

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU

Predmet: Referat o urađenoj doktorskoj disertaciji kandidata Željka Radovanovića

Odlukom br. 35/281 od 26. 05. 2016. godine, imenovani smo za članove Komisije za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata Željka Radovanovića, dipl. inž. tehnologije pod nazivom: „**Uticaj jona srebra, bakra i cinka na svojstva biokeramičkih materijala na bazi kalcijum–hidroksiapatita i kalcijum–fosfata**”.

Posle pregleda dostavljene Disertacije i drugih pratećih materijala i razgovora sa Kandidatom, Komisija je sačinila sledeći

REFERAT

1. UVOD

1.1. Hronologija odobravanja i izrade disertacije

2005/2006. godine Željko Radovanović, dipl. inž. tehnologije, upisao je doktorske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, po starom programu, naučna oblast **Hemija i hemijska tehnologija**.

11. 09. 2014. godine Željko Radovanović je prijavio temu doktorske disertacije pod naslovom: „Uticaj jona srebra, bakra i cinka na svojstva biokeramičkih materijala na bazi kalcijum–hidroksiapatita i kalcijum–fosfata”.

02. 10. 2014. Na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta doneta je odluka (br. 35/269) o imenovanju članova Komisije za ocenu podobnosti teme i kandidata Željka Radovanovića, dipl. inž. tehnologije za izradu doktorske disertacije i naučne zasnovanosti teme pod nazivom „Uticaj jona srebra, bakra i cinka na svojstva biokeramičkih materijala na bazi kalcijum–hidroksiapatita i kalcijum–fosfata”.

30. 10. 2014. Nastavno-naučno veće Tehnološko-metalurškog fakulteta je donelo odluku (br. 35/300) o prihvatanju Referata Komisije za ocenu podobnosti teme „Uticaj jona srebra, bakra i cinka na svojstva biokeramičkih materijala na bazi kalcijum–hidroksiapatita i kalcijum–fosfata” i kandidata Željka Radovanovića za izradu doktorske disertacije. Za mentora ove doktorske disertacije imenovan je dr Đorđe Janačković, redovni profesor TMF-a.

24. 11.2014. Na sednici Veća naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu data je saglasnost (Odluka br. 61206-5275/2-14) na predlog teme doktorske disertacije Željka

Radovanovića, dipl. inž. tehnologije, pod nazivom: „Uticaj jona srebra, bakra i cinka na svojstva biokeramičkih materijala na bazi kalcijum–hidroksiapatita i kalcijum–fosfata”.

26. 05. 2016. Na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta doneta je Odluka (br. 35/281) o imenovanju članova Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije Željka Radovanovića, dipl. inž. tehnologije, pod nazivom: „Uticaj jona srebra, bakra i cinka na svojstva biokeramičkih materijala na bazi kalcijum–hidroksiapatita i kalcijum–fosfata”.

1.2. Naučna oblast disertacije

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije pripadaju naučnoj oblasti **Hemija i hemijska tehnologija** za koju je matičan Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu. Mentor dr Đorđe Janačković, red. prof. TMF-a, je na osnovu objavljenih publikacija iz oblasti ove doktorske disertacije i stečenog naučno-istraživačkog iskustva kompetentan da rukovodi izradom ove doktorske disertacije.

1.3. Biografski podaci o kandidatu

Željko Radovanović je rođen 25. 02. 1980. godine u Mostaru. Osnovno školovanje je započeo u Mostaru a završio u Nevesinju, gde je završio i srednju školu, gimnaziju „Aleksa Šantić“. Školske 1999/2000. godine je upisao Tehnološko-metalurški fakultet u Beogradu. Diplomirao je na Katedri za neorgansku hemijsku tehnologiju 2005. godine, sa prosečnom ocenom 9,18. Diplomski rad sa temom: "Sinteza i karakterizacija kordijerita nehidrolitičkim sol-gel postupkom" odbranio je sa ocenom 10.

Školske 2005/2006. godine upisao je doktorske studije na Tehnološko – metalurškom fakultetu u Beogradu na smeru Neorganska hemijska tehnologija, pod mentorstvom profesora Đorđa Janačkovića. Na doktorskim studijama je uspešno položio sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 10.

Od 2007. do 2009. godine radio je kao istraživač–pripravnik, a od 2009. do 2012. godine kao istraživač–saradnik na Tehnološko – metalurškom fakultetu u Beogradu. Od 2012. godine zaposlen je na Inovacionom centru Tehnološko – metalurškom fakultetu. Od 2015. godine radi sa zvanjem Viši stručni saradnik.

Učestvovao je na istraživanjima u okviru sledećih projekata:

- “Razvoj mineralnih sorbenata na bazi bentonita i sepiolita za potrebe prehrambene industrije”, evidencioni broj: 7057B, 2005-2007.
- “Израда прототипа уређаја за регенерацију искоришћених минералних електроизолационих уља методом сорпције на минералном сорбенту”, ев.бр.401-00-218/2007-01/10-ИП (Тип 1)/10, 2007. (иновациони пројекат).
- EUREKA Project E!3303-BIONANOCOMPOSIT-Hidroxyapatite nanocomposite Ceramics-New Implant Materijal for Bone Substitutes, evidencioni broj kod MNZZ Republike Srbije: 401-00-67/2005-01/02.
- EUREKA Project E!4141- ECOSAFETY- Measures for providing a quality and safety in food chain i “Sinteza, struktura, svojstva i primena funkcionalnih

nanostrukturnih keramičkih i biokeramičkih materijala”, evidencioni broj 142070, 2006-2010.

