

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
FAKULTETA ZA FIZIČKU HEMIJU
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

**Predmet: Izveštaj Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata
Jelene Krstić, master fizikohemičara**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Fakulteta za fizičku hemiju održanoj 01.09.2016. godine imenovani smo za članove Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata Jelene Krstić, master fizikohemičara, pod naslovom:

„Radiolitički sintetisani nanokompozitni materijali na bazi poli(vinil alkohola), hitozana i nanočestica srebra projektovani za biomedicinsku primenu”

Ova tema je odobrena odlukom Nastavno-naučnog veća Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu na sednici održanoj 15.10.2014. godine. Na osnovu te odluke, Veće naučnih oblasti prirodnih nauka Univerziteta u Beogradu dalo je saglasnost na predlog ove teme na sednici održanoj 26.03.2015. godine. Posle pregleda doktorske disertacije, Komisija podnosi Nastavno- naučnom veću sledeći

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija mastera fizikohemičara Jelene Krstić, je napisana na 134 strane, i u skladu je sa Uputstvom za oblikovanje doktorske disertacije Univerziteta u Beogradu. Sastoji se od sledećih celina: Rezime (4 strane), Uvod (1 strana), Teorijski deo (24 strana), Predmet i cilj rada (1 strana), Eksperimentalni deo (9 strana), Rezultati i diskusija (77 strane), Zaključak (3 strane), Literatura - 103 navoda (10 strana) i Prilog (9 strana).

U delu *Rezime*, na srpskom i engleskom jeziku, predstavljena je problematika kojom se disertacija bavi i celokupni koncept dizajniranja novih antibakterijskih hidrogel nanokompozita na bazi nanočestica srebra, poli(vinil alkohola) i vodorastvornog hitozana za primenu u biomedicini.

U poglavlju *Uvod* ukratko su obrazloženi značaj sinteze novih antibakterijskih hidrogel nanokompozita na bazi nanočestičnog srebra i optimizacije farmakokinetičkog mehanizma oslobađanja za primenu u kontrolisanoj dostavi antibakterijskih agenasa.

U poglavlju *Teorijski deo* generalno je predstavljen značaj nanotehnologije u biomedicini, klasa nanokompozitnih hidrogelova, njihova hibridna fizičko-hemijska i strukturna svojstva nastala interakcijom nanočestica i polimera iz kojih proističu njihova funkcionalna antibakterijska svojstva. Predstavljena je i problematika sinteze Ag/nanokompozita, sa posebnim osvrtom na radijaciono-hemijsku sintezu hidrogel nanokompozita upotrebom γ -zračenja.

U poglavlju *Predmet i cilj rada* ukratko su opisani aktuelnost problematike i aspekt dizajniranja hidrogel nanokompozita pomoću osnovnih elemenata bitnih za projektovanje antibakterijske funkcije.

U poglavlju *Eksperimentalni deo* navedene su hemikalije koje su korišćene za sintezu, detaljno je opisan postupak sinteze i navedene su sve metode karakterizacije sintetisanih nanokompozita (infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom, spektroskopija u ultraljubičastoj i vidljivoj oblasti spektra, difrakcija rendgenskih zraka, fotoelektronska spektroskopija, skenirajuća elektronska mikroskopija, rendgenska trodimenziona mikro-kompjuterizovana tomografija, gravimetrijska metoda, metoda statičkog rasejanja laserskih snopova, fluorescentna spektroskopija, atomska apsorpciona spektroskopija, test antibakterijske aktivnosti i termomehanička analiza u statičkom i dinamičkom modu).

