

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Milena Lj. Stevanović

**ELEKTROFORETSKE KOMPOZITNE
PREVLAKE HIDROKSIAPATITA, HITOZANA
I GRAFENA NA TITANU SA I BEZ DODATKA
GENTAMICINA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2025.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ

Милена Љ. Стевановић

**ЕЛЕКТРОФОРЕТСКЕ КОМПОЗИТНЕ
ПРЕВЛАКЕ ХИДРОКСИАПАТИТА,
ХИТОЗАНА И ГРАФЕНА НА ТИТАНУ СА И
БЕЗ ДОДАТКА ГЕНТАМИЦИНА**

Докторска дисертација

Београд, 2025.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Milena Lj. Stevanović

**ELECTROPHORETICALLY DEPOSITED
COMPOSITE HYDROXYAPATITE, CHITOSAN
AND GRAPHENE COATINGS ON TITANIUM
WITH AND WITHOUT GENTAMICIN**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2025.

MENTOR:

Dr Đorđe Janačković, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

MENTOR:

Dr Ana Janković, naučni savetnik Inovacionog centra
Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Jelena Bajat, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Maja Vukašinović Sekulić, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Marija Đošić, viši naučni saradnik
Instituta za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina u Beogradu

DATUM ODBRANE: _____

Ova doktorska disertacija najvećim delom je realizovana na Katedri za fizičku hemiju i elektrohemiju Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom prof. dr Vesne Mišković-Stanković. Profesorki dugujem duboku zahvalnost za ukazano poverenje, razumevanje, nesebičnu podršku i strpljenje, kao i za dragocene savete, znanje i iskustvo koje je velikodušno delila tokom celog trajanja mog istraživanja, omogućivši time uspešnu izradu ove disertacije.

Od srca se zahvaljujem svojim mentorima, prof. dr Đorđu Janackoviću i dr Ani Jančević, koji su, nakon prelaske prof. dr Vesne Mišković-Stanković na drugu instituciju, nesebično prihvatili da preuzmu vođenje moje disertacije. Njihova podrška u tom ključnom trenutku, kao i posvećenost, razumevanje i stručna pomoć tokom daljeg rada, bili su mi od izuzetnog značaja i dali su mi dodatnu snagu da istrajem do kraja.

Prof. dr Jeleni Bajat, prof. dr Maji Vučkasić i dr Mariji Đošić, članovima komisije, dugujem iskrenu zahvalnost na stručnoj pomoći, korisnim komentarima i sugestijama tokom pisanja disertacije, kao i na izuzetnoj podršci tokom eksperimentalnog rada. Njihovo znanje, posvećenost i konstruktivni saveti značajno su doprineli kvalitetu ovog istraživanja i uspešnoj realizaciji doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Svetlani Grujić, prof. dr Ivani Matić Bujagić i prof. dr Jadranki Odović na pruženoj pomoći tokom ispitivanja oslobađanja gentamicina, kao i dr Vesni Kojić na podršci u realizaciji ispitivanja citotoksičnosti prevlaka. Njihova stručnost, strpljenje i spremnost da uvek izađu u susret bili su mi od neprocenjivog značaja tokom eksperimentalnog rada.

Veliku zahvalnost upućujem svim kolegama sa Katedre za fizičku hemiju i elektrohemiju na pruženoj podršci i korisnim savetima tokom rada na disertaciji.

Ogromnu zahvalnost dugujem svojim dragim kolegamicama dr Ani Jančević, dr Mariji Đošić i dr Katarini Nešović, ne samo na pomoći i savetima tokom izrade disertacije, već i na neprocenjivoj podršci, zajedničkim trenucima, razgovorima, smehu, kafama i druženjima koja su ovaj put učinila lakšim i lepšim.

Najdublju i najiskreniju zahvalnost dugujem svojim roditeljima, sestri i bratu koji su verovali u mene i pružali mi bezrezervnu podršku na svakom koraku ovog puta. Hvala i mojoj porodici na razumevanju i ljubavi, a posebno mom suprugu i našoj ćerki čija su mi ljubav, podrška i razumevanje bili neizmerna snaga i motivacija tokom celokupnog rada na ovoj disertaciji.

Milena Stevanović

Mojoj najdražoj Petri

ELEKTROFORETSKE KOMPOZITNE PREVLAKE HIDROKSIAPATITA, HITOZANA I GRAFENA NA TITANU SA I BEZ DODATKA GENTAMICINA

SAŽETAK

Cilj ove doktorske disertacije bilo je dobijanje i karakterizacija novih antibakterijskih prevlaka na bazi hidroksiapatita, hitozana i grafena na titanu sa i bez dodatka gentamicina. Prevlake su dobijene postupkom elektroforetskog taloženja u jednom koraku iz stabilnih vodenih suspenzija za primenu u oblasti koštanih implantata.

Detaljna karakterizacija dobijenih prevlaka je rađena u cilju ispitivanja njihove strukture, morfologije i fizičko-hemijskih svojstava, kao i adhezije prevlaka za supstrat. U okviru ovih istraživanja ispitan je i uticaj dodatka grafena na fizičko-hemijska i biološka svojstva dobijenih prevlaka kao i mogućnost inkorporacije gentamicina kao antibakterijskog agensa. *In vitro* ispitivanja su obuhvatila ispitivanja kinetike otpuštanja gentamicina u fiziološki relevantnim uslovima (37 °C) tokom 21 dana, kao i evaluaciju bioloških svojstava prevlaka, uključujući antibakterijsku aktivnost i biokompatibilnost istaloženih prevlaka.

Rezultati ove disertacije su pokazali da su postupkom elektroforetskog taloženja uspešno istaložene antibakterijske, biokompatibilne kompozitne prevlake na titanu. Inkorporacija grafena doprinela je poboljšanju fizičko-hemijskih svojstava prevlaka, pri čemu je njegova velika specifična površina omogućila efikasnije vezivanje i ugrađivanje veće količine antibiotika. Količina inkorporiranog antibiotika bila je dovoljna za postizanje izraženog antibakterijskog efekta izazivajući potpunu redukciju ukupnog broja ćelija soja *S. aureus*, pri čemu nije ispoljena citotoksičnost prema humanim ćelijskim linijama (MRC-5) u *in vitro* uslovima. Biomineralizacija prevlaka potvrđena je formiranjem novog sloja apatita na njihovoj površini, već nakon sedam dana izlaganja simuliranoj telesnoj tečnosti. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da ovi materijali poseduju visok potencijal za dalja istraživanja i primenu u ortopediji i regenerativnoj medicini.

Ključne reči: elektroforetsko taloženje; kompozitne prevlake; hidroksiapatit; hitozan; gentamicin; grafen; antibakterijska aktivnost; biomineralizacija; biokompatibilnost

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Inženjerstvo materijala

UDK broj:

ELECTROPHORETICALLY DEPOSITED COMPOSITE HYDROXYAPATITE, CHITOSAN AND GRAPHENE COATINGS OF ON TITANIUM WITH AND WITHOUT GENTAMICIN

ABSTRACT

The aim of this doctoral dissertation was the development and characterization of novel antibacterial coatings based on hydroxyapatite, chitosan, and graphene on titanium, with and without the addition of gentamicin. The coatings were produced by a one-step electrophoretic deposition process from stable aqueous suspensions, intended for application in the field of bone implants.