- “Sinteza, struktura, svojstva i primena funkcionalnih nanostrukturnih keramičkih i biokeramičkih materijala”, evidencioni broj 142070, 2006-2010.

Sada učestvuje na istraživanju u okviru projekta

- “Sinteza, razvoj tehnologija dobijanja i primena nanostrukturnih multifunkcionalnih materijala definisanih svojstava“, evidencioni broj III 45019, 2011-2015.

Od 2007. godine angažovan je i na ispitivanjima različitih materijala (neorganskih, organskih, metala i njihovih kompozita) skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) i elektronsko disperzivnom spektroskopijom (EDS). Ova ispitivanja su vršena i za kolege sa drugih projekata a koji rade na Tehnološko-metalurškom fakultetu, kao i za istraživače sa drugih fakulteta i instituta Beogradskog univerziteta. Učestvovao je u izradi više diplomskih, završnih i master radova iz oblasti neorganske hemijske tehnologije i inženjerstva materijala.

U okviru projekta FP7-REGPOT-2009-1 NANOTECH FTM, br: 245916 boravio je u dva navrata (jun 2011. i jun 2012.) na usavršavanju u tehnikama sinterovanja i karakterizacije materijala u Institutu neorganske hemije Tehničkog univerziteta Riga, Letonija.

Učestvovao je u izradi studije:

Dj. Janačković, Dj. Veljović, R. Petrović, B. Jokić, I.Janković-Častvan, **Ž. Radovanović**, V. Pavlović, N. Gojković, V. Čebašek, M.Korakianiti, N. Pavlović, “Studija za konsolidaciju pepelišta u cilju funkcionalnih radova na pepelištu – partija 1“, Ugovor po Javnoj nabavci br. 896/2014 - Partija 1, ugovor zaveden kod narucioca EPS, ogranak TEK0 Kostolac pod br. 253, ugovor zaveden kod pruzaoca usluge. Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu pod br. 43/1, 2015.

Do sada je objavio šest radova u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), dva rada u istaknutim časopisima međunarodnog značaja (M22), četiri rada u časopisima međunarodnog značaja (M23), osam radova saopštenih na skupu međunarodnog značaja štampanih u izvodu (M34), jedan rad u vrhunskom časopisu nacionalnog značaja (M51) i šest radova saopštenih na skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64).

2. OPIS DISERTACIJE

2.1. Sadržaj disertacije

Doktorska disertacija Željka Radovanovića, dipl. inž. tehnologije napisana je na ukupno 165 strana, u okviru kojih se nalazi 20 poglavlja, sa ukupno 59 slika, 24 tabele i 337 literaturni navod. Doktorska disertacija sadrži: Uvod, Teorijski deo, Eksperimentalni deo, Rezultate i diskusiju, Zaključak i Literaturu. Na početku disertacije dati su izvodi na srpskom i engleskom jeziku. Po svojoj formi i sadržaju, podneti rad zadovoljava sve standarde Univerziteta u Beogradu za doktorsku disertaciju.

2.2. Kratak prikaz pojedinačnih poglavlja

U uvodu je naveden značaj i glavna svojstva koja implantni materijali za zamenu i reparaciju treba da imaju. Kao osnovni neorganski materijali za dobijanje implanata velike biokompatibilnosti predstavljeni su kalcijum–hidroksiapatit (HAp) i α - i β -kalcijum–fosfati (TCP). Obrazloženo je zašto je dopiranje ovih materijala jonima Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} značajno, kako za ostvarivanje antimikrobne aktivnosti tako i za moguće poboljšanje biokompatibilnosti. Istaknuti su ciljevi disertacije kao sveobuhvatno istraživanje od početne hidrotermalne sinteze dopiranih hidroksiapatita, preko karakterizacije prahova i primenjenih tehnika dobijanja i karakterizacije biokeramičkih materijala, kompakata i skafolda, sa akcentom na uticaj dopiranja jonima Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} kroz sve ove faze.

Teorijski deo disertacije obuhvata četiri poglavlja: Skeletni sistem – podela, uloge i osobine, Biomaterijali, Dopiranje HAp i HAp/TCP jonima Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} i Kompakti i skafoldi. U prvom poglavlju teorijskog dela navedene su i analizirane podele, uloge i osobine skeletnog sistema kao i sastav i osobine kostiju i faktori koji učestvuju u procesu izgradnje i prilagođavanja koštanog tkiva. U drugom poglavlju date su definicije biomaterijala i osobine koje oni moraju da zadovolje u cilju adekvatnog ispunjavanja svojih specifičnih uloga a izložena je i njihova podela. Prikazana su svojstva, načini dobijanja i mogućnosti poboljšanja kalcijum–hidroksiapatita i kalcijum–fosfata. U trećem poglavlju su analizirani razlozi dopiranja HAp i HAp/TCP jonima Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} , kao i pregled literature u kojoj se navode rezultati brojnih istraživača koji su korišćenjem različitih metoda sinteze i različitih količina dopanata pokušali da dobiju materijal što bolje biokompatibilnosti i antimikrobnog delovanja. U četvrtom poglavlju u teorijskog dela navedene su najzastupljenije metode procesiranja kompakata i skafolda. Prikazan je pregled literature koja se odnosi na procesiranje biokeramičkih materijala, kompakata i skafolda, različitim tehnikama pripreme polaznih kompakata i skafolda i različitim tehnikama sinterovanja, kao i njihova mehanička svojstva, bioaktivnost i biokompatibilnost.

