

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET ZA FIZIČKU HEMIJU

Nenad R. Filipović

**Sinteza i karakterizacija biokompozita
poli (ϵ -kaprolakton) / nanočestice selena**

-Doktorska disertacija-

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

Nenad R. Filipović

**Synthesis and characterization of poly
(ϵ -kaprolakton) / selenium nanoparticles
biocomposite**

-Doctoral Dissertation-

Belgrade, 2018

Mentori

dr Magdalena Stevanović, naučni savetnik
Institut tehničkih nauka SANU

Prof. dr Miloš Mojović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Fakultet za fizičku hemiju

Članovi komisije

Prof. dr Marina Milenković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Prof. dr Gordana Ćirić-Marjanović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Fakultet za fizičku hemiju

U Beogradu,

Datum odbrane: _____

Najveću zahvalnost na izradi ove teze dugujem mentoru **Magdaleni Stevanović**, naučnom savetniku na Institutu tehničkih nauka SANU. Zahvalnost pre svega, na strpljenju tokom mog profesionalnog sazrevanja kao i na nesebičnoj pomoći koju mi je pružala od prvih eksperimenata do samog pisanja teze. Zahvaljujući njenoj velikoj posvećenosti uspeo sam da prebrodim sve poteškoće sa kojima sam se susretao tokom realizacije ovog doktorskog rada. Hvala na svemu!

Veliku zahvalnost dugujem mentoru sa fakulteta, prof. Milošu Mojoviću na pruženoj pomoći i podršci prilikom izrade disertacije.

Deo disertacije koji se tiče antibakterijskog ispitivanja je urađen na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, kod profesorke Marine Milenković i ovom prilikom joj se zahvaljujem na tome kao i na pomoći pri samoj izradi disertacije koju mi je pružila kao član komisije za ocenu disertacije.

Prof. Gordani Ćirić-Marjanović sa Fakulteta za fizičku hemiju se iskreno zahvaljujem što je pristala da bude član komisije za ocenu disertacije kao i na pruženim, jako korisnim savetima tokom pisanja teze.

Ova doktorska disertacija je urađena u Institutu tehničkih nauka SANU, u okviru projekta III45004 "Molekularno dizajniranje nanočestica kontrolisanih morfoloških i fizičko-hemijskih karakteristika i funkcionalnih materijala na njihovoj osnovi" čiji je rukovodilac prof. dr Dragoljub Uskoković. Veliku zahvalnost dugujem kolegama sa ovog projekta na konkretnoj pomoći i podršci koju su mi pružali u proteklom periodu kao i na lepoj atmosferi koju sam uvek delio sa njima.

Biokompatibilnost uzoraka ispitana je na Nacionalnom institutu za biologiju u Ljubljani, uz pomoć profesorke Metke Filipič i njenih saradnika dr Jane Nunić i dr Bojane Žegure. Njihova profesionalnost i želja da pruže podršku u ovim ispitivanjima je bila od izuzetne važnosti za samu izradu teze. Ispitivanja degradacije polimera u ekstraktu izolovanom iz bakterijskih ćelija su izvedena zahvaljujući dr Jasmini Nikodinović-Runić i dr Sanji Jeremić sa Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Kvantitativno određivanje selena je urađeno uz pomoć prof. Slavice Ražić sa Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Eksperimenti ramanske spektroskopije su urađeni na Fakultetu za fizičku hemiju uz srdačnu pomoć dr Danice Bajuk-Bogdanović. Karakterizacija infracrvenom spektroskopijom izvršena je na Institutu za opštu i fizičku hemiju uz pomoć dr Aleksandre Radulović kao i na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu uz pomoć docenta Aleksandra Marinkovića. Ispitivanje zeta potencijala urađeno je u INN "Vinča" uz pomoć dr Mirjane Marković dok je elektronska mikroskopija jednog dela uzoraka urađena kod prof. Vlade Pavlovića na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu i kod prof. Miloša Bokorova na Biloškom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu. Svima njima se ovim putem zahvaljujem na pruženoj pomoći. Disertacija ne bila urađena u ovom obliku da nije bilo moguće okarakterisati uzorke transmissionom i visokorezolucionom elektronskom mikroskopijom na čemu mi je pomogla dr Ines Bračko sa Instituta Jožef Stefan u Ljubljani, pa joj se ovom prilikom zahvaljujem na tome.

Posebnu se zahvaljujem svom bratu Milošu, na ogromnoj podršci koju mi je pružao tokom mog školovanja kao i na pomoći u ispitivanjima antikancerogene aktivnosti koja su izvršena za vreme njegovog boravka na Univerzitetu "Friedrich-Alexander" u Erlangenu u Nemačkoj.

Specijalnu zahvalnost dugujem svojoj Ani, Aleksi i Petru što mom životu daju pravi smisao. Doktorsku disertaciju posvećujem njima, svojim roditeljima kao i svima koje volim!!!

Nenad

Sinteza i karakterizacija biokompozita poli (ϵ -kaprolakton) / nanočestice selena

REZIME

Ova doktorska disertacija predstavlja multidisciplinarno istraživanje u okviru kojeg su utvrđeni optimalni uslovi sinteze sfernih čestica poli (ϵ -kaprolaktona) (PCL-a) sa inkorporiranim, sintetisanim nanočesticama selena; izvršena je detaljna karakterizacija novodobijenog biokompozita različitim metodama fizičko-hemijske analize i ispitana su biološka svojstva značajna za njegovu potencijalnu primenu. Istraživanja su realizovana kroz tri faze.

Prvu fazu su činile sinteza i karakterizacija sfernih čestica PCL-a, utvrđivanje uticaja različitih parametara sinteze na morfološke karakteristike dobijenih čestica i ispitivanje njihove biokompatibilnosti. Pokazano je da se fizičko-hemijskom metodom rastvarač/nerastvarač mogu dobiti uniformne sfere, prosečnog prečnika ~ 500 nm kada se kao stabilizator koristi poliglutaminska kiselina (PGA) koja istovremeno može imati ulogu i krioprotektanta. Primenom liofilizacije kao metode sušenja, veličina čestica je redukovana na < 200 nm pri koncentraciji rastvora PGA od 0,05%. Biokompatibilnost PCL čestica je ispitana u *in vitro* uslovima i rezultati su pokazali da čestice ne ispoljavaju štetan efekat na HepG2 ćelijama.

U okviru druge faze urađena je sinteza, karakterizacija i optimizacija parametara prilikom dobijanja amorfnih nanočestica selena (SeNp) kao i ispitivanje njihove antibakterijske i antikancerogene aktivnosti. Parametri koji su se pokazali kao najoptimalniji pri redukciji natrijum selenita (Na_2SeO_3) askorbinskom kiselinom su: (i) upotreba goveđeg serum albumina (BSA) kao stabilizatora i (ii) odnos molova između prekursora i redukcionog sredstva 5:1. Sintetisane sferne, amorfne nanočestice selena su veličine ≤ 80 nm. Rezultati ispitivanja antibakterijske aktivnosti SeNp na 6 različitih bakterijskih sojeva su pokazali značajnu efikasnost SeNp u inhibiciji Gram-pozitivnih bakterijskih sojeva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) i *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228),

glavnih uzročnika infekcija u ortopediji. Što se tiče antikancerogene aktivnosti pokazano je da pri koncentraciji od 3,75%, koloidni rastvor SeNp nakon 48h gotovo u potpunosti ubija HeLa ćelije, koje su korišćene kao model u ovim ispitivanjima.

U završnoj fazi urađena je sinteza i karakterizacija biokompozita PCL/SeNp, uz utvrđivanje optimalnih parametara pri kojima se koloidni rastvor SeNp može efikasno inkorporirati unutar PCL sfernih čestica. Izborom acetona i etanola za sistem rastvarač/nerastvarač uspešno su dobijene mikrosfere veličine 1-3 μm u koje su inkorporirane SeNp sa efikasnošću od 92%. Degradacija dobijenog biokompozita je ispitana u različitim degradacionim medijumima i to: (i) puferu fosfatnih soli (PBS), (ii) rastvoru lipaze izolovane iz pankreasa svinje u PBS-u, (iii) 0.1 M hlorovodoničnoj kiselini (HCL), i (iv) suspenziji ćelijskog ekstrakta izolovanog iz bakterijskog soja *P. aeruginosa* PAO1 u PBS-u. Pokazano je da nakon 660 dana ovaj biokompozitni sistem jako sporo otpušta SeNp u medijumima sa fiziološkim pH dok u kiselom medijumu nije zabeleženo prisustvo otpuštenog selena. Sa druge strane u bakterijskom ekstraktu je zabeleženo pojačano otpuštanje već posle prvog dana ali je nakon 7 dana dostignuta maksimalna vrednost od 29,2%. Na osnovu detaljne analize uzoraka degradacije, zaključeno je da je struktura PCL/SeNp takva da su otpuštene samo nanočestice selena koje su raspoređene bliže površini polimernih mikrosfera ili u amorfnim segmentima polimera. Na kraju je ispitana biokompatibilnost mikrosfera PCL/SeNp na HepG2 ćelijama i dobijeni rezultati su potvrdili da je ovaj biokompozit bezbedan za potencijalnu biomedicinsku primenu.

Eksperimentalne tehnike kojima su vršene fizičko-hemijske karakterizacije uzoraka su: infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR), ramanska spektroskopija, difrakcija rendgenskog zračenja (XRD), skenirajuća, transmisiona i visokorezoluciona transmisiona elektronska mikroskopija (SEM, TEM i HRTEM), metoda određivanja raspodele veličina čestica (PSD), metoda merenja zeta potencijala, termogravimetrijska i diferencijalna termijska analiza (TGA-DTA), diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC), atomska emisiona spektroskopija sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-AES). Za biološka ispitivanja korišćene su Bujon-mikrodiluciona metoda za određivanje

antimikrobne aktivnosti, kolorimetrijski test za određivanje ćelijske metaboličke aktivnosti (MTT test), 2',7' - dihlorofluorescein diacetate (DCFDA) test za određivanje nastanka reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) i komet test za određivanje potencijalne genotoksičnosti.

Ključne reči: biodegradabilni polimeri, poli (ϵ -kaprolakton), mikrosfere, kontrolisana dostava, biokompoziti, biomedicina, nanočestice selena, fizičko-hemijska karakterizacija materijala.

Naučna oblast:

Fizička hemija

Uža naučna oblast:

Nauka o materijalima

UDK: 66.017:615

Synthesis and characterization of poly-(ϵ -caprolactone)/selenium nanoparticles biocomposite

ABSTRACT

This doctoral dissertation represents a multidisciplinary study in which optimal synthesis conditions of poly-(ϵ -caprolactone) (PCL) spherical particles with incorporated selenium nanoparticles were determined, comprehensive characterization of obtained systems by various physicochemical methods was conducted and investigations of biological properties significant for the potential application of this biocomposite material were performed. In order to complete these tasks investigations were carried out into three consequent stages.

The first stage was synthesis and characterization of spherical PCL particles, investigation of influence of different experimental parameters on obtained particles morphology, as well as investigation of their biocompatibility. It was demonstrated that spherical particles with an average diameter of 500 nm could be successfully synthesized by solvent/non-solvent approach, when poly-glutamic acid was used as stabilizing agent/cryoprotectant. Furthermore, it was determined that freeze-drying (lyophilization) process could reduce particle size below 200 nm, at PGA concentration of 0.05 %. Biocompatibility of these PCL particles was investigated *in vitro*, and it was shown that they did not have a toxic effect on HepG2 cells.

The second stage consisted of synthesis, characterization and optimization of experimental parameters used to obtain amorphous selenium nanoparticles (SeNp), as well as the investigation of their antibacterial and anticancerogenic properties. The optimal parameters for reduction of sodium selenite (Na_2SeO_3) with ascorbic acid were: (i) use of bovine serum albumine (BSA) as a stabilizing agent and (ii) 5:1 molar ratio of the reducing agent and precursor resulting in amorphous, spherical SeNp with size less than 80 nm. The results of antibacterial testing conducted on 6 different bacterial strains showed that colloidal SeNp

solution was more efficient for the inhibition of Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*). Regarding the anticancer activity, it was shown that 3.75 % of colloidal SeNp solution after 48 h almost completely killed HeLa cells used as a model in these investigations.

The final stage was synthesis and characterization of biocomposite PCL/SeNp and investigation of parameters which provide efficient incorporation of colloidal SeNps into PCL spherical particles. Degradation of obtained system was conducted in 4 different media: i) phosphate saline buffer (PBS), (ii) solution of lipase from porcine pancreas in PBS, (iii) 0.1 M HCl , and (iv) *P. aeruginosa* PAO1 cell- free extract in PBS. When acetone and ethanol were selected as solvent and nonsolvent, respectively, microspheres ranging in size from 1 to 3 μm were obtained with SeNp incorporation efficiency of 92%. Over the course of 660 days, the release of SeNp from pH neutral media was very slow, while in acidic media selenium presence was not detected. On the other hand, the release in the medium with bacterial extract was much more pronounced, even after 24 h reaching its maximum value of 29,2% after 7 days. Based on the thorough characterization of degradation samples, it was concluded that the release of SeNp was influenced by the structure of PCL/SeNp particles, whereas SeNp were released only from the regions which were closer to the microspheres surface and from the amorphous segments. Finally, the biocompatibility of PCL/SeNp on HepG2 cells was tested, and the results confirmed that this composite was safe for a potential biomedical application.

Physicochemical characterization of samples was performed by following experimental techniques: Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), Raman spectroscopy, X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), high-resolution transmission electron microscopy (HRTEM), particle size distribution analysis (PSD), zeta potential measurements, thermogravimetric and differential thermal analysis (TGA-DTA), differential scanning calorimetry (DSC) and inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES). Biological testing were performed by: broth microdilution method for investigation of antibacterial activity; colorimetric MTT assay for cell viability determination; 2',7' - dihalorofluorescein diacetate (DCFDA)

assay for monitoring the formation of reactive oxygen species (ROS); and Comet assay for assessment of genotoxicity.

Key words: biodegradable polymers, poly-(ϵ -caprolactone), microspheres, controlled release, biocomposites, biomedicine, selenium nanoparticles, physicochemical characterization of materials.

Scientific field:

Physical chemistry

Scientific subfield:

Materials science

UDC number: 66.017:615

SADRŽAJ

1. OPŠTI DEO	1
1.1 Biomedicina, biomaterijali i kompozitni materijali	1
1.1.1 Nanomedicina.....	3
1.1.2 Kontrolisana dostava lekova.....	5
1.1.3 Regenerativna medicina i tkivno inženjerstvo	9
1.2 Polimerni materijali za biomedicinske primene	10
1.2.1 Biodegradabilni polimeri.....	10
1.2.1.1 Alifatični poliestri.....	12
1.2.2.2 Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL).....	14
1.3 Dobijanje i primena poli(ϵ-kaprolaktona)	16
1.4 Mikroelementi neophodni za pravilno funkcionisanje organizma	18
1.4.1 Osnovni podaci o mikroelementima	18
1.4.2 Klasifikacija mikroelemenata.....	19
1.4.3 Osobine mikroelemenata.....	19
1.5 Selen	19
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	22
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	24
3.1 Eksperimentalne metode.....	25
3.1.1 Infracrvena spektroskopija sa Furijevom transformacijom - FTIR.....	25
3.1.2 Ramanska spektroskopija	26
3.1.3 Elektronska mikroskopija	28
3.1.3.1 Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)	29
3.1.3.2 Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM).....	30
3.1.4 Rendgenska difrakciona analiza (XRD)	31
3.1.5 Termalne metode analize	32
3.1.5.1 Diferencijalna termijska analiza (DTA).....	32
3.1.5.2 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)	33

3.1.5.3. Termogravimetrijska analiza (TGA)	34
3.1.6 Određivanje raspodele veličina čestica (PSD)	34
3.1.7 Metoda merenja zeta potencijala	36
3.1.8 Atomska emisiona spektroskopija sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-AES)	38
3.1.9 Ispitivanje biokompatibilnosti uzoraka.....	39
3.1.9.1 Kolorimetrijski test za određivanje ćelijske metaboličke aktivnosti (MTT test).....	40
3.1.9.2 2',7' – dihlorofluorescein diacetat (DCF-DA) test za određivanje nastanka reaktivnih vrsta kiseonika (ROS).....	40
3.1.9.3 Određivanje genotoksičnosti – Komet test.....	41
3.1.10 Mikrodiluciona metoda za određivanje antimikrobne aktivnosti	42
3.1.11 Metoda određivanja antikancerogene aktivnosti	42
3.2. Eksperimentalni rad.....	43
3.2.1 Sinteza i karakterizacija čestica poli(ϵ -kaprolaktona) PCL-a	43
3.2.1.1 Sinteza PCL čestica.....	43
3.2.1.1.1 Ispitivanje uticaja različitih stabilizatora tokom sinteze na morfološke karakteristike PCL mikro i submikrosfera.....	44
3.2.1.1.2 Ispitivanje uticaja različitih pritisaka i temperatura sušenja tokom sinteze PCL čestica na njihovu morfologiju	45
3.2.1.2 Karakterizacija sintetisanih PCL uzoraka.....	46
3.2.1.3 Ispitivanje biokompatibilnosti sintetisanih PCL čestica.....	47
3.2.1.3.1 Ispitivanje citotoksičnosti uzoraka - MTT test.....	47
3.2.1.3.2 DCF-DA test za određivanje nastanka reaktivnih vrsta kiseonika (ROS).....	48
3.2.1.3.3 Određivanje genotoksičnosti sintetisanih uzoraka Komet testom.....	49
3.2.2 Sinteza i karakterizacija nanočestica selena SeNp.....	50
3.2.2.1 Sinteza SeNp	50
3.2.2.2 Uticaj različitih vrsta stabilizatora na sintezu SeNp	50
3.2.2.3 Uticaj molskih odnosa redukcionog sredstva i prekursora na sintezu SeNp.....	51
3.2.2.4 Karakterizacija SeNp.....	52
3.2.2.4.1 Ispitivanje morfologije i zeta potencijala	52
3.2.2.4.2 Ispitivanje kristalnog stanja	53
3.2.2.4.3 Kvalitativna karakterizacija SeNp	53
3.2.2.4.4 Termalna analiza SeNp	54
3.2.2.4.5 Kvantitativno određivanje Se u koloidnom rastvoru SeNp	54

3.2.2.4.6 Antibakterijska aktivnost SeNp.....	55
3.2.2.4.7 Antikancerogena aktivnost koloidnog rastvora SeNp	55
3.2.3 Sinteza biokompozita PCL mikrosfera sa inkorporiranim nanočesticama selena - PCL/SeNp	56
3.2.3.1 Ispitivanje uticaja različitih sistema rastvarač/nerastvarač na efikasnost metode sinteze.....	56
3.2.3.2 Karakterizacija dobijenih čestica biokompozita PCL/SeNp	58
3.2.3.2.1 Ispitivanje morfologije i raspodele veličine čestica	58
3.2.3.2.2 Ispitivanje interakcije SeNp i PCL-a.....	58
3.2.3.2.3 Ispitivanje kristalne strukture biokompozita PCL/SeNp	59
3.2.3.2.4 Kalorimetrijska ispitivanja i utvrđivanje stepena kristaliničnosti biokompozita PCL/SeNp.....	59
3.2.3.2.5 Degradacija PCL/SeNp biokompozita i profil otpuštanja SeNp.....	60
3.2.3.2.6 Kvantitativno određivanje Se u uzorcima PCL/SeNp.....	61
3.2.3.2.7 Ispitivanje uticaja bakterijskog soja <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na degradaciju čestica PCL/SeNp	62
3.2.3.2.7.1 Degradacioni potencijal ćelijskog ekstrakta izolovanog iz <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> prema komercijalnim granulama PCL-a	63
3.2.3.2.7.2 Degradacija PCL/SeNp u ćelijskom ekstraktu izolovanom iz <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> i suspendovanom u puferu fosfatnih soli	64
3.2.3.2.8 Ispitivanje biokompatibilnosti biokompozita PCL/SeNp.....	64
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	66
4.1 Sinteza i karakterizacija sfernih čestica poli(ϵ-kaprolaktona)	66
4.1.1 Ispitivanje interakcije između različitih vrsta stabilizatora i PCL-a	66
4.1.2 Uticaj primene različitog tipa polielektrolita kao stabilizatora na morfološke karakteristike PCL čestica	69
4.1.3 Uticaj različitih metoda sušenja na morfologiju čestica PCL	74
4.1.3.1 Ispitivanje uticaja povišene temperature i sniženog pritiska na morfologiju PCL čestica.....	74
4.1.3.2 Liofilizacija PCL čestica i rezultati ispitivanja uticaja različitih krioprotektanata na njihovu morfologiju.....	77
4.1.3 Uticaj različite koncentracije PGA na dobijanje sfernih čestica PCL-a, liofilizacijom finalne suspenzije.....	84
4.1.4 Ispitivanje biokompatibilnosti sintetisanih PCL čestica.....	88
4.1.4.1. Ispitivanje citotoksičnosti PCL uzoraka MTT testom	89

4.1.4.2. Ispitivanje uticaja PCL uzoraka na nastanak reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) -DCF-DA analiza	90
4.1.4.3 Ispitivanje genotoksičnosti sintetisanih PCL čestica- Komet test	92
4.2 Sinteza i karakterizacija nanočestica selena	93
4.2.1 Ispitivanje uticaja različitih parametara sinteze na fizičko-hemijske karakteristike nanočestica selena	93
4.2.2 Ispitivanja kristalnog stanja uzoraka SeNp	103
4.2.3 Kvalitativna analiza SeNp – Vibraciona spektroskopija	107
4.2.4 Ispitivanja termalnih osobina liofiliziranog praha SeNp	111
4.2.5 Kvantitativno određivanje selena u koloidnom rastvoru SeNp	113
4.2.6 Ispitivanje antimikrobne aktivnosti sintetisanih nanočestica selena	114
4.2.7 Antikancerogena aktivnost amorfnih nanočestica selena	116
4.3 Sinteza i karakterizacija biokompozita poli(ϵ-kaprolaktona) sa inkorporiranim nanočesticama selena	118
4.3.1 Ispitivanje morfoloških karakteristika čestica biokompozita PCL/SeNp	118
4.3.2 Kvalitativna analiza biokompozita PCL/SeNp- Ispitivanje interakcije SeNp i PCL tokom procesa inkorporiranja unutar PCL mikrosfera metodom FTIR spektroskopije	123
4.3.3 Ispitivanja kristalne strukture biokompozita PCL/SeNp	124
4.3.4 Termalna analiza biokompozita PCL/SeNp	126
4.3.5 Ispitivanja degradacije biokompozita PCL/SeNp u fiziološkim uslovima	129
4.3.6 Uticaj procesa degradacije na kristalnu strukturu biokompozita PCL/SeNp	130
4.3.7 Uticaj procesa degradacije na stepen kristaliničnosti biokompozita PCL/SeNp	135
4.3.8 Ispitivanja degradacionog potencijala ćelijskog ekstrakta izolovanog iz bakterijskog soja <i>P. aeruginosa</i> PAO1 prema PCL-u i PCL/SeNPs	141
4.3.8.1 Provera degradacione efikasnosti na agar ploči	141
4.3.8.2 Kalorimetrijska ispitivanja uzoraka PCL/SeNp suspendovanih u bakterijskom ekstraktu u različitim vremenskim intervalima	142
4.3.9 Profil otpuštanja SeNPs iz PCL mikrosfera u različitim degradacionim medijumima	145
4.3.10 Ispitivanje biokompatibilnosti uzoraka PCL/SeNp	148
4.3.10.1 Ispitivanje citotoksičnosti uzoraka MTT testom	148
4.3.10.2 Ispitivanje uticaja biokompozita PCL/SeNp na nastanak reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) -DCF-DA analiza	149
4.3.10.3 Ispitivanja genotoksičnosti PCL/SeNp čestica - Komet test	150

5. ZAKLJUČAK..... 151

6. LITERATURA..... 155

7. PRILOG

PRILOG 1 I

PRILOG 2 II

PRILOG 3 III

8. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM

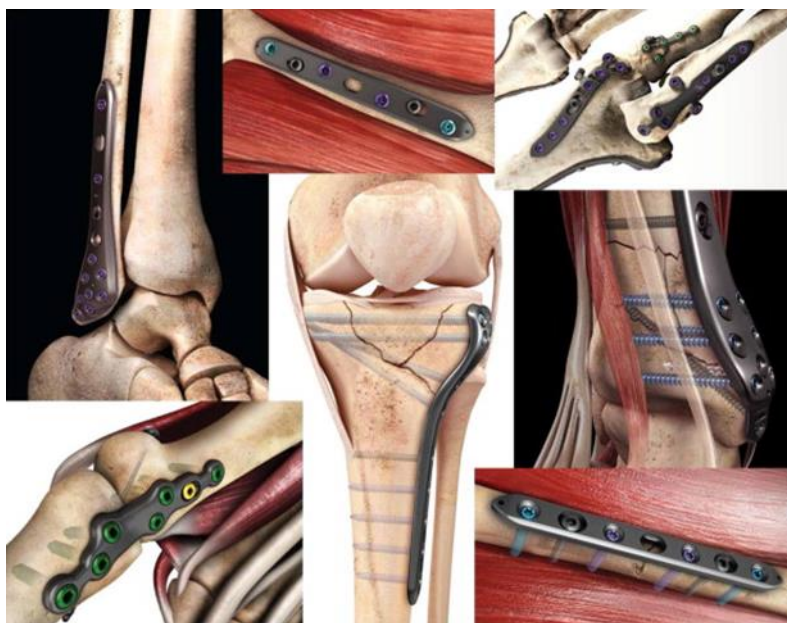
1. UVOD

1.1 Biomedicina, biomaterijali i kompozitni materijali

Biomedicina je termin koji se pojavio u prošlom veku sa ciljem da fiziološke i patološke procese, posmatrane iz ugla biologije i biohemije, poveže sa stanjima ljudskog organizma tj. medicinom generalno. Danas, pojam biomedicina predstavlja jednu široku multidisciplinarnu oblast koja podrazumeva primenu ogromnog broja različitih materijala i metoda na polju medicine i farmacije. Biomedicinska primena je cilj mnogih istraživanja iz oblasti nanomedicine, kontrolisane dostave lekova, regenerativne medicine, tkivnog inženjerstva, itd. [1–3]. Opšte prihvaćena i najčešće korišćena definicija biomaterijala je da su to materijali koji se koriste za zamenu i reparaciju živog tkiva i organa kako iz zdravstvenih tako i iz estetskih razloga[1]. Podela biomaterijala su raznovrsne i to prema hemijskom sastavu (metalni, polimerni, keramički, prirodni i kompozitni), mestu ugradnje (ortopedski, dentalni, oftalmološki, kardiovaskularni, dermatološki, pomoćni itd.), forme i načina aplikacije (prah, blok, cement, funkcionalno – gradijentni, tanak sloj ili prevlaka, itd.), vrste interakcije između implanta i tkiva (bioinertni, bioaktivni i biresorbilni). Na godišnjem nivou se izdvajaju velike sume novca za proizvodnju biomaterijala kao što su veštački kuk, sočiva, razne vrste implantata, itd. Uslovi koje jedan materijal treba da ispuni da bi našao primenu u biomedicini su mnogobrojni, počev od biokompatibilnosti, netoksičnosti u širokom opsegu koncentracija, neizazivanju bilo koje vrste negativnog imunološkog odgovora organizma, odgovarajuće morfologije i veličine čestica, itd. [4].

Sa fiziološke tačke gledišta, samo nekoliko materijala se može u potpunosti smatrati inertnim, dok većina materijala sadrži neke komponente koje potencijalno mogu ispoljiti toksični ili iritacioni efekat. Zbog toga biomaterijali moraju da zadovolje veliki broj zahteva od kojih je na prvom mestu biokompatibilnost. Prema definiciji koju je u svom radu objavio *Williams*, biokompatibilnost je sposobnost biomaterijala da izvrše željenu funkciju u skladu sa medicinskom terapijom bez izazivanja bilo kakvog lokalnog ili sistemskog neželjenog efekta na pacijenta tj. ugrožavanja same terapije, već indukovanje najadekvatnijeg pozitivnog odgovora na ćelijskom nivou i na nivou tkiva i organa

[5]. Ukratko rečeno biokompatibilnost je pozitivno povezivanje materijala i organizma koje ne dovodi do neželjenih efekata. Ovaj termin obuhvata brojne različite aspekte materijala poput njegovih hemijskih, fizičkih i mehaničkih svojstava kao i potencijalnu citotoksičnost, genotoksičnost i alergijske reakcije. Primera radi materijali koji se koriste za izradu medicinskih implantata moraju da poseduju odgovarajuća svojstva u pogledu biokompatibilnosti, netoksičnosti, otpornosti prema koroziji, izdržljivosti, čvrstoći i žilavosti kao i niske vrednosti modula elastičnosti. Primeri biomaterijala u vidu implantata i odgovarajućih šrafova koji se koriste za unutrašnje fiksiranje koštanih fragmenata kod kompleksnih preloma, prikazani su na slici 1.1.1.



Slika 1.1.1. Fiksiranje koštanih fragmenata uz pomoć pločica i srafova. Slika preuzeta iz [6] a prethodno sa sajta <http://www.depuuy.com/> uz dozvolu izdavača "Elsevier"-a.

Mogućnost istraživanja na molekularnom nivou intenzivirala je potragu za materijalima sa poboljšanim, željenim osobinama za upotrebu u medicini i farmaciji. Za izradu implantata kao i generalno u regenerativnoj medicini, tkivnom inženjerstvu i kontrolisanoj dostavi lekova najčešće se koriste kompozitni materijali. Kompozitni materijali su materijali koji su sastavljeni od dva ili više materijala, a osobine su im bolje od materijala komponenata [6]. Kompozitni materijali mogu biti tipa metal/metal, metal/polimer, metal/keramika,

keramika/keramika, keramika/polimer, polimer/polimer itd. [7]. Specijalna grupa kompozitnih materijala koja se izdvojila a direktno je vezana sa biomedicinom jesu biokompoziti. Postoji nekoliko definicija biokompozita. Jedna od njih je da predstavljaju kompozite koji su sastavljeni od biodegradabilnih ili ekološki prihvatljivih materijala [8]. Po drugoj definiciji biokompoziti su kompoziti materijala biološkog porekla ali ne moraju imati biomedicinsku primenu [9]. Generalno gledano ova grupa materijala može biti sačinjena od brojnih varijacija organskih i neorganskih komponenti, prirodnih i sintetičkih polimera, polisaharida, proteina, keramičkih materijala, metala i nano-ugljenika. Biokompoziti mogu biti proizvedeni u raznim formama poput filmova, membrana, prevlaka, čestičnih sistema, vlakana, gelova itd. Kao takvi, našli su primenu u raznim granama biomedicine: tkivno inženjerstvo, senzori, implanti, kontrolisana dostava i brojne druge [9–11].

1.1.1 Nanomedicina

Nanomaterijali, nanotehnologija, nanomedicina ... Ovo su pojmovi koji su obeležili početak 21. veka bar kada se radi o nauci i industriji. Revolucija koju sa sobom nosi prefiks "nano" se pojavila zahvaljujući jednoj činjenici, da se materijali čiji su entiteti dimenzija u okviru nanoskale, ponašaju znatno drugačije nego kada su izgrađivačke strukture tih materijala znatno većih dimenzija. Kada se govori o nanoskali i o nanomaterijalima, po nekoj široko prihvaćenoj definiciji se podrazumeva da bar jedna od dimenzija čestica materijala ulazi u opseg od 1-100 nm tj. 10^{-9} m. Prema tome nanotehnologija se može definisati kao dizajniranje, dobijanje i primena materijala, struktura, uređaja i sistema kontrolisanjem njihovih oblika i dimenzija u opsegu nanoskale [12]. Kako su dimenzije molekularnih struktura većine sistema od biološkog značaja takođe u ovom opsegu, primena nanomaterijala i nanotehnologije u medicini je jako brzo postala popularna oblast istraživanja sa ogromnim potencijalom. Međutim, neophodni podaci koji se tiču farmakokinetike, farmakodinamike i toksičnosti mnogih nanomaterijala i dalje nisu dovoljno ispitani i predmet su brojnih debata u naučnoj zajednici.

Evropska naučna fondacija je 2004. godine predložila sledeću definiciju nanomedicine: *Nanomedicina je specifično naučno polje koje obuhvata dijagnostifikovanje, lečenje i prevenciju bolesti i traumatskih povreda, ublažavanje bolova, očuvanje i unapređenje zdravlja koristeći sisteme i pojave u ljudskom telu na molekulskom nivou* [13]. Iako je ova definicija sveobuhvatna njen glavni nedostatak je što se u isto vreme može odnositi i na nanomedicinu i molekularnu medicinu, koja je bazirana na konvencionalnom biohemijskom pristupu. Da bi se ova dva pojma razgraničila potrebno je naglasiti da je terapijski efekat nanomaterijala dizajniranih za primenu u medicini posledica samo njihove veličine. Shodno tome, preciznija definicija nanomedicine bi obuhvatila samo pojave od medicinskog značaja koje su posledica veličine nanometarskih sistema. Primera radi, kod dva registrovana leka (Doxil® i Abraxane®) koji se koriste u hemoterapiji, efikasnost antikancerogenog efekta je direktna posledica njihovih fizičko-hemijskih karakteristika na nanometarskoj skali [14,15]. Oba ova leka pripadaju prvoj generaciji tzv. nanonosača u sistemima za dostavu lekova, gde se dostava do tumorskog tkiva vrši pasivno zahvaljujući efektu poboljšanog prodiranja i zadržavanja [16–18]. Ovaj efekat je posledica veće poroznosti krvnih sudova i ubrzanog metabolizma kod tumorskih tkiva u poređenju sa zdravim (krvni sudovi u kancerogenim tkivima imaju pore veličine u rasponu od 100 do 800 nm, pa nanočestice veličine od 10 do 100 nm mogu brže i lakše da prodru u tkivo tumora i ubiju kancerogene ćelije, dok sudovi zdravog tkiva imaju pore znatno manje veličine, 2-6 nm). Pored ove prve generacije sistema za dostavu lekova pojavile su se druga i treća generacija, specijalno dizajnirane da vrše dostavu do tumorskog tkiva raznovrsnim mehanizmima aktivnog transporta kao i da oslobađaju lekovite supstance na osnovu stimulansa sredine [18–21].

Pored unapređivanja terapije solidnih tumora, kao najzastupljenije oblasti nanomedicine, dosta napretka je ostvareno i u terapiji raznih drugih infektivnih bolesti, kardiovaskularnih, endokrinih/egzokrinih i degenerativnih poremećaja, u lečenju glaukoma odloženim oslobađanjem leka, kao i razvitku inteligentnih nano-biomaterijala za ćelijsku terapiju sa ciljem poboljšanja srčane funkcije i regeneracije kože [20].

Glavna klasifikacija nanočestica prema hemijskom sastavu je na neorganske nanočestice, nanočestice na bazi lipida i polimerne nanočestice [22]. U nanomedicini se koriste različiti tipovi nanosistema kao što su nanosfere, nanovlakna, nanokapsule, nanoštapići itd. [23].

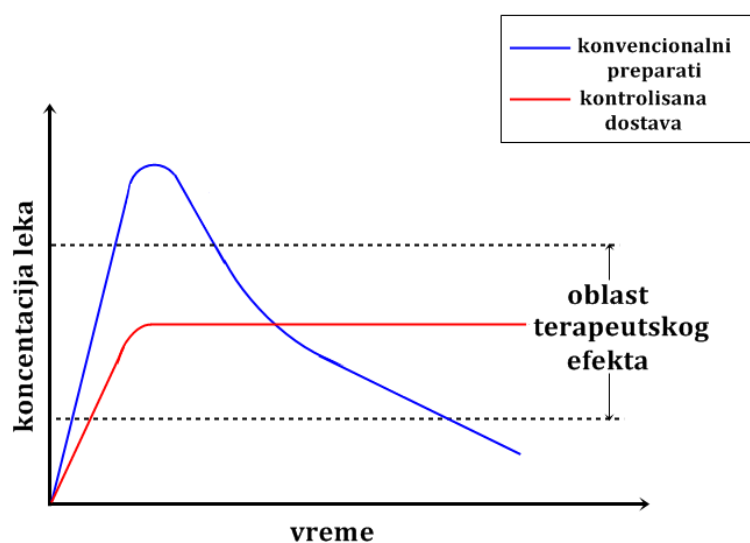
Na kraju može se zaključiti da je glavni zadatak nanomedicine uspešno implementiranje znanja dobijenih detaljnijim ispitivanjima odgovarajućih nanosistema u dijagnostičke ili terapijske svrhe, uz poštovanje strogih protokola za klinička ispitivanja. Postoji nekoliko proizvoda koji su prošli ovu transformaciju iz laboratorije do pacijenata, poput Verigene®. Ova zanimljiva dijagnostička platforma je dizajnirana da brzo identifikuje razne infektivne patogene [24,25]. Kao drugi primer mogu da posluže nanočestice gvožđe oksida koje se koriste kao kontrastni agens i u kliničkoj su upotrebi prilikom dijagnostičke procedure snimanja magnetnom rezonancom limfnih čvorova kod pacijenata sa rakom dojke, pluća, prostate i endometrijuma [26,27]. Iako su nove mogućnosti koje pruža nanomedicina u dijagnostici i terapiji velike, ipak je praktična primena ograničena problemima povezanim sa toksičnošću, nestabilnošću i nedostatkom selektivnosti nanočestica. Za razne nanočestice se smatra da su ćelije tolerantne prema njima, ali to ne znači da te čestice ne utiču na njihov metabolizam. Ova prepreka se može definisati i kao latentna toksičnost nanosistema.

U poslednje vreme istraživanja su fokusirana na prevazilaženje ovih ograničenja putem oblaganja nanočestica biokompatibilnim polimerima [28,29].

1.1.2 Kontrolisana dostava lekova

Sinteza, optimizacija i potencijana primena sistema za kontrolisanu dostavu lekova i drugih aktivnih supstanci je u poslednje vreme u velikom porastu i predstavlja oblast interesovanja mnogih istraživača [30]. Polimeri se intenzivno proučavaju kao materijali za izradu sistema za kontrolisanu dostavu lekova [22]. U ovim sistemima, polimer je na određen način ukombinovan sa lekom tako da se otpuštanje leka odigrava na predvidljiv način. Oslobađanje leka tokom vremena može se odigravati konstantno, periodično ili biti potencirano tj. izazvano nekim

od okolnih, spoljašnjih faktora (pH sredine, temperatura, prisustvo enzima, itd.). Uobičajni sistemi za unošenje leka u organizam preko tableta ili intravenozno ubrizgavanje leka podrazumevaju unošenje cele propisane doze odjednom, što često može biti blizu toksične vrednosti. Sa druge strane, neophodno je konstantno unošenje nove količine leka u kratkim vremenskim intervalima, što podrazumeva i velike fluktuacije koncentracije leka u organizmu. Terapeutski efekat se može najbolje postići kada bi se koncentracija leka održavala konstantnom što duži vremenski period. Svi ovi problemi prevaziđeni su u sistemima za kontrolisanu dostavu (slika 1.1.2.).

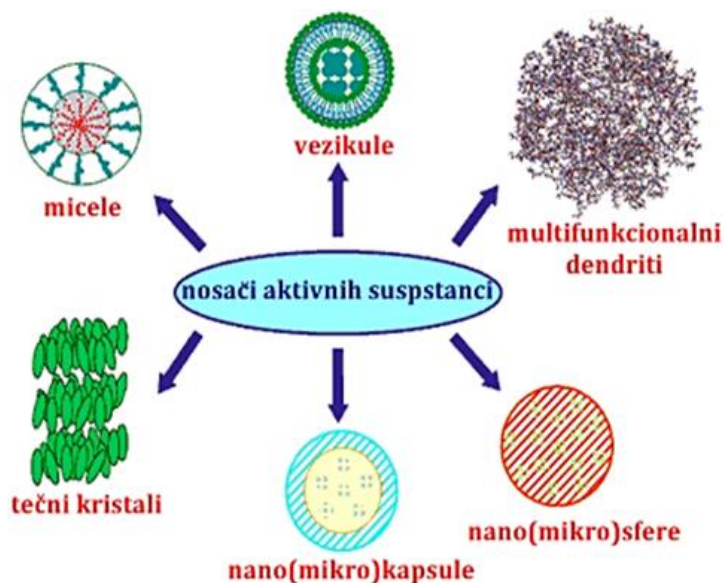


Slika 1.1.2. Uporedni prikaz profila farmakokinetike za konvencionalne preparate i sisteme za kontrolisanu dostavu

Krajnji cilj kontrolisane dostave lekova jeste postizanje ravnomernije, efikasnije koncentracije leka tokom dužeg perioda vremena, smanjenje sporednih, neželjenih, efekata, eliminisanje potencijalne predoziranosti kao i prevazilaženje nedovoljne, tj. neefikasne koncentracije leka. Održavanjem koncentracije leka na određenom nivou izbegava se njegovo često apliciranje i time se povećava komfornost pacijenata. Potencijalna ne-biokompatibilnost upotrebljenih materijala, nepoželjni produkti degradacije, hirurški zahvati za uklanjanjem implantata ili viša cena su neke od mana sistema za kontrolisanu dostavu lekova.

Sistemi za kontrolisanu dostavu lekova mogu biti od izuzetnog značaja kada se lekovi iz nekog razloga ne mogu adekvatno uneti i administrirati u organizam na standardan, konvencionalan, način. To je npr. u situacijama koje zahtevaju sporo oslobađanje u vodi rastvornih supstanci, brzo oslobađanje slabo rastvornih, dostavu leka do tačno određenog mesta u organizmu, dostavu dva ili više terapijskih sredstava slične formulacije, sistemi koji se mogu rastvoriti ili degradirati i ukloniti iz organizma klasičnim metaboličkim putevima. Idealan sistem za kontrolisanu dostavu bi trebalo da bude inertan, biokompatibilan, određenih mehaničkih osobina, da njegovo apliciranje bude dovoljno komforno za pacijenta, da je efikasnost inkapsulacije odnosno imobilizacije leka unutar čestice zadovoljavajuće, da je jednostavan za administraciju i uklanjanje, kao i da je lak za sintezu i sterilizaciju.

Sistemi za kontrolisanu dostavu mogu biti veoma različiti, što po hemijskom sastavu nosača, to i po njihovom obliku i formi. Naravno, izbor prirode i oblika nosača zavisi prvenstveno od aplikacije sistema ali i od vrste aktivne supstance koju želimo da isporučimo. Najčešće korišćeni nosači su razni polimeri (sintetički ili prirodni), ugljeni hidrati, lipidi, razni kompoziti i mnogi drugi. Na slici 1.1.3. prikazane su neke od formi ovih sistema koje se najčešće koriste.



Slika 1.1.3. Raličiti oblici sistema za kontrolisanu dostavu medikamenata[31]

Jedna od formi sistema za kontrolisanu dostavu koja je najzastupljenija jesu mikro/nanosfere. Predstavljaju sistem matrice u kome je "lek" dispergovan u celoj zapremini čestice i treba ih razlikovati od mikro/nanokapsula, kod kojih je "lek" smešten u jezgru, obavijenom ljuskom od nosača. Prednosti koje pružaju mikro/nanosferni sistemi su sledeći: (i) u njih se mogu inkapsulirati različiti tipovi aktivnih komponenti, (ii) uniformnost u morfologiji je lakše postići u odnosu na druge geometrijske oblike, (iii) zbog izotropne geometrije i odnosa površina/zapremina njihovo ponašanje je predvidljivo i detaljno ispitano sa raznim biološkim entitetima, (iv) lako se mogu administrirati, (v) pružaju efikasnu zaštitu inkapsuliranim aktivnim komponentama od spoljašnjih uslova i (vi) otpuštanje aktivnih komponenti se može lako modelovati [32,33]. Sa druge strane mali prinosi, efikasnost inkapsulacije i uska raspodela veličine su glavne prepreke kod dizajniranja ovakvih sistema. Takođe bitno je naglasiti da je jako važno ispitati distribuciju aktivne komponente unutar mikrosfera kao i interakciju sa samim nosačem kako bi imali što jasniji uvid u farmakokinetiku ovakvog sistema. Zbog toga bi generalizacije po pitanju profila otpuštanja i distribucije aktivnih komponenti unutar mikrosfernih sistema trebalo izbegavati, već ih definisati za svaki sistem ponaosob. Što se tiče same upotrebe mikrosfernih preparata ona je ograničena načinom administracije. Primera radi, kod unošenja putem aerosoli (pulmonarna dostava) postoje studije koje su pokazale da se dobri rezultati postižu sa česticama veličine oko 3 μm [34,35]. Kod oralne administracije, iako ne postoji ograničenje u veličini čestica, u nekoliko radova je utvrđeno da sa smanjenjem mikrosfera dolazi do znatnog poboljšanja apsorpcije u gastrointestinalnom traktu [36–38]. Kada se radi o subkutanoj i intramuskularnoj administraciji, dimenzija mikrosfera bi trebala biti 10-250 μm , kako bi se izbegla fagocitoza od strane makrofaga i smanjila mogućnost inflamacije [39,40]. Intravenozna aplikacija suspenzija mikrosfernih čestica generalno nije preporučena zbog opasnosti aglomeracije i opstrukcije krvnih sudova. Ipak u radu *H. L. Kutscher*-a i *sradnika* pokazano je da mikrosfere od polistirena veličine 2 μm neometano cirkulišu u krvnom sistemu pacova [41]. Veličina mikrosfera ima važnu ulogu i sa stanovišta distribucije aktivnih komponenata jer je pokazano da je kod

čestica ispod 20 μm ova distribucija dosta homogena, dok se kod čestica reda veličine 40 μm ili većih javlja nehomogena distribucija [42,43].

1.1.3 Regenerativna medicina i tkivno inženjerstvo

Regenerativna medicina i tkivno inženjerstvo su dramatično napredovali u poslednjih 10 godina, pružajući potencijal za regeneraciju skoro svakog tkiva i organa ljudskog tela [44]. Ovo multidisciplinarno polje kao grana biomedicine uključuje aspekte ćelijske biologije i transplantacije, nauku o biomaterijalima, oslikavanje (eng. imaging), karakterizaciju površina, interakcije ćelija i materijala, dostavu lekova, itd. Tkivno inženjerstvo između ostalog, izučava i rast ćelija na resorbujućoj podlozi izvan tela[45]. Takva podloga sa tkivom se ugrađuje u organizam na obolelom mestu, vremenom se resorbuje i omogućava novonastalom živom tkivu da je zameni. Ovakvim pristupom bi se potencijalno prevazišli problemi nedostatka donora tkiva, problemi vezani za donor-primalac kompatibilnost, itd. Polimerne podloge u inženjerstvu tkiva, tzv. polimerni skafoldi (eng. *scaffold*-mreža, skela) mogu biti različite poroznosti, veličina i oblika, različitih površinskih osobina, omogućavajući time različitu proliferaciju i diferencijaciju ćelija[46]. Uloga skafolda je da imitira i / ili podrži postojeće biološke procese i funkcioniše kao veštačka ekstracelularna matrica. Selekcija polimera tj. biomaterijala za izradu skafolda i njegov dizajn imaju ključnu ulogu u konstituisanju i razvoju tkiva [47]. Polimerni skafoldi mogu biti različite poroznosti, veličina, oblika i različitih površinskih osobina. Oni pružaju trodimenzionalnu (3D) strukturu (skela) gde ćelije mogu razviti funkcionalno tkivo odgovarajuće strukture i funkcije; omogućavaju transport hranljivih materija i bioaktivnih molekula, ćelijsku proliferaciju i diferencijaciju; adheziju ćelija, obezbeđuju privremenu mehaničku potporu, itd. U inženjerstvu tkiva jedan od važnih uslova je bioresorbibilnost polimera. Primena na polju inženjerstva tkiva je ograničena nedostatkom odgovarajuće vaskularizacije u fazi konstruisanja implanata kao u fazi njihove integracije u organizam [48]. U polimere koji se ispituju i koriste kao nosači u inženjerstvu tkiva spadaju, između ostalih i poliesti

kao što su poli (ϵ -kaprolakton) (PCL), poli (laktid) (PLA), poli (glikolid) (PGA) kao i kopolimer poli (laktid-ko-glikolid) (PLGA) [49].

1.2 Polimerni materijali za biomedicinske primene

Polimeri su veoma raznovrsna klasa materijala. Predstavljaju molekule sa dugačkim lancima i izgrađeni su od velikog broja monomernih jedinica koje su međusobno povezane kovalentnim vezama. Zbog svojih specifičnih svojstva našli su primenu i u medicinske svrhe na polju regenerativne medicine, tkivnog inženjerstva, nanomedicine [11,50,51]. Poslednjih godina, polimerne nanočestice su naročito privukle pažnju istraživača kao materijali za dobijanje sistema za kontrolisanu dostavu lekova [22,52,53]. Uprkos razvoju mnogih sintetičkih i polusintetičkih polimera i dalje se za kontrolisanu dostavu lekova koriste i prirodni polimeri kao što su razne smole, albumin, itd. Polimeri korišćeni u kontrolisanoj dostavi lekova moraju biti hemijski inertni, netoksični, biokompatibilni, laki za sterilizaciju, bez neželjenih produkata degradacije, itd. [54]. Mogućnost modelovanja fizičkih i hemijskih osobina datog polimernog materijala dovodi do određenih osobina čineći ih posebno atraktivnim za biomedicinske primene. Na svojstva polimera utiče niz faktora kao što su sastav osnovnih i bočnih grupa, struktura lanca (na koju utiče izbor rastvarača koji se koriste u sintezi polimera, dinamika sušenja itd), i molska masa (na koju utiče rekristalizacija monomera, koncentracija inicijatora, nivo vakuma u procesu sušenja polimera itd) [55]. Polimeri mogu pokazivati viskoelastične osobine slične onima kod prirodne kosti [56].

1.2.1 Biodegradabilni polimeri

Biodegradabilni polimeri predstavljaju specifičnu grupu polimera koji podležu degradaciji unutar živih sistema bez dokaza o njihovom izlučivanju [1,57]. Ova definicija ne uključuje bakterije, gljive i slične organizme. Usled interakcije sa biološkim elementima biodegradabilni polimeri se razgrađuju stvarajući

odgovarajuće fragmente ili produkte degradacije. Ovi produkti se mogu udaljiti od lokacije polimera od koga su nastali i ponekad biti izlučeni iz organizma. U radu koji su objavili M. Vert i saradnici biodegradabilni polimerni materijala se definišu u sledeće podgrupe [58]:

- *bioresorbilni polimeri* – Ovi materijali podležu degradaciji u celokupnoj zapremini a produkti degradacije bivaju resorbovani u *in vivo* uslovima i eliminisani fiziološkim procesima (filtracija ili uključivanje u metaboličke procese).
- *bioerozibilni polimeri* – razlikuju se od bioresorbilnih samo po tome što podležu površinskoj degradaciji.
- *bioapsorbilni polimeri* – imaju sposobnost rastvaranja u telesnim tečnostima bez kidanja molekulskih lanaca ili fragmenata. Na slici 1.2.1.1 prikazani su različiti oblici implantata na bazi bioapsorbilnih polimera koji se koriste kod oštećenja kičmenog stuba.



Slika 1.2.1.1 Različiti bioapsorbilni implantati koji se koriste kod oštećenja kičmenog stuba.
Slika preuzeta iz [59] a prethodno sa sajta <http://thejns.org/>

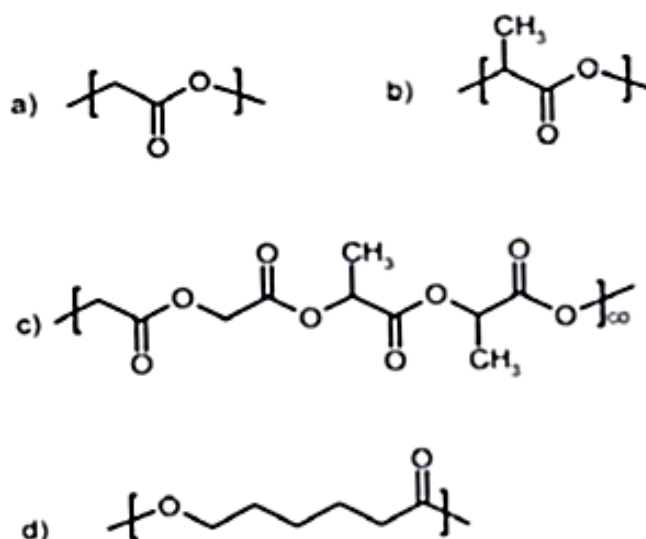
Klasifikacija biodegradabilnih polimera se može izvršiti prema hemijskoj strukturi, prema njihovom poreklu, načinu sinteze itd. [60]. Kada se radi o podeli na osnovu porekla razlikujemo prirodne, modifikovane prirodne i sintetičke polimere. Neki od prirodnih polimera su celuloza, kolagen, fibrin, albumin i polisaharidi. Modifikovani prirodni polimeri su oni kod kojih su postignute određene promene tj. željene osobine kao npr. smanjen period degradacije. Ovo se obično postiže dodavanjem polarnih grupa koje pospešuju degradaciju polimera. Polimeri dobijeni različitim metodama sinteze su sintetički i oni su naročito atraktivni za primenu u svojstvu biomaterijala jer ih je lakše obrađivati i dobiti materijal određenih morfoloških i drugih odgovarajućih osobina.

Najčešće korišćeni biodegradabilni polimeri su poliestri kao što su poli(laktid), poli(laktid-ko-glikolid), poli(ϵ -kapolakton) [1]. Komercijalno su dostupni različitih sastava i molekulskih masa što omogućava njihovo ispitivanje i kontrolisanje degradacije. Degradacija je postignuta sintezom polimera koji u osnovi imaju hidrolitički nestabilne veze [61]. Hemijska jedinjenja sa ovakvim karakteristikama su estri, anhidridi, ortoestri i amidi. Poliestri mogu biti, na primer, homopolimeri sastavljeni od jedne vrste monomera ili kopolimeri sastavljeni od raznovrsnih monomera npr. od laktida i glikolida. Krajnji produkti razgradnje poliestara se nesmetano uključuju u metabolizam dajući pri tome netoksične produkte.

1.2.1.1 Alifatični poliestri

Još od otkrića njihove biodegradabilnosti i biokompatibilnosti, u oblasti biomaterijala se najviše koriste polimeri na bazi alifatičnih poliestara, pogotovo u domenu tkivnog inženjerstva i sistema za kontrolisanu dostavu [62–64]. Razlog njihove široke primene leži u njihovoj netoksičnosti i dobroj biodegradabilnosti i biokompatibilnosti. Kako samo ime kaže, karakterišu ih estarske grupe koje su razdvojene odgovarajućim alkil grupama. Dužina ovih linearnih makromolekula a samim tim i molekulska masa može biti različita i zavisi samo od uslova polimerizacije.

Alifatični poliestri predstavljaju veliku familiju polimera i mogu biti ili prirodnog porekla (bakterijski biosintetski proces, poli (β -hidroksi kiselina) s, b-PHA) ili dobijeni hemijskim putem različitim tipovima polimerizacije [65]. Alifatični poliestri dobijeni polimerizacijom ne spadaju u biopolimere i kao takvi se ne mogu naći u živim sistemima. Najčešće korišćeni alifatičnih poliestara dobijeni hemijskim putem su poli (glikolid) (PGA), poli(laktid) (PLA), poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA) poli(epsilon-kaprolakton) (PCL). Njihova hemijska struktura je prikaza na slici 1.2.1.1. Svi ovi polimeri su hidrofobni a u zavisnosti od njihove kristaliničnosti varira i njihovo vreme degradacije. Mehanizam degradacije ove grupe sintetičkih polimera je preko hidrolize estarskih grupa polimernog lanca. Tako, u slučaju PLGA kao degradacioni proizvodi se dobijaju laktidna i glikolidna kiselina koje kasnije ulaze u metaboličke puteve Krebsovog ciklusa i bivaju odstranjene iz organizma [1]. Zato nizak pH pogoduje i ubrzava proces degradacije ovog polimera. Ovo je bitna osobina za nano-nosače sintetisane od ovog polimera i mora se imati u vidu prilikom definisanja njihovog cilja-lokacije na kojoj će dostaviti svoj sadržaj.



Slika 1.2.1.1.1 Molekulske strukture pojedinih alifatičnih poliestara: a) Poli(glikolid), PGA; b) Poli(laktid), PLA; c) Poli(laktid-ko-glikolid), PLGA; d) Poli (ϵ -kaprolakton), PCL.

Generalno gledano hidroliza alifatičnih poliestara se može odvijati na dva načina. Jedan način je površinska degradacija/erozija i odnosi se na hidrolitičko uklanjanje i kidanje delova polimernih lanaca samo na površini. Ovakav način je dominantan kod izrazito hidrofobnih polimera kada je stepen kidanja polimernih lanaca na površini mnogo brži od prodiranja vode (degradacionog medijuma) unutar zapremine polimera. Kao rezultat dobija se istanjivanje polimernih formulacija dok njihova unutrašnjost ostaje netaknuta u početnoj fazi. Prednost ovog načina degradacije je u njegovoj predvidljivosti i kontroli otpuštanja aktivnih komponenti na osnovu toga. Drugi način je degradacija u celoj zapremini i karakteristična je za hidrofobne polimere manjih molarnih masa. U ovom slučaju je stepen prodiranja vode unutar zapremine polimernih formulacija dominantniji proces u odnosu na površinsko kidanje lanaca. U zavisnosti od brzine difuzije produkata degradacije iz unutrašnjosti polimernih formulacija u degradacioni medijum može se dobiti šuplja struktura ili potpuna erozija polimernih formulacija [57].

U poslednje vreme dosta istraživanja je usmereno ka funkcionalizaciji ili modifikaciji površine alifatičnih poliestara sa ciljem unapređivanja njihovih degradacionih mehanizama zarad specifičnih aplikacija. Neki od rezultata dobijenih na tom polju su sumirani u radovima *A. Silvers*-a i *K. Washington*-a i ostalih autora [66,67].

1.2.2.2 Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL)

Poli(epsilon-kaprolakton) (PCL) je jedan od prvih sintetičkih polimera, prvi put sintetisan od strane *W. Carothers*-a i njegove grupe početkom 30-ih godina prošlog veka [68]. Njegova brza komercijalizacija je proistekla iz težnje da se pronade polimer koji bi mogao biti razgrađen od strane mikroorganizama [57]. PCL je hidrofoban, semikristalan polimer sa niskom temperaturom topljenja 59-64°C (u zavisnosti od stepena kristaliničnosti) i niskom temperaturom ostakljivanja (-60°C) [69]. Sintetiše se polimerizacijom monomera ϵ -kaprolaktona i to najčešće otvaranjem njegove ciklične strukture i propagacijom lanca uz pomoć raznih anjonskih, katjonskih ili koordinativnih katalizatora. Dobro je rastvorljiv u

većini uobičajenih organskih rastvarača, kao što su hloroform, dihlormetan i toluen, dok se ne rastvara u alkoholima i dietiletru. Za razliku od drugih alifatičnih poliestra, poseduje visoku permeabilnost za male molekule, hidrolitička degradacija PCL je veoma spora (što ga čini pogodnim za korišćenje u sistemima za otpuštanje leka pri dužim vremenskim intervalima) i za vreme njegove degradacije izbegnuta je mogućnost dobijanja kisele sredine i promene pH [57,70]. Sama degradacija ovog polimera u normalnim uslovima se dešava u intervalu 2-4 godine [70,71]. Zbog sporog vremena degradacije njegova primena je najpre bila usmerena ka sistemima koji su trebali ostati aktivni po više od godinu dana i hirurškim materijalima za ušivanje (Maxon™). Sa razvojem oblasti tkivnog inženjerstva i naglog porasta interesovanja za bioresorbilnim polimerima, istraživanja sa PCL-om dobijaju sve više na značaju. U ovoj oblasti najviše su došle do izražaja njegove mehaničke osobine i mogućnost da se lako meša sa raznim drugim materijalima kako bi se dobila tačno definisana svojstva.

Degradacija PCL-a je proces koji se može podeliti na dve faze [57,72]. Prvu, početnu fazu karakteriše gubitak molekulske mase do 5000 g/mol, zbog nasumičnog kidanja bočnih lanaca, dok druga faza predstavlja intenzivniji gubitak molekulske mase kada se fragmenti polimernog lanca kidaju i oslobađaju. Prva faza predstavlja površinsku neenzimsku hidrolizu i pretežno se odigrava u amorfnim segmentima polimera. Degradacija je u ovoj fazi autokatalizovana jer oslobođena karboksilna kiselina katalizuje hidrolizu dodatnim kidanjem estarskih grupa. Druga faza je enzimska fragmentacija celokupne zapremine i odigrava se kada se steknu uslovi da fragmenti lanaca difunduju u degradacionu sredinu. Ova faza je ograničena permeabilnošću vode. U *in vivo* uslovima, tokom degradacije, fagocitoza segmentiranih i difundovanih fragmenata odvija se istovremeno sa uključivanjem produkata u ciklus limunske kiseline [57].

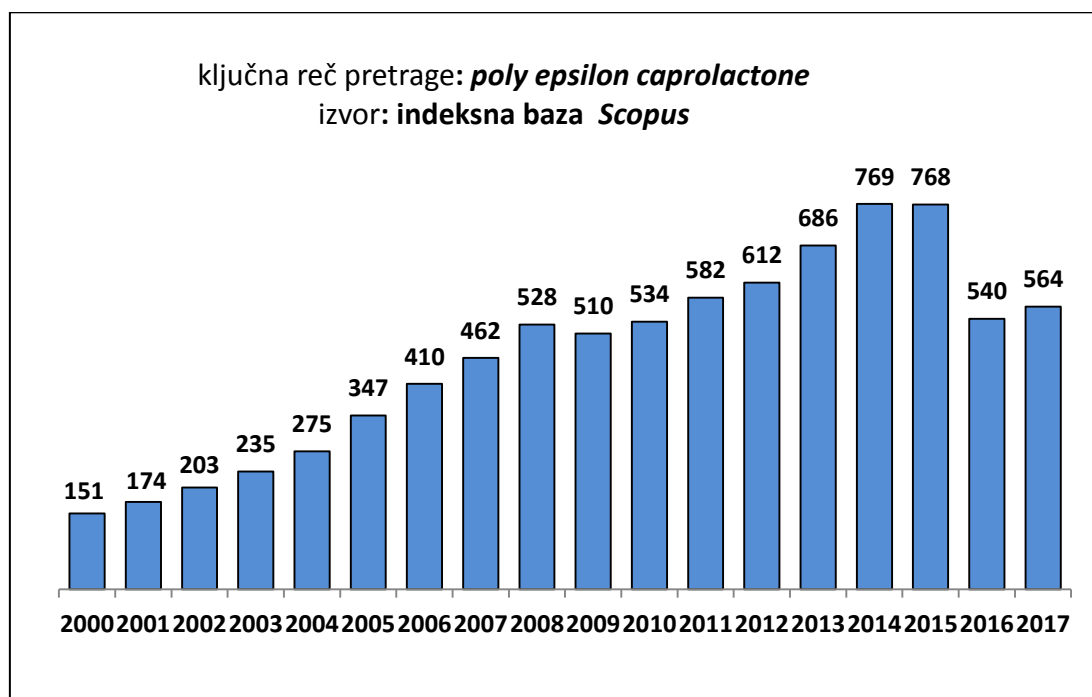
Sama degradacija polimernih formulacija zavisi od brojnih faktora. Sa jedne strane tu su priroda polimernog lanca, hidrofobnost, kristaličnost, molekulska masa, veličina i morfologija čestica, makroskopska geometrija formulacije itd. Sa druge strane jako je bitan i uticaj degradacionog medijuma poput pH vrednosti, prisustvo enzima itd. [73–77].

1.3 Dobijanje i primena poli(ϵ -kaprolaktona)

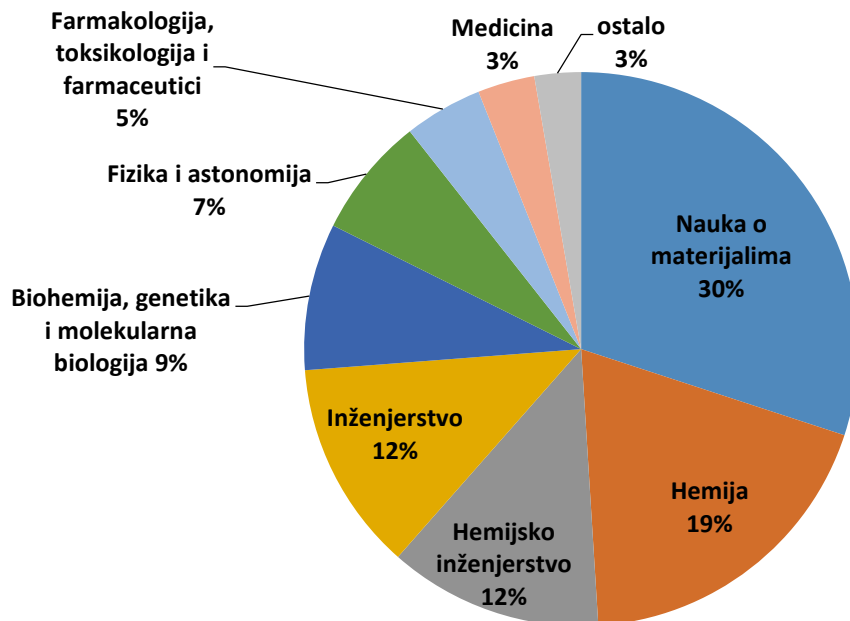
Uslovi koje jedan materijal treba da ispuni da bi opravdao svoju primenu u biomedicini su mnogobrojni, počev od morfologije i veličine čestica do biokompatibilnosti u širokom opsegu koncentracije. PCL je dobro poznat biodegradabilni polimer koga odlikuju dobra biokompatibilnost (odobren je od strane Američke agencije za kontrolu hrane i lekova-FDA), dugo vreme degradacije, visoka permeabilnost prema mnogim molekulima, izostanak degradacionih proizvoda koji snižavaju pH, odlične mehaničke karakteristike, sposobnost da se lako meša sa ostalim materijalima itd. Zbog svega toga često je materijal izbora u različitim sistemima za kontrolisanu dostavu lekova, u tkivnom inženjerstvu i različitim medicinskim sredstvima. Postoji nekoliko odličnih preglednih radova u kojima je sumirana većina ovih sistema [57,69,70]. U zavisnosti od željene primene PCL se može sintetisati u više različitih formi od mikro- i nanosfera, micela, hidrogelova, preko nanovlakana, nanožica, do trodimenzionalne porozne strukture-skafolda itd. [57,70]. Kako je PCL jedan od najranije sintetisanih polimera, počeo je među prvima da se koristiti za kontrolisanu dostavu. Kada se radi o dobijanju mikro- i nanosfera razvijene su brojne tehnike koje se grubo mogu podeliti na polimerizacione tehnike i tehnike sinteze iz komercijalno dostupnog polimera. Sinteze koje se rade iz komercijalno dostupnih granula se najčešće sastoje u isparavanju ili ekstrakciji polimernog rastvora, što dovodi do njegove precipitacije [72]. Tu pre svega spadaju emulzione metode, metoda rasprašivanja polimernog rastvora u sitne kapljice i njihovo sušenje, taloženje polimera na granici faza, metoda izmene rastvarača, dijaliza pomoću odgovarajućih membrana i mnoge druge [72,78]. Većina ovih tehnika podrazumeva upotrebu različitih stabilizatora čija je uloga da smanjenjem površinske energije čestica spreče njihovu aglomeraciju i agregaciju ali i da definišu njihovu morfologiju. Najčešće korišćeni stabilizatori za sintezu mikro- i nanočestica PCL-a su: polivinil pirolidon (PVP), polivinil alkohol (PVA), span 20, polysorbate 80, PE/F68, pluronic F 127, natrijum dodecil sulfat (SDS) itd. [69,78]. U poslednje vreme istraživanja su usmerena ka funkcionalizaciji i konjugaciji hidrofilnih vrsta sa PCL-om kako bi se modifikovala njegova degradacija [79].

Iako tema ovog rada nije iz oblasti tkivnog inženjerstva, ovo je naučna oblast koja je "proslavila" PCL i učinila ga neizostavnim materijalom za dizajniranje raznovrsnih sistema za regeneraciju tkiva-skafolda. Postoji mnogo tehnika za dizajniranje skafolda na bazi PCL-a. Kada su u pitanju porozni sistemi najzastupljenije tehnike su 3D štampanje, izvlačenje vlakana na odgovarajući supstrat pod dejstvom električnog polja (eng. *electrospinning*) upotreba odgovarajućih supstanci-porogena, saturacija i oslobađanje CO₂ iz polimernog rastvora, tehnika razdvajanja faza [80].

Na slici 1.3.1 dati su podaci o broju objavljenih radova u periodu 2000-2017-te godine, dobijeni pretragom indeksne baze SCOPUS kada je kao ključna reč korišćen naziv polimera - *poly epsilon caprolactone*. Ukupan broj ovih radova iznosi 8350 a njihova zastupljenost po određenim naučnim disciplinama je data na slici 1.3.2. Iz priloženih slika se vidi da je ovaj polimer i dalje aktuelan u istraživanjima, posebno kada se radi o istraživanjima iz oblasti nauke o materijalima.