Detailed characterization of the obtained coatings was conducted to investigate their structure, morphology, physicochemical properties, and adhesion to the substrate. The influence of graphene addition on the physicochemical and biological properties of the coatings was also examined, as well as the potential for incorporating gentamicin as an antibacterial agent. *In vitro* studies included the investigation of gentamicin release kinetics under physiologically relevant conditions (37 °C) over a period of 21 days, as well as the evaluation of the biological properties of the coatings, including antibacterial activity and biocompatibility of the coatings.

The results of this dissertation demonstrated that antibacterial and biocompatible composite coatings were successfully deposited on titanium using the electrophoretic deposition technique. The incorporation of graphene contributed to improved physicochemical properties of the coatings, with its high specific surface area enabling more efficient binding and retention of larger amounts of the antibiotic. The amount of incorporated antibiotic was sufficient to achieve a pronounced antibacterial effect, resulting in complete reduction of the total number of *S. aureus* cells, without exhibiting cytotoxicity toward human cell lines (MRC-5) under *in vitro* conditions. The bioactivity of the coatings was confirmed by the formation of a new apatite layer on their surface after only seven days of exposure to simulated body fluid. Based on the obtained results, it can be concluded that these materials possess high potential for further research and application in orthopedics and regenerative medicine.

Keywords: electrophoretic deposition; composite coatings; hydroxyapatite; chitosan; gentamicin; graphene; antibacterial activity; biomineralization; biocompatibility

Scientific field: Technology engineering

Scientific subfield: Materials engineering

UDC number:

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DEO	3
2.1. Struktura i svojstva kostiju	3
2.1.1. Prirodna kost	3
2.2. Koštani supstituenti	4
2.2.1. Biološki koštani supstituenti.....	4
2.2.2. Sintetički koštani supstituenti.....	5
2.3. Kompozitni materijali	6
2.3.1. Biokeramički materijali na bazi kalcijum-fosfatnih jedinjenja.....	8
2.3.2. Polimeri	10
2.3.3. Grafen.....	12
2.3.4. Antibiotici.....	12
2.4. Elektroforetsko taloženje.....	14
2.5. Kompozitne prevlake na bazi hidroksiapatita i polimernih komponenti	15
2.5.1. Bioaktivnost kompozitnih prevlaka u simuliranim <i>in vitro</i> uslovima	20
3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	22
4. EKSPERIMENTALNI DEO	23
4.1. Materijali	23
4.1.1. Priprema vodenih suspenzija hidroksiapatit/hitozan i hidroksiapatit/hitozan/grafen sa i bez dodatka gentamicina	23
4.1.2. Priprema površine titana za taloženje hidroksiapatit/hitozan i hidroksiapatit/hitozan/grafen sa i bez dodatka gentamicina	23
4.1.3. Elektroforetsko taloženje hidroksiapatit/hitozan i hidroksiapatit/hitozan/grafen prevlaka sa i bez dodatka gentamicina iz vodenih suspenzija na površini titana.....	24
4.2. Fizičko-hemijska karakterizacija kompozitnih prevlaka	24
4.2.1. Rendgenska difrakciona analiza (XRD)	24
4.2.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom (Fourier) transformacijom – FT-IR	24
4.2.3. Ramanova spektroskopija.....	25
4.2.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija sa energetsom disperzionom spektroskopijom (SEM-EDS).....	25
4.2.5. Rendgenska fotoelektronska spektroskopija (XPS).....	25
4.2.6. Termogravimetrijska analiza (TGA)	25
4.3. Ispitivanje sposobnosti biomineralizacije hidroksiapatit/hitozan i hidroksiapatit/hitozan/grafen prevlaka sa i bez dodatka gentamicina.....	25
4.3.1. Ispitivanje biomineralizacije u <i>in vitro</i> uslovima	25
4.3.1.1. Priprema simulirane telesne tečnosti	25
4.3.2. Ispitivanje sposobnosti biomineralizacije prevlaka nakon potapanja u SBF	26
4.4. Ispitivanje profila otpuštanja gentamicina	27

4.4.1. Određivanje koncentracije otpuštenog gentamicina tečnom hromatografijom visokih performansi u sprezi sa UV spektroskopijom	27
4.4.2. Određivanje koncentracije otpuštenog gentamicina tečnom hromatografijom visokih performansi u sprezi sa masenom spektrometrijom	27
4.5. Biološka karakterizacija prevlaka	30
4.5.1. Antibakterijska aktivnost.....	30
4.5.1.1. Agar difuziona metoda.....	30
4.5.1.2. Ispitivanje kinetike antibakterijske aktivnosti	30
4.5.2. Citotoksičnost.....	30
4.5.2.1. Test odbacivanja boje (DET)	31
4.5.2.2. MTT	31
4.5.3. Aktivnost alkalne fosfataze	31
4.5.4. Statistička analiza	32
5. REZULTATI I DISKUSIJA.....	33
5.1. Hidroksiapatit/hitozan i hidroksiapatit/hitozan/gentamicin prevlake	33
5.1.1. Elektroforetsko taloženje hidroksiapatit/hitozan prevlaka sa i bez dodatka gentamicina na površini titana	33
5.1.2. Fizičko-hemijska karakterizacija hidroksiapatit/hitozan prevlaka sa i bez dodatka gentamicina.....	34
5.1.2.1. Rendgenska difrakciona analiza (XRD).....	34
5.1.2.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)	35
5.1.2.3. Termička stabilnost	36
5.1.2.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija (FE-SEM).....	38
5.1.2.5. Ispitivanje adhezije prevlaka	38
5.1.2.6. Rendgenska fotoelektronska spektroskopija (XPS)	39
5.1.3. Ispitivanje sposobnosti biomineralizacije hidroksiapatit/hitozan prevlaka sa i bez dodatka gentamicina.....	42
5.1.3.1. Formiranje biomimetičkog hidroksiapatita na površini prevlaka nakon potapanja u SBF	42
5.1.3.2. Rendgenska difrakciona analiza (XRD) prevlaka nakon potapanja u SBF.....	42
5.1.3.3. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) prevlaka nakon potapanja u SBF.....	43
5.1.3.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija (FE-SEM) prevlaka nakon potapanja u SBF.....	45
5.1.3.5. Ispitivanje sposobnosti biomineralizacije prevlaka elektrohemijским metodama u SBF-u	46
5.1.3.5.1. Potencijal otvorenog kola	46
5.1.3.5.2. Spektroskopija elektrohemijske impedancije (SEI)	46
5.1.3.5.3. Polarizaciona merenja (PDS).....	49
5.1.4. Ispitivanje otpuštanja gentamicina iz hidroksiapatit/hitozan/gentamicin prevlake	51
5.1.4.1. Određivanje koncentracije otpuštenog gentamicina tečnom hromatografijom visokih performansi u sprezi sa UV spektroskopijom.....	51
5.1.4.2. Određivanje koncentracije otpuštenog gentamicina tečnom hromatografijom visokih performansi u sprezi sa masenom spektrometrijom.....	51
5.1.5. Ispitivanje bioloških svojstava hidroksiapatit/hitozan prevlaka sa i bez dodatka gentamicina	54
5.1.5.1. Antibakterijska aktivnost	54
5.1.5.1.1. Agar difuziona metoda	54
5.1.5.1.2. Ispitivanje kinetike antibakterijske aktivnosti.....	55
5.1.5.2. Citotoksičnost.....	56
5.1.5.2.1. MTT test	56
5.1.5.2.2. Test odbacivanja boje tripan-plavo (DET).....	57
5.1.5.3. Test alkalne fosfataze	58
5.2. Hidroksiapatit/hitozan/grafen i hidroksiapatit/hitozan/grafen/gentamicin prevlake.....	60