Eksperimentalni deo disertacije obuhvata deset poglavlja. U prvom poglavlju dat je opis hidrotermalne sinteze polaznih prahova HAp-a, nedopiranog i dopiranih, sa početnim molskim Ca/P odnosima 1,67 i 1,50. U seriji sinteza sa Ca/P odnosom 1,67 sprovedeno je dopiranje HAp-a jonima metala, Ag^+ , Cu^{2+} ili Zn^{2+} , i prahovi sintetisani pri ovom odnosu su iskorišćeni za dobijanje kompakata. U seriji sinteza sa Ca/P odnosom 1,50 za dopiranje su korišćeni i Si^{4+} joni, prvenstveno u cilju stabilizacije TCP faza pri kalcinaciji praha, odnosno kasnije sinterovanju skafolda. Iz literature je poznato da Si^{4+} joni imaju ulogu u biomineralizaciji i stimulaciji biološke aktivnosti, pa je dopiranje jonima Si^{4+} u sintezama izvedeno samostalno i zajedno sa jonima Ag^+ i Cu^{2+} odnosno Ag^+ i Zn^{2+} da bi se razdvojio uticaj dopiranja jonima Si^{4+} i ostalih ispitivanih jona. U drugom poglavlju predstavljene su metode karakterizacije HAp-a Ca/P=1,67: rendgenska difrakciona analiza (XRD), skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM), energetska disperziona spektroskopijom (EDS), infracrvena spektroskopska analiza (FTIR), ispitivanje desorpcije jona metala pomoću atomske apsorpcione spektroskopije (AAS), simultana termo–gravimetrijska analiza/diferencialna

skenirajuća kalorimetrija (TGA/DSC). U trećem poglavlju je opisano ispitivanje antimikrobnog delovanja sintetisanih i kalciniranih prahova Ca/P=1,67 primenom *in vitro* kvantitativnog testa u tečnom medijumu sa mikroorganizmima: gram-pozitivnom *S. aureus* (ATCC 25923), dve gram-negativne: *E. coli* (ATCC 25922) i *P. aeruginosa* (ATCC 27833) i gljivica *C. albicans* (ATCC 24433). Četvrto poglavlje opisuje *in vitro* metode (MTT i DET test) kojima je ispitivana biokompatibilnost kalciniranih prahova Ca/P=1,67 sa humanim fibroblastnim ćelijama MRC-5. U petom poglavlju objašnjen je postupak pripreme unijaksijalnim i izostatskim presovanjem polaznih kompakata. U šestom poglavlju objašnjene su tehnike sinterovanja za dobijanje gustih biokeramičkih materijala – kompakata. Primjenjene su sledeće tehnike sinterovanja: konvencionalno (CS) na 1200 °C (oznaka 12) i mikrotalasno sinterovanje (MW) na 900, 1200 i 1300 °C (oznake: 09, 12 i 13, redom). U sedmom poglavlju predstavljene su metode karakterizacije kompakata: određivanje gustine i relativnog linearnog skupljanja, SEM preloma i poliranih površina kao i određivanje prosečne veličina zrna analizom mikrostrukture, XRD analiza i određivanje faznog sastava korišćenjem programa JADE 6 i određivanje mehaničkih karakteristika kompakata, tvrdoće i žilavosti. U osmom poglavlju navedene su metode karakterizacije HAp-a Ca/P=1,50: XRD, SEM, EDS, FTIR, i detaljno opisane metode ispitivanja citotoksičnosti prahova kalciniranih na 1150 °C, a u odnosu na L929 ćelijsku liniju – metabolička aktivnost ćelija, proliferacija ćelija, produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i analiza ćelijske nekroze obeležavanjem ćelija sa propidijum jodidom (PI) i merenjem produkcije laktat dehidrogenaze (LDH). U devetom poglavlju objašnjen je postupak dobijanja skafolda tehnikom replike poliuretanskog suđera i test biokompatibilnosti u simuliranom telesnom fluidu (SBF). I u desetom poglavlju navedene su metode karakterizacije skafolda: XRD skafolda serije 54 (prahovi kalcinirani na 1150 °C pa skafoldi sintetisani na 1400 °C) i određivanje faznog sastava korišćenjem programa JADE 6, SEM makro i mikro morfologije skafolda, određivanje poroznosti i mehaničkih karakteristika i ispitivanje antimikrobnog delovanja odabranih serija skafolda primenom *in vitro* kvantitativnog testa u tečnom medijumu a u odnosu na gram-pozitivnu *S. aureus* (ATCC 25923) i gram-negativnu *E. coli* (ATCC 25922).

Nakon objašnjenja eksperimentalnih procedura dati su rezultati istraživanja zajedno sa diskusijom u sledeća četiri poglavlja.