U poglavlju *Rezultati i diskusija* obrazložen je osnovni plan istraživanja baziran na sintezi hidrogel nanokompozita sa odabranim konstituentima, nanočestčnim srebrom (Ag), poli(vinil alkoholom) (PVA) i vodorastvornim hitozanom (vr-CS) upotrebom γ -zračenja. Ovo poglavlje je podeljeno u četiri glavne celine koje su usmerene ka ispitivanju osnovnih elemenata projektovanja Ag/hidrogel nanokompozita sa svojstvom održive i kontrolisane antibakterijske funkcije. Prva celina opisuje optimizaciju koncentracije Ag-nanočestica u Ag/PVA hidrogel nanokompozitu kao model sistemu za biomedicinsku primenu, zatim ispitivanje zavisnosti oslobađanja Ag^+ -jona od molarne koncentracije, veličine (tj. specifične površine), fizičko-hemijskih i termodinamičkih svojstava nanočestica, kao i difuzionih svojstava fluida. U drugoj celini je opisana optimizacija veličine Ag-nanočestica uvođenjem prirodnog polimera CS kao komponente neumreženih Ag/PVA/CS nanokompozita. Treći deo *Rezultata i diskusije* se odnosi na modifikaciju rastvorljivosti biopolimera dejstvom γ -zračenja i radijacionu sintezu i karakterizaciju hidrogel nanokompozita na bazi Ag-nanočestica, PVA i vr-CS. Četvrti deo *Rezultata i diskusije* opisuje optimizaciju radijaciono-hemijske metode za *in situ* sintezu hidrogel nanokompozita i uticaj ovakvog postupka sinteze na antibakterijsku aktivnost.

U *Zaključku* su sumirani svi zaključci izvedeni iz rezultata dobijenih karakterizacijom i ispitivanjem navedenih sistema koji su u potpunosti saglasni sa postavljenim ciljevima.

B. Opis rezultata doktorske disertacije

U ovoj doktorskoj disertaciji razvijena je nova metoda radijaciono-hemijske sinteze hidrogel nanokompozita na bazi poli(vinil alkohola), vodorastvornog hitozana i nanočestica srebra i ispitana su njihova fizičko-hemijska svojstva, značajna za biomedicinsku primenu. Sintetisan je Ag/PVA hidrogel nanokompozit kao model sistem da bi se stekao uvid u parametre koji određuju efikasna, kontrolisana i održiva antibakterijska svojstva. Ustanovljen je način projektovanja antibakterijske funkcije Ag/hidrogel nanokompozita koji obezbeđuje njihovu bezbednu primenu u biomedicini.

Rezultati *in vitro* oslobađanja Ag^+ -jona iz Ag/PVA model sistema u fiziološkim uslovima su pokazali kontinualan i kontrolisan profil u vremenu i koncentraciji koja je optimalna za primenu u kliničkoj praksi (oko 9 dana). Utvrđeno je da su *in vitro* profili oslobađanja Ag^+ -jona slični profilima oslobađanja lekova, te je bilo moguće primeniti farmakokinetičke modele za analizu kinetike oslobađanja. Kopča i Makoid-Banakar farmakokinetički modeli su pokazali najbolja poklapanja sa eksperimentalno dobijenim vrednostima. Iz odnosa parametara dobijenih primenom modela Kopča, utvrđeno je da je oslobađanje Ag^+ -jona difuziono kontrolisan proces

(Fikova difuzija), i zavisi ne samo od molarne koncentracije već i od veličina *Ag*-nanočestica koje su za ove sisteme prečnika u opsegu od 6,5-8,5 nm. Ovaj rezultat je u skladu sa većom specifičnom površinom oksidacije i većom rastvorljivošću manjih *Ag*-nanočestica dobijenom primenom Ostvald-Frojdliohove jednačine. Pokazano je da oksidacioni potencijal *Ag*-nanočestica zavisi i od difuzionih svojstava fiziološkog fluida, dobijenih analizom kinetičkih aspekata bubrenja. Sa povećanjem difuzionog koeficijenta brži je dotok rastvorenog kiseonika potrebnog za oksidaciju. Modifikovana Nernstova jednačina sa Plietovom formulacijom negativnog pomeranja standardnog elektrodnog potencijala metalnih čestica prečnika manjeg od 25 nm, omogućila je da se potencijal oksidacije i Gibsova slobodna energija, kao mera antibakterijske snage zavisno od njihove veličine koreliraju sa antibakterijskim svojstvima u fiziološkim uslovima. Test antibakterijske aktivnosti na gram-pozitivne *Staphylococcus aureus* i gram-negativne *Escherichia coli* bakterije je pokazao da koncentracija oslobođenih Ag^+ -jona mora da bude iznad minimalne inhibitorne koncentracije koja se za Ag^+ -jone (MIK_{Ag^+}) nalazi u opsegu od 0,78-6,25 ppm. Na osnovu analize model sistema utvrđeno je da se pri projektovanju antibakterijske funkcije *Ag*/hidrogel nanokompozita mora ovladati parametrima koji je određuju, a to su veličina čestica, njihova molarna koncentracija u opsegu antibakterijskih terapijskih ppm koncentracija, kao i difuzionim svojstvima fluida.