Slika 1.3.1. Grafički prikaz publikovanih radova u periodu 2000-2017. u kojima je korišćen PCL. Podaci su preuzeti sa indeksne baze SCOPUS a kao ključna reč pretrage je korišćen naziv polimera -*poly epsilon caprolactone*



Slika 1.3.2. Grafički prikaz zastupljenosti radova (u kojima je korišćen PCL) po naučnim oblastima, za period 2000-2017. Podaci su preuzeti sa indeksne baze SCOPUS a kao ključna reč pretrage je korišćen naziv polimera - *poly epsilon caprolactone*

1.4 Mikroelementi neophodni za pravilno funkcionisanje organizma

1.4.1 Osnovni podaci o mikroelementima

Mikroelementi ili, kako se još nazivaju, elementi u tragovima, imaju različite definicije a prema tome u kojoj oblasti se termin koristi [81]. Ukoliko se pojam mikroelementa koristi u analitičkoj hemiji onda označava elemente koji imaju prosečnu koncentraciju manju od 100 čestica po milionu, odnosno manje od 100 mikrograma u gramu. Sa druge strane, u geohemiji mikroelementi su elementi čija je koncentracija manja od 1000ppm ili 0.1% sastava stene. U biohemiji mikroelement predstavlja dijetetske minerale koji su potrebni u vrlo malim količinama za pravilan rast, razvoj i funkcionisanje organizma.

1.4.2 Klasifikacija mikroelemenata

Mikroelementi u biomedicini i biohemiji se mogu podeliti na 4 grupe. Prvu grupu čine elementi koji imaju definisanu biohemijsku funkciju i čiji nedostatak se manifestuje kod ljudi. Tu spadaju gvožđe (Fe), cink (Zn), bakar (Cu), kobalt (Co), jod (I), molibden (Mo), selen (Se) i fluor (F). Drugoj grupi pripadaju elementi koji nemaju jasno definisanu biohemijsku funkciju, ali se njihov nedostatak manifestuje kod ljudi. U ove elemente spadaju hrom (Cr) i bor (B). Treću grupu čine elementi koji imaju definisanu biohemijsku funkciju, ali ne pokazuju se znakovi deficijencije kod ljudi i tu spada mangan (Mn). Četvrtu grupu čine elementi koji nemaju definisanu biohemijsku funkciju niti se pokazuju znakovi deficijencije kod ljudi. U ovu grupu spadaju nikl (Ni), silicijum (Si), vanadijum (V), arsen (As), brom (Br), olovo (Pb), litijum (Li) i kalaj (Sn).

1.4.3 Osobine mikroelemenata

Osobine mikroelemenata su specifičnost, interaktivnost i amplifikacija. Specifičnost mikroelementa znači da nijedan mikroelement ne može biti zamenjen hemijski sličnim supstituentom. Interaktivnost znači da prevelika količina jednog mikroelementa može uticati na metaboličku iskoristivost drugog npr. prevelik unos cinka značajno utiče na apsorpciju bakra. Amplifikacija je osobina mikroelemenata koja označava to što i male količine proizvode dramatične efekte na organizam.

1.5 Selen

Selen je otkriven 1817. godine od strane Jons Jakob Berzelijusa. Ime je dobio od grčke reči *selene* koja znači mesec (zato što se uvek javljao uz telur, latinski *tellus* -zemlja). Pripada VI grupi periodnog sistema pa je po mnogim svojstvima sličan ostalim halkogenim elementima (sumpor, telur). U prirodi se javlja u 4 oksidaciona stanja -2, 0, +4 i +6, od čega su jedinjenja poslednja dva rastvorna u vodi i to u obliku oksidaciona anjona selenita (SeO_3^{2-}) i selenata (SeO_4^{2-}).

Poput sumpora, selen postoji u više alotropskih modifikacija [82]:

- Sivo/crna heksagonalna tj. trigonalna forma, ujedno i najstabilnija, u kojoj su atomi selena uređeni u duge spiralne lance;
- Crvene kristalne, monoklične forme (α i β) koje su izgrađene od osmočlanih prstenova selenovih atoma;
- Crna staklasta forma, sadrži velike prstenove od preko 1000 atoma selena;
- Crvena, amorfna forma, za koju se veruje da se pretežno sastoji iz kombinacije malih prstenova i deformisanih lanaca heksagonalnih oblika.

Primena Se je veoma raznovrsna. Što se tiče industrijske primene Se se najviše koristi kao aditiv u proizvodnji stakla i čelika. Pored toga popularan je materijal za izradu foto-ćelija i delova fotokopir mašina. Međutim sa otkrićem Švarca i Folca da je Se neophodan nutrijent počinje i da se menja interesovanje za ovaj element. Danas je poznato da je Se mikroelement neophodan za pravilno funkcionisanje ljudskog organizma i ima jako bitnu ulogu u ishrani i fiziologiji ljudi. Poznat je po tome što ulazi u sastav glutathion peroksidaze (selenoenzim koji ima odlučujuću ulogu u oksidativnim procesima) i tioredoksin reduktaze (koji pored ostalih uloga učestvuje i u reakcijama detoksikacije), a u formi seleno-cisteina, kao 21-e aminokiseline, ulazi u sastav brojnih proteina [83]. Kao moćan antioksidans neutrališe slobodne radikale, i na taj način utiče na funkciju i integritet ćelije i DNK, na održavanje vitalnosti organizma i sveukupnog zdravlja, može imati antikancerogeni efekat [84–87] i jako je bitan za metabolizam kostiju [88–90]. U istraživanju koje su sprovedi L.C. Clark i ostali autori utvrđeno je da konzumiranje 200 μg Se na dan smanjuje stopu smrtnosti kod pacijenata obolelih od raka prostate, debelog creva i pluća [91]. Sa druge strane veoma je tanka granica između prihvatljivog nivoa unosa selena i njegove toksičnosti [92,93]. Do skora se smatralo da je selen u elementarnom obliku nerastvoran i biološki inertan, dok je pažnja bila uprta na druge dve forme: seleno-metionin (SeMet) i selenit. SeMet i selenit su najzastupljeniji oblici selena u prirodi. SeMe se često koristi kao dodatak u ishrani ali i u brojnim terapijama.

Međutim, sa napretkom nanotehnologije došlo se do novih saznanja u vezi sa aktivnošću elementarnog Se nanodimenzija - SeNp. U poređenju sa SeMet i selenitom, SeNp poseduju jednaku efikasnost u povećanju aktivnosti glutathion peroksidaze i tioredoksin reduktaze, ali i znatno manju toksičnost [94–96].

Do sada je u literaturi prijavljeno mnogo metoda za sintezu nanočestica selena – SeNp. One se generalno mogu podeliti u tri grupe [97–99]:

- metode hemijske sinteze (hemijska redukcija)
- metode fizičke sinteze (laserska ablacija, mikrotalasno zračenje)
- metode biosinteze (redukcija uz pomoć bioloških organizama ili njihovih ekstrakta)

U zavisnosti od izbora metode i uz odgovarajuću upotrebu stabilizatora, moguće je dobiti različite morfologije sa različitim unutrašnjim strukturama [100–103]. Za biomedicinsku primenu uglavnom je od interesa amorfna ili crvena monoklinična forma, najčešće dobijena u vidu koloidnog rastvora. Metode hemijske sinteze-redukcije su i dalje najzastupljeniji pristup za dobijanje SeNp zbog njihove jednostavnosti, reproducibilnosti, dobrog reakcionog prinosa i mogućnosti da se njihova površina "dekoriše" raznim jedinjenjima koja im omogućavaju specifičnu primenu. Kao redukciona sredstva mogu se koristiti askorbinska kiselina, glukoza, natrijum tiosulfat, glutathion (redukovani oblik GSH) itd. Prema mnogim autorima prisustvo stabilizatora je neophodno ukoliko želimo da postignemo kontrolisani rast čestica (granična veličina čestica za koju se može dobiti stabilna suspenzija je oko 200 nm). Kao stabilizatori nanočestica selena koji sprečavaju njihovu agregaciju se uglavnom koriste razni polisaharidi (hitozan, karboksimetil celuloza, natrijum alginat), goveđi serum albumin (BSA), polivinil alkohol (PVA) itd. [104–108]. Sa druge strane odgovarajućim izborom redukcionog sredstva moguće je čak izbeći upotrebu stabilizatora. Primer za to su redukcija glukozom i L-cisteinom [102,109]. U prvom slučaju su dobijene čestice veličine 20–80 nm, a u drugom oko 130 nm. Međutim upotreba stabilizatora može znatno poboljšati jednu drugu karakteristiku a to je biološka aktivnost, tj. efikasnost interakcije sa ćelijama. Tako na primer, upotreba BSA kao stabilizatora ne dovodi

do pojačanog imunog odgovora organizma na prisustvo stranih čestica a omogućuje lak prolazak čestica kroz ćelijsku membranu bez rizika od povećane citotoksičnosti [104].

Najveći broj istraživanja sa SeNp uključuju ispitivanje antikancerogene aktivnosti ovog materijala. Jedna od strategija na koju se oslanjaju ova istraživanja jeste različita distribucija SeNp u krvne sudove zdravog i kancerogenog tkiva zbog razlike u veličini njihovih pora [105,110]. Druge strategije uključuju funkcionalizaciju površine SeNp kao i njegovu konjugaciju sa drugim antikancerogenim supstancama. Većina ovih istraživanja je sumirana u preglednim radovima koji su se pojavili u proteklih par godina [97–99].

Takođe u skorije vreme primetan je porast u istraživanjima koja se bave antibakterijskom i antivirusnom aktivnošću SeNp [111–117]. U njima je između ostalog pokazano da na antibakterijsku aktivnost utiče i način sinteze tj. površina SeNp kao i veličina čestica [116,117]. Među njima jedan od pravaca koji ima veliki potencijal jeste oblaganje različitih tipova biomaterijala i medicinskih naprava sa ciljem da se suzbije pojava infekcije i formiranje biofilma [118,119].

Toksičnost nanočestica selena može biti uslovljena veličinom, morfologijom kao i prirodom stabilizatora koji se koriste za njihovo dobijanje. Zbog toga je često teško izvesti zaključke o koncentracijama koje bi bile u potpunosti odgovarajuće za primenu u terapijske svrhe. Potencijalno rešenje može biti inkorporiranje nanočestica selena u polimerni nosač koji je biokompatibilan a koji bi omogućio kontrolisano otpuštanje SeNp u organizmu.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Nanočestice selena predstavljaju novu formu ovog mikroelementa koja se pokazala kao dosta efikasnija od ostalih u pogledu raznih bioloških aktivnosti. Sa druge strane, doza potencijalnog rizika u ispoljavanju toksičnog efekta ovog materijala je i dalje glavni problem koji ograničava njegovu primenu u biomedicinske svrhe. Jedna od strategija koja bi mogla da olakša primenu nanočestica selena jeste da se one zaštite odgovarajućim biokompatibilnim nosačima koji bi ih u fiziološkim uslovima jako sporo otpuštali, dok bi u određenim patološkim situacijama (bakterijskom okruženju), ovo otpuštanje bilo znatno brže.

Imajući u vidu ovakav pristup, glavni ciljevi ovog multidisciplinarnog istraživanja su utvrđivanje optimalnih parametara za dobijanje novog biokompozita poli(ϵ -kaprolakton)/nanočestice selena, detaljna karakterizacija novo-dobijenog sistema korišćenjem različitih fizičko-hemijskih metoda analize i ispitivanje raznih bioloških karakteristika kao potvrda potencijalne primene dobijenog materijala.

Ciljeve istraživanja su činili:

- Sinteza sfernih čestica PCL-a i utvrđivanje optimalnih uslovi sinteze pri kojima se fizičko-hemijskom metodom rastvarač/nerastvratač mogu dobiti što uniformnije čestice PCL-a;
- Ispitivanje strukturnih i morfoloških osobina dobijenih čestica PCL-a;
- Ispitivanje biokompatibilnosti čestica PCL-a u *in vitro* uslovima;
- Sinteza i utvrđivanje optimalnih parametara pri kojima je metodom hemijske redukcije moguće dobiti uniformne, amorfne nanočestice selena - SeNp;
- Ispitivanje strukturnih i morfoloških osobina dobijenih čestica SeNp;
- Ispitivanje antibakterijske aktivnosti čestica SeNp;
- Ispitivanje antikancerogene aktivnosti čestica SeNp;
- Sinteza biokompozita PCL/SeNp i određivanje optimalnih uslovi sinteze pri kojima je moguće efikasno inkorporirati SeNp u sferne PCL čestice– PCL/SeNp;

- Detaljna fizičko-hemijska karakterizacija dobijenih sfernih čestica PCL/SeNp i ispitivanje interakcija između PCL-a i SeNp unutar ovog sistema;
- Ispitivanje degradacije sistema PCL/SeNp i profila otpuštanja SeNp u različitim degradacionim medijuma i to u: (i) puferu fosfatnih soli (PBS), (ii) rastvoru lipaze izolavane iz pankreasa svinje u PBS-u, (iii) 0.1 M hlorovodoničnoj kiselini (HCL), i (iv) ćelijskom ekstraktu izolovanom iz bakterijskog soja *P. aeruginosa* PAO1.
- Ispitivanje promene veličine kristalita i krive topljenja izazavane procesima degradacije i korelacija ovih promena i profila otpuštanja nanočestica Se;
- Ispitivanje biokompatibilnosti mikrosfera PCL/SeNp na HepG2 ćelijama i upoređivanje sa rezultatima za PCL čestice koje ne sadrže SeNp.
- Upoređivanje dobijenih rezultati sa podacima iz literature i sticanje uvida u potencijal finalnog sistema PCL/SeNp sa stanovišta primene u biomedicini.

Da bi svi ovi ciljevi bili realizovani, bilo je potrebno izvršiti temeljnu karakterizaciju uzoraka sledećim fizičko-hemijskim metodama analize: infracrvenom spektroskopijom sa Furijeovom transformacijom (FTIR), ramanskom spektroskopijom, difrakcijom rendgenskog zračenja (XRD), skenirajućom, transmisijom i visokorezolucijom transmisijom elektronskom mikroskopijom (SEM, TEM i HRTEM), metodom određivanja raspodele veličina čestica (PSD), metodom merenja zeta potencijala, termogravimetrijskom i diferencijalnom termijskom analizom (TGA-DTA), diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC), atomskom emisijom spektroskopijom sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-AES). Pored ovih karakterizacija bilo je neophodno i uraditi brojna biološka ispitivanja poput Bujon-mikrodilucione metode za određivanje antimikrobne aktivnosti, kolorimetrijskog testa za određivanje ćelijske metaboličke aktivnosti (MTT testa), 2',7' - dihlorofluorescein diacetat (DCFDA) testa za određivanje nastanka reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) i komet testa za određivanje potencijalne genotoksičnosti.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1 Eksperimentalne metode

3.1.1 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom - FTIR

Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom - FTIR predstavlja nedestruktivnu spektroskopsku tehniku koja se zasniva na interakciji ispitivanog uzorka sa elektromagnetnim zračenjem iz infracrvene (IC) oblasti (0,75-1000 μm) [120]. Zajedno sa Ramanskom spektroskopijom pripada analitičkoj tehnici koja se naziva vibraciona spektroskopija. Naziv potiče od pojave da usled apsorpcije zračenja iz IC oblasti dolazi do promene frekvencije vibracija odgovarajućih hemijskih veza unutar molekula, funkcionalnih grupa itd. Da bi vibracija neke hemijske veze bila vidljiva IC analizom, potrebno je da se tokom vibracija dešava promena dipolnog momenta veze i da je ispunjen kvantnomehanički uslov da moment prelaza između osnovnog i pobuđenog vibracionog stanja bude različit od nule [121]. Ukoliko su ovi uslovi ispunjeni, nakon propuštanja polihromatskog upadnog zračenja kroz uzorak, deo se apsorbuje a deo se propusti. Kao rezultat dobija se signal intenziteta apsorbovanog/propuštenog upadnog zračenja u funkciji talasnih brojeva. Svaka hemijska vrsta daje specifičan spektar u oblasti nižih talasnih brojeva (~500-1200) koji se naziva "oblast otiska prsta" i koja se može koristiti za kvalitativnu analizu date vrste. Kod klasičnih uređaja koristi se upadno polihromatsko zračenje iz srednje IC oblasti pa dobijeni spektri pokrivaju oblast talasnih brojeva od 400-4000 cm^{-1} . Spektri nose podatke koji se odnose na osnovne vibracije veza i odgovarajuće rotaciono vibracione strukture. IC spektroskopija se smatra nezamenjivom metodom za kvalitativnu analizu raznih materijala a pogotovo polimera i kompozitnih materijala. Njome je moguće ispitivati i kristaliničnost polimernih materijala, interakciju između materijala na molekulskom nivou, sekundarnu strukturu proteina kao i još mnogo drugih karakteristika materijala [122–124].

Sa otkrićem interferometra koji je zamenio disperzioni element i uz upotrebu Furijeove transformacije otpočela je era FTIR spektroskopije. Prednosti

IC spektrometara sa Furijeovom transformacijom u odnosu na klasične instrumente su velika brzina snimanja spektra jer se svo polihromatsko zračenje analizira istovremeno, velika osetljivost i mnogo veći odnos signal/šum (S/N) što je posebno značajno u slučaju slabih signala. FTIR spektrometri najčešće koriste interferometar Majkelsonovog tipa koji deli upadno zračenje na sistem pokretnog i nepokretnog ogledala. Posle refleksije na ogledalima, zraci se vraćaju na delitelj zračenja gde dolazi do njihove interferencije posle čega prolaze kroz uzorak i padaju na detektor. Signal koji se dobija je funkcija pomeraja pokretnog ogledala i naziva se interferogram. Dobijeni signal se Furijeovom transformacijom prevodi u karakterističan oblik zavisnosti intenziteta od frekvencije ili talasne dužine.

FTIR spektroskopijom moguće je analizirati uzorke u sva tri agregatna stanja. Kao najveća mana ove spektroskopske tehnike se obično navodi nemogućnost kvalitetne analize uzoraka koji sadrže vodu zbog prejake apsorpcije upadnog zračenja. Međutim sa otkrićem ATR (engl. *Attenuated Total Reflection*) tehnike prevaziđen je i ovaj problem. Radi se o specijalnom dodatku čiji je glavni deo kristal velike optičke gustine i visokog indeksa refrakcije (poput dijamanta). Uzorak se nanosi iznad kristala. Zadatak ovog kristala je da stvori talas upadnog zračenja koji interaguje sa površinom uzorka usled čega dolazi do njegovog slabljenja. Ovako "oslabljen" talas se vraća na detektor i prevodi se u signal.

Kvalitativna analiza uzoraka sintetisanih u ovom doktorskom radu je urađena na dva uređaja:

- Carl Zeiss SPECORD 75, i
- MIDAC M 2000

Kod oba uređaja snimanja su vršena u transmisionom modu korišćenjem tehnike KBr pastile za pripremu uzorka.

3.1.2 Ramanska spektroskopija

Ramanska spektroskopija je druga tehnika vibracione spektroskopije koja je zasnovana na pojavi fenomena ramanskog rasejanja (otkrio ga je indijski naučnik Raman). Radi se o neelastičnom rasejanju koja se javlja usled interakcije upadnog

zračenja (fotona) sa električnim dipolom molekula ili atoma materijala koji se proučava. Za razliku od Rejljevog rasejanja, Ramanovo rasejanje ima frekvenciju koja se razlikuje od frekvencije upadnog zračenja i nosi značajne informacije o hemijskim i strukturnim karakteristikama materijala. Da bi došlo do Ramanovog efekta potrebno je da bude ispunjen uslov promene u molekulskoj polarizabilnosti (zbog toga se ramanskom spektroskopijom mogu analizirati neke molekulske vrste koje su IC neaktivne) [125]. Promena polarizabilnosti određuje intenzitet Ramanovog rasejanja. Ramanska spektroskopija je komplementarna sa IC spektroskopijom tako da vibracije koje imaju slabiji intenzitet na IC spektru su jače naglašene na ramanskom spektru i obrnuto. Kod Ramanske spektroskopije jako bitan je odabir upadnog zračenja. Savremeni uređaji su konstruisani tako da mogu koristiti više izvora pobudnog zračenja koji emituju zračenje talasnih dužina iz UV-Vis oblasti do NIR oblasti (kontinualni gasni laseri- Ar, He-Ne; ekscimerski gasni laseri; poluprovodnički laseri-diode; pulsni čvrsti laseri Nd:YAG itd.). Intenzitet ramanskog rasejanja je izražen preko jednačine:

$$I = kP\alpha^2\nu^4 \quad (1)$$

odakle se vidi da je najuticajniji faktor energija tj. frekvencija upadnog zračenja ν . Takođe tu su i polarizabilnost molekula α kao i snaga lasera P . Što manja talasna dužina veći je intenzitet ramanskog rasejanja ali je veća mogućnost destrukcije materijala kao i mogućnost pojave fluorescencije koja je najveća prepreka u korišćenju ove spektroskopske metode. Sa druge strane uzorci koji sadrže vodu se mogu neometano snimati pa je primena ove metode u biološkim uzorcima veoma zastupljena [126,127].

Jedna od novijih tehnika ramanske spektroskopije koja pored odlične osetljivosti pruža mogućnosti snimanja jako male količine uzoraka kao i mapiranje određene molekulske vrste u kompleksnom jedinjenju ili kompozitnom materijalu jeste ramanska mikroskopija. Nastala je kuplovanjem optičkog mikroskopa sa izvorom zračenja i odgovarajućim detektorom (najčešće CCD detektori).

Metoda ramanske spektroskopije korišćena je za analizu nanočestica selena jer se pomoću ove metode može izvršiti kvalitativna karakterizacija selena kao i utvrditi njegova kristalna struktura. Eksperimenti su urađeni na ramanskom mikroskopu *DXR* proizvođača *Thermo Scientific*.

3.1.3 Elektronska mikroskopija

Brojna naučna otkrića sa kraja 19-og i početka 20-tog veka (otkriće elektrona, dualne prirode čestice i mnoga druga) stvorila su uslove za konstruisanje elektronskih mikroskopa koji bi imali znatno veće uvećanje od već postojećih optičkih mikroskopa. Elektronska mikroskopija koristi talasna svojstva elektrona, omogućavajući istraživanje detalja prostorne strukture i do nekoliko među-atomskih rastojanja [128]. Rezolucija (razdvojna moć) je najmanje rastojanje između dve tačke pri kome se one raspoznaju kao razdvojeni objekti. Rezolucija je opisana Abbe-ovom jednačinom i zavisi od talasne dužine osvetljavajućeg snopa (maks. teorijska rezolucija $\sim 1/2 \lambda$ snopa koji pada na objekat). Otuda i elektronski mikroskop ima više stotina puta veću razdvojnu moć od svetlosnog. Elektronskom mikroskopijom omogućeno je vizuelno posmatranje pojava, procesa i struktura na nanonivou, čime su znatno unapređena istraživanja. Najčešće primenjivane tehnike elektronske mikroskopije su: skenirajuća elektronska mikroskopija **SEM** i transmisiona elektronska mikroskopija **TEM**, koje za stvaranje slike koriste različite mehanizme. SEM skenira površinu uzoraka i formira sliku detekcijom elektrona koji se odbijaju od spoljašnje površine preparata (daje utisak dubine-3D), dok TEM formira sliku pomoću elektrona koji se propuštaju kroz uzorak [129]. Osnovni delovi ovih uređaja su smešteni unutar glavne mikroskopske kolone i to su elektronski top, sistem brojnih sočiva, nosač uzorka i delovi za detekciju. Elektronski top predstavlja izvor elektrona tj. katodu. Emitovani elektroni ubrzavaju se prema anodi koja ima funkciju propuštanja elektrona tačno definisanih energija. Elektronski snop fokusira se sistemom elektromagnetnih sočiva, smeštenih u središnjem delu mikroskopske kolone. Kondenzatorsko sočivo služi za širenje elektronskog snopa i usmeravanje razlike

napona na uzorak, a objektivsko za izoštravanje (promenom jačine struje). Pomoću projektorskog sočiva se vrši regulacija uveličanja i to tako što se promenom jačine struje u njemu, fokusna tačka pomera gore-dole, duž optičke ose. Da bi se obezbedila veća prodornost elektrona u koloni i onemogućila jonizacija molekula vazduha potrebno je da sistem bude pod vakuumom. Interakcija elektronskog snopa sa uzorkom je takva da jedan deo elektrona biva propušten kroz uzorak, deo je elastično i neelastično rasejan, deo je reflektovan, a deo interaguje sa uzorkom na takav način da dolazi do emisije sekundarnih elektrona, Ožeovih elektrona, X-zraka, i katodnoluminiscentnih elektrona koji se mogu skupljati i analizirati od strane specifičnih detektora. Ukoliko se detektuje karakteristično X-zračenje emitovano od strane uzorka moguće je u isto vreme utvrditi i hemijski sastav i koncentraciju te vrste unutar uzorka. Ova tehnika se naziva energetska disperziona spektroskopija – **EDS**. Pored ove tehnike kod TEM uređaja pored slike mogu se dobiti i difrakcioni obrasci kao posledica kristalnog/amornog uređenja uzorka. Kako se radi o difrakciji male površine uzorka zahvaćene elektronskim snopom ova tehnika se naziva **SAED** (*Selected Area Electron Diffraction*) i njom je moguće odrediti i parametre kristalne rešetke.

3.1.3.1 Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) predstavlja jednu od najviše korišćenih metoda u nauci o materijalima, posebno u karakterizaciji materijala sačinjenih od mikro i nano entiteta [129,130]. Većina skenirajućih elektronskih mikroskopa može postići uvećanje od 10 do preko 200 000 puta. Uzorci koji se snimaju na klasičnim SEM uređajima moraju biti neisparljivi i provodni (neprovodni uzorci se naparavaju ugljenikom ili metalom u vrlo tankom sloju). Lik objekta se formira na bazi reflektovanih elektrona ili sekundarnih elektrona. Sekundarni elektroni su malih energija tako da dolaze iz dubine od najviše 5 nm, pa je slika formirana na ovaj način ustvari slika površine uzorka. Energije reflektovanih elektrona su veće i mogu da potiču iz dubine od 1 - 2 μm , tako da formirana slika reprezentuje i dubinu uzorka. Osim sekundarnih elektrona i drugi

oblici emisije sa uzorka (X zraci, katodo-luminescencija, reflektovani elektroni itd.) mogu se skupljati i analizirati od strane specifičnih detektora. Kao posebna naprednija vrsta SEM uređaja razvijen je FESEM (*Field Emission SEM*). Kod ovog uređaja se koristi poseban "top" kao izvor elektrona za razliku od standardnih volframovih filamenata koji se najčešće nalaze u SEM uređajima. Kao rezultat dobija se izuzetno fokusiran elektronski snop elektrona značajnije nižeg napona (0,02-5kV). Ovo je jako korisno u snimanju neprovodnih materijala jer smanjuje naelektrisanje njihovih površina kao i uzorka koji su osetljivi na elektronski snop viših energija. Pored toga ovi uređaji su opremljeni specijalnim detektorima koji im omogućuje bolju rezoluciju nego klasični uređaji.

Morfologija uzoraka koji su sintetisani u ovom radu je ispitivana na dva uređaja. Mikronske i submikronske čestice PCL/SeNp i PCL-a su snimljena na SEM uređaju JSM-6390LV – JEOL, dok su submikronske i nanočestice Se snimljene na FE-SEM uređaju Supra 35 VP - Carl Zeiss.

3.1.3.2 Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)

Transmisionu elektronsku mikroskopiju (TEM) karakteriše izuzetno veliki opseg uvećanja od 100 do 10^6 puta i mogućnost dobijanja slike materijala veoma visoke rezolucije, manje od 1 nm [131]. Za TEM merenja uzorak mora biti jako tanak (~ 100 nm). Prilikom prolaska elektronskog snopa kroz uzorak neki elektroni ne menjaju smer u odnosu na upadni snop, a neki bivaju rasejani pod određenim uglovima. Ukoliko se slika formira od elektrona koji nisu promenili smer radi se o mikroskopiji svetlog polja, dok se kod formiranja lika od rasejanih elektrona radi o spektroskopiji tamnog polja. Za razliku od SEM analize, nije potrebno oblagati uzorak provodnim materijalom ali je njihova priprema jako bitna za efikasno snimanje. U zavisnosti od forme uzorka, za njegovu pripremu je možda potrebno zamrzavanje ili upotreba odgovarajućih noževa kojima se seku jako tanki delići uzorka [132]. Kada se radi o analizi prahova pripremaju se jako razblažene suspenzije. Ove suspenzije se nanose na odgovarajuće metalne mrežice (Cu, Ni, Au) koje su sa jedne strane obložene tankim karbonskim filmom [132,133].

Poseban modalitet snimanja koji omogućuje rezoluciju na atomskom i subatomskom nivou je visokorezoluciona transmisiona mikroskopija-HRTEM (*High Resolution TEM*). Princip ove metode se zasniva na korišćenju i propuštenih i rasejanih elektrona, koji nakon interferencije formiraju 2D sliku. Elektroni pri prolasku kroz materijal bivaju difraktovani od strane atoma materijala, menjajuću fazu njegove talasne prirode. Ove fazne promene se uz pomoć specijalnih aberacija konvertuju u amplitude u ravni slike. Ovakvo oslikavanje se naziva oslikavanje faznog kontrasta i najveća rezolucija koja se može postići je ispod 1 Å [134]. HRTEM-om se uspešno mogu ispitivati kristalne strukture na nivou jediničnih ćelija, nesavršenosti kristlnih rešetki, kao i površine nanomaterijala na atomskom nivou[135].

TEM i HRTEM analiza uzoraka koji su sintetisani u ovom radu su urađeni na TEM uređaju JEOL JEM-2100.

3.1.4 Rendgenska difrakciona analiza (XRD)

Rendgenska difrakciona analiza (XRD) spada u grupu nedestruktivnih metoda, prevashodno namenjena za karakterizaciju kristalnih materijala. Ova metoda se tradicionalno koristi za identifikaciju faza, kvantitativnu analizu kao i analizu strukturnih nesavršenosti . Različite vrste mikro i nanokristalnih materijala kao što su neorganski i organski materijali, lekovi, minerali, metali, keramika i kompoziti mogu se analizirati rendgenskom difrakcijom [129]. Osim toga mogu se analizirati masivni materijali, tanki filmovi, polikristalni materijali i sl. U zavisnosti od tipa uzorka koji se koristi, XRD metode se mogu podeliti u metode difrakcije na uzorcima monokristala i metode difrakcije na polikristalnim uzorcima tj. kristalnom prahu.

Princip XRD analize zasniva se na interakciji upadnog rendgenskog zračenja određene talasne dužine sa površinom uzorka smeštenog na odgovarajući nosač. Usled difrakcije upadnog zračenja definisane Bragg-ovom jednačinom ($n\lambda=2d\sin\theta$), dolazi do njegovog rasejanja koje se nakon prolaska kroz analizator i filter beleži. Konačni rezultat je difraktogram na kome je intenzitet zračenja difraktovanog sa

uzorka predstavljen u zavisnosti od dvostrukog ugla upadnog zračenja 2θ . XRD analizom je moguće odrediti parametre elementarne ćelije kristala, veličinu kristalita, stepen kristalichnosti uzorka, naprezanja u strukturi itd .

Svi eksperimenti ispitivanja kristalne strukture su izvršeni na difraktometru Philips PW 1050 koji emituje Cu-K α zračenje, talasne dužine $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$.

3.1.5 Termalne metode analize

Termalne metode analize obuhvataju grupu metoda kojima se mere osobine materijala i/ili reakcionih proizvoda u funkciji temperature i vremena, dok je materijal izložen kontrolisanom temperaturskom programu i atmosferi [136]. U zavisnosti od prirode materijala i osobina koje su cilj njegovog ispitivanja, termalna analiza se može izvoditi kako u izotermnim uslovima tako i u dinamičkim uslovima. Promene koje se javljaju u materijalu kao posledica zagrevanja/hlađenja pretvaraju se u električni signal srazmeran promeni. Ovaj signal se pojačava i obrađuje, najčešće preko računara a zatim predstavlja u funkciji temperature ili vremena.

Postoji veliki broj tehnika koje se koriste za termijsku analizu. Za kakarakterizaciju uzoraka u okviru ovog rada korišćene su:

- Termogravimetrija (TG)
- Diferencijalna termijska analiza (DTA)
- Diferencijalna skanirajuća kalorimetrija (DSC)

3.1.5.1 Diferencijalna termijska analiza (DTA)

Diferencijalna termijska analiza (eng. *differential thermal analysis* -DTA) je metoda analize termijskih osobina supstanci koja meri razliku u temperaturi između etalona/referensa i ispitivanog uzorka nastalu tokom njihovog zagrevanja pod jednakim uslovima [120]. Promene koje nastaju mogu birti endotermnog ili

egzotermnog karaktera i beleže se u vidu električnog signala (V) u funkciji vremena tj. temperature (°C). DTA analizom se mogu ispitivati fazne transformacije (promena kristalne strukture, topljenje, ključanje), desorpcija adsorbovanih gasova i para, pirolitičke reakcije (dehidratacija, svi drugi vidovi termičkog razlaganja) kao i termijski aktivirane reakcije sa gasovima iz atmosfere [136].

3.1.5.2 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (eng. *differential scanning calorimetry* - DSC) se zasniva na registrovanju i merenju protoka toplote pri entalpijskoj promeni u nekom uzorku u zavisnosti od temperature [120]. Diferencijalna termijska analiza i diferencijalna skenirajuća kalorimetrija su slične metode. Svojim tehničkim rešenjima DSC metoda omogućava direktno praćenje promene toplotnog fluksa u zavisnosti od temperature i mnogo je pogodnija za kvantitativan rad, kada je u pitanju određivanje promene entalpije procesa (DSC metoda se često naziva i kvantitativni DTA). Kod DSC uređaja detektovani električni signal se automatski transformiše u snagu iz koje se lako dobija vrednost toplotne energije tj. entalpije ($J=W*s$). To je omogućeno kalibracijom uređaja u celom temperaturskom opsegu primenom različitih referentnih materijala.

DSC analizom je moguće ispitivati iste karakteristike materijala kao i kod DTA analize ali i neke dodatne pojave. Kada se radi o polimernim materijalima tu spadaju [137]:

- Određivanje tačke ostakljivanja (T_g) i skok toplotnog kapaciteta prilikom staklastog prelaza,
- Određivanje stepena kristaliničnosti kod semi-kristalnih materijala,
- Čistoća uzoraka,
- Polimorfizam,
- Određivanje toplotnih kapaciteta
- Određivanje toplote reakcija itd.

U ovoj disertaciji DSC analiza je vršena na uzorcima biokompozita PCL/SeNp sa ciljem da se ispita uticaj inkorporiranja amorfnih nanočestica selena na kristalnu strukturu biokompozita, kao i da se na osnovu promene parametara faznog prelaza topljenja prati napredak degradacije polimera (PCL-a) sa vremenom. Uzorci su snimljeni na uređaju DSC 131 EVO, francuske firme SETARAM.

3.1.5.3. Termogravimetrijska analiza (TGA)

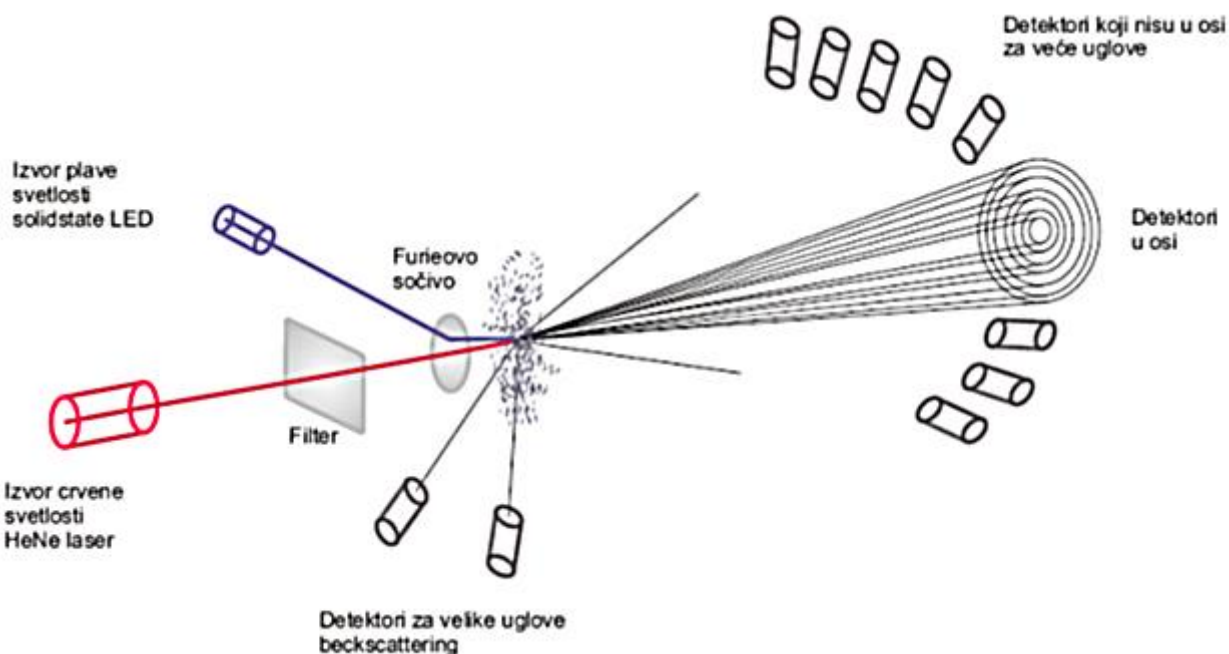
Termogravimetrijska analiza ili termogravimetrija predstavlja tehniku za merenje promene mase uzorka u f-ji od temperature ili vremena pri kontrolisanom režimu grejanja i u kontrolisanoj atmosferi [120]. Fizičko-hemijski procesi koji se prate ovom metodom su: isparavanje, sublimacija, dehidratacija, dehidroksilacija, sagorevanje, reakcije sa gasovima iz atmosfere gde se stvaraju neisparljivi proizvodi itd. [138]. Fundamentalni rezultati termogravimetrijske analize su: temperatura početka i završetka reakcije i promena mase uzorka. Gotovo svi noviji TG uređaji su konstruisani tako da simultano mere i DTA signal (TGA/DTA analiza). Povezivanjem nosača uzorka za DTA analizu na osetljivu termovagu, omogućeno je paralelno praćenja promene temperature/toplotnog fluksa uzorka i njegove mase tokom kontrolisanog temperaturnog režima.

Za potrebe ispitivanja termalne stabilnosti, potencijalne kvalitativne analize sastava kao i nekih svojstava koja su toplotno zavisna TGA/DTA analiza je urađena na prahovima SeNp i biokompozita PCL/SeNp. Merenja su vršena na uređaju SETSYS EVOLUTION francuske kompanije SETARAM.

3.1.6 Određivanje raspodele veličina čestica (PSD)

Određivanje raspodele veličina čestica (PSD) je tehnika laserske difrakcije koja se bazira na činjenici da je prostorni raspored difraktovane svetlosti funkcija veličine čestica uzorka koji se analizira [139]. U suštini LD meri intenzitete i rastojanja difrakcionih prstenova (prostorne uglove i pravac upadne svetlosti).

Pored difrakcije dešavaju se još i refleksija, prelamanje, apsorpcija i re-radijacija. Svi zajedno, ovi fenomeni koji se dešavaju na osvetljenim česticama nazivaju se rasejanje svetlosti. Za razliku od difraktovane svetlosti koja se prostire pod malim uglovima u odnosu na pravac prostiranja upadne svetlosti, rasejanje je kompleksnije – svetlost se prostire u svim pravcima. Prostorni raspored rasejane svetlosti sa čestice se naziva mapa rasejanja. Prostorni raspored zavisi od odnosa veličine čestice (D) i talasne dužine upadne svetlosti (λ). Tako da će se ovaj prostorni raspored rasejane svetlosti menjati ne samo sa veličinom čestice već i sa promenom talasne dužine upadnog zračenja.



Slika 3-1 Šematski prikaz instrumenta za određivanje raspodele veličine čestica Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd, UK) koji je korišćen u radu [139].

Na slici 3-1 dat je šematski prikaz konstrukcije optičkog instrumenta Mastersizer 2000, (Malvern Instruments Ltd, UK) na kome su rađene sve analize uzoraka. Uzorak čestica, dispergovanih u odgovarajućem medijumu, prolazi kroz fokusirani snop svetlosti i rasejava svetlost pod karakterističnim prostornim uglovima. Mastersizer 2000 koristi dva izvora svetlosti: HeNe laser je izvor crvene svetlosti talasne dužine 633 nm, i smešten je u osu instrumenta, prečnik zraka je

0.63 mm, divergencija je 1.5 mrad, a maksimalna optička snaga lasera je 4 mW; drugi izvor svetlosti, koji nije u osi, je LED koji emituje plavu svetlost talasne dužine 455 nm. Opseg veličina čestica koje se mogu izmeriti instrumentom je od 0.02 do 2000 μm .

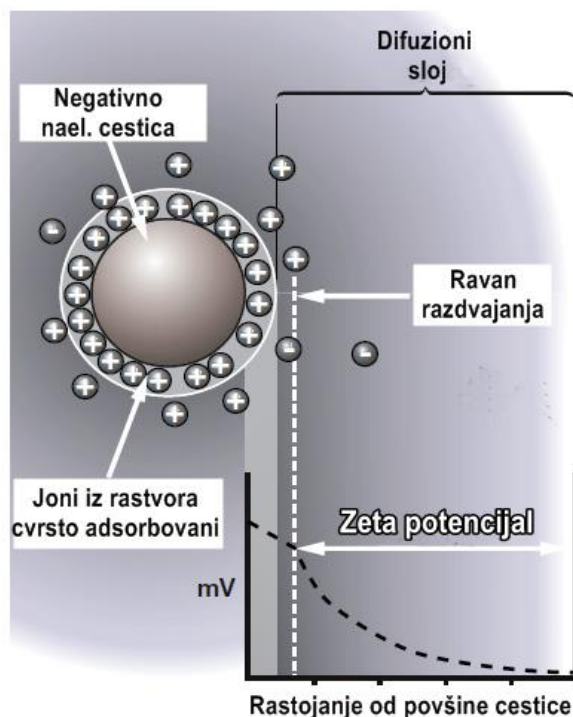
Primena uređaja za merenje raspodele veličina čestica se generalno zasniva na činjenici da svojstva disperznih materijala zavise od veličine čestica i uniformnosti raspodele. Razvoj nanotehnologije kao i primena nanomaterijala su uslovljeni dobrom uniformnošću čestica. Koloidna hemija i emulzioni sistemi se baziraju na rasponu veličine čestica u tačno definisanom rasponu. Takođe primena mnogih materijala koji se nalaze u formi praha zavisi od veličine čestica i njihove raspodele. Tu spadaju abrazivi, keramički materijali, cementi, kozmetički preparati, lekovite supstance, hrana i piće, pigmenti i boje, đubriva, elektrodni materijali za baterije itd. Što se tiče naučnih istraživanja ova metoda se smatra neizostavnom u disciplinama poput nauke o materijalima, inženjerskim naukama, fizici ali i brojnim drugim.

3.1.7 Metoda merenja zeta potencijala

Zeta potencijal je termin koji se koristi za opis površinskog naelektrisanja koloidnih, disperzionih sistema i rastvora makromolekula. Fizički smisao ove veličine jeste da predstavlja srednju vrednost elektrokinetičkog potencijala koja se javlja u oblasti difuzionog sloja (*Gouy-Chapman-ov* električni dvosloj), negde između Sternovog sloja i disperzionog medijuma tj. rastvora. Šematski prikaz je dat na slici 3-2.

Kao model za posmatranje data je čestica sa negativnim naelektrisanjem. Kada se ona nađe u odgovarajućoj disperzionoj sredini, najpre dolazi do snažnog privlačenja pozitivnih jona iz disperzionog medijuma koji formiraju Sternov sloj. Na ovaj čvrsto vezani sloj se naknadno adsorbuje sloj jona suprotnog naelektrisanja ali zantno slabijeg intenziteta veze koji formira difuzioni sloj. Prilikom kretanja čestica (bilo Braunovog, bilo pod uticajem spoljašnjih sila) deo jona iz ovog sloja će se kretati sa česticom a deo ne. Granica koja deli ove jone je

ravant razdvajanja. Potencijal koji se javlja od ove ravni do granice difuzionog sloja sa disperzionim medijumom je zeta potencijal. Debljina ovog sloja je reda veličine 0,2 nm [140].



Slika 3-2 Šematski prikaz zeta potencijala negativno naelektrisane čestice u disperzionom medijumu. Slika je preuzeta od proizvođača uređaja na kojem su rađena merenja (<https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs>)

Najčešće se vrednosti zeta potencijala dobijaju merenjem brzine čestica u disperzionom medijumu pod dejstvom električnog polja i izražava se u mV. Na osnovu brzine kretanja čestica ka anodi ili katodi pod poznatim naponom i vrednosti viskoznosti i dielektrične konstante medijuma vrši se proračun zeta potencijala. Kada je njegova vrednost $\geq \pm 30$ mV smatra se da su koloidni rastvor ili disperzija čestica stabilni. Ispod ove granični vrednosti stvaraju se uslovi za koagulaciju ili agregaciju čestica i takvi koloidni rastvori/disperzije se smatraju nestabilnim [141]. Međutim treba nagistiti da su merenja zeta potencijala jako osetljiva na parametre disperzionog medijuma poput pH i jonske jačine, kao i na koncentraciju čestica koje su predmet analize[142].

U ovom radu za određivanje Zeta potencijala uzoraka korišćen je uređaj Zetasizer (Nano ZS, ZEN3600) koji radi na principu elektroforetičke mobilnosti.

Opseg veličine čestica kojima se može određivati zeta potencijal na ovom uređaju je 5nm-10 μ m.

3.1.8 Atomska emisiona spektroskopija sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-AES)

Kada se radi o kvantitativnom određivanju Se može se reći da induktivno spregnuta plazma sa emisionom ili masenom spektroskopijom prvi izbor od instrumentalnih tehnika. Prvi od uslova koje ispunjava ova analitička metoda je visoka osetljivost tj. nizak nivo granice detekcije jer je Se najčešće zastupljen u uzorcima u jako malim koncentracijama. Drugi uslov je nezavisnost od hemijske prirode tj. oksidacionog stanja. ICP-AES koristi plazmu kao izvor pobuđivanja atoma i jona koji dalje emituju elektromagnetno zračenje na karakterističnim talasnim dužinama. Najčešće se koristi bezelektrodna argonska plazma (ređe azotna) koja radi na atmosferskom pritisku i održava se induktivnim sprežanjem sa radiofrekventnim elektromagnetskim poljem. Uzorak za analizu mora biti adekvatno pripremljen pre nego što se unese u deo uređaja koji se naziva plazmenik ili gorionik. To podrazumeva da uzorak mora biti u formi rastvora ili stabilnih suspenzija sa submikronskim veličinama suspendovanih čestica. Ovako pripremljen uzorak se uz pomoć nebulizera prevodi u formu aerosola koji se potom unosi u plazmenik uz pomoć struje nosećeg gasa- argona. Plazmenik se najčešće sastoji iz tri cevi: unutrašnja, srednja i spoljašnja. Kroz unutrašnju se uvodi uzorak, kroz srednju se uvodi Ar za formiranje plazme – intermedijerni Ar, dok se kroz spoljašnju cev uvodi Ar koji se pruža termičku izolaciju ali takodje stabilizuje i centrira plazmu. Temperatura koja se razvija je između 6000 i 10 000 K. Glavne karakteristike ove tehnike su odlična granice detekcije, niske hemijske interferencije, sposobnost detekcije više elemenata kao i stabilan i ponovljiv signal. Kvantifikacija uzoraka se vrši uz pomoć standarda, formiranjem kalibracione krive u odgovarajućem koncentracionom ospegu.

U okviru ove doktorske disertacije ICP-AES spektroskopija je korišćena za kvantitativno određivanje koncentracije selena u različitim uzorcima. Eksperimenti su rađeni na uređaju Thermo Scientific iCap 6500 Duo.

3.1.9 Ispitivanje biokompatibilnosti uzoraka

Ne postoji idealan i generalni pristup za određivanje biokompatibilnosti svih biomaterijala već se ova ispitivanja vrše u zavisnosti od same primene i dejstva svakog materijala pojedinačno. Najčešće ta ispitivanja počinju *in vitro* studijama na odgovarajućim ćelijskim linijama, gde se dobija procena citotoksičnosti, sposobnosti fomiranja reaktivnih slobodnih radikala, genotoksičnosti, internalizacija nano i submikronskih čestica, adsorpcije proteina ili adhezija ćelija na površinu implanata/skafolda... Nakon toga se prelazi na *in vivo* studije na osnovnim životinjskim modelima (miševi, pacovi, zečevi) gde se u zavisnosti od formi ispitivanog materijala prati efektivnost materijala u vidu biodistribucije čestičnih sistema, histopatologije tkiva u blizini implanta. Rezultati koji se dobijaju prilikom ispitivanja biokompatibilnosti nisu uvek jednoznačni i dosledni. Naime, u literaturi se može naći da su rezultati *in vitro* studija suprotni onima dobijenim u *in vivo* uslovima, ili da jedna *in vitro* tehnika pokaže da ispitivan materijal ispoljava negativan efekat dok druga to ne pokazuje. Kompleksnost tumačenja rezultata je posledica kompleksnosti mehanizma interakcije ćelija i tkiva sa ispitivanim materijalima koja se ogleda u površinskoj hemiji, morfologiji i elastičnosti dodirne površine, veličini čestica, koncentraciji, vremenu i mnogim drugim faktorima. Kada se na sve to doda i mehanizam degradacije i resorpcije (ukoliko se radi o biodegradabilnim materijalima) postaje jasno da je biokompatibilnost jedno od najvažnijih svojstva koje se mora uzeti u obzir pri odabiru materijala za biomedicinsku primenu.

Za *in vitro* ispitivanja biokompatibilnosti korišćena je HepG2 ćelijska linija (humane hepatocelularne ćelije koje su po morfologiji epitelijalne ćelije). Ove ćelije se često koriste u *in vitro* studijama i dobijene su iz Evropske kolekcije za ćelijske kulture (ECACC). Ćelije su kultivisane u rastvoru EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium) sa dodatkom 10% goveđeg seruma, 1% rastvora neesencijalnih aminokiselina, 2 mM L-glutamina i 100 U/ml penicilina sa 100 µg/ml streptomicina, pri 37°C u atmosferi sa 5% CO₂.

3.1.9.1 Kolorimetrijski test za određivanje ćelijske metaboličke aktivnosti (MTT test)

MTT test je kolorimetrijski test za procenu ćelijske metaboličke aktivnosti [143]. Predstavlja jedan od osnovnih i nezaobilaznih metoda za prvu procenu citotoksičnosti ispitivanih supstanci, potencijalnih medicinskih agenasa, toksičnih materijala itd. U vijabilnim (zdravim) ćelijama, tačnije u njihovim mitohondrijama se nalazi enzim sukcinat-dehidrogenaza. Ovaj enzim redukuje žutu tetrazolijumovu so - MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) do formazana, jedinjenja plave boje koje se u vidu kristala taloži u ćelijama. Po završetku inkubacije ćelija sa ispitivanim uzorcima staloženi formazan iz ćelija se ekstrahuje i rastvara najčešće u dimetil sulfoksidu. Uz pomoć spektrofluorometrije moguće je izvršiti kvantitativnu procenu preživljavanja ćelija merenjem intenziteta fluorescencije rastvorenog formazana.

3.1.9.2 2',7' - dihlorofluorescein diacetat (DCF-DA) test za određivanje nastanka reaktivnih vrsta kiseonika (ROS)

Reaktivne vrste kiseonika (engl. Reactive Oxygen Species - ROS) predstavljaju različite hemijske vrste koje nastaju kao međuproizvod metabolizma kiseonika, jako su nestabilne i reaktivne a kao produkt interakcije sa molekulima sredine nastaju novi radikali. Iako se njihovo prisustvo obično povezuje sa početkom ili progresijom raznih oboljenja (ateroskleroza, rak, dijabetes, neurodegenerativni poremećaji itd.), slobodni radikali imaju važnu ulogu i u ćelijskoj signalizaciji i predstavljaju snažno oruđe ćelije odbrambenog sistema u borbi protiv raznih mikroorganizama, nepoznatih materijala itd. [144]. Sa druge strane, izloženost organizma negativnim uticajima sredine može doprineti povećanju koncentracije ovih jedinjenja, što izaziva obimna oštećenja ćelijskih struktura (oksidativni stres).

Dihlorofluorescein diacetat (DCF-DA) test je jedan od osnovnih i najčešće korišćenih metoda za detekciju nastajanja reaktivne vrsta kiseonika H_2O_2 unutar ispitivanih ćelija. DCF-DA je nefluorescentan molekul koji lako difunduje kroz

ćelijsku membranu, nakon čega se hidrolizuje unutarćelijskim esterazama do nefluorescentnog 2',7'- dihlorodihidrofluoresceina (DCFH₂). Peroksidaze, citohrom c i Fe²⁺ su sposobni da oksiduju DCFH₂ do veoma fluorescentnog 2',7'- dihlorofluoresceina (DCF) u prisustvu vodonik peroksidaza. Akumulacija DCF unutar ćelija se može meriti pojavom fluorescencije na 530 nm, kada se uzorak ekscituje upadnim zračenjem od 485 nm. Intenzitet fluorescencije DCF (meri se protočnom citometrijom) proporcionalan je količini reaktivnih vrsta kiseonika, formiranih unutar ćelije.

3.1.9.3 Odredjivanje genotoksičnosti – Komet test

Komet test je drugi naziv za eksperimentalnu tehniku koja se zasniva na gel elektroforezi pojedinačnih ćelija ili SCGE test (engl. *Single Cell Gel Electrophoresis*) [145]. Ova metoda se najčešće koristi za utvrđivanje nivoa oštećenja DNK u ćelijama. Sastoji se u fiksiranju ćelija u rastvor agarose na mikroskopskom staklu, potom se vrši liziranje ćelija uz pomoć odgovarajućih rastvora (smeša detrdženta, soli u visokoj koncentraciji, alkalni puffer, itd) kako bi se formirao takozvani nukleoid u kome su organizovane strukture DNK vezane za matriks jedra. Ovako pripremljeni uzorci se prebacuju u horizontalnu jedinicu za elektroforezu gde se uranjaju u rastvor Na₂-EDTA i NaOH (alkalna sredina) i ostavljaju određeni period (oko 20 min) kako bi se DNK lanci odmotali. Nakon toga se kroz ovaj rastvor pušta napon (najčešće oko 20 mV) u trajanju od 20 min. Suština metode se zasniva na različitoj migraciji DNK iz nukleoida tokom elektroforeze ukoliko je došlo do njihovog oštećenja. Naime kod zdravih ćelija, kada nema oštećenja DNK lanaca, oni su gusto pakovani u visoko organizovane strukture oko proteina iz nukleusa. Kada dođe do oštećenja ova organizacija je narušena i individualni DNK lanci gube njihovu kompaktnu strukturu. U električnom polju, zbog svog ukupnog negativnog naelektrisanja, oštećeni DNK lanci bivaju privučeni ka anodi. Sama detekcija se vrši uz pomoć fluorescentne mikroskopije, tako što se DNK lanci nakon izvršene elektroforeze oboje etidijum bromidom. Celokupna slika, gledano pod fluorescentnim mikroskopom, podseća na kometu (otuda i naziv) gde je glava kometa sačinjena od DNK lanaca bez oštećenja a rep od onih koji se pretpeli

oštećenje. Što su intenzitet fluorescencije i dužina repa veći to je veće oštećenje. Kvantitativna procena nivoa oštećenja DNK se dobija nakon upoređivanja intenziteta fluorescencije DNK lanaca koji migriraju (repa) sa intenzitetom svih DNK lanaca iz nukleusa i obično se izražava u procentima.

3.1.10 Mikrodiluciona metoda za određivanje antimikrobne aktivnosti

Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) uzoraka korišćena je Bujon-mikrodiluciona metoda. Predstavlja jednu od najčešće korišćenih metoda za ispitivanje antimikrobne aktivnosti zbog jednostavnosti, ekonomičnosti i reproducibilnosti. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je po definiciji najmanja koncentracija uzorka pri kojoj mikroorganizmi ne pokazuju dalji vidljivi rast. Zasniva se na vizuelnoj proceni razvoja bakterija koje se kultivišu na odgovarajuće hranjive podloge (u ovom radu je korišćen Müller Hinton bujon kao podloga). Izvodi se u mikrotitracionim (otuda i potiče prefiks mikro) pločama, sa 96 bazena sa ravnim dnom zapremina 0,3 ml, što omogućuje paralelno ispitivanje i do 12 uzoraka u rasponu od 8 različitih koncentracija dobijenih razblaživanjem.

3.1.11 Metoda određivanja antikancerogene aktivnosti

Ispitivanja antikancerogene aktivnosti su vršena na HeLa ćelijama. Ove ćelije predstavljaju najstariju i jednu od najkorišćenijih humanih ćelijskih linija koje se koriste u laboratorijskim ispitivanjima (*in vitro*). Razvijene su iz raka grlića materice i karakteriše ih intenzivna proliferacija i laka održivost. Zbog toga se i dalje često koriste u brojnim naučnim istraživanjima [146]. Za proveru njihove vijabilnosti usled tretiranja različitim koncentracijama nanočestica selena urađen je klasičan MTT test.

3.2. Eksperimentalni rad

3.2.1 Sinteza i karakterizacija čestica poli(ϵ -kaprolaktona) PCL-a

Sinteza čestica PCL-a je izvršena precipitacijom polimera korišćenjem sistema rastvarač/nerastvarač. To je brza i jednostavna metoda koja se bazira na izdvajanju čestica polimera prvobitno rastvorenog u organskom rastvaraču i to nakon dodavanja odgovarajućeg nerastvarača u višku. Rastvarač i nerastvarač moraju biti mešljivi u određenoj meri, kako ne bi došlo da razdvajanja faza. Precipitacija polimera je izazavana difuzijom organskog rastvarača u sredinu nerastvarača, i opaža se gotovo istovremenim mlečno belim zamućenjem. Isparavanjem tečne faze dobija se prah mikro/nano čestica. Gledano po principu i ekonomičnosti ovo jeste jedna zgodna i brza metoda, ali je nije lako realizovati iz više razloga. To su pre svega pravi izbor rastvarača i nerastvarača, zatim određivanje njihovih odgovarajućih molskih frakcija, izbor stabilizatora i na kraju sprovođenje dobre metode sušenja. Shodno tome, svi ovi navedeni faktori mogu uticati na morfologiju i veličinu čestica dobijenog praha.

Za sintezu PCL čestica korišćene su komercijalne granule proizvođača *Direct Lactel* (Birminge, Alabama, USA). Po specifikaciji proizvođača inherentna viskoznost PCL-a je 0,65-0,85 dL/g . Polivinil pirolidon (PVP) K-25 je kupljen od nemačkog proizvođača Merck Chemicals Ltd. dok jr poli (α,γ L-glutaminska kiselina) (PGA) sa molekulskom masom $M_w=20-40$ kDa nabavljena od kineske kompanije *Guilin Peptide Technology Limited*.

3.2.1.1 Sinteza PCL čestica

Za sintezu PCL čestica izabran je sistem hloroform/etanol pri čemu je odnos zapremine medijuma određen nakon serije proba u kojima se pokazalo je minimalni odnos etanola i hloroforma potreban da izazove precipitaciju 4:1. U prvom koraku se polimerne granule (300 mg) rastvaraju u hloroformu (5 ml). Nakon sat vremena u polimerni rastvor se naglo doda 20 ml etanola (nerastvarača), što dovodi do momentalnog belog zamućenja. Ovako dobijena

suspenzija se kratko homogenizuje na magnetnoj mešalici (svega 1 min), a zatim suši u Petrijevoj šolji narednih 72 sata na sobnoj temperaturi.

3.2.1.1.1 Ispitivanje uticaja različitih stabilizatora tokom sinteze na morfološke karakteristike PCL mikro i submikrosfera

Jedan od parametara sinteze koji najčešće uslovljava morfologiju i veličinu polimernih čestica jeste izbor odgovarajućeg stabilizatora. Kod ovog parametra su zapravo bitne hemijska priroda i koncentracija stabilizatora. Umesto stabilizatora u literaturi se može naći termin surfaktant, mada ova dva termina nemaju isto značenje. Za stabilizatore se generalno može reći da su to molekuli ili jedinjenja koja imaju sposobnost da odgovarajućim slabim vezama ili adsorpcijom na površinu čestica smanje njihovu površinsku energiju i na taj način spreče njihovu aglomeraciju. U zavisnosti od brzine i stepena adsorpcije moguće je dobiti različite morfologije i veličine čestica. Sam fenomen stabilizacije čestica usled adsorpcije stabilizatora na njihovu površinu moguće je ostvariti na više načina. Jedan podrazumeva porast površinskog naelektrisanja što dalje rezultira elektrostatičkim odbijanjem čestica. Ovaj vid stabilizacije je karakterističan za vodene tj. polarne medijume i njegov efekat opada sa padom polarnosti medijuma. Drugi način se bazira na uticaju stabilizatora velikih molekulskih masa tj. makromolekula, čija je srednja masena vrednost molarne mase $M_w > 10\text{kDa}$. Dužina lanaca ovih makromolekula je uporediva sa dometom Van der Valsovih privlačnih sila [147]. Unutar ovog pristupa razlikuju se dva mehanizma. Jedan je sterni efekat a drugi deplecioni (*depletion*) i za njega je karakteristično da ne podrazumeva adsorpciju makromolekula na površinu već okruživanje čestica slobodnim, rastvorenim makromolekulima. Sterni efekat se bazira na odbojnim silama nastalim usled preklapanja elektronskih oblaka istoimenih atoma unutar polimernih lanaca. Glavni preduslov za ovakav tip stabilizacije je efikasna pokrivenost površine čestica. Za razliku od ostalih mehanizama stabilizacije neosetljiv je na prisustvo elektrolita, koncentraciju čestica i polarnost rastvarača. Na kraju moguće je izvršiti stabilizaciju čestica kombinacijom elektrostatičkog i

sternog efekta kada se kao stabilizatori koriste polimeri sa izraženim površinskim naelektrisanjem tj. polielektroliti.

Za ispitivanje uticaja stabilizatora na morfološke karakteristike čestica PCL-a korišćena su dva tipa stabilizatora:

- polivinil pirolidon (PVP) - poznati sintetički polimer neutralnog naelektrisanja i
- poli(α,γ , l-glutaminska kiselina) (PGA) - prirodni polielektrolit anjonskog karaktera.

Vodeni rastvori stabilizatora, masene koncentracije 0,05%, su ukapavani paralelno uz dodavanje etanola. Nakon toga dobijena suspenzija je homogenizovana 20 min na magnetnoj mešalici, kako bi se postigla što homogenija raspodela stabilizatora i mogućnost adsorpcije na površinu polimernih čestica [148].

Poliglutaminska kiselina je hidrofilan polimer koji se sastoji od jedne amino kiseline i u zavisnosti od pH rastvarača može imati različitu sekundarnu strukturu. Naime ispod izoelektrične tačke ne pokazuje nikakvo površinsko naelektrisanje i zauzima strukturu alfa heliksa a iznad izoelektrične tačke ima neuređenu konformaciju (nasumičnog klupka) i ispoljava negativno površinsko naelektrisanje [149].

3.2.1.1.2 Ispitivanje uticaja različitih pritisaka i temperatura sušenja tokom sinteze PCL čestica na njihovu morfologiju

Još jedan parametar koji se u literaturi može naći kao uticajan na morfologiju polimernih čestica je metoda sušenja. Kako bi ispitali uticaj ovog parametra, finalne suspenzije polimernih čestica dobijene bez dodataka stabilizatora i nakon ukapavanja PVP i PGA su sušene u ambijentalnim uslovima i u vakuum sušnici pri pritisku od 1 mbar i temperaturi od 45 °C. Vreme sušenja je bilo isto za obe grupe uzorka i iznosilo 72 sata [148].

Pored ovih ispitivanja, urađena su i ispitivanja uticaja liofilizacije na seriji novih uzoraka [150]. Liofilizacija je postupak sušenja koji se često može sresti kod sinteze polimernih mikro i nanosistema, ali često zahteva upotrebu odgovarajućih protektanata, tj. suspsituenta koji će imati ulogu da zaštite prvobitnu formu sistema tokom zamrzavanja i samog procesa sublimacije. S'tim u vezi ispitan je uticaj PGA kao protektanta u poređenju sa saharozom, kojoj se u literaturi često prepisuje ovakva funkcija [151]. Inicijalno su napravljena dva uzorka dobijena ukapavanjem 5 ml 1% rastvora PGA odnosno saharoze u suspenziju čestica PCL-a, uz homogenizaciju na magnetnoj mešalici (500 rpm). Po završetku ukapavanja homogenizacija je nastavljena još jedan minut i dobijene suspenzije su presute u Petrijeve posude od aluminijuma kako bi obezbedile bolju toplotnu provodljivost. Ove posude su ostavljene u zamrzivaču narednih 15 sati na temperaturi od -15 °C kako bi se uzorci zamrzli i kako bi isparilo što više hloroforma. Ujedno na ovaj način debljina sloja polimerne suspenzije je svedena na nekoliko mm čime je obezbeđen što bolji odnos zapremine i površine uzorka. Na kraju, uzorci su prebačeni u liofilizator (Christ, alpha 1-2 LDplus, Osterode am Harz, Germany) gde su sušeni 12 sati pri temperaturi od -57 °C i pritisku od 0,37 mbar.

Nakon utvrđivanja efekta PGA i saharoze na morfologiju čestica PCL-a ispitan je i uticaj različitih koncentracija PGA, gde je procedura za pripremu polimerne suspenzije ponovljena osim što su umesto 1%-og rastvor PGA ukapavani 0,5%-ni i 0,05%-ni rastvori jednakih zapremina .

3.2.1.2 Karakterizacija sintetisanih PCL uzoraka

Kvalitativna analiza PCL čestica je urađena **FTIR** spektroskopijom na uređaju Carl Zeiss SPECORD 75. Prahovi su pripremljeni za snimanje tehnikom KBr pastile. Snimanje spektra je izvršeno u intervalu talasnih brojeva 400–4000 cm^{-1} pri spektralnoj rezoluciji od 4 cm^{-1} .

Morfologije svih sintetisanih uzoraka su ispitivane na **SEM** uređaju JEOL JSM-6390LV. Pre postavljanja na nosač, uzorci (u formi praha) su oblagani tankim slojem zlata procesom fizičke depozicije pare (PVD). U tu svrhu korišćen je Bal-Tec

SCD 005 naparivač koji koristi Ar za formiranje plazme koja dalje izaziva raspršivanje zlata i njegovu depoziciju na uzorku. Naparivanje je vršeno pri struji od 30 mA na razdaljini od 50 mm i u trajanju od 3 min.

Raspodela veličine čestica (**PSD**) dobijenih uzoraka PCL-a je izmerena metodom laserske difrakcije na uređaju Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd, UK). Prahovi sintetisani uz upotrebu različitih stabilizatora su dispergovani u etanolu u koncentraciji od ~ 0,2 mg/ml, uz pomoć ultrazvučnog kupatila snage 50 W i frekvencije 40 kHz, u trajanju od 15 min.

Zeta potencijal suspenzija PCL čestica je meren na uređaju Zetasizer - Nano ZS, ZEN3600. Za razblaženje suspenzije čestica korišćen je etanol.

3.2.1.3 Ispitivanje biokompatibilnosti sintetisanih PCL čestica

3.2.1.3.1 Ispitivanje citotoksičnosti uzoraka - MTT test

Citotoksičnost uzoraka je utvrđena uz pomoć 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid (MTT) testa po uzoru na rad *Mossman*-a uz male izmene [143]. HepG2 ćelije su kultivisane u sterilnim pločama sa 96 udubljenja (*Nunc, Naperville IL, USA*), tako da je gustina ćelija iznosila oko 40 000/ml. Ćelije su inkubirane 20 sati na temperaturi od 37 °C u atmosferi zasićenoj vodenom parom, sa 5% CO₂ kako bi se osiguralo njihovo vezivanje za dno posude. Medijum u kome su ćelije inkubirane je izvučen nakon 20 sati, ćelije su isprane fosfatnim puferom (PBS) i dodat je svež medijum, koji je sadržao različite koncentracije različitih uzoraka (varirane koncentracije: 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 i 1 % zapreminski; ispitivani uzorci: čestice PCL-a bez upotrebe stabilizatora, čestice dobijene uz dodavanje 0.05, 0.5 i 1 % PGA). Inkubacija ćelija sa različitim koncentracijama različitih uzoraka polimernih čestica je trajala 24 časa. U svaki eksperiment je uključena i negativna kontrola (ćelije koje nisu tretirane) i prazna proba (proba bez polimera sa 1%-nim PGA). Potom je dodat MTT (krajnje koncentracije od 0.5 mg/ml), i ćelije su inkubirane dodatna tri sata, nakon čega je medijum sa MTT-om uklonjen, a formirani kristali formazana su rastvoreni i pokupljeni u dimetil

sulfoksidu (DMSO). Merena je optička gustina na 570 nm (referentni filter 690 nm) korišćenjem mikrofluorimetra (*Synergy MX, Biotek, USA*). Sposobnost preživljavanja ćelija određuje se upoređujući vrednosti optičke gustine iz otvora u kome su tretiranih ćelije, sa onim u kojima su netretirane ćelije. Odrađeno je po pet ponavljanja za svaku tačku koncentracije i po tri nezavisna eksperimenta za svaki uzorak [150].