Prvo poglavlje u delu Rezultati i diskusija prezentuje rezultate karakterizacije i diskusiju o hidrotermalno sintetisanim i kalciniranim prahovima Ca/P=1,67. Difraktogrami sintetisanih prahova pokazuju da su sintetisani u velikoj meri amorfni hidroksiapatiti bez jasno izraženog uticaja jona dopiranja Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} . Za dopirane prahove utvrđeno je da je veličina kristalita, određena korišćenjem Šererove jednačine, nešto veća, a zapremina jedinične ćelije manja, osim u slučaju $Zn(0,4)HAp$, u odnosu na nedopiran HAp (29,5 nm i $531,89(4) \text{ \AA}^3$, redom). Prahovi kalcinirani na 1200 °C sastoje se od dve faze: HAp i α -TCP, a udeo α -TCP faze je manji u slučaju dopiranja. EDS analiza sintetisanih prahova pokazuje da su sintetisani kalcijum deficitarni hidroksiapatiti, osim u slučaju $Ag(0,2)HAp$, dok je atomski % dopirajućih jona dosta veći u odnosu na kalcinirane prahove. SEM analiza morfologije sintetisanih prahova je pokazala da se prahovi sastoje od sferno aglomerisanih štapićastih čestica HAp-a. Dimenzije sfernih agregata su 1,30 μm za nedopiran HAp, nešto

više za dopiranje sa Ag^+ (oko 1,37 μm), a niže za dopiranje sa Zn^{2+} (oko 1,25 μm) i Cu^{2+} (oko 1,20 μm). Kalcinacijom prahova na 1200 °C ovi sferni agregati štapićastih čestica su se stopili i delimično povezali. FTIR analiza je pokazala da sintetisani prahovi sadrže i karbonatne jone CO_3^{2-} , koji nestaju prilikom kalcinacije. U testu otpuštanja jona nisu detektovani joni Zn^{2+} dok je količina otpuštenih jona Ag^+ i Cu^{2+} veća kod sintetisanih u odnosu na kalcinisanе prahove i generalno, otpuštanje jona Ag^+ je u svim slučajevima veće nego jona Cu^{2+} . TGA/DSC analiza je pokazala da na temperaturama nižim od 800 °C dolazi do transformacije $\text{HAp} \rightarrow \beta\text{-TCP}$, a transformacija $\beta\text{-TCP} \rightarrow \alpha\text{-TCP}$ se dešava na 1055 °C za prahove dopirane jonima Ag^+ i Zn^{2+} , na 1095 °C za nedopirani HAp i na 1130 °C za prah dopiran jonima Cu^{2+} . Ispitivanje antimikrobne aktivnosti pokazalo je da svi prahovi imaju dobru antimikrobnu aktivnost ali nešto bolju aktivnost pokazuju kalcinisani prahovi sa rezultatom redukcije patogenih mikroorganizama koja se kreću u opsegu od 94 do 100%. MTT i DET *in vitro* testovi biokompatibilnosti kalcinisanih prahova u odnosu na MRC-5 ćelije pokazali su da najslabiju ali ipak dovoljno dobru biokompatibilnost imaju uzorci HAp-a dopirani jonima Cu^{2+} . U slučaju dopiranja jonima Ag^+ i Cu^{2+} bolju bioaktivnost pokazuju uzorci sa manjim udelom jona dopanata (početnih 0,2 mol% u odnosu na 0,4 mol%), dok je u slučaju dopiranja jonima Zn^{2+} obrnuto. Sa protokom vremena od 48 do 96 h, bioaktivnost svih uzoraka raste što ukazuje da ova dopiranja nisu citotoksična po MRC-5 ćelije.

Drugo poglavlje rezultata i diskusije prezentuje rezultate karakterizacije biokeramičkih materijala – kompakata. Za kompakte iz serije MW09 karakteristično je da imaju najveću poroznost (od 36% za nedopiran uzorak do 32% za dopiran sa Zn^{2+}) i posledično najslabije rezultate za tvrdoću i žilavost od 0,8–1,0 GPa i 0,65–0,77 $\text{MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$, redom. Osim uzorka dopiranog jonima Zn^{2+} , zrna nisu formirana i na mikrofografiji se uočavaju preseći šupljih sfera, koje su najbrojnije za dopiranje jonima Ag^+ od 0,4 mol%. Ovi kompakti sastoje se pretežno od HAp (oko 60 %) i $\beta\text{-TCP}$ faza a uzorak dopiran jonima Zn^{2+} sadrži i $\alpha\text{-TCP}$ fazu. Kompakti sinterovani konvencionalno i mikrotalasno na 1200 °C pokazuju sličnu morfologiju sa prosečnom veličinom zrna oko 1 μm . Kod obe tehnike sinterovanja kompakti dobijeni od HAp-a dopiranog jonima Ag^+ i Zn^{2+} od 0,4 mol% imaju najveću poroznost i pokazuju najmanju tvrdoću od oko 1,7 GPa osim MW kompakta sa Ag^+ . Najbolji rezultati tvrdoće za obe tehnike sinterovanja dobijeni su za kompakte koji sadrže jone Cu^{2+} (3,85 GPa za CS i 3,91 GPa za MW). Maksimalnu žilavost za CS od 1,46 $\text{MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$ pokazao je kompakt koji sadrži jone Cu^{2+} i za MW od 1,34 $\text{MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$ pokazao je kompakt koji sadrži jone Ag^+ od 0,4 mol%. Za kompakte sinterovane MW na 1300 °C primetno je znatno povećanje veličine zrna (3,25 μm za Cu^{2+} do 3,99 μm za Ag^+ od 0,2 mol%). Takođe, ostvarene su najmanje poroznost u odnosu na sve serije kompakata ali bez velike razlike u tvrdoći osim povećanja za kompakt dopiran jonima Zn^{2+} sa 1,7 GPa pri MW12 do 3,8 GPa. Vrednosti žilavosti su manje u odnosu na seriju MW12. Svi kompakti sinterovani CS i MW na 1200 i 1300 °C sastoje se od HAp, $\beta\text{-TCP}$ i $\alpha\text{-TCP}$ faza. Kompakti dopirani jonima Ag^+ imaju sličan odnos faza kao i nedopiran uzorak, dopiranje jonima Zn^{2+} više promovise $\alpha\text{-TCP}$ fazu, a kompakti dopirani jonima Cu^{2+} , koji su imali najbolje mehaničke karakteristike, najviše stabilisu $\beta\text{-TCP}$ fazu.

