$tgkR = kR. \quad (\text{A21})$$

Grafičko rešenje jednačine (A17) je dato u obliku:

$$\omega = \frac{Nc}{R_s} \text{ i } f = \frac{N'c}{R_s}, \quad (\text{A22})$$

$$R_s = \frac{N'c}{f} \text{ ili } d_{sd} = \frac{2N_c}{f}. \quad (\text{A23})$$

gde je R_s poluprečnik, a d_{sd} je prečnik nanoelemenata/nanokapljica, N i N' su brojne konstante, uzimajući sledeće vrednosti: $N = 4,49; 7,6; 10,8; 14; 24,0; \dots$; i $N' = 0,715; 1,21; 1,72; 2,23; 2,74; 3,82; \dots$

Konačno, vrednost prečnika sub-čestica može se izračunati pomoću jednačine (A17). U zavisnosti od stepena spajanja, jednačina (A17) treba da se koriguje vrednoću odgovarajućeg faktora pakovanja, koji raste sa stepenom razblaženja sistema i sa smanjenjem temperature očvršćavanja (temperature unutar reakcione cevne peći).

A3. Faktor pakovanja

Faktor pakovanja sistema (F_p), definisan kao odnos zapremina čestice teorijske gustine i čestice stvarnog srednjeg prečnika, izražen je kao:

$$F_p = \frac{V_T}{V_S} = \left(\frac{d_T}{d_S} \right)^3, \quad (\text{A24})$$

gde su d_T i d_S teorijska i stvarna vrednost prečnika. Znajući vrednost faktora pakovanja, broj nanoelemenata (N_p) u zapremini sekundarne čestice praha, može da se izračuna iz jednačine (A25):

$$N_p = \frac{6F_p}{\pi d^3}. \quad (\text{A25})$$

Broj kontakata po jedinici zapremine unutar sekundarne čestice (N_c) dat je sledećim izrazom:

$$N_c = \frac{3F_p Z}{\pi d^3}, \quad (\text{A26})$$

gde je Z koordinacioni broj, koji zavisi od gustine pakovanja, uzimajući vrednosti od 6 (za kubično pakovanje, sa najnižim stepenom pakovanja između pojedinačnih elemenata) do 12 (za tetraedarsko pakovanje sa najvišim stepenom pakovanja). Gustina pakovanja, u nasumično aranžirane sfere, slična je faktoru pakovanja koji odgovara ortorombičnom rasporedu (gustina pakovanja je 60,5 % teorijske gustine).

A4. Pore

Formula za određivanje ukupne zapremine pora V_p može da se izrazi kao:

$$V_p = 8r^3 - \frac{6}{4} \left(\frac{4}{3} \right) r_{sp}^3 \pi = 2r_{sp}^3 (4 - \pi) \approx 1,72r_{sp}^3 \pi, \quad (\text{A27})$$

gde je r_{sp} srednji poluprečnik sub-čestica.

Srednji poluprečnik pora (r_p) može da se izrazi iz:

$$\frac{4}{3} r_p^3 \pi = 1,72r_{sp}^3. \quad (\text{A28})$$

Biografija autora

Božana Čolović rođena je 11.01.1983. godine u Kninu. Osnovno i srednje obrazovanje završila je u Arandelovcu. Tehnološko-metalurški fakultet, Univerziteta u Beogradu, upisala je 2001. godine. Diplomirala je 2007. godine na odseku za Biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju sa prosečnom ocenom 9,00, odbranivši diplomski rad pod nazivom: „Proizvodnja alginatnih čestica metodom ultrazvuka“, pod mentorstvom dr Branka Bugarskog. Na istom fakultetu upisala je doktorske studije školske 2006/2007. godine, studijski program Biotehnologija i Biohemijско inženjerstvo. Položila je sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija. Naučno-nastavno veće Tehnološko-metalurškog fakuleta donelo je odluku o usvajanju predloga teme doktorske disertacije u maju 2012.

Od 2007. godine zaposlena je u Institutu za nuklearne nauke „Vinča“, u Laboratoriji za radijacionu hemiju i fiziku. Bavi se istraživanjima u oblasti biomaterijala za primenu u inženjerstvu koštanih tkiva: keramički materijali (posebno hidroksiapatit - geometrijsko i strukturno dizajniranje apatita različitim postupcima hemijske sinteze), polimerni biomaterijali, polimer-keramika nanokompoziti. Istraživanja uključuju ispitivanje primene ovih sistema kao nosača za kontrolisano otpuštanje različitih lekova i praćenje kinetike njihovog otpuštanja.

Objavila je 11 naučnih radova, od kojih 3 u vrhunskim međunarodnim časopisima, 1 u istaknutom međunarodnom časopisu, 4 u međunarodnim časopisima i 3 u domaćim časopisima. Na međunarodnim naučnim skupovima predstavila je 8 radova.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana Božana Čolović
broj indeksa 27/06

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

**Biomimično dizajniranje nosača na bazi hidroksiapatita u cilju
inkapsulacije antibiotika sa kontrolisanim otpuštanjem**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija ni u celini ni u delovima nije bila preložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojimu drugih lica.

U Beogradu, 22. 11. 2012.

Potpis doktoranda

Božana Čolović

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Božana Čolović

Broj indeksa 27/06

Studijski program Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

Naslov rada Biomimično dizajniranje nosača na bazi hidroksiapatita u cilju inkapsulacije antibiotika sa kontrolisanim otpuštanjem

Mentor prof. dr Branko Bugarski

Potpisana Božana Čolović

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 22. 11. 2012.

Božana Čolović

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Biomimično dizajniranje nosača na bazi hidroksiapatita u

cilju inkapsulacije antibiotika sa kontrolisanim otpuštanjem

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

Potpis doktoranda

U Beogradu, 22.11.2012.

Borisa Čolović