Uvođenjem CS i variranjem odnosa polimera u PVA/CS blendama utvrđeno je da se veličina čestica smanjuje u slučaju kada je sadržaj PVA u blendi veći od 50 %, te da je veličinu čestica moguće kontrolisati variranjem odnosa PVA/CS komponenti. S druge strane, ispitana je mogućnost radijaciono-hemijske degradacije CS. Primenom jednostavne metode degradacije CS dobijena je rastvorljivost CS u fiziološkim pH vrednostima (pH~7,4). Utvrđeno je da γ -zračenje indukuje raskidanje glukozidnih veza i Majarovu reakciju sa produktima koji doprinose povećanju antibakterijskih svojstava.

Modifikacija CS do vodorastvornog derivata (vr-CS) omogućila je sintezu trodimenzionalne polimerne mreže hidrogela, primenom kombinovane radijaciono-hemijske metode sa postupkom zamrzavanja/odmrzavanja. Rezultati rendgenske 3D mikro-kompjuterizovane tomografije (3D μ -KT) su pokazali poroznu morfologiju, a fluorescentnom spektroskopijom je potvrđena stabilnost matrice u kojoj je CS inkorporiran putem kovalentnog i vodoničnog vezivanja. PVA/vr-CS-Z/O matrica je adekvatna za sintezu i stabilizaciju nanočestica sfernog oblika, sa prečnikom od oko 10 nm. Rezultati mehaničke karakterizacije pokazali su da *Ag*/PVA/vr-CS-Z/O imaju zadovoljavajuću mehaničku čvrstoću za biomedicinsku primenu. Dvostruko povećanje udela vr-CS kao komponente matrice hidrogela dovodi do porasta modula kompresibilnosti za 93 %, Jangovog modula elastičnosti za 37 %, kao i čvrstoće za 94 %, dok se kod hidrogel nanokompozita modul kompresibilnosti i Jangov modul elastičnosti povećavaju za 6 %, a čvrstoća za 9 %, dobijeno analizom u statičkom modu. Potvrđeno je da su viskoelastična svojstva hidrogelova i hidrogel nanokompozita usko povezana sa stanjem vode i pokretljivošću polimernih lanaca, što je dobijeno analizom u dinamičkom modu. Dvostruko povećanje udela vr-CS kao komponente matrice hidrogel nanokompozita dovodi do porasta stepena umreženja i modula sačuvane energije za 50 %, dok se $tg \delta$ smanjuje za 90 %. Dobijeni rezultati su pokazali značajno poboljšanje mehaničkih svojstava hidrogel nanokompozita, namenjenih za primenu u obliku antibakterijskih obloga za lečenje rana. Transportna svojstva matrica bez prisustva čestica imaju Fikov tip difuzije fluida i rastu sa uvođenjem vr-CS u matricu. Sa uvođenjem nanočestica, tip difuzije je ne-Fikov, a vrednosti difuzionih koeficijenata su manje sa uvođenjem vr-CS u matricu. Farmakokinetički modeli oslobađanja Ag^+ -jona su pokazali da je brzina oslobađanja jona kontrolisana difuzijom jona i brzinom relaksacije polimernih lanaca (ne-Fikova difuzija) za