Treće poglavlje prezentuje rezultate karakterizacije i diskusiju o hidrotermalno sintetisanim i kalcinisanim prahovima Ca/P=1,50. Sintetisani su sledeći prahovi: HAp,

SiHAp, Ag(0,4)HAp, Cu(0,4)HAp, Ag(0,2)Cu(0,4)SiHAp i Ag(0,2)Zn(0,4)SiHAp. U svim slučajevima, dopiranja jonima Si^{4+} je izvedeno sa 12,5 mol% u odnosu na fosfor. FTIR spektri sintetisanih i kalciniranih prahova na 1150 °C u potpunosti su slični odgovarajućim spektrima prahova sa Ca/P odnosom 1,67. Sa XRD difraktograma kalciniranih prahova na 1150 °C uočava se da se prahovi sastoje od tri faze: HAp, β -TCP i α -TCP, pri čemu u tri slučaja dopiranja jonima Si^{4+} preovlađuju HAp i α -TCP faze dok je u slučaju dopiranja samo jonima Cu^{2+} i udeo β -TCP faze značajan. Mikrografi sintetisanih prahova u slučaju HAp, AgHAp i CuHAp prikazuju sferne agregate štapićastih čestica veličine od 0,5 do 2,0 μm , dok je kod uzoraka dopiranih jonima Si^{4+} : SiHAp, AgCuSiHAp i AgZnSiHAp, pored sfernih aglomerisanih čestica prisutan i značajan udeo čestica nanometarskih dimenzija koje najverovatnije potiču od SiO_2 . Mikrografije kalciniranih prahova na 1100 i 1150 °C prikazuju stopljena, pretežno sferna zrna. Citotoksičnost prahova kalciniranih na 1150 °C procenjena je na osnovu njihovog delovanja na metaboličku aktivnost, proliferaciju, produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta i nekrozu L929 ćelija. Jedino prahovi SiHAp i AgCuSiHAp značajno snižavaju metaboličku, odnosno proliferativnu aktivnost L929 ćelija, redom, što ukazuje na njihov potencijalni citotoksični efekat. Međutim, potvrda citotoksičnog delovanja ovih materijala nije dobijena na nivou ćelijske nekroze i nije praćena statistički značajno većom produkcijom ROS-a.

U četvrtom poglavlju rezultata i diskusije prikazani su rezultati karakterizacije biokeramičkih materijala – skafolda koji su dobijeni procesiranjem hidrotermalno sintetisanih (Ca/P=1,50: HAp, SiHAp, AgHAp, CuHAp, AgCuSiHAp i AgZnSiHAp) i kalciniranih prahova na 1100 i 1150 °C. Skafoldi su sinterovani konvencionalno na 1300 i 1400 °C. Skenirajućom elektronskom mikroskopijom je utvrđeno da je prečnik pora od 100 do 500 μm i da su pore u većini slučajeva međusobno povezane i valjkastog oblika što sve zajedno čini dobru osnovu za interakciju skafold–koštano tkivo, odnosno proliferaciju i rast nove kosti unutar skafolda. Mikrografija površine skafolda posle 14 dana u SBF-u pokazuje novoformirani sloj hidroksiapatita (osim u slučaju skafolda nastalog od praha CuHAp, kalcinisanog na 1100 °C i sinterovanog na 1400 °C, C04) ispod koga se naziru zrna koja izgrađuju skafolde. Ovo ukazuje na dobra bioaktivna svojstva skafolda u *in vitro* uslovima. Ukupna poroznost skafolda kreće se od 85 do 94 % a u skladu sa ovako velikom poroznošću su i prilično slabe mehaničke karakteristike koje se kreću u opsegu od 2,4 do 20,3 N maksimalne sile, od 0,05 do 0,28 MPa pritiskne čvrstoće i od 0,3 do 7,0 MPa za elastični modul. Antimikrobna aktivnost u odnosu na *E.Coli* kretala se od 0 % za skafold AC54 do 96% za skafold AC04 i od 5,3% za skafold AZ53 do 63% za skafold AZ04. Antimikrobna aktivnost u odnosu na *S.Aureus*. iznosila je 0, 60 i 74 % za AC53, AC04 i AC54, redom, i 5, 32 i 71 % za AZ53, AZ04 i AZ54, redom.