5.2.1. Elektroforetsko taloženje hidroksiapatit/hitozan/grafen prevlaka sa i bez dodatka gentamicina na površini titana	60
5.2.2. Fizičko-hemijska karakterizacija hidroksiapatit/hitozan/grafen prevlaka sa i bez dodatka gentamicina.....	60
5.2.2.1. Rendgenska difrakciona analiza (XRD).....	60
5.2.2.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)	61
5.2.2.3. Rendgenska fotoelektronska spektroskopija (XPS)	63
5.2.2.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija (FE-SEM).....	65
5.2.2.5. Ispitivanje adhezije prevlaka	66
5.2.2.6. Ramanova spektroskopija	67
5.2.2.7. Termička stabilnost	68
5.2.3. Ispitivanje sposobnosti biomineralizacije hidroksiapatit/hitozan/grafen prevlaka sa i bez dodatka gentamicina	69
5.2.3.1. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) prevlaka nakon potapanja u SBF.....	69
5.2.3.2. Rendgenska difrakciona analiza (XRD) prevlaka nakon potapanja u SBF	71
5.2.3.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija (FE-SEM) prevlaka nakon potapanja u SBF.....	72
5.2.3.4. Ispitivanje sposobnosti biomineralizacije prevlaka elektrohemijским metodama u SBF-u	73
5.2.3.4.1. Spektroskopija elektrohemijske impedancije (SEI)	73
5.2.3.4.2. Polarizaciona merenja (PDS).....	75
5.2.4. Ispitivanje otpuštanja gentamicina iz hidroksiapatit/hitozan/grafen/gentamicin prevlake	76
5.2.4.1. Određivanje koncentracije otpuštenog gentamicina tečnom hromatografijom visokih performansi u sprezi sa UV spektroskopijom (HPLC-UV)	76
5.2.4.2. Određivanje koncentracije otpuštenog gentamicina tečnom hromatografijom visokih performansi u sprezi sa masenom spektrometrijom (HPLC-MS).....	76
5.2.5. Ispitivanje bioloških svojstava hidroksiapatit/hitozan/grafen prevlaka sa i bez dodatka gentamicina	78
5.2.5.1. Antibakterijska aktivnost	78
5.2.5.1.1. Agar difuziona metoda	78
5.2.5.1.2. Ispitivanje kinetike antibakterijske aktivnosti.....	79
5.2.5.2. Citotoksičnost.....	80
5.2.5.2.1. MTT test	80
5.2.5.2.1. Test odbacivanja boje tripan-plavo (DET).....	81
5.2.5.3. Aktivnost alkalne fosfataze	81

6. ZAKLJUČAK **83**

7. LITERATURA..... **88**

1. UVOD

Biomaterijali se prema definiciji Američkog nacionalnog instituta za zdravlje mogu opisati kao „bilo koja supstanca ili kombinacija supstanci, osim lekova, sintetičkog ili prirodnog porekla, koja se može koristiti u bilo kom vremenskom periodu, a koja povećava ili zamenjuje delimično ili potpuno bilo koje tkivo, organ ili funkciju u organizmu, u cilju održanja ili unapređenja kvaliteta života pojedinca“ [1–3].

U poslednjih nekoliko decenija javila se povećana potreba za razvojem novih i unapređenih materijala za koštane implantate, koji su bezbedni po ljudsko zdravlje. Ova potreba proistekla je usled očiglednog starenja svetske populacije, odnosno sve većeg učešća starijeg stanovništva sa bolestimakarakterističnim za to životno doba. Stoga su istraživači širom sveta usmereni na razvoj različitih medicinskih sredstava i pomagala, odnosno novih materijala za njihovu izradu koji bi doprineli unapređenju kvaliteta lečenja brojnih dentalnih i ortopedskih stanja i poremećaja.

Najnovija istraživanja u oblasti biomaterijala su usredsređena na razvoj funkcionalnih biomaterijala za izradu i oblaganje koštanih i dentalnih implantata, produženog veka trajanja. Razvoj i dizajn ovakvih materijala se vodi osnovnim zahtevima koje biomaterijali za izradu koštanih implantata moraju da ispune: 1) biokompatibilnost, 2) bioaktivnost, 3) biodegradabilnost, 4) adekvatna mehanička stabilnost, 5) visoka otpornost na koroziju i otpornost na habanje i u poslednje vreme 6) antibakterijska aktivnost [4,5]. Imajući u vidu navedene zahteve, istraživanja u oblasti koštanih implantata se sve više zasnivaju na razvoju različitih kompozitnih materijala na bazi keramičkih i polimernih materijala sa inkorporiranim aktivnim komponentama (antibioticima) u cilju prevencije infekcija [6]. Sintetički hidroksiapatit (HAP) je keramički materijal koji se odlikuje izvanrednom biokompatibilnošću i bioaktivnošću usled sličnosti sa hemijskim sastavom prirodne kosti [7]. Eksperimenti *in vivo* su pokazali poboljšanje proliferacije i diferencijacije osteoprogenitorskih ćelija i rast nove kosti kada je korišćen porozni, sintetički hidroksiapatit [8]. Međutim, glavni nedostatak ovakvih prevlaka na bazi hidroksiapatita su loša mehanička i adhezivna svojstva, odnosno loše prijanjanje prevlake za metalni implantat i nedostatak antibakterijskih svojstava, kao i veoma česta pojava post-operativnih infekcija koje mogu dovesti do odbacivanja implantata. U cilju prevazilaženja pomenutih ograničenja, kao efikasan pristup pokazala se upotreba polimernih komponenti, koje uglavnom služe kao matrice u sintezi kompozitnih materijala sa poboljšanim adhezivnim svojstvima i koje mogu da služe i kao nosači različitih biološki aktivnih agenasa, i mogu u izvesnoj meri da poseduju antibakterijska svojstva [6,7]. Za ojačanje polimernih matrica, odnosno kompozitnih materijala može se primeniti grafen (Gr) [7]. Uključivanje grafena u kompozitne materijale doprinosi poboljšanju mehaničkih i termičkih svojstava kompozita, dok se zbog svoje dobre biokompatibilnosti može smatrati i potencijalnim biomaterijalom. S obzirom da koštani implantati moraju da pružaju odgovarajuću mehaničku potporu, metali i metalne legure predstavljaju primarni izbor zbog odlične kombinacije krutosti, žilavosti i tvrdoće [9]. Titan i legure titana predstavljaju „zlatni standard“ u izradi koštanih implantata u slučajevima težih ortopedskih stanja jer poseduju odlična mehanička svojstva i visoku otpornosti na koroziju. Međutim, metali generalno poseduju „biološki pasivne“ površine, nemaju sposobnost da indukuju odgovarajuću interakciju u organizmu i podstaknu vezivanje implantata sa okolnim koštanim tkivom. U cilju povećanja bioaktivnosti koštanih implantata, veoma uspešno se primenjuje modifikacija površine metala nanošenjem tankih bioaktivnih filmova [6]. U velikom broju naučnih studija je pokazano da modifikovane površine metalnih implantata pokazuju visoku efikasnost u smanjenju rizika od bakterijskih infekcija, onemogućavanjem formiranja biofilma i povećanjem bioaktivnosti implantata, u poređenju sa nemodifikovanim površinama [1,10–12]. Poznate su različite tehnike za modifikaciju površine metalnih implantata [13], među kojima se izdvaja elektroforetsko taloženje (eng. *Electrophoretic deposition*, *EPD*). Primenom elektroforetskog taloženja moguće je dobiti kompozitne prevlake visoke čistoće, kontrolisane topografije i morfologije, na sobnoj temperaturi, omogućavajući taloženje osetljivih bioloških molekula i lekova [10].