razliku od Ag/PVA model sistema, a da oslobađanje Ag^+ -jona ne zavisi samo od ukupne molarne koncentracije, već je rezultat i veličine Ag-nanočestica. Utvrđeno je da oksidacioni elektrodni potencijal i Gibsova slobodna energija odn., antibakterijska snaga ovih sistema zavise kako od veličine Ag-nanočestica, tako i od difuzionih svojstava fluida utvrđenih analizom kinetičkih aspekata bubrenja. Ustanovljeno je da se Ag/PVA model sistem pokazao adekvatnim za analizu elemenata potrebnih za projektovanje antibakterijske funkcije, s obzirom da su i u Ag/PVA/vr-CS-Z/O sistemima uočene zavisnosti oslobađanja Ag^+ -jona od veličine čestica i difuzionih svojstava fluida.

Postignuto je unapređenje antibakterijske aktivnosti Ag/PVA/vr-CS-Z/O sinergijom Ag-nanočestica sa vr-CS, pa su se za red veličine niže molarne koncentracije Ag-nanočestica u poređenju sa model sistemima pokazale efikasnijim na *Staphylococcus aureus* bakterije. Ovaj efekat je još izraženiji kod sistema koji su sintetisani u jednostepenom procesu radijaciono-hemijske sinteze (Ag/PVA/vr-CS-*in situ*). Potvrđeno je da je putem uvođenja radijaciono-modifikovanog prirodnog polimera CS, kao i optimizacijom radijaciono-hemijske metode, moguće postići jednostavan postupak sinteze terapijskog sredstva sa efikasnijom antibakterijskom funkcijom.

Zavisnosti oslobađanja antibakterijskih Ag^+ -jona od molarne koncentracije čestica i njihove veličine odn. specifične površine, kao i od njihovih fizičko-hemijskih i termodinamičkih svojstava, ali i od difuzionih svojstava fluida, čine elemente koji su neophodni za adekvatno projektovanje održive i kontrolisane antibakterijske funkcije hidrogel nanokompozita. Antibakterijska sredstva na bazi Ag-nanočestica i biopolimera CS, sa većom biodostupnošću koja je obezbeđena adekvatnim projektovanjem materijala, kao i inovativno kombinovanje ovih komponenata jednostavnim postupkom sinteze, primenjeno u ovoj doktorskoj disertaciji, može doprineti rešavanju aktuelnog problema rezistencije u odnosu na antibiotike.

C. Uporedna analiza rezultata disertacije sa rezultatima iz literature

Svetski centar za kontrolu i prevenciju bolesti (eng. *Center for Disease Dynamics, Economics & Policy*) analizom podataka iz 49 zemalja navodi da je broj multirezistentnih infekcija na antibiotike značajno porastao u periodu od 1999. do 2015. godine, pri čemu je broj smrtnih slučajeva samo u Evropi oko 25 000 godišnje. Sinteza novih antibakterijskih lekova je skupa i dugotrajna, te je iz navedenih razloga neophodan potpuno novi pristup koji bi mogao da prati stalne promene rezistencije bakterija na antibiotike. Zbog sve veće rezistencije bakterija na antibiotike veoma je važno razviti materijale koji bi svojim unapređenim mehanizmom kontrolisane dostave antibakterijskih agenasa mogli da budu funkcionalnija zamena antibioticima. Radijaciono-hemijska metoda sinteze, koja koristi radiolitičke produkte vode, je veoma pogodna za istovremenu modifikaciju i integrisanje polimernih molekula sa metalnim nanočesticama, te omogućava fino dizajniranje željenih inherentnih svojstava hidrogel nanokompozita, bez primene toksičnih reaktanata, naročito kada je reč o različitim primenama u biomedicini. Poseban izazov u ovoj oblasti istraživanja vezan je za sintezu i karakterizaciju nanočestica u unapređenim strukturama polimernih smeša u kojima je bar jedna komponenta prirodni polimer nastao biosintezom u živim organizmima. U cilju dobijanja biomimetičkih materijala, zahtevi nanotehnologije nisu više usmereni samo na formulisanje terapijskih

agenasa nanokompozita, nego i na istraživanja aspekata njihove funkcionalnije primene (Kamoun et al., 2015).