U Zaključku (poglavlje 20) disertacije sumirani su najznačajniji zaključci proizašli iz rada na ovoj disertaciji.

U delu Literatura navedene su reference korišćene tokom izrade doktorske disertacije.

3. OCENA DISERTACIJE

3.1. Savremenost i originalnost

Rezultati istraživanja Željka Radovanovića, dipl. ing. tehnologije, prikazani u disertaciji pod nazivom: “Uticaj jona srebra, bakra i cinka na svojstva biokeramičkih materijala na bazi kalcijum–hidroksiapatita i kalcijum–fosfata”, predstavljaju značajan doprinos razvoju i primeni biomaterijala na bazi hidroksiapatita, nedopiranog i dopiranog jonima Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} , u obliku kompakata i skafolda. Biomaterijali na bazi kalcijum–hidroksiapatita i kalcijum–fosfata poslednjih decenija predstavljaju veoma važno polje istraživanja zbog njihove široke primene u medicini i stomatologiji. Indikacije za upotrebu sintetskih materijala u cilju ozdravljenja koštanog tkiva i popunjavanja koštanih defekata nakon bolesti, traume ili hiruške intervencije, svakodnevno se povećavaju sa konstantnim povećanjem populacije i produžavanjem životnog veka. Takođe, naučne studije ukazuju na pojavu infekcija nakon ugradnje implanata što najčešće vodi gubitku implanta i potrebi za novom hirurškom intervencijom. Veliki problem u takvim situacijama je i sve češća pojava mikroorganizama otpornih na dejstvo lekova. Prema navedenom, neophodno je sintetisati antimikrobno aktivne materijale sa širokim spektrom dejstva od kojih bi se dalje odgovarajućim tehnikama procesiranja mogli dobiti implantni materijali optimalne mikrostrukture, mehaničkih svojstava, bioaktivnosti i biokompatibilnosti.

Zbog toga je u okviru ove doktorske disertacije po prvi put detaljno proučeno hidrotermalno dobijanje, karakterizacija i primena hidroksiapatita sferne morfologije, dopiranih jonima Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} . Ispitan je uticaj dopiranja navedenim jonima na faznu stabilnost hidroksiapatita tokom kalcinacije i sinterovanja gustih i poroznih biokeramičkih formi. Takođe, detaljno je ispitana antimikrobna aktivnost i biokompatibilnost dopiranih prahova na bazi kalcijum–hidroksiapatita i kalcijum–fosfata. Primenom pogodnih tehnika procesiranja od navedenih prahova dobijeni su biokeramički kompakti i skafoldi čija su morfološke i mehaničke osobine detaljno ispitane. Može se zaključiti da istraživanja u okviru ove doktorske disertacije, a prema sveobuhvatnom pregledu literature, prate i proširuju svetske trendove i ukazuju na značaj i aktuelnost proučavane problematike.

3.2. Osvrt na referentnu i korišćenu literaturu

U literaturnom pregledu doktorske disertacije naveden je 337 literaturni navod, od kojih veliki broj čine najnoviji radovi iz međunarodnih časopisa sa tematikom značajnom za izradu doktorske disertacije. U navedenoj literaturi dat je detaljan prikaz najnovijih metoda za sintezu hidroksiapatita, s posebnim osvrtom na dopiranje jonima metala u cilju ostvarenja antimikrobne aktivnosti datih materijala. Navedene reference sadrže i najnovije tehnike za dobijanje gustih (kompakata) i poroznih (skafolda) biokeramičkih materijala, metode karakterizacije, kao i rezultate vezane za antimikrobnu aktivnost i biokompatibilnost u *in vitro* i *in vivo* uslovima. Literaturni navodi sadrže i mehaničke karakteristike najčešće korišćenih biomaterijala. U okviru literaturnih navoda nalaze se i reference kandidata Željka Radovanovića, proistekle iz ove disertacije, koje su objavljene u vrhunskom međunarodnom

časopisu i međunarodnom časopisu i saopštene na međunarodnim konferencijama. Kandidat je proširio do sada poznata saznanja o sintezi i karakterizaciji biomaterijala koji se primenjuju u ortopediji i stomatologiji za rekonstrukciju koštanog tkiva.