Rezultati MTT testa su prikazani kao procenat vijabilnosti ćelija i to kao srednja vrednost 3 nezavisna eksperimenta, gde je svaka koncentracija ispitana u 5 replika. Vijabilnost ćelija kontrolne grupe predstavljen je kao 100%. Radi određivanja statističke značajnosti tj. pouzdanosti (P), urađen je dvosmerni studentov T test između tretiranih i kontrolnih ćelija. Pri vrednostima $P < 0.05$ (sa 95% pouzdanosti), rezultati su smatrani statistički značajnim.

3.2.1.3.2 DCF-DA test za određivanje nastanka reaktivnih vrsta kiseonika (ROS)

Obrazovanje intracelularnih reaktivnih vrsta kiseonika mereno je spektrofotometrijski, korišćenjem fluorescentne probe, 2'-7'-dihlorodihidrofluorescein diacetata (DCFH-DA) kao što je to prvi opisao *Osseni* sa svojim kolegama uz male izmene [152,153]. HepG2 ćelije, su zasađene u sterilnu posudu sa 96 otvora, pri gustini od 75 000/ml (*Nunc, Naperville IL, USA*) u pet replika za svaki uzorak. Nakon 20-časovne inkubacije na 37°C u atmosferi zasićenoj vodenom parom, sa 5% CO₂ dodato je po 20 µM DCFH-DA i ćelije su ostavljene još 30 min. Nakon toga medijum je uklonjen, ćelije isprane PBS-om kako bi se uklonio sav DCFH-DA i tretirane različitim koncentracijama čestica od svakog pojedinačnog uzorka. Kao i u ispitivanju citotoksičnosti korišćene su koncentracije: 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 i 1 % (zapreminski), a ispitivani su uzorci: čestice PCL-a bez upotrebe stabilizatora, čestice dobijene uz dodavanje 0.05, 0.5 i 1 % PGA. U svakom eksperimentu, uključena je negativna kontrola (netretirane ćelije), prazna proba (sa 1%-nim rastvorom PGA) i pozitivna kontrola (0.5 mM t-BOOH). Radi kinetičkih ispitivanja, sudovi su održavani na 37°C i intenzitet fluorescencije je

meren na svakih 30 min tokom 5 sati inkubacije, korišćenjem spektrofluorimetra (Tecan, Genios, Austrija) pri talasnoj dužini ekscitacije na 485 nm i emisije na 530 nm [150].

Za svaki uzorak su rađena tri nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost između tretirane grupe i kontrole, određena je dvosmernim studentovim T testom, korišćenjem analize promenljivih ANOVA testom. Granična vrednost pouzdanosti ispod koje se smatra da se rezultati statistički ne razlikuju je 0,05.

3.2.1.3.3 Određivanje genotoksičnosti sintetisanih uzoraka Komet testom

Za ispitivanje genotoksičnosti HepG2 ćelije su zasađene sa gustom od 80 000/ml u sterilne posude sa 12 mesta (*Corning Costar Corporation, Corning, NewYork, USA*). Nakon 20-časovne inkubacije na 37°C u atmosferi zasićenoj vodenom parom, sa 5% CO₂ dodat je svež medijum koji je sadržao odgovarajuće koncentracije (0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 i 1 %) svakog pojedinačnog uzorka (čestice PCL-a bez upotrebe stabilizatora, čestice dobijene uz dodavanje 0.05, 0.5 i 1 % PGA). U svaki eksperiment je uključena negativna kontrola (ćelije koje nisu tretirane) prazna proba (proba bez polimera sa 1%-nim PGA) i pozitivna kontrola korišćen rastvor benzo[a]piren-a (BaP), koncentracije 30 µM. Nakon završetka inkubacije ćelije su pokupljene i ispitano je oštećenje DNK lanaca po protokolu koji je prvi opisao *Singh* sa saradnicima uz male izmene [154]. 50 slika ćelijskih nukleusa je nasumično odabrano i analizirano uz pomoc softvera za analizu slike "Comet Assay IV" (*Perceptive Instruments, UK*). Po tri nezavisna eksperimenta je urađeno za svaki uzorak. Nivo oštećenja DNK lanca je meren na osnovu procenta DNK koji su formirali rep tokom migracije. Za potvrdu ponovljivosti između eksperimentalnih uslova korišćena je analiza promenljivih ANOVA, a za upoređivanje srednje vrednosti procenta DNK repa korišćen je Dunetsov test (Dunnett's) gde su rezultati sa vrednošću $P < 0.05$ smatrani statistički pouzdanim [150].

3.2.2 Sinteza i karakterizacija nanočestica selena SeNp

3.2.2.1 Sinteza SeNp

Nanočestice selena su sintetisane hemijskom redukcijom natrijum selenita (Na_2SeO_3) uz upotrebu askorbinske kiseline (Vitamin C - $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) kao redukcionnog sredstva. Sinteze nanočestica hemijskom redukcijom se smatraju brzim i jednostavnim metodama koje se generalno sastoje iz dva dela. Prvi je prevođenje elementa iz prekursora u kome se nalazi u višem oksidacionom stanju (X^{y+}) u elemenatno stanje (X^0) upotrebom odgovarajućeg redukcionog sredstva. Drugi deo je ograničavanje aglomeracije u strukture nanometarskih dimenzija. Ovaj deo se obično postiže upotrebom odgovarajućeg stabilizatora. Da bi se na kraju sinteze dobila stabilna suspenzija ili koloidni rastvor nanočestica u odgovarajućem medijumu potrebno je utvrditi uticaj svih reakcionih parametara poput odnosa molova reaktanata, pH vrednosti, temperature, vrste i koncentracije stabilizatora itd. U našem radu najpre je ispitan uticaj različite vrste i koncentracije stabilizatora: goveđeg serum albumin (BSA) i poliglutaminske kiseline (PGA), a potom i uticaj molskog odnosa askorbinske kiseline i natrijum selenita.

Natrijum selenit Na_2SeO_3 i goveđi serum albumin (BSA) molarne mase $M_w=66$ kDa su nabavljeni od proizvođača *Sigma Aldrich Chemie GmbH* (Nemačka) dok je askorbinska kiselina (Vitamin C - $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) kupljena od proizvođača *VWR Prolabo* (Belgija).

3.2.2.2 Uticaj različitih vrsta stabilizatora na sintezu SeNp

Za stabilizaciju nanočestica selena korišćena su dva tipa stabilizatora, globularni BSA i linearni PGA. Rastvori stabilizatora su dodavani u rastvor askorbinske kiseline paralelno sa dodavanjem prekursora tj. Na_2SeO_3 . Najpre su pripremljeni vodeni reakcioni rastvori prekursora Na_2SeO_3 i redukcionog sredstva $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ u koncentracijama 0.02M i 0.1M respektivno. Za svaki eksperiment korišćena je ista koncentracija i zapremina (12.5 i 10 ml) prekursora i redukcionog sredstva. Kako bi utvrdili uticaj različite koncentracije spomenutih stabilizatora na

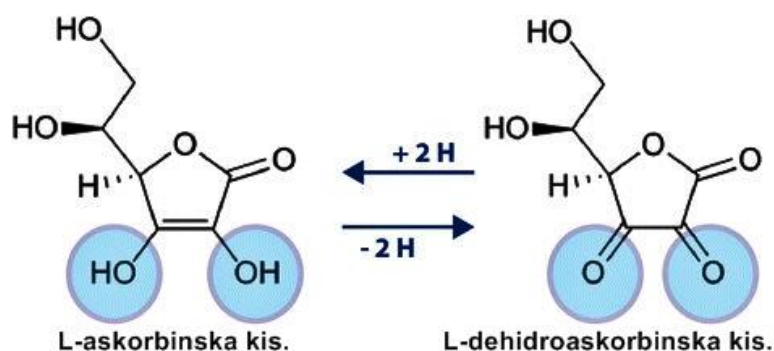
morfološke karakteristike nanočestica selena korišćene su dve masene koncentracije: (i) mala koncentracija (masena koncentracija 0,16 %) - gde je maseni odnos stabilizatora i prekursora 1:1, (ii) velika koncentracija (0,36 %) - maseni odnos stabilizatora i prekursora je iznosio 2,25:1.

Radi odgovarajućeg poređenja pripremljen je i uzorak bez upotrebe stabilizatora dodavanjem iste količine prekursora u redukcionu rastvor. Kod svih uzoraka, reakciona čaša u kojoj dolazi do redukcije je obmotana aluminijskom folijom kako bi sprečila interakciju nanočestica selena i vitamina C sa svetlom. Takođe, celokupna sinteza je vršeno uz homogenizaciju na magnetenoj mešalici u ukupnom trajanju od 30 min pri brzini mešanja od 1000 rpm.

BSA je protein sa samo jednim polipeptidnim lancem koji se sastoji od 583 aminokiselina i ima globularnu makrokonformaciju. Lako se rastvara u vodi pri čemu zauzima sferoidni oblik dimenzija 4 nm x 4 nm x 14 nm [155]. Izoelektrična tačka ovog proteina je oko 4,7 pri standardnim uslovima, što znači da u sredinama u kojima je pH ispod ove vrednosti poseduje pozitivno površinsko naelektrisanje.

3.2.2.3 Uticaj molskih odnosa redukcionog sredstva i prekursora na sintezu SeNp

Askorbinska kiselina je poznata kao redukciono sredstvo pri čemu se njena oksidacija odvija po sledećem mehanizmu:



Slika 3.2.2.3.1. Šematski prikaz oksidacije askorbinske kiseline

Standardni elektrodni potencijal ove polureakcije na pH7 je +0.06 V [156]. Sa druge strane polureakcija redukcije selenita do elementarnog selena se odvija po sledećem mehanizmu:



a vrednost standardnog elektrodnog potencijala za ovu polureakciju je +0.74V.

Kao što se vidi iz navedenih polureakcija razlika u elektrodnim potencijalima je dovoljno velika da bi došlo do spontane redukcije selenitnih jona tj. oksidacije askorbinske kiseline. Stehiometrijski gledano za redukciju 1 mola Na_2SeO_3 bi bila potrebna 2 mola askorbinske kiseline. Međutim, postizanje ravnoteže kod oksidacije askorbinske kiseline je uslovljeno faktorima poput pH, temperature i jonske jačina rastvora, tako da je precizno izračunavanje stehiometrijskog odnosa spomenutih reaktanata dosta komplikovanije. Inače se u sintezama hemjskom redukcijom redukciono sredstvo najčešće dodaje u višku. U ovom radu ispitan je uticaj dva različita molska odnosa askorbinske kiseline i natrijum selenita: 4:1 i 5:1.

3.2.2.4 Karakterizacija SeNp

3.2.2.4.1 Ispitivanje morfologije i zeta potencijala

Kako bi se pronašli optimalni parametri za sintezu amorfnih nanočestica Se svi uzorci su okarakterisani metodama elektronske mikroskopije. Za potrebe SEM analize korišćeni su liofilizirani uzorci SeNp koji su pre snimanja naparavani ugljenikom. Snimanja su urađena na FE-SEM uređaju Supra 35 VP - Carl Zeiss. TEM i HR-TEM mikrografije su napravljene sa dobijenim koloidnim rastvorima/suspencijama na uređaju JEOL JEM-2100. TEM uređaj je bio opremljen detektorom za EDS analizu, a pored mikrografija zabeleženi su i difrakcioni obrasci korišćenjem SAED tehnike.

Zeta potencijal koloidnih rastvora SeNp je snimljen bez pripreme uzorka i bez razblaživanja rastvora.

3.2.2.4.2 Ispitivanje kristalnog stanja

Selen je poznat po tome da postoji u više alotropskih modifikacija pa su dobijeni liofilizirani uzorci SeNp, sintetisani pri različitim uslovima, snimljeni na difraktometru u intervalu uglova 2θ od $10-80^\circ$, sa rezolucijom skeniranja od $0,05^\circ$ i brzinom skeniranja 2s po koraku. Da bi lakše identifikovali difrakcione pikove snimljeni su i difraktogrami prahova PGA i BSA koji su korišćeni u sintezi SeNp.

3.2.2.4.3 Kvalitativna karakterizacija SeNp

Kvalitativna karakterizacija SeNp je urađena FTIR spektroskopijom i mikroramanskom spektroskopijom. U prvom slučaju snimanja su vršena na spektrometru **MIDAC M 2000** uz pomoć tehnike KBr pastille i u tu svrhu je korišćen liofiliziran prah SeNp. Spektri su dobijeni u intervalu talasnih brojeva $400-4000\text{ cm}^{-1}$, na sobnoj temperaturi.

Ramanski spektri su snimljeni na **DXR** Ramanskom mikroskopu proizvođača **Thermo Scientific**, koji je opremljen gasnim laserom (HeNe). Detekcija rasejanog zračenja je izvršena spektrografom sa rešetkom od 600 linija/mm i aperturom proreza $50\text{ }\mu\text{m}$. Uzorak SeNp u formi koloidnog rastvora je nanešen na nosač i kroz njega je propušten upadni snop laserskog zračenja talasne dužine 633 nm. Snimanja su vršena pri sledećim uslovima:

- vreme ekspozicije uzorka – 60 s
- broj skenova uzorka – 10
- jačina lasera - 8 mW

Korekcija na fluorescenciju je vršena uz pomoć OMNIC softverskog paketa, obradom signala polinomom 5-og reda.

3.2.2.4.4 Termalna analiza SeNp

Termalna analiza SeNp je urađena na uređaju za simultanu termogravimetrijsku i diferencijalnu termijsku analizu /diferencijalnu skanirajuću kalorimetriju **SETSYS Evolution TGA-DTA/DSC (SETARAM, France)**. Mala količina praha SeNp je smeštena u posudu od alumine zapremine 120 μl i podvrgnuta temperaturskom režimu zagrevanja od 40-1000 $^{\circ}\text{C}$, sa brzinom zagrevanja od 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Zagrevanje je vršeno u atmosferi sintetičkog vazduha.

3.2.2.4.5 Kvantitativno određivanje Se u koloidnom rastvoru SeNp

Eksperimenti određivanja koncentracije Se su vršeni na uređaju **Thermo Scientific iCap 6500 Duo** pri čemu je korišćena ulazna snaga radiofrekventnog generatora od 1150 W proizvodeći visokofrekventnu struju frekvencije 27 MHz. Argon je korišćen pri protocima od 12L/min kao spoljni gas, 0.5 L/min kao intermedijerni gas i od 0.4 L/min kao noseći gas. Unošenje uzoraka u nebulizer je kontrolisano peristaltičkom pumpom sa protokom od 1.2 ml/min. Intenzitet emisije zračenja uzorka je meren na talasnoj dužini $\lambda = 196.26 \text{ nm}$. Uzorci koloidnog rastvora Se su korišćeni bez dodatne pripreme osim filtriranja kroz **Millipore** filter veličine pora od 450 nm. Za dobijanje kalibracione krive korišćen je standardni rastvor **MES-21-1 (AccuStandrad, USA)** u sledećim koncentracijama: 10 ppb, 20 ppb, 50 ppb, 100 ppb, 0,2 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm and 2 ppm. Uz svaki set uzoraka korišćena je bar po jedna prazna proba koja je sadržala istu količinu kiseline i oksidansa. Dobijena kalibraciona kriva je imala sledeće parametre:

- korelacioni koeficijent $R = 0.9991$,
- jednačina linearnosti $y = 8.11 + 931.45x$,
- granica detekcije $\text{LOD} = 0,0017 \text{ mg/l}$.

3.2.2.4.6 Antibakterijska aktivnost SeNp

Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) SeNp korišćena je Bujon-mikrodiluciona metoda prema standardu za klinička i laboratorijska ispitivanja (CLSI 2017) [157]. Ispitivanja su rađena na 6 sojeva bakterija. Od Gram-pozitivnih korišćene su *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 1228), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), dok su od Gram-negativnih korišćene *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Escherichia coli* (ATCC 25922) i *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Bakterijske kulture uzgajane preko noći na hranljivoj podlozi Müller-Hinton bujon, su prebačene u mikrotitarske ploče sa 96 bazena, pri čemu je broj bakterija po bazenu podešen na 2×10^6 CFU/ml. Nakon toga je napravljena serija duplih razređenja koloidnog rastvora SeNp u 1% rastvoru dimetil sulfoksida DMSO u rasponu od 1000-12,5 µg/ml. Mikrotitarske ploče su zatim inkubirane 24h na 37°C. Svi testovi su vršeni u duplikatu a korišćene su dve pozitivne kontrole rasta koje su sadržale samo bakterije u hranljivoj podlozi [119]. Mikrobni rast je određivan dodavanjem po 20 µl 0,5% vodenog rasvora TTC (2,3,5-trifenil tetrazolijum hlorida) u svakom udubljenju. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) se definiše kao koncentracija SeNp pri kojoj mikroorganizmi ne pokazuju vidljivi rast (nema ružičastog obojenja).

3.2.2.4.7 Antikancerogena aktivnost koloidnog rastvora SeNp

Antikancerogena aktivnost koloidnog rastvora SeNp je ispitan na HeLa ćelijama. HeLa ćelije koje su nabavljene iz Evropske kolekcije autentičnih ćelijskih kultura (ECACC su kultivisane medijumu DMEM u koji je kao supplement dodat 2mM L-glutamin, 1% penicilin-streptomycin I 10 % fetalni goveđi serum. Kultivacije je izvršena na 37 °C u atmosferi sa 5% CO₂. MTT test je vršen po standardnom protokolu opisanom u eksperimentalnom delu ispitivanja biokompatibilnosti PCL čestica. HeLa ćelije su inkubirane sa 4 koncentracije koloidnog rastvora SeNp (0.5, 1, 2.5, 3.75 I 7.5%) a njihova vijabilnost je merena posle 24, 48 I 72 h.

3.2.3 Sinteza biokompozita PCL mikrosfera sa inkorporiranim nanočesticama selena - PCL/SeNp

Inkapsulacija* ili inkorporiranje aktivnih komponenti u polimerne čestice je jako bitan segment u sintezi sistema za kontrolisano otpuštanje. Naime od izbora tehnike sinteze zavisi na koji način i u kojoj meri će aktivna komponenta biti inkorporirana unutar nosećih čestica. Zato prilikom odabira tehnike sinteze najpre treba uzeti u obzir svojstva i nosača i aktivne komponente poput hidrofilnosti/hidrofobnosti, rastvorljivosti u odgovarajućim medijumima kao i mogućnost interakcije između nosača i aktivne komponente.

3.2.3.1 Ispitivanje uticaja različitih sistema rastvarač/nerastvarač na efikasnost metode sinteze

Kako je cilj ovog rada bio da se nanočestice selena koje su dobijene u formi koloidnog vodenog rastvora inkorporiraju u jako hidrofoban polimer PCL korišćena su dva sistema rastvarača/nerastvarač:

1. hloroform/etanol
2. aceton/etanol

U prvom slučaju sinteza je rađena po proceduri poput one opisane u poglavlju za sintezu PCL mikrosfera. 300 mg PCL granula je rastvoreno u 10 ml hloroforma. Nakon toga, 0,5 ml koloidnog rastvora SeNp je dodato kap po kap u polimerni rastvor uz upotrebu homogenizatora visoke energije (IKA ultraturex). Homogenizacija je vršena 5 min pri obrtnom momentu od 21 000 rpm. Kako je razlika u polarnosti ova dva sistema velika, upotreba visokoenergetskog homogenizatora zapravo omogućuje formiranje emulzije u kojoj su sitne kapljice sa nanočesticama Se okružene polimernim lancima rastvorenim u hloroformu. Takođe, korišćena je nešto veća zapremina hloroforma u odnosu na sintezu PCL

* Inkapsulacija je termin koji se češće sreće u literaturi mada se po definiciji odnosi na sistem kapsula, gde je aktivna komponenta okružena omotačem od odgovarajućeg polimera.

sfera bez selena (odjeljak 3.2.1.1) jer se sa povećanjem razlike u zapremini hloroforma i vode postiže stabilnija emulzija. Odmah po završetku homogenizacije smeša polimera i SeNp je presuta (niz zid čaše) u 40 ml etanola uz paralelno ukapavanje 5 ml rastvora PGA koncentracije 0,05%. Kao što je to ranije rečeno, u ovom koraku dolazi do momentalne precipitacije polimera pri čemu polimerni lanci "zarobljavaju" nanočestice Se iz svog okruženja. Sa ukapavanjem stabilizatora vršena je i homogenizacija na magnetnoj mešalici u trajanju od 20 min (800 rpm). Nakon toga dobijena suspenzija je presuta u Petrijevu šolju i ostavljena da se suši na sobnoj temperaturi naredna dva dana. Dobijen prah je bledo narandžaste boje.

Kod drugog sistema najpre je 300 mg polimera rastvarano u 30 ml acetona. U tu svrhu, poklopljena čaša sa acetonom i PCL-om je smeštena na magnetnu mešalicu uz blagu homogenizaciju (300 rpm) i zagrevanje na 50 °C u trajanju od jednog sata. Nakon toga polimerni rastvor je ostavljen da se ohladi do sobne temperature. U ohlađeni polimerni rastvor je potom ukapavano 0,5 ml koloidnog rastvora SeNp uz homogenizaciju na 21000 rpm u trajanju od 5 min. Zbog bolje mešljivosti acetona i vode ne dolazi do formiranja emulzije već bistre homogene smeše. Ova smeša je zatim presuta u čašu sa etanolom (75 ml) uz dodavanja 10 ml rastvora PGA masene koncentracije 0,05%. Finalna suspenzija PCL čestica sa inkorporiranim nanočesticama Se je najpre homogenizovana 20 min pri 800 rpm, presuta u Petrijevu šolju i ostavljena da se suši naredna dva dana. Dobijeni prah je bledoružičaste boje.

Kako bi izvršili detaljnu karakterizaciju dobijenih čestica PCL/SeNp pripremljen je i uzorak prazne probe kod koga je ponovljen postupak sinteze samo je izostavljen korak dodavanja koloidnog rastvora SeNp. Ovaj uzorak će se u daljem tekstu nazivati kao prazne PCL mikrosfere.

Sledeći korak u definisanju uspešnosti metode sinteze sistema za kontrolisano otpuštanje aktivne komponente je određivanje efikasnosti njenog inkorporiranja unutar nosača. Ovaj parametar je utvrđen na osnovu sledeće jednačine:

$$EI\% = \frac{W_e}{W_t} \cdot 100 \quad (3)$$

gde je W_e količina inkorporiranog Se određena eksperimentalno metodom ICP-AES, dok je W_t količina Se koja je teorijski izračunata na osnovu podatka koncentracije Se u koloidnom rastvoru (takođe određene metodom ICP-AES) i mase PCL-a korišćenog u sintezi.

3.2.3.2 Karakterizacija dobijenih čestica biokompozita PCL/SeNp

3.2.3.2.1 Ispitivanje morfologije i raspodele veličine čestica

Ispitivanje morfologije prahova PCL/SeNp i praznih PCL mikrosfera je urađeno skenirajućom elektronskom mikroskopijom na uređaju JEOL JSM-6390LV i transmisionom elektronskom mikroskopijom na mikroskopu Jeol 2100. Priprema uzorka za SEM analizu je opisana u delu koji se odnosi na ispitivanja PCL čestica. Za potrebe TEM analize PCL/SeNp uzorak je suspendovan u etanolu i nakapan na nosač koji se sastoji od bakarne mreže i tankog karbonskog filma (300-mesh).

Za potrebe određivanja raspodele veličine čestica u uzorcima PCL/SeNp, dobijeni prahovi su dispergovani u etanolu u koncentraciji od $\sim 0,2$ mg/ml, uz pomoć ultrazvučnog kupatila (40 kHz; 50 W; 15 min) i snimani na uređaju Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd, UK).

3.2.3.2.2 Ispitivanje interakcije SeNp i PCL-a

Moguća interakcija između SeNp i polimernih lanaca PCL-a je ispitivana IC spektroskopijom sa Furijeovom transformacijom. Spektri su snimljeni na laboratorijskom spektrometru MIDAC M 2000. Uzorci u formi praha (PCL/SeNp i prazne PCL mikrosfere) su pripremljeni tehnikom KBr pastile za snimanje u intervalu talasnih brojeva $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$, na sobnoj temperaturi.

3.2.3.2.3 Ispitivanje kristalne strukture biokompozita PCL/SeNp

Kristalna struktura dobijenog praha PCL/SeNp je najpre ispitivana metodom difrakcije X-zraka – XRD. Snimanje uzoraka je izvršeno u intervalu uglova 2θ od $15-60^\circ$, sa rezolucijom skeniranja od $0,05^\circ$ i brzinom skeniranja 2s po koraku. I ovde su poređenja radi, snimljeni difraktogrami dobijenog praha PCL/SeNp i praha praznih PCL mikrosfera. Kako bi ispitali promenu kristalne strukture polimera sa vremenom degradacije vršeno je određivanje veličine kristalita na osnovu varijacije Šererove (Scherrer) jednačine:

$$D = \frac{0,9\lambda}{b \cos \theta} \quad (4)$$

gde je D izračunata veličina kristalita, b je širina izabranog difrakcionog pika izmerena na polovini njegove visine i izražena u radijanima, λ je talasna dužina emitovanih X zraka i iznosi $1,5406 \text{ \AA}$ a θ je upadni ugao zračenja. Konstanta 0,9 se naziva još faktor oblika i njegova vrednost zavisi od morfologije kristalita. Pre izračunavanja veličine kristalita svi difraktogrami su normalizovani.

3.2.3.2.4 Kalorimetrijska ispitivanja i utvrđivanje stepena kristaliničnosti bikompozita PCL/SeNp

Kalorimetrijska ispitivanja su vršena iz dva razloga. Prvi je bio da se uporede entalpije i temperature topljenja PCL-a pre i nakon inkorporiranja SeNp, dok je drugi povod bio ispitivanje uticaja procesa degradacije u različitim medijumima na kristaliničnost polimera. Snimanje je vršeno na DSC uređaju **131 EVO**, francuske kompanije **SETARAM**. Uređaj je opremljen i kontrolisan preko softvera **CALISTO**. Precizno izmerene mase uzoraka u formi praha su smeštani u aluminijumske posudice zapremine $30 \mu\text{l}$ koje su potom hermetički zatvarane. Prazna posuda je korišćena kao referentna. Svi uzorci su bili podvrgnuti identičnom temperaturskom režimu koji se sastojao od startne zone i zone zagrevanja. U startnoj zoni uzorci su sporo zagrevani ($1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$) do temperature $30 \text{ }^\circ\text{C}$ na kojoj su termostatirani narednih 5 min. Nakon toga je usledilo zagrevanje

do 100 °C, sa brzinom zagrevanja od 5 °C/min. Za vreme trajanja eksperimenata, ćelija za uzorke je bila okružena inertnom atmosferom azota. Stepem kristaliničnosti uzoraka W_c je dobijen iz sledeće jednačine:

$$W_c = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f^0} \times 100 \quad (5)$$

gde je ΔH_f entalpija topljenja ispitivanih uzoraka a ΔH_f^0 entalpija topljenja 100% kristalnog PCL-a. Literaturni podatak za ovu vrednost je 139.5 J/g [158]. Entalpije topljenja svih uzoraka su računane uz pomoć softvera Calisto, a za baznu linija korišćen je tip sigmoidalne bazne linije.

3.2.3.2.5 Degradacija PCL/SeNp biokompozita i profil otpuštanja SeNp

Degradacija čestica PCL/SeNp kao i otpuštanje nanočestica Se iz polimernog matriksa su ispitivani u različitim degradacionim medijumima. Eksperimenti su vršeni u paralelnim probama tako što je po 15 mg praha PCL/SeNp suspendovano u 7.5 ml odgovarajućeg medijuma. Svi uzorci su temostatirani u vodenom kupatilu na temperaturi od 37 °C. Medijumi su birani tako da simuliraju odgovarajuće fiziološke uslove:

- ◆ Pufer fosfatnih soli (PBS) sa vrednošću pH=7.4,
- ◆ Rastvor lipaze izolovane iz pankreasa svinje u PBS-u (tip II sa sadržajem proteina preko 20%). Prema podacima proizvođača aktivnost enzima je 30-90 U/mg korišćenjem triacetina kao substrata. Koncentracija lipaze u svakom uzorku je bila 0.4 mg/ml.
- ◆ 0.1 M hlorovodonična kiselina HCL (pH=1).

U prva dva medijuma, u svakom uzorku je dodato po 1 mg natrijum azid NaN_3 , kako bi sprečio rast mikroorganizama. Prvi medijum se najčešće koristi u ispitivanju degradacije sistema za kontrolisanu dostavu i otpuštanja aktivnih komponenti. Njegov zadatak je da simulira uslove u ekstracelularnom matriksu. Naredna dva medijuma predstavljaju specifično okruženje u kome se mogu naći

sistemi za kontrolisanu dostavu, pogotovo oni koji se unose *per os*. Prvi među njima sadrži enzim iz grupe esteraza čiji je glavni zadatak da kataliziraju hidrolizu masti. Lipaze se u našim organizmima mogu naći kako u ekstracelularnom prostoru poput one koje luče pankreas i pljuvačne žlezde a čiji je glavni zadatak da učestvuju u procesu digestije, tako i unutar ćelija u okviru odgovarajućih organela lizozoma. Što se tiče poslednjeg medijuma, sa jedne strane bi trebalo da simulira uslove sredine kao što je želudačna kiselina (glavni sastojak ove kiseline je HCL) a sa druge da ukaže na uticaj ovako niskog pH na sam proces razgradnje.

U svakom medijumu je suspendovano po 7 uzoraka PCL/SeNp koji su u određenim vremenskim intervalima (posle 7, 14, 21, 36, 50, 108 i 660 dana) izvađeni radi dalje karakterizacije. Najpre je vršeno odvajanje taloga od supernatanta i to centrifugiranjem u trajanju od 10 min na 7000 rpm, nakon čega je vršeno dekantovanje. Dobijeni talog je potom ispran nekoliko puta destilovanom vodom kako bi se uklonili ostaci medijuma, filtriran na kvalitativnom filter papiru i osušen na sobnoj temperaturi, u zamračenoj sredini u trajanju od 2 dana. Svi uzorci su čuvani u zamrzivaču do daljih karakterizacija.

Rastvor fosfatnih soli (PBS) je napravljen tako što je u 800 ml destilovane vode rastvoreno 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44g Na₂HPO₄, i 0,24g KH₂PO₄. Nakon rastvaranja ovih soli pH rastvora se podesi na 7,4 dodavanjem HCl. Na kraju se zapremina podesi na 1L dodavanjem destilovane vode [159]. Lipaza tip II, izolovana iz pankreasa svinje, je nabavljena od *Sigma Aldrich Chemie GmbH* (Nemačka).

3.2.3.2.6 Kvantitativno određivanje Se u uzorcima PCL/SeNp

Eksperimenti određivanja koncentracije Se otpuštenog tokom degradacije u različitim medijumima i vremenskim intervalima su urađeni na isti način kao i kod ispitivanja koncentracije koloidnog rastvora Se (poglavlje 3.2.2.4.5). Sa druge strane uzorci PCL/SeNp u formi praha su pripremani mikrotalasnom digestijom. U tu svrhu korišćen je mikrotalasni digester **CEM MDS-2100**. Precizno odmereni

uzorci ($\pm 0.0001\text{g}$) su smešteni u zatvorene posude-tube otporne na visoke pritiske gde su najpre podvrgnuti razgradnji pomoću 65% HNO_3 (7ml) i 30% H_2O_2 (2 ml). Nakon 10-o minutnog tretmana digestija je nastavljena u mikortalasnom reaktoru po programu koji je opisan u radu [160]. Period od 10 min je uveden kako bi se izbegli prvi produkti agresivne razgradnje. Proces digestije se prati preko pritiska. U zavisnosti od broja tuba koristi se snaga od 400W (za 4) do 1600W (za 12). Kada se pokrene digestija pritisak se podiže do 40 PSI 20 minuta, a zatim se drži na 40 PSI 5 minuta, nakon toga je digestija gotova i proces hlađenja traje 5 minuta. Kada se dobijena suspenzija ohladi profiltrira se kroz **Millipore** filter sa veličinom pora od 450 nm. Profiltrirana suspenzija se na kraju kvantitativno prenosi u normalni sud od 25 ml i dopunjuje ultračistom vodom (**Milli-Q**, otpornost 18 $\text{M}\Omega$). Radni rastvori uzorka su dobijeni razblaživanjem sa 2.5% HNO_3 .

3.2.3.2.7 Ispitivanje uticaja bakterijskog soja *Pseudomonas aeruginosa* na degradaciju čestica PCL/SeNp

Pseudomonas aeruginosa je Gram-negativna bakterija koja često izaziva infekcije posebno kod osoba sa oštećenom funkcijom imunog sistema. Od ranije je u literaturi poznato da lipaze izolovane iz nekoliko bakterijskih sojeva imaju sposobnost da znatno ubrzavaju razgradnju PCL-a kao i drugih alifatičnih poliestara [76,161–163]. Ovaj pristup se često koristi kod dugorazgradivih polimera kako bi se eksperimenti otpuštanja aktivnih komponenti sveli na mnogo prihvatljiviji vremenski period. Generalno gledano bakterijske ćelije su bogate digestivnim enzimima kojima razgrađuju okolnu materiju. Iz ovog razloga, u ovom radu je ispitan uticaj ćelijskog sadržaja ovog bakterijskog soja na degradaciju PCL-a, a samim tim i na otpuštanje Se iz polimernog matriksa. Na ovaj način je planirano da se u isto vreme (u izvesnoj meri) simuliraju uslovi bakterijskog okruženja i ubrza proces degradacije polimera kako bi se dobio profil otpuštanja u kratkom vremenskom intervalu.

Pseudomonas aeruginosa PA01 (ATCC 15692) su kultivisane u medijumu mineralnih soli (MMS) koji je smeša soli u sledećim koncentracijama : 9.0 g/l

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 1.5 g/l KH_2PO_4 , 0.2 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.002 g/l CaCl_2 , 1.0 g/l NH_4Cl . U 1 ml ovog medijuma je dodata smeša kazamino kiselina* i glukoze (0.7+0.2 masenih %) ili maslinovog ulja (1%) da služe kao izvor ugljenih hidrata. Sadrži sve esencijalne amino kiseline sem triptofana i standardni je dodatak medijuma za kultivaciju mikroorganizma.) Bakterijska kultura je inkubirana 48 h na 30 °C uz mešenje od 180 rpm. Nakon inkubacije bakterijska kultura je centrifugirana 10 min pri 5000 rpm (**GS-3 rotor, Sorvall Centrifuge, DuPont Instruments, Delaware, USA**). Dobijen bakterijski sediment je dalje procesuiran kako bi se dobio ćelijski ekstrakt. To je postignuto upotrebom *BugBuster* reagensa za ekstrakciju proteina po protokolu proizvođača - *Novagen (Wisconsin, USA)*. Ukupna koncentracija proteina u ekstraktu je određena po *Bradford*-ovoj metodi koristeći reagens CBB G-250 [164]. Izolovani ćelijski ekstrakt je potom korišćen u dva tipa eksperimenta. Najpre je ispitan degradacioni potencijal na čvrstoj hranljivoj podlozi od agara a potom su urađena ispitivanja u vodenoj sredini tj. rastvoru fosfatnog pufera. U prvom slučaju ispitivanja su vršena na komercijalnim granulama PCL-a a u drugom slučaju su eksperimenti rađeni na sintetičanim česticama PCL/SeNp.

3.2.3.2.7.1 Degradacioni potencijal ćelijskog ekstrakta izolovanog iz *P. aeruginosa* prema komercijalnim granulama PCL-a

Eksperimenti na čvrstoj hranljivoj podlozi su najpre urađeni kako bi potvrdili da se ekstrakt izolovan iz bakterijskog soja *P. aeruginosa* može koristiti kao medijum za ubrzanu degradaciju PCL-a. 100 mg komercijalnih granula PCL-a je najpre rastvoreno u 2 ml dihlormetana. Potom je dodata voda do ukupne zapremine od 20 ml i ova smeša je tretirana sonohemijski u trajanju od 1 min (5 pulseva sa frekvencijom polja od 60 Hz) kako bi se dobila stabilna suspenzija [165]. Nakon toga je suspenzija zagrevana do 65 °C kako bi ispario sav organski rastvarač i pomešana sa agarom koji je ranije pripremljen u 200 mM Tris-HCl

* kazamino kiseline predstavljaju smesu amino kiselina i nekih manjih peptida dobijenih hidrolizom kazeina

puferu (pH 8.5). Koncentracija agara je podešena na 1% (g/ml). Suspenzija je na kraju izlivena u Petrijevu šolju i ostavljena da očvršne na ambijentalnoj temperaturi. Nakon očvršćavanja, izvučena su 2 cilindra prečnika 3cm na čije je mesto ubačen ćelijski ekstrakt. U jednom je ubačen ćelijski ekstrakt dobijen iz bakterija kultivisanim uz upotrebu glukoze a u drugom ekstrakt dobijen upotrebom maslinovog ulja kao izvor ugljenika. Nakon jednodnevnog inkubiranja na 30°C, ponovljen je postupak i inkubacija nastavljena dodatna 3 dana.

3.2.3.2.7.2 Degradacija PCL/SeNp u ćelijskom ekstraktu izolovanom iz *P. aeruginosa* i suspendovanom u puferu fosfatnih soli

Za ispitivanje ubrzane degradacije PCL mikrosfera kao i otpuštanja SeNPs iz istih, odmereno je 85 mg PCL/SeNp u formi praha i suspendovano u 8 ml smese PBS-a i ćelijskog ekstrakta izolovanog iz *P. aeruginosa* koncentracije 20 mM. Eksperimenti su trajali tri nedelje uz termostatiranje uzorka na 37 °C u vodenom kupatilu. U tačno određenim vremenskim intervalima je dodavano po 2 ml ćelijskog ekstrakta sa sadržajem ukupnih proteina 1.8-2 mg/ml. Prvo dodavanje je izvršeno nakon 24 h a naredna dva na početku druge i treće nedelje. Pre svakog dodavanja ćelijskog ekstrakta najpre je izvučen po 1ml alikvota iz reakcione bočice i centrifugiran 5 min pri 13000 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5417C, Hamburg, Germany*). Talog i supernatant su odvojeni dekantovanjem i skladišteni u zamrzivaču na -20 ° do njihove karakterizacije. Deo uzoraka koji je odvojen u formi taloga je podvrgnut DSC analizi, dok je supernatant iskorišćen za kvantitativno određivanje koncentracije otpuštenog selena, uz pomoć tehnike ICP-AES.

3.2.3.2.8 Ispitivanje biokompatibilnosti biokompozita PCL/SeNp

Ispitivanje biokompatibilnosti sintetisanih čestica PCL/SeNp je izvršena na identičan način kao što je to bio slučaj sa česticama PCL-a, primenom tri različite metode. Prva je ispitivanje citotoksičnosti MTT testom, druga je utvrđivanje indukcije nastanka reaktivnih vrsta kiseonika DCF-DA testom i treća je ispitivanje

genotoksičnosti komet testom. Kako je u poglavlju 3.2.1.3 dat detaljan opis ovih eksperimenata, oni neće biti ponavljani u ovom delu.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 Sinteza i karakterizacija sfernih čestica poli(ϵ -kapolaktona)

4.1.1 Ispitivanje interakcije između različitih vrsta stabilizatora i PCL-a.

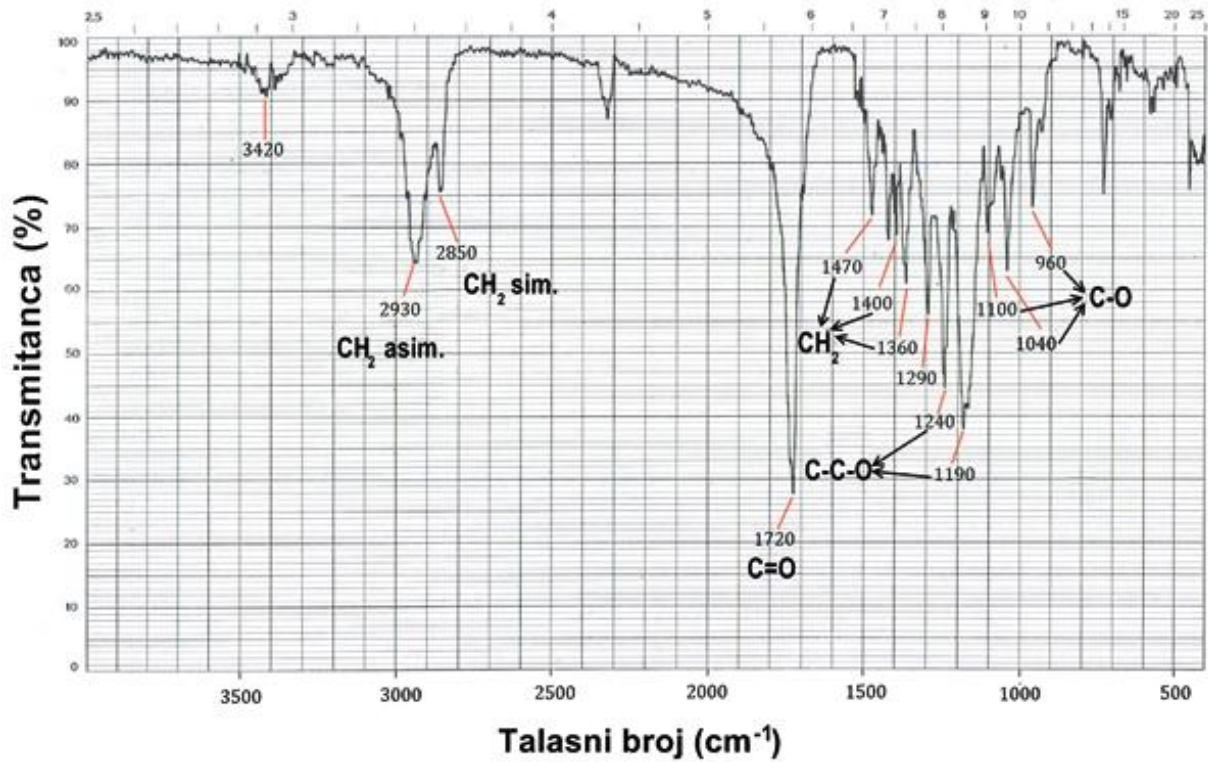
Kako bi ispitili interakciju stabilizatora sa PCL-om na molekulskom nivou snimljeni su IC spektri uzorka PCL-a sintetisanog bez dodatka stabilizatora (slika 4.1.1.1) i uzoraka sintetisanih uz dodatak PVP-a (slika 4.1.1.2) i PGA (slika 4.1.1.3).. Ono što je odmah uočljivo na svim spektrima jesu karakteristične trake za PCL koje su sumirane u tabeli 4.1.1.1.

4.1.1.1 Asignacija traka i njihove vrednosti talasnih brojeva dobijeni sa FTIR spektara uzoraka PCL-a sintetisanih bez i sa dodavanjem rastvora PVP-a i PGA.

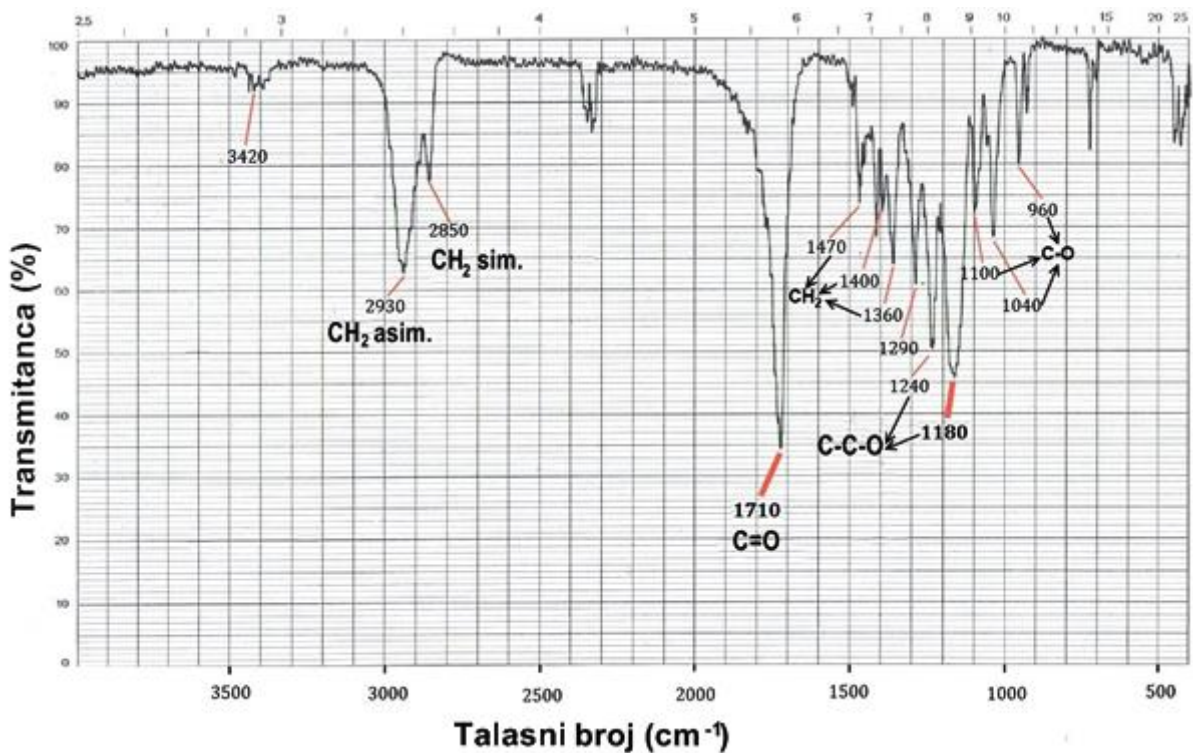
<u>Asignacija traka *</u>	<u>Taladni broj trake (cm⁻¹)</u>		
	PCL	PCL+0.05% PVP	PCL+0,05% PGA
overtonovi istežuće vibr. C=O [148]	~ 3400	~ 3400	~ 3400
Asimetr. istežuća vibr. CH ₂ [166]	2930	2930	2930
Simetr. istežuća vibr. CH ₂ [166]	2850	2850	2860
Karbonilna istežuća vibr. C=O [166]	1720	1710	1710
Deformacione vibr. CH ₂ [167]	1470,1410, 1360	1470,1410, 1360	1470,1410, 1380
Istežuća C-O & C-C vibr. kristalne faze [166]	1290	1290	1300
Asimetrična C-CO [166]	1240	1240	1240
Simetrična istežuća vibr. C-CO [166]	1190	1180	1180
Vibracije C-O i C-C [167]	1100,1040, 960	1100,1040, 960	1100,1040, 960
Ljuljajuće vibr. CH ₂ [167]	720	720	720

*Asignacija traka je izvršena prema literaturnim podacima

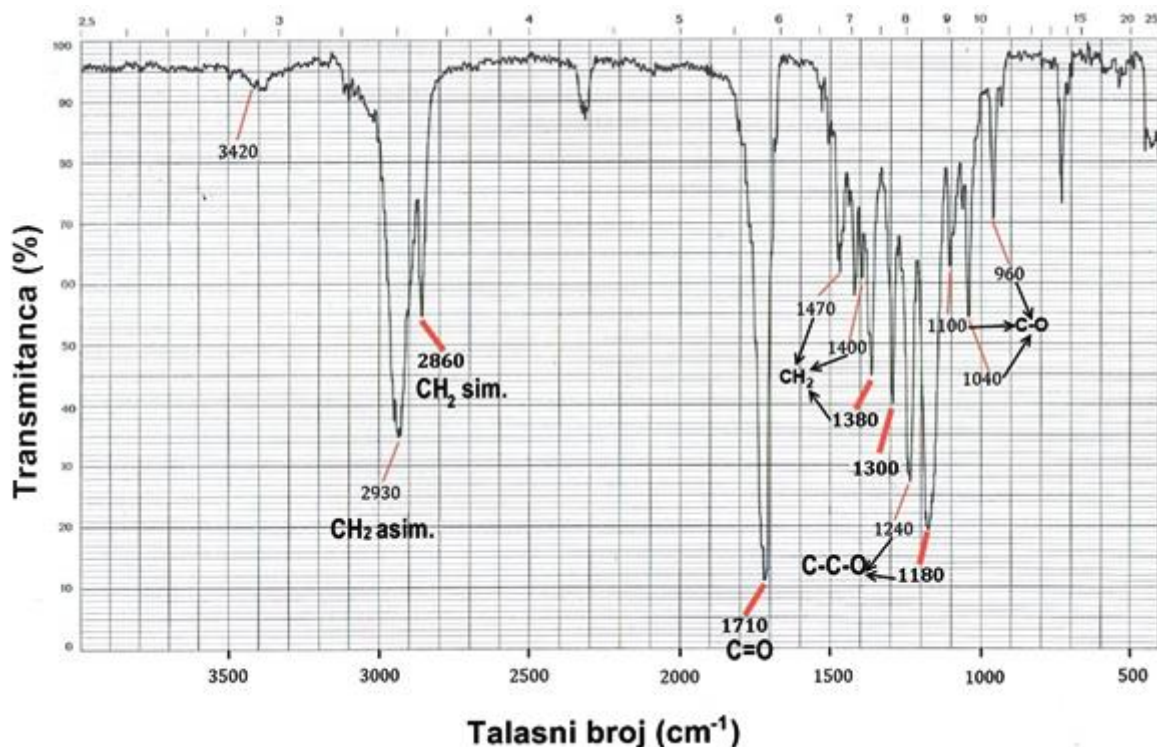
Karbonilna grupa C=O kao karakteristična za sve estarske grupe je najintenzivnija traka na svim spektrima s'tim što je zapaženo njeno blago pomeranje sa 1720 na 1710 cm^{-1} sa upotrebom stabilizatora. Razlog ovog blagog pomeraja je u tome što je upravo ova grupa najverovatnija meta za adsorpciju funkcionalnih grupa stabilizatora formiranjem slabe vodonične veze. Sa druge strane na spektru uzoraka PCL+PVP, nije zapažena ni jedna karakteristična traka koja bi ukazivala na prisustvo ovog stabilizatora (slika 4.1.1.2). Naime najintenzivnije trake kod PVP (Prilog 1) su amidna I traka C=O grupe koja se javlja na oko 1650 cm^{-1} i široka traka (brdo) oko 3400 cm^{-1} koja se javlja usled vibracija OH grupe prisutnih zbog higroskopne prirode PVP-a [168]. Kada se radi o spektru PGA (Prilog 2), najintenzivnija trake ovog jedinjenja potiču od vibracija CN, OH, NH, C=O (amidne I) i COH grupa i javljaju se na talasnim brojevima 1050, 3380, 1300, ~1650 i 1400 cm^{-1} respektivno [169]. Na spektru uzorka PCL+PGA takođe nisu zapažene nove trake ali se mogu uočiti dve promene (slika 4.1.1.3). Prva je pomeraj trake koja potiče od deformacionih vibracija CH₂ grupe sa 1360 na 1380 cm^{-1} a druga je pomeraj trake karakteristične za kristalnu strukturu polimera sa 1290 na 1300 cm^{-1} . U prvom slučaju verovatno je došlo do preklapanja sa trakom koja potiče od vibracije COH grupe iz PGA dok se drugi pomeraj može objasniti preklapanjem trake koja potiče od deformacionih vibracija NH grupe iz PGA.



Slika 4.1.1.1. FTIR spektar PCL praha sintetisanog bez dodavanja stabilizatora [148].



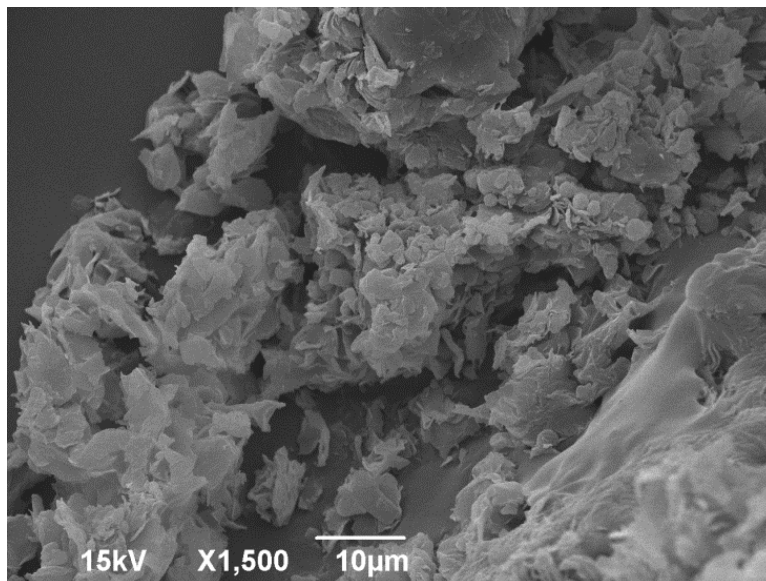
Slika 4.1.1.2 FTIR spektar PCL praha sintetisanog dodavanjem rastvora PVP-a [148].



Slika 4.1.1.3. FTIR spektar PCL praha sintetisanog dodavanjem rastvora PGA [148].

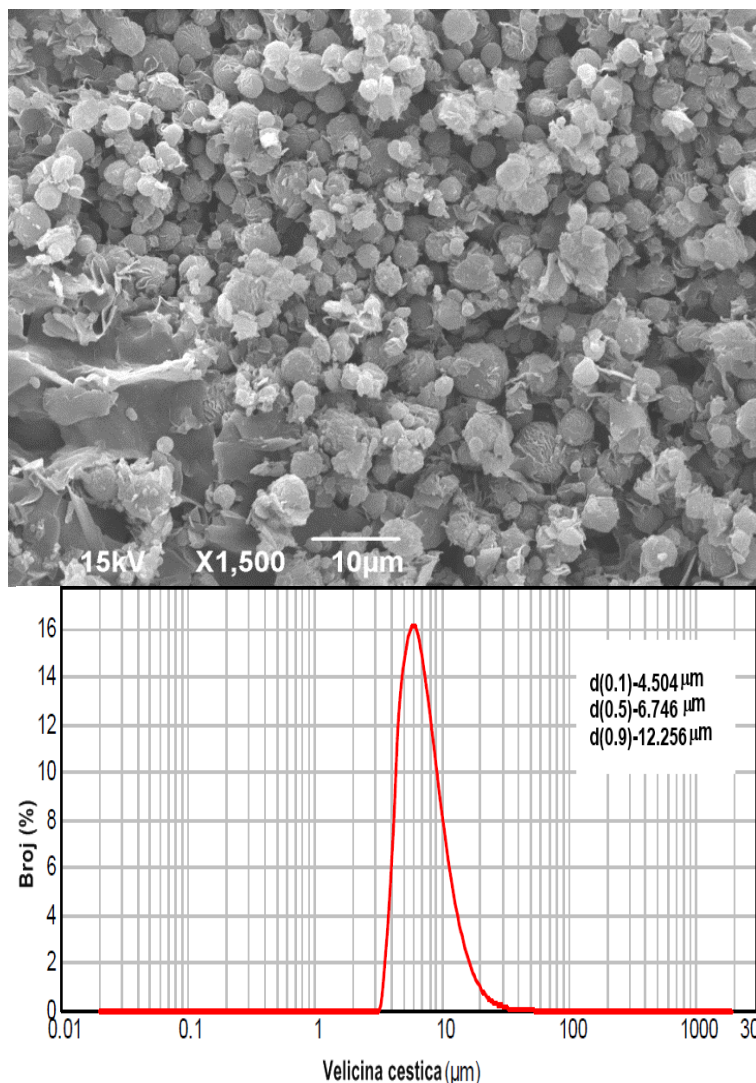
4.1.2 Uticaj primene različitog tipa polielektrolita kao stabilizatora na morfološke karakteristike PCL čestica

Na slici 4.1.2.1 prikazana je morfologija praha PCL-a dobijenog bez upotrebe stabilizatora. Kao što se može videti nakon precipitacije polimera izazvane njegovom difuzijom iz hloroforma u etanol, dolazi do aglomeracije i agregacije čestica u strukture nepravilne morfologije. U inicijalnoj fazi najpre dolazi samo do aglomeracija čestica usled težnje za smanjenjem njihove površinske energije. Kako vreme odmiče i isparavanje hloroforma i etanola postaje intenzivnije, povećava se viskoznost polimerne suspenzije a aglomeracija i agregacija postaju sve izraženije.



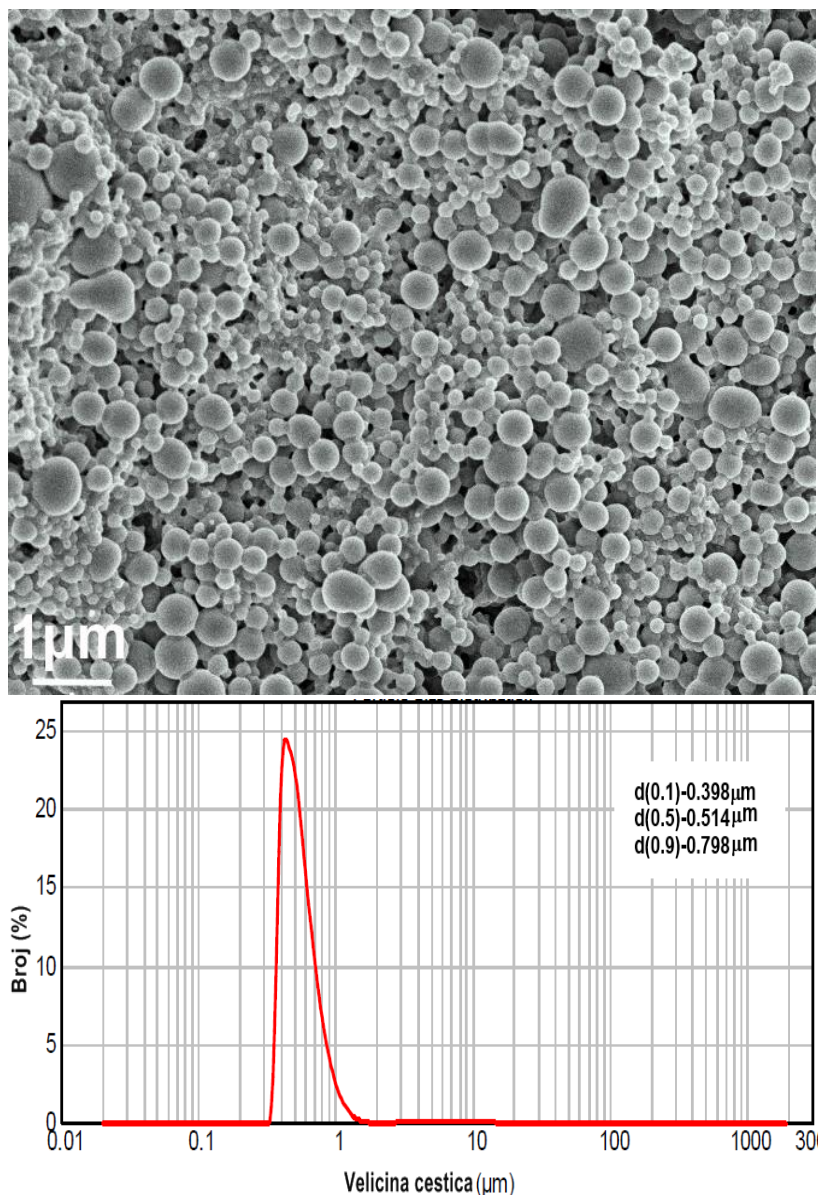
Slika 4.1.2.1 SEM mikrografija PCL praha dobijenog bez upotrebe stabilizatora [148].

Sa druge strane na slici 4.1.2.2, dobijenoj SEM analizom uzorka koji je sintetisan uz dodatak PVP-a može se zapaziti prisustvo čestica mikronskih dimenzija koje imaju sferoidnu morfologiju ali su, takođe, prisutne i čestice nepravilnih oblika. Razlika u morfologiji praha u odnosu na prethodni uzorak može se objasniti prisustvom PVP-a kao stabilizatora koji je uspeo da spreči potpunu aglomeraciju i agregaciju polimera tokom precipitacije. Iz rezultata raspodele veličine čestica ovog uzorka (slika 4.1.2.2 dole), vidi se da 10 % od ukupnog broja detektovanih čestica ima prečnik do 4,5 μm , 50 % je manje od 6,7 μm , a 90 % čestica je prečnika ispod 12,3 μm . Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima sa SEM-a. Međutim evidentno je da u ovim eksperimentalnim uslovima PVP nije uspeo da u potpunosti stabilise površinu PCL-a i dovede do formiranja pravilne sferne morfologije.



Slika 4.1.2.2 SEM mikrografija praha PCL-a sintetisanog uz dodatak PVP-a (gore) i njegova raspodela veličine (dole) [148].

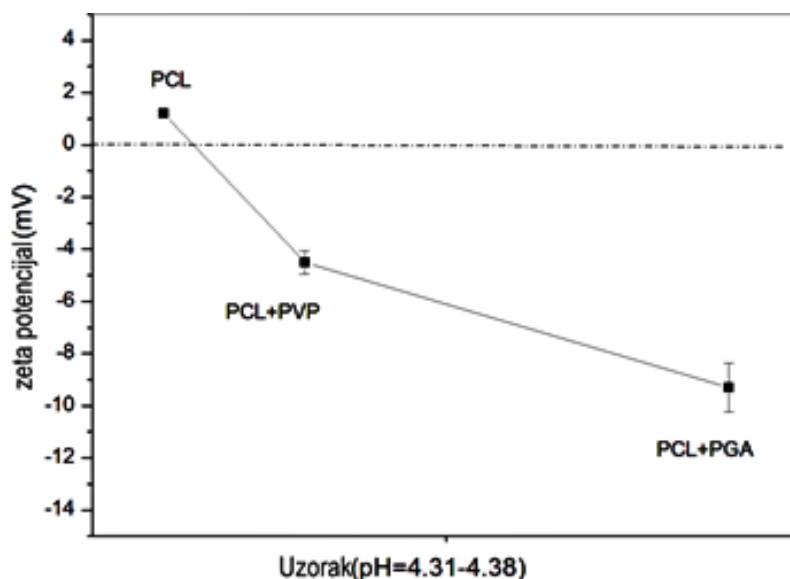
Ovi uslovi su ispunjeni kada je u eksperimentu kao stabilizator upotrebljena PGA (slika 4.1.2.3). Sa SEM mikrografije ovih uzoraka uočava se uniformna i sferna morfologija PCL čestica, pravilne glatke površine. Njihova raspodela nam otkriva da su dimenzije čestica u submikronskoj skali i da se kreću u intervalu od 400-800 nm. Glatka površina čestica je povezana sa ravnomernim isparavanjem hloroforma i homogenom raspodelom čestica unutar zapremine uzorka.



Slika 4.1.2.3 SEM mikrografija praha PCL-a sintetisanog uz dodatak PGA (gore) i njegova raspodela veličine (dole) [148].

Kao što je već navedeno u delu o eksperimentalnim metodama (odjeljak 3.1.7), površinsko naelektrisanje izraženo kao *zeta* potencijal je jako bitna karakteristika koloidnih rastvora i suspenzija čestica. Što je veća apsolutna vrednost ove veličine veće je odbijanje između samih čestica a samim tim i sistem je stabilniji. Na slici 4.1.2.4 prikazane su vrednosti *zeta* potencijala za sva tri uzorka pri određenoj vrednosti pH. Kao što se može videti za uzorak pripremljen bez upotrebe stabilizatora dobijena je pozitivna vrednost bliska nuli, dok sa

upotrebom stabilizatora *zeta* potencijal dobija negativni predznak. Kada se posmatraju uzorci pripremljeni uz upotrebu stabilizatora, uočava se dvostruki porast (po apsolutnoj vrednosti) *zeta* potencijala kod uzorka sa PGA. Obzirom da je PGA polianjon, očekivano je da će njegova adsorpcija na blago pozitivnu površinu PCL-a biti izraženija. Ovi rezultati potvrđuju da je u datim eksperimentalnim uslovima PGA efikasniji stabilizator za sintezu PCL čestica sferne morfologije.



Slika 4.1.2.4 Rezultati merenja zeta potencijala PCL čestica sintetisanih bez i uz dodatak rastvora PVP-a i PGA [148].

Vrednost zeta potencijala je prikazana kao srednja vrednost pet merenja sa standardnom devijacijom. Adsorpcija stabilizatora na površinu čestica zavisi od više faktora poput hemijskog potencijala stabilizatora u rastvoru, hemijske prirode čestica koje treba stabilisati kao i medijuma u kome se odigrava reakcija, postojanja drugih kompetitivnih procesa unutar sistema, temperature, načina mešanja tokom sinteze itd. Kod polielektrolita adsorpcija na površinu je najviše vođena elektrostatičkom interakcijom.

4.1.3 Uticaj različitih metoda sušenja na morfologiju čestica PCL

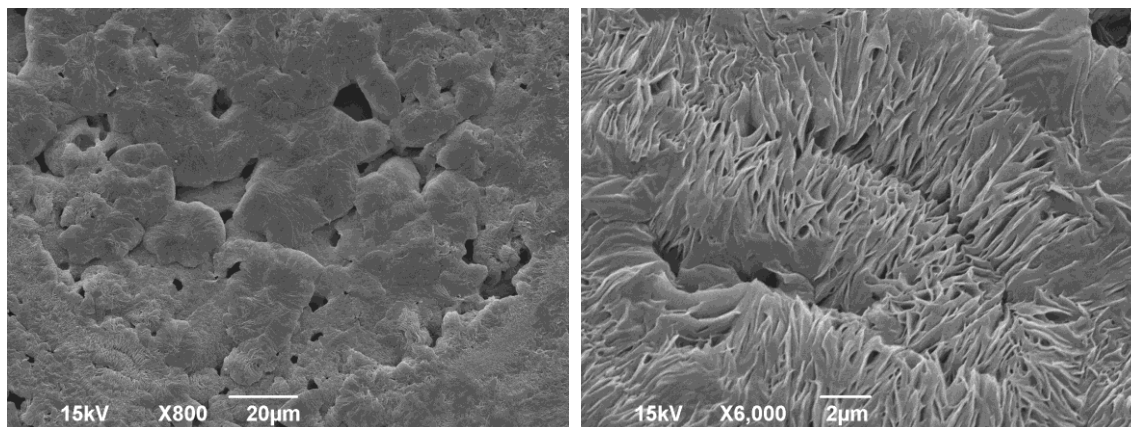
Kod preparata za kontrolisano otpuštanje aktivnih komponenti dizajniranih za biomedicinske primene dosta pažnje je posvećeno njihovom čuvanju i skladištenju. Budući da su morfologija i veličina čestica ključni parametri koji definišu primenu ovih sistema, jako je bitno da budu očuvani za vreme njihovog skladištenja. Zbog toga se najčešće ovi sistemi čuvaju u formi praha [151]. Prevođenje polimernih suspenzija u formu praha tj. sušenje je proces koji može znatno uticati na morfologiju i veličinu čestica. Pritom glavni parametri koji definišu uticaj sušenja su temperatura i pritisak. Kako se finalna suspenzija polimernih čestica sastoji od smeše etanola, hloroforma i vode, sniženje pritiska će favorizovati isparavanje hloroforma i etanola* i samim tim znatno ubrzati proces sušenja. U ovom radu pored sušenja na ambijentalnoj temperaturi ispitan je uticaj kombinovanog efekta (i) povišene temperature i sniženog pritiska i (ii) snižene temperature i sniženog pritiska tj. liofilizacije.