U literaturi je opisano nekoliko mogućih mehanizama oslobađanja bioaktivne komponente koje može biti kontrolisano procesom bubrenja odn. difuzijom fiziološkog fluida, difuzijom bioaktivne komponente ili procesom degradacije polimera (Lee et al., 2012; Redmond et al., 2005; Aydın et al., 2012; Khamanga et al., 2012; Jamuna-Thevi et al., 2011). Međutim, aspekt zavisnosti oslobađanja antibakterijskih Ag^+ -jona iz hidrogel nanokompozita od molarne koncentracije i veličine (odn. specifične površine) nanočestica, zatim od njihovih fizičko-hemijskih i termodinamičkih svojstava, kao i od difuzionih svojstava fiziološkog fluida, nije do sada zabeležen u literaturi.

Doprinos ove doktorske disertacije se ogleda u iskorišćenju biokompatibilnih i ekološki prihvatljivih radiolitičkih produkata vode ne samo za modifikaciju hitozana, već i za sintezu antibakterijskih hidrogel nanokompozita na bazi Ag-nanočestica, PVA i vr-CS projektovanih za biomedicinsku primenu. Sinteza hidrogel nanokompozita dejstvom γ -zračenja se može izvoditi u dvostepenom procesu (sintezom polimerne matrice hidrogela, a potom sintezom metalnih nanočestica u hidrogelu) (Krklješ et al. 2007a), ali i unapređenom *in situ* sintezom hidrogel nanokompozita u jednostepenom procesu (Juby et al., 2012).

Do sada je u literaturi radijaciono procesiranje prirodnih polimera primenom jonizujućeg zračenja najvećim delom ostalo neistraženo, jer je mehanizam modifikacije često veoma složen. Nastali degradirani produkti niskih molarnih masa se najčešće koriste kao antibiotici i antioksidansi, dok se umreženi produkti vodorastvornih derivata uglavnom koriste kao obloge za zarastanje rana i apsorbenti toksina (Hennink et al. 2012; Zhu et al. 2011). Poznato je da je CS katjonski polisaharid koji ima veliki potencijal za primenu u različitim oblastima biomedicine i farmacije jer je netoksičan, biokompatibilan i bioaktivan (Jayakumar et al., 2011). Kong sa saradnicima (2010) i Qin sa saradnicima (2006) ukazuju da CS ispoljava antibakterijsko dejstvo samo u kiseloj sredini, što se obično pripisuje njegovoj slaboј rastvorljivosti na visokom pH vrednostima (Pasanphan et al., 2010). Međutim, antibakterijsko delovanje oligomera je do sada uglavnom ispitivano u kiseloj sredini, a samo je nekoliko radova objavljeno na temu korelacije rastvorljivosti CS u vodi i antimikrobne aktivnosti. Zahtevi biomedicinske primene su okrenuti ka sintezi CS rastvornog pri fiziološkoј pH vrednosti u ćeliji, dovoljno velike molarne mase da spreči transport esencijalnih supstanci i time destabilizuje ćelijski zid bakterija, uzrokujući curenje sastojaka i na kraju ćelijsku smrt (Kim et al., 2011). Zbog toga je posebna pažnja posvećena prevođenju CS u vodorastvorni oblik γ -zračenjem. Do sada u literaturi postoji samo jedan podatak o radijacio-hemijskoј sintezi hidrogelova koji sadrže vr-CS praćenoј postupkom zamrzavanja/odmrzavanja (Nho et al., 2001) pri čemu su ispitana i sorpciona svojstva ovih hidrogelova u vodi. Međutim, ispitivanje procesa bubrenja u fiziološkim uslovima (SBF) PVA/vr-CS-Z/O hidrogelova i Ag/PVA/vr-CS-Z/O hidrogel nanokompozita značajno za primenu u biomedicini nije do sada zabeleženo u literaturi. Dobijeni rezultati su pokazali da je postignuta četiri puta veći ravnotežni stepen bubrenja, SD_r kod hidrogel nanokompozita sa većim udelom biopolimera i koncentracijom Ag-nanočestica ($15 \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^3$), i pored post-radijacionih ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja, u odnosu na Ag/PVA model sistem sa najvećom koncentracijom Ag-nanočestica ($110 \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^3$).