3.3. Opis i adekvatnost primenjenih naučnih metoda

U ovoj doktorskoj disertaciji primenjene su savremene naučne metode za karakterizaciju sintetisanih nedopiranih i dopiranih prahova hidroksiapatita i kalciniranih prahova HAp/TCP, kompakata i skafolda. Rendgenostrukturalna analiza je korišćena za identifikaciju prisutnih kristalnih faza u kalciniranim uzorcima prahova HAp/TCP, kompakata i skafolda, kao i za semikvantitativno određivanje parametara jedinične ćelije sintetisanih prahova i faznih udela kalciniranih prahova, kompakata i skafolda pomoću programa JADE 6. Infracrvena spektroskopija je primenjena kao kvalitativna metoda kojom su na osnovu položaja apsorpcionih traka, identifikovane funkcionalne grupe sintetisanih i kalciniranih prahova HAp-a, kao i kompakata. Desorpcija jona dopanata iz sintetisanih i kalciniranih prahova HAp-a, određena je metodom atomske apsorpcione spektroskopije. Simultanom TGA/DSC analizom ispitane su termalne osobine hidrotermalno sintetisanih prahova Ca/P odnosa 1,67. Skenirajućom elektronskom mikroskopijom analizirana je morfologija prahova HAp i HAp/TCP, preloma i polirane površine kompakata, kao i mikro- i makro-struktura skafolda. Takođe, SEM metodom analizirana je morfologija ćelija MRC-5 koje su bile u kontaktu sa medijumom kalciniranih prahova Ca/P odnosa 1,67. Hemijski sastav prahova HAp i HAp/TCP i kompakata određen je EDS metodom radi utvrđivanja Ca/P odnosa i sadržaja jona metala kojima je izvršeno dopiranje. Ispitivanje antimikrobnog delovanja HAp i HAp/TCP prahova Ca/P odnosa 1,67 su vršena primenom kvantitativnog testa određivanja procenta redukcije broja mikroorganizama *in vitro* u tečnom medijumu tokom izlaganja prahovima. Patogeni mikroorganizmi korišćeni u ovom testu su: gram-pozitivna *S. aureus*, dve gram-negativne; *E. coli* i *P. aeruginosa* i gljivica *C. albicans*. Biokompatibilnost kalciniranih prahova Ca/P odnosa 1,67 ispitana je korišćenjem *in vitro* MTT i DET testova na ćelijskoj liniji humani fibroblasti pluća MRC-5. Citotoksičnost kalciniranih prahova Ca/P odnosa 1,50 ispitana je na osnovu njihovog efekta na metaboličku aktivnost, proliferaciju, produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta i nekrozu L929 ćelija. Mehanička ispitivanja kompakata sinterovanih konvencionalno i mikrotalasno izvršena su na uređaju Buehler Indentament serije 1100. U cilju praćenja uticaja dopirajućih jona na morfologiju i fazni sastav kompakata određene su vrednosti tvrdoće i žilavosti loma koje predstavljaju veoma važne mehaničke karakteristike kompakata na osnovu kojih se ocenjuje njihova moguća primena u reparaciji oštećenih delova koštanog tkiva. Mehaničke karakteristike skafolda testirane su univerzalnom mašinom za testiranje i određene su vrednosti maksimalne sile, pritiska čvrstoće i modula elastičnosti. Antimikrobno delovanje odabranih serija skafolda ispitano je primenom kvantitativnog *in vitro* testa u tečnom medijumu a u odnosu na patogene mikroorganizme: *S. aureus* i *E. coli*.

3.4. Primenljivosti ostvarenih rezultata

Uzimajući u obzir literaturne podatke iz ove oblasti, rezultati i zaključci izvedeni tokom izrade ove doktorske disertacije značajni su za dalji razvoj dopiranih prahova HAp-a i HAp/TCP-a, kao i razvoj gustih i visokoporoznih biokeramičkih materijala, potencijalnih implanata, željenog faznog sastava, strukture, antimikrobne aktivnosti i bioaktivnosti.

3.5. Ocena dostignutih sposobnosti kandidata za samostalni naučni rad

Kandidat Željko Radovanović, dipl. ing. tehnologije je tokom izrade doktorske disertacije ispoljio izuzetnu stručnost u pripremi i realizaciji eksperimenata, korišćenju različitih tehnika karakterizacije materijala i analizi rezultata. Kandidat poseduje sve kvalitete koji su neophodni za samostalni naučni rad.

4. OSTVARENI NAUČNI DOPRINOS

4.1. Prikaz ostvarenih naučnih doprinosa

U okviru ove doktorske disertacije ostvaren je značajan doprinos u razvoju novih dopiranih HAp i HAp/TCP prahova, antimikrobno aktivnih i biokompatibilnih, pogodnih za dobijanje kompakata i skafolda.

Najznačajniji naučni doprinosi ove disertacije su:

- Utvrđeno je da sintetisani i kalcinirani dopirani prahovi imaju veliki potencijal za primenu u ortopediji i stomatologiji zbog izrazite antimikrobne aktivnosti prema najčešćim uzročnicima infekcija koje se mogu razviti nakon ugradnje koštanih implanta. Ovim je znatno povećana upotrebna vrednost HAp i HAp/TCP prahova.
- Dokazana je zavisnosti biokompatibilnosti i citotoksičnosti kalciniranih dopiranih prahova HAp/TCP od vrste i stepena dopiranja.
- Potvrđeno je da se mikrotalasnim sinterovanjem dobijaju bolje sinterovani kompakti uz istovremenu uštedu vremena i energije.
- Objašnjen je uticaj dopiranja jonima Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} na fazni sastav, strukturu i morfologiju kompaktnih materijala što se odražava na mehaničke karakteristike kompakata.
- Prvi put je primenjeno dopiranje sa tri vrste jona istovremeno i utvrđeno je da skafoldi procesirani od datih dopiranih HAp/TCP prahova imaju najbolje mehaničke karakteristike.