4.1.3.1 Ispitivanje uticaja povišene temperature i sniženog pritiska na morfologiju PCL čestica

Za ispitivanje uticaja povišene temperature i sniženog pritiska izabrana je temperatura sušenja od 45 °C i pritisak od 0.1 mbar. Ove vrednosti su izabrane tako da se izbegne topljenje polimera (po podacima proizvođača ova vrednost je oko 65 °C) a opet pospeši isparavanje tečnog medijuma. Na slikama 4.1.3.1.1-4.1.3.1.3. prikazane su morfologije uzoraka dobijenih bez dodatka stabilizatora i uz dodatak PVP-a i PGA respektivno, nakon sušenja pri navedenim uslovima. Kod svih uzoraka vidljiva je razlika u morfologiji u odnosu na one sušene na ambijentalnoj temperaturi. Očigledno je da je ubrzano isparavanje tečnog medijuma dovelo do intenzivnije koalescencije čestica a sprečilo formiranje velikih agregata duž sve tri dimenzije. Kod uzorka pripremljenog bez dodavanja stabilizatora koalescencija

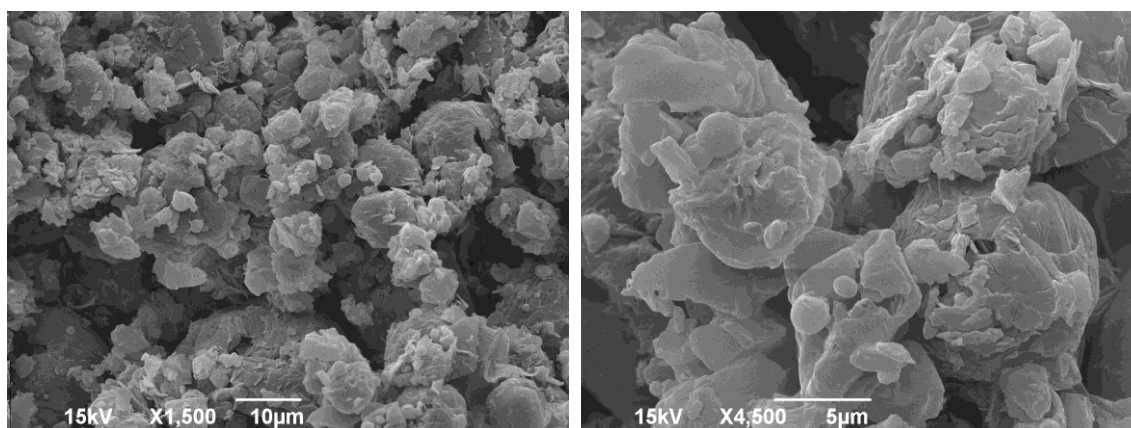
* tablične vrednosti napona pare vode, etanola i hloroforma merenih u normalnim uslovima su 2.3, 5,83 i 25.9 kPa respektivno https://en.wikipedia.org/wiki/Vapor_pressure

čestica je favorizovana u ravni posude tako da je dovela do formiranja filma (slika 4.1.3.1.1). Na slici sa većim uvećanjem vidi se da je površina tog filma i dalje dosta neujednačana i neravna, što se može objasniti agresivnim isparavanjem medijuma u kome su čestice bile suspendovane.



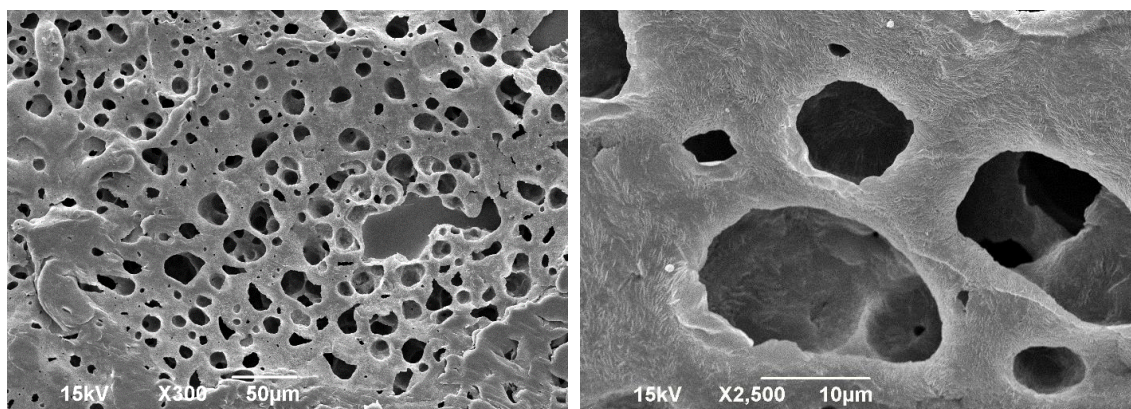
Slika 4.1.3.1.1 SEM mikrografije PCL čestica sintetisanih bez upotrebe stabilizatora i sušenih na $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$, pri pritisku od 0.1 mbar. Slika sa desne strane je snimljena pri većem uvećanju [148].

Najmanja promena u morfologiji PCL čestica je zapažena kod uzorka koji sadrži PVP (slika 4.1.3.1.2). Za razliku od prethodnog uzorka nije došlo do nikakvog formiranja filma, a u odnosu na isti uzorak sušen na ambijentalnoj temperaturi (slika 4.1.2.2) uočljiva je intenzivnija aglomeracija čestica sa po nekim tragom sferne morfologije.



Slika 4.1.3.1.2. SEM mikrografije PCL čestica sintetisanih uz upotrebu PVP-a i sušenih na $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$, pri pritisku od 0.1 mbar. Slika sa desne strane je snimljena pri većem uvećanju [148].

Sa druge strane najveća promena u morfologiji se može uočiti kod uzorka sintetisanog uz dodatak PGA (slika 4.1.3.1.3). Dobijena je visoko porozna struktura sa porama različitih prečnika, medjusobno povezanih slojem polimera. Ovakva trodimenzionalna poroznost materijala je jako zanimljiva sa stanovišta tkivnog inženjerstva tačnije dizajniranje materijala za regeneraciju tkiva koji se nazivaju skafoldi. Pored adekvatnih mehaničkih karakteristika i adekvatnog vremena biodegradacije, visoka poroznost je najbitnija karakteristika ovih materijala.



Slika 4.1.3.1.3 SEM mikrografije PCL čestica sintetisanih uz upotrebu PVP-a i sušenih na T=45 °C , pri pritisku od 0.1 mbar. Slika sa desne strane je snimljena pri većem uvećanju [148].

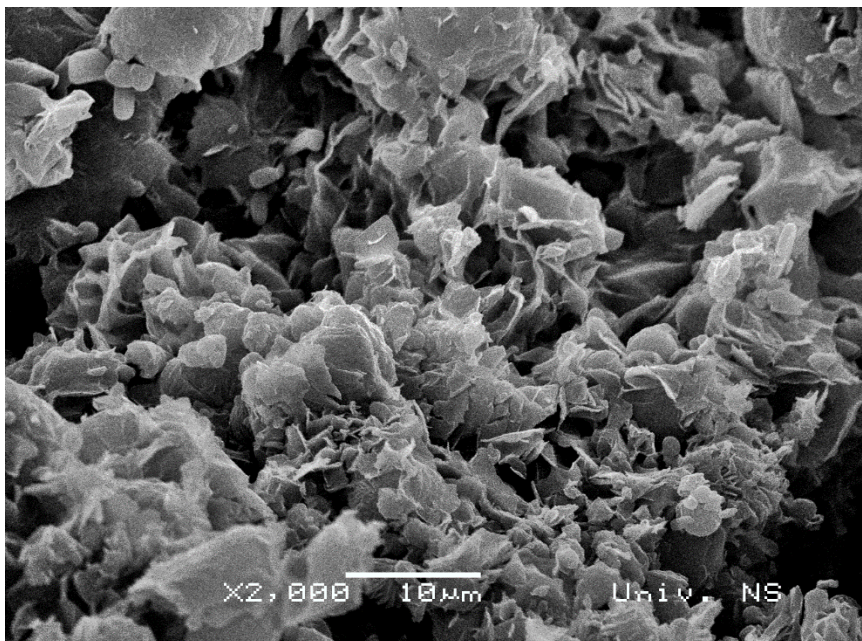
Kao što je već navedeno u opštem delu, PCL je jedan od najkorišćenijih polimera u ovoj oblasti nauke o materijalima. U literaturi se mogu naći brojne tehnika za dobijanje trodimenzionalnih poroznih struktura tj. skafolda na bazi PCL-a ali prema našem saznanju ovakva metoda još uvek nije prijavljena. Mehanizam formiranja ovakve morfologije se može objasniti kombinovanim efektom agresivnog isparavanja medijuma i početne morfologije čestica formirane nakon precipitacije. Naime kod ovog uzorka sušenog u normalnim uslovima (sobna temperatura i atmosferski pritisak) utvrđeno je da dolazi do formiranja sferne morfologije. Međutim u ovim eksperimentalnim uslovima isparavanje je toliko ubrzano da dolazi do razdvajanja tečnosti zbog spomenute razlike u naponu pare. Kako je sam polimer hidrofoban on će težiti da bude okružen manje polarnim rastvaračem tj. etanolom. Redukcija zapremine ovog medijuma se odigrava toliko brzo da u jednom trenutku preovladavaju odbojne

sile između polimernih čestica izazvane adsorpcijom PGA. Pri kontaktu sfera dolazi do koalescencije čestica ostavljajući sitne pore zbog svog oblika. Krupnije pore nastaju usled isparavanja kapljica vode koje zbog svog napona pare poslednje isparavaju a prethodno bivaju zarobljene očvršćavanjem polimera [148].

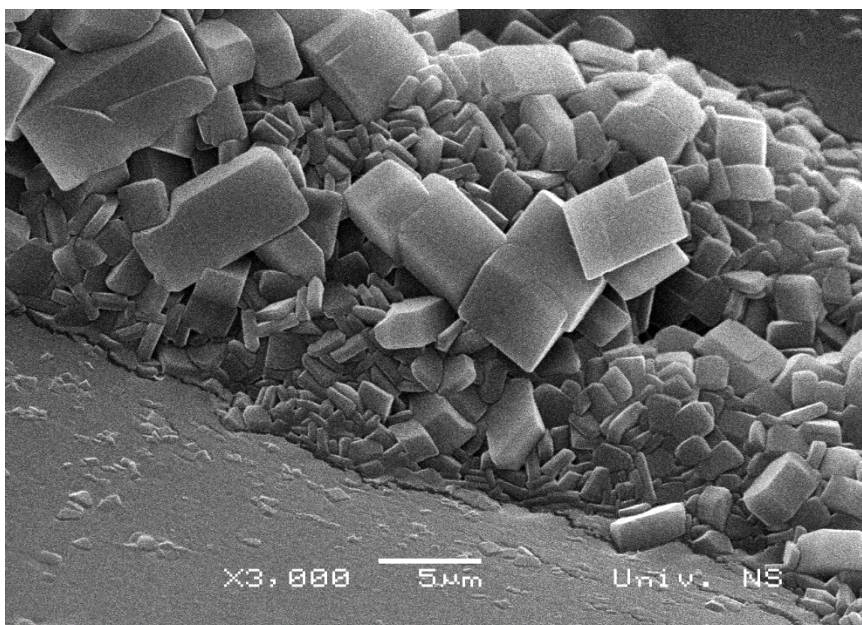
4.1.3.2 Liofilizacija PCL čestica i rezultati ispitivanja uticaja različitih krioprotektanata na njihovu morfologiju

Kako se mikro- i nanočestice obično sintetišu u tečnom medijumu koji pruža povoljno okruženje za njihovu visoku površinsku energiju, potrebno je da se prevedu u formu praha kako bi se obezbedila njihova stabilnost duži vremenski period. Zbog toga se često kao metoda sušenja koristi liofilizacija koja podrazumeva uklanjanje zamrznutog tečnog medijuma sublimacijom ili desorpcijom uz primenu vakuma. Istovremeno, upotreba liofilizacije često dovodi i do smanjenja veličine čestice [151,170].

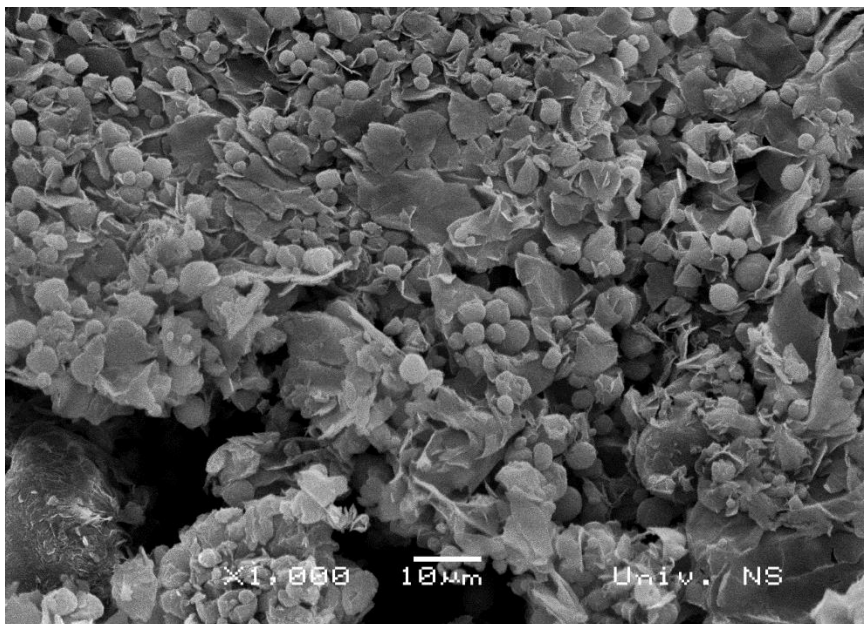
Morfologija čestica PCL-a sintetisanih bez upotrebe bilo kakvog dodatnog sredstva i primenom liofilizacije kao metode sušenja prikazana je na slici 4.1.3.2.1. Kao i u slučaju čestica sintetisanih na isti način samo sušenim pri ambijentalnim uslovima (slika 4.1.2.1) dobijeni su aglomerati i agregati mikronskih dimenzija i nepravilne morfologije. Primena liofilizacije ipak, dovela je do promena u morfologiji u vidu smanjenja aglomeracije čestica i formiranja velikih agregata. Takođe, ako se posmatra površina ovih aglomerata, može se uočiti da je sastavljena od polimernih struktura oblika ljuski. Ovakva morfologija je direktna posledica intenzivnijeg isparavanja rastvarača iz zamrznutog uzorka.



Slika 4.1.3.2.1 SEM mikrografija liofiliziranog uzorka PCL-a sintetisanog bez upotrebe stabilizatora. [150].



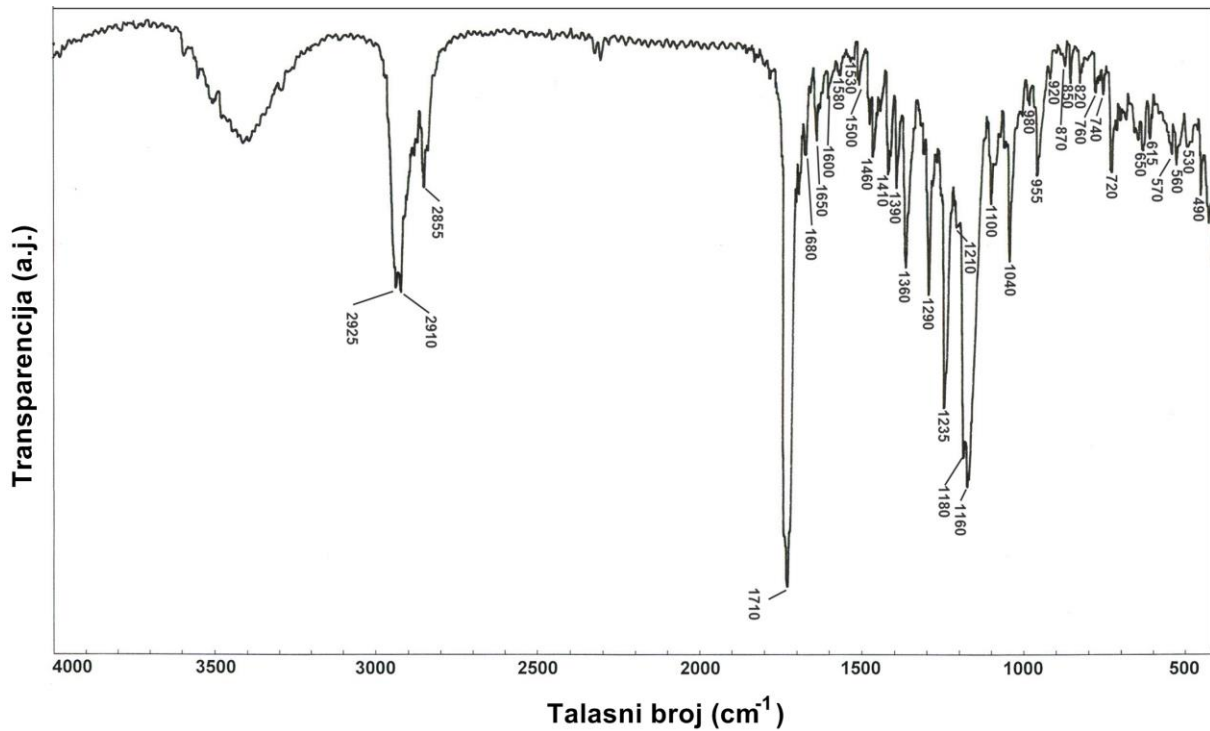
Slika 4.1.3.2.2. SEM mikrografija liofiliziranog uzorka PCL-a sintetisanog uz upotrebu 1 %-og rastvora saharoze [150].



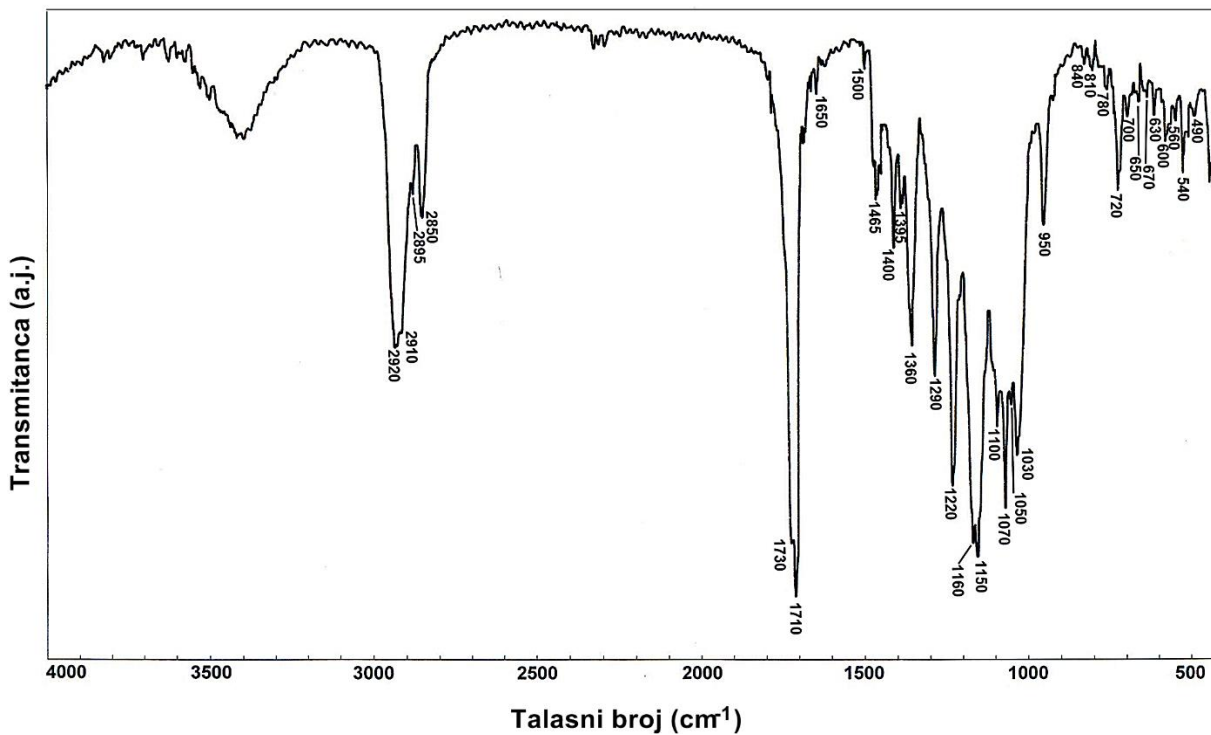
**Slika 4.1.3.2.3 SEM
mikrografija
liofiliziranog uzorka
PCL-a sintetisanog
uz upotrebu 1 %-og
rastvora PGA [150]**

Potpuno drugačija morfologija je dobijena primenom saharoze i PGA kao dodataka za stabilizaciju tokom liofilizacije. U slučaju saharoze dobijene su kubne i pločaste strukture jasno definisanih ivica i dimenzija između par i desetak mikrona (slika 4.1.3.2.2). Ovakva morfologija PCL čestica, prema našem saznanju, nije prijavljena do sada u literaturi i nije uobičajena za organske materijale. Sa druge strane kod uzorka koji je sintetisan uz dodatak PGA (slika 4.1.3.2.3) uočljivi su tragovi sferne morfologije ali i prisustvo aglomerisane površine poput one primećene kod uzorka čistog polimera. Na osnovu ovih rezultata i budući da su svi ostali parametri sinteze održavani konstantnim, može se reći da je izbor različitih krioprotektanata rezultirao potpuno drugačijom morfologijom čestica. Saharoza, kako je to već ranije navedeno, se često koristi u procesima liofilizacije kao krioprotektant sa glavnom ulogom očuvanja odgovarajuće strukture finalnog produkta i njegove zaštite od potencijalno negativnih efekata zamrzavanja i naglog isparavanja rastvarača [151]. Međutim ovako izrazita promena u morfologiji finalnih čestica izazvana upotrebom ovog krioprotektanta se ne može naći u literaturi.

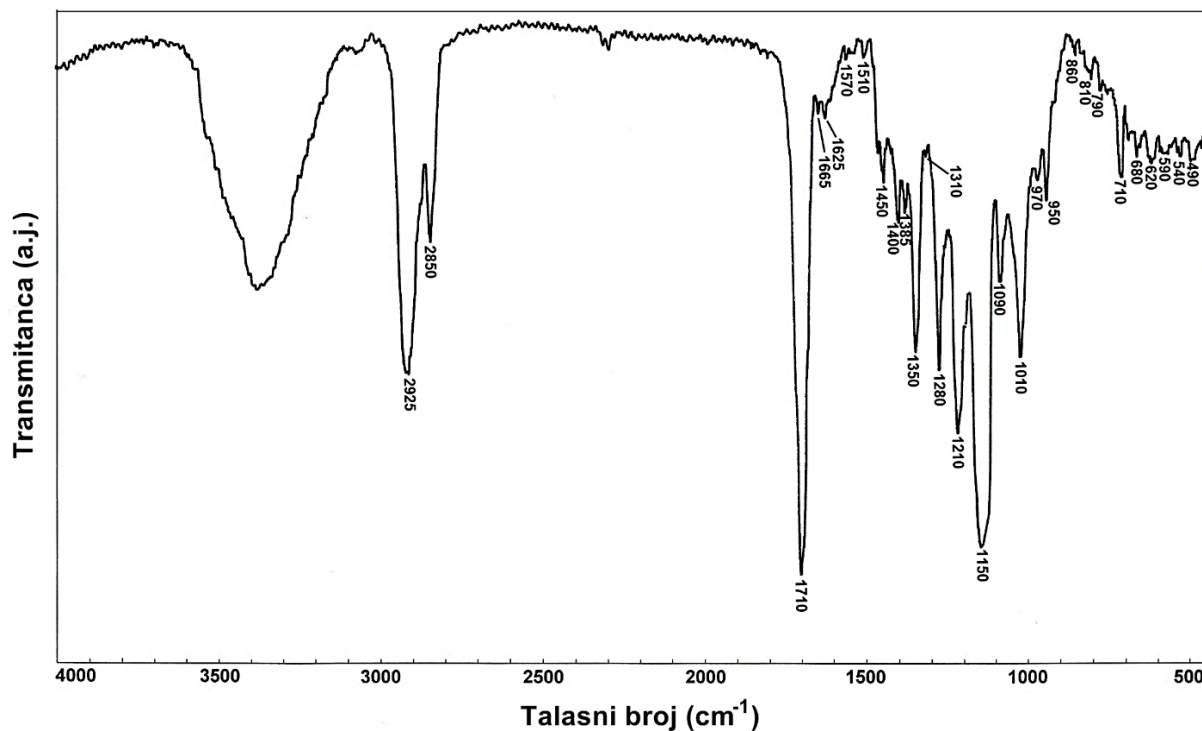
Kako bi dodatno ispitali uticaj saharoze i PGA na morfologiju liofiliziranih čestica PCL-a urađena je IC spektroskopija sva tri uzorka. Dobijeni spektri su prikazani na slikama 4.1.3.2.4-4.1.3.2.6.



Slika 4.1.3.2.4 FTIR spektar liofiliziranog PCL praha, sintetisanog bez dodavanja stabilizatora.



Slika 4.1.3.2.5 FTIR spektar liofiliziranog PCL praha, sintetisanog uz dodatak 1%-og rastvora PGA.



Slika 4.1.3.2.6 FTIR spektar liofiliziranog PCL praha, sintetisanog uz dodatak 1%-og rastvora saharoze.

Kao što se može videti, spektri sva tri uzorka sadrže sve karakteristične trake za PCL navedene u tabeli 4.1.3.2.1. U odnosu na spektre uzoraka dobijenih sušenjem na ambijentalnoj temperaturi (slike 4.1.1.1-4.1.1.3), kod sva tri uzorka dobijena liofilizacijom, može se uočiti širok pik na oko 3400 cm^{-1} , na mestu pika overtonova karbonilne grupe. Razlog pojave ovog širokog pika je prisustvo vlage u uzorcima, pošto je poznata činjenica da su liofilizirani uzorci higroskopni te je verovatno došlo do adsorpcije vlage po završetku sušenja. Ovaj pik je najintenzivniji kod uzorka koji sadrži saharozu ali se kod ovog uzorka može pripisati i vibraciji OH grupa iz saharoze. Kod uzorka koji sadrži saharozu primetno je pomeranje svih pikova ka manjim talasnim brojevima a najizraženije pomeranje je zapaženo kod simetrično istežuće vibracije C-O veze, sa 1040 na 1010 cm^{-1} . Generalno pomeraj pikova ka manjim talasnim brojevima je često posledica okruženja tj. povećane koncentracije OH grupa ili povećanje u broju vodoničnih veza. Budući da je pomeraj zapažen na svim trakama a ne samo na onim koji su podložne formiranju vodoničnih veza najverovatnije je kod ovog

uzorka zaostala određena količina vode vezana za molekule saharoze. U slučaju trake koja potiče od istežućih vibracija C-O veze, pomeraj je izraženiji zato što je ova traka najintenzivnija na spektru čiste saharoze [171].

Tabela 4.1.3.2.1. Asignacija traka i njihove vrednosti talasnih brojeva dobijeni sa FTIR spektara liofiliziranih PCL uzoraka sintetisanih bez i sa dodavanjem rastvora PGA i saharoze [150].

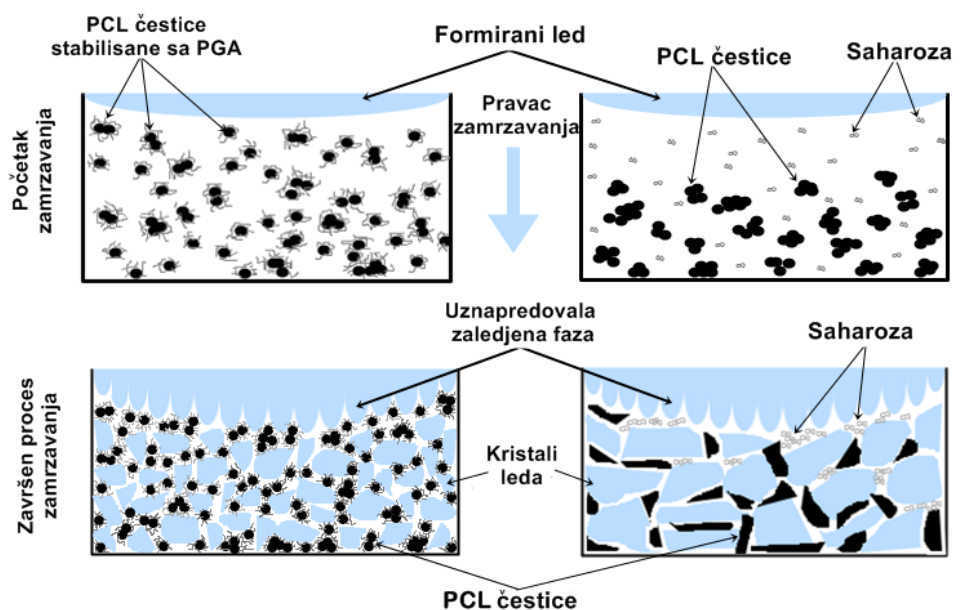
<u>Asignacija traka</u>	<u>Taladni broj trake (cm⁻¹)</u>		
	PCL	PCL+1% PGA	PCL+ 1% Saharoze
Istežuće vibr. O-H veze	~ 3400	~ 3400	~ 3400
Asimetr. istežuća vibr. CH₂	2910, 2925	2920	2925
Simetr. istežuća vibr. CH₂	2855	2850	2850
Karbonilna istežuća vibr. C=O	1710	1710&1730	1710
Deformacione vibr. CH₂	1460,1410,1360	1465,1400,1360	1450,1400,1350
Istežuća C-O & C-C vibr. kristalne faze	1290	1290	1280
Asimetrična C-CO	1235	1220	1210
Simetrična istežuća vibr. C-CO	1160	1150,1160	1150
Vibracije C-O i C-C	1100,1040,955	1100,1030&1050, 950	1090,1010,950
Ljuljajuće vibr. CH₂	720	720	710

Sa druge strane na spektru uzorka koji sadrži PGA primetna je pojava nove trake pozicionirane na 1070 cm⁻¹ dok je traka koja potiče od C-O grupe (1400 cm⁻¹) podeljena na dve oštre trake na 1050 i 1030 cm⁻¹. Pojava nove trake kod ovog uzorka jasno ukazuje na prisustvo PGA jer potiče od rastežućih vibracija C-N veze (Prilog 2). Takođe, kod ovog uzorka se jasno može videti da karbonilna traka ima

dva maksimuma na 1730 i 1710 cm^{-1} . Traka na višem talasnom broju potiče od vibracija karbonilne grupe polimernih lanaca koji se nalaze u amorfnom stanju dok ona na nižem talasnom broju odgovara vibraciji kristalnog segmenta polimera [172,173]. Razdvajanje karbonilne trake kod liofiliziranog uzorka je očekivana pojava jer sam proces liofilizacije, tačnije zamrzavanja, pospešuje amorfnost kod uzoraka.

Imajući u vidu sve navedene rezultate može se zaključiti da su uticaji saharoze i PGA na morfologiju PCL čestica drugačije prirode. Saharoza se u navedenim eksperimentalnim uslovima ne adsorbuje u dovoljnoj meri na površinu čestica poput PGA već svoj efekat ispoljava tokom zamrzavanja polimerne suspenzije. Naime sam proces zamrzavanja uzoraka se dešava unutar liofilizatora kada se pritisak spusti dovoljno nisko. Ovaj nizak pritisak pospešuje isparavanje tečnog medijuma što dovodi do lokalnog snižavanja temeperature na površini medijuma. Tako dolazi do formiranja tankog sloja leda a ceo postupak se naziva vakumsko indukovano zamrzavanje [174]. Da bi ovo zamrzavanje bilo efikasno potrebno je da nivo suspenzije koja se suši ne bude visok jer postoji gradijent zamrzavanja normalan na ravan suda u kome je smešten uzorak. U obrnutom slučaju doći će do zamrzavanja gornjeg sloja ispod koga će biti zarobljen sloj tečnog medijuma koji usled agresivnog isparavanja stvara efekat ključanja i dolazi do znatnog gubitka uzorka. Kako je debljina sloja svih uzoraka svedena na par mm ova pojava je izbegnuta. Sa pojavom sloja leda otpočinje i razdvajanje tečne i čvrste faze pri čemu dolazi do koncentrisanja suspendovanih čestica u tečnoj fazi ili kriokoncentrovane tečnosti. U ovom stadijumu je bitno da čestice polimera i krioprotektanta budu homogeno distribuirane. To zavisi od više faktora poput difuzionih faktora, viskoznosti, interakcije između polimera i krioprotektanata i površinske energije [175]. Kako je adsorpcija PGA izraženija a razlika u molekulskoj masi znatno veća između saharoze i polimera najverovatnije je da je došlo do njihovog razdvajanja u ovoj fazi. Takođe saharoza je poznata po tome što njen koncentrovani rastvor sa smanjenjem temperature podleže staklastom prelazu [176]. Mana ovog prelaza je što preostala voda ostaje zarobljena i stvara adhezione sile koje zajedno sa potiskivanjem sloja leda

normalnog na sud suzbijaju i kompaktuju čestice u strukture prikazane na slici 4.1.2.2.2. Kod uzorka sa PGA kiselinom ovakav scenario je izbegnut zbog homogenije raspodele čestica tokom procesa zamrzavanja i adsorpcije PGA koja u određenoj meri sprečava aglomeraciju čestica. Šematski prikaz opisanih mehanizama dat je na slici 4.1.3.2.7.



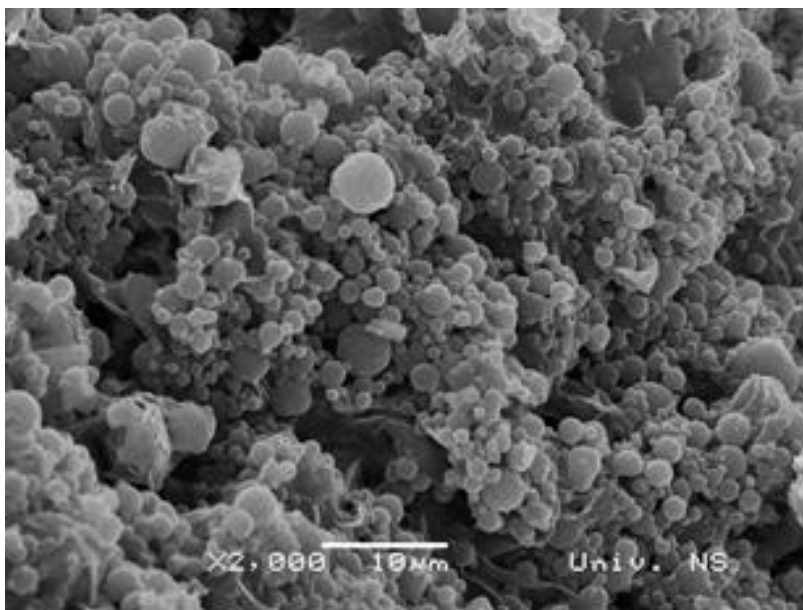
Slika 4.1.3.2.7 Šematski prikaz pretpostavljenog mehanizma formiranja različitih morfologija tokom liofilizacije uzorka PCL-a sintetisanih uz upotrebu PGA i saharoze [150].

4.1.3 Uticaj različite koncentracije PGA na dobijanje sfernih čestica PCL-a, liofilizacijom finalne suspenzije

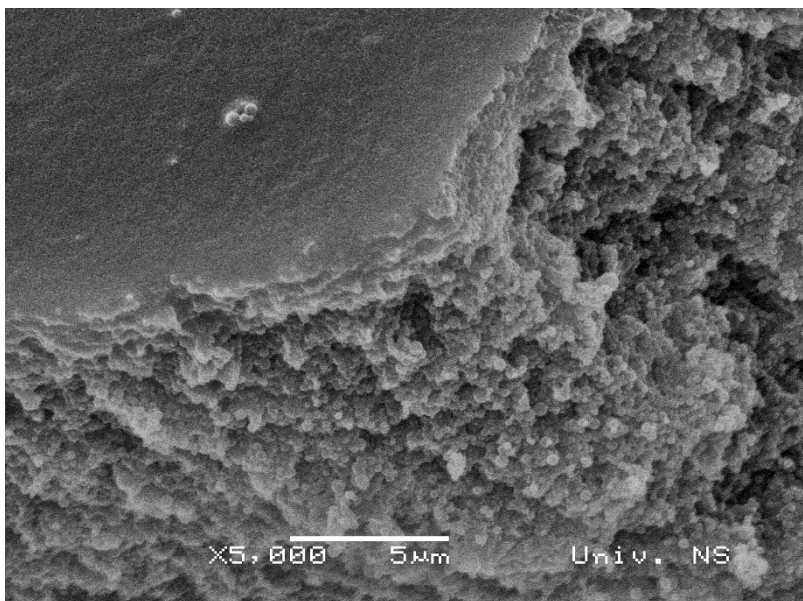
Na osnovu rezultata ispitivanja morfologije PCL čestica sušenih pri standardnim uslovima, utvrđeno je da je u opisanim eksperimentalnim uslovima optimalna koncentracija rastvora PGA potrebna za dobijanje submikronskih sfera 0,05% *. Što se tiče eksperimenata sa liofilizacijom najpre su korišćeni znatno koncentrovaniji rastvori PGA i saharoze zbog toga što se u literaturi za liofilizaciju polimernih čestica najčešće dodaju krioprotektanti u jako visokim

* ova masena koncentracija se odnosi na rastvor PGA. U odnosu na celokupni sistem PCL+PGA maseni udeo PGA je 0,83 %.

koncentracijama (20%) i zato što sniženje temperature najčešće utiče negativno na brzinu hemijskih procesa [177,178]. Sa druge strane visoke koncentracije dodatih krioprotektanata zahtevaju njihovo naknadno uklanjanje, što dodatno komplikuje i produžava proces sinteze. Da bi utvrdili koja je koncentracija PGA optimalna za dobijanje liofiliziranih sfernih čestica PCL-a pripremljene su probe kod kojih su dodati rastvori PGA u koncentracijama 1%, 0,5% i 0,05 %. SEM mikrografije uzorka sa 0,5 i 0,05% PGA prikazane su na slikama 4.1.3.1 i 4.1.3.2 a uzorka koji sadrži najveću koncentraciju PGA na slici 4.1.3.3.

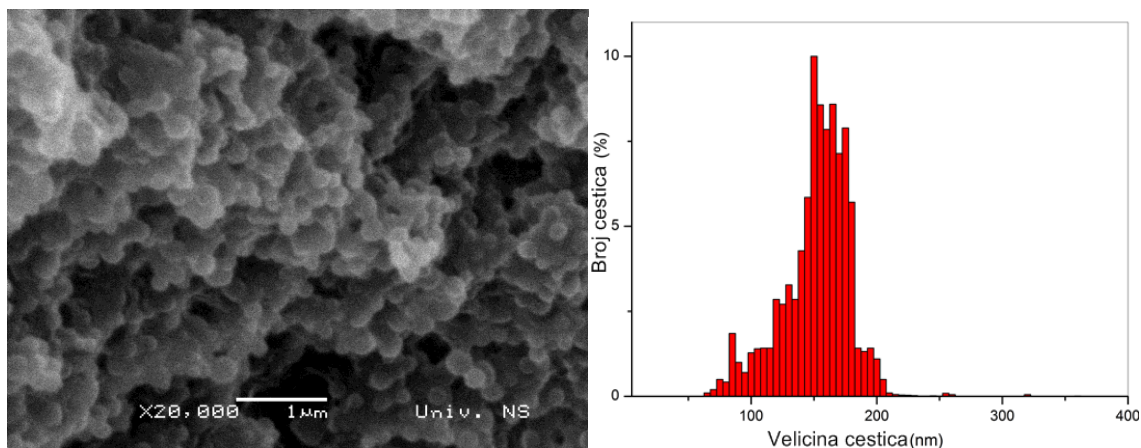


Slika 4.1.3.1 SEM mikrografija liofiliziranog uzorka PCL-a sintetisanog dodavanjem 0,5%-og rastvora PGA [150].



Slika 4.1.3.2 SEM mikrografija liofiliziranog uzorka PCL-a sintetisanog dodavanjem 0,05%-og rastvora PGA [150].

Kod uzorka sintetisanog uz dodatak 0,5% rastvora PGA primetan je napredak u formiranju sferne morfologije (slika 4.1.3.1). Veći deo polimera je uspeo da formira sfere mikronskih dimenzija ali se pored ovih sfera uočavaju i ostaci polimernih aglomerata. U poređenju sa uzorkom pripremljenim sa 1% rastvorom PGA (slika 4.1.3.2.3), dvostruko smanjenje koncentracijePGA ima pozitivan efekat ali ne u celokupnoj zapremini uzorka. Kao i u slučaju uzorka sušenog pri ambijentalnim uslovima, najbolji rezultati u dobijanju PCL sfera postignuti su kada je korišćen rastvor PGA koncentracije 0,05%. Evidentno je da je kod ovog uzorka postignuta uniformna sferna morfologija i da se veličina čestica kreće u submikronskom opsegu (slika 4.1.3.2). Na osnovu slike sa većim uvećanjem (slika 4.1.3.3) može se zaključiti da je distribucija dobijenih sfera homogena. Takođe je uočljivo i da su sfere u većoj meri aglomerisane u odnosu na uzorak sušen pri normalnim uslovima. Zarad detaljnije analize veličine čestica korišćen je alat *Particle Size Analyzer macro* u okviru programa *Image J* (W. Rasband, NIH, US), koji proračunava raspodelu veličine čestica obuhvaćenu naznačenim delom slike. Kao rezultat ovog proračuna u kome je obuhvaćeno 350 čestica dobijena je prosečna veličina prečnika čestica od 168 ± 16 nm (slika 4.1.3.3).



Slika 4.1.3.3. SEM mikrografija liofiliziranog uzorka PCL-a sintetisanog dodavanjem 0,05%-og rastvora PGA sa većim uvećanjem. Sa ove slike je vršeno određivanje raspodele veličina softverom *Image J*. Dobijena raspodela je prikazana sa desne strane [150].

U poređenju sa uzorkom dobijenim pri ambijentalnim uslovima može se zaključiti da sama liofilizacija može dovesti do znatnog smanjenja veličine čestica. Ovakav rezultat se može smatrati očekivanim i direktna je potvrda efikasnosti ove metode sušenja ali pod uslovom da je prethodno izvršen pravilan izbor stabilizatora/krioprotektanata. S'tim u vezi PGA se pokazao kao efikasan stabilizator i krioprotektant i to u jako malim koncentracijama, tj. sa mesenim udelom ispod 1 %. Kao jedini nedostatak ove metode zapaženo je intenzivnije aglomerisanje PCL sfera u odnosu na uzorak osušen pri ambijentalnim uslovima.

Pojava narušavanja morfologije i stabilnosti sistema sa povećanjem koncentracije stabilizatora se može objasniti fenomenom *bridging flocculation* [147]. Ova pojava se odigrava kada je prekrivenost površine čestica velika a sam polimer koji se koristi za stabilizaciju ima linearnu formu sa dugačkim lancima (visoku Mw). Sa povećanjem koncentracije ovih čestica (sa isparavanjem hloroforma i etanola) povećava se i mogućnost preklapanja ovih lanaca. Ako posmatramo strukturu PGA iz nje se vidi da je bogata karboksilnim grupama sa bočne strane lanaca koje su u vodenom rastvoru deprotonovane a na krajevima svakog lanca se nalazi po jedna protonovana amino grupa. Ukoliko su lanci PGA pravilno orijentisani usled njihove prevelike koncentracije moguće je da dolazi do formiranja vodoničnih veza (mostova) i do flokulacije*. Zapravo primena PGA u prečišćavanju vode se uglavnom zasniva na flokulacionom fenomenu koji se najčešće izaziva promenom pH sredine, povećanjem koncentracije katjona itd. [179,180]. Sa smanjenjem koncentracije stabilizatora smanjuje se verovatnoća za formiranjem mostova između lanaca PGA pa su odbojne sile dominantne. Kod rastvora PGA koncentracije 0,5% količina stabilizatora koja ispoljava pozitivan efekat na morfologiju PCL čestica je takođe prekoračena ali u znatno manjoj meri nego što je to slučaj sa uzorkom koji sadrži najveću koncentraciju PGA. Najbolja morfologija čestica je dobijena kada je korišćen rastvor PGA koncentracije 0,05%, tako da za opisane eksperimentalne uslove, uključujući i liofilizaciju i sušenje pri ambijentalnim uslovima, ova vrednost koncentracije rastvora PGA je

* flokulacija (eng. *flocculation*) je termin koji se koristi kod koloidnih rastvora ili suspenzija i označava koagulaciju i aglomeraciju čestica tj pojavu taloženja.

najoptimalnija. Negativan efekat na morfologiju i zeta potencijal nanočestica Ag izazvan povećanjem koncentracije PGA objavljen je i u radu M. Stevanović i ostalih autora [181].

4.1.4 Ispitivanje biokompatibilnosti sintetisanih PCL čestica

Iako je PCL poznat kao biokompatibilan materijal, ispitivanja biokompatibilnosti sintetisanih uzoraka je neophodno uraditi iz više razloga. Tokom postupka sinteze mogu nastati rezidue (zaostaci) potencijalno štetnih susstanci. Tu se pre svega misli na zaostatke rastvarača. Sa druge strane, smanjenje dimenzija čestica na submikronski nivo utiče na njihovu interakciju sa ćelijama zbog olakšane mogućnosti transporta kroz ćelijsku membranu. Zbog svega toga, kako bi se procenila potencijalna toksičnost sintetisanih PCL čestica urađena su *in vitro* ispitivanja na HepG2 ćelijskoj liniji. Prema podacima iz literature, jetra i slezina su glavni organi u kojima se čestice PCL distribuiraju [182]. Takođe, metabolička aktivnost ovih ćelija je takva da bolje reflektuju procese u zdravim ćelijama jetre u odnosu na druge ćelijske linije [183]. Pokazano je i da je osetljivost ovih ćelija na genotoksične efekte velika [184].

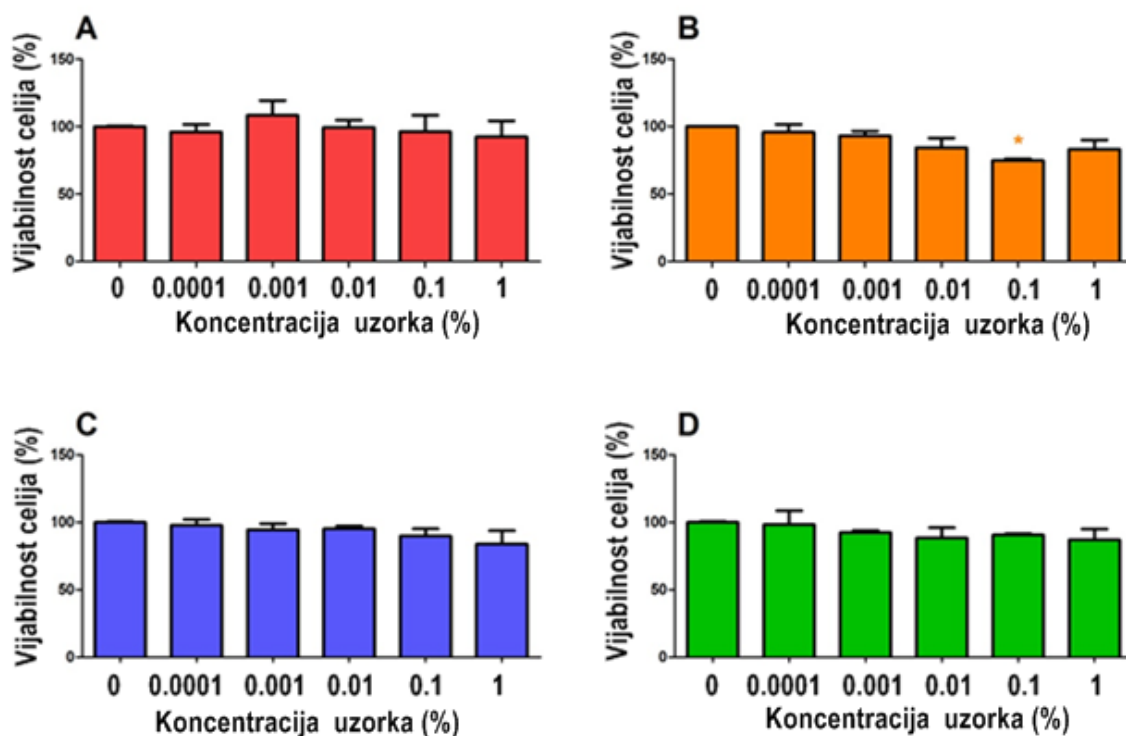
Kako je u prethodnom delu utvrđeno da je PGA najoptimalnija za dobijanje PCL sfera, eksperimenti biokompatibilnosti su vršeni na sledećim uzorcima:

- liofilizirani PCL prah dobijen bez upotrebe stabilizatora
- liofilizirani PCL prah dobijen dodavanjem 1% rastvora PGA
- liofilizirani PCL prah dobijen dodavanjem 0,5% rastvora PGA
- liofilizirani PCL prah dobijen dodavanjem 0,05% rastvora PGA

Cilj ovih eksperimenata je bio da se ispita biokompatibilnost uzoraka PCL-a dobijenih bez i sa različitim koncentracijama PGA kao i potencijalni efekat njihovih morfoloških karakteristika i veličine čestica na toksičnost prema HepG2 ćelijama.

4.1.4.1. Ispitivanje citotoksičnosti PCL uzoraka MTT testom

Na slici 4.1.4.1.1 prikazani su rezultati citotoksičnosti različitih uzoraka PCL čestica u intervalu koncentracija 0,0001-1 % . Evidentno je da nakon celodnevno inkubiranja svih uzoraka sa HepG2 ćelijama nije došlo do značajnijeg pada njihove vijabilnosti. Pad od 17 %, u odnosu na kontrolu, je zapažen kod uzorka dobijenog sa najmanjom koncentracijom PGA a čije čestice imaju najmanje veličine i sfernu morfologiju (slika 4.1.4.1.1B). Budući da je ovaj pad zabeležen na jednoj koncentraciji i to ne najvećoj kao i da njegova vrednost nije visoka ovaj rezultat se ne može posmarati sa stanovišta uticaja veličine i morfologije. Kao zaključak ovih eksperimenata može se reći da svi ispitivani uzorci ne ispoljavaju citotoksični efekat na HepG2 ćeljskoj liniji u koncentracionom intervalu od 0,0001 do 1 %.



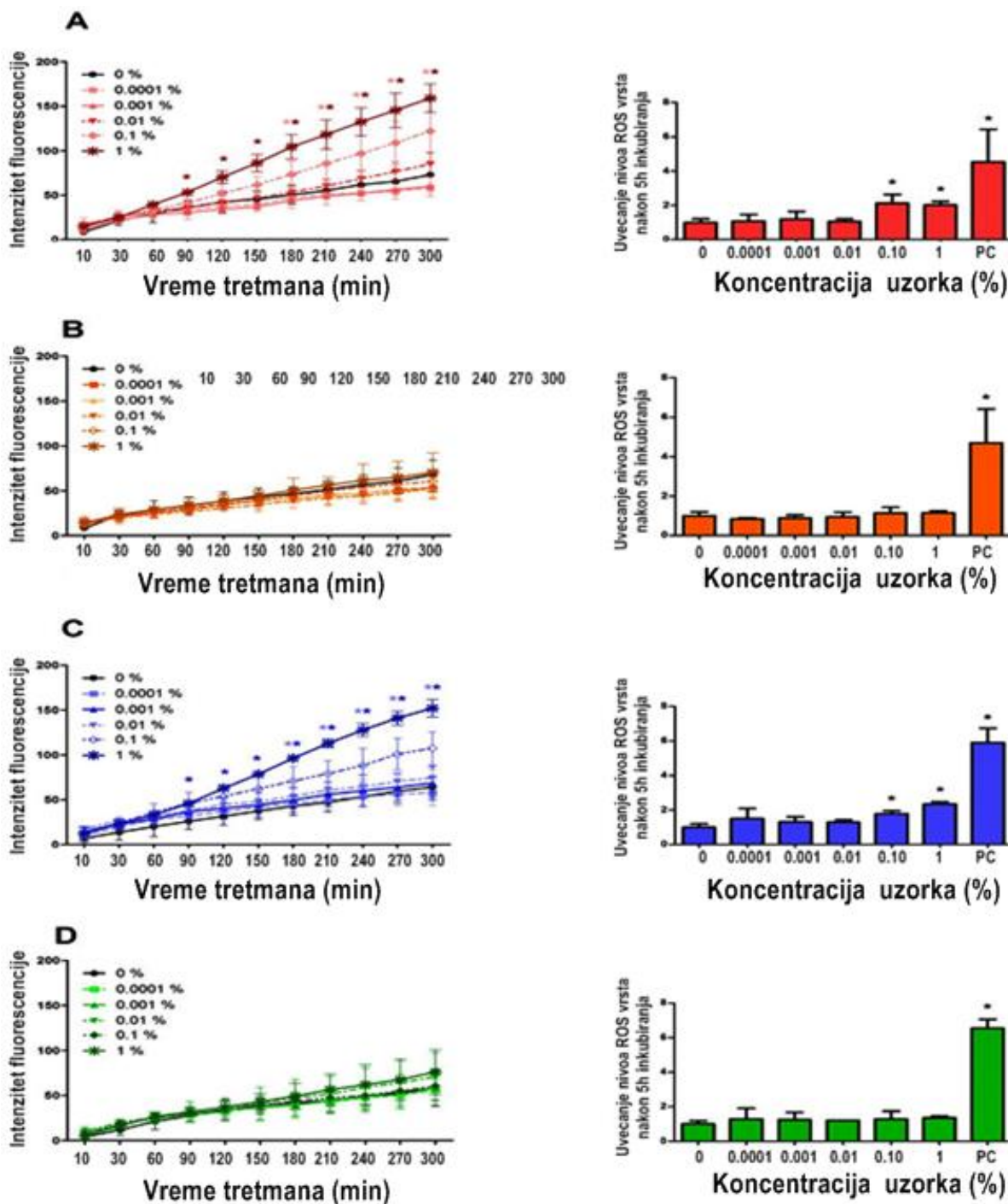
Slika 4.1.4.1.1 Rezultati MTT testa nakon jednodnevnog inkubiranja HepG2 ćelija sa različitim uzorcima PCL-a. A-PCL bez stabilizatora; B-PCL pripremljen sa 0,05% rastvorom PGA; C - PCL pripremljen sa 0,5% rastvorom PGA; D - PCL pripremljen sa 1% rastvorom PGA. Svaki uzorak je ispitan u intervalu rastućih koncentracija (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 i 1 %). (*) su označene vrednosti koje značajnije odstupaju od kontrole [150].

Ovi rezultati su u dobrom slaganju sa rezultatima koje su dobili *Campos* i ostali autori, gde su ipitivane PCL sfere sa veličinama oko 450 nm a kao model ćelija korišćeni su fibroblasti 3T3 izolovani iz miša [185]. Treba napomenuti i da porast koncentracije PGA u procesu sinteze ne utiče na citotoksičnost čestica što dodatno opravdava upotrebu ovog polimera u formulacijama za kontrolisanu dostavu lekova.

4.1.4.2. Ispitivanje uticaja PCL uzoraka na nastanak reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) -DCF-DA analiza

Među različitim reakcijama ćelija na stres izazvanim prisustvom stranih čestica (submikronskih i nanodimenzija), nastanak reaktivnih vrsta kiseonika se odigrava među prvima i na osnovu njega se najpre može steći uvid o toksičnosti ispitivanih čestica [182]. DCFH-DA test je primenjen na različitim uzorcima PCL čestica, inkubiranjem HepG2 ćelija sa njihovim rastućim koncentracijama (0,0001-1%) u periodu od 5 sati. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 4.1.4.2.1 A-D.

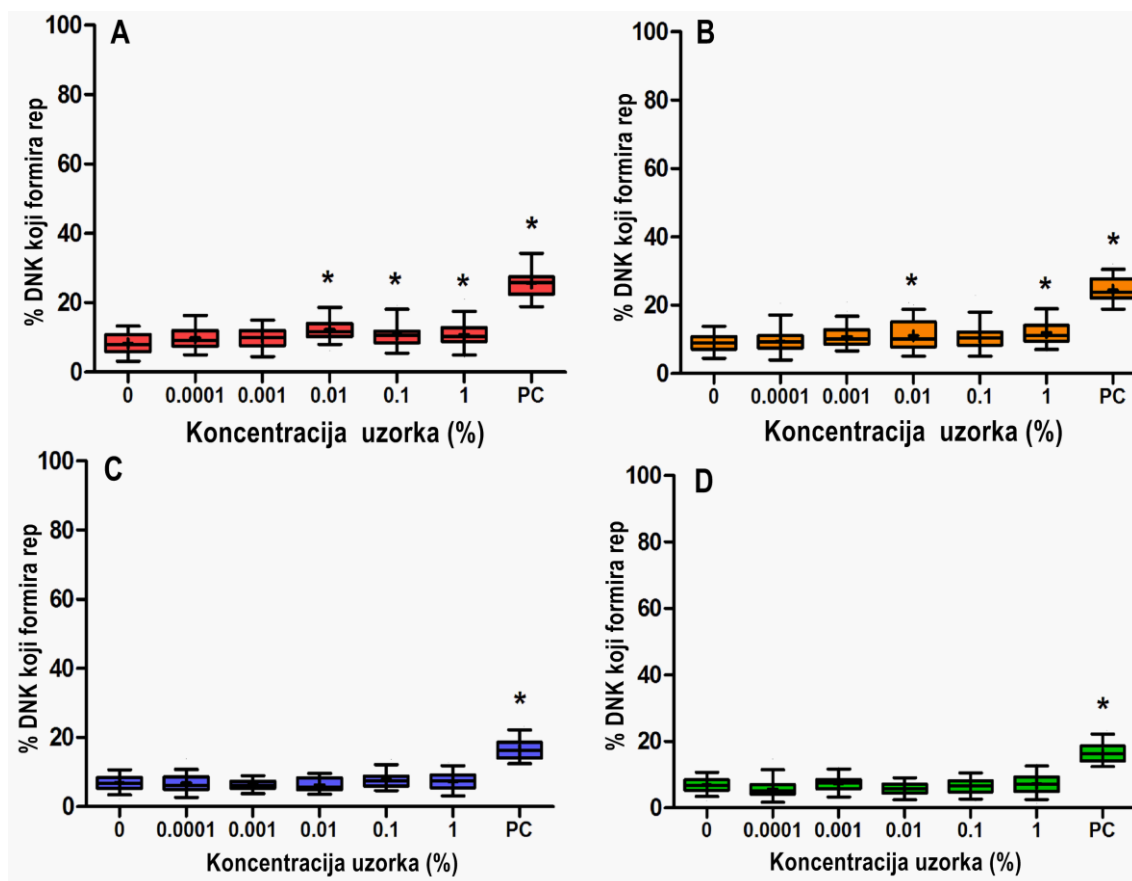
Na osnovu slike 4.1.4.2.1A i 4.1.4.2.1C kod uzoraka PCL-a sintetisanih bez stabilizatora i kod uzoraka PCL-a sintetisanih sa 0,5% PGA, može se zapaziti značajniji porast formiranja intraćelijskih reaktivnih vrsta kiseonika tokom vremena inkubiranja pri koncentracijama uzoraka 0,1 i 1%. Sa druge strane kod preostala dva uzorka nije primećano nikakvo uvećanje intenziteta fluorescencije koje bi ukazivalo na porast broja reaktivnih vrsta kiseonika u celom koncentracionom opsegu uzoraka. Budući da je intenzitet indukovanog porasta reaktivnih vrsta kiseonika između uzorka bez stabilizatora i uzorka koji je sintetisan dodavanjem 0,5%-og rastvora PGA gotovo isti, ne može se smatrati da je izazvan prisustvom PGA. Na osnovu ovih rezultata može se reći da dodatak PGA ima negativan uticaj na formiranje reaktivnih vrsta kiseonika.



Slika 4.1.4.2.1. Intraćelijsko formiranje ROS u HepG2 ćelijama, izazvano njihovim inkubiranjem sa različitim uzorcima PCL-a, u trajanju od 5 sati. A-PCL bez stabilizatora; B-PCL pripremljen sa 0,05% rastvorom PGA; C - PCL pripremljen sa 0,5% rastvorom PGA; D - PCL pripremljen sa 1% rastvorom PGA. DCFH-DA test je urađen sa serijom rastućih koncentracija od svakog uzorka (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 i 1 %). Intenziteti fluorescencije kao znak prisustva ROS vrsta su mereni na svakih pola sata i prikazani su na levoj strani slike u funkciji vremena. Na desnoj strani je prikaz ukupnog uvećanja ROS vrsta u odnosu na kontrolu (0) izmeren na kraju 5-og sata u funkciji od rastuće koncentracije PCL čestica. Na svakom grafiku je uključena i pozitivna kontrola PC (0,5 mM t-BOOH). (*) su označene vrednosti koje značajnije odstupaju od kontrole [150].

4.1.4.3 Ispitivanje genotoksičnosti sintetisanih PCL čestica- Komet test

Evaluacija genotoksičnosti nekog materijala je jako bitan deo toksikoloških ispitivanja. Komet test je urađen po analogiji prethodnih testova nakon jednodnevnog inkubiranja uzoraka PCL-a u navedenim koncentracijama.



Slika slika 4.1.4.3.1. Rezultati oštećenja DNK usled izlaganja HepG2 ćelija različitim uzorcima PCL čestica u trajanju od 24 h. A-PCL bez stabilizatora; B-PCL pripremljen sa 0,05% rastvorom PGA; C - PCL pripremljen sa 0,5% rastvorom PGA; D - PCL pripremljen sa 1% rastvorom PGA. Svaka vrednost sa grafika je dobijena nakon analize 50 ćelija po nezavisnom eksperimentu. Vrednosti su prikazane uz pomoć kutija čije ivice predstavljaju 25% i 75% vrednosti ispitanih ćelija, puna linija unutar kutija predstavlja srednju vrednost. (*) su označene vrednosti koje značajnije odstupaju od kontrole. Kao pozitivna kontrola upotrebljen je benzo[a]piren (BaP) pri koncentraciji od 30 μ M [150].

Za razliku od ispitivanja formiranja reaktivnih vrsta kiseonika, značajniji porast oštećenja DNK je zabeležen kod uzorka bez PGA i kod uzorka koji sadrži najmanju količinu PGA (slika 4.1.4.3.1 A i B). Kod prvog uzorka porast je zapažen pri koncentracijama dodatog uzorka od 0,01, 0,1 i 1%, dok je kod drugog uzorka to

slučaj nakon izlaganja koncentracijama od 0,01 i 1%. Kod uzoraka koji sadrže veću količinu PGA nije primećen nikakav porast genotoksičnosti u odnosu na kontrolu (slike 4.1.4.3.1 C i D) što se može smatrati kao potvrda zaključka iz prethodnog poglavlja da prisustvo PGA umanjuje toksične efekte PCL čestica na HepG2 ćelijama. U ovom slučaju moguće je pretpostaviti da su sferna morfologija i submikronska veličina čestica odgovorni za blagi porast oštećenja DNK mada je ovaj porast u granicama tolerancije, što se najbolje može videti u poređenju sa pozitivnom kontrolom. Sve ovo je u skladu sa podacima iz literature i *in vivo* studijom u trajanju od tri meseca na Wistar soju pacova koja je pokazala da PCL submikronske sfere ne ispoljavaju nikakav genotoksičan efekat nakon tromesečne administracije [186].

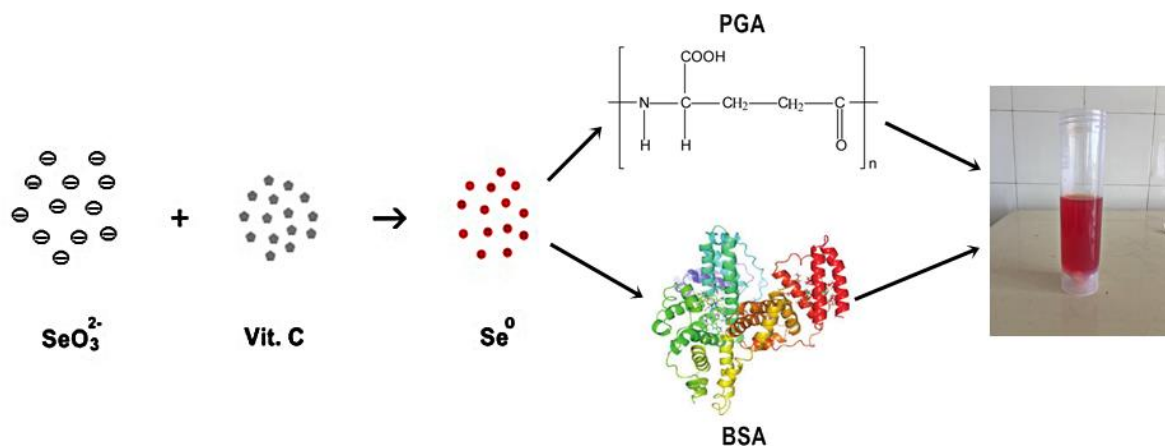
4.2 Sinteza i karakterizacija nanočestica selena

4.2.1 Ispitivanje uticaja različitih parametara sinteze na fizičko-hemijske karakteristike nanočestica selena

Eksperimentalni parametri koji su varirani tokom sinteze nanočestica selena su sumirani u tabeli 4.2.1.1. Za potrebe XRD, FTIR merenja, FESEM analize i termalne analize dobijene suspenzije/koloidni rastvori su sušeni liofilizacijom kako bi se uzorci preveli u formu praha. Za potrebe TEM analize, merenja zeta potencijala i karakterizaciju ramanskom spektroskopijom uzorci su korišćeni u formi suspenzije/koloidnog rastvora. Na slici 4.2.1.1 dati su šematski prikaz sinteze SeNp uz upotrebu BSA i PGA kao stabilizatora i makroskopski izgled dobijenog koloidnog rastvora i liofiliziranog praha uzorka VI.

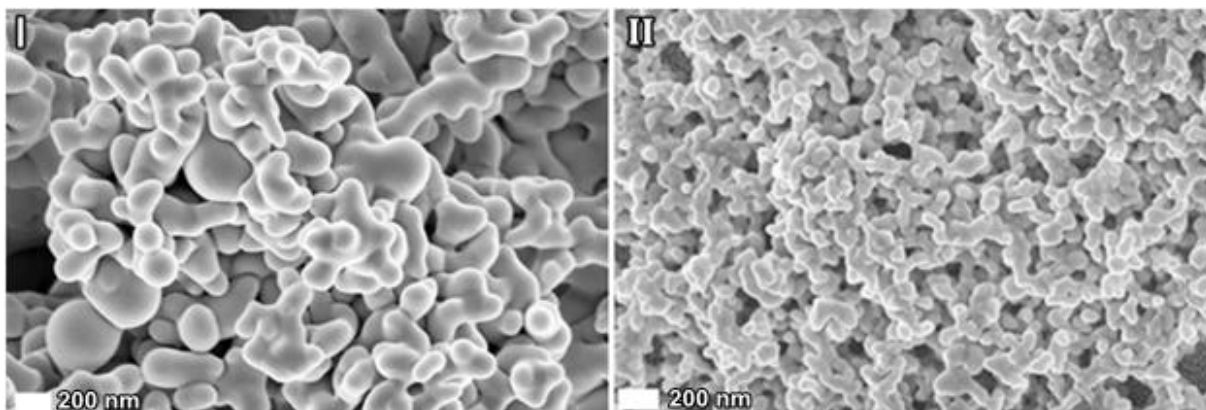
Tabela 4.2.1.1 Parametri koji su varirani u toku sinteze nanočestica Se i stabilnost dobijenih suspenzija. Stabilnost je procenjena vizuelno, kao pojava zamućenja tj. precipitacije čestica i odnosi se na određene uslove skladištenja (posude zaštićene od svetlosti i smeštene u frižderu). Uzorak VI je označen crvenom bojom jer je pokazao najbolju stabilnost.

Uzorak SeNp	Molski odnos Na_2SeO_3 : Vit.C	Maseni odnos Na_2SeO_3 :BSA	Maseni odnos Na_2SeO_3 :PGA	Vreme stabilnosti suspenzije-pojave taloga
I	1:4	-	-	≤1 min
II	1:4	1:1	-	≤1 dana
III	1:4	-	1:1	≤5 min
IV	1:4	1:2	-	≤30 dana
V	1:4	-	1:2	≤30 dana
VI	1:5	1:1	-	3-4 meseci

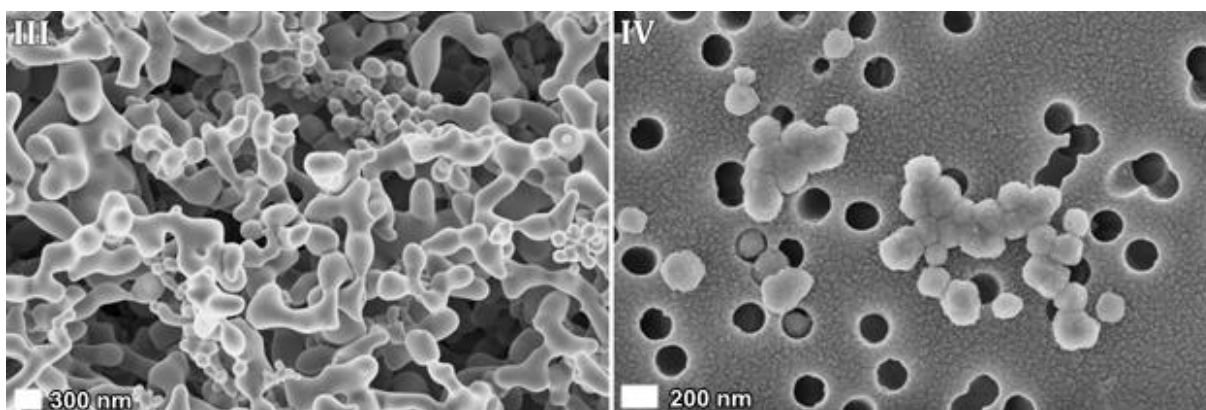


Slika 4.2.1.1 Šematski prikaz sinteze nanočestica Se u formi koloidnog rastvora. Donji deo slike prikazuje liofilizaciju dobijenog koloidnog rastvora i makroskopski izgled dobijenog praha.