Po prvi put je primenom farmakokinetičkih modela izvršena analiza procesa oslobađanja bioaktivne komponente iz hidrogel nanokompozita, odnosno oslobođenih Ag^+ -jona u cilju projektovanja materijala za primenu kao zavoja za zarastanje rana ili kao mekotkivnih implanata (meniskus). Izračunavanjem Gibsove slobodne energije za proces oksidacije Ag-nanočestica u

fiziološkim uslovima u sistemima sa vr-CS (Ag/PVA/vr-CS) pokazano je da je kinetika oslobađanja Ag⁺-jona, odnosno antibakterijska snaga povezana sa veličinom Ag-nanočestica u toku prva 2 dana, što je izuzetno značajan rezultat za primenu u kliničkoj praksi. Test antibakterijske aktivnosti je potvrdio da je postignuto unapređenje antibakterijske efikasnosti zbog prisustva vr-CS u matrici, koja je izraženija na *Staphylococcus aureus* bakterije.

Još jedan doprinos ove doktorske disertacije je optimizacija radijaciono-hemijske metode za dobijanje Ag/PVA/vr-CS-*in situ* hidrogel nanokompozita u jednostepenom radijaciono-tehnološkom koraku, pri čemu je smanjenjem veličine Ag-nanočestica do klastera ispod 2 nm, ali i jačim antibakterijskim dejstvom vr-CS, dobijen srebro/hitozan sinergijski efekat *in vitro* antibakterijske aktivnosti na *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* bakterije.

D. Naučni radovi i saopštenja u kojima su publikovani rezultati iz doktorske disertacije

Rezultati doktorske disertacije Jelene Krstić publikovani su u vidu 1 rada u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), 1 rada u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), pri čemu je kandidat prvi autor na oba rada, 1 poglavlje u monografiji međunarodnog značaja (M14) i u vidu 14 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima (M33 i M34) od toga 12 štampanih u izvodu i 2 u celini.

M14 - Monografska studija/poglavlje u knjizi M12 (Monografija međunarodnog značaja) ili rad u tematskom zborniku međunarodnog značaja

1. A. Radosavljević, **J. Krstić**, J. Spasojević, Z. Kačarević-Popović: **Radiolytic synthesis of nanocomposites based on noble metal nanoparticles and natural polymer, and their application as biomaterial**, in "Radiation Curing of Composites for Enhancing Their Features and Utility in Health Care and Industry", Chapter 11, pp. 167-184, 2015, (IAEA-TECDOC-1764, ISBN 978-92-0-103815-9), International Atomic Energy Agency (IAEA).

M21 – Rad objavljen u vrhunskom međunarodnom časopisu

1. **J. Krstić**, J. Spasojević, A. Radosavljević, M. Šiljegović, Z. Kačarević-Popović, **Optical and structural properties of radiolytically in situ synthesized silver nanoparticles stabilized by chitosan/poly(vinyl alcohol) blends**, Radiation Physics and Chemistry, 96 (2014) 158-166.

M22 - Rad u istaknutom međunarodnom časopisu

1. **J. Krstić**, J. Spasojević, A. Radosavljević, A. Perić-Grujić, M. Đurić, Z. Kačarević-Popović, S. Popović, **In vitro silver ion release kinetics from nanosilver/poly(vinyl alcohol) hydrogels synthesized by gamma irradiation**, Journal of Applied Polymer Science, 131 (2014) 40321.