4.2. Kritička analiza rezultata istraživanja

Definisanjem ciljeva istraživanja utvrđena je metodologija istraživanja primenjena tokom izrade doktorske disertacije. Uvidom u dostupnu literaturu iz ove oblasti istraživanja koja razmatra sintezu, karakterizaciju i primenu biomaterijala, i rezultata istraživanja dobijenih primenom odabrane metodologije u okviru ove disertacije, može se primetiti da dobijeni rezultati ne pokazuju značajnija odstupanja od očekivanih rezultata. Takođe, dobijeni rezultati, potvrđeni primenom različitih metoda, se međusobno dopunjuju, što je dokumentovano kroz diskusiju rezultata u okviru doktorske disertacije.

4.3. Verifikacija rezultata u časopisima i saopštenjima na konferencijama

Kandidat Željko Radovanović, dipl. inž. tehnologije je svoje rezultate potvrdio objavljivanjem radova u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21) i međunarodnom časopisu (M23) i saopštavanjem radova na međunarodnim i domaćim skupovima.

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21):

1. **Radovanović Ž.**, Jokić B., Veljović Dj., Dimitrijević S., Kojić V., Petrović R., Janačković Dj.: Antimicrobial Activity and Biocompatibility of Ag^+ and Cu^{2+} doped biphasic Hydroxyapatite/ α -Tricalcium phosphate Obtained from Hydrothermally Synthesized Ag^+ and Cu^{2+} doped Hydroxyapatite, - Applied Surface Science, Vol 307, 2014, pp. 513–519. ISSN: 0169–4332, IF (2013) 2,538.

Rad u međunarodnom časopisu (M23):

1. **Radovanović Ž.**, Veljović Dj., Jokić B., Dimitrijević S., Bogdanović G., Kojić V., Petrović R., Janačković Dj.: Biocompatibility and antimicrobial activity of zinc(II)-doped hydroxyapatite, synthesized by a hydrothermal method, - Journal of the Serbian Chemical Society, Vol 77, No 12, 2012, pp. 1787–1798. ISSN: 0352–5139, IF (2012) 0,912.

Radovi saopšteni na skupu međunarodnog značaja štampani u izvodu (M34):

1. **Radovanović Ž.**, Jokić B., Dimitrijević S., Veljović D., Petrović R., Janacković D.: Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite powders doped with (Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+}), heating, characterization and antimicrobial testing, - Hybrid Materials; Strasbourg, France, 2011, A.3.1.2 pp. 39.
2. **Radovanović Ž.**, Veljović Dj., Palcevskis E., Dimitrijević S., Bogdanović G., Kojić V., Petrović R., Janačković Dj.: Investigation of influence of doping Hydroxyapatite with ions Ag^+ , Cu^{2+} and Zn^{2+} , on mechanical properties towards conventional and microwave sintering, - First International Conference on Processing, characterisation and application of nanostructured materials and nanotechnology, NanoBelgrade, PP2, Belgrade, Serbia, 2012, pp. 78.

Rad saopšten na skupu domaćeg značaja štampani u izvodu (M64):

1. **Radovanović Ž.**, Veljović Đ., Radovanović L., Petrović R., Janačković Đ.: Hidroksiapatit dopiran Ag^+ -jonima: parametri jedinične ćelije, morfologija, termalna i spektralna svojstva, - Knjiga izvoda radova-XXI konferencija Srpskog kristalografskog društva, Užice, 2014, str. 58.

5. ZAKLJUČAK

Kratak osvrt na disertaciju u celini

Na osnovu svega napred iznetog, Komisija smatra da doktorska disertacija Željka Radovanovića, dipl. inž. tehnologije, pod nazivom: „**Uticao jona srebra, bakra i cinka na svojstva biokeramičkih materijala na bazi kalcijum–hidroksiapatita i kalcijum–fosfata**”, predstavlja značajan i originalni naučni doprinos u oblasti **Hemija i hemijska tehnologija**, što je potvrđeno objavljivanjem radova u međunarodnim časopisima i saopštavanjem radova na međunarodnim skupovima. Naučni doprinos ove doktorske disertacije u oblasti biomaterijala se ogleda u proučavanju uticaja dopiranja jonima metala na morfologiju, antimikrobno delovanje, biokompatibilnost i fazni sastav prahova, kompakata i skafolda na bazi kalcijum–hidroksiapatita i kalcijum–fosfata.

Predlog Komisije Nastavno-naučnom veću

Imajući u vidu kvalitet, obim i naučni doprinos postignutih rezultata, Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj Referat i da ga zajedno sa podnetom disertacijom Željka Radovanovića, dipl. inž. tehnologije, pod nazivom: „**Uticao jona srebra, bakra i cinka na svojstva biokeramičkih materijala na bazi kalcijum–hidroksiapatita i kalcijum–fosfata**” izloži na uvid javnosti u zakonski predviđenom roku i uputi na konačno usvajanje Veću naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu, te da nakon završetka ove procedure, pozove kandidata na usmenu odbranu disertacije.

Beograd, 13.06.2016.

Članovi komisije:

.....

Dr Đorđe Janačković, redovni profesor,

Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški
fakultet

.....

Dr Rada Petrović, redovni profesor,

Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški
fakultet

.....

Dr Suzana Dimitrijević, vanredni profesor,

Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški
fakultet

.....

Dr Vesna Kojić, naučni saradnik,

Institut za onkologiju Vojvodine, Sremska
Kamenica.