Sa FESEM mikrografija svih uzoraka vidi se da su dimenzije čestica u submikronskoj i nanometarskoj skali. Treba napomenuti da je kod većine uzoraka aglomeracija prisutna jednim delom kao posledica liofilizacije. Kod uzorka pripremljenog bez stabilizatora aglomeracija čestica elementarnog selena je najizraženija kao potvrda njihove tendencije da se spajanjem oslobode viška površinske energije (slika 4.2.1.2-I). Otuda je kod ovog uzorka najkraće vreme nakon čega je vizuelno zapažena pojava taloga. Pojedinačne čestice su nepravilne sferoidne morfologije, veličine 100-500 nm. Na sledećoj slici prikazana je morfologija uzorka II kod koga je kao stabilizator korišćen BSA (slika 4.2.1.2-II). I kod ovog uzorka je u određenoj meri zapaženo slepljivanje čestica sferoidne morfologije ali su same pojedinačne čestice manjih dimenzija, oko 100 nm i uniformnog oblika.



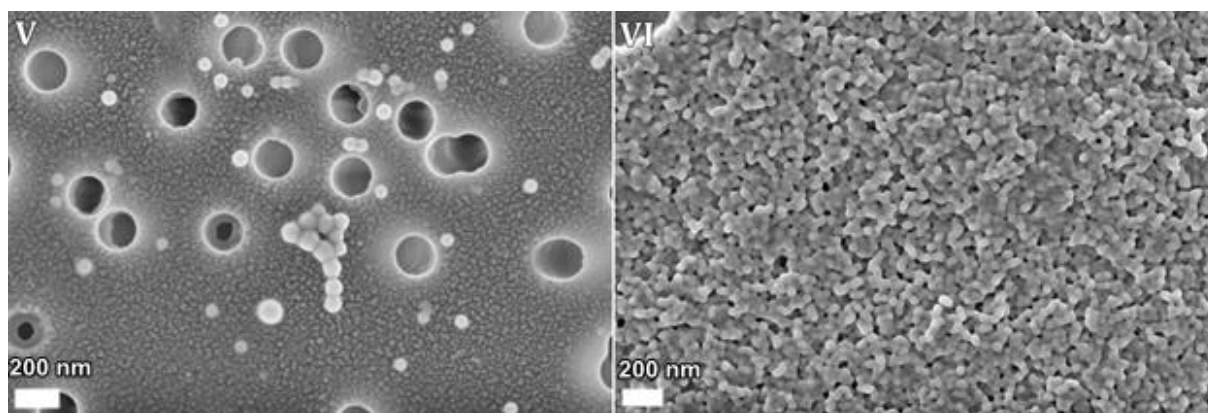
Slika 4.2.1.2 FESEM mikrografije čestica Se iz uzoraka I i II. I-uzorak sintetisan bez upotrebe stabilizatora. II-uzorak sintetisan uz dodatak manje količine BSA (oznake uzoraka su iste kao i u tabeli 4.2.1.1).



Slika 4.2.1.3 FESEM mikrografije čestica Se iz uzoraka III i IV. III -uzorak sintetisan uz upotrebu manje količine PGA. IV -uzorak sintetisan uz dodatak veće količine BSA (oznake uzoraka su iste kao i u tabeli 4.2.1.1).

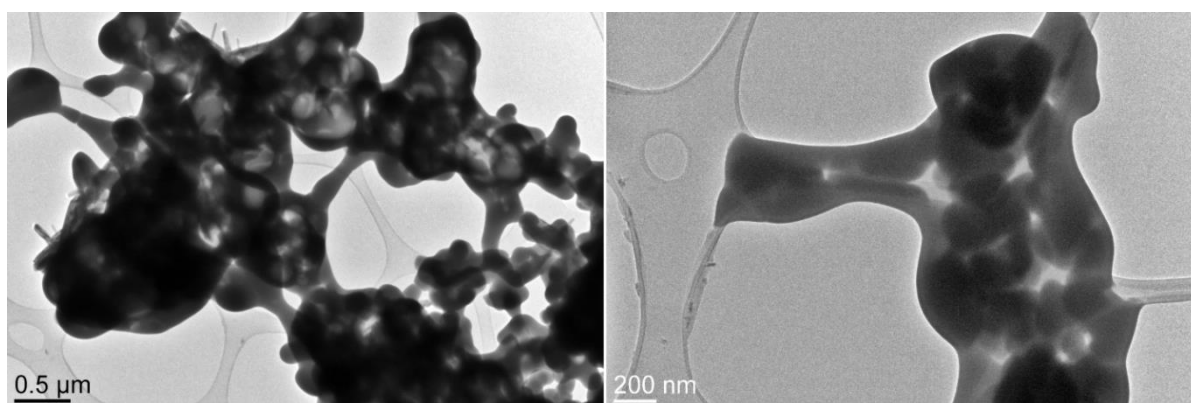
Kod uzorka pripremljenog dodavanjem iste mase PGA (uzorak III, tabela 4.2.1.1) aglomeracija je dovela do formiranja lanaca sastavljenih od čestica selena veličine 200-500 nm (slika 4.2.1.3-III). Ovakva morfologija se može pripisati nedovoljnom pokrivenošću čestica selena poliglutaminskom kiselinom, te je njihovo spajanje favorizano na onim delovima površine na kojoj nije došlo do adsorpcije stabilizatora.

Uzorci koji su pokazali veću stabilnost na osnovu vizuelnog posmatranja u dužem vremenskom periodu su označeni kao IV, V i VI. Uzorak IV je sintetisan sa dvostruko većom masom BSA nego uzorak II i kod ovog uzorka se uočavaju čestice pravilnije sferne morfologije, bez izražene aglomeracije (slika 4.2.1.3-IV). Na osnovu ove mikrografije može se proceniti da je veličina sfernih čestica selena oko 200 nm. Kada je umesto BSA upotrebljena ista masa PGA dobijene su takođe sferne čestice ali ovoga puta nanometarskih veličina tj. ispod 100 nm u prečniku (slika 4.2.1.3-V). Na osnovu FESEM mikrografija, najbolja morfologija je dobijena kod uzorka VI kod kojeg je molski odnos vitamina C i prekursora 5:1 a maseni odnos BSA i prekursora 1:1 (slika 4.2.1.3-VI). Čestice su uniformne, nanometarskih dimenzija ali zbog liofilizacije uzorka aglomerisane pa se ne može jasno definisati njihov oblik. Iako su uzorci snimani na FESEM uređaju, postizanje veće rezolucije i uvećanja nije bilo moguće zbog interakcije samih uzorka sa elektronskim snopom (polimeri kao što su BSA i PGA su osetljivi na primenu upadnog elektronskog snopa veće energije koja je potrebna za postizanje bolje rezolucije).

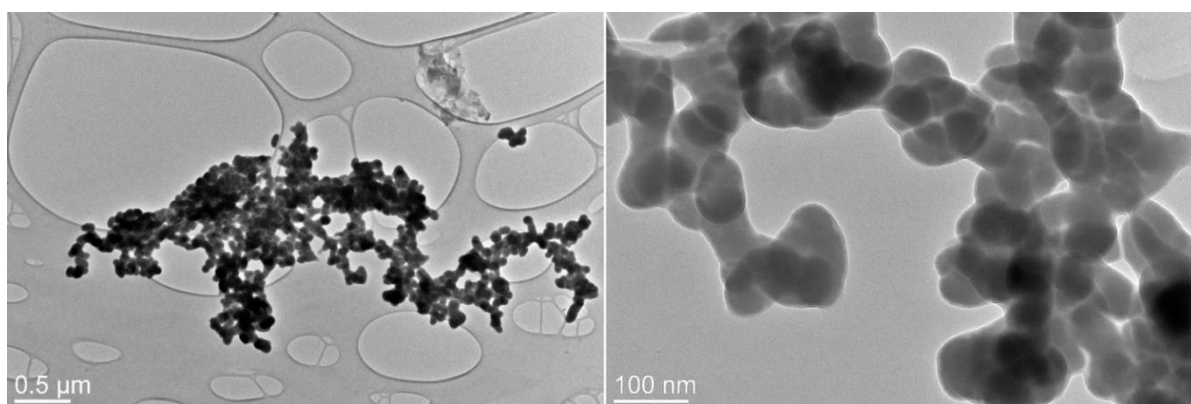


Slika 4.2.1.4 FESEM mikrografije čestica Se iz uzoraka V i VI. V -uzorak sintetisan uz upotrebu veće količine PGA. VI- uzorak sintetisan uz upotrebu veće konc. Vit.C i manje količine BSA (oznake uzoraka su iste kao i u tabeli 4.2.1.1).

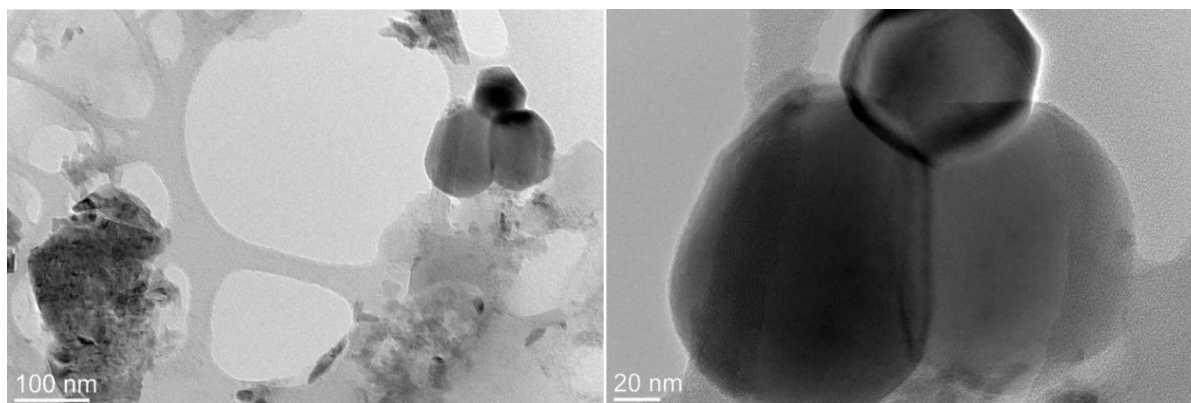
Kako bi se detaljnije ispitala morfologija sintetisanih uzoraka kao i uticaj parametara sinteze na morfologiju i veličinu čestica, upotrebljena je transmisiona elektronska mikroskopija. Kao što je navedeno u eksperimentalnom delu, za potrebe TEM analize korišćeni su uzorci u tečnom stanju tj. suspenzije/koloidni rastvori. Snimanje uzoraka u formi suspenzija omogućuje posmatranje segmenta uzorka u kome su čestice izolovane ili monoslojno grupisane, pa je sama analiza morfologije olakšana. Generalno gledano TEM se smatra pogodnijom mikroskopskom tehnikom za analizu tankih uzoraka gde njihova debljina obično ne prelazi stotinak nm. Sa TEM slika uzorka I (slika 4.2.1.5) dobijenog bez stabilizatora, uočava se izražena aglomeracija čestica što je onemogućilo dalju analizu morfologije. Kod uzorka II (slika 4.2.1.6) može se uočiti znatno manja aglomeracija čestica čija je veličina oko 100 nm. Čestice poseduju nepravilnu sfernu morfologiju i prilično su homogene u pogledu izgleda i veličine.



Slika 4.2.1.5 TEM mikrografije čestica Se, uzorak I sintetisan bez stabilizatora. Slika sa desne strane odnosi se na isti uzorak, samo je veće uvećanje.

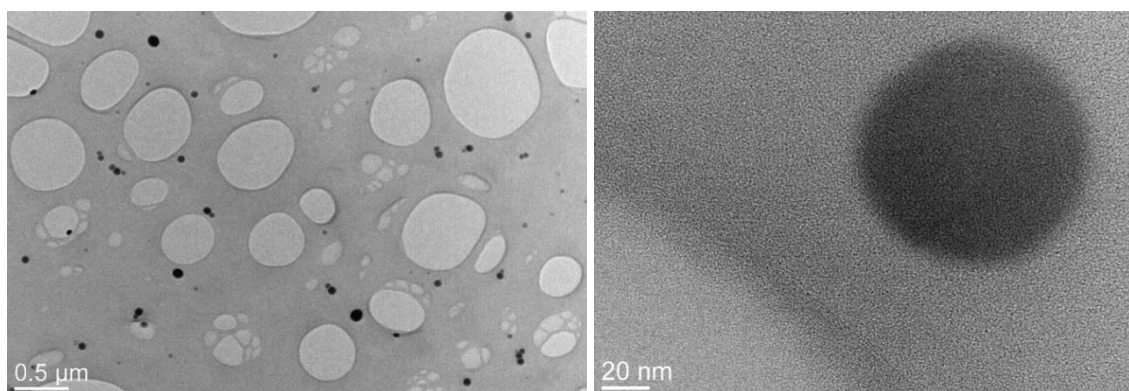


Slika 4.2.1.6 TEM mikrografije čestica Se, uzorak II sintetisan uz dodatak BSA kao stabilizatora Slika sa desne strane odnosi se na isti uzorak, samo je veće uvećanje.



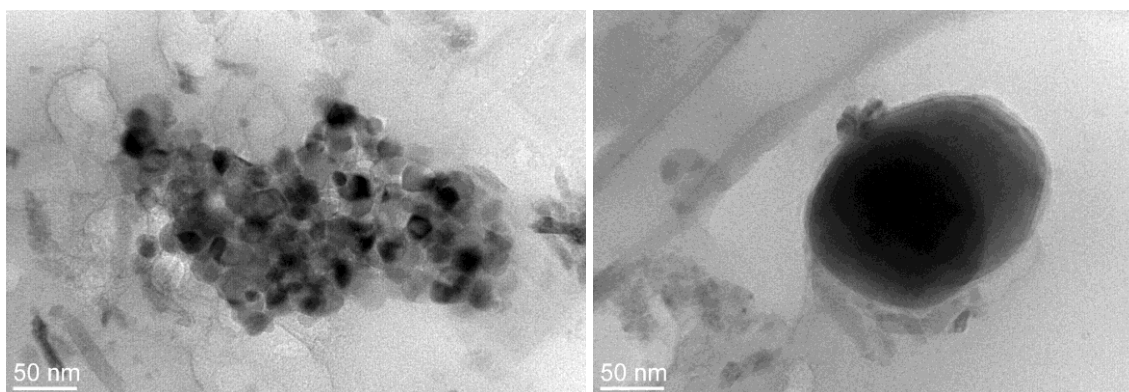
Slika 4.2.1.7 TEM mikrografije čestica Se, uzorak III sintetisan uz dodatak PGA kao stabilizatora. Desno- HRTEM mikrografija izolovanih čestica istog uzorka.

Kod uzorka III (slika 4.2.1.7) zbog izražene aglomeracije ne može se jasno definisati morfologija i veličina pojedinačnih čestica. Naime kod aglomerata zbog preklapanja čestica duž pravca elektronskog snopa povećava se gustina materijala tj. smanjuje propustljivost elektrona koji formiraju sliku. Na osnovu slika mikrografija 4.2.1.7 vidi se da uzorak III nije uniforman u pogledu veličine i morfologije čestica. Na slici sa većim uvećanjem, prikazane su izolovane čestice veličine ≤ 100 nm i sferične morfologije sa pojedinim oštrim ivicama. Na TEM slikama ovog uzorka formiranje lanaca nije zapaženo (što se može videti na FESEM slikama). Moguće objašnjenje je da su uzorci za snimanja na FESEM-u liofilizirani, te je njihova aglomeracija izazvana tokom procesa zamrzavanja i sublimacije.

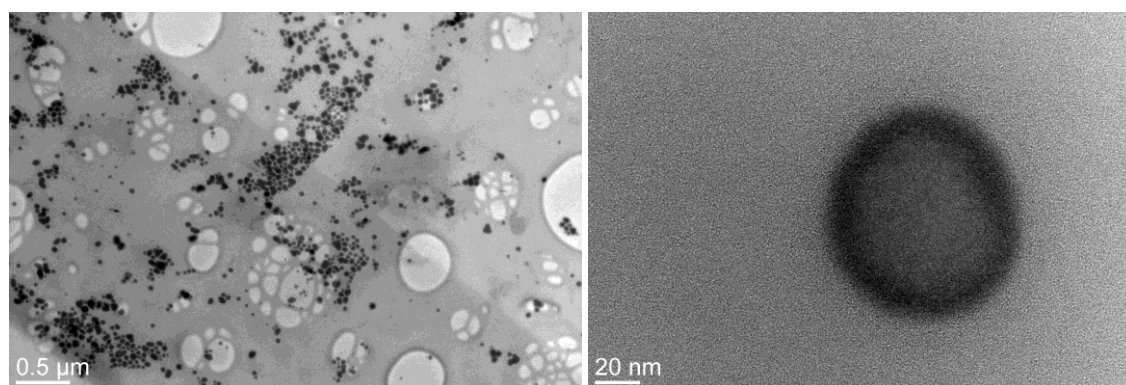


Slika 4.2.1.8 TEM mikrografije čestica Se, uzorak IV sintetisan uz dodatak visoke koncentracije BSA kao stabilizatora. Desno- HRTEM mikrografija izolovane čestice istog uzorka.

Sa FESEM slike uzorka IV (slika 4.2.1.3-IV), sintetisanog sa većom koncentracijom BSA, vidi se da čestice imaju sfernu morfologiju sa veličinama oko 200 nm. Rezultati TEM analize ovog uzorka (slika 4.2.1.8) potvrđuju sfernu morfologiju čestica Se, ali je zapažena veličina čestica dosta manja, ispod 100 nm. Još jedan od uzoraka kod koga su kao krajnji rezultat dobijene nanočestice Se je uzorak V (slika 4.2.1.9). Na HRTEM slici ovog uzorka prikazane su dve izolovane čestice koje se preklapaju i koje imaju sferičnu morfologiju. Na osnovu TEM mikrografija i kod ovog uzorka može se uočiti aglomeracija čestica i njihova nepravilna morfologija, što potvrđuje da PGA nije najadekvatniji stabilizator za sintezu nanočestica Se u opisanim eksperimentalnim uslovima.



Slika 4.2.1.9 TEM mikrografije čestica Se, uzorak V sintetisan uz dodatak visoke koncentracije PGA vSlika sa desne strane ima veće uvećanje. Desno-HRTEM mikrografija izolovanih čestica istog uzorka.



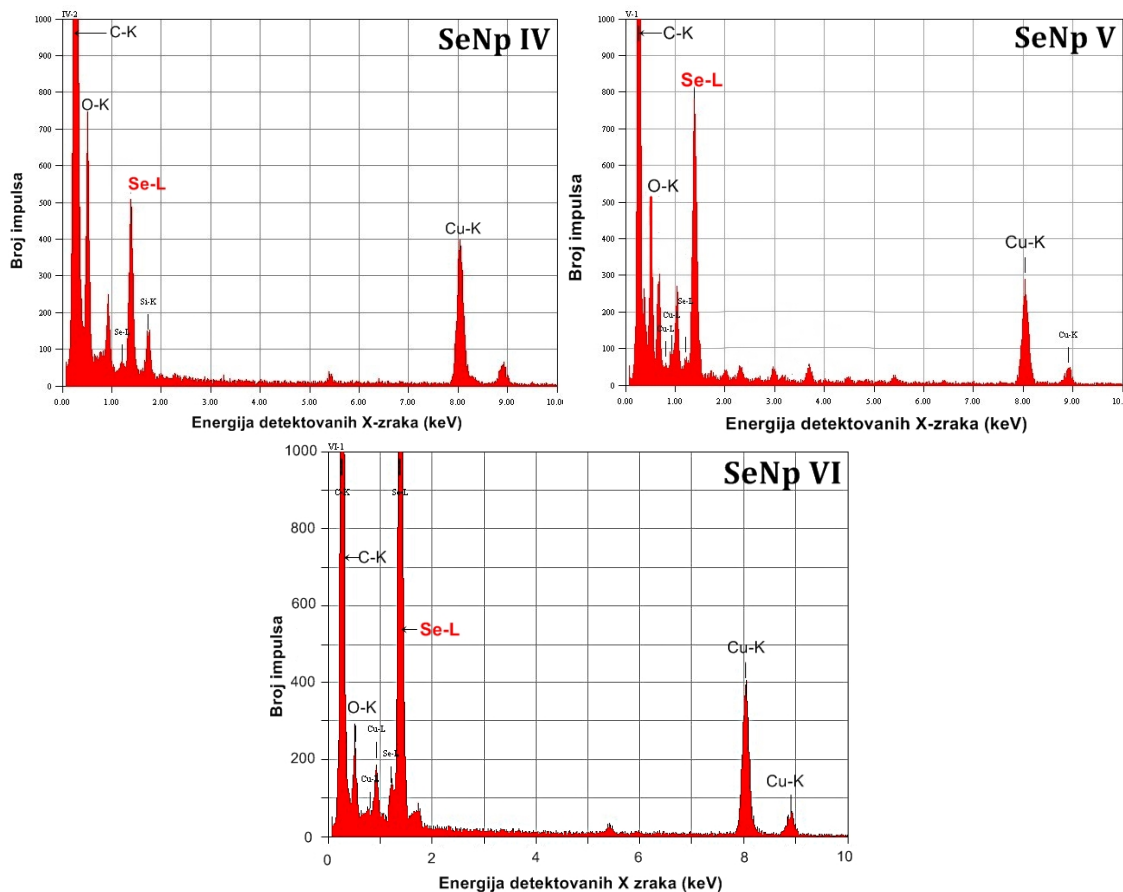
Slika 4.2.1.10 TEM mikrografije čestica Se, uzorak VI sintetisan uz dodatak male koncentracije BSA a velike koncentracije vitamina C. Desno-HRTEM mikrografija izolovane čestice istog uzorka.

Uzorak kod koga su čestice uniformne, nanodimenzija i sa uskom raspodelom veličine je uzorak VI, dobijen kada je u sintezi korišćena manja

koncentracija BSA a veća koncentracija vitamina C, što se može videti sa slike 4.2.1.10. Sve čestice su sferne i neaglomerisane, a kod ovog uzorka je zapažena i izuzetna stabilnost tokom dužeg vremenskog perioda. Na desnoj strani slike 4.2.1.10. gde je prikazana HRTEM mikrografija izolovane čestice ovog uzorka, jasno se uočava pravilna sferna morfologija kao i da je prečnik ove čestice oko 80 nm. Kao glavni zaključak ispitivanja morfologije nanočestica selena sintetisanih bez i sa različitim koncentracijama PGA ili BSA kao stabilizatora, metodama elektronske mikroskopije, može se istaći da je BSA efikasniji stabilizator. Takođe interesantno je da je promena u molarnom odnosu redukcionog sredstva i prekursora sa 4:1 na 5:1 rezultirala pojačanim efektom stabilizacije BSA i dobijanjem uniformnih nanočestica. Moguće objašnjenje ovog fenomena bi moglo da bude povezano sa makrokonformacijom BSA u kiseloj sredini. Zbog toga je izmeren pH dobijenih koloidnih rastvora SeNp i dobijene su vrednosti 4,35 i 4,25 za uzorke IV i VI respektivno. Obe vrednosti su ispod vrednosti izoelektrične tačke ali treba imati na umu da je BSA kompleksan protein sastavljen od preko 500 aminokiselina i da je možda ova mala razlika u vrednosti pH dovoljna da utiče na konformaciju određenih delova molekula usled čega se on bolje adsorbuje na površinu selenovih nanočestica.

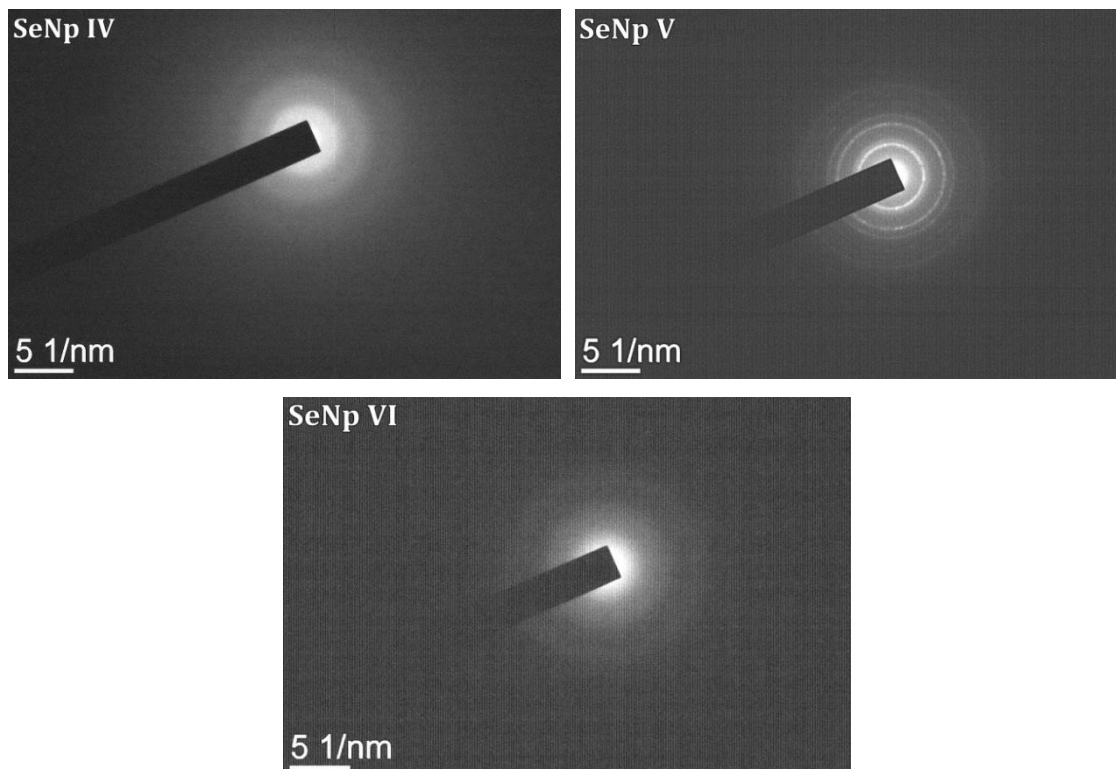
Pored ispitivanja morfologije i veličine čestica savremeni elektronski mikroskopi mogu biti opremljeni i dodatnim izvorom zračenja i detektorima koji im omogućavaju ispitivanja sastava tehnikom EDS ili ispitivanje kristalne strukture tehnikom SAED. Kako je jedan od ciljeva bio dobijanje amorfnih nanočestica selena, kombinacijom ovih tehnika mogu se potvrditi i hemijski sastav, veličina i kristalno uređenje čestica. EDS merenja i SAED analize su urađene na uzorcima IV, V i VI budući da je na tim TEM slikama potvrđeno da su čestice nanodimenzija. Rezultati EDS analize su prikazani na slici 4.2.1.11. Na svim spektrima potvrđeno je prisustvo Se koji je identifikovan na osnovu L linije emisijom zračenja energije od 1.379 keV. Pored Se na spektrima su prisutni C, O i Cu. Prva dva elementa su sastavni delovi oba stabilizatora dok se Cu javlja zbog bakarne mrežice na koju se nanose uzorci. Upoređivanjem spektara može se uočiti da se intenzitet signala selena menja značajno i da je najintenzivniji kod uzorka VI, dok je kod uzorka IV čak manjeg intenziteta od signala O. Posmatrano sa stanovišta procesa sinteze

ovakav rezultat je očekivan budući da su kod uzoraka IV i V korišćene duplo veće količine stabilizatora u odnosu na uzorak VI.



Slika 4.2.1.11 EDS spektri uzoraka SeNp označenih kao IV (levo), V (desno), VI (dole). Spektri su dobijeni sa površina navedenih uzoraka prikazanih na TEM mikrografijama 4.2.1.8-4.2.10.

Što se tiče SAED analize uzoraka dobijani difrakcioni obrasci su prikazani na slici 4.2.1.12. Kao što se može videti prisutna je velika razlika između uzoraka IV i VI sa jedne strane i uzorka V sa druge strane. U prvom slučaju može se uočiti da su difraktovani elektroni difuzno i radijalno raspoređeni oko upadnog snopa elektrona što ukazuje da su uzorci amorfni. Sa druge strane kod uzorka V se pojavljuju uski koncentrični prstenovi formirani od strane difraktovanih elektrona koji ukazuju da je uzorak polikristalan.



Slika 4.2.1.12 Difrakcioni obrasci dobijeni sa uzoraka SeNp označenih kao IV (levo), V (desno), VI (dole). SAED analiza je izvršena sa površina navedenih uzoraka prikazanih na TEM mikrografijama 4.2.1.8-4.2.1.10.

Kod nanočestičnih sistema dobijenih u formi koloidnog rastvora jedna od polaznih karakterizacija je ispitivanje zeta potencijala. Pritom, prilikom merenja zeta potencijala dobijaju se i informacije u vezi hidrodinamičkog radijusa i polidisperznosti uzorka. U tabeli 4.2.1.2 je dat prikaz ovih vrednosti. Zeta potencijal za uzorak VI je $29,6 \pm 0,8\text{mV}$ što po apsolutnoj vrednosti ukazuje da je koloidni rastvor stabilan. Pozitivni predznak potiče od BSA jer se pH tokom reakcije kreće od 2,6-4,4, što je ispod izoelektrične tačke za ovaj protein. Vrednost polidisperzionog indeksa od 0,118 ukazuje na usku raspodelu veličine čestica kod ovog uzorka koja je na osnovu hidrodinamičkog radijusa procenjena na oko 80 nm. Ova vrednost se može potvrditi na osnovu TEM mikrografija ovog uzorka. Poređenja radi u istoj tabeli su dati i parametri dobijeni za uzorak V. Kao što se može videti hidrodinamički radijus ovih čestica je blizu 100 nm, polidisperzioni indeks ukazuje na širu raspodelu veličine u odnosu na uzorak VI. Sama vrednost zeta potencijala je $-23,6 \pm 0,7\text{mV}$, što je po apsolutnoj vrednosti manje od uzorka VI,

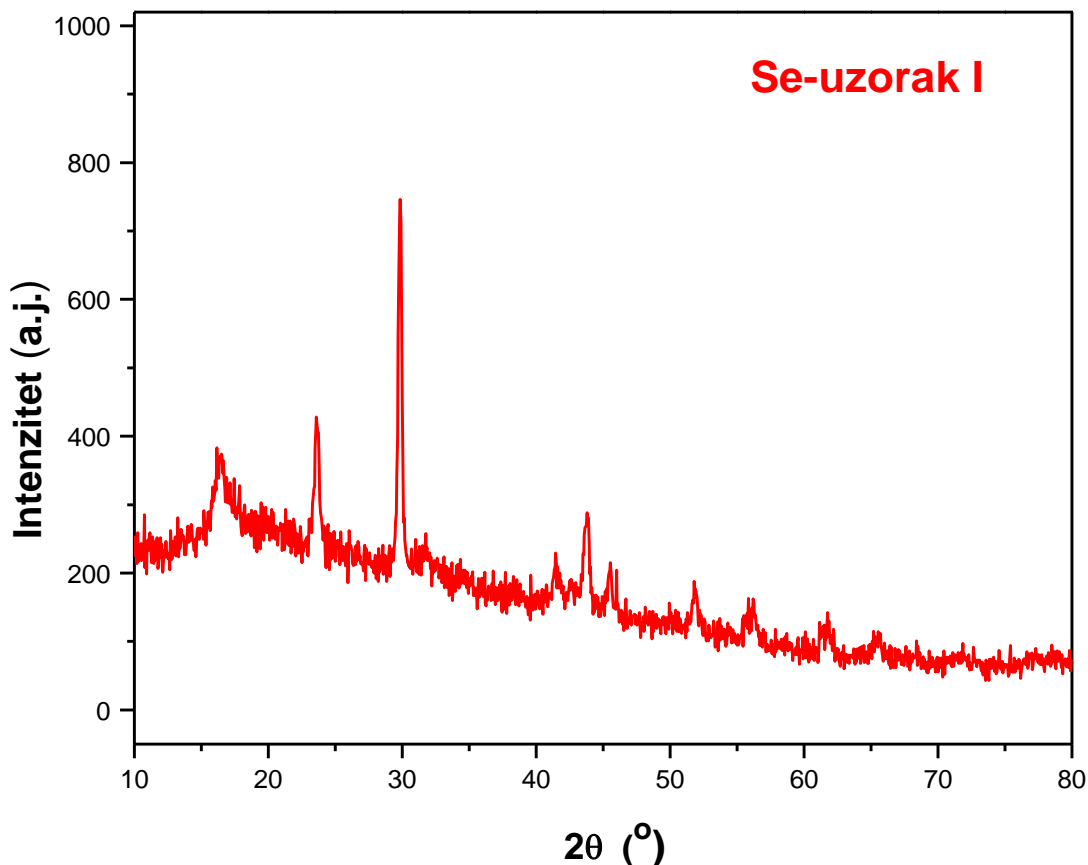
a negativni predznak potiče od PGA budući da ovaj polimer u vodenom rastvoru ima anjonski karakter.

Tabela 4.2.1.2 Parametri dobijeni ispitivanjem zeta potencijala SeNp označenih kao uzorci V i VI (tabela 4.2.1.1)

Uzorak SeNp	Hidrodin. radijus (nm)	PdI	ZP (mV)
Se-PGA (V)	96,5 (0,9)	0,133 ±0,009	-23,6 ±0,7
Se-BSA (VI)	79,64 ±0,69	0,118 ±0,015	29,6 ±0,8

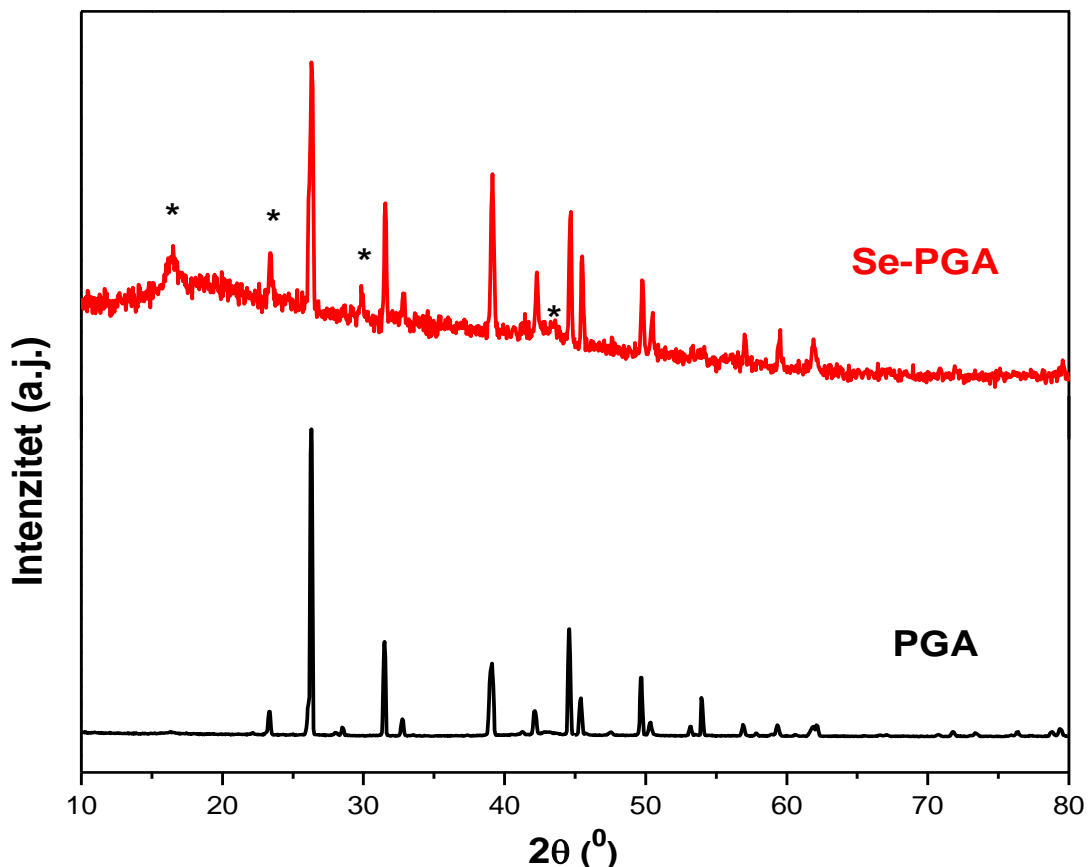
4.2.2 Ispitivanja kristalnog stanja uzoraka SeNp

Da bismo dalje potvrdili rezultate dobijene SAED tehnikom liofilizirani uzorci dobijeni sa manjom koncentracijom PGA, uzorak V, i manjom koncentracijom BSA, uzorak VI, su podvrgnuti XRD analizi. Poređenja radi snimljen je i difraktogram uzorka sintetisanog bez dodatka stabilizatora, uzorak I (slika 4.2.2.1). Kao što se može videti sa tog difraktograma prisutno je par pikova koji ukazuju na kristalnu strukturu sa jedne strane dok sa druge strane velike oscilacije u signalu i zakrivljena bazna linija (amorfni halo) ukazuju na prisustvo amorfne faze takođe. Najintenzivniji pikovi se javljaju na uglovima 2θ od 23,6, 29,85 i 43,8 stepeni. U poređenju sa difraktogramom monokristala Se hexagonalne strukture, dostupne preko kristalografske baze **RRUFF™ (ID : R050656)** može se zapaziti odgovarajuće poklapanje položaja pikova i odnosa njihovih intenziteta. Na ovaj način je potvrđeno da kristalna faza kod uzorka bez stabilizatora, uzorak I, potiče od Se. Sa termodinamičkog aspekta, budući da je trigonalna (heksagonalna) forma selena najstabilnija, verovatno je došlo do spontanog prelaza elementarnog selena iz amornog u kristalno uređenje ali ne u celoj zapremini uzorka. U radu koji su objavili *Pinto* i koautori pokazano je slično ponašanje kod nanočestica Se za vreme njihovog stajanja na sobnoj temperaturi [187]. Sa druge strane, treba napomenuti da sam proces liofilizacije favorizuje uređenje kratkog dometa tj. amornost.



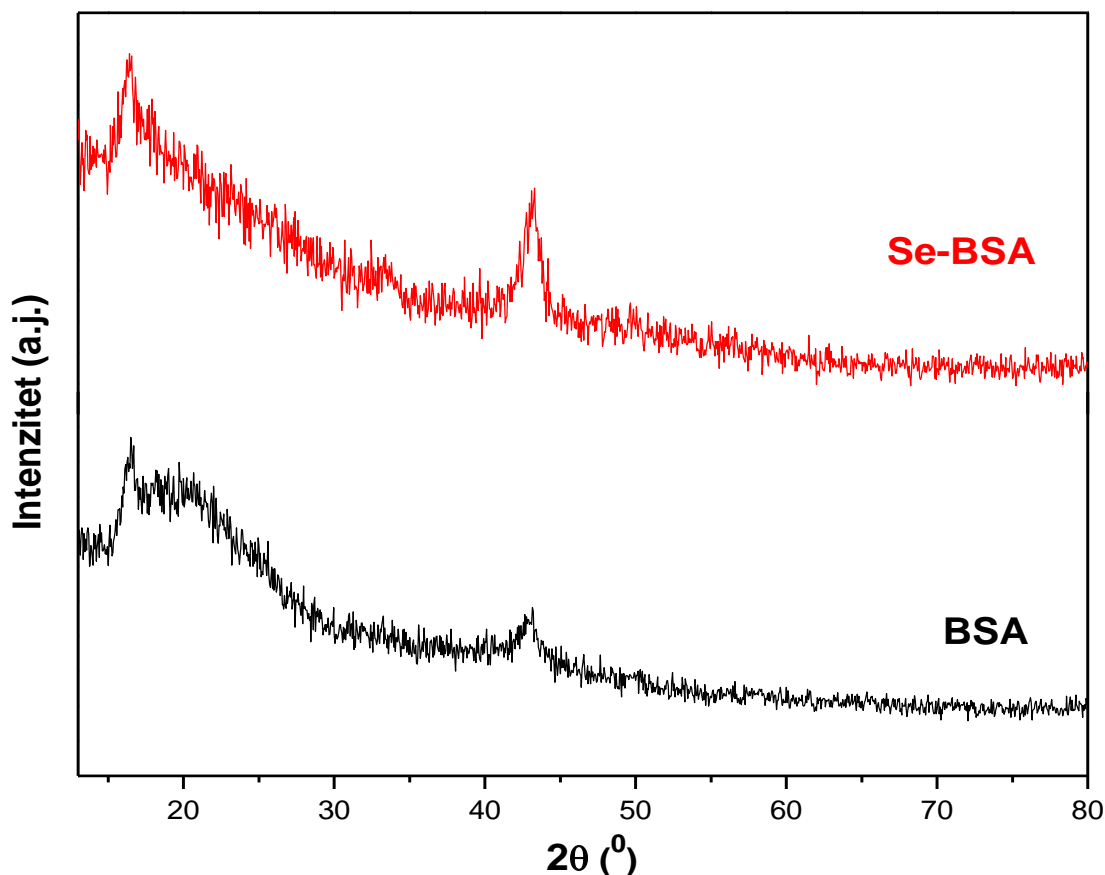
Slika 4.2.2.1 Difraktogram liofiliziranog praha Se, uzorka pripremljenog bez dodatka stabilizatora (uzorak I, tabela 4.2.1.1)

Kod uzorka sintetisanog sa manjom koncentracijom PGA (uzorak V), mogu se zapaziti brojne refleksije, te se može reći da je kod ovog uzorka kristalno uređenje zastupljenije nego kod prethodnog uzorka (slika 4.2.2.2). Na istoj slici je poređenja radi prikazan difraktogram PGA koji je korišćen u sintezi. Veliko podudaranje u pikovima između ova dva difraktograma potvrđuje prisustvo PGA. Pikovi koji nisu identifikovani da potiču od PGA se poklapaju sa pikovima uzorka I (slika 4.2.2.1).



Slika 4.2.2.2 Difraktogram liofiliziranog praha Se sintetisanog uz upotrebu veće koncentracije PGA (V). Radi boljeg poređenja dat je i difraktogram praha PGA koji je korišćen u sintezi.

Potpuno drugačiji difraktogram je dobijen nakon snimanja uzorka VI (slika 4.2.2.3). Ovde je takođe, radi poređenja, dat uporedni prikaz difraktograma komercijalnog BSA koji je korišćen u sintezi. Ono što je odmah uočljivo jeste da nema promena u izgledu difraktograma koje bi ukazale na prisustvo kristalne faze. Rezultati sa XRD-a su u dobrom slaganju sa rezultatima SAED analize i ukazuju na to da BSA ne samo da utiče na morfologiju i veličinu čestica selena već sprečava njihovu kristalizaciju.



Slika 4.2.2.3 Uporedni prikaz difraktograma liofiliziranog praha Se sintetisanog uz upotrebu manje koncentracije BSA i veće koncentracije vitamina C (uzorak VI) i difraktograma praha BSA koji je korišćen u sintezi [119].

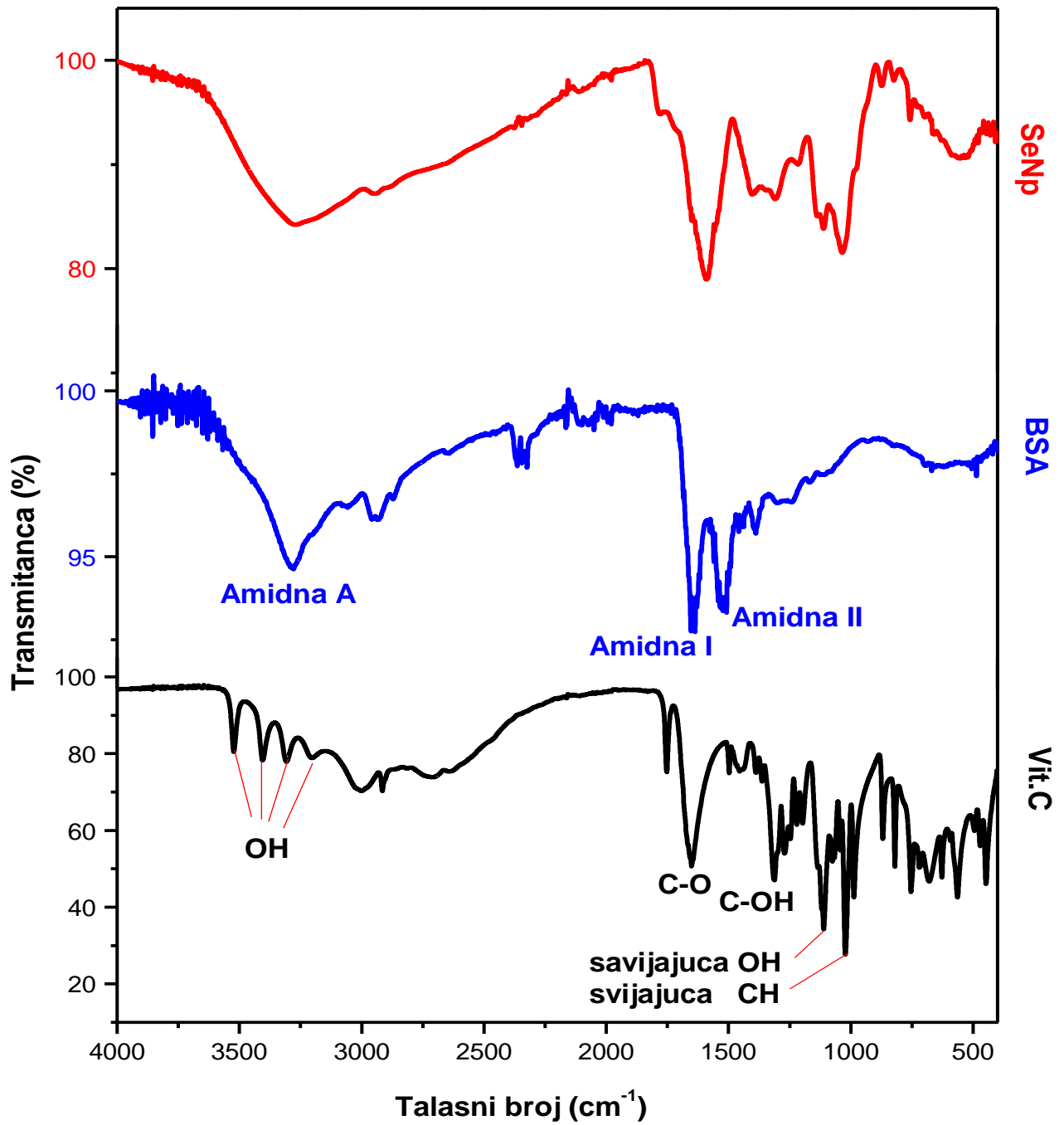
Imajući u vidu sve navedene rezultate, uzorak VI sintetisan uz upotrebu manje koncentracije BSA i veće koncentracije vitamina C je uzorak kod koga su uspešno dobijene amorfne nanočestice selena (SeNp) sferne morfologije. Takođe iz prikazanih rezultata mogu se izvesti dva bitna zaključka po pitanju sinteze SeNp redukcijom selenita uz pomoć askorbinske kiseline. Prvi je da je BSA pogodniji stabilizator od PGA za sintezu amorfni nanočestica Se a drugi da molski odnos između redukcionog sredstva i prekursora ima jak uticaj na veličinu čestica, na uniformnost u pogledu veličine i morfologije čestica i na kraju na stabilnost uzorka. Molski odnos koji je utvrđen kao najoptimalniji je 5:1 u korist askorbinske kiseline. Sva dalja ispitivanja fizičko-hemijskih i bioloških svojstava su urađena na uzorku VI.

4.2.3 Kvalitativna analiza SeNp – Vibraciona spektroskopija

Kako bi ispitali interakciju između BSA i nanočestica Se urađena je **FTIR spektroskopija** uzorka VI. Na slici 4.2.3.1 dat je uporedni prikaz SeNp, komercijalnog praha BSA i vitamina C. U tabeli 4.2.3.1 sumirana je i identifikovana većina traka koje su zapažene kod svih uzorka. Ono što se može odmah uočiti na spektrima BSA i uzorka VI je dominantna široka traka (brdo) na strani viših talasnih brojeva, tačnije između $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ koja potiče od istežućih vibracija N-H* i O-H veza [188]. Takođe, imajući u vidu da su oba uzorka liofilizirana verovatno sadrže malu količinu vode a i zbog kompleksne strukture samog BSA postoje brojne intra- i intermolekulske vodonične veze koje utiču na formiranje brda u ovako širokom intervalu talasnih brojeva. Sa druge strane, na spektru vitamina C**, uticaj okoline na krutost O-H veze je jasno izražen kroz više razdvojenih pikova koji se zapažaju u ovom intervalu. Krećući se ka nižim talasnim brojevima kod BSA i vitamina C uočavaju se trake slabijeg intenziteta koje potiču od C-H istežućih vibracija u regionu talasnih brojeva oko 2900 cm^{-1} , koje se na uzorku SeNp-VI gotovo ne uočavaju. Najintenzivniji pikovi u spektru ovog uzorka se javljaju na sledećim talasnim brojevima: 1588, 1403, 1308, 1112 i 1034 cm^{-1} .

* Kod proteina ova traka se naziva amidna A traka

** Vitamin C je kristalna supstanca i ne adsorbuje vodu kao što je to slučaj sa proteinima, ugljenim hidratima itd.



Slika 4.2.3.1 FTIR spektri liofiliziranog praha SeNp (uzorak VI) kao i prahova BSA i vitamina C koji su korišćeni u sintezi

Tabela 4.2.3.1 Asignacija traka i njihove vrednosti talasnih brojeva dobijeni sa FTIR spektara liofiliziranog praha SeNp (uzorak VI) i komercijalnih prahova vitamina C i BSA koji su korišćeni u sintezi.

Asignacija	SeNp	BSA[188]	Vit. C[189]
Amidna A traka	~ 3270 b	~3300 b	
O-H istežuće vibracije			3523, 3404, 3308, 3203 m
C-H istežuće vibracije	-	Više traka u intervalu 2872-2958 m	
C-H istežuće vibracije	-		Više traka u intervalu 2715-3000
C=O istežuće vibracije	1780 s		1752 m
Amidna I traka	1651 s 1588 j	Više traka u intervalu 1637-1655 j	
C-O istežuće vibracije			1651 j
Amidna II traka	1557 s	Više traka u intervalu 1508-1541 s	-
C-C istežuće vibracije		-	1496 s
Amidna III traka	1403 m	1388 m	
C-OH istežuće vibracije	1308 m		1312 j
OH savijajuće vibracije	1112 m	-	1110 j
C-H savijajuće vibracije	1034 j	-	1022 j

j-traka jakog intenziteta; **m**-traka srednjeg intenziteta; **s**-traka slabog intenziteta; **b**-širok pik, brdo.

Posmatrano sa strane spektara BSA i vitamina C, navedene trake u uzorku VI se mogu identifikovati preko traka ovih jedinjenja u čistom stanju, koje se javljaju na sličnim talasnim brojevima. Najintenzivnije trake kod BSA su amidna I (pozicionirana u intervalu talasnih brojeva 1637-1655 cm^{-1}) i amidna II (smeštena u intervalu 1508-1541 cm^{-1}). Ove trake su karakteristične za proteine i nastaju usled istežućih vibracija C=O veze* i savijajućih vibracija N-H veze**, respektivno.

* ~80% amidne I trake potiče od vibracije C=O veze a ostatak od vibracije C-N veze

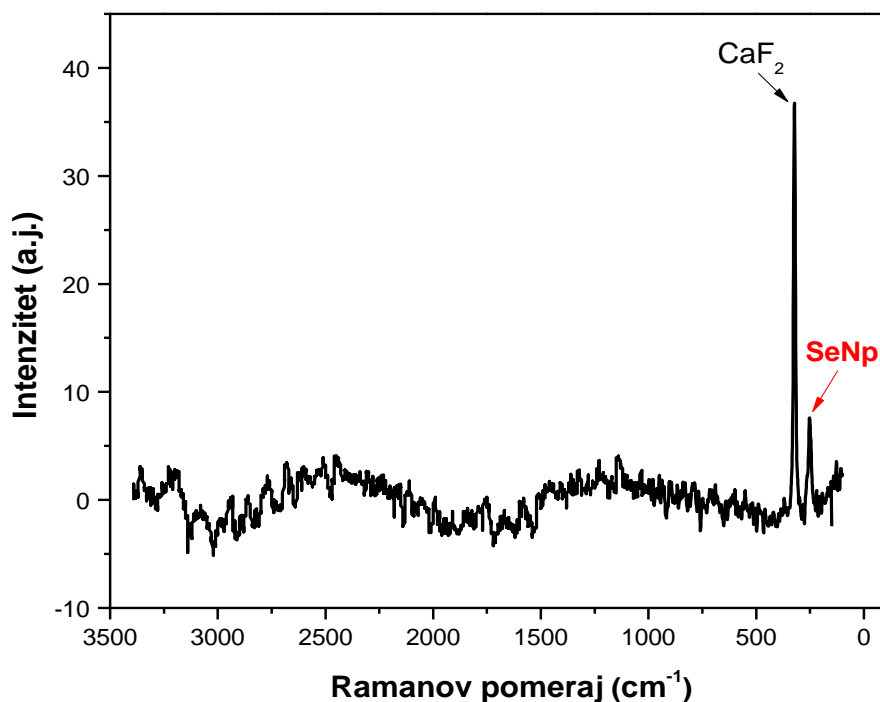
** 40-60% amidne II trake potiče od savijajućih vibracija CN-H veze dok ostatak potiče od istežućih vibracija C-N i C-H veza

Generalno gledano obe ove veze su uključene u formiranju vodoničnih veza između različitih molekulskih grupa unutar proteina, pa se smatra se da su pozicija i izgled amidnih traka glavni pokazatelji sekundarne strukture proteina [190]. Gledano kroz amidnu I traku, sekundarna struktura proteina se sastoji od udela α -heliksa koji je postavljen u središnjem delu pika, β -ploče koji formiraju kraj pika ka manjim talasnim brojevima i nasumičnih spirala koje formiraju kraj pika ka većim talasnim brojevima [191]. Budući da se kod uzorka VI uočava široka traka jakog intenziteta na 1588 cm^{-1} , što je između pozicija amidnih traka BSA, kao i da na spektru vitamina C nema trake na sličnoj vrednosti talasnih brojeva može se zaključiti da se sekundarna struktura samog proteina izmenila tokom procesa sinteze kao i da je došlo do interakcije sa nanočesticama Se. Ostaci amidnih traka se mogu pronaći kao pikovi malog intenziteta locirani sa jedne i druge strane ove široke trake.

Iako se BSA može često naći u literaturi kao stabilizator nanočestica Se [98] sam mehanizam stabilizacije do sada nije u potpunosti objašnjen. Na osnovu rezultata merenja zeta potencijala i FTIR spektara može se pretpostaviti da je adsorpcija BSA na površinu SeNp jedan od glavnih procesa. Što se tiče ostalih traka koje su izražene u spektru uzorka VI u oblasti nižih talasnih brojeva, logičan zaključak bi bio da potiču od zaostataka vitamina C koji je dodat u višku tokom procesa sinteze. Upoređivanjem ova dva spektra, trake na 1308, 1112 i 1034 potiču od C-OH istežućih, O-H savijajućih (u ravni) i C-H savijajućih (u ravni) vibracija respektivno.

Još jedna tehnika vibracione spektroskopije koja je korišćena za kvalitativnu analizu sintetisanih SeNp jeste **ramanska spektroskopija**. Takođe, ovom tehnikom se može potvrditi kristalno/amorfno uređenje selena. Poznato je da se kod amornog selena na ramanskim spektrima javlja pik na oko 250 cm^{-1} koji je identifikovan kao A1 simetrično istežući mod [192]. Ovaj pik se javlja usled vibracije lanaca i amornih prstenova koje formiraju atomi selena. Sa druge strane kod trigonalne strukture, simetrično istežuće vibracije se javljaju na oko 233 cm^{-1} [193]. Ramanski spektar uzorka VI je prikazan na slici 4.2.3.2. Treba napomenuti da je spektar dobijen snimanjem na tečnom uzorku pošto je snimanje na liofiliziranom uzorku bilo nemoguće zbog izražene fluorescencije. Fluorescencija je

takođe zabeležena i na tečnom uzorku samo znatno manjeg intenziteta, tako da je prikazani spektar dobijen nakon softverske korekcije za fluorescenciju.



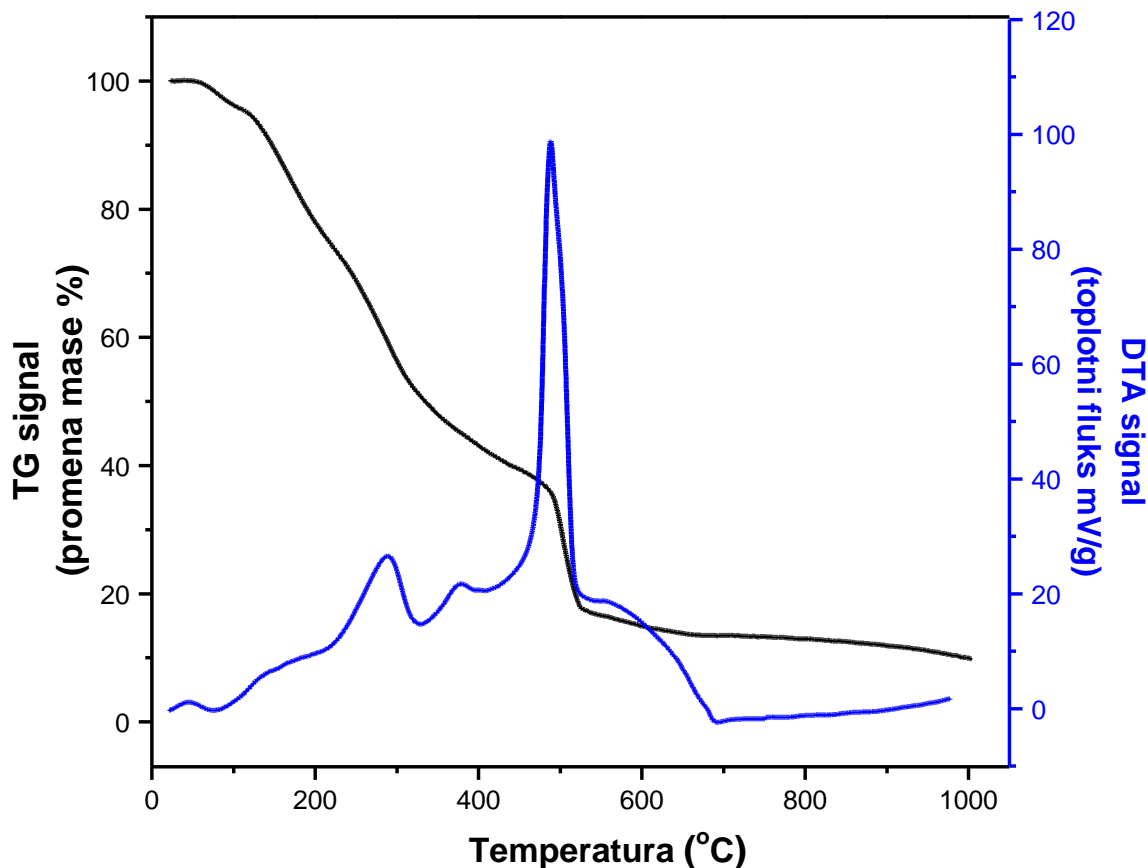
Slika 4.2.3.2 Ramanski spektar koloidnog rastvora SeNp

Na spektru se mogu uočiti dva pika. Prvi, intenzivniji na 322 cm^{-1} potiče od nosača CaF_2 (Prilog 3) dok se drugi na 251 cm^{-1} može pripisati nanočesticama seleno amorfne strukture. Na ostatku spektra se ne uočavaju dodatni pikovi koji su očekivani na osnovu rezultata FTIR spektroskopije što se verovatno može pripisati efektu fluorescencije, budući da je signalna linija najviše pogođena ovim efektom u oblasti srednjih talasnih brojeva.

4.2.4 Ispitivanja termalnih osobina liofiliziranog praha SeNp

Metode termalne analiza se često koriste u kompozitnim sistemima jer su brojna fizička svojstva samog kompozita uslovljena sastavom pojedinačnih supstituenata ali i stepenom njihove međusobne interakcije. Takođe, kod farmaceutskih preparata bitna karakteristika je njihova stabilnost kako bi se jasno

definisali uslovi skladištenja. Rezultati termogravimetrijske analize zajedno sa diferencijalnom termijskom analizom uzorka SeNp-VI su prikazani na slici 4.2.4.1.



Slika 4.2.4.1. TG-DTA dijagram dobijen snimajem liofiliziranog praha SeNp-VI

Prva promena signalne DTA linije u vidu endotermnog efekta se može uočiti na oko 80 °C i javlja se usled oslobađanja adsorbovane vode iz uzorka. Nakon ovog događaja signalna linija dobija egzotermni karakter što kulminira pojavom prvog egzotermnog pika na temperaturi od 297,2 °C. Sa daljim porastom temperature uočava se najpre drugi egzotermni pik dosta manjeg intenziteta na 389.9 °C nakon čega se javlja najdominantniji egzotermni pik na temperaturi od 502 °C. Pojava egzotermnih pikova na DTA krivi može biti okarakterisana kao pojava oksidacije uzorka tokom njegove dekompozicije, tj. sagorevanja uzorka. Što se tiče TGA krive, liofilizirani uzorak je zagrevan do 1000 °C i ono što se najpre može zaključiti je da je na kraju procesa zagrevanja preostalo 9.9% početne mase uzorka. Prvi pad mase

odgovara endotermnom događaju sa DTA krive tj. gubitku adsorbovane vode. Ovaj gubitak je procenjen na oko 5%. Nakon toga sledi intenzivniji pad mase koji u nižem temperaturnom intervalu verovatno predstavlja gubitak vezane vode (budući da uzorak sadrži BSA i da je liofiliziran). U ovom intervalu gubitak mase je oko 20 %, što ukupno sa adsorbovanom vodom iznosi 25% ukupne mase uzorka. Na ovaj proces se nadovezuje proces termalne degradacije. Posmatrano sa stanovišta DTA krive u oblasti prvog egzoternog pika gubitak mase je oko 24 %, u oblasti drugog pika je 6% i u oblasti trećeg pika 25%. Imajući u vidu kompleksan sastav uzorka VI teško je proceniti koja komponenta sagoreva u ovim procesima. Ono što je interesantno po pitanju amorfnog Se jeste da bi usled zagrevanja trebalo da prolazi najpre kroz fazni prelaz kristalizacije a potom da dolazi do topljenja te kristalne faze na temperaturama oko 250 °C. Nijedan od ovih prelaza nije detektovan na uzorku VI. Objašnjenje ovog fenomena je da je stabilizacija čestica pomoću BSA sprečila kristalizaciju Se, a da je sa nastavkom zagrevanja došlo do oksidacije Se. Prisustvo vitamina C u ovom uzorku nije detektovano budući da kao kristalna supstanca ima oštar i intenzivan pik na temperaturi oko 210 °C [194].

4.2.5 Kvantitativno određivanja selena u koloidnom rastvoru SeNp

Za kvantitativnu analizu nanočestica selena u koloidnom rastvoru, uzorak VI, korišćena je atomska emisiona spektroskopija uz pomoć induktivno spregnute plazme za atomizaciju uzorka ICP-AES. Rezultati dobijeni na osnovu dva ponovljena merenja su prikazani u tabeli 4.2.5.1. Merenja su rađena u različitim vremenskim intervalima. Druga šarža SeNp (II-SeNp) je dalje upotrebljena za sintezu PCL/SeNp, i njena vrednost je korišćena prilikom izračunavanja efikasnosti inkorporiranja SeNp. Na osnovu vrednosti dobijene za obe šarže može se zaključiti da je reproduktivnost metode sinteze dobra i da je koncentracija amorfnih nanočestica selena u koloidnom rastvoru 634.5 ± 15.5 mg/kg.

Tabela 4.2.5.1 Koncentracije Se određene metodom ICP-AES iz različitih šarža koloidnog rastvora SeNp.

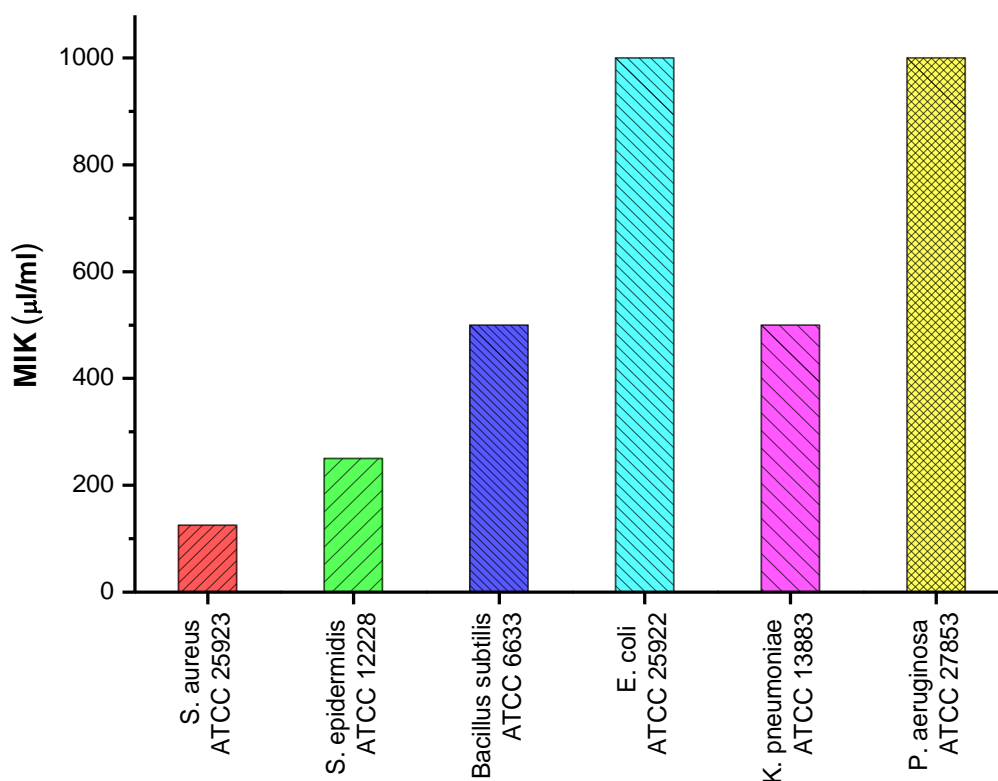
UZORAK	I šarža	II šarža
SeNp-Uzorak VI	640 mg/kg	629 mg/kg

4.2.6 Ispitivanje antimikrobne aktivnosti sintetisanih nanočestica selena

Iako se nanočestice selena ne kategorišu kao jak antimikrobni agens, u poslednjih par godina evidentan je porast istraživanja koja se bave ovom tematikom. Na osnovu literature, raspon između koncentracija koje imaju pozitivno dejstvo i koncentracija koje mogu imati toksični efekat je širi u slučaju nanočestica selena nego u slučaju drugih oblika ovog mikroelementa [98]. Takođe selen je fiziološki prisutan u ljudskom telu i utvrđeno je da ima višestruku ulogu za zdravlje čoveka. Na slici 4.2.6.1 prikazan je grafik uticaja koloidnog rastvora SeNp na inhibiciju šest različitih bakterijskih sojeva. Ono što je interesantno je da je najveća osetljivost postignuta kod sojeva *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis* koje pripadaju Gram-pozitivnim bakterijama. Pored ovih sojeva, osetljivost je detektovana i kod Gram-pozitivnog soja *Bacillus subtilis*. Što se tiče bakterija iz roda *Staphylococcus* poznato je da predstavljaju jedne od najčešćih uzročnika tzv. bolničkih ili nozokomijalnih infekcija*, pogotovo kada se radi o soju *Staphylococcus aureus* [119]. *Staphylococcus epidermidis* u normalnim uslovima nije patogena bakterija i uglavnom nastanjuje kožu i sluzokožu ljudi. Međutim, kod ljudi koji su bili izloženi nekoj hirurškoj intervenciji ili su duže smešteni u zdravstvenoj ustanovi ovaj bakterijski soj često izaziva infekcije na mestu gde se nalazi strano telo poput katetera ili implantiranih materijala [195]. Zbog toga se svrstava u oportunističke bakterijske sojeve. Glavna opasnost od bolničkih infekcija izazvanih ovim bakterijskim sojevima jeste ta što su uglavnom otporne na

* Infekcije koje se javljaju kod pacijenata, medicinskog i nemedicinskog osblja unutar zdravstvenih ustanova. Najčešće se javljaju se usled pada imuniteta i uglavnom ne reaguju na standardnu antibiotsku terapiju.

standardnu antibiotsku terapiju. Osetljivost soja *Staphylococcus aureus* na prisustvo SeNp je dvostruka veća u odnosu na *Staphylococcus epidermidis*, 125 naspram 250 µg/ml. Od tri soja Gram-negativnih bakterija, nešto veća osetljivost je zabeležena samo kod soja *Klebsiella pneumoniae* koji takođe može dovesti do infekcija pluća, kosti, srca itd. kod pacijenata kod kojih je imunitet već oslabljen [119] dok preostala dva soja (*Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*) nisu pokazala osetljivost na ispitanu koncentraciju SeNp.