U oblasti ortopedske hirurgije i traumatologije, potencijalni upalni procesi i infekcije na samom mestu hirurške intervencije mogu izazvati ozbiljne zdravstvene komplikacije i dovesti čak i do odbacivanja implantata. Iz tog razloga, standardna klinička terapija podrazumeva sistemsku primenu antibiotika nakon implantacije ili drugih ortopedskih zahvata kako bi se sprečio razvoj infekcije i odbacivanje implantata. Ovakav pristup zahteva visoke doze leka kako bi se postigao efekat na željenom mestu, što sa druge strane, može imati negativan efekat na celokupno stanje organizma. U cilju prevazilaženja ovog problema, površina implantata se može modifikovati materijalima koji sadrže različite antibiotike [14,15]. Na taj način, lokalnom primenom antibiotika, moguće je postići visoku koncentraciju aktivne supstance direktno na željenom mestu, smanjujući potencijalne neželjene efekte sistemske administracije antibiotika [6].

Cilj ovog rada je dobijanje netoksičnih, antibakterijskih kompozitnih prevlaka hidroksiapatita i hitozana, odnosno i hidroksiapatita, hitozana i grafena na titanu sa i bez dodatka gentamicina postupkom elektroforetskog taloženja, u jednom koraku, iz vodenih suspenzija za potencijalnu primenu u medicini u oblasti koštanih implantata. Biće izvršena detaljna karakterizacija u cilju ispitivanja morfologije i strukture dobijenih prevlaka. U okviru ove disertacije će biti ispitan i uticaj dodatka grafena na fizičko-hemijska i biološka svojstva dobijenih prevlaka. Takođe, ispitaće se kinetika otpuštanja gentamicina i antibakterijska aktivnost prevlaka kako bi se stekao uvid u efikasnost dobijenih prevlaka u sprečavanju infekcija nakon implantacije. Biokompatibilnost i potencijal za buduće primene u medicini biće detaljno ispitani testovima citotoksičnosti i ispitivanjem aktivnosti alkalne fosfataze na testiranim ćelijskim linijama.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Struktura i svojstva kostiju

2.1.1. Prirodna kost

Kost je kompleksna struktura koja se prilagođava različitim funkcijama u telu omogućavajući podršku i zaštitu organizma, kretanje i proizvodnju krvnih zrnaca. Struktura kosti obuhvata kompaktnu i sponozastu kost, koštanu srž, periosteum i endosteum. Pod kompaktnom kosti se podrazumeva spoljni sloj kosti koji obezbeđuje jačinu i zaštitu, dok sponozasta kost zauzima unutrašnji deo obezbeđujući strukturnu potporu i doprinoseći smanjenju težine kostiju. Koštana srž je odgovorna za proizvodnju krvnih zrnaca i zauzima centralnu šupljinu kostiju, dok su periosteum i endosteum fibrozne membrane koje pokrivaju spoljašnju i unutrašnju površinu kostiju, redom [16].

Prema hemijskom sastavu, kost se može definisati kao keramičko-organski kompozit koji se sastoji od kolagena (20 %), kalcijum-fosfata (69 %) i vode (9 %) i koji sadrži i male količine drugih organskih materija, poput proteina, lipida i polisaharida. Kolagena vlakna u koštanom tkivu su u obliku fibrilnih vlakana (prečnika 100-200 nm) koja kostima obezbeđuju odgovarajuću elastičnost [17]. Mineralna komponenta koja doprinosi krutosti kostiju uglavnom se sastoji od kalcijum-fosfata u formi kristala hidroksiapatita igličastog oblika (dužine 40-60 nm, širine oko 20 nm i debljine od 1,5 do 5 nm). S obzirom na kompleksnu strukturu, mehanička svojstva kostiju uslovljena su velikim brojem faktora poput stepena poroznosti (5-95 %), stepena mineralizacije, orijentacije kolagenih vlakana, rasporeda kristala apatita kao i opšteg stanja organizma. Kost se odlikuje relativno visokim modulom elastičnosti usled prisustva kolagena i složene fibrozne mikrostrukture i odličnom žilavošću (pri niskim stopama deformacije) koja je posledica složene hijerarhijske strukture. Mehanička svojstva ljudske kompaktne kosti prikazana su u tabeli 1.

Tabela 1. Mehanička svojstva kompaktne ljudske kosti [17]

Smer ispitivanja u odnosu na smer kosti		
	Paralelno	Normalno
Zatezna čvrstoća (MPa)	124-174	49
Pritisna čvrstoća (MPa)	170-193	133
Napon savijanja (MPa)	160 ^a	
	54	
Jungov modul elastičnosti (GPa)	17,0-18,9	11,5
Čvrstoća smicanja (MPa)	20-27 (nasumično)	
Energija loma (J/m²)	6000 (niska stopa deformacije)	
	98 (visoka stopa deformacije)	
K_{Ic} (MPa m^{1/2})	2-12 ^a	
Krajnja zatezna čvrstoća	0,014-0,031	0,007
Krajnja pritisna čvrstoća	0,0185-0,026	0,028
Granični napon pri istezanju	0,007	0,004
Granična deformacija pri pritisku	0,010	0,011

^a Pravac merenja nije definisan.

Koštano tkivo se tokom života konstantno obnavlja i regeneriše uz istovremeno uklanjanje starog ili oštećenog tkiva. Ova dva procesa su poznata kao modelovanje i remodelovanje i predstavljaju odgovor i adaptaciju organizma na promene u fizičkoj aktivnosti, nivoima hormona i

drugim faktorima i pomažu u održavanju čvrstoće kostiju, kao i u oporavku i regeneraciji koštanih defekata [8]. Modelovanje kostiju je najizraženije tokom rasta i podrazumeva samo formiranje nove kosti dok je u procesu remodelovanja formiranje kostiju praćeno resorpcijom.