Slika 4.2.6.1 Rezultati antibakterijske aktivnosti koloidnog rasvora SeNp ispitane na 6 bakterijskih sojeva. Antibakterijska aktivnost je ispitana Bujon-mikrodilucionom tehnikom u koncentracionom opsegu koloidnog rastvora SeNp 1000- 12,5 µg/ml. Rezultati dobijeni za sojeve *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli* su deo publikacije [119].

U poređenju sa literaturnim podacima, rezultat dobijen za *S. aureus* je u skladu sa istraživanjima koje su sproveli D.M. Cruz i saradnici kao i G. Guisbiers i saradnici [114,115]. Međutim treba naglasiti da se u prvom slučaju radi o SeNp koje su sintetisane biološkim putem (biosinteze), dok su u drugom istraživanju korišćene nanočestice selena sintetisane laserskom ablacijom. U oba slučaja

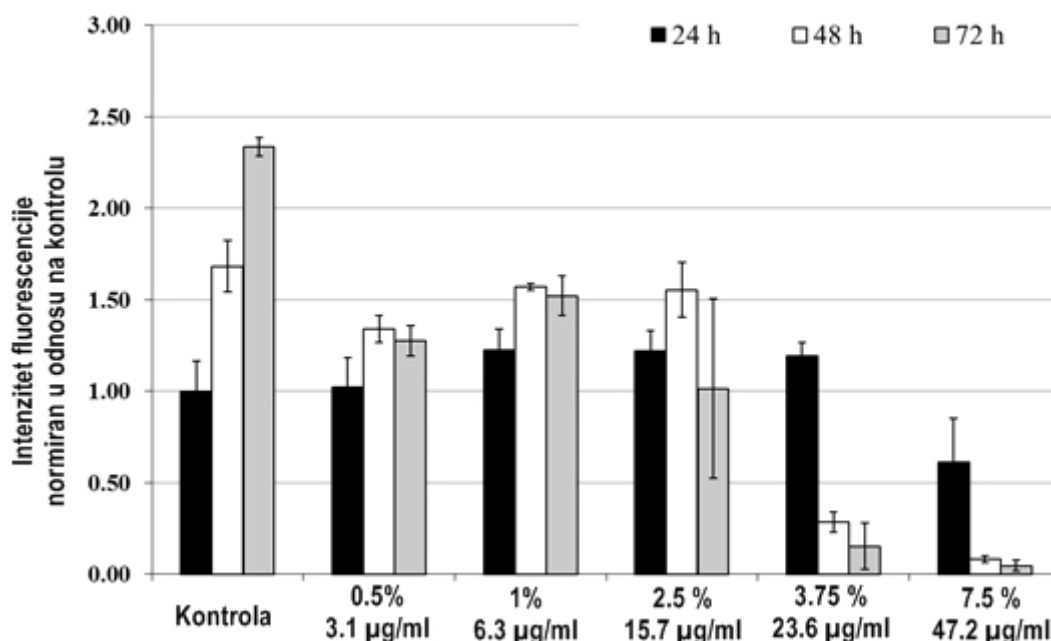
prečnici korišćenih SeNp su oko 100 nm ali je interesantno da se u oba rada navodi značajniji antibakterijski efekat prema soju *E. coli* što nije slučaj kod uzorka VI. Objašnjenje može biti usled razlika u površinskoj hemiji samih čestica tj. da BSA favorizuje interakciju sa Gram-pozitivnim bakterijama. Selektivni antibakterijski efekat SeNp prema Gram-pozitivnim sojevima je prijavljen i u istraživanju *P. Tran*-a i saradnika, sa nanočesticama selena istih dimenzija ali sintetisanih uz dodatak PVA kao stabilizatora [112]. Sa druge strane ako se posmatraju podaci u literaturi koji se tiču antibakterijskih ispitivanja SeNp stabilisanih BSA, *P. Tran* i *J. Webster* su u svom radu pokazali da koncentracije od 31 µg/ml zaustavljaju razmnožavanje ćelija *S. aureus* već nakon 3h od inkubiranja a baktericidni efekat se postiže na ~ 40 % ispitivanih bakterija [111].

Se je mikroelement koji je bitan za normalan metabolizam i zdravlje kostiju. Efekti Se na metabolizam kostiju su sumirani u radu Zeng-a i saradnika [89]. Imajući u vidu ovu činjenicu i rezultate antimikrobne aktivnosti SeNp prema *S. aureus* i *S. epidermidis*, u radu *Stevanovic et al.* predložena je primena SeNp za oblaganje skafolda na bazi biostakla koji bi se koristili za regeneraciju koštanog tkiva [119]. Ovaj materijal, pre oblaganja koloidnim rastvorom SeNp nije pokazivao nikakvu aktivnost prema pomenutim sojevima, a nakon oblaganja došlo je do njihove inhibicija rasta pri koncentracijama 250 i 500 µg/ml za *S. aureus* i *S. epidermidis* respektivno.

4.2.7 Antikancerogena aktivnost amorfnih nanočestica selena

Rezultati *in vitro* ispitivanja antikancerogene aktivnosti koloidnog rastvora SeNp su prikazani na slici 4.2.7.1. Kao što se može videti, u odnosu na kontrolu (proba koja sadrži ostale komponente osim prekursora- Na_2SeO_3), aktivnost ispitivanih HeLa ćelija se znatno menja u celom koncentracionom opsegu nakon inkubiranja u trajanju od 48 i 72 h. Merenja izvršena nakon 24 h od inkubiranja su pokazala da je vijabilnost HeLa ćelija smanjena u slučaju kada je upotrebljena koncentracija uzorka od 7,5% tj. 47,2 µg/ml čistog selena. SeNp ispoljavaju "odloženi" negativni efekat na deobu i vijabilnost HeLa ćelija. Koncentracija

koloidnog rastvora SeNp od 3,75% (23,6 $\mu\text{g/ml}$ samog Se) ispoljava snažan antikancerogeni efekat nakon 48 h.



Slika 4.2.7.1 Rezultati antikancerogenog efekta koloidnog rastvora SeNp ispitani na HeLa ćelijama u tri vremenska intervala (posle 24, 48 i 72 h). Relativni intenzitet fluorescencije je prikazan u zavisnosti od različite zapremine koloidnog rastvora SeNp tj. mase čistog Se. Kao kontrola korišćena je smeša rastvora vitamina C i BSA u istim koncentracijama kao i u uzorku SeNp-VI

Antikancerogeni efekat nanočestica selena je tema mnogih istraživanja u proteklih desetak godina i mehanizmi preko kojih se ovaj efekat ispoljava se mogu sumirati u tri grupe: (i) povećana produkcija reaktivnih kiseoničkih vrsta ROS, (ii) vezivanje za funkcionalne grupe koje sadrže sumpor (poput tiola) i (iii) modifikacija hromatina [196]. Međutim prilikom poređenja rezultata potrebno je imati na umu parametre poput veličine, morfologije i površinske hemije i njihov uticaj na interakciju sa ćelijama. Primera radi u istraživanju *Huang-a* i ostalih autora, pokazano je da nanosfere Se ispoljavaju najjači antikancerogeni efekat u poređenju sa nano-cevima, nano-šipkama i nanocilindrima [197]. U istom radu autori navode da nanosfere Se dovode do formiranja vakuola nakon procesa endocitoze. Njihovo gomilanje unutar interćelijskih segmenata na kraju dovodi do apoptoze. Koncentracije nanosfera Se koje su pokazale antikancerogeni efekat

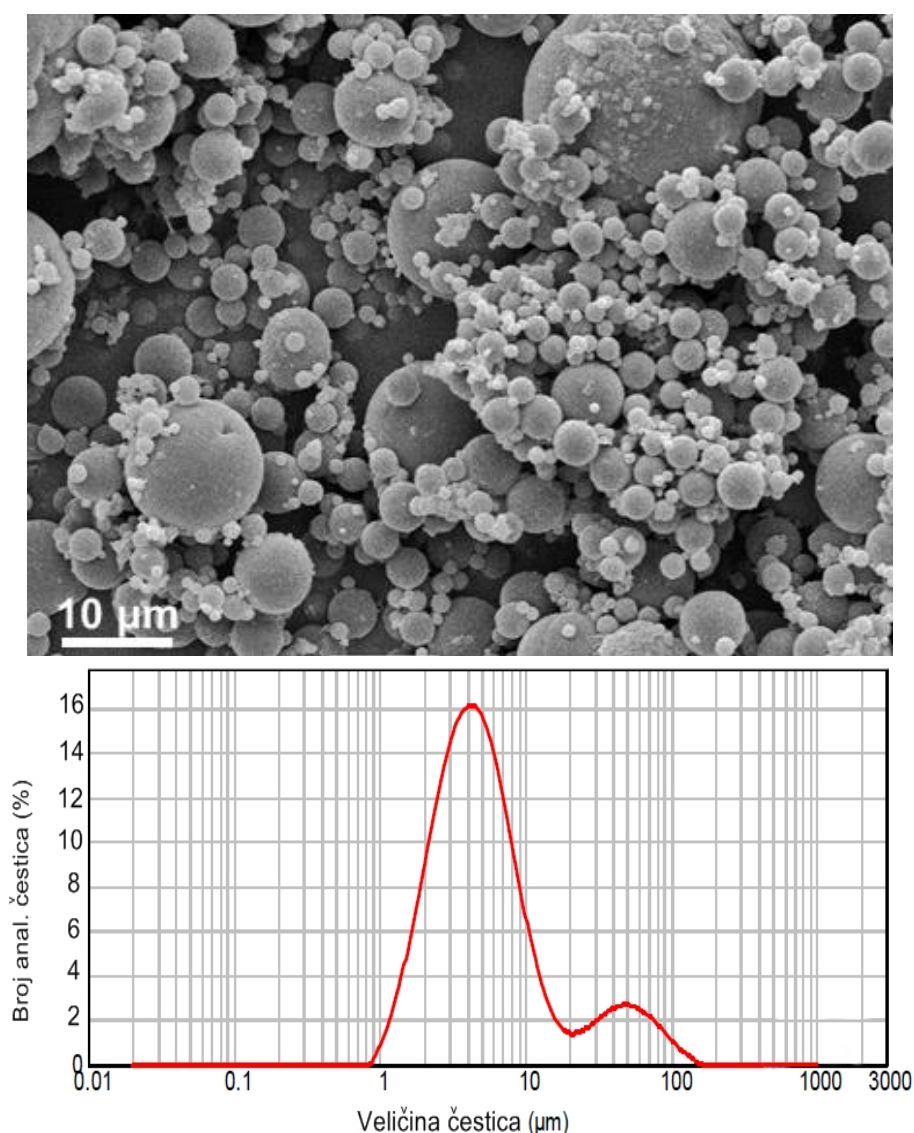
nakon 48 h su preko 50 $\mu\text{g/ml}$. Imajući u vidu da su ove nanosfere Se sintetisane bez upotrebe stabilizatora, i rezultate koji su dobijeni u okviru ove disertaciji, može se zaključiti da upotreba BSA za stabilizaciju SeNp pospešuje njihov antikancerogeni efekat prema HeLa ćelijama. Kada se radi o SeNp stabilisanim BSA, L Kong i ostali su pokazali da ovakve čestice inhibiraju rast ćelija karcinoma prostate i to tako da koncentracije SeNp od 100 μM dovode do smanjenja vijabilnosti ćelija od preko 60% nakon 48h, dok je pri istim uslovima nakon 24h zabeleženo dvostruko manje smanjenje [105].

4.3 Sinteza i karakterizacija biokompozita poli(ϵ -kaprolaktona) sa inkorporiranim nanočesticama selen

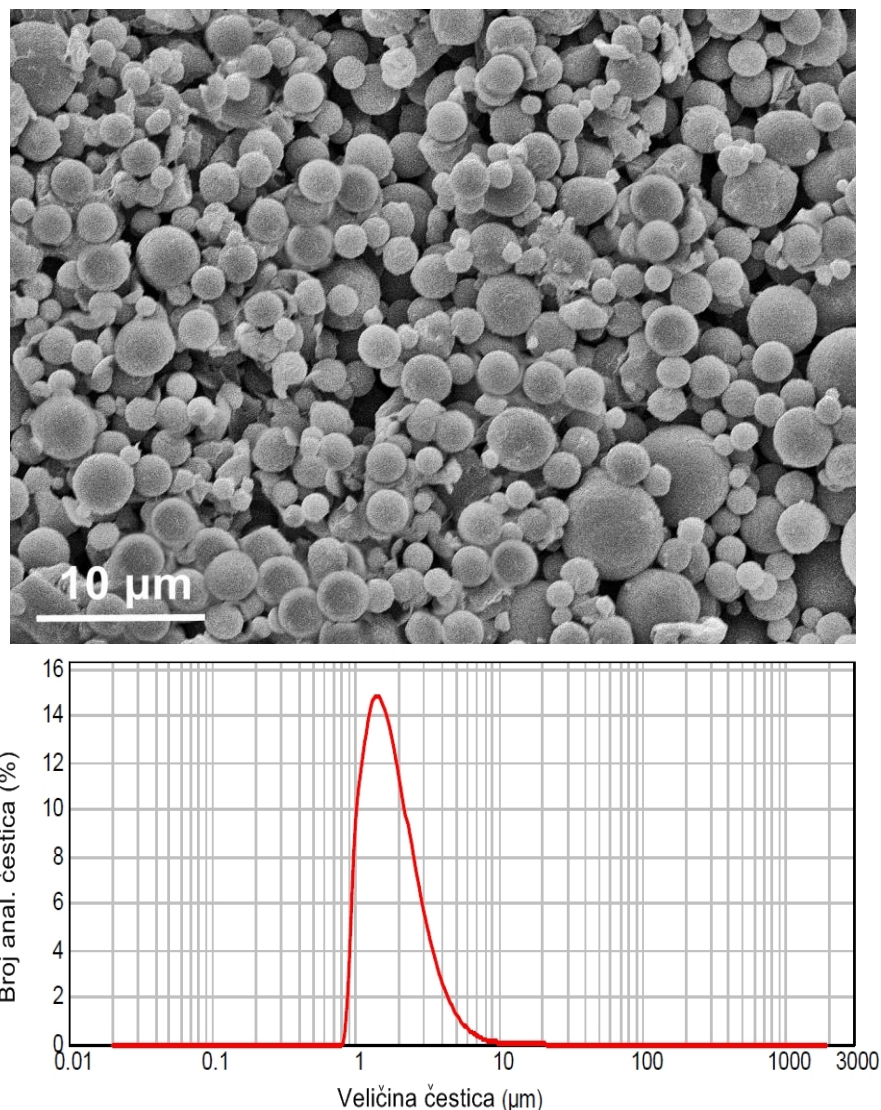
4.3.1 Ispitivanje morfoloških karakteristika čestica biokompozita PCL/SeNp

Morfologije prahova PCL/SeNp sintetisanih iz sistema hloroform/etanol i acetone/etanol i odgovarajuće raspodele veličina čestica su prikazane na slikama 4.3.1.1 i 4.3.1.2 respektivno. Kao što se može videti sa ovih SEM mikrografija, u oba slučaja dobijene su mikrosfere ali sa evidentnom razlikom u veličini i raspodeli. Kada je precipitacija polimera izvršena iz emulzije hloroforma i koloidnog rastvora SeNp dobijene su mikrosfere široke raspodele veličina. Zapravo rezultati dobijeni difrakcijom svetlosti ukazuju na bimodalnu raspodelu veličina, gde veći deo analiziranih čestica ima raspodelu u intervalu 1-10 μm , dok jedan manji broj analiziranih čestica ima znatno veći prečnik, oko 50 μm . Uska raspodela veličine čestica je bitna zato što, kao što je već pomenuto, mnoga svojstva mikro- i nanočestičnih sistema zavise od veličine samih čestica. Interakcija sa ćelijama, distribucija aktivne komponente i njeno otpuštanje su neka od tih svojstava koja su ujedno jako bitni parametri svakog sistema za kontrolisanu dostavu tako da u

slučaju široke raspodele veličina čestica nekog materijala ova svojstva neće biti jednaka u celokupnoj zapremini uzorka. Kada je inkorporiranje koloidnog rastvora SeNp vršeno iz polimernog rastvora u acetonu, dobijene su uniformnije mikrosfere. Prema podacima merenja raspodele veličine, 10% analiziranih čestica ima prečnik oko 1 μm , 50% njih je $\leq 1,6 \mu\text{m}$ a 90 % analiziranih čestica ima prečnik ispod 3,2 μm .



Slika 4.3.1.1 SEM mikrografija uzorka PCL/SeNp sintetisanog iz sistema hloroform/etanol i raspodela veličina čestica (dole)

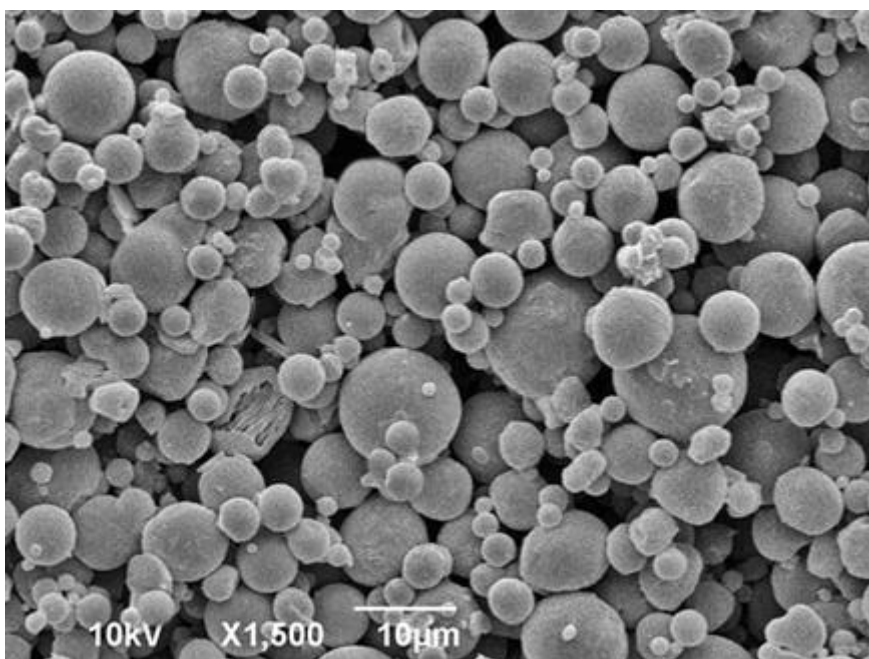


Slika 4.3.1.2 SEM mikrografija uzorka PCL/SeNp sintetisanog iz sistema aceton/etanol i raspodela veličina čestica (dole)

U slučaju čestica dobijenih kada su u sintezi korišćeni hloroform i etanol (slika 4.3.1.1), dobijena bimodalna raspodela veličina se može povezati sa nedovoljnom stabilnošću smeše hloroforma i koloidnog rastvora SeNp. Pošto se precipitacija odigrava usled difuzije rastvorenih polimernih lanaca u nerastvarač, homogenost sistema i viskozitet su odlučujući faktori u ovom procesu. Postizanje stabilne smeše hloroforma i SeNp je bitno i sa stanovišta efikasnog i ravnomernog inkorporiranja SeNp unutar polimerne matrice. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je izbor acetona i etanola kao rastvarača i nerastvarača u

sintezi, pogodniji za dobijanje mikrosfera PCL/SeNp homogene morfologije i veličine (slika 4.3.1.2) pa su dalji eksperimenti rađeni na ovom sistemu.

Kao što je to navedeno u eksperimentalnom delu, radi detaljnije i tačnije analize mikrosfera PCL/SeNp pripremljena je "prazna" proba koja ne sadrži SeNp. Morfologija "praznih" PCL čestica sintetisanih iz sistema aceton/etanol je prikazana na slici 4.3.1.3. Na osnovu prikazane mikrografije može se zaključiti da su i kod ovog uzorka dobijene čestice sferene morfologije ali nešto većih dimenzija nego što je to bio slučaj sa PCL mikrosferama u koje su inkorporirane SeNp. Kada se uporede prazne PCL sfere sintetisane kada su u sintezi korišćeni hloroform i etanol sa onima dobijenim kada su u sintezi korišćeni aceton i etanol, dolazi se do zaključka da je promena rastvarača polimera uticala na povećanje dimenzija čestica iz submikronskih u mikronske.

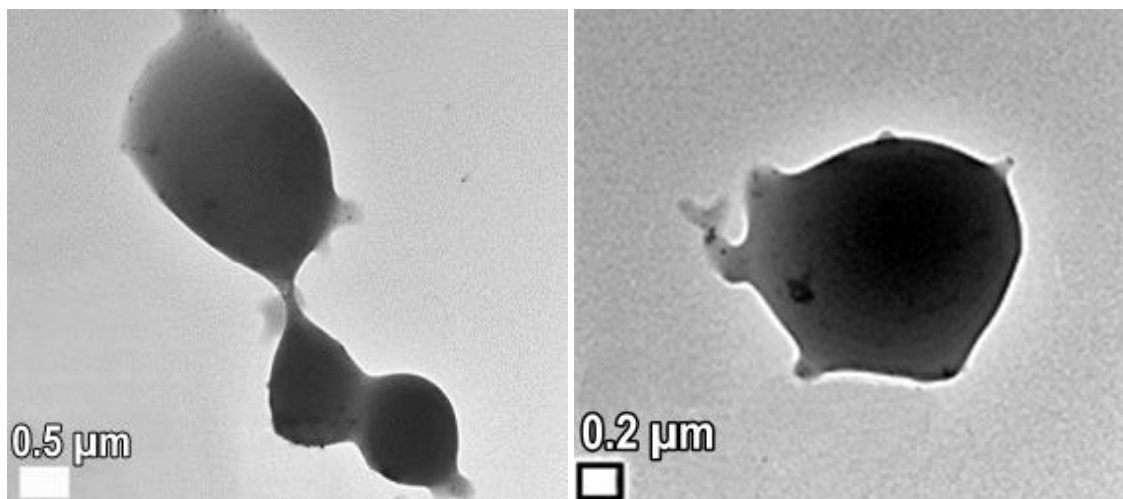


Slika 4.3.1.3 SEM mikrografija "praznih" PCL čestica sintetisanih iz sistema aceton/etanol

Efikasnost inkorporiranja (inkapsulacije) aktivne komponente u sistemima za kontrolisanu dostavu je jako bitan parameter koji govori o uspešnosti same metode sinteze. Kako je u prethodnom delu o karakterizaciji SeNp utvrđeno da je

koncentracija Se u koloidnom rastvoru $629 \mu\text{g/g}$ a rezultat analize praha dobijenog iz sistema aceton/etanol je $968 \pm 18^*$ $\mu\text{g/g}$ dolazi se do rezultata EI=92%, čime je dodatno potvrđeno da je ovaj postupak sinteze efikasan za inkorporiranje SeNp.

Dalja karakterizacija PCL/SeNp je nastavljena sa transmissionom mikroskopijom. Rezultujuće mikrografije su prikazane na slici 4.3.1.4. Na TEM slikama izolovanih čestica mogu se uočiti crne tačke koje potiču od SeNp. Kako je gustina SeNp znatno veća od gustine polimera, transmisija elektrona kroz ovaj materijala je smanjena što rezultira njihovom tamnijom slikom. Budući da su PCL čestice, u koje su inkorporirane SeNp, mikronskih dimenzija, nanočestice Se je moguće videti samo po obodu polimernih mikročestica jer je tu polimerni sloj najtanji.



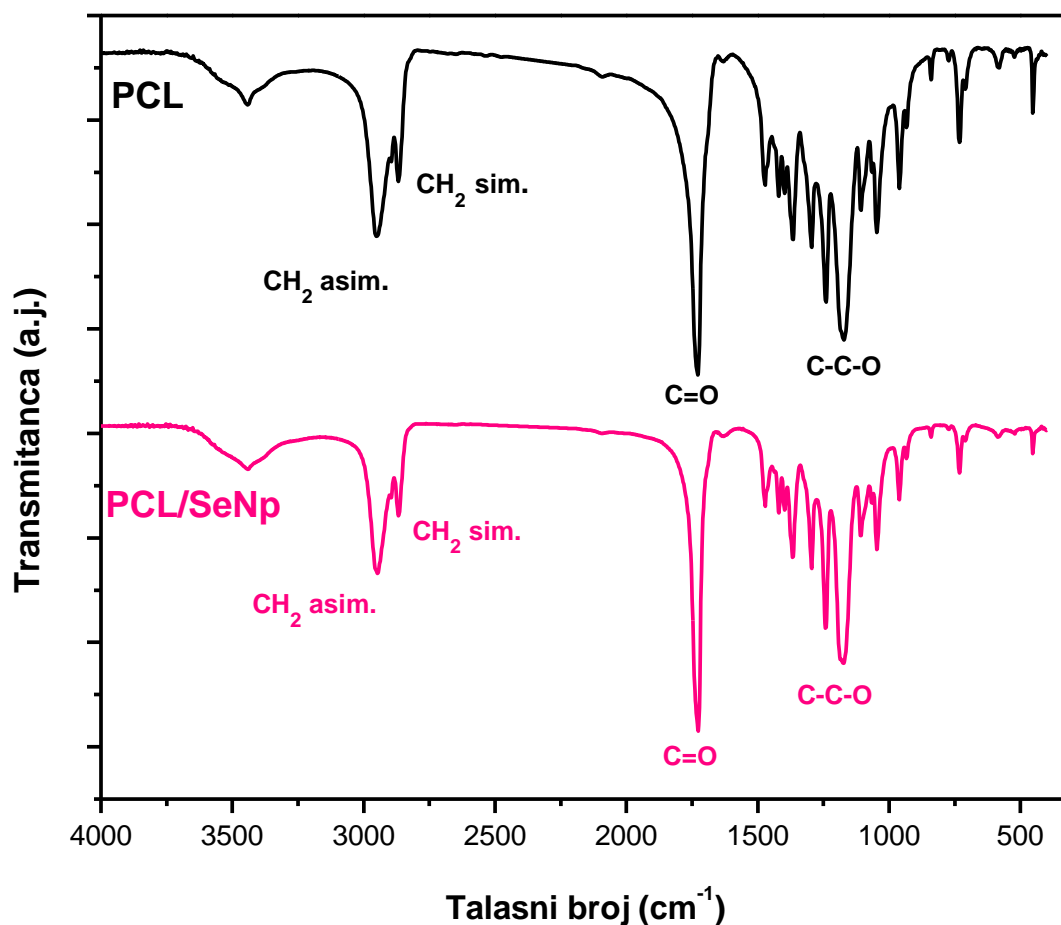
Slika 4.3.1.4 TEM mikorgrafije uzorka PCL/SeNp sintetisane iz sistema aceton/etanol. Na česticama je moguće videti crne tačke koje potiču od SeNp.

* Ova vrednost je dobijena kao srednja vrednost dva nezavisna merenja izvršena u različitim vremenskim intervalima na istom uzorku

4.3.2 Kvalitativna analiza biokompozita PCL/SeNp- Ispitivanje interakcije SeNp i PCL tokom procesa inkorporiranja unutar PCL mikrosfera metodom FTIR spektroskopije

Tokom inkapsulacije ili inkorporiranja aktivne komponente unutar polimerne matrice odgovarajućeg nosača, često se dešava da dođe do izvesne interakcije između njih. Da li će doći do interakcije zavisi od hemijskog karaktera supstituenata ali i od načina inkapsulacije i prirode medijuma koji su korišćeni u sintezi. Bilo kakva interakcija jačeg intenziteta na relaciji nosača i aktivne komponente uglavnom nije poželjna jer može uticati na bioaktivnost aktivne komponente i na njen proces otpuštanja. Kako je u prethodnom delu pokazano da postoji jaka interakcija između BSA i Se moguća interakcija između sistema SeNp-BSA i PCL-a je ispitana metodom IC spektroskopije. U tu svrhu snimljen je spektar i praznih mikročestica PCL-a, poređenja radi. Uporedni prikaz ova dva spektra je dat na slici 4.3.2.1. Ono što je odmah uočljivo jeste da ne postoji pojava neke nove trake koja bi poticala od inkorporiranog koloidnog rastvora SeNp. Sve trake se pojavljuju na istim talasnim brojevima i sličnog su intenziteta.

Na FTIR spektrima se nalaze sve karakteristične trake za PCL. Osim njih ne uočavaju se nikakve dodatne trake što se može objasniti činjenicom da je, gledano po sastavu, PCL dominantna hemijska vrsta u sistemu PCL/SeNp koja aktivno apsorbuje IC zračenje u intervalu talasnih brojeva sličnim uzorku SeNp. Nije zabeleženo ni pomeranje traka koje bi potencijalno ukazivalo na neku vrstu interakcije između PCL i SeNp, što dovodi do pretpostavke da su čestice SeNp samo fizički "zarobljene" u polimernim mikrosferama.

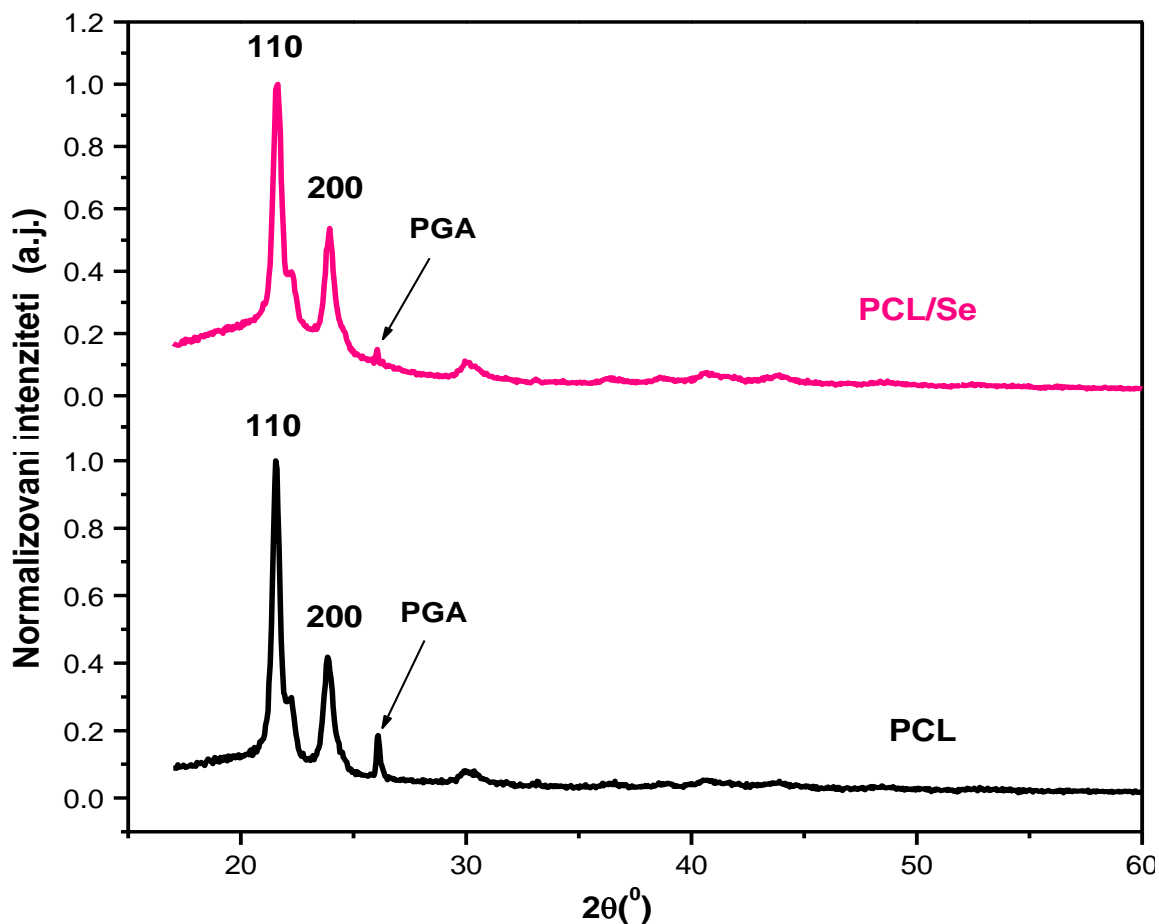


Slika 4.3.2.1 Uporedni prikaz FTIR spektara PCL mikrosfera sa i bez inkorporiranih SeNp.

4.3.3 Ispitivanja kristalne strukture biokompozita PCL/SeNp

Za dalja ispitivanja mikrostrukture biokompozita PCL/SeNp primenjena je XRD analiza sintetisanog praha. Poređenja radi snimljen je i difraktogram mikrosfera PCL-a koje ne sadrže SeNp. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 4.3.3.1. PCL je poznat kao semikristalan materijal i njegova kristalna struktura se proučavala još od sredine prošlog veka [198,199]. Dve dominantne refleksije koje su karakteristične za PCL potiču sa kristalnih ravni 110 i 200 i javljaju se pri uglovima 2θ od $21-22^\circ$ i $23-24^\circ$, respektivno [162]. Na difraktogramima uzoraka PCL i PCL/SeNp ovi pikovi se javljaju na $21,55^\circ$ i $23,85^\circ$ tj. $21,65^\circ$ i $23,95^\circ$. Pored ovih pikova zabeležena je i slabija refleksija na $26,1^\circ$ koja potiče od PGA (slika 4.2.2.2.).

Ako se difraktogrami pogledaju pažljivije može se zapaziti da je signalna linija kod uzorka PCL/Se podignuta u intervalu uglova od 15-30°. Ako se uzme u obzir difraktogram SeNp (4.2.2.3) dolazi se do zaključka da je podizanje signalne linije prouzrokovano prisustvom amorfne vrste ovog kompozitnog materijala tj. SeNp.



Slika 4.3.3.1 Difraktogrami prahova PCL-a sa i bez inkorporiranih SeNp

Polimeri su semikristalni materijali sa kristalnim domenima čije se veličine (debljine kristalita) najčešće kreću u intervalu 10-100 nm [200]. Za proračun veličine kristalita korišćene su širine oba pika na polovinama njihovih visina. Kod polimernih tj. semikristalnih materijala pikovi nisu uski i simetrični kao kod materijala sa boljim kristalnim uređenjem ili monokristala. Zbog toga je prilikom računanja veličine kristalita bitno formirati dobru baznu liniju. Bazna linija pika je dobijena uz pomoć programa Origin 8.5 podešavanjem u šest tačaka (dve pre

početka pika, dve ispod samog pika i dve nakon završetka pika). Ovaj metod je primenjen za sve uzorke. Dobijene veličine kristalita su prikazane u tabeli 4.3.3.1.

Tabela 4.3.3.1 Veličine kristalita dobijenih iz difraktograma prahova PCL-a sa i bez inkorporiranim SeNp. Proračuni su rađeni za dve najintenzivnije refleksije.

Uzorak	$D_{(110)}$ (Å)	$D_{(200)}$ (Å)
PCL	208	216
PCL/SeNp	180	180

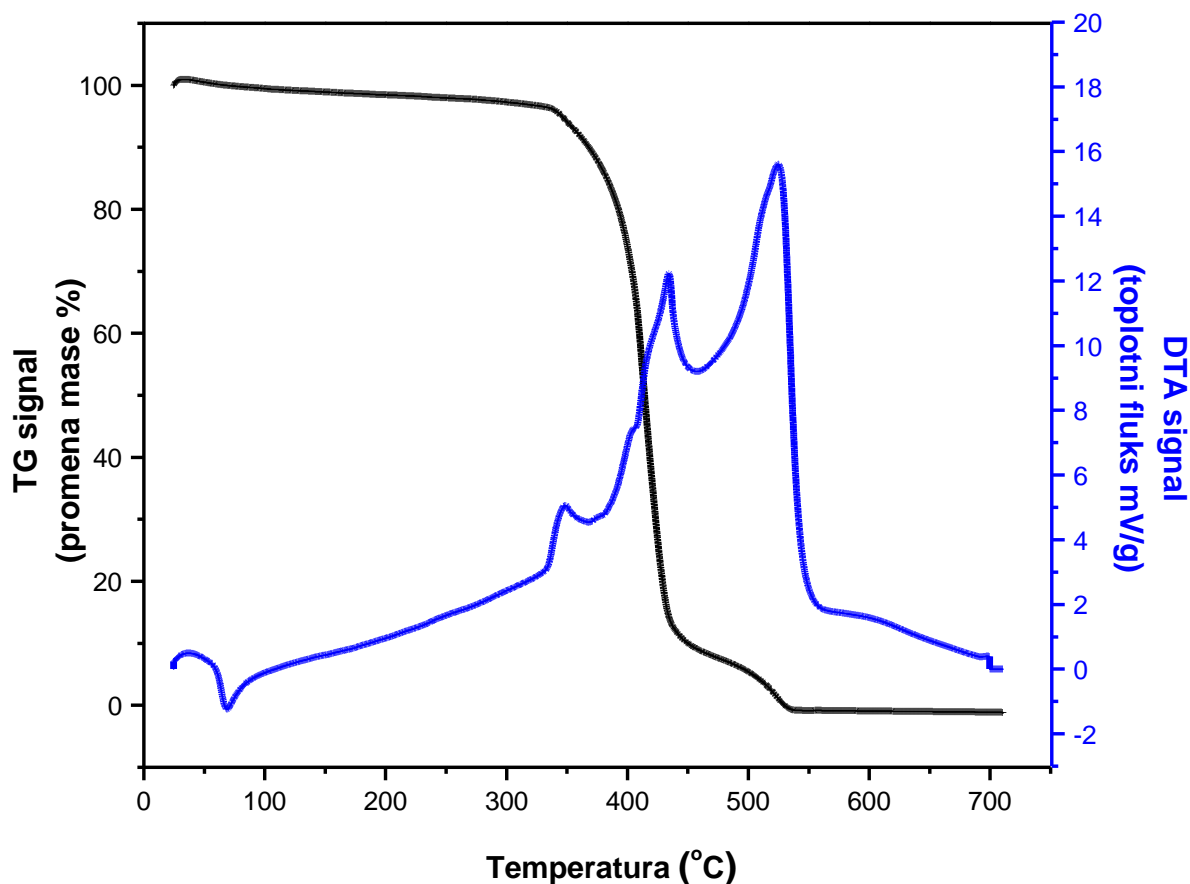
Kao što se može videti primetan je mali pad u veličini kristalita kod uzorka koji sadrži SeNp, što se može objasniti blagim suzbijanjem pakovanja polimernih lanaca u kristalne domene usled prisustva amorfnih nanočestica Se.

4.3.4 Termalna analiza biokompozita PCL/SeNp

Termalna analiza sintetisanog biokompozita PCL/SeNp je izvršena u istim uslovima kao kod liofiliziranog uzorak SeNp. Termogravimetrijski signal i signal sa diferencijalne termijske analize su uporedno prikazani kako bi se detektovani događaji posmatrali i sa stanovišta promene mase i sa stanovišta promene temperature unutar uzorka. Kada se radi o DTA signalu zapaženo je nekoliko pojava. Prva je endotermna promena izazvana topljenjem PCL-a koja se odigrava na temperaturi oko 68°C. Nakon nje slede tri egzotermne promene koje se odigravaju na temperaturama 349, 434 i 625°C. Imajući u vidu vrednosti ovih temperatura i sastav ispitivanog uzorka jasno je da su egzotermne promene posledice sagorevanja uzorka tj. njegove termalne dekompozicije. Ovo se može potvrditi posmatrajući signal promene mase. Naime posle malog kontinuiranog pada mase od oko 4% uočava se oštar pad mase od gotovo 83% koji počinje na temperaturi približnoj prvom egzotermnom piku sa DTA krive a završava se na sličnoj temperaturi na kojoj je zabeležen drugi egzotermni pik sa DTA krive oko 450 °C. Naredni pad mase od preostalih 13% nije tako oštar kao prethodni ali se završava na oko 540 °C što je blizu završetka poslednje egzotermne promene.

Ujedno, na osnovu TG krive, uočava se da je na ovoj temperaturi sagorela sva količina mikrosfera PCL/SeNp.

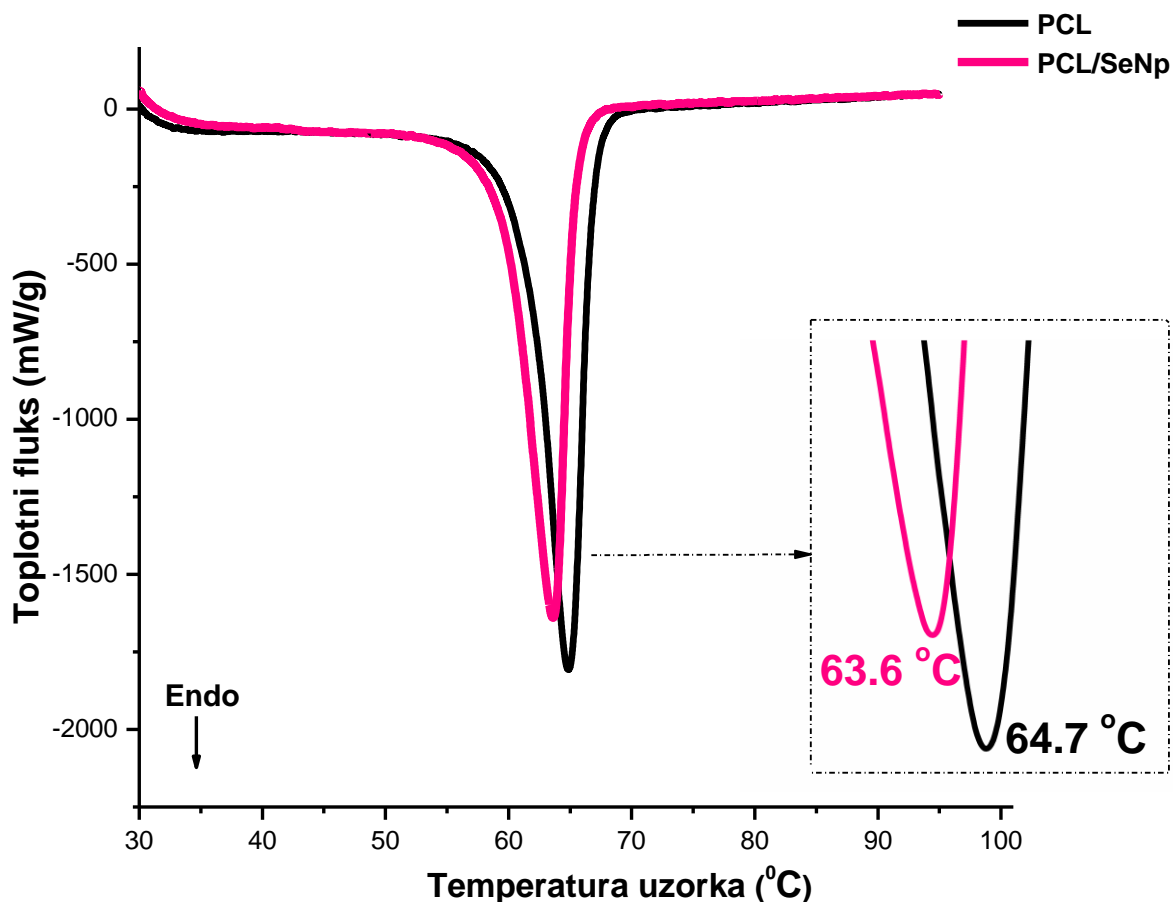
Na osnovu prikazanih rezultata sa DTA krive može se zaključiti da kod PCL/SeNp nema tragova kristalne faze Se i pretpostavlja se da je celokupna količina SeNp zadržala amorfno uređenje tokom procesa njihovog inkorporiranja unutar PCL mikrosfera.



Slika 4.3.4.1 TG-DTA analiza biokompozita PCL/SeNp

Za detaljniju analizu mikrosfera PCL/SeNp upotrebljena je još jedna tehnika termalne analize – DSC. Prednost ove tehnike je u kvantifikaciji fazne promene koja izaziva promenu signala u odnosu na referentnu posudu [137]. Zato se, između ostalog, ova tehnika često koristi za brzu i laku proveru stepena kristaliničnosti kod polimernih materijala. Stepen kristaliničnosti polimernih materijala se može

još određivati i iz XRD difraktograma, FTIR spektara, NMR spektara itd. Međutim treba nomenovati da vrednosti koje se dobijaju DSC analizom predstavljaju masenu frakciju (izraženu u %) kristalnih domena unutar polimera, dok recimo stepen kristaliničnosti izračunat XRD analizom predstavlja zapreminsku frakciju. Zbog toga vrednosti stepena kristaliničnosti dobijeni različitim metodama ne treba koristiti za precizna poređenja i često se njihove vrednosti razlikuju. Kada se radi o inkapsulaciji/inkorporiranju aktivnih komponenti u polimernu matricu može doći do promene stepena kristaliničnosti. Tako, je u radu M.J. Rashid-a i otalih autora prijavljeno da inkapsulacija BSA u mikrosfere PCL-a dovodi do povećanja stepena kristaliničnosti, jer molekuli BSA služe kao nukleacione klice i pospešuju kristalizaciju [201]. Na slici 4.3.4.2 dat je uporedni prikaz DSC dijagrama PCL mikrosfera sa i bez inkorporiranih SeNp u oblasti temperatura gde se odigrava topljenje polimera. Poređenjem oblika endoterme topljenja može se zaključiti da ne postoji značajnija razlika poput širenja pika, pojačane asimetričnosti itd. koja bi ukazivala na interakciju sa SeNp. Ipak mala promena jeste primećena u pogledu površine pikova i njihovih minimuma tj. temperature topljenja. Sa inkorporiranjem SeNp došlo je do pada temperature topljenja sa 64,7 na 63,6 °C kao i do smanjenja entalpije sa 84,5 na 76,8 J/g. Kada se ove vrednosti unesu u jednačinu za izračunavanja stepena kristaliničnosti (odjeljak 3.2.3.2.4, jednačina 5) dobija se pad sa 60 na 55%. Smanjenje temperature topljenja kod polimera može biti posledica smanjenja debljine polimernih kristalnih domena . Imajući u vidu rezultate dobijene XRD analizom, potvrđeno je da je, tokom kristalizacije PCL-a izazvane difuzijom u nerastvarač, pakovanje polimernih lanaca u lamelarne strukture otežano prisustvom amorfne vrste tj. SeNp. Iako veličina kristalita i stepen kristaliničnosti polimera ne moraju biti povezani, suzbijanje formiranja kristalnih domena zbog "zarobljenih" SeNp je verovatno dovelo i do blagog smanjenja stepena kristaliničnosti.



Slika 4.3.4.2 Uporedni prikaz DSC krive PCL čestica sa i bez inkorporiranog SeNp. Na slici se se vidi i-uvećani deo dijagrama u oblasti temperatura topljenja.

4.3.5 Ispitivanja degradacije biokompozita PCL/SeNp u fiziološkim uslovima

Kod biodegradabilnih polimera jedna od ključnih karakteristika koja u velikoj meri određuje njegovu potencijalnu aplikaciju jeste brzina i mehanizam degradacije. Mehanizam degradacije PCL-a je dobro poznat i opisan u uvodnom delu. Međutim brzina degradacije je uslovljena raznim faktorima poput geometrijom uzorka, morfologijom i veličinom čestica, hemijskom prirodom degradacionog medijuma itd. [202] Samim tim otpuštanje aktivne komponente je direktno povezano sa ovim parametrima. U radu J.C. Jeong-a i saradnika pokazano je da je jedan od ključnih parametara koji određuju brzinu otpuštanja iz PCL mikrosfera zapravo kristalna mikrostruktura [77].

Kako bi se što preciznije ispitale promene kristalne strukture, stepen kristaliničnosti i koncentracije oslobođenog SeNp iz PCL čestica tokom degradacije u različitim medijumima, svi eksperimenti su urađeni na istom sistemu, čija je detaljna karakterizacija data u prethodnom delu. Na ovaj način su pomenute karakteristike iste kod svih uzoraka a sve promene izazvane samo uticajem degradacionog medijuma i perioda degradacije.

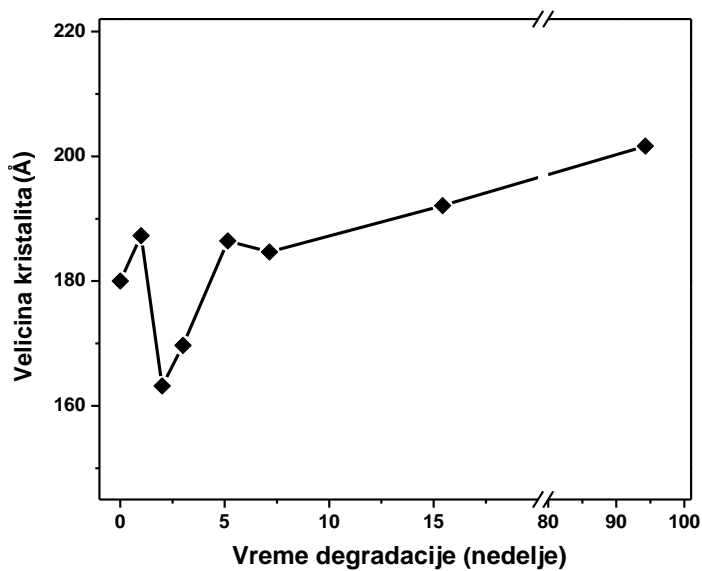
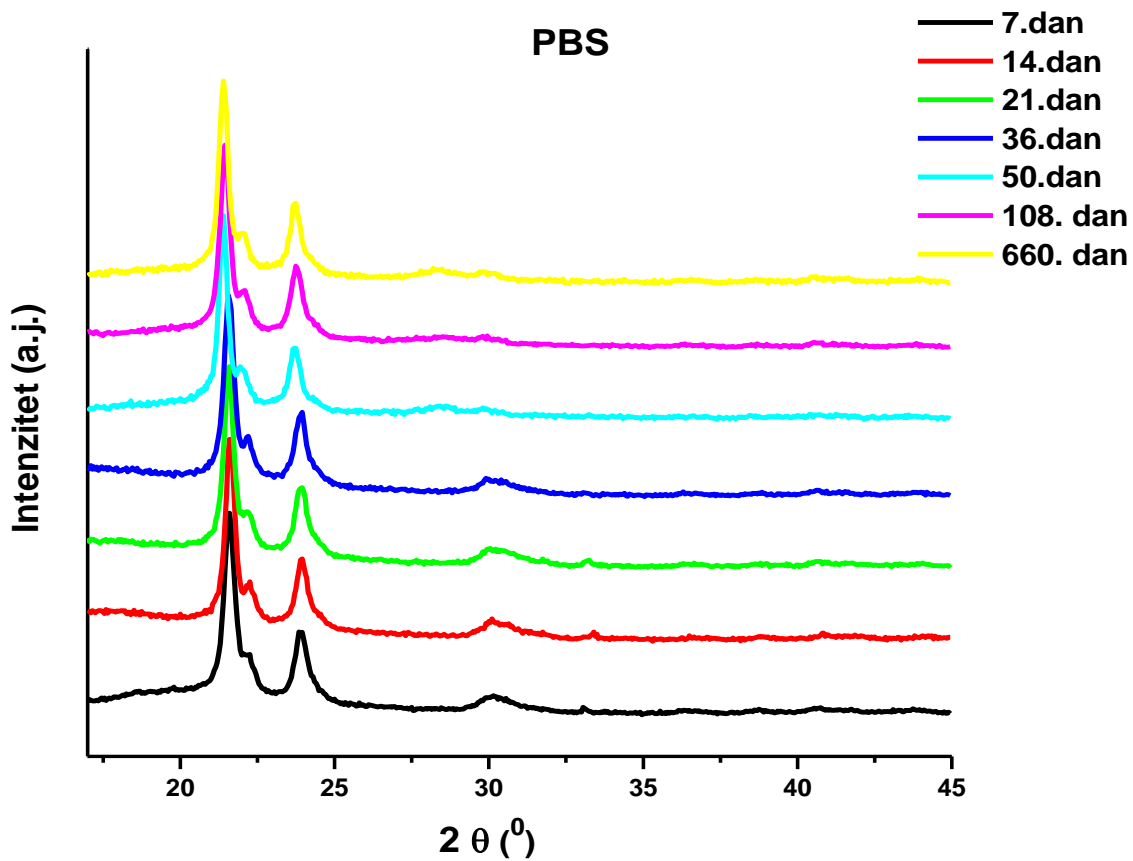
4.3.6 Uticaj procesa degradacije na kristalnu strukturu biokompozita PCL/SeNp

Svi XRD difraktogrami uzoraka koji su odvajani nakon različitih vremenskih perioda degradacije (7, 14, 21,36, 50, 108 i 660 dana) iz različitih medijuma koji sadrže rastvor PBS-a, rastvor lipaze izolovane iz pankreasa svinje u PBS-u ili 0,1M rastvor HCL-a prikazani su na slikama 4.3.6.1-4.3.6.3 respektivno. U poređenju sa difraktogramom PCL/SeNp koji će u ovom razmatranju biti nazivan 0-ti uzorak, na svim difraktogramima se može odmah uočiti odsustvo pika koji potiče od PGA. Kako je PGA rastvoran u vodi, očigledno je da su interakcije molekula vode sa hidrofilnim krajevima ovog polimera nadjačale njegovu adsorpciju na površinu PCL mikrosfera. Drugi zaključak koji se može doneti jeste da nema pojave novih refleksija koje bi potencijalno ukazivale na kristalizaciju SeNp. Za detaljniju analizu kristalne strukture primenjena je Šererova jednačina (odjeljak 3.2.3.2.3, jednačina 3). Prilikom odabira pika na osnovu koga će se ispitati veličina kristalita biraju se pikovi najvećeg intenziteta i dobre simetrije. Najintenzivniji pik kod PCL-a je onaj koji potiče sa ravni (110) ali ovaj pik nije simetričan jer kod njega dolazi do preklapanja sa pikom koji potiče od refleksije sa ravni (111) ali je manjeg intenziteta. Kao rezultat pojavljuje se proširenje sa strane većih uglova. Iako se u literaturi može sresti da autori koriste ovaj pik za proračun veličine kristalita, tokom eksperimenta u tu svrhu korišćen je pik koji potiče od refleksija sa ravni (200). Rezultati veličine kristalita su prikazani ispod difraktograma odgovarajućih medijuma. Ono što je uočljivo za sva tri medijuma jeste da dolazi do sličnog profila oscilacije veličini kristalita, ali se ove oscilacije razlikuju od medijuma do medijuma, u pogledu intenziteta i vremenskog interval u kome se javljaju. Kada se

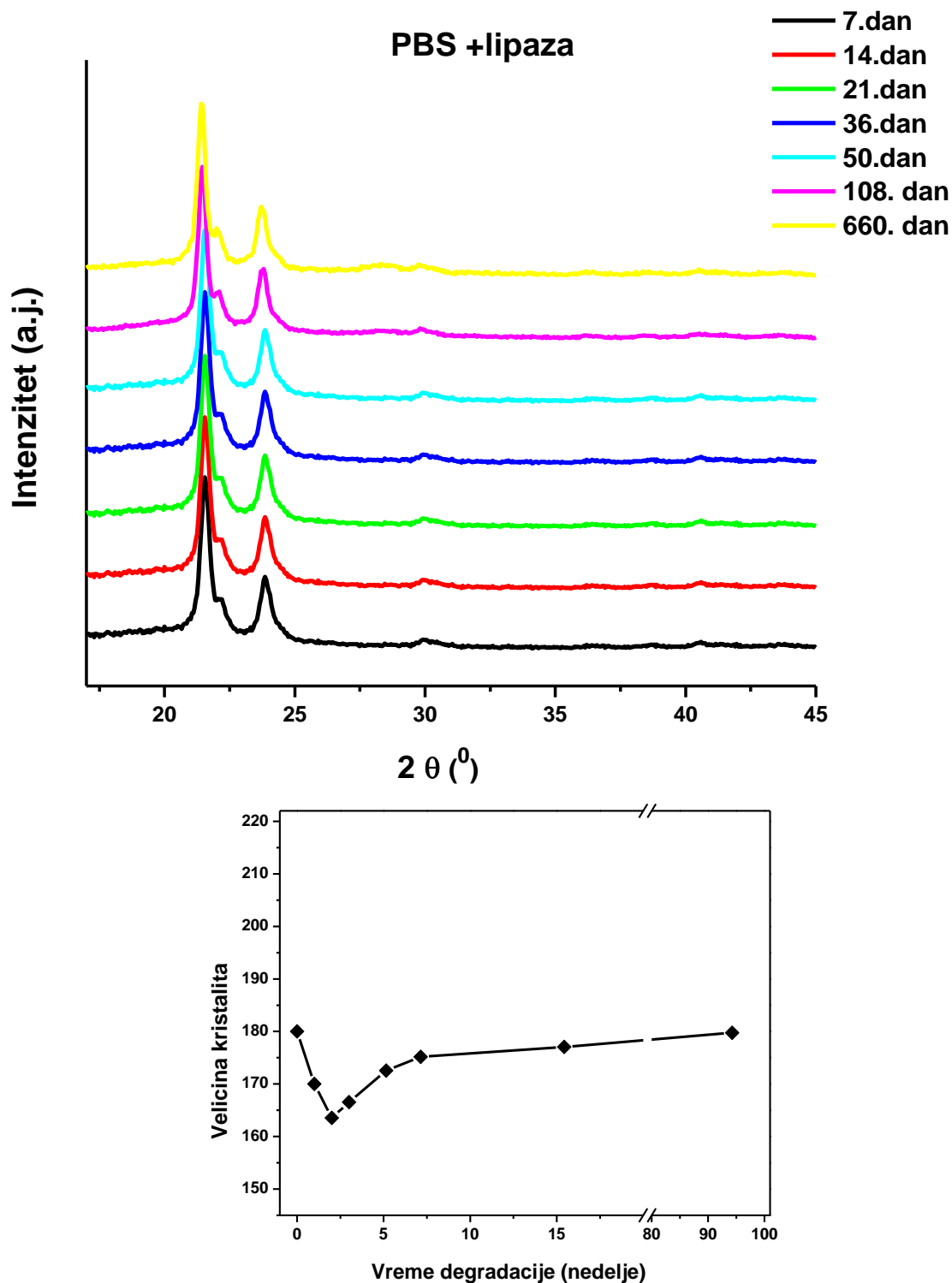
radi o uzorcima koji su bili suspendovani u PBS medijumu, nakon početnog blagog skoka od 7 Å zabeleženog nakon sedmodnevne degradacije, usledio je značajniji pad veličine kristalita u drugoj nedelji na vrednost od 163 Å, da bi se nakon 5 nedelja veličina kristalita vratila na vrednost koja je izračunata posle prve nedelje. U degradacionom periodu koji je usledio veličine su blago rasle do maksimalne vrednost od 202 Å, koja je dobijena nakon degradacije od 660 dana.

Kod drugog degradacionog medijuma, u kome je prisutan enzim lipaza, pad u veličini kristalita kreće od prvog uzorka koji je uzet nakon prve degradacione nedelje. Minimalna veličina je kao i kod prvog medijuma zabeležena kod uzorka koji je proveo 2 nedelje u degradacionom medijumu i iznosi 163 Å, nakon čega kreće kontinualni rast. Ovaj rast je dostigao svoju maksimalnu vrednost od 180 Å kod uzorka koji je bio suspendovan 660 dana u degradacionom medijumu. Interesantno je da je ova vrednost ista kao i kod nultog uzorka, tj. pre početka degradacije.

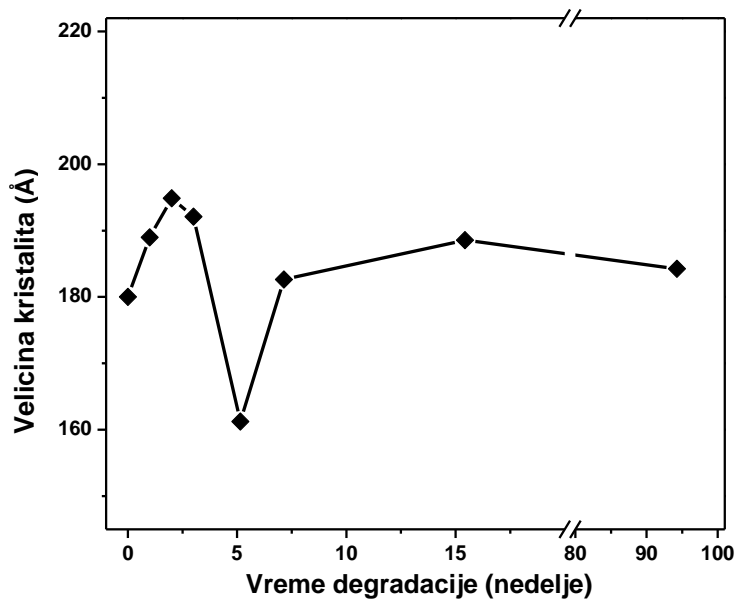
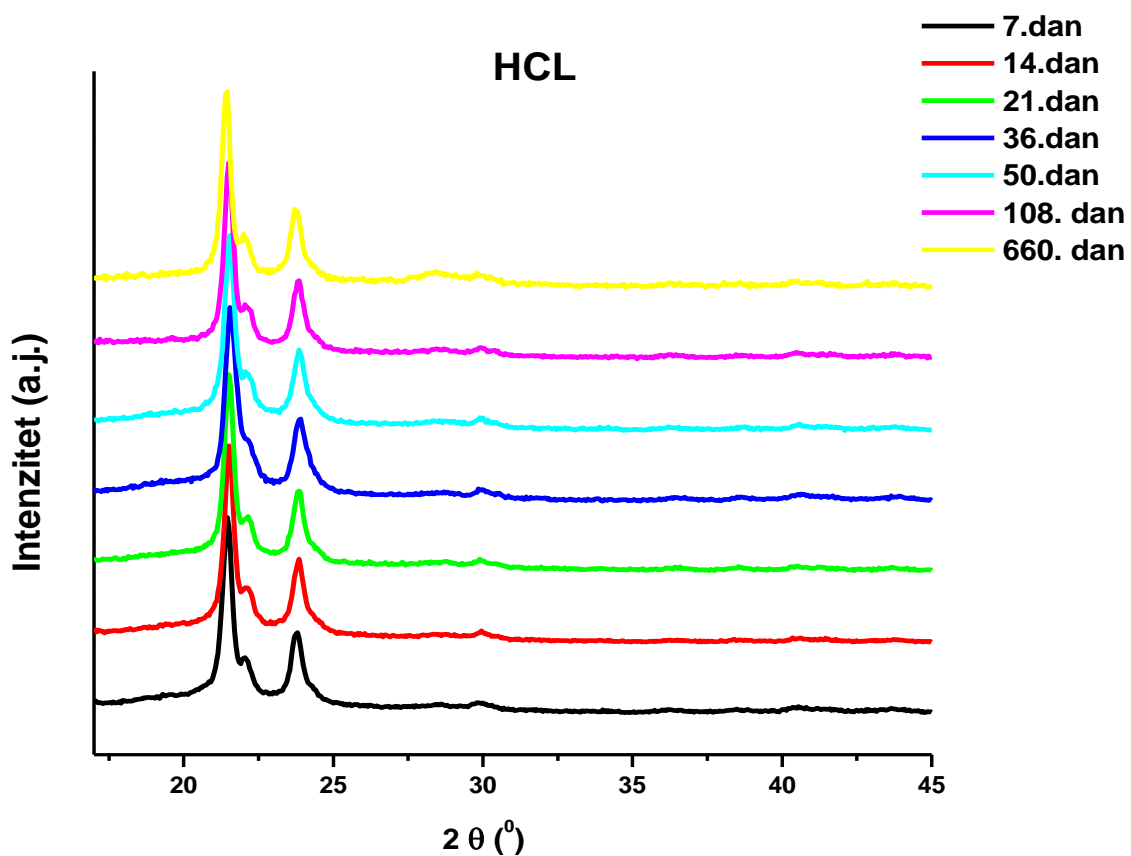
Najintenzivnije širenje difrakcionih pikova je zabeleženo kod uzoraka koji su bili suspendovani u kiselj sredini. Razlika u odnosu na prethodne medijume je ta što opadanje veličine kristalita kreće tek nakon 21. dana. Minimalna vrednost od 161 Å je zabeležena nakon 50. dana. Takođe kod ovog medijuma maksimalna vrednost nije zabeležena kod uzorka koji je proveo najviše vremena u degradacionom medijumu, već kod uzorka koji je bio izložen degradaciji 2 nedelje i iznosi 195 Å.



Slika 4.3.6.1 XRD difraktogrami uzoraka koji su bili suspendovani u PBS medijumu u periodu od 660 dana (gore). Veličine kristalita izračunate iz difraktograma su prikazane u funkciji vremena degradacije (dole).



Slika 4.3.6.2 XRD difraktogrami uzoraka koji su bili suspendovani u medijumu PBS+lipaza u periodu od 660 dana (gore). Veličine kristalita izračunate iz difraktograma su prikazane u funkciji vremena degradacije (dole).

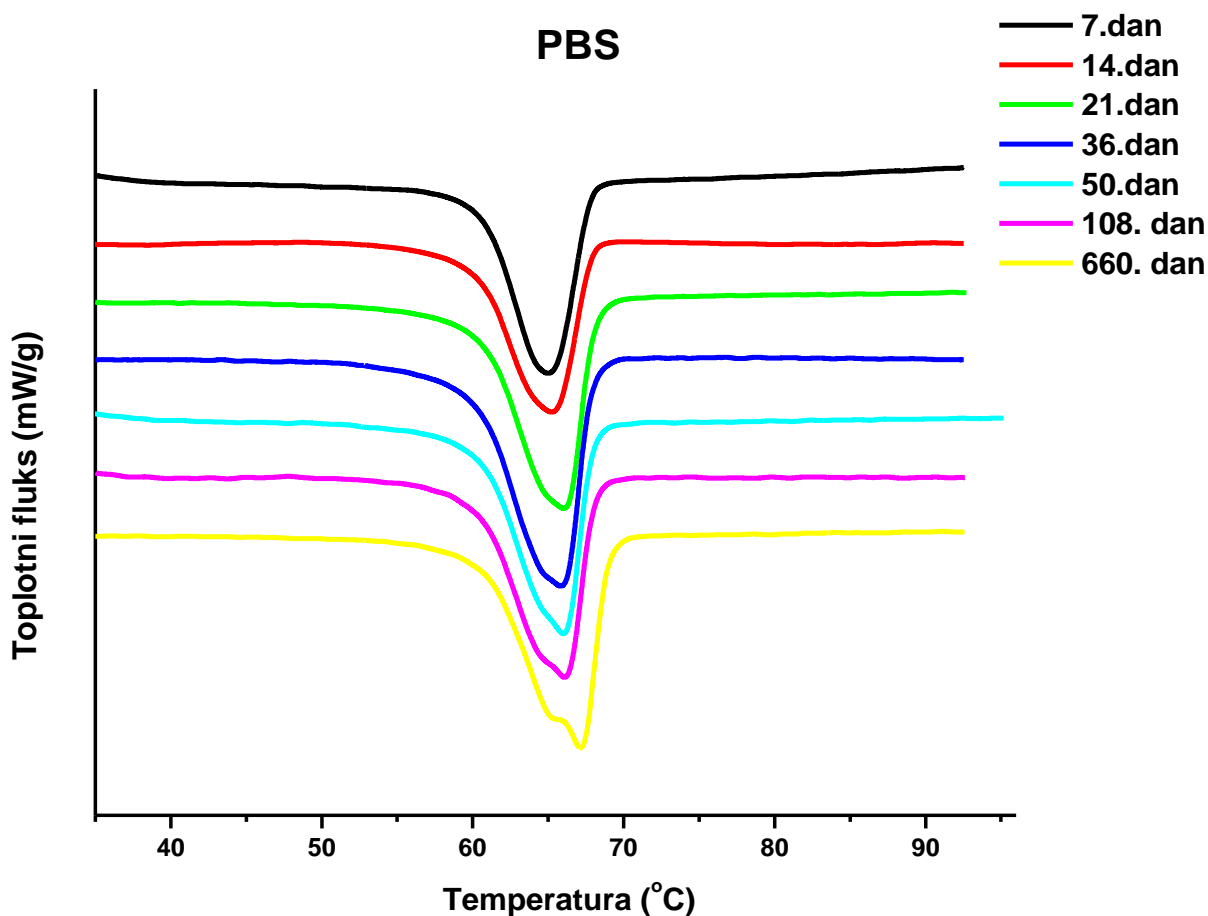


Slika 4.3.6.3 XRD difraktogrami uzoraka koji su bili suspendovani u 0,1 M HCL u periodu od 660 dana (gore). Veličine kristalita izračunate iz difraktograma su prikazane u funkciji vremena degradacije (dole).

Širenje difrakcionih pikova kod polimera je često prouzrokovano pojavom raznih defekata u njihovoj unutrašnjoj strukturi [203]. Poznato je da amorfni i kristalni segmenti nisu jasno odvojeni i da na prelazu ova dva uređenja postoji njihovo preklapanje [204]. Zbog toga promene u širini pikova na dobijenim difraktogramima ne znače da je sigurno došlo do promene u dimenzijama kristalita tih uzoraka. Međutim kako je kod sva tri degradaciona medijuma dobijen sličan profil oscilacije u širini difrakcionog pika, može se zaključiti da se isti fenomen poput pojave defekata javlja kao posledica degradacionog mehanizma i karakteristika je unutrašnjeg uređenja polimera. Razlika u trenucima pojavljivanja ovih oscilacija ukazuje na različitu brzinu formiranja defekata tj. razliku u interakciji polimera sa degradacionim medijumima. Kako vreme odmiče i budući da su uzorci termostatirani na 37 °C, ovi defekti nestaju tj. kristalni domeni se usavršavaju. Slično ponašanje u vidu porasta veličine kristalita sa porastom vremena degradacije je prijavljeno u studiji koju su sprovedli Castilla-Cortázar i koautori [162]. Međutim, treba napomenuti da su ovi rezultati dobijeni sa PCL-om mrežaste strukture i medijumom koji je sadržao lipazu izolovanu iz bakterijskog soja *Pseudomonas*. U istom radu, kada je polimer bio izložen čistom PBS-u zabeležen je konstantan pad u veličini kristalita.

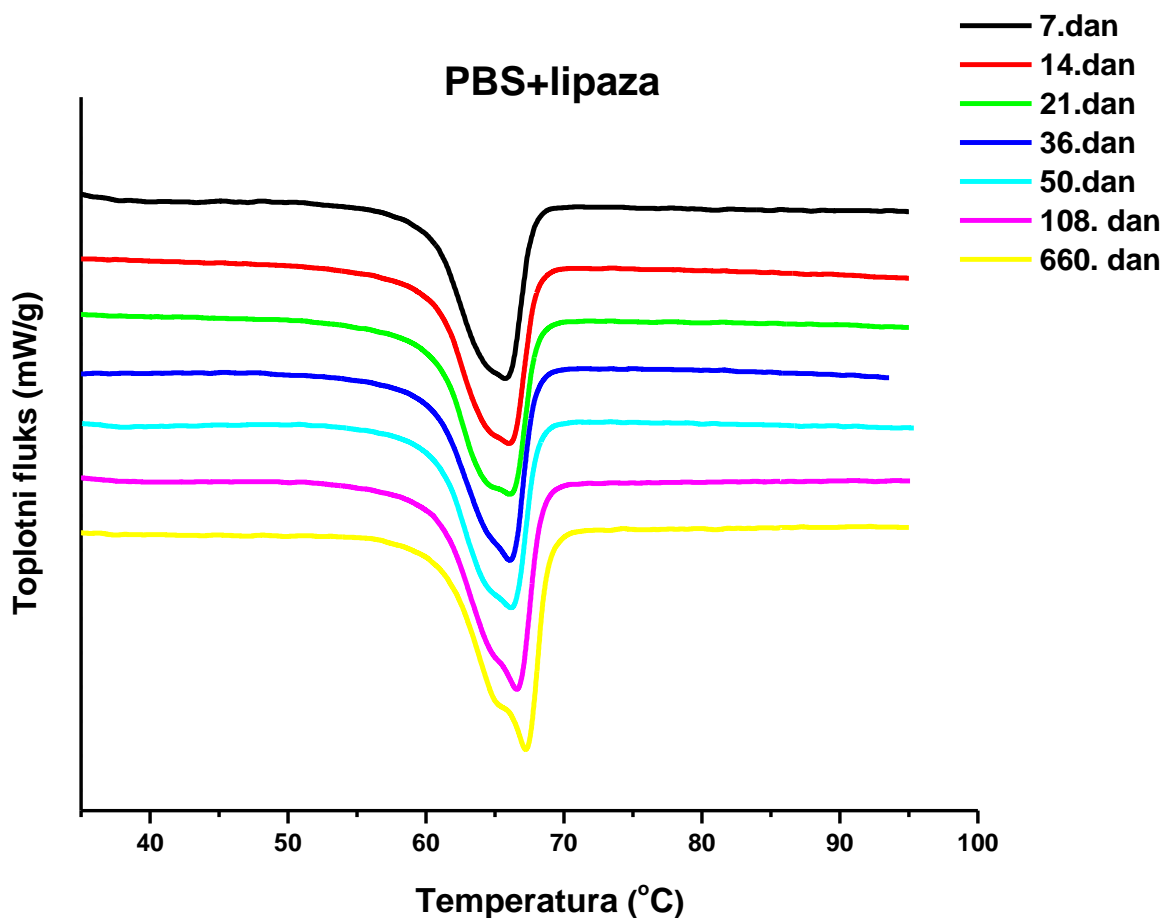
4.3.7 Uticaj procesa degradacije na stepen kristaliničnosti biokompozita PCL/SeNp

Kao i kod XRD analize, rezultati DSC merenja svih uzoraka izloženih različitim periodima degradacije su predstavljeni na istom dijagramu, pojedinačno za svaki medijum, kako bi bilo lakše njihovo poređenje. Na slici 4.3.7.1 prikazani su termogrami dobijeni sa uzoraka koji su bili suspendovani 7, 14, 21,36, 50, 108 i 660 dana u čistom puferskom medijumu, PBS-u.



Slika 4.3.7.1 Uporedni prikaz DSC krivi, u oblasti topljenja PCL-a, uzoraka suspendovanih u PBS-u u periodu od 660 dana.

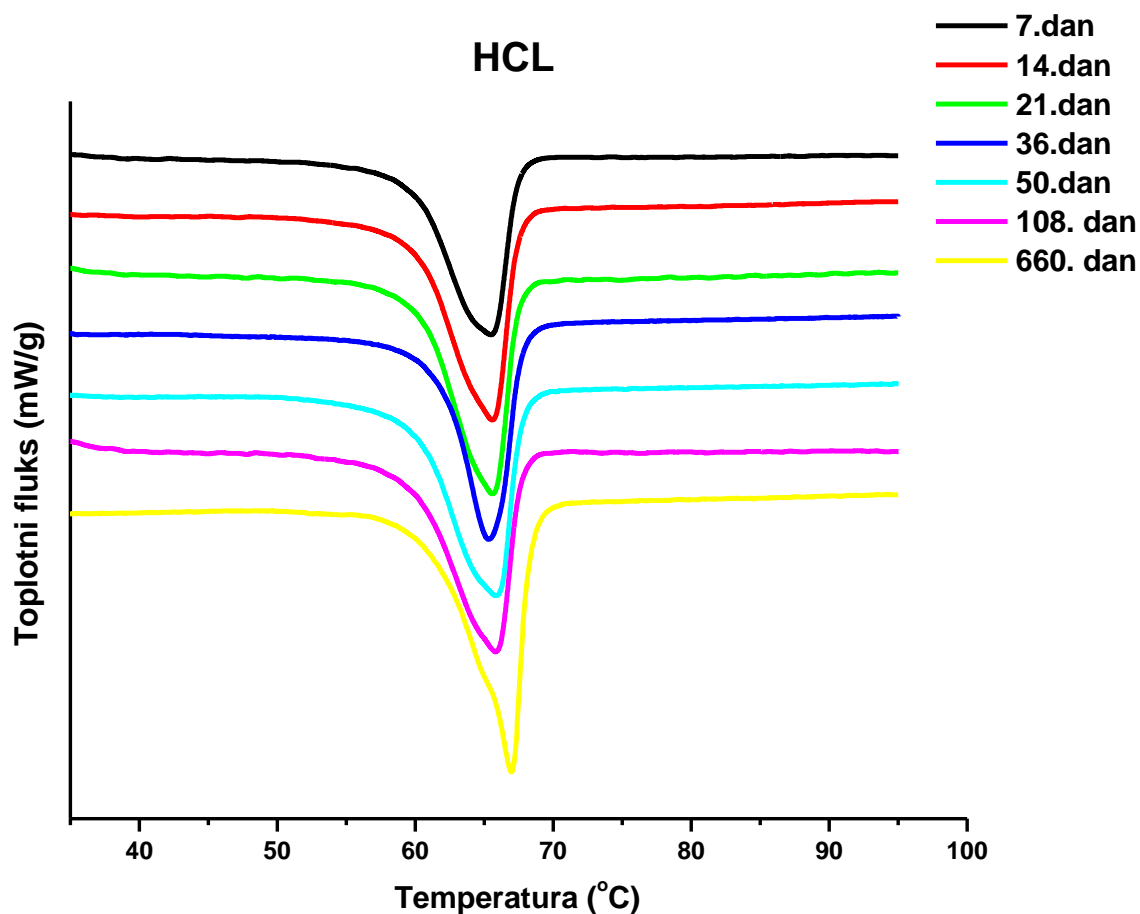
Ono što je odmah primetno jeste da postoji velika razlika u obliku pika topljenja kod prvog i poslednjeg uzorka tj. nakon degradacije u trajanju od 7 i 660 dana. Pik topljenja kod prvog uzorka ima simetrični oblik i sličan je piku koji je zabeležen kod nultog uzorka. Kako vreme degradacije raste, simetričnost pika se gubi i pojavljuje se proširenje na piku, na strani manjih temperatura. Ovo proširenje je toliko izraženo kod uzorka koji je najduže bio izložen degradaciji da je dovelo do pojave "ramena" na ovom piku. Kod medijuma koji pored pufera sadrži i enzim lipazu, se može zapaziti isti trend krive topljenja, s 'tim što su nesimetričnost i proširenja na pikovima blago izraženiji (slika 4.3.7.2). Pojava "ramena" na strani nižih temperatura je takođe zabeležena kod uzorka koji je bio najduže izložen degradacionom medijumu.



Slika 4.3.7.2 Uporedni prikaz DSC krivi, u oblasti topljenja PCL-a, uzoraka suspendovanih u PBS-u u periodu od 660 dana.

Nešto drugačiji profil krive topljenja je zapažen kod uzoraka koji su bili suspendovani u 0,1 M rastvoru HCL (slika 4.3.7.3). Pikovi su generalno uži a proširenje na strani nižih temperatura je slabo primetno čak i kod uzorka sa najvećim vremenom degradacije. Oblik krive topljenja kod semikristalnih materijala je posledica njihovog kristalnog uređenja i mikrostrukture. Generalno gledano, što su kristalni segmenti polimera "nesavršeniji" i što je šira raspodela veličine kristalita tj. debljine lamela, to će kriva imati nepravilniji oblik i pik će biti širi [205]. Zbog toga se krive topljenja dosta razlikuju od krive topljenja čistih kristalnih supstanci. Temperatura minimuma pika, koja se najčešće uzima za temperaturu topljenja, je u stvari temperatura na kojoj se tope kristaliti koji su najzastupljeniji u raspodeli veličina. Shodno tome, kristaliti manjih dimenzija se

tope brže i grade stranu pika na nižim temperaturama, dok kristaliti većih dimenzija formiraju deo pika na strani viših temperatura. Zbog toga, fizički gledano, temperatura topljenja nekog polimera je poslednja tačka pika pre nego što se signalna linija poravna i reprezentuje temperaturu topljenja najvećeg kristalita. Ovaj kristalit je najbliži idealnom monokristalu polimera. Međutim, u praksi se zbog tehničkih razloga najčešće koristi minimum* pika kao temperatura topljenja polimera.



Slika 4.3.7.3 Uporedni prikaz DSC krivi, u oblasti topljenja PCL-a, uzoraka suspendovanih u PBS-u u periodu od 660 dana.

* u zavisnosti od izbora eksperimentatora moguće je softverski podesiti da smer endotermnih procesa bude okrenut naviše.

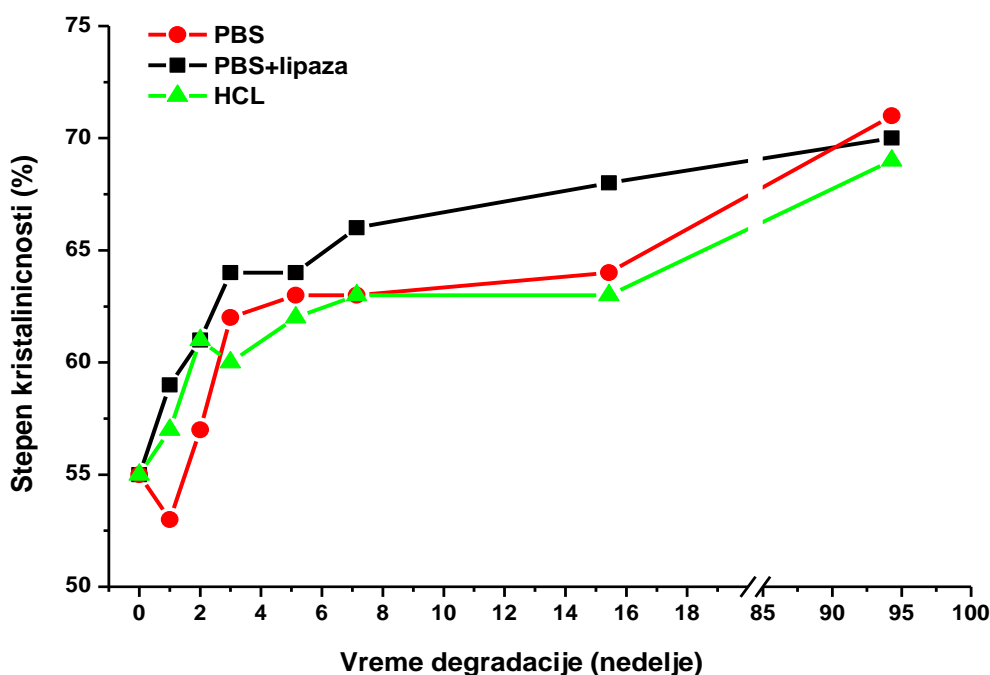
Što se tiče osnovnih podataka koje definišu faznu promenu topljenja poput temperature i entalpije topljenja, rezultati dobijeni za sve uzorake su sumirani u tabeli 4.3.7.1. Ako se posmatraju minimumi pikova, tj. temperature topljenja može se uočiti trend porasta T_m sa porastom vremena degradacije. Ovaj pomeraj T_m je pravilniji i izraženiji kod čistog puferskog medijuma i puferskog medijuma sa lipazom. Kod kiselog medijuma značajniji porast T_m je primetan tek kod uzorka sa najvećim vremenom degradacije. Celokupni pomeraj T_m je slične vrednosti kod sva tri medijuma i iznosi ≤ 2 °C.

Tabela 4.3.7.1 Temperature topljenja i prateće entalpije uzoraka iz degradacionih eksperimenata

Vreme degradacije (dani)	PBS	PBS+lipaza	HCL
	$T_m(^{\circ}\text{C})/\Delta H_f(\text{J/g})$	$T_m(^{\circ}\text{C})/\Delta H_f(\text{J/g})$	$T_m(^{\circ}\text{C})/\Delta H_f(\text{J/g})$
7	65.0 / 73.52	65.7 / 82.25	65.5 / 80.16
14	65.3 / 76.48	66.0 / 84.76	65.6 / 85.15
21	65.7 / 82.40	66.1 / 89.14	65.6 / 83.38
36	65.5 / 86.34	66.2 / 89.66	65.3 / 86.52
50	66.0 / 86.35	66.2 / 88.73	65.9 / 87.40
108	66.1 / 88.97	66.6 / 94.84	65.8 / 87.70
660	67.1 / 95.55	67.2 / 95.99	67.0 / 95.81

Radi bolje preglednosti, vrednosti stepena kristaliničnosti dobijene iz entalpija topljenja su predstavljene u funkciji vremena degradacije na slici 4.3.7.4. Poznato je da u prvoj fazi degradacije semikristalnih polimera dolazi do porasta stepena kristaliničnosti zbog činjenice da se degradacija najpre odigrava u amorfnim segmentima polimera [205]. Ova pojava je zabeležena kod sva tri degradaciona medijuma uz mala odstupanja kod uzoraka koji su bili suspendovani

u čistom puferu i kiseljoj sredini. Celokupan skok stepena kristaliničnosti računat između nultog uzorka i uzorka koji je proveo najviše vremena u degradacionom medijumu je gotovo isti za sva tri medijuma i iznosi oko 15%. Jedina razlika koja se može izdvojiti kao uticaj medijuma jeste da je nešto brži rast stepena kristaliničnosti prisutan kod medijuma koji sadrži lipazu, pogotovo u degradacionom inetrvalu između 7. i 16. nedelje.



Slika 4.3.7.4 Promena stepena kristaliničnosti uzoraka iz eksperimenata degradacije u funkciji od vremena degradacije

Na osnovu rezultata DSC analize nekoliko zaključaka je moguće izdvojiti. Prvi je da sa porastom vremena degradacije dolazi do porasta stepena kristaliničnosti kao posledica uklanjanja amorfnih segmenata. Kao prateći efekat primetan je i blagi porast temperature topljenja. Međutim, kako degradacioni period odmiče, dolazi i do degradacije kristalnih segmenata. Ova degradacija se verovatno dešava na ivicama lamela tj. na krajevima gde se polimerni lanci savijaju. Budući da je hidroliza PCL-a površinski efekat moguće je da se ovaj fenomen dešava samo u delu zapremine uzorka koji je u kontaktu sa degaradcionim medijumom. Kao rezultat svega toga dolazi do bimodalne raspodele

veliĉine kristalita tj. debljine lamella u kojima su polimerni lanci upakovani. Razlika u intenzitetu proširenja pikova topljenja izmeĊu medijuma sa niskim pH i medijuma sa neutralnim pH moŹe ukazivati na razliku u brzini degradacije uzoraka u ovim medijumima.

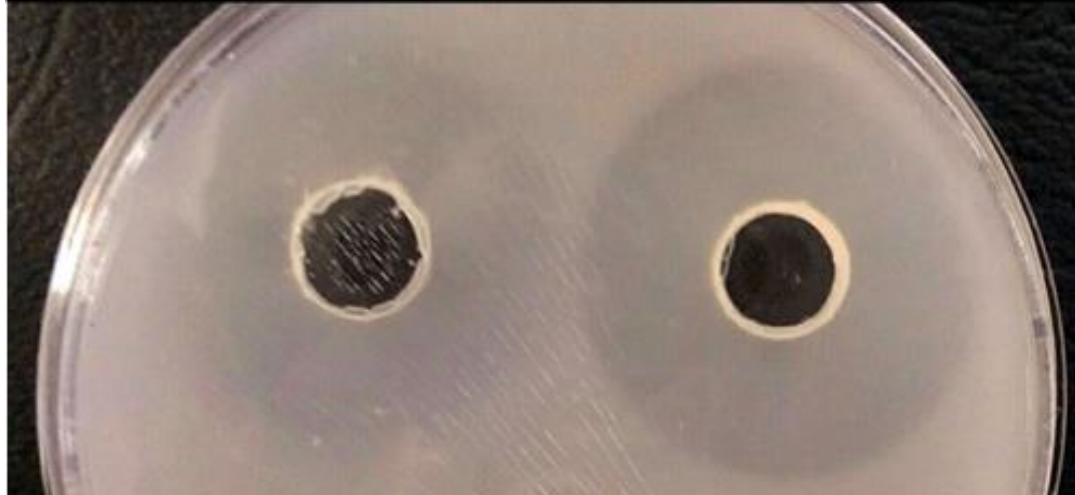
4.3.8 Ispitivanja degradacionog potencijala ćelijskog ekstrakta izolovanog iz bakterijskog soja *P. aeruginosa* PAO1 prema PCL-u i PCL/SeNPs.

4.3.8.1 Provera degradacione efikasnosti na agar ploĉi

Rezultat ispitivanja potencijala ćelijskog ekstrakta izolovanog iz bakterijskog soja *P. aeruginosa* PAO1 na degradaciju komercijalnih granula PCL-a je prikazan na slici 4.3.8.1.1. Povećanje transparentnosti polimernog filma oko mesta na kojima je ubaĉen bakterijski ekstrakt je iskorišćeno kao pokazatelj uspešnosti degradacije polimera u tim regionima. Što je veći radijus transparentnijeg sloja polimernog filma veća je degradaciona efikasnost ispitivanog materijala. U poreĊenju bakterijskih ekstrakta dobijenih iz razliĉitih kultivacionih podloga, veća efikasnost je zabeleŹena kod ekstrakta izolovanog iz bakterija kultivisanih na maslinovom ulju. Radijus transparentnog dela filma oko ovog ekstrakta je izmeren i dobijena vrednost je 10,5 mm dok je ekstrakt bakterija kultivisanih na glukozi degradirao polimer u krugu radijusa 9,5 mm. Razlika u efikasnosti degradacije je verovatno posledica razliĉite koncentracije enzima esteraza nastalih tokom rasta bakterija.

Na osnovu prikazanih rezultata moŹe se zakljuĉiti da je ćelijski ekstrakt izolovan iz bakterijskog soja *P. aeruginosa* PAO1, medijum koji je efikasan u degradaciji PCL-a. Prema našem saznanju, do sada u literaturi, nije prijavljena upotreba ovakvog ili sliĉnog medijuma za katalizovanu degradaciju biodegradabilnih polimera. Umesto ćelijskog ekstrakta obiĉno se koristi ĉist izolovani enzim, poput lipaze. Gledano sa praktiĉnog i ekonomskog aspekta, upotreba ovakvog ćelijskog ekstrakta je opravdana.

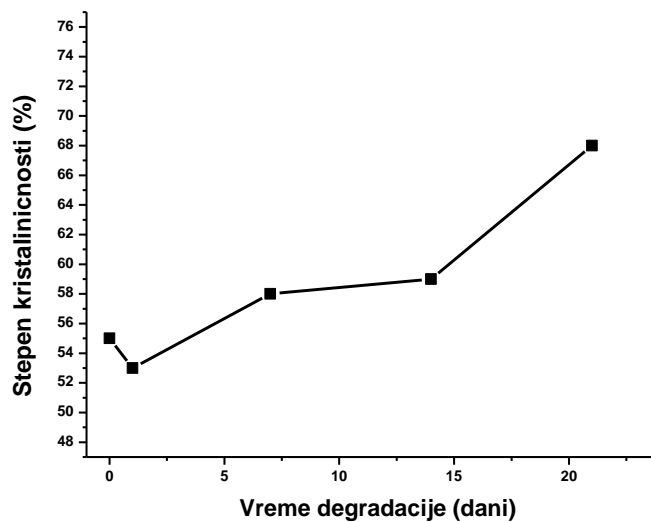
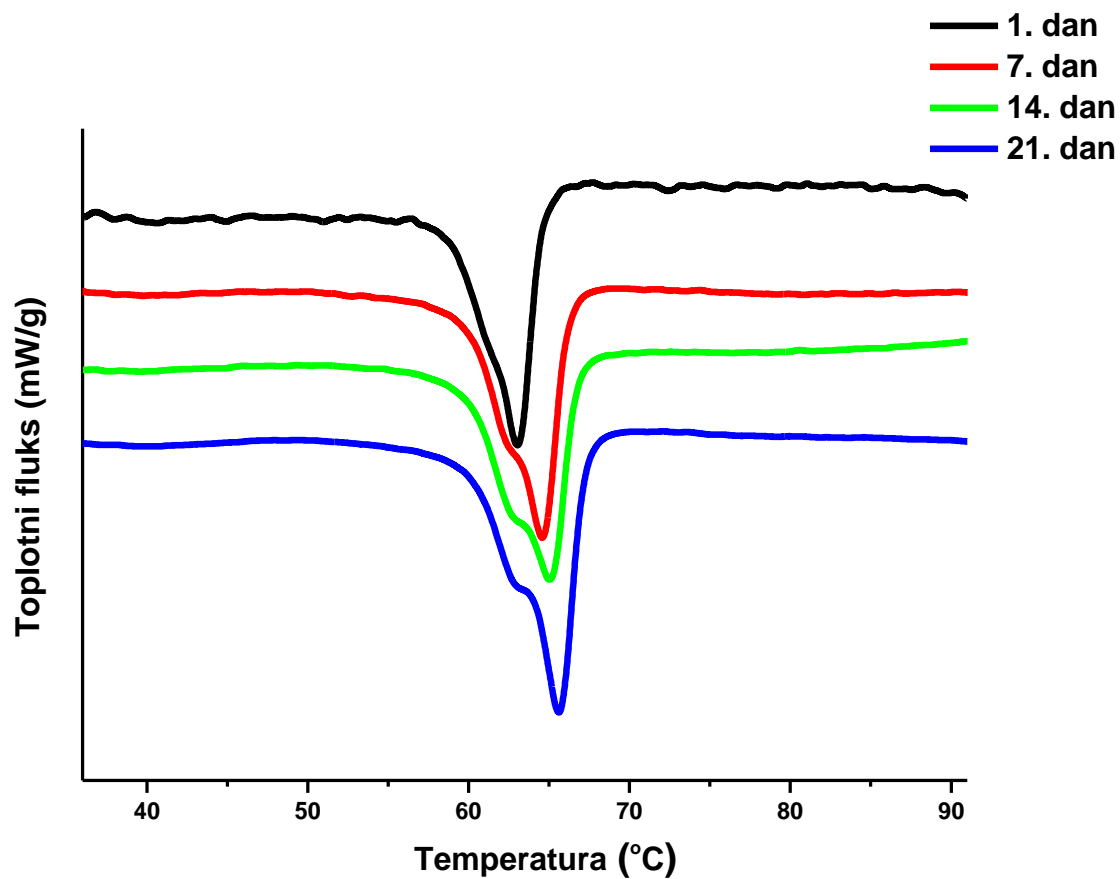
	Glukoza	Maslinovo ulje
Radius degrad. zone (mm)	9.5	10.5



Slika 4.3.8.1.1 Degradacioni potencijal ćelijskog ekstrakta iz bakterija *P. aeruginosa* PA01, uzgajanih na dve različite podloge, glukozi i maslinovom uju. Ispitivanja su vršena sa komercijalnim granulama PCL-a

4.3.8.2 Kalorimetrijska ispitivanja uzoraka PCL/SeNp suspendovanih u bakterijskom ekstraktu u različitim vremenskim intervalima

Krive topljenja uzoraka koji su bili izloženi degradaciji u bakterijskom ekstraktu su date na slici 4.3.8.2.1. Ono što je odmah primetno jeste da pik nema simetričnost ni kod uzorka koji je izdvojen nakon samo jednog dana. Pojava "ramena" na strani nižih temperatura je primetna već nakon nedelju dana i postaje izraženija u uzorcima koji su bili suspendovani u degradacionom medijumu 14 i 21 dan.



Slika 4.3.8.2.1 Uporedni prikaz DSC krivi, u oblasti topljenja PCL-a, uzoraka suspendovanih u bakterijskom ćelijskom ekstraktu (gore). Promena stepena kristalinitnosti u funkciji vremena degradacije je prikazana na donjoj slici.

Parametri krive topljenja poput temperature i entalpije topljenja su prikazani u tabeli 4.3.8.2.1. Što se tiče T_m primetan je konstantan rast koji u poređenju između 1. i 21. dana iznosi 2,6 °C. Ovaj pomeraj T_m je nešto veće vrednosti nego kod medijuma koji simuliraju fiziološke uslove, ali su vrednosti T_m niže za ~2 °C u proseku. Kod stepena kristaliničnosti takođe je zabeležen trend rasta sa porastom vremena degradacije (slika 4.3.8.2.1). I ovde je kao i u slučaju eksperimenata sa prethodnim medijumima zabeležen ukupan skok od 15 %.

Tabela 4.3.8.2.1 Temperature topljenja i prateće entalpije uzoraka koji su bili suspendovani u bakterijskom ćelijskom ekstraktu

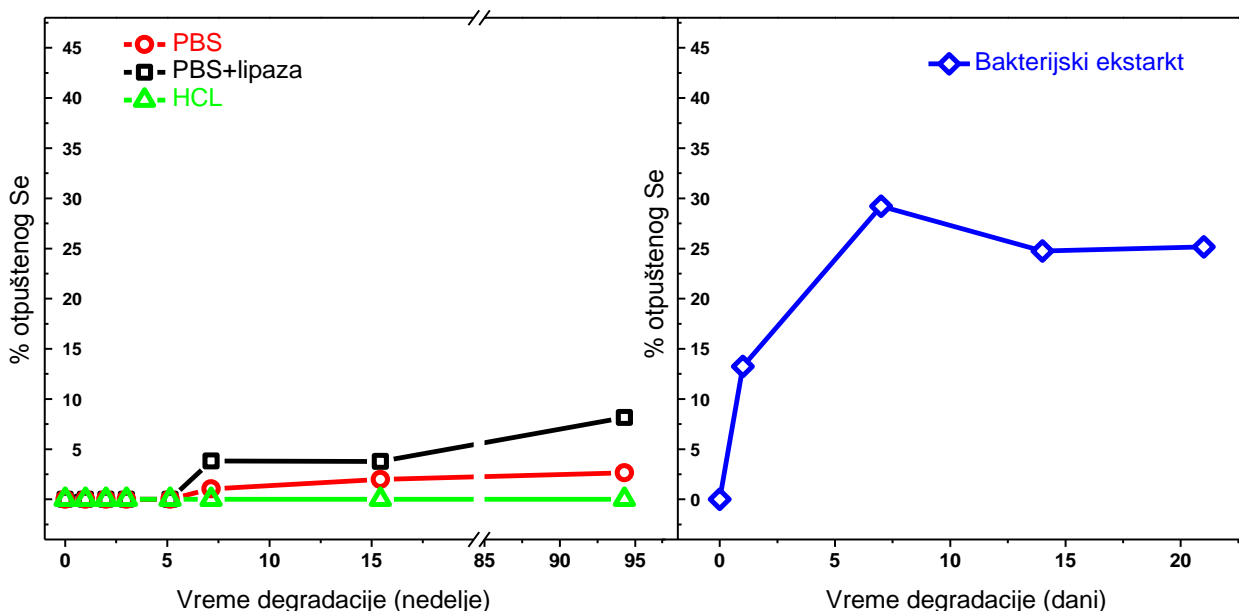
Vreme degradacije (dani)	T_m (°C)	ΔH_f (J/g)
1	63.0	74.3
7	64.6	80.1
14	65.0	82.2
21	65.6	94.9

Na osnovu promene oblika krive topljenja (bimodalne raspodele veličine kristalita), porasta T_m i stepena kristaliničnosti i imajući u vidu rezultate dobijene za prva tri medijuma, dolazi se do zaključka da je degradacija u bakterijskom ćelijskom ekstraktu u trajanju od tri nedelje postigla iste efekte kao i degradacija u prethodna tri medijuma u trajanju od 660 dana. Drugim rečima upotrebom bakterijskog ekstrakta soja *P. aeruginosa* PA01 moguće je postići ubrzanje degradacionih procesa oko 30x u odnosu na medijume koji simuliraju fiziološke uslove.

4.3.9 Profil otpuštanja SeNPs iz PCL mikrosfera u različitim degradacionim medijumima

U prethodnih 10-ak godina mnogo naučnika je ispitivalo otpuštanje raznih aktivnih komponenti iz PCL mikrosfera. Detalji ovih studija se mogu naći u par preglednih radova [57,69,70,72]. Kao dominantan proces otpuštanja prepoznata je difuzija aktivne komponente iz polimernog matriksa [77]. Zbog toga jako bitan faktor koji utiče na brzinu otpuštanja je raspodela aktivne komponente unutar samih mikrosfera. Primera radi, molekuli aktivne komponente koji su raspoređeni bliže površini mikrosfera će značajno brže biti oslobođeni. Kada se radi o polimernim sistemima za kontrolisanu dostavu, poznato je da hidrofilne supstance imaju tendenciju raspoređivanja bliže površini hidrofobnog polimera, dok se hidrofobne raspoređuju podjednako u celoj zapremini [206].

Rezultati otpuštanja SeNp iz PCL mikrosfera u sva četiri medijuma i to (i) puferu fosfatnih soli (PBS), (ii) rastvoru lipaze izolavane iz pankreasa svinje u PBS-u, (iii) 0.1 M hlorovodoničnoj kiselini (HCL), i (iv) ćelijskom ekstraktu izolovanom iz bakterijskog soja *P. aeruginosa* PAO1 su prikazani u funkciji degradacionih vremena na slici 4.3.9.1.



Slika 4.3.9.1 Profil otpuštanja SeNp u degradacionim medijumima koji simuliraju fiziološke uslove (levo). Profil otpuštanja SeNp u bakterijskom ćelijskom ekstraktu (desno). Radi efikasnog poređenja oba grafika su na ordinati (pokazuje % otpuštenog Se) podešena na istim vrednostima.

Kada se radi o medijumima koji simuliraju fiziološke uslove postoji velika razlika između medijuma kod kojih je neutralan pH ($=7,4$) i medijuma sa niskom vrednošću pH ($=1$). U kiseloj sredini nije zabeleženo prisustvo Se čak ni posle 660 dana (ICP-AES je jako osetljiva metoda i granica detekcije je 10 ppb). Iako je poznato da je PCL sporo-degradirajući polimer, ovakvo ponašanje nije zabeleženo do sada u literaturi. Naprotiv jako kisela i bazna sredina se često koriste kako bi se ubrzao proces degradacije. Zbog toga jedino objašnjenje ovog fenomena jeste da potiče od prirode aktivne komponente tj. SeNp. Da bi došlo do otpuštanja SeNp iz PCL mikrosfera potrebno je formiranje difuzionih kanala od površine ka unutrašnjosti sfera [77]. Na osnovu FTIR rezultata utvrđeno je da nema interakcije SeNp sa PCL-om, već da se SeNp samo fizički inkorporirane unutar polimernih sfera. Takođe na osnovu karakterizacije SeNp potvrđeno je da postoji znatna interakcija između nanočestica Se i BSA koja omogućuje stabilnost njihovog kompozita tj. SeNp. Kako je konformacija BSA jako osetljiva na nizak pH, došlo je do odmotavanja proteinskih lanaca i denaturacije proteina. Kao rezultat konformacionih promena povećava se dimenzija samog molekula a sa njim i kompozita sa Se. Ova promena može biti dovoljna da spreči prolazak SeNp kroz difuzione kanale. Suzbijanje otpuštanja BSA kao modela iz PLGA mikrosfera je već pokazano u studiji koju su objavili *T. Estey* i koautori [207]. Sa druge strane kod puferских medijuma je zabeleženo jako sporo otpuštanje. Kod oba medijuma, prvo detektovano prisustvo Se u supernatantu je dobijeno iz uzorka koji je bio suspendovan 50 dana u medijumu. Ukupna količina Se koji je otpušten u čistom PBS medijumu je iznosila 2,6 % od početne koncentracije koja je izmerena za nulti uzorak. Blagi porast u otpuštenoj količini Se je zabeležen u medijumu koji pored pufera sadrži i lipazu, gde je maksimalna otpuštena količina dobijena iz supernatanta uzorka koji je proveo 660 dana u degradacionom medijumu 8,1%. Ovakav rezultat je očekivan pošto je poznato da enzimi mogu katalizovati u određenoj meri degradaciju polimera [75,208]. Kako iz tehničkih uslova nije bilo moguće dodavati svežu količinu enzima u ovom medijumu, povišena količina otpuštenog Se je posledica efekta ubrzanog kidanja veza i formiranja difuzionih kanala na površini polimernih mikrosfera izazvanih enzimom koji je dodat na početku degradacije. Otud postoji i plato u oslobođenoj količini Se u intervalu

između 50. i 108. dana degradacije. Treba napomenuti da nije zabeležen nikakav efekat naglog otpuštanja (engl. *burst release*) koji se javlja kada je aktivna komponenta adsorbovana ili zarobljena na površinu polimera.

Suprotno ovim rezultatima, kod uzoraka koji su bili suspendovani u bakterijskom ekstraktu, već nakon 1 dana je zabeležena količina otpuštenog Se od 13,2% što je znatno veće nego ukupna oslobođena količina u medijumu PBS+lipaza. Nakon 7 dana, kod uzoraka koji su bili suspendovani u bakterijskom ekstraktu, iz PCL mikrosfera je otpušteno 29,2% inkorporiranog Se. Međutim sa daljim porastom degradacionog vremena nije zabeležen porast koncentracije oslobođenog Se, već je došlo do malog pada detektovane koncentracije. Moguće objašnjenje za mali pad u koncentraciji oslobođenog Se je da je došlo do njegove precipitacije i/ili adsorpcije na površinu polimera.

Gledano iz ugla kompozicije i mikrostrukture čestica PCL/SeNp, zasićenje u oslobođenoj količini Se se može objasniti na dva načina. Jedan je da je maksimalna količina (~30%) detektovana posle 7 dana, ona količina SeNp koja je bila inkorporirana bliže površini PCL/SeNp čestica i u amorfnim segmentima polimera. Preostala količina, oko 70% je "zarobljena" u kristalnim segmentima i dublje unutar zapremine polimera. Da bi se ova količina oslobodila potrebno je da degradacija stigne do druge faze, kada kreće kidanje glavnog dela polimernih lanaca i oslobađanje oligomera. Drugo moguće objašnjenje je da su SeNp formirale aglomerate unutar PCL mikrosfera čije su dimenzije takve da sprečavaju njihov prolazak kroz difuzione kanale.

Kada se rezultati dobijeni XRD i DSC analizom uporede sa rezultatima otpuštanja SeNp nekoliko zaključaka se može izvesti. Tokom degradacije odigravaju se razni procesi, poput formiranja difuzionih kanala, koji su praćeni prodiranjem medijuma. Moguće je da ovaj proces dovodi do perturbacije mikrostrukture i kristalnog uređenja koje su XRD analizom detektovane kao oscilacije u veličini kristalita u početnim vremenskim intervalima. Sa druge strane DSC tehnika nije tako osetljiva metoda pa se promene u kristalnom uređenju uočavaju kasnije kada su difuzioni kanali već formirani i izražavaju se kroz

promene u raspodeli debljine kristalnih lamela. Takođe, kod medijuma koji sadrži lipazu zabeležen je brži rast kristaliničnosti pogotovo u intervalu posle 7. nedelje, kao posledica degradacije amorfnih regija polimera. Upravo u ovom intervalu je detektovano prisustvo SeNp. Kao rezultat toga zabeležena je veća koncentracija Se u ovom medijumu u poređenju sa uzorcima suspendovanim u čistom PBS-u. Kada se radi o uzorcima iz bakterijskog ekstrakta, promene na krivi topljenja su vidljive posle sedam dana u poređenju sa 660 koliko je bilo potrebno za medijume PBS i PBS+lipaza. Pored toga, kod uzoraka iz bakterijskog ekstrakta je izmeren ukupan pomeraj T_m od 1,6 °C, što je ukupan pomeraj zabeležen kod uzoraka iz medijuma sa lipazom.

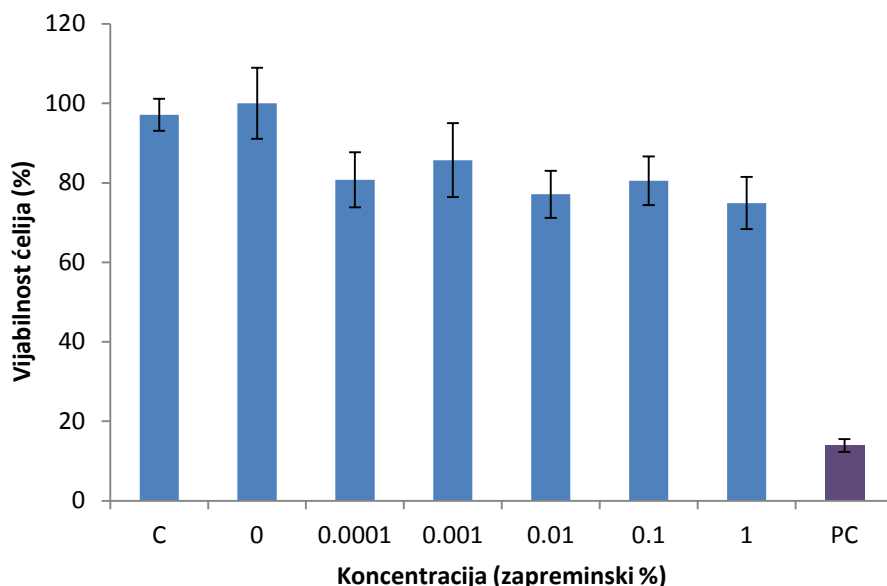
4.3.10 Ispitivanje biokompatibilnosti uzoraka PCL/SeNp

Biokompatibilnost čestica PCL/SeNp je ispitana MTT testom, DCF-DA analizom i Komet testom. Za razliku od PCL-a koji je prepoznat kao biokompatibilan materijal od strane Američke agencije za kontrolu hrane i lekova (FDA) i Svetske zdravstvene organizacije (WHO), primena selena na polju biomedicine je dosta ograničena i koncentraciono zavisna. Rezultati ispitivanja citotoksičnosti, genotoksičnosti i indukovanja nastanka reaktivnih vrsta kiseonika i čestica PCL/SeNp prema HepG2 ćelijama su rađeni u cilju potvrde potencijala ovog materijala za biomedicinsku primenu.

4.3.10.1 Ispitivanje citotoksičnosti uzoraka MTT testom

Kao što se može videti sa slike 4.3.10.1.1 za razliku od rezultata MTT testa sprovedenog na "praznim" česticama PCL-a gde je vijabilnost ćelija u celom koncentracionom intervalu bila ≥ 90 % (slika 4.1.4.1.1), kod PCL/SeNp čestica je primetan značajniji pad. Ipak smanjenje vijabilnosti nije zavisno od koncentracije čestica kojima su ćelije inkubirane i primetno je već kod prve primenjene koncentracije. Maksimalan pad od 20 % je u granicama tolerancije za dalja ispitivanja toksičnosti Komet testom. Jedan od mogućih razloga za smanjenje

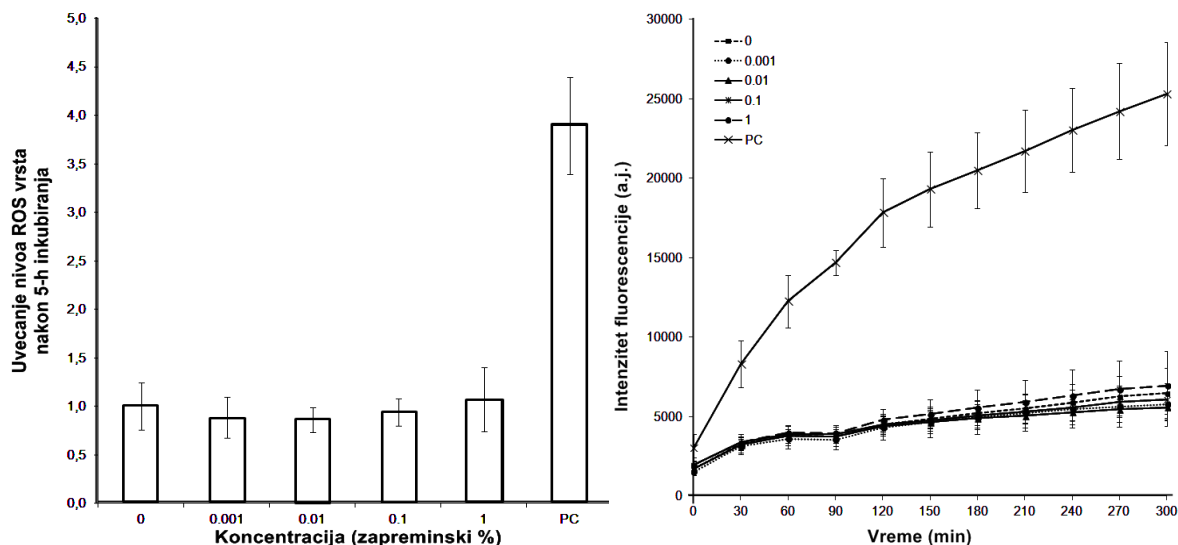
vijabilnosti ćelija bi bio prisustvo male koncentracije SeNp na površini čestica PCL-a, koje bi bile otpuštene brzo nakon internalizacije PCL/SeNp. Budući da je veličina čestica PCL/SeNp 1-3 μm , to u mnogome otežava njihov prolazak kroz membranu.



Slika 4.3.10.1.1 Rezultati MTT testa nakon jednodnevnog inkubiranja HepG2 ćelija sa suspenzijom PCL/SeNp čestica. Vijabilnost ćelija je predstavljena u funkciji rastućih koncentracija uzorka (0.0001 - 1 %). Kao pozitivna kontrola PC korišćen je etopozid pri koncentraciji 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

4.3.10.2 Ispitivanje uticaja biokompozita PCL/SeNp na nastanak reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) -DCF-DA analiza

Dalja ispitivanja biokompatibilnosti čestica PCL/SeNp su nastavljena ispitivanjem indukovanja ROS usled inkubacije HepG2 ćelijama. sa rastućom koncentracijom čestica PCL/SeNp. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 4.3.10.2.1 i na osnovu njih može se zaključiti da čestice PCL/SeNp ne dovode do nastanka reaktivnih vrsta kiseonika u ispitivanom koncentracionom opsegu nakon petočasnog inkubiranja. Ovi rezultati su dobrom slaganju sa rezultatima dobijenim za prazne PCL čestice.

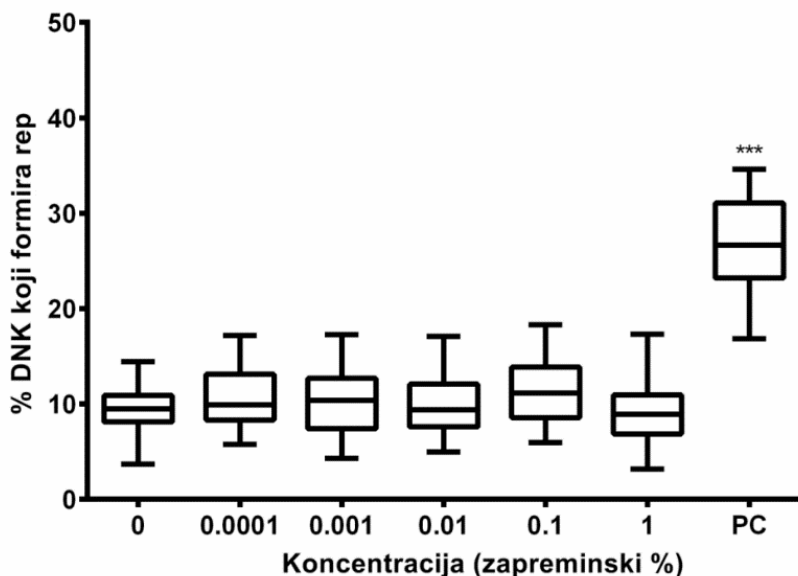


Slika 4.10.2.1 Intraćelijsko formiranje ROS u HepG2 ćelijama, izazvano njihovim inkubiranjem sa suspenzijom PCL/SeNp čestica, u trajanju od 5 sati. DCFH-DA test je urađen sa serijom rastućih koncentracija uzorka (0.0001 - 1 %). Promena relativnog intenziteta fluorescencije kao znaka prisustva ROS vrsta u funkciji vremena je prikazan na desnoj strani slike. Na levoj strani je prikaz ukupnog uvećanja ROS vrsta u odnosu na kontrolu (0-ćelije koje nisu tretirane uzorkom) izmeren na kraju 5-og sata u funkciji od rastuće koncentracije PCL čestica. Na ovom grafiku je uključena i pozitivna kontrola PC (0,5 mM t-BOOH).

4.3.10.3 Ispitivanja genotoksičnosti PCL/SeNp čestica - Komet test

Na slici 4.3.10.3.1 prikazani su rezultati Komet testa iz kojih se može jasno zaključiti da PCL/SeNp čestice nemaju nikakav genotoksični efekat na HepG2 ćelije nakon jednodnevnog inkubiranja. Takođe nije zabeležena nikakva koncentraciona zavisnost, obzirom da je procenat DNK lanaca koji formiraju rep zabeležen za najvišu koncentraciju čestica, isti kao i kod prazne probe. I ovde su dobijeni rezultati u dobrom slaganju sa onim dobijenim za prazne PCL čestice.

Rezultati dobijeni sa sva tri testa potvrđuju da čestice PCL/SeNp imaju dobru biokompatibilnost i da ne postoji koncentraciona zavisnost koja bi ukazivala na efekat naglog otpuštanja SeNp ili njihove desorpcije sa površine polimera. Zbog toga bi se zabeleženi pad u vijabilnosti ćelija kod MTT testa pre mogao smatrati promenom u metabolizmu ćelija izazvan prisustvom stranog tela nego efekat citotoksičnosti.



Slika 4.3.10.3.1 Rezultati oštećenja DNK usled 24h-og inkubiranja HepG2 ćelija sa rastućim koncentracijama PCL/SeNp čestica (0.0001 - 1 %). Svaka vrednost sa grafika je dobijena nakon analize 50 ćelija po nezavisnom eksperimentu. Vrednosti su prikazane uz pomoć kutija čije ivice predstavljaju 25% i 75 % vrednosti ispitanih ćelija, puna linija unutar kutija predstavlja srednju vrednost. (*) su označene vrednosti koje značajnije odstupaju od kontrole. Kao pozitivna kontrola upotrebljen je benzo[a]pyrene (BaP) pri koncentraciji od 30 μ M.

U razvijenim zemljama degenerativni poremećaji i zapaljenja kostiju i zglobova čine gotovo polovinu hroničnih bolesti kod ljudi srednjeg i starijeg starosnog doba [209]. Kao rezultat, na godišnjem nivou, milioni medicinskih naprava se ugrađuju. Međutim, određen broj ovih implantata postane kolonizovan od strane mikroorganizama, što dovodi do infekcija. Uprkos konstantnom napretku biomaterijala ovo i dalje predstavlja glavni problem u ortopediji. U studiji koju su sproveli *Mittal* i saradnici, preko 90 % ispitanika je smatralo da je to najveća mana prilikom ugradnje metalnih implantata [210]. Infekcije koje se javljaju na implantiranom mestu su posledice adhezije bakterijskih vrsta na površini implanta i formiranja tzv. biofilma. [211]. Formiranje biofilma se odigrava u nekoliko faza koje dovode do ogromnih problema. Glavni problem je što ovako formirani biofilm može postati bakterijski rezervoar iz koga se bakterije mogu širiti po celom telu. Drugi problem je što su biofilmovi bakterija otporni na antibiotsku terapiju pa ih je jako teško ukloniti. Usled toga dolazi do hronične

infekcije što dalje rezultira uklanjanjem implanata a u najgorim slučajevima i amputacijom ili smrtnim ishodom [212]. Oko dve trećine infekcija ortopedskih implanata izazivaju razni sojevi bakterija iz roda *Staphylococcus* [213]. Pored njih, kao najčešće prateće bakterije se javljaju bakterije iz soja *Pseudomonas aeruginosa* [214]. *Staphylococcus aureus* je glavni uzočnik dva hronična oboljenja kostiju artritisa i osteomijelitisa [215]. Bakterijski soj *Pseudomonas aeruginosa* obično ne izaziva infekcije kod zdravih ljudi ali se često javlja kod osoba kod kojih je imunitet oslabljen [216]. Smatra se da je najčešći patogen otkriven kod osoba koje su bile duže smeštene u zdravstvenim ustanovama [217]. Sa ciljem sprečavanja posthirurških infekcija, nakon ugradnje implantata, pacijenti bivaju podvrgnuti sistemskoj antibiotskoj terapiji [218,219]. Međutim mana sistemske antibiotske terapije je što jako mala koncentracija antibiotika stigne do željenog mesta [220]. Takođe, dugotrajna upotreba antibiotika može dovesti do rezistencije mikroorganizama što dovodi do pogoršanja ishoda lečenja i velikog ekonomskog opterećenja zdravstvenog sistema [221,222]. Zbog toga se u poslednje vreme pojavio novi pristup, oblaganje implanata ne-antibiotskim materijalima koji ispoljavaju određenu antibakterijsku aktivnost, poput nanočestica. Međutim ovo nije lako ostvariti zbog interakcije nanočestica sa biološkim entitetima. Primera radi, nanočestice srebra su poznate po jakom antimikrobnom efektu ali u ljudskom tkivu lako precipitiraju kao hloridi [118]. Takođe, oblaganje implanata ovakvim materijalom je skupo [223].

Imajući u vidu rezultate dobijene u okviru ove doktorske disertacije biokompozit PCL/SeNp ima veliki potencijal za oblaganje implantnih materijala iz više razloga. Nanočestice selena (SeNp) imaju značajan antibakterijski efekat protiv bakterijskih sojeva *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*, koji su jedni od najčešćih izazivača infekcija kod pacijenata koji su bili podvrgnuti hirurškom zahvatu tokom implantiranja. Zahvaljujući strukturi SeNp (stabilizacija molekulima BSA), kao i raspodeli SeNp unutar PCL mikrosfera, biokompozit PCL/SeNp u fiziološkim uslovima jako sporo otpušta SeNp. Na ovaj način je smanjen rizik od ispoljavanja toksičnog efekta selena. Nasuprot tome, ukoliko bi ovaj biokompozit bio okružen bakterijama iz soja *Pseudomonas aeruginosa* (koje se

često mogu naći kod bolničkih infekcija), otpuštanje bi teklo znatno ubrzano čime bi SeNp mogle da ispolje terapijski efekat na površini implantiranih materijala, gde obično dolazi do kolonizacije bakterija i formiranja biofilma.

5. ZAKLJUČAK

Iako u literaturi postoji priličan broj radova, kako o dobijanju polimernih čestica u cilju kontrolisane dostave medikamenata tako i nanočestica mikroelemenata, uticaj različitih parametara prilikom dobijanja čestica poli(ϵ -kaprolaktona) (PCL-a) kao i nanočestica selena (SeNp) nije u dovoljnoj meri ispitan. Za ove materijale, proces sinteze je od izuzetnog značaja, jer razumevanje uticaja svih procesirajućih parametara nam pruža mogućnost da dobijemo tačno željenu strukturu kao i moguće pravce za dalje usavršavanje. S' tim u vezi adekvatna karakterizacija brojnim fizičko-hemijskim metodama kao i tumačenje dobijenih rezultata su ključni u postizanju pravih rezultata.

Glavni zaključci proistekli iz teze se mogu podvesti u tri grupe i to su:

- ✓ Uspešno su sintetisane sferne čestice PCL-a i utvrđeni optimalnih uslovi sinteze pri kojima se fizičko-hemijskom metodom rastvarač/nerastvarač mogu dobiti uniformne čestice PCL-a. Ispitan je uticaj dva tipa stabilizatora i to poliglutaminske kiseline (PGA) kao polianjona i polivinil pirolidona (PVP-a) koji je polimer nejonskog tipa. Utvrđeno je da je PGA znatno efikasniji stabilizator u datim eksperimentalnim uslovima pri čemu su dobijene submikronske sfere, prosečnog prečnika ~500 nm. Takođe je ispitan uticaj parametara sušenja na morfologiju PCL čestica gde je utvrđeno da se pri povišenoj temperaturi (40 °C) i sniženom pritisku (0,1 mbar) iz sferne morfologije može dobiti trodimenzionalna mikroporozna struktura. Ovakva struktura se može potencijalno iskoristiti u tkivnom inženjerstvu. Sa druge strane primenom liofilizacije veličina čestica je redukovana na <200 nm ali samo pri upotrebi koncentracije rastvora PGA od 0,05%. Veće koncentracije dovode do porasta veličine čestica i na kraju do aglomeracije. Ispitivanja biokompatibilnosti PCL čestica su izvršena u *in vitro* eksperimentima na HepG2 ćelijama i dobijeni rezultati su pokazali da čestice ne ispoljavaju nikakve štetne efekte u pogledu

citotoksičnosti, indukovanja nastanka reaktivnih vrsta kiseonika i genotoksičnosti.

- ✓ Uspešno su sintetisane amorfne nanočestice seleno (SeNp) i utvrđeni optimalni uslovi sinteze. Ispitivana je njihova antibakterijska i antikancerogena aktivnost. Kao metoda sinteze za dobijanje SeNp izabrana je hemijska redukcija natrijum selenita (Na_2SeO_3) askorbinskom kiselinom (Vitamin C - $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$). Rezultati koji su dobijeni u ovom delu su pokazali da je goveđi serum albumin (BSA) pogodniji stabilizator od PGA, pri čemu je interakcija između Se i BSA takve prirode da obezbeđuje dobijanje isključivo amorfni nanočestica koje ne podležu kristalizaciji ni tokom zagrevanja do visokih temperatura. Sa druge strane ukoliko se koristi PGA dobijaju se polikristalne čestice. Takođe podjednako bitan parametar koji obezbeđuje povećanu stabilnost koloidnog rastvora SeNp je odnos molova između prekursora (Na_2SeO_3) i redukcionog sredstva ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$). Pri molskom odnosu 5:1 u korist askorbinske kiseline dobijene su amorfne nanočestice seleno sferne morfologije i veličine <80 nm. Rezultati antibakterijskog ispitivanja na šest različitih bakterijskih sojeva su pokazali da je koloidni rastvor SeNp znatno efikasniji u inhibiciji Gram-pozitivnih sojeva (*Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*) koji su jedni od najčešćih uzročnika bolničkih infekcija. Što se tiče antikancerogene aktivnosti, ispitivane na HeLa ćelijama, pokazano je da SeNp suzbija razvoj ćelija nakon 48 i 72h pri jako malim koncentracijama, dok pri koncentraciji od 3,75% u potpunosti uništava ćelije.
- ✓ Sintetisan je biokompozit PCL/SeNp i određeni uslovi pri kojima se koloidni rastvor SeNp može efikasno inkorporirati unutar PCL sfernih čestica (PCL/SeNp). Ispitana je degradacija dobijenog sistema u četiri različita degradaciona medijuma. Ustanovljeno je da za inkorporiranje SeNp u polimerne sfere pogodnije koristiti

aceton/etanol nego hloroform/etanol kao sistem rastvarač/nerastvač. Na ovaj način dobijene su mikrosfere sa raspedelom veličina 1-3 μm u koje su inkorporirane SeNp sa efikasnošću od 92%. Ovaj biokompozitni sistem je dalje korišćen u eksperimentima degradacije i ispitivanju biokompatibilnosti. Tri degradaciona medijuma su izabrana tako da simuliraju fiziološke uslove: (i) pufer fosfatnih soli (PBS), (ii) rastvor lipaze izolovane iz pankreasa svinje u PBS-u, (iii) 0.1 M hlorovodonična kiselina HCl. Nakon 660 dana degradacije u spomenutim medijumima otpušteno je svega 2,6% SeNp u PBS medijumu i 8,1% SeNp u medijumu koji sadrži i enzim lipazu. U kiselom medijumu nije zabeleženo prisustvo otpuštenog SeNp. Četvrti degradacioni medijum je izabran da simulira uslove bakterijske infekcije. U tu svrhu korišćen je ćelijski ekstrakt izolovan iz bakterijskog soja *P. aeruginosa* PAO1. Kod ovog medijuma je zabeleženo pojačano otpuštanje već posle prvog dana, ali je nakon 7 dana dostignuta maksimalna vrednost od 29,2%. Uz detaljnu analizu veličine kristalita i krive topljenja uzoraka iz degradacionih eksperimenata, došlo se do zaključka da je otpuštanje SeNp uslovljeno njihovom strukturom tj. ponašanjem BSA u navedenim medijumima. Sa druge strane struktura PCL/SeNp je takva da su se otpustile samo nanočestice selena koje su raspoređene bliže površini polimernih mikrosfera ili u amorfnim segmentima polimera. Pokazano je da se metode difrakcije X-zraka (XRD) i diferencijalne skanirajuće kalorimetrije (DSC) mogu efikasno koristiti za praćenje degradacionih procesa polimera. Na kraju je ispitana biokompatibilnost mikrosfera PCL/SeNp na HepG2 ćelijama. Jedino malo odstupanje u odnosu na rezultate koji su dobijeni za PCL čestice bez SeNp je primećeno kod ispitivanja citotoksičnosti. Međutim ovo odstupanje od ~20% nije koncentraciono zavisno pa se ne može reći da je posledica desorpcije SeNp sa ispitivanog sistema, a takođe je u granicama vrednosti u okviru kojih se smatra da

materijal nije citotoksičan. Ostali rezultati su potvrdili da je ovaj biokompozit bezbedan za potencijalnu biomedicinsku primenu.

U poređenju sa literaturom nekoliko rezultata proisteklih iz ove doktorske disertacije se mogu izdvojiti kao originalna nova saznanja:

- Prvi put je prijavljeno korišćenje PGA kao efikasnog stabilizatora polimernih sfernih čestica ali i protektanta tokom procesa liofilizacije.
- Utvrđeno je da postoji specifičan odnos molova između redukcionog sredstva ($C_6H_8O_6$) i prekursora (Na_2SeO_3) koji pospešuje efekat stabilizacije BSA.
- Pokazano je da BSA ima jako bitan uticaj na otpuštanje SeNp u zavisnosti od pH sredine.
- Prvi put je prijavljena upotreba bakterijskog ekstrakta za uspešno katalizovanje degradacionih procesa PCL-a.
- Inovativni sistem PCL/SeNp je pokazao potencijal za dizajniranje novih biomaterijala koji bi u fiziološkim uslovima otpuštali Se u jako maloj koncentraciji dok bi se u prisusutvu bakterijskih enzima ovo otpuštanje odigravalo znatno brže već nakon 1 dana.

Rezultati u okviru ove doktorske disertacije će doprineti proširenju znanja iz oblasti primene poli(epsilon-kaprolaktona) kao materijala za kontrolisanu dostavu medikamenata kao i na polju dobijanja i primene nanočestica selena.

6. LITERATURA

- [1] M. Stevanovic, Sinteza, karakterizacija i degradacija poli(DL-laktid-ko-glikolid) nanosfera koje sadrže askorbinsku kiselinu, Univerzitet u Beogradu, 2007.
- [2] B. Dhandayuthapani, D. kumar Sakthi, Biomaterials for Biomedical Applications, in: Biomed. Appl. Polym. Mater. Compos., 2016: pp. 1–20. doi:10.1002/9783527690916.ch1.
- [3] R. Pignatello, ed., Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications, InTech, 2013. doi:10.5772/56420.
- [4] R.D. Buddy, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons, Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine, Elsevier Academic Press, 2013. <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpBSAIMM06/biomaterials-science/biomaterials-science>.
- [5] D.F. Williams, On the mechanisms of biocompatibility, Biomaterials. 29 (2008) 2941–2953. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.
- [6] M.S. Scholz, J.P. Blanchfield, L.D. Bloom, B.H. Coburn, M. Elkington, J.D. Fuller, M.E. Gilbert, S.A. Muflahi, M.F. Pernice, S.I. Rae, J.A. Trevarthen, S.C. White, P.M. Weaver, I.P. Bond, The use of composite materials in modern orthopaedic medicine and prosthetic devices: A review, Compos. Sci. Technol. 71 (2011) 1791–1803. doi:10.1016/j.compscitech.2011.08.017.
- [7] M. Stevanovic, Dobijanje, morfologija i struktura prahova poli(DL-laktid-ko-glikolida) i biokompozita poli(DL-laktid-ko-glikolid)/bifazni kalcijum fosfat, Univerzitet u Beogradu, 2006.
- [8] K. Haraguchi, Biocomposites, in: K. Müllen, S. Kobayashi (Eds.), Encycl. Polym. Nanomater., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2014: pp. 1–8. doi:10.1007/978-3-642-36199-9_316-1.
- [9] S. Ahmed, S. Ikram, S. Kanchi, K. Bisetty, Biocomposites: Biomedical and Environmental Applications, Pan Stanford Publishing, Singapore, 2018. <https://books.google.com/books?id=ySJWDwAAQBAJ>.
- [10] S. Thomas, K. Joseph, S.K. Malhotra, K. Goda, M.S. Sreekala, Polymer Composites, Biocomposites, 2013. doi:10.1002/9783527674220.
- [11] K. Müllen, Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials, 2017. doi:10.1007/978-3-642-36199-9.
- [12] S.S. Sweeney AE, Nanoscale Science and Engineering Education, Los Angeles: American Scientific Publishers, 2008.
- [13] An ESF–European Medical Research Councils (EMRC) Forward Look, Strasbourg, 2005.
- [14] E. Miele, G.P. Spinelli, E. Miele, F. Tomao, S. Tomao, Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer, Int. J. Nanomedicine. 4 (2009) 99–105. doi:10.2147/IJN.S3061.
- [15] A.E. Green, P.G. Rose, Pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer, Int. J. Nanomedicine. 1 (2006) 229–239. doi:10.1002/14651858.CD006910.pub2.
- [16] R.E. Serda, B. Godin, E. Blanco, C. Chiappini, M. Ferrari, Multi-stage delivery nano-particle systems for therapeutic applications, Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. 1810 (2011) 317–329. doi:10.1016/j.bbagen.2010.05.004.
- [17] C.L. Ventola, The nanomedicine revolution: part 2: current and future clinical applications., P T. 37 (2012) 582–91.

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3474440&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [18] N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, N. Kamaly, O.C. Farokhzad, Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 66 (2014) 2–25. doi:10.1016/j.addr.2013.11.009.
- [19] K. Bourzac, Carrying drugs, *Nature*. 491 (2012) S58–S60. doi:10.1038/491S58a.
- [20] J.S. Murday, R.W. Siegel, J. Stein, J.F. Wright, Translational nanomedicine: status assessment and opportunities, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 5 (2009) 251–273. doi:10.1016/j.nano.2009.06.001.
- [21] A.E. Sweeney, Nanomedicine concepts in the general medical curriculum: initiating a discussion, *Int. J. Nanomedicine*. 10 (2015) 7319–7331. doi:10.2147/IJN.S96480.
- [22] K.M. El-Say, H.S. El-Sawy, Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery, *Int. J. Pharm.* 528 (2017) 675–691. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.06.052.
- [23] S.M. Moghimi, A.C. Hunter, J.C. Murray, Nanomedicine: current status and future prospects, *FASEB J.* 19 (2005) 311–330. doi:10.1096/fj.04-2747rev.
- [24] M. Dodemont, R. De Mendonca, C. Nonhoff, S. Roisin, O. Denis, Performance of the Verigene Gram-Negative Blood Culture Assay for Rapid Detection of Bacteria and Resistance Determinants, *J. Clin. Microbiol.* 52 (2014) 3085–3087. doi:10.1128/JCM.01099-14.
- [25] S.G. Beal, J. Ciurca, G. Smith, J. John, F. Lee, C.D. Doern, R.M. Gander, Evaluation of the Nanosphere Verigene Gram-Positive Blood Culture Assay with the VersaTREK Blood Culture System and Assessment of Possible Impact on Selected Patients, *J. Clin. Microbiol.* 51 (2013) 3988–3992. doi:10.1128/JCM.01889-13.
- [26] M.G. Harisinghani, J. Barentsz, P.F. Hahn, W.M. Deserno, S. Tabatabaei, C.H. van de Kaa, J. de la Rosette, R. Weissleder, Noninvasive Detection of Clinically Occult Lymph-Node Metastases in Prostate Cancer, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 2491–2499. doi:10.1056/NEJMoa022749.
- [27] M.E. Kooi, V.C. Cappendijk, K.B.J.M. Cleutjens, A.G.H. Kessels, P.J.E.H.M. Kitslaar, M. Borgers, P.M. Frederik, M.J.A.P. Daemen, J.M.A. van Engelshoven, Accumulation of Ultrasmall Superparamagnetic Particles of Iron Oxide in Human Atherosclerotic Plaques Can Be Detected by In Vivo Magnetic Resonance Imaging, *Circulation*. 107 (2003) 2453–2458. doi:10.1161/01.CIR.0000068315.98705.CC.
- [28] W.B. Tan, Y. Zhang, Surface modification of gold and quantum dot nanoparticles with chitosan for bioapplications, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 75A (2005) 56–62. doi:10.1002/jbm.a.30410.
- [29] M. Mikhaylova, D.K. Kim, N. Bobrysheva, M. Osmolowsky, V. Semenov, T. Tsakalakos, M. Mamoun, Superparamagnetism of Magnetite Nanoparticles: Dependence on Surface Modification, (2004). doi:10.1021/LA035648E.
- [30] F. Bassyouni, N. ElHalwany, M. Abdel Rehim, M. Neyfeh, Advances and new technologies applied in controlled drug delivery system, *Res. Chem. Intermed.* 41 (2015) 2165–2200. doi:10.1007/s11164-013-1338-2.