Razlikuje se nekoliko vrsta koštanih ćelija – osteoblasti, osteoklasti i osteociti i svaka od ovih ćelija ispoljava jedinstvene funkcije u organizmu:

- Osteoblasti su ćelije koje formiraju koštano tkivo i sintetišu i izlučuju organske materije koštanog matriksa, uključujući kolagen i druge proteine. Učestvuju u regulaciji mineralizacije koštanog matriksa taloženjem kalcijuma i drugih minerala. Prilikom formiranja novog koštanog tkiva, osteoblasti postaju okruženi matriksom i na kraju se transformišu u osteocite.
- Osteoklasti su velike ćelije sa više jezgara i učestvuju u procesu resorpcije kostiju, odnosno u uklanjanju starog ili oštećenog koštanog tkiva. Osteoklasti luče enzime koji rastvaraju mineralizovani matriks kosti, omogućavajući da se proizvodi razgradnje apsorbuju u krvotok.
- Osteociti su zrele koštane ćelije koje potiču od osteoblasta. Osteociti igraju glavnu ulogu u razmeni hranljivih materija i otpadnih proizvoda unutar kosti. Ove ćelije su povezane jedne sa drugima i sa dovodom krvi kroz mrežu sićušnih kanala na taj način regulišu metabolizam koštanog tkiva i reaguju na mehanički stres [18].

Remodelovanje koštanog tkiva se zasniva na zajedničkom koordinisanom delovanju svih navedenih ćelija, i doprinosi održavanju strukturnog integriteta skeleta, regeneraciji oštećene kosti i prilagođavanju kostiju mehaničkom stresu. Ovaj kompleksan proces zamene stare kosti novim se sastoji od tri faze: prva faza podrazumeva iniciranje resorpcije kostiju ćelijama osteoklasta, zatim sledi tranzicioni period od resorpcije do formiranja nove kosti i poslednja faza predstavlja formiranje nove kosti od strane osteoblasta [8,18].

Usled izlaganja zdrave kosti različitim opterećenjima, naročito u slučajevima kada se to opterećenje sa vremenom povećava, prema Volfovom zakonu [19,20] dolazi do „prilagođavanja“ kosti opterećenju, odnosno dolazi do njenog preoblikovanja i jačanja. Međutim, u suprotnom slučaju kada dolazi do smanjenja opterećenja na određenu kost dolazi i do smanjenja gustine kostiju – osteopenija. Ovo može da bude veoma izraženo u slučajevima umetanja veštačkih materijala (potpuna zamena kuka) zbog efekta zaštite od naprežanja (eng. *stress shielding effect*) koji nastaje kao posledica veće krutosti (Jungov modul elastičnosti) metala u odnosu na kost [16].

2.2. Koštani supstituenti

U slučajevima kada kost nije sposobna da se regeneriše, (uklanjanje tumora kosti, gubitak kosti u nesrećama, komplikovani lomovi kostiju), neophodno je uključiti čvrstu zamenu za deo kosti, a to su transplantacioni ili implantacioni materijali, humanog, životinjskog ili sintetskog porekla.

2.2.1. Biološki koštani supstituenti

Prema poreklu, biološki koštani supstituenti se mogu klasifikovati u tri osnovne kategorije: autograftove, alograftove i ksenograftove [21]. Autograftovi su transplantati koji potiču iz organizma istog pacijenta, što eliminiše rizike povezane sa biokompatibilnošću i imunološkim odgovorom, omogućavajući na taj način efikasnu i brzu regeneraciju kosti. Alograftovi predstavljaju demineralizovani koštani matriks (DBM) koji se dobija od donora, odnosno od druge jedinke iste vrste. S druge strane, ksenograftovi podrazumevaju transplantaciju koštanog tkiva između različitih vrsta, kao što su sinterovani goveđi apatit, svinjski kolagen ili termički tretirani koralji.

2.2.2. Sintetički koštani supstituenti

Sintetički biomaterijali se mogu podeliti prema hemijskom sastavu na metalne, polimerne i keramičke, dok sa aspekta primene mogu biti dentalni, ortopedski, kardiovaskularni, dermatološki, oftalmološki i drugi [22]. Keramički materijali, u ulozi sintetičkih koštanih supstituenata, se izdvajaju po visokom stepenu biokompatibilnosti, što predstavlja osnovnu prednost u odnosu na druge materijale. Sa druge strane, primenu biokeramike ograničavaju krtošć i niska žilavost, što može negativno uticati na pouzdanost i trajnost implantata. Pобољšanje mehaničkih svojstava keramike moguće je postići formiranjem kompozitnih struktura ili nanošenjem keramičkih prevlaka na metalne podloge, čime se kombinuju dobra mehanička svojstva metala sa površinskom bioaktivnošću keramičkih materijala. Sintetički biomaterijali, u ulozi implantata, stupaju u interakciju sa živim tkivima i u zavisnosti od načina interakcije mogu se dalje klasifikovati na bioinertne, bioaktivne i bioresorptivne [23].

Bioinertna keramika karakteriše se odsustvom međusobne interakcije sa okolnim biološkim tkivima, pri čemu ni sama ne utiče na tkivo, niti tkivo reaguje na njen prisustvo. Nakon implantacije ovih materijala u organizam, dolazi do stvaranja neprijanjajuće vlaknaste prevlake (debljine oko 1 μm) koja formira vlaknastu kapsulu. Ovakvi materijali se uglavnom koriste na mestima izloženim značajnim mehaničkim opterećenjima, kao što su glave endoproteza kuka i određeni segmenti proteza kolena.

Bioaktivna keramika poseduje sposobnost da aktivno učestvuje u biološkoj interakciji sa okolnim tkivima. Proces jonske izmene između implantata i telesnih tečnosti inicira formiranje sloja karbonatnog apatita na površini materijala. Ovaj novonastali sloj pokazuje hemijsku i kristalografsku sličnost sa mineralnom komponentom prirodne kosti. Po svom hemijskom sastavu, bioaktivna keramika se uglavnom bazira na kalcijum-fosfatima i najčešće korišćeni materijali iz ove grupe su hidroksiapatit i njegovi kompoziti, zatim staklo-keramika, kao i biostakla®.

Bioresorptivna keramika predstavlja klasu materijala koji nakon implantacije u organizam ulaze u proces postepene, delimične ili potpune resorpcije, pri čemu dolazi do njihove zamene novostvorenim tkivom. Poželjno je da kinetika razgradnje ovog tipa biomaterijala bude usklađena sa brzinom regeneracije kosti, čime se obezbeđuje optimalna integracija sa biološkom sredinom. Tipični predstavnici ove grupe su trikalcijum-fosfat (TCP) i kopolimeri poli(mlečne) i poli(glikolne) kiseline, koji se primenjuju u savremenoj regenerativnoj medicini.

Da bi neki materijal, odnosno biomaterijal, mogao da se koristi za izradu medicinskih implantata, mora da ispuni nekoliko osnovnih kriterijuma kao što su: odgovarajuća mehanička svojstva, dobra biokompatibilnost i netoksičnost, sposobnost osteointegracije, visoka otpornost na koroziju, visoka otpornost na habanje, dug životni vek, antibakterijska svojstva i drugo.

1. **Mehanička svojstva** – Odgovarajući materijal treba da poseduje mehanička svojstva slična kosti, odnosno modul elastičnosti i čvrstoću u određenim granicama. Manji modul i čvrstoća materijala najčešće dovode do odbacivanja implantata, dok u slučajevima visokih vrednosti modula elastičnosti i čvrstoće dolazi do pojave efekta zaštite od naprezanja [1].
2. **Biokompatibilnost i netoksičnost** – Kompatibilnost ispitivanog materijala je od naročitog značaja za razvoj implanata. Ispitivani materijal ne sme da izaziva i ispoljava toksične i alergijske efekte na okolna tkiva.
3. **Sposobnost osteointegracije** – Sposobnost materijala da izazove rast novog sloja kosti na površini implantata i dovede do „direktnog vezivanja“ sa kosti. Različiti faktori mogu da utiču na osteointegraciju implantata poput hemijskih reakcija materijala, hrapavosti površine i topografije. Stoga je, u cilju razvoja efikasnih implantacionih materijala veoma bitno izvršiti detaljnu karakterizaciju i razumeti sve pojave na površini tog materijala [16].
4. **Visoka otpornost na koroziju** – Materijal treba da poseduje odgovarajuću otpornost na koroziju, jer nakon implantacije dolazi u kontakt sa okolnim telesnim tečnostima koje mogu da deluju kao korozivni medijum za implantat. Pored toga, i pH vrednost takođe utiče na održivost

implantata unutar fiziološkog okruženja. Takođe, može doći do pojave korozivnih procesa na površini implantata, što može da naruši njegovu funkciju i dovede do njegovog odbacivanja.

5. **Visoka otpornost na habanje** – Odabrani materijali moraju da imaju nizak koeficijent trenja ili visoku otpornost na habanje. Veliko trenje bi izazvalo oštećenja kosti i implantata a „ostaci habanja“ mogu da izazovu upalne procese, da oštete kost koja podržava implantat i da dovedu do odbacivanja implantata.
6. **Dug životni vek** – Nakon implantacije dolazi do različitih cikličnih naprezanja oko implantata. Od suštinskog je značaja da implantat poseduje visoku čvrstoću koja će mu omogućiti da podnese i podrži višestruka naprezanja i opterećenja unutar ljudskog tela [24].

2.3. Kompozitni materijali

Podela kompozitnih materijala se može izvršiti prema različitim kriterijumima, i to prema vrsti matrice i punioca, dimenzijama pojedinih faza, nameni i drugim. Najzastupljenija je podela prema vrsti matrice tako da se razlikuju kompoziti sa polimernom, metalnom i keramičkom matricom. Kombinovanjem više različitih materijala postiže se usklađivanje njihovih pojedinačnih svojstava i kao rezultat se dobija kompozitni materijal poboljšanih karakteristika. Postoji široki spektar svojstava na koja se može uticati, pa se dodavanjem materijala „punioca“ i variranjem njegovog udela mogu u određenoj meri povećati čvrstoća, žilavost, otpornost na habanje i ostala svojstva [25,26]. Variranjem veličine čestica pojedinačnih faza u kompozitnom materijalu mogu se promeniti karakteristike materijala u odnosu na karakteristike pojedinačnih polaznih materijala – od krutih materijala se mogu dobiti žilavi i slično [27].

Prema literaturi, danas se kao metalni implantatati upotrebljavaju titan (Ti), legure titana (Ti6Al4V), nerđajući čelik 316L, Co-Cr legure i drugi [28–31]. Iako poseduju izvanredna mehanička svojstva, metalni implantati ne izazivaju adekvatan biološki odgovor u organizmu nakon implantacije. Takođe, mogu se pojaviti i dodatni toksični efekti usled oslobađanja jona metala u okolno tkivo [32,33]. Zbog različitih mehaničkih svojstava kostiju i implantata (na primer modula elastičnosti) može doći do pojave poznate kao efekat zaštite od naprezanja, što uzrokuje smanjeno fiziološko opterećenje kosti, smanjenje gustine koštanog tkiva, a time i povećan rizik od gubitka implantata i potrebe za ponovljenom operacijom [19,20].

U cilju povećanja biokompatibilnosti i bioaktivnosti ortopedskih implantata, kao i smanjenja potencijalnog otpuštanja metalnih jona u okolno tkivo, primenjuje se modifikacija površine implantata, a to je moguće ostvariti na različite načine. Neke od mogućnosti uključuju dodatak materijala željenih svojstava na površinu bioaktivne keramičke prevlake, konverziju postojeće površine u površinu „pogodnijeg“ hemijskog sastava i topografije, uklanjanje materijala sa postojeće površine u cilju dobijanja odgovarajućih topografija. Ove modifikacije se mogu podeliti u tri velike grupe: mehanička, fizička i hemijska i biološka funkcionalizacija. Mehanička funkcionalizacija ima za cilj dobijanje površine implantata odgovarajuće specifične hrapavosti koja obezbeđuje poboljšanu ćelijsku adheziju i proliferaciju osteoblasta u cilju nastajanja novog sloja kosti. Pod fizičkom funkcionalizacijom se podrazumeva oksidacija metala ili nanošenje keramičkih prevlaka na površinu implantata u cilju povećanja njihove bioaktivnosti i biokompatibilnosti. Hemijska i biološka funkcionalizacija predstavljaju relativno nov metod modifikacije ortopedskih implantata [34,35]. Biomolekuli koji se mogu imobilisati na površini biomaterijala su raznovrsni poput antikoagulanata, anti-inflamatornih lekova, antibiotika i ekstracelularnih proteina matriksa. Najnovija istraživanja u oblasti ortopedije podrazumevaju funkcionalizaciju sa osteogenim ćelijama i osteoinduktivnim faktorima rasta [36].

Nakon plasiranja implantata, odnosno nakon hiruške intervencije, pacijenti su potencijalno skloniji infekciji jer je efikasnost imunog sistema ugrožena prisustvom stranog tela (implantata). Uprkos striktnim antiseptičkim operativnim procedurama za uklanjanje mikrobnih kontaminacija sa bolničkih površina, bakterijske ćelije se mogu naći na površini implantata i biti unešene u organizam,

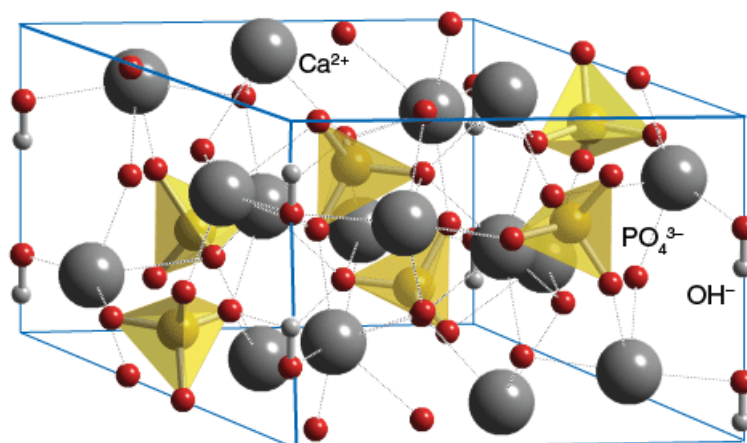
gde se veoma brzo mogu razmnožiti. Bakterijske infekcije značajno povećavaju potencijalne postoperativne komplikacije. Infekcije nakon implantacije nastaju kao rezultat adhezije ćelija bakterija na površinu implantata, a zatim i formiranje biofilma na tom mestu. Proces formiranja biofilma se odigrava u nekoliko faza. Prvo dolazi do ubrzanog prijanjanja bakterijskih ćelija za površinu implantata praćenog razmnožavanjem ćelija i intraćelijskom adhezijom u ekstracelularnom polisaharidnom matriksu. Ukoliko do adhezije ćelija dođe pre odigravanja procesa regeneracije tkiva, odbrambeni sistem domaćina često ne može da spreči kolonizaciju bakterijskih ćelija i formiranje biofilma koji je izuzetno otporan i na imuni sistem i na antibiotike. Izuzetna otpornost biofilma potiče od njegove kompaktne strukture, redukovano ćelijskog rasta i disanja bakterijskih ćelija biofilma kao i odličnog zaštitnog sloja koji formiraju polimeri matrice biofilma [37]. Jednom formiran biofilm ima tendenciju da bude veoma otporan na antibiotike, pa čak može da izazove infekciju okolnih tkiva, što dovodi do upalnih stanja, odbacivanja implantata ili u najtežem slučaju, dovede do fatalnog ishoda. Ukoliko dođe do pojave infekcija nakon implantacije, sistemska terapija antibioticima je najčešće najjednostavniji i najpristupačniji izbor lečenja. Međutim, ovakva terapija zahteva veoma visoke koncentracije antibiotika koji usled poremećene cirkulacije krvi, često ne stignu u dovoljnoj koncentraciji do mesta infekcije. Stoga, obećavajući pristup za lečenje ovakvih infekcija i sprečavanje adhezije bakterijskih ćelija na mestu implantacije predstavlja lokalna isporuka antimikrobnih agenasa. Lokalna isporuka antibiotika u cilju sprečavanja infekcija nakon implantacije u dužem vremenskom periodu pokazuje dosta prednosti u odnosu na sistemska terapiju antimikrobnim agensima. Glavne prednosti uključuju: 1) primenu nižih doza antibiotika, 2) izbegavanje mogućnosti primene toksičnih doza antibiotika, 3) ređu pojavu antibiotske rezistencije i 4) sposobnost dugotrajnog kontrolisanog otpuštanja različitih antimikrobnih agenasa sa različitom kinetikom. Antibiotici koji su korišćeni kao delovi sistema za lokalnu isporuku lekova su vankomicin, tobramicin, cefamandol, cefalotin, karbencilin, amoksicilin i gentamicin [24,38–40]. Da bi se omogućilo lokalno prisustvo visokih koncentracija leka na samom mestu plasiranja implantata, površina implantata se može modifikovati direktnom impregnacijom sa antibioticima, imobilizacijom antimikrobnog agensa u matrici, sposobnog da se veže za različite površine, kao i nanošenjem prevlaka sa antimikrobnim, aktivnim metalima poput bakra i srebra [7,41–43] kada se implantat istovremeno koristi i kao sistem za isporuku antimikrobnih agenasa (nosač agenasa). Postoje dve strategije za dobijanje ovakvih sistema: 1) odgovarajući lekovi i biomolekuli mogu da se inkorporiraju u sam biomaterijal i da se oslobode difuzijom ili degradacijom matrice na željenom mestu; 2) lekovi i biomolekuli mogu da se imobilisu na površinu biomaterijala odnosno implantata potapanjem i sušenjem, imobilizacijom hemijskim vezama i nanošenjem prevlaka. Glavni nedostatak procesa potapanja je loša kontrola otpuštanja lekova, kao i ograničen broj mesta za hemijsko vezivanje lekova [41]. Sa druge strane, prevlake su privukle veoma veliku pažnju u ulozi nosača različitih antimikrobnih agenasa. Postoje „pasivne“ i „aktivne“ prevlake. Pasivne prevlake imaju sposobnost da redukuju adheziju ćelija bakterija izmenom fizičko-hemijskih svojstava površine. U „aktivne“ prevlake spadaju one prevlake koje aktivno otpuštaju antimikrobne agense [41]. Veliki napredak je postignut razvojem nanostrukturnih kompozitnih materijala u obliku prevlaka ili tankih filmova gde su bioaktivne komponente inkorporirane unutar neorganskog nanostrukturnog matriksa. Nanokompoziti mogu da kombinuju biopolimere koji imitiraju organske komponente ekstracelularnog matriksa kostiju (kolagen) i bioaktivnu nanokeramiku kako bi indukovali biomineralizaciju. Iako je veliki napredak na ovom polju postignut, glavna pažnja ovih istraživanja je i dalje usmerena na razvoj funkcionalnih nanostrukturnih prevlaka za „pametne“ biomaterijale koji aktivno učestvuju u formiranju funkcionalnog tkiva oko implantata i pokazuju sposobnost otpuštanja antibiotika ili drugih antimikrobnih agenasa.

Organsko-neorganski kompoziti predstavljaju inovativne materijale u oblasti koštanih implantata posebno za dobijanje aktivnih sistema za otpuštanje antimikrobnih agenasa. Keramičke nanočestice poboljšavaju bioaktivnost, dok polimerne komponente poboljšavaju mehanička svojstva i adheziju za supstrat.

2.3.1. Biokeramički materijali na bazi kalcijum-fosfatnih jedinjenja

U oblasti biomaterijala i inženjerstva tkiva od primarnog je značaja primena bioaktivnih i biokompatibilnih keramičkih materijala. Prema sastavu, mineralna faza prirodne kosti (koštani apatit), pripada grupi kalcijum-fosfatnih jedinjenja, tako da je velika pažnja usmerena upravo na izučavanje ove grupe jedinjenja. Ovi materijali se odlikuju netoksičnošću i biokompatibilnošću, zbog čega ih organizam ne prepoznaje kao strana tela. Dodatno, poseduju bioaktivna svojstva koja omogućavaju integraciju u živa tkiva, slično kao što se dešava pri remodelovanju zdrave kosti, formirajući čvrste fizičko-hemijske veze između implantata i kosti (osteointegracija). Takođe, kalcijum-fosfati su poznati po tome što podstiču adheziju osteoblasta i njihovo razmnožavanje [44–46]. Kao komponente različitih kompozitnih sistema, ovi materijali indukuju rast novog koštanog tkiva, odnosno apatitnog sloja. Stabilnost pojedinih faza kalcijum-fosfata je funkcija temperature, hemijskog sastava i pH vrednosti okruženja [47]. Na telesnoj temperaturi (37 °C) u prisustvu telesnih tečnosti, pri pH vrednosti od 7,4 stabilna faza kalcijum-fosfata je hidroksiapatit [48]. Dodatno, potrebno je napomenuti da se nakon plasiranja implantata, kao posledica oštećenja okolnog tkiva, lokalno smanjuje pH vrednost usled prisustva enzima, ali se nakon izvesnog vremena ponovo se vraća na 7,4 [49].

Iako se konstantno razvijaju različiti biokeramički materijali u oblasti ortopedije i stomatologije, hidroksiapatit se i dalje izdvaja kao najčešće korišćen materijal usled sličnosti sa neorganskim mineralnim delom kostiju i zuba, kao i zbog izvanredne biokompatibilnosti i jedinstvene bioaktivnosti koje poseduje [12]. Na slici 1. je prikazana jedinična ćelija hidroksiapatita [16].



Slika 1. Jedinična ćelija hidroksiapatita [50]

Jedinična ćelija hidroksiapatita ima heksagonalnu strukturu sa prostornom grupom $P6_3/m$, i parametrima ćelije $a = b = 9,4225 \text{ \AA}$ i $c = 6,8850 \text{ \AA}$ [11,50]. Kristalna struktura hidroksiapatita je podložna supstitucijama. Katjonske supstitucije se javljaju na mestima koja su normalno zauzeta atomima kalcijuma, dok anjonske supstitucije mogu da uključe ili fosfatne ili hidroksilne jone. Hlorapatit, fluorapatit i karbonatni apatit su uobičajeni primeri anjonske supstitucije u hidroksiapatitu, gde su OH^- joni zamenjeni Cl^- , F^- i CO_3^{2-} jonima, redom. Ove supstitucije mogu značajno da utiču na morfologiju kristala, rastvorljivost, kristaliničnost, parametre kristalne rešetke, termičku stabilnost i biološki odgovor hidroksiapatita [51,52]. U tabeli 2. prikazana su glavna svojstva hidroksiapatita.

Tabela 2. Osnovna svojstva hidroksiapatita [50]

Svojstvo	Vrednost
Gustina	3,16 g/cm ³
Temperatura razlaganja	>1000 °C
Dielektrična konstanta	7,40-10,47
Termalna konduktivnost	0,013 W/cmK
Tačka topljenja	1614 C°
Zatezna čvrstoća	38-300 MPa (gusti HAP) ~3 MPa (porozni HAP)
Napon savijanja	38-250 MPa (gusti HAP) 2-11 MPa (porozni HAP)
Pritisna čvrstoća	120-900 MPa (gusti HAP) 2-100 MPa (gusti HAP)
Jungov modul elastičnosti	35-120 GPa
Poasonov odnos	0,27
Energija loma	2,3-20 J / m ²
Žilavost loma	0,7-1,2 MPa·m ^{1/2} (opada sa poroznošću)
Tvrdoća loma	3-7 GPa (gusti, kompaktni HAP)
Biokompatibilnost	Visoka
Biodegradabilnost	Niska
Bioaktivnost	Visoka
Osteokonduktivnost	Visoka
Osteoinduktivnost	Nula

U oblasti biomaterijala, za izradu koštanih i dentalnih implantata, dominantna je primena sintetičkog hidroksiapatita koji je u pogledu hemijske i kristalografske strukture veoma sličan koštanom apatitu, termodinamički je stabilan pri fiziološkim pH vrednostima i osteokonduktivan [53].

Načini dobijanja hidroksiapatita se mogu podeliti u četiri velike grupe; suvi postupci, mokri postupci, procesi na visokoj temperaturi i metoda sinteze zasnovana na biogenim izvorima ili bioinspirisanim pristupima [50]. Suvi postupci obuhvataju sinteze u čvrstom stanju i mehanohemijske sinteze i ovako dobijeni prahovi se odlikuju krupnim zrnima (obično iznad nano-dimenzija). Mokri postupci su najčešće korišćeni za sintezu nano-prahova hidroksiapatita jer omogućavaju dobijanje nanočestičnog hidroksiapatita i mogu da se podele u šest podgrupa: konvencionalno hemijsko taloženje, hidroliza, sol-gel postupak, hidrotermalna metoda, emulziona metoda i sono-hemijska metoda. Proces na visokoj temperaturi omogućavaju dobijanje veoma čistih, hemijski homogenih prahova. Sinteza zasnovana na biogenim izvorima ili bioinspirisanim pristupima omogućava delimično ili potpuno dobijanje hidroksiapatita iz biogenih izvora ekstrakcijom iz ribljih kostiju i krljušti, iz goveđih kostiju, ljuski jajeta, korala ili iz egzoskeleta morskih organizama. Ovako dobijen hidroksiapatit se bolje integriše u ljudski organizam zbog sličnosti sa koštanim apatitom [50].

Često je, nakon sinteze prahova hidroksiapatita postupcima koji ne uključuju visoku temperaturu, potrebno naknadno sinterovanje i u zavisnosti od metode sinterovanja mogu se dobiti gusti (kompaktni) ili porozni proizvodi. Brzina zagrevanja, temperatura sinterovanja i vreme zadržavanja na određenoj temperaturi, uglavnom se nalaze u intervalima od 0,5–3 °C/min, 1000–1250 °C i 2–5 h, redom. Gusta keramika na bazi hidroksiapatita se može dobiti postupcima sinterovanja, toplim uniaksijalim presovanjem i toplim izostatskim presovanjem. Ovim postupcima dolazi do smanjenja veličine zrna i dobija se hidroksiapatit velike gustine, fine mikrostrukture, visoke termičke stabilnosti i dobrih mehaničkih svojstava. Metode za dobijanje porozne keramike na bazi

hidroksiapatita obuhvataju sinterovanje u prisustvu specifičnih aditiva koji doprinose formiranju pora, i u literaturi se pominje upotreba naftalena, parafina, vodonik-peroksida ili nekih poroznih materijala poput polimernih sundjera koji sagorevaju na visokim temperaturama ostavljajući pore [54]. Veličina i zapremina pora zavisi od raspodele veličine čestica u polaznom materijalu kao i od aditiva i uslova sinterovanja. Pretpostavlja se da je minimalna veličina pora potrebna za proces „urastanja“ kostiju u implantima u intervalu 100-135 μm . Pore u implantima su neophodne za proces osteointegracije, koji zavisi od veličine pora, zapremine i njihove povezanosti. Efikasnost urastanja kostiju i njihovo fiksiranje se može postići povećanjem poroznosti i međusobne povezanosti pora. Obično, porozna keramika pokazuje veći stepen resorpcije i veću resorbilnost i osteokonduktivnost u poređenju sa gustom keramikom, zbog veće specifične površine koja omogućava bolju adheziju, diferencijaciju i proliferaciju koštanih ćelija na površini implantata [50]. Odlikuje se slabim mehaničkim svojstvima i stoga je pogodna za implantaciju u tkiva koja ne podležu velikim opterećenjima (operacija srednjeg uha i neke maksilofacijalne intervencije) [50]. Dodatno, porozna struktura omogućava uspešno vezivanje farmakoloških supstanci poput antibiotika, hormona, enzima, fragmenata antitela, steroida i drugih.

Hidroksiapatit ima širok spektar primena na polju medicine, stomatologije i nauke o materijalima. Neke od tih primena uključuju:

1. Dentalne primene, u pastama za zube, dentalnim implantatima i dentalnim ispunama. Ima ulogu u lečenju i regeneraciji zubne gleđi i dentina.
2. Primenu u koštanim graftovima i implantatima, u vidu biomaterijala koji obezbeđuje osnovu za rast nove kosti, promoviše regeneraciju kostiju i integraciju sa okolnim tkivom.
3. Prevlake za medicinska sredstva – hidroksiapatit se može nanositi u vidu prevlaka na površinu medicinskih implantata, poput zamena za zglobove i šrafova kako bi poboljšao njihovu biokompatibilnost.
4. Kao deo sistema za isporuku lekova – nanočestice hidroksiapatita mogu da se koriste kao nosači za isporuku lekova.
5. Inženjerstvo tkiva – skafoldi hidroksiapatita se koriste na polju inženjerstva tkiva da formiraju i obezbede tro-dimenzione strukture koje podržavaju rast ćelija i regeneraciju tkiva. Ovi skafoldi mogu da se zaseju ćelijama i zatim implantiraju u telo kako bi pospešili obnavljanje oštećenih tkiva.

Loša mehanička i adhezivna svojstva hidroksiapatita ograničavaju njegovu primenu u medicini. Ovaj nedostatak se može prevazići formiranjem kompozita, kombinujući materijale različitih karakteristika