- [31] C. Kaparissides, S. Alexandridou, K. Kotti, S. Chaitidou, Recent Advances in Novel Drug Delivery Systems, *J. Nanotech. Online.* (2006) 1–11. doi:10.2240/azojono0111.
- [32] V.T. Tran, J.P. Benoît, M.C. Venier-Julienne, Why and how to prepare biodegradable, monodispersed, polymeric microparticles in the field of pharmacy?, *Int. J. Pharm.* 407 (2011) 1–11. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.01.027.
- [33] K.K. Kim, D.W. Pack, *Microspheres for Drug Delivery*, Springer US, Boston, MA, 2006. doi:10.1007/978-0-387-25842-3_2.
- [34] A. Rawat, Q.H. Majumder, F. Ahsan, Inhalable large porous microspheres of low molecular weight heparin: In vitro and in vivo evaluation, *J. Control. Release.* 128 (2008) 224–232. doi:10.1016/j.jconrel.2008.03.013.
- [35] F. Mohamed, C.F. van der Walle, Engineering Biodegradable Polyester Particles With Specific Drug Targeting and Drug Release Properties, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 71–87. doi:10.1002/jps.21082.
- [36] M. Gaumet, R. Gurny, F. Delie, Localization and quantification of biodegradable particles in an intestinal cell model: The influence of particle size, *Eur. J. Pharm. Sci.* 36 (2009) 465–473. doi:10.1016/J.EJPS.2008.11.015.
- [37] A. Lamprecht, U. Schäfer, C.M. Lehr, Size-dependent bioadhesion of micro- and nanoparticulate carriers to the inflamed colonic mucosa, *Pharm. Res.* 18 (2001) 788–793. doi:10.1023/A:1011032328064.
- [38] W. WEI, L. WANG, L. YUAN, X. YANG, Z. SU, G. MA, Bioprocess of uniform-sized crosslinked chitosan microspheres in rats following oral administration, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 878–886. doi:10.1016/j.ejpb.2008.02.011.
- [39] G. Gasparini, S.R. Kosvintsev, M.T. Stillwell, R.G. Holdich, Preparation and characterization of PLGA particles for subcutaneous controlled drug release by membrane emulsification, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 61 (2008) 199–207. doi:10.1016/j.colsurfb.2007.08.011.
- [40] C. Thomas, V. Gupta, F. Ahsan, Particle Size Influences the Immune Response Produced by Hepatitis B Vaccine Formulated in Inhalable Particles, *Pharm. Res.* 27 (2010) 905–919. doi:10.1007/s11095-010-0094-x.
- [41] H.L. Kutscher, P. Chao, M. Deshmukh, Y. Singh, P. Hu, L.B. Joseph, D.C. Reimer, S. Stein, D.L. Laskin, P.J. Sinko, Threshold size for optimal passive pulmonary targeting and retention of rigid microparticles in rats., *J. Control. Release.* 143 (2010) 31–7. doi:10.1016/j.jconrel.2009.12.019.
- [42] C. Berkland, M.J. Kipper, B. Narasimhan, K. Kim, D.W. Pack, Microsphere size, precipitation kinetics and drug distribution control drug release from biodegradable polyanhydride microspheres, *J. Control. Release.* 94 (2004) 129–141. doi:10.1016/j.jconrel.2003.09.011.
- [43] C. Berkland, K. Kim, D.W. Pack, PLG microsphere size controls drug release rate through several competing factors., *Pharm. Res.* 20 (2003) 1055–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12880292>.
- [44] M. Ventre, V. Coppola, M. Iannone, P.A. Netti, I. Tekko, E. Larrañeta, A.M. Rodgers, C.J. Scott, A. Kissenpfennig, R.F. Donnelly, S. Maher, D. Losic, A. George, A. Ramachandran, Nanotechnologies for tissue engineering and regeneration, in: *Nanotechnologies Prev. Regen. Med.*, Elsevier, 2018: pp.

- 93–206. doi:10.1016/B978-0-323-48063-5.00002-2.
- [45] T. Nardo, I. Carmagnola, F. Ruini, S. Caddeo, S. Calzone, V. Chiono, G. Ciardelli, Synthetic Biomaterial for Regenerative Medicine Applications, in: *Kidney Transplantation, Bioeng. Regen.*, Elsevier, 2017: pp. 901–921. doi:10.1016/B978-0-12-801734-0.00065-5.
- [46] B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa, D.S. Kumar, Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review, *Int. J. Polym. Sci.* 2011 (2011) 1–19. doi:10.1155/2011/290602.
- [47] A. Atala, Regenerative medicine strategies, *J. Pediatr. Surg.* 47 (2012) 17–28. doi:10.1016/j.jpedsurg.2011.10.013.
- [48] J.J. Lee, S.-G. Lee, J.C. Park, Y. Il Yang, J.K. Kim, Investigation on biodegradable PLGA scaffold with various pore size structure for skin tissue engineering, *Curr. Appl. Phys.* 7 (2007) e37–e40. doi:10.1016/j.cap.2006.11.011.
- [49] S. Ramakrishna, J. Mayer, E. Wintermantel, K.W. Leong, Biomedical applications of polymer-composite materials: a review, *Compos. Sci. Technol.* 61 (2001) 1189–1224. doi:10.1016/S0266-3538(00)00241-4.
- [50] R. Francis, D. Sakthi Kumar, eds., *Biomedical Applications of Polymeric Materials and Composites*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2016. doi:10.1002/9783527690916.
- [51] Z. Tang, C. He, H. Tian, J. Ding, B.S. Hsiao, B. Chu, X. Chen, Polymeric nanostructured materials for biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.* 60 (2016) 86–128. doi:10.1016/j.progpolymsci.2016.05.005.
- [52] M. Gaumet, A. Vargas, R. Gurny, F. Delie, Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 1–9. doi:10.1016/J.EJPB.2007.08.001.
- [53] M. Stevanović, Polymeric micro- and nanoparticles for controlled and targeted drug delivery, in: *Nanostructures Drug Deliv.*, Elsevier, 2017: pp. 355–378. doi:10.1016/B978-0-323-46143-6.00011-7.
- [54] L. Mu, P.H. Seow, Application of TPGS in polymeric nanoparticulate drug delivery system, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 47 (2006) 90–97. doi:10.1016/J.COLSURFB.2005.08.016.
- [55] N. Rapoport, W.G. Pitt, H. Sun, J.L. Nelson, Drug delivery in polymeric micelles: from in vitro to in vivo., *J. Control. Release.* 91 (2003) 85–95. doi:S0168365903002189 [pii].
- [56] K.S.K. Soppimath, T.M.T.M. Aminabhavi, A.R.A.R.A.R. Kulkarni, W.E. Rudzinski, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *J. Control. Release.* 70 (2001) 1–20. doi:10.1016/S0168-3659(00)00339-4.
- [57] M.A. Woodruff, D.W. Huttmacher, The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century, *Prog. Polym. Sci.* 35 (2010) 1217–1256. doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002.
- [58] M. Vert, S.M. Li, G. Spenlehauer, P. Guerin, Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 3 (1992) 432–446. doi:10.1007/BF00701240.
- [59] M.M. Robbins, A.R. Vaccaro, L. Madigan, The use of bioabsorbable implants in spine surgery, *Neurosurg. Focus.* 16 (2004) E1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15198489>.
- [60] T. Hayashi, Biodegradable polymers for biomedical uses, *Prog. Polym. Sci.* 19

- (1994) 663–702. doi:10.1016/0079-6700(94)90030-2.
- [61] F. Von Burkersroda, L. Schedl, A. Göpferich, Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion, *Biomaterials*. 23 (2002) 4221–4231. doi:10.1016/S0142-9612(02)00170-9.
- [62] I. Manavitehrani, A. Fathi, H. Badr, S. Daly, A.N. Shirazi, F. Dehghani, Biomedical applications of biodegradable polyesters, *Polymers (Basel)*. 8 (2016). doi:10.3390/polym8010020.
- [63] S. Slomkowski, Biodegradable Polyesters for Tissue Engineering, *Macromol. Symp.* 253 (2007) 47–58. doi:10.1002/masy.200750706.
- [64] J. Zhan, A. Singh, Z. Zhang, L. Huang, J.H. Elisseeff, Multifunctional aliphatic polyester nanofibers for tissue engineering., *Biomater.* 2 (2012) 202–12. doi:10.4161/biom.22723.
- [65] M. Vert, Aliphatic Polyesters: Great Degradable Polymers That Cannot Do Everything†, (2004). doi:10.1021/BM0494702.
- [66] K.E. Washington, R.N. Kularatne, V. Karmegam, M.C. Biewer, M.C. Stefan, Recent advances in aliphatic polyesters for drug delivery applications, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*. 9 (2017) e1446. doi:10.1002/wnan.1446.
- [67] A.L. Silvers, C.-C. Chang, B. Parrish, T. Emrick, Strategies in Aliphatic Polyester Synthesis for Biomaterial and Drug Delivery Applications, in: 2012: pp. 237–254. doi:10.1021/bk-2012-1114.ch015.
- [68] F.J. van Natta, J.W. Hill, W.H. Carothers, Studies of Polymerization and Ring Formation. XXIII. ϵ -Caprolactone and its Polymers, *J. Am. Chem. Soc.* 56 (1934) 455–457. doi:10.1021/ja01317a053.
- [69] G. Cama, D.E. Mogosanu, A. Houben, P. Dubruel, Synthetic biodegradable medical polyesters: Poly- σ -caprolactone, in: *Sci. Princ. Biodegrad. Bioresorbable Med. Polym. Mater. Prop.*, Elsevier, 2016: pp. 79–105. doi:10.1016/B978-0-08-100372-5.00003-9.
- [70] T.K. Dash, V.B. Konkimalla, Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review, *J. Control. Release*. 158 (2012) 15–33. doi:10.1016/j.jconrel.2011.09.064.
- [71] C.G. Pitt, F.I. Chasalow, Y.M. Hibionada, D.M. Klimas, T. Park, N. Carolina, Aliphatic Polyesters . I. The Degradation of Poly (ϵ - caprolactone) In Vivo, *J. Appl. Polym. Sci.* 26 (1981) 3779–3787. doi:10.1002/app.1981.070261124.
- [72] V.R. Sinha, K. Bansal, R. Kaushik, R. Kumria, A. Trehan, Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: An overview, *Int. J. Pharm.* 278 (2004) 1–23. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.01.044.
- [73] Z. Gan, Q. Liang, J. Zhang, X. Jing, Enzymatic degradation of poly (ϵ -caprolactone) film in phosphate buffer solution containing lipases, *Polym. Degrad. Stab.* 3910 (1997) 209–213. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014139109600208X>.
- [74] F. Kedzierewicz, P. Thouvenot, I. Monot, M. Hoffman, P. Maincent, Influence of different physicochemical conditions on the release of indium oxine from nanocapsules, *J. Biomed. Mater. Res.* 39 (1998) 588–593. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(19980315)39:4<588::AID-JBM13>3.0.CO;2-3.
- [75] C. Wu, T.F. Jim, Z. Gan, Y. Zhao, S. Wang, A heterogeneous catalytic kinetics for enzymatic biodegradation of poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles in

- aqueous solution, *Polymer (Guildf)*. 41 (2000) 3593–3597.
doi:10.1016/S0032-3861(99)00586-8.
- [76] D.R. Chen, J.Z. Bei, S.G. Wang, Polycaprolactone microparticles and their biodegradation, *Polym. Degrad. Stab.* 67 (2000) 455–459.
doi:10.1016/S0141-3910(99)00145-7.
- [77] J.C. Jeong, J. Lee, K. Cho, Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(ϵ -caprolactone) microspheres, *J. Control. Release*. 92 (2003) 249–258. doi:10.1016/S0168-3659(03)00367-5.
- [78] J.P. Rao, K.E. Geckeler, Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters, *Prog. Polym. Sci.* 36 (2011) 887–913.
doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001.
- [79] P. Grossen, D. Witzigmann, S. Sieber, J. Huwyler, PEG-PCL-based nanomedicines: A biodegradable drug delivery system and its application, *J. Control. Release*. 260 (2017) 46–60. doi:10.1016/j.jconrel.2017.05.028.
- [80] M. Abedalwafa, F. Wang, L. Wang, C. Li, Biodegradable PCL for tissue engineering applications: A review, *Rev. Adv. Mater. Sci.* 34 (2013) 123–140.
- [81] O. Wada, What are Trace Elements ? — Their deficiency and excess states, *Jpn Med Assoc J.* 47 (2004) 351.
- [82] T. Takahashi, Comparative x-ray-photoemission study of monoclinic, trigonal, and amorphous selenium, *Phys. Rev. B.* 26 (1982) 5963–5964.
doi:10.1103/PhysRevB.26.5963.
- [83] M.P. Rayman, The importance of selenium to human health, *Lancet*. 356 (2000) 233–241.
- [84] B.R. Cardoso, B.R. Roberts, A.I. Bush, D.J. Hare, Selenium, selenoproteins and neurodegenerative diseases, *Metallomics*. 7 (2015) 1213–1228.
doi:10.1039/C5MT00075K.
- [85] M.P. Rayman, Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action, *Proc. Nutr. Soc.* 64 (2005) 527–542.
doi:10.1079/PNS2005467.
- [86] M. Roman, P. Jitaru, C. Barbante, Selenium biochemistry and its role for human health, *Metallomics*. 6 (2014) 25–54. doi:10.1039/C3MT00185G.
- [87] H. Zeng, G.F. Combs, Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion, *J. Nutr. Biochem.* 19 (2008) 1–7.
doi:10.1016/j.jnutbio.2007.02.005.
- [88] J.J. Cao, B.R. Gregoire, H. Zeng, Selenium Deficiency Decreases Antioxidative Capacity and Is Detrimental to Bone Microarchitecture in Mice, *J. Nutr.* 142 (2012) 1526–1531. doi:10.3945/jn.111.157040.
- [89] H. Zeng, J.J. Cao, G.F. Combs, Selenium in Bone Health: Roles in Antioxidant Protection and Cell Proliferation, *Nutrients*. 5 (2013) 97–110.
doi:https://doi.org/10.3390/nu5010097.
- [90] R. Moreno-Reyes, D. Egrise, J. Nève, J.L. Pasteels, A. Schoutens, Selenium deficiency-induced growth retardation is associated with an impaired bone metabolism and osteopenia, *J. Bone Miner. Res.* 16 (2001) 1556–1563.
doi:10.1359/jbmr.2001.16.8.1556.
- [91] L.C. Clark, Effects of Selenium Supplementation for Cancer Prevention in Patients With Carcinoma of the Skin, *Jama*. 276 (1996) 1957.
doi:10.1001/jama.1996.03540240035027.

- [92] J.S. Morris, S.B. Crane, Selenium toxicity from a misformulated dietary supplement, adverse health effects, and the temporal response in the nail biologic monitor, *Nutrients*. 5 (2013) 1024–1057. doi:10.3390/nu5041024.
- [93] M. Vinceti, J. Mandrioli, P. Borella, B. Michalke, A. Tsatsakis, Y. Finkelstein, Selenium neurotoxicity in humans: Bridging laboratory and epidemiologic studies, *Toxicol. Lett.* 230 (2014) 295–303. doi:10.1016/j.toxlet.2013.11.016.
- [94] H. Wang, J. Zhang, H. Yu, Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: Comparison with selenomethionine in mice, *Free Radic. Biol. Med.* 42 (2007) 1524–1533. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.013.
- [95] J. Zhang, H. Wang, Y. Bao, L. Zhang, Nano red elemental selenium has no size effect in the induction of seleno-enzymes in both cultured cells and mice, *Life Sci.* 75 (2004) 237–244. doi:10.1016/j.lfs.2004.02.004.
- [96] J. Zhang, X. Wang, T.T. Xu, Elemental selenium at nano size (Nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: Comparison with se-methylselenocysteine in mice, *Toxicol. Sci.* 101 (2008) 22–31. doi:10.1093/toxsci/kfm221.
- [97] B. Sarkar, S. Bhattacharjee, A. Daware, P. Tribedi, K.K. Krishnani, P.S. Minhas, Selenium Nanoparticles for Stress-Resilient Fish and Livestock, *Nanoscale Res. Lett.* 10 (2015). doi:10.1186/s11671-015-1073-2.
- [98] T.M. Sakr, M. Korany, K. V. Katti, Selenium nanomaterials in biomedicine—An overview of new opportunities in nanomedicine of selenium, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 46 (2018) 223–233. doi:10.1016/j.jddst.2018.05.023.
- [99] S. Chhabria, K. Desai, Selenium Nanoparticles and Their Applications, *Encycl. Nanosci. Nanotechnol.* (2016) 1–32.
- [100] S. V. Valueva, L.N. Borovikova, V. V. Koreneva, Y.I. Nazarkina, a. I. Kipper, V. V. Kopeikin, Structural-morphological and biological properties of selenium nanoparticles stabilized by bovine serum albumin, *Russ. J. Phys. Chem. A.* 81 (2007) 1170–1173. doi:10.1134/S0036024407070291.
- [101] H. Chen, J.B. Yoo, Y. Liu, G. Zhao, Green synthesis and characterization of se nanoparticles and nanorods, *Electron. Mater. Lett.* 7 (2011) 333–336. doi:10.1007/s13391-011-0420-4.
- [102] A.R. Ingole, S.R. Thakare, N.T. Khati, A. V. Wankhade, D.K. Burghate, Green synthesis of selenium nanoparticles under ambient condition, *Chalcogenide Lett.* 7 (2010) 485–489.
- [103] X. Gao, J. Zhang, L. Zhang, Hollow sphere selenium nanoparticles: Their in-vitro anti hydroxyl radical effect, *Adv. Mater.* 14 (2002) 290–293. doi:10.1002/1521-4095(20020219)14:4<290::AID-ADMA290>3.0.CO;2-U.
- [104] J.S. Zhang, X.Y. Gao, L.D. Zhang, Y.P. Bao, Biological effects of a nano red elemental selenium, *Biofactors.* 15 (2001) 27–38. doi:10.1002/biof.5520150103.
- [105] L. Kong, Q. Yuan, H. Zhu, Y. Li, Q. Guo, Q. Wang, X. Bi, X. Gao, The suppression of prostate LNCaP cancer cells growth by Selenium nanoparticles through Akt/Mdm2/AR controlled apoptosis, *Biomaterials.* 32 (2011) 6515–6522. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.05.032.
- [106] S.Y. Zhang, J. Zhang, H.Y. Wang, H.Y. Chen, Synthesis of selenium

- nanoparticles in the presence of polysaccharides, *Mater. Lett.* 58 (2004) 2590–2594. doi:10.1016/j.matlet.2004.03.031.
- [107] C. Shah, M. Kumar, P. Bajaj, Acid-induced synthesis of polyvinyl alcohol-stabilized selenium nanoparticles, *Nanotechnology*. 18 (2007) 385607. doi:10.1088/0957-4484/18/38/385607.
- [108] Z.H. Lin, F.C. Lin, C.R.C. Wang, Observation in the growth of selenium nanoparticles, *J. Chinese Chem. Soc.* 51 (2004) 239–242. doi:10.1002/jccs.200400038.
- [109] Z. Chen, Y. Shen, A. Xie, J. Zhu, Z. Wu, F. Huang, L-Cysteine-assisted controlled synthesis of selenium nanospheres and nanorods, *Cryst. Growth Des.* 9 (2009) 1327–1333. doi:10.1021/cg800398b.
- [110] T. Chen, Y.S. Wong, W. Zheng, Y. Bai, L. Huang, Selenium nanoparticles fabricated in *Undaria pinnatifida* polysaccharide solutions induce mitochondria-mediated apoptosis in A375 human melanoma cells, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 67 (2008) 26–31. doi:10.1016/j.colsurfb.2008.07.010.
- [111] P.A. Tran, T.J. Webster, Selenium nanoparticles inhibit *Staphylococcus aureus* growth., *Int. J. Nanomedicine*. 6 (2011) 1553–8. doi:10.2147/IJN.S21729.
- [112] P.A. Tran, N. O'Brien-Simpson, E.C. Reynolds, N. Pantarat, D.P. Biswas, A.J. O'Connor, Low cytotoxic trace element selenium nanoparticles and their differential antimicrobial properties against *S. aureus* and *E. coli*, *Nanotechnology*. 27 (2015) 045101. doi:10.1088/0957-4484/27/4/045101.
- [113] S. Shoeibi, M. Mashreghi, Biosynthesis of selenium nanoparticles using *Enterococcus faecalis* and evaluation of their antibacterial activities, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 39 (2017) 135–139. doi:10.1016/j.jtemb.2016.09.003.
- [114] G. Guisbiers, Q. Wang, E. Khachatryan, L.C.C. Mimum, R. Mendoza-Cruz, P. Larese-Casanova, T.J.J. Webster, K.L.L. Nash, Inhibition of *e. Coli* and *s. aureus* with selenium nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation in deionized water, *Int. J. Nanomedicine*. 11 (2016) 3731–6. doi:10.2147/IJN.S106289.
- [115] S. Niiyama, R. Happle, R. Hoffmann, Validation of Patient-Reported Outcomes Measurement Information System (PROMIS) Short Forms for Use in Childhood-onset Systemic Lupus Erythematosus, *Eur. J. Dermatology*. 11 (2001) 475–476. doi:10.1002/acr.
- [116] E. Cremonini, E. Zonaro, M. Donini, S. Lampis, M. Boaretti, S. Dusi, P. Melotti, M.M. Lleo, G. Vallini, Biogenic selenium nanoparticles: characterization, antimicrobial activity and effects on human dendritic cells and fibroblasts, *Microb. Biotechnol.* 9 (2016) 758–771. doi:10.1111/1751-7915.12374.
- [117] D. Chudobova, K. Cihalova, S. Dostalova, B. Ruttkay-Nedecky, M.A. Merlos Rodrigo, K. Tmejova, P. Kopel, L. Nejdil, J. Kudr, J. Gumulec, S. Krizkova, J. Kynicky, R. Kizek, V. Adam, Comparison of the effects of silver phosphate and selenium nanoparticles on *Staphylococcus aureus* growth reveals potential for selenium particles to prevent infection, *FEMS Microbiol. Lett.* 351 (2014) 195–201. doi:10.1111/1574-6968.12353.
- [118] P.A. Tran, T.J. Webster, Antimicrobial selenium nanoparticle coatings on polymeric medical devices, *Nanotechnology*. 24 (2013) 7pp.

- doi:10.1088/0957-4484/24/15/155101.
- [119] M. Stevanović, N. Filipović, J. Djurdjević, M. Lukić, M. Milenković, A. Boccaccini, 45S5Bioglass®-based scaffolds coated with selenium nanoparticles or with poly(lactide-co-glycolide)/selenium particles: Processing, evaluation and antibacterial activity, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 132 (2015) 208–215. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.05.024.
- [120] S. Mentus, U. Mioč, *Odabrane metode fizičko-hemijske analize*, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, 1993.
- [121] J. Dimitrić Marković, *Praktični aspekti odabranih poglavlja molekulske spektrohemijske*, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, 2008.
- [122] Q. Ye, P. Spencer, Analyses of material-tissue interfaces by Fourier transform infrared, Raman spectroscopy, and chemometrics, in: *Mater. Interfacial Phenom. Contrib. from Dent. Craniofacial Reconstr.*, Elsevier, 2016: pp. 231–251. doi:10.1016/B978-0-08-100330-5.00009-1.
- [123] J.L. Koenig, J.L. Koenig, Applications of IR spectroscopy to polymers, in: *Spectrosc. Polym.*, Elsevier, 1999: pp. 147–206. doi:10.1016/B978-044410031-3/50004-9.
- [124] S.L. Hsu, IR Spectroscopy, in: *Compr. Polym. Sci. Suppl.*, Elsevier, 1989: pp. 429–468. doi:10.1016/B978-0-08-096701-1.00020-3.
- [125] K.P.J. Williams, I.C. Wilcock, Raman spectroscopy of polymers, in: *Polym. Polym. Compos.*, Elsevier, 1997: pp. 443–449. doi:10.1016/B978-044410031-3/50005-0.
- [126] A. Downes, A. Elfick, Raman spectroscopy and related techniques in biomedicine, *Sensors*. 10 (2010) 1871–1889. doi:10.3390/s100301871.
- [127] F. Adar, Current Uses of Raman Microscopy in Biomedical Studies, *Spectroscopy*. 30 (2015) 1–6. <http://www.spectroscopyonline.com/current-uses-raman-microscopy-biomedical-studies>.
- [128] F. Pulizzi, Electron and X-ray microscopy, *Nat. Mater.* 8 (2009) 259. doi:10.1038/nmat2424.
- [129] P.C. Lin, S. Lin, P.C. Wang, A.R. Sridhar, Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials, 32 (2014) 711–726. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.11.006. Techniques.
- [130] D.C. Joy, Scanning electron microscopy for materials characterization, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 2 (1997) 465–468. doi:10.1016/S1359-0286(97)80091-5.
- [131] D.B. Williams, C.B. Carter, *The Transmission Electron Microscope*, in: *Transm. Electron Microsc.*, Springer US, Boston, MA, 2009: pp. 3–22. doi:10.1007/978-0-387-76501-3_1.
- [132] L.F. Kourkoutis, J.M. Plitzko, W. Baumeister, Electron Microscopy of Biological Materials at the Nanometer Scale, *Annu. Rev. Mater. Res.* 42 (2012) 33–58. doi:10.1146/annurev-matsci-070511-155004.
- [133] D.B. Williams, C.B. Carter, Specimen Preparation, in: *Transm. Electron Microsc.*, Springer US, Boston, MA, 2009: pp. 173–193. doi:10.1007/978-0-387-76501-3_10.
- [134] D.B. Williams, C.B. Carter, High-Resolution TEM, in: *Transm. Electron Microsc.*, Springer US, Boston, MA, 2009: pp. 483–509. doi:10.1007/978-0-387-76501-3_28.

- [135] M. Malatesta, Transmission electron microscopy for nanomedicine: novel applications for long-established techniques., *Eur. J. Histochem.* 60 (2016) 2751. doi:10.4081/ejh.2016.2751.
- [136] P. (Ed.). Gabbot, Principles and Applications of Thermal Analysis, 2008. doi:10.1002/9780470697702.
- [137] W.M. Groenewoud, Characterisation of Polymers by Thermal Analysis, 2001. doi:10.1016/B978-044450604-7/50007-8.
- [138] T. Thermogravimetric, I. Family, Thermogravimetric Analysis (TGA) A Beginner ' s Guide, (1960).
- [139] Z. Stojanović, S. Marković, D. Uskoković, No Title, *Teh. Mater.* 19 (2010) 1–15.
- [140] L. Rabinovich-Guilatt, P. Couvreur, G. Lambert, D. Goldstein, S. Benita, C. Dubernet, Extensive surface studies help to analyse zeta potential data: the case of cationic emulsions, *Chem. Phys. Lipids.* 131 (2004) 1–13. doi:10.1016/j.chemphyslip.2004.04.003.
- [141] K.E. Sapsford, K.M. Tyner, B.J. Dair, J.R. Deschamps, I.L. Medintz, Analyzing Nanomaterial Bioconjugates: A Review of Current and Emerging Purification and Characterization Techniques, *Anal. Chem.* 83 (2011) 4453–4488. doi:10.1021/ac200853a.
- [142] R. Xu, Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement, *Particuology.* 6 (2008) 112–115. doi:10.1016/J.PARTIC.2007.12.002.
- [143] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays., *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55–63. doi:https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- [144] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, 2015. doi:10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001.
- [145] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206–221. doi:10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J.
- [146] A. Capes-Davis, G. Theodosopoulos, I. Atkin, H.G. Drexler, A. Kohara, R.A.F. MacLeod, J.R. Masters, Y. Nakamura, Y.A. Reid, R.R. Reddel, R.I. Freshney, Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines, *Int. J. Cancer.* 127 (2010) 1–8. doi:10.1002/ijc.25242.
- [147] J. Shi, Steric Stabilization, 2002. http://muri.lci.kent.edu/References/NIM_Papers/stabilization_of_NP_suspensions/2002_Shi_steric_stabilization.pdf.
- [148] N. Filipović, M. Stevanović, A. Radulović, V. Pavlović, D. Uskoković, Facile synthesis of poly(ϵ -caprolactone) micro and nanospheres using different types of polyelectrolytes as stabilizers under ambient and elevated temperature, *Compos. Part B Eng.* 45 (2013) 1471–1479. doi:10.1016/J.COMPOSITESB.2012.07.008.
- [149] K. Inoue, N. Baden, M. Terazima, Diffusion coefficient and the secondary structure of poly-L-glutamic acid in aqueous solution., *J. Phys. Chem. B.* 109 (2005) 22623–8. doi:10.1021/jp052897y.

- [150] N. Filipović, M. Stevanović, J. Nunić, S. Cundrič, M. Filipič, D. Uskoković, Synthesis of poly(ϵ -caprolactone) nanospheres in the presence of the protective agent poly(glutamic acid) and their cytotoxicity, genotoxicity and ability to induce oxidative stress in HepG2 cells, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 117 (2014) 414–424. doi:10.1016/J.COLSURFB.2014.03.015.
- [151] W. Abdelwahed, G. Degobert, S. Stainmesse, H. Fessi, Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (2006) 1688–1713. doi:10.1016/j.addr.2006.09.017.
- [152] R.A. Osseni, C. Debbasch, M.O. Christen, P. Rat, J.M. Warnet, Tacrine-induced Reactive Oxygen Species in a Human Liver Cell Line: The Role of Anethole Dithiolethione as a Scavenger., *Toxicol. In Vitro*. 13 (1999) 683–8. doi:10.1016/S0887-2333(99)00050-8.
- [153] J. Petković, B. Žegura, M. Stevanović, N. Drnovšek, D. Uskoković, S. Novak, M. Filipič, DNA damage and alterations in expression of DNA damage responsive genes induced by TiO₂ nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells, *Nanotoxicology*. 5 (2011) 341–353. doi:10.3109/17435390.2010.507316.
- [154] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191. doi:10.1016/0014-4827(88)90265-0.
- [155] T. Peters, All about albumin : biochemistry, genetics, and medical applications, Academic Press, 1996.
- [156] H. Sapper, S.O. Kang, H.H. Paul, W. Lohmann, The reversibility of the vitamin C redox system: Electrochemical reasons and biological aspects, *Zeitschrift Fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 37 (1982) 942–946. doi:10.1515/znc-1982-1015.
- [157] CLSI, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th ed., Wayne, PA 19087 USA, 2017. www.clsi.org.
- [158] V. Crescenzi, G. Manzini, G. Calzolari, C. Borri, Thermodynamics of fusion of poly- β -propiolactone and poly- ϵ -caprolactone. comparative analysis of the melting of aliphatic polylactone and polyester chains, *Eur. Polym. J.* 8 (1972) 449–463. doi:10.1016/0014-3057(72)90109-7.
- [159] Phosphate-buffered saline (PBS)., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006. doi:10.1101/pdb.rec8247.
- [160] S. Razic, S. Djogo, L. Slavkovic, Inorganic analysis of herbal drugs. Part II. Plant and soil analysis – diverse bioavailability and uptake of essential and toxic elements *, *J. Serb. Chem. Soc.* 88+543. 7162 (2006). doi:10.2298/JSC0610095R.
- [161] K. Herzog, R.J. Müller, W.D. Deckwer, Mechanism and kinetics of the enzymatic hydrolysis of polyester nanoparticles by lipases, *Polym. Degrad. Stab.* 91 (2006) 2486–2498. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2006.03.005.
- [162] I. Castilla-Cortázar, J. Más-Estellés, J.M. Meseguer-Dueñas, J.L. Escobar Ivirico, B. Marí, A. Vidaurre, Hydrolytic and enzymatic degradation of a poly(ϵ -caprolactone) network, *Polym. Degrad. Stab.* 97 (2012) 1241–1248. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2012.05.038.
- [163] I. Journal, Biodegradable poly (epsilon-caprolactone) nano-particles for tumor-targeted delivery of tamoxifen, (2017). doi:10.1016/S0378-

- 5173(02)00483-0.
- [164] Bradford MM, A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding, *Anal Biochem.* 72 (1976) 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [165] T. Teeraphatpornchai, T. Nakajima-Kambe, Y. Shigeno-Akutsu, M. Nakayama, N. Nomura, T. Nakahara, H. Uchiyama, Isolation and characterization of a bacterium that degrades various polyester-based biodegradable plastics, *Biotechnol. Lett.* 25 (2003) 23–28. doi:10.1023/A:1021713711160.
- [166] T. Elzein, M. Nasser-Eddine, C. Delaite, S. Bistac, P. Dumas, FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces, *J. Colloid Interface Sci.* 273 (2004) 381–387. doi:10.1016/J.JCIS.2004.02.001.
- [167] S. Suganya, T. Senthil Ram, B.S. Lakshmi, V.R. Giridev, Herbal drug incorporated antibacterial nanofibrous mat fabricated by electrospinning: An excellent matrix for wound dressings, *J. Appl. Polym. Sci.* 121 (2011) 2893–2899. doi:10.1002/app.33915.
- [168] G.M. El Maghraby, R.N. Elsergany, Fast disintegrating tablets of nisoldipine for intra-oral administration, *Pharm. Dev. Technol.* 19 (2014) 641–650. doi:10.3109/10837450.2013.813543.
- [169] M. Stevanović, I. Bračko, M. Milenković, N. Filipović, J. Nunić, M. Filipič, D.P. Uskoković, Multifunctional PLGA particles containing poly(l-glutamic acid)-capped silver nanoparticles and ascorbic acid with simultaneous antioxidative and prolonged antimicrobial activity, *Acta Biomater.* 10 (2014) 151–162. doi:10.1016/j.actbio.2013.08.030.
- [170] P. Fonte, S. Reis, B. Sarmento, Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery, *J. Control. Release.* 225 (2016) 75–86. doi:10.1016/j.jconrel.2016.01.034.
- [171] A.B. Brizuela, L.C. Bichara, E. Romano, A. Yurquina, S. Locatelli, S.A. Brandán, A complete characterization of the vibrational spectra of sucrose, *Carbohydr. Res.* 361 (2012) 212–218. doi:10.1016/j.carres.2012.07.009.
- [172] Y. He, Y. Inoue, Novel FTIR method for determining the crystallinity of poly(ϵ -caprolactone), *Polym. Int.* 49 (2000) 623–626. doi:10.1002/1097-0126(200006)49:6<623::AID-PI435>3.0.CO;2-8.
- [173] M.M. Coleman, J. Zarian, Fourier-transform infrared studies of polymer blends. II. Poly(ϵ -caprolactone)–poly(vinyl chloride) system, *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.* 17 (1979) 837–850. doi:10.1002/pol.1979.180170509.
- [174] J. Liu, T. Viverette, M. Virgin, M. Anderson, P. Dalal, A Study of the Impact of Freezing on the Lyophilization of a Concentrated Formulation with a High Fill Depth, *Pharm. Dev. Technol.* 10 (2005) 261–272. doi:10.1081/PDT-54452.
- [175] N.-O. Chung, M.K. Lee, J. Lee, Mechanism of freeze-drying drug nanosuspensions, *Int. J. Pharm.* 437 (2012) 42–50. doi:10.1016/J.IJPHARM.2012.07.068.
- [176] Y. Roos, M. Karel, Phase Transitions of Amorphous Sucrose and Frozen Sucrose Solutions, *J. Food Sci.* 56 (1991) 266–267. doi:10.1111/j.1365-2621.1991.tb08029.x.
- [177] W. Wang, Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals, *Int. J. Pharm.* 203 (2000) 1–60. doi:10.1016/S0378-5173(00)00423-3.

- [178] A. Saez, M. Guzmán, J. Molpeceres, M. R. Aberturas, Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (2000) 379–387. doi:10.1016/S0939-6411(00)00125-9.
- [179] I. Bajaj, R. Singhal, Poly (glutamic acid) – An emerging biopolymer of commercial interest, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 5551–5561. doi:10.1016/J.BIORTECH.2011.02.047.
- [180] I.B. Bajaj, R.S. Singhal, Flocculation Properties of Poly(γ -Glutamic Acid) Produced from *Bacillus subtilis* Isolate, *Food Bioprocess Technol.* 4 (2011) 745–752. doi:10.1007/s11947-009-0186-y.
- [181] M. Stevanović, B. Kovačević, J. Petković, M. Filipič, D. Uskoković, Effect of poly- α , γ , L-glutamic acid as a capping agent on morphology and oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles, *Int. J. Nanomedicine.* 6 (2011) 2837. doi:10.2147/IJN.S24889.
- [182] R.P. Singh, P. Ramarao, Accumulated Polymer Degradation Products as Effector Molecules in Cytotoxicity of Polymeric Nanoparticles, *Toxicol. Sci.* 136 (2013) 131–143. doi:10.1093/toxsci/kft179.
- [183] D. Kirkland, S. Pfuhler, D. Tweats, M. Aardema, R. Corvi, F. Darroudi, A. Elhajouji, H. Glatt, P. Hastwell, M. Hayashi, P. Kasper, S. Kirchner, A. Lynch, D. Marzin, D. Maurici, J.-R. Meunier, L. Müller, G. Nohynek, J. Parry, E. Parry, V. Thybaud, R. Tice, J. van Benthem, P. Vanparys, P. White, How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop, *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 628 (2007) 31–55. doi:10.1016/j.mrgentox.2006.11.008.
- [184] S. Knasmüller, W. Parzefall, R. Sanyal, S. Ecker, C. Schwab, M. Uhl, V. Mersch-Sundermann, G. Williamson, G. Hietsch, T. Langer, F. Darroudi, A.T. Natarajan, Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens, *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 402 (1998) 185–202. doi:10.1016/S0027-5107(97)00297-2.
- [185] E.V. Ramos Campos, N.F. Silva de Melo, V.A. Guilherme, E. de Paula, A.H. Rosa, D.R. de Araújo, L.F. Fraceto, Preparation and Characterization of Poly(ϵ -Caprolactone) Nanospheres Containing the Local Anesthetic Lidocaine, *J. Pharm. Sci.* 102 (2013) 215–226. doi:10.1002/jps.23350.
- [186] D. Surendran, S.R. Kumar, Long Term Effect of Biodegradable Polymer on Oxidative Stress and Genotoxicity, *BIO.* 2 (2012) 37–46. doi:10.5618/bio.2012.v2.n1.4.
- [187] A.H. Pinto, E.R. Leite, E. Longo, E.R. De Camargo, Crystallization at room temperature from amorphous to trigonal selenium as a byproduct of the synthesis of water dispersible zinc selenide, *Mater. Lett.* 87 (2012) 62–65. doi:10.1016/j.matlet.2012.07.067.
- [188] J. Grdadolnik, Y. Maréchal, Bovine serum albumin observed by infrared spectrometry. II. Hydration mechanisms and interaction configurations of Embedded h₂O molecules, *Biopolym. - Biospectroscopy Sect.* 62 (2001) 54–67. doi:10.1002/(SICI)1097-0282(200007)54:1<64::AID-BIP70>3.0.CO;2-R.
- [189] A.A. Bunaciu, E. Bacalum, H.Y. Aboul-Enein, G. Elena Udristioiu, Ş. Fleschin,

- FT-IR Spectrophotometric Analysis of Ascorbic Acid and Biotin and their Pharmaceutical Formulations, *Anal. Lett.* 42 (2009) 1321–1327. doi:10.1080/00032710902954490.
- [190] A. Barth, Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1767 (2007) 1073–1101. doi:10.1016/j.bbabi.2007.06.004.
- [191] K. V. Abrosimova, O. V. Shulenina, S. V. Paston, FTIR study of secondary structure of bovine serum albumin and ovalbumin, *J. Phys. Conf. Ser.* 769 (2016). doi:10.1088/1742-6596/769/1/012016.
- [192] A. Baganich, V. Mikla, D. Semak, A. Sokolov, A. Shebanin, Raman Scattering in Amorphous Selenium, *Phys. Stat. Sol.* 297 (1991).
- [193] K. Okano, I. Saito, T. Mine, Y. Suzuki, T. Yamada, N. Rupesinghe, G.A.J. Amaratunga, W.I. Milne, D.R.T. Zahn, Characterizations of a-Se based photodetectors using X-ray photoelectron spectroscopy and Raman spectroscopy, *J. Non. Cryst. Solids.* 353 (2007) 308–312. doi:10.1016/j.jnoncrysol.2006.11.007.
- [194] M. Juhász, Y. Kitahara, T. Fujii, Thermal decomposition of vitamin C: An evolved gas analysis–ion attachment mass spectrometry study, *Food Chem.* 129 (2011) 546–550. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2011.04.056.
- [195] A.A. Salyers, D.D. Whitt, *Bacterial pathogenesis : a molecular approach*, 2nd ed., ASM Press, Washington, D.C., 2002. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/101126049>.
- [196] A.P. Fernandes, V. Gandin, Selenium compounds as therapeutic agents in cancer, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1850 (2015) 1642–1660. doi:10.1016/j.bbagen.2014.10.008.
- [197] G. Huang, Y. Zhang, Q. Zhang, B. Zhang, L. Wen, Vacuolization and apoptosis induced by nano-selenium in HeLa cell line, *Sci. China Chem.* 53 (2010) 2272–2278. doi:10.1007/s11426-010-4116-7.
- [198] H. Bittiger, R.H. Marchessault, W.D. Niegisch, IUCr, Crystal structure of poly- ϵ -caprolactone, *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.* 26 (1970) 1923–1927. doi:10.1107/S0567740870005198.
- [199] H. Hu, D.L. Dorset, Crystal structure of poly(ϵ -caprolactone), *Macromolecules.* 23 (1990) 4604–4607. doi:10.1021/ma00223a017.
- [200] B. Wunderlich, *Macromolecular Physics*, Elsevier, 1973. doi:10.1016/B978-0-12-765601-4.X5001-X.
- [201] M.J. Rashid, L. Ali Reza, N. Sultana, Fabrication of BSA Loaded Poly(Caprolactone) (PCL) Microsphere Incorporated Chitosan Scaffolds for Tissues Engineering Application, *Appl. Mech. Mater.* 695 (2014) 199–202. doi:10.4028/www.scientific.net/AMM.695.199.
- [202] C.G. Pitt, M. Chasin, A. Domb, E. Ron, E. Mathiowitz, R. Langer, K. Leong, C. Laurencin, H. Brem, S. Grossman, Biodegradable polymers as drug delivery systems, M. Dekker, 1991. doi:10.1016/0223-5234(91)90162-G.
- [203] C.G. Vonk, The determination of the lamellar thickness in semi-crystalline polymers by small-angle scattering, *Makromol. Chemie. Macromol. Symp.* 15 (1988) 215–222. doi:10.1002/masy.19880150116.
- [204] C. De Rosa, F. Auriemma, *Crystal Structures of Polymers*, in: *Handb. Polym. Cryst.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2013: pp. 31–70. doi:10.1002/9781118541838.ch2.

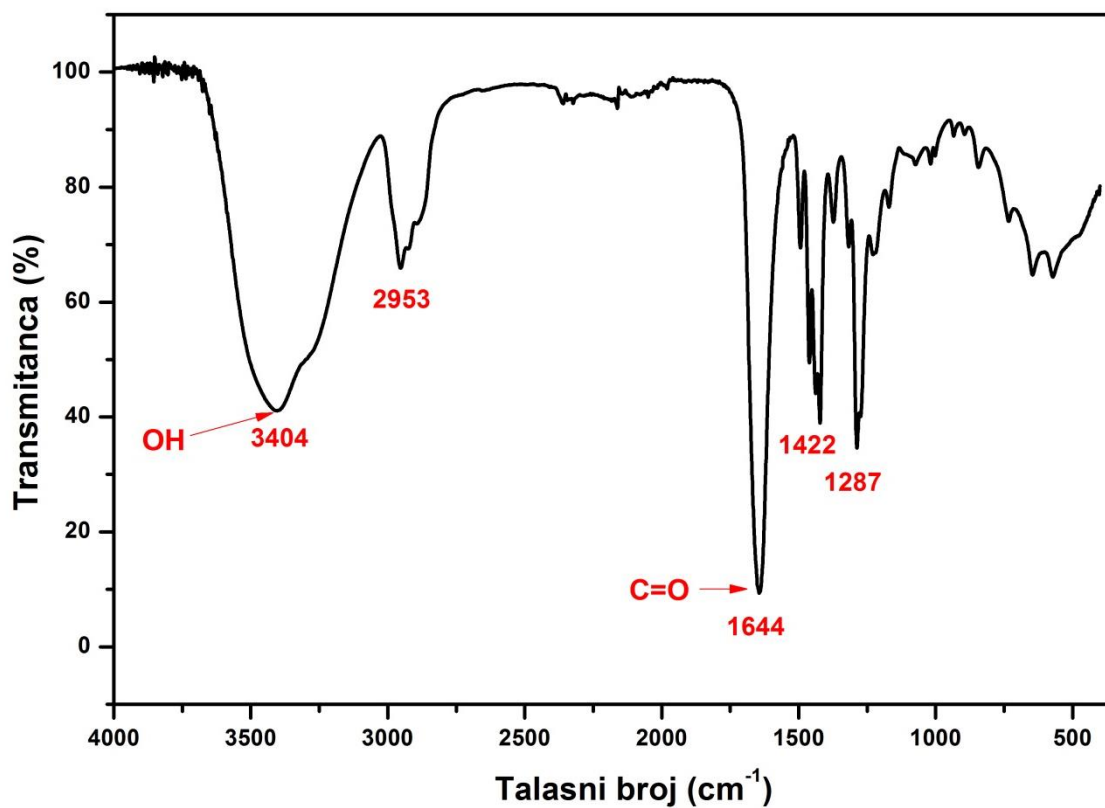
- [205] A. Włochowicz, M. Eder, Distribution of lamella thicknesses in isothermally crystallized polypropylene and polyethylene by differential scanning calorimetry, *Polymer (Guildf)*. 25 (1984) 1268–1270. doi:10.1016/0032-3861(84)90374-4.
- [206] X. Wang, Y. Wang, K. Wei, N. Zhao, S. Zhang, J. Chen, Drug distribution within poly(ϵ -caprolactone) microspheres and in vitro release, *J. Mater. Process. Technol.* 209 (2009) 348–354. doi:10.1016/j.jmatprotec.2008.02.004.
- [207] T. Estey, J. Kang, S.P. Schwendeman, J.F. Carpenter, BSA degradation under acidic conditions: A model for protein instability during release from PLGA delivery systems, *J. Pharm. Sci.* 95 (2006) 1626–1639. doi:10.1002/jps.20625.
- [208] J.S. Chawla, M.M. Amiji, Biodegradable poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen, *Int. J. Pharm.* 249 (2002) 127–138. doi:10.1016/S0378-5173(02)00483-0.
- [209] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castan, J.A. Planell, Review. Biomaterials in orthopaedics, *J. R. Soc. Interface.* (2008). doi:10.1098/rsif.2008.0151.
- [210] R. Mittal, J. Morley, H. Dinopoulos, E.G. Drakoulakis, E. Vermani, P. V. Giannoudis, Use of bio-resorbable implants for stabilisation of distal radius fractures: The United Kingdom patients' perspective, *Injury*. 36 (2005) 333–338. doi:10.1016/j.injury.2004.09.015.
- [211] M. Zilberman, J.J. Elsner, Antibiotic-eluting medical devices for various applications, *J. Control. Release.* 130 (2008) 202–215. doi:10.1016/j.jconrel.2008.05.020.
- [212] N.N. Showan, M.Y. and Anne, P. Jonathan, Sterility and Infection, in: Narayan R (Ed.), *Biomed. Mater.*, Springer US, New York, 2009: pp. 239–258. doi:10.1007/978-0-387-84872-3.
- [213] E.C. Rodríguez-Merchán, A.D. Liddle, Microbiological Concepts of the Infected Total Knee Arthroplasty, in: E.C. Rodríguez-Merchán, S. Oussedik (Eds.), *Infected Total Knee Arthroplast.*, Springer, Cham, 2018: pp. 11–17. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-319-66730-0_2.
- [214] M. Ribeiro, F.J. Monteiro, M.P. Ferraz, Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions, *Biomater.* 2 (2012) 176–194. doi:10.4161/biom.22905.
- [215] D. Teterycz, T. Ferry, D. Lew, R. Stern, M. Assal, P. Hoffmeyer, L. Bernard, I. Uçkay, Outcome of orthopedic implant infections due to different staphylococci, *Int. J. Infect. Dis.* 14 (2010). doi:10.1016/j.ijid.2010.05.014.
- [216] D.J. Evans, S.M.J. Fleiszig, Why does the healthy cornea resist pseudomonas aeruginosa infection?, *Am. J. Ophthalmol.* 155 (2013) 961–970. doi:10.1016/j.ajo.2013.03.001.
- [217] J. Yayan, B. Ghebremedhin, K. Rasche, Antibiotic Resistance of Pseudomonas aeruginosa in Pneumonia at a Single University Hospital Center in Germany over a 10-Year Period, *PLoS One*. 54 (2015) 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0139836.
- [218] J.A. Wright, S.P. Nair, Interaction of staphylococci with bone, *Int. J. Med. Microbiol.* 300 (2010) 193–204. doi:10.1016/j.ijmm.2009.10.003.
- [219] S. Xie, Y. Tao, Y. Pan, W. Qu, G. Cheng, L. Huang, D. Chen, X. Wang, Z. Liu, Z.

- Yuan, Biodegradable nanoparticles for intracellular delivery of antimicrobial agents., *J. Control. Release.* 187 (2014) 101–17.
doi:10.1016/j.jconrel.2014.05.034.
- [220] L. Zhao, P.K. Chu, Y. Zhang, Z. Wu, Antibacterial coatings on titanium implants, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 91 (2009) 470–480.
doi:10.1002/jbm.b.31463.
- [221] C.M. Oliphant, K. Eroschenko, Antibiotic Resistance, Part 2: Gram-negative Pathogens, *J. Nurse Pract.* 11 (2015) 79–86.
doi:10.1016/j.nurpra.2014.10.008.
- [222] C.M. Oliphant, K. Eroschenko, Antibiotic resistance, Part 1: Gram-positive pathogens, *J. Nurse Pract.* 11 (2015) 70–78.
doi:10.1016/j.nurpra.2014.09.018.
- [223] M. Stevanović, V. Uskoković, M. Filipović, S.D. Škapin, D. Uskoković, Composite PLGA/AgNpPGA/AscH nanospheres with combined osteoinductive, antioxidative, and antimicrobial activities, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 5 (2013) 9034–9042. doi:10.1021/am402237g.

7. PRILOG

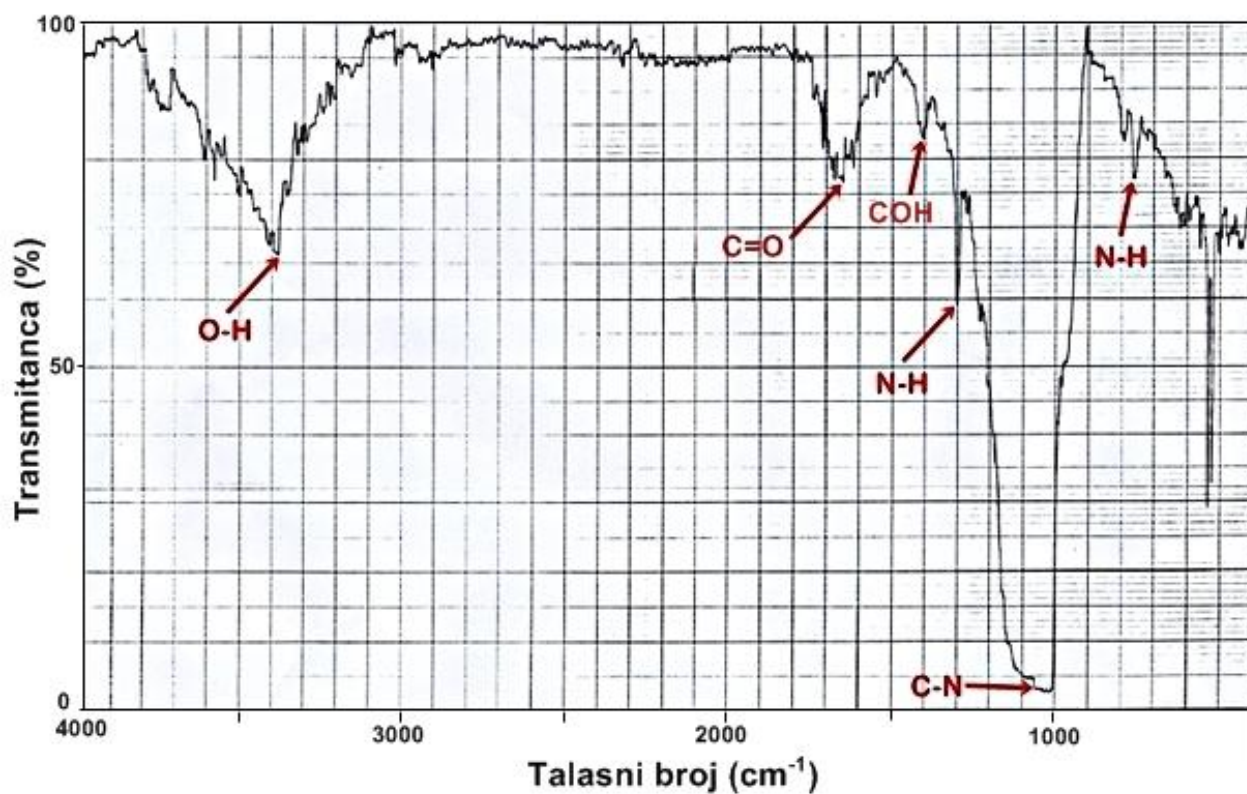
PRILOG 1

FTIR spektar praha PVP (K-25, Merck, Germany) koji je korišćen u sintezi PCL čestica, sa označenim najintenzivnijim trakama.



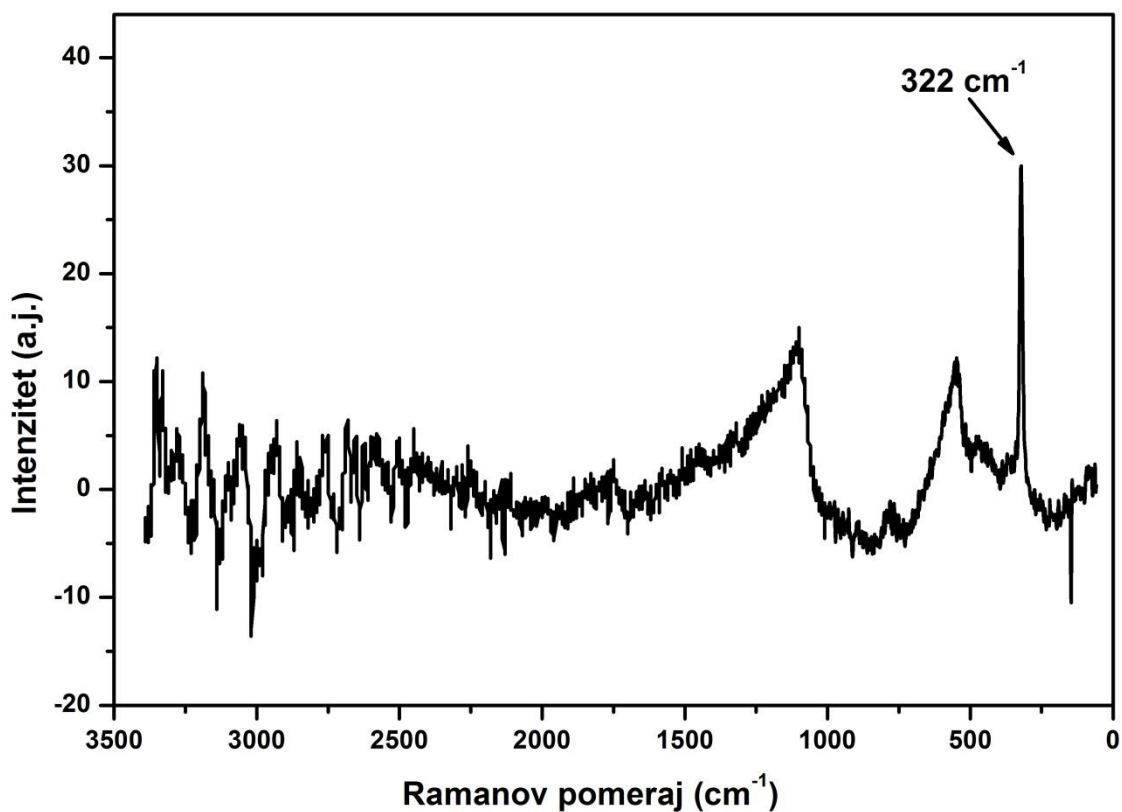
PRILOG 2

FTIR spektar praha PGA koji je korišćen u sintezi PCL čestica, sa označenim trakama. Najintenzivnije trake se javljaju na 1050, 3380, 1300 i 1400 cm^{-1} .



PRILOG 3

Ramanski spektar nosača uzorka. Najintenzivnija traka se javlja na 322 cm^{-1} i potiče od CaF_2 . Identična traka je zapažena i na spektru koloidnog rastvora SeNp.



8. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM

A. Biografski podaci o kandidatu

Nenad Filipović je rođen 25.11.1984. godine u Nišu, država Srbija. Osnovne studije je završio 2011. na Fakultetu za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu, sa prosečnom ocenom 8.23 i diplomskim radom "Termička stabilnost i kristalizacija amorfnih legura $\text{Fe}_{89.8}\text{Ni}_{1.5}\text{Si}_{5.2}\text{B}_3\text{C}_{0.5}$ ". Na istom fakultetu je 2011. odbranio master rad pod naslovom "Mehanizam prvog kristalizacionog stupnja amorfnih legura $\text{Fe}_{89.8}\text{Ni}_{1.5}\text{Si}_{5.2}\text{B}_3\text{C}_{0.5}$ ". Od 2011. godine je na doktorskim studijama Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu.

U Institutu tehničkih nauka SANU je zaposlen od novembra 2011. godine. Angažovan je na projektu integralnih i interdisciplinarnih istraživanja III 45004, "Molekularno dizajniranje nanočestica kontrolisanih morfoloških i fizičko-hemijskih karakteristika i funkcionalnih materijala na njihovoj osnovi".

Pored toga, aktivno je učestvovao i učestvuje na više međunarodnih projekata:

- COST akcija - *Theranostics Imaging and Therapy: An Action to Develop Novel Nanosized Systems for Imaging-Guided Drug Delivery*, 2011-2015;
- Bilateralni projekat Instituta tehničkih nauka SANU sa Univerzitetom u Erlangenu, Nemačka - *Scaffolds with therapeutic functionality*, 2014-2015.
- Bilateralni projekat Instituta tehničkih nauka SANU sa Slovenijom - *Biokompatibilne čestice i skafoldi projektovani za dostavu lekova i regenerativnu medicinu*, 2016-2017.
- Bilateralni projekat *Mobilita & Grande Rilevanza* između Republike Srbije i Republike Italije - *Imaging labeled biomaterials for cell-therapy follow-up by Magnetic Resonance Imaging* 2016-2018.
- COST akcija AMICI-*Anti-Microbial Coating Innovations to prevent infectious diseases* (COST Action CA-15114) 2016-2019.

B. Objavljeni naučni radovi proistekli iz doktorske teze

Rad u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (M21a):

N. Filipović, M. Stevanović, A. Radulović, V. Pavlović, D. Uskoković, ***Facile synthesis of poly(epsilon-caprolactone) micro and nanospheres using different types of polyelectrolytes as stabilizers under ambient and elevated temperature***, Composites Part B: Engineering, 45 (2013) 1471–1479.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.compositesb.2012.07.008>

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu(M21):

N. Filipović, M. Stevanović, J. Nunić, S. Cundrić, M. Filipič, D. Uskoković ***Synthesis of poly(epsilon-caprolactone) nanospheres in the presence of the protective agent poly(glutamic acid) and their cytotoxicity, genotoxicity and ability to induce oxidative stress in HepG2 cells***, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 117 (2014) 414–24.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.03.015>.

Magdalena Stevanović, Nenad Filipović, Jelena Djurdjević, Miodrag Lukić, Marina Milenković, Aldo Boccaccini, ***45S5 Bioglass®-based scaffolds coated with selenium nanoparticles or with poly(lactide-co-glycolide)/selenium particles: Processing, evaluation and antibacterial activity***, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 132 (2015) 208-215.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.05.024>.

M33 Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini:

Nenad Filipović, Magdalena Stevanović and Dragan Uskoković, *Effects of ambient and elevated drying temperature on morphological characteristics of poly (epsilon-caprolactone) obtained without and with different stabilizers*, **11th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, September 24-28, 2012, Belgrade**, Volume I (2012), p. 450-452.

M34 Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu:

Nenad Filipović, Magdalena Stevanović, Vladimir Pavlović, Aleksandra Radulović, Zoran Stojanović, Dragan Uskoković, *Synthesis and the effect of processing parameters on characteristics of poly-epsilon-caprolactone micro- and nanospheres*, **Tenth Young Researchers' Conference Materials Science and Engineering**, December 21-23, 2011, Belgrade, Program and the Book of Abstracts, p. 21.

Nenad Filipović, Magdalena Stevanović, Petar Stupar, Jana Petković, Metka Filipič, Dragan Uskoković, *Freeze-drying method to produce a range of PCL particles with tailored morphological properties*, **The fourteenth annual Materials Research Society Conference YUCOMAT**, 3-7 2012, Herceg Novi, Book of Abstracts, p. 124.

Petar Stupar, Magdalena Stevanović, Nenad Filipović, Vladimir Pavlović, Jana Nunić, Sandra Cundrič, Metka Filipič, Dragan Uskoković, *Effects of different cryoprotectants on morphology of lyophilized poly(ϵ -caprolactone) micro- and nanospheres*, **Joint Event of the 11th Young Researchers' Conference: Materials Science and Engineering and the 1st European Early Stage Researches' Conference on Hydrogen Storage**, December 3rd-5th, 2012, Belgrade, Program and the Book of Abstracts, p. 104.

Nenad Filipović, Magdalena Stevanović, Srečo D. Škapin, Ines Bračko, Dragan P. Uskoković, *Synthesis and characterization of selenium nanoparticles in the presence of bovine serum albumin or poly (L-glutamic acid) for biomedical application*, **Joint Event of the 11th Young Researchers' Conference: Materials Science and Engineering and the 1st European Early Stage Researches' Conference on Hydrogen Storage**, December 3rd-5th, 2012, Belgrade, Program and the Book of Abstracts, p. 105.

Nenad Filipović, Magdalena Stevanović, Vladimir Pavlović and Dragan Uskoković, *Selenium nanoparticles for biomedical application*, **The fifteenth annual Materials Research Society Conference YUCOMAT**, September 2-6, 2013, Herceg Novi, Book of Abstracts, p. 132.

Nenad Filipović, Magdalena Stevanović, Vladimir Pavlović and Dragan Uskoković, *Preparation and characterization of selenium nanoparticles incorporated within poly(ϵ -caprolactone)*, **The twelfth young researchers' conference, Materials Science and Engineering**, December 11-13, 2013, Belgrade, Program and the Book of Abstracts, p. 8.

A.R. Boccaccini, M. Stevanovic, N. Filipovic, M. Lukić, Lj. Veselinović, M. Milenković, *Development and evaluation of 45S5 bioactive glass based scaffolds coated with selenium nanoparticles or with poly(lactide-co-glycolide)/selenium nanoparticles*, **European Symposium and Exhibition on Biomaterials and Related Areas (Euro BioMAT)**, Weimar, Germany, 2015.

Nenad Filipović, Sanja Jeremić, Jasmina Nikodinović, Slavica Ražić, Magdalena Stevanović, *Effect of different degradation medium on PCL spheres loaded with selenium nanoparticles*. **Final Annual Meeting of the COST Action TD1004, "Theranostics Imaging and Therapy: An Action to Develop Novel Nanosized Systems for Imaging-Guided Drug Delivery"**, 10-11 September, Belgrade, 2015.

Nenad Filipović, Jana Nunić, Metka Filipič, Milos Filipović and Magdalena Stevanović, *Selenium nanoparticles as a potential candidate in cancer treatment*, **4th World Conference on Physico Chemical Methods in Drug Discovery and Development (PCMDDD-4)**, Rovinj, Hrvatska, 21.-24. 09. 2015. Programme & Book of Abstracts, p. 78.

Nenad Filipović, Sanja Jeremić, Lidija Đokić, Slavica Ražić, Magdalena Stevanović, *Comparison of the release of selenium nanoparticles from poly (ϵ -caprolactone) microparticles in four different degradation mediums*, **Fifteenth Young Researchers Conference – Materials Science and Engineering**, December 7-9, 2016, Belgrade, Program and the Book of Abstracts, p. 8.

Nenad Filipovic, Magdalena Stevanovic, Marina Milenkovic, Jana Nunić, Metka Filipič, *Selenium nanoparticles stabilized by poly (l-glutamic acid) as an antimicrobial agent*, AMICI meeting, Pori, Finland, 5-8. 06. 2017.

C. Objavljeni naučni radovi koji nisu proistekli iz doktorske teze

M21 Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu:

M. Stevanović, I. Bračko, M. Milenković, N. Filipović, J. Nunić, M. Filipič, D. P. Uskoković, *Multifunctional PLGA particles containing poly(L-glutamic acid)-capped silver nanoparticles and ascorbic acid with simultaneous antioxidative and prolonged antimicrobial activity*, Acta Biomaterialia, 10 (2014) 151-162.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.08.030>

M. Dinić, U. Pecikoza, J. Djokić, R. Stepanović-Petrović, M. Milenković, M. Stevanović, N. Filipović, J. Begović, N. Golić, J. Lukić, *Exopolysaccharide Produced by Probiotic Strain Lactobacillus paraplantarum BGCG11 Reduces Inflammatory Hyperalgesia in Rats*, Frontiers in Pharmacology, 9 (2018).

<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00001>

Vesna Lojpur, Jelena Krstić, Zorica Kačarević-Popović, Nenad Filipović, Ivana Lj. Validžić, *Flexible and high-efficiency Sb2S3/solid carrier solar cell at low light intensity*, Environmental Chemistry Letters, 16 (2018) 659-664.

<https://doi.org/10.1007/s1031>

M34 Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu:

M. Stevanović, N. Filipović, V. Catanzaro, S. Padovan, C. Grange, G. Digilio, *Design of PLGA microparticles as a cell scaffolds*. **6th China-Europe Symposium on**

Biomaterials in Regenerative Medicine (CESB) 21 - 24 May 2017, Porto, Portugal, book of abstracts 171-172.

Valeria Catanzaro, Giuseppe Digilio, Federico Capuana, Cristina Grange, Stefano Porta, Carla Carrera, Sergio Padovan, Nenad Filipovic, Magdalena Stevanovic, *Redox-responsive mri probes to follow-up the microenvironment within cell-embedding hydrogels*, **12th European Molecular Imaging Meeting (EMIM)**, 4-7 April 2017, Cologne, Germany.

Nenad Filipović, Miodrag Lukić, Abirami Sengottuvelan, Sonja Kaišarević, Nebojša Andrić, Aldo R. Boccaccini and Magdalena Stevanović, *Coated calcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering produced by foam replica method*, **The 14th Young Researchers' Conference Materials Science and Engineering**, 9.-11. December, 2015, Belgrade. Program and the Book of Abstracts, p. 3.

Catanzaro Valeria, Stevanovic Magdalena, Grange Cristina, Porta Stefano, Nenad Filipović, Tei Lorenzo, Carniato Fabio, Padovan Sergio, Esposito Giovanna, Ferrauto Giuseppe, Digilio Giuseppe, Aime Silvio, *pH responsive, gadolinium labelled cell-supporting microparticles for stem cell therapy and follow-up*, **European Molecular Imaging Meeting-EMIM 2015**, 18-20 March 2015, Venue: Kupferbau Tübingen, Hölderlinstraße 5, 72074 Tübingen, Germany.

Nenad Filipović, Magdalena Stevanović, Jelena Djurdjević, Jadranka Milikić, Ljiljana Veselinović, Vladimir Pavlović, Dragan Uskoković, *Facile chemical synthesis and characterization of polyester/magnesium oxide nanoparticles for biomedical application*, **The sixteenth annual Materials Research Society Conference YUCOMAT 2014**, September 1-5. Herceg Novi, Book of Abstract (2014) p. 71.

Digilio Giuseppe, Stevanović Magdalena, Filipović Nenad, Đurđević Jelena, Milikić Jadranka, Tei Lorenzo, Catanzaro Valeria, Padovan Sergio, Carrera Carla, Aime Silvio *Gadolinium labelled microparticles as cell scaffolds for cell transplantation*, **European molecular imaging meeting EMIM 2014**, June 4-6. Antwerp, Belgium.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Ненад Филиповић _____

Број индекса _____ 315/11 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Синтеза и карактеризација биокомпозита поли (ϵ -капролактон) / наночестице селена

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

Потпис аутора

У Београду, _____ 06.08.2018. _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ненад Филиповић

Број индекса 315/11

Студијски програм Докторске студије

Наслов рада Синтеза и карактеризација биокмпозита поли (ϵ -капролактон) /
наночестице селена

Ментори др Магдалена Стевановић, научни саветник, Институт техничких
наука САНУ

Проф. др Милош Мојовић, ванредни професор, Универзитет у
Београду-Факултет за физичку хемију

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 06.08.2018.

Изјава о коришћењу

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

Синтеза и карактеризација биокомпозита поли (ε-капролактон) / наночестице селена

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____ 06.08.2018.

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

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

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

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

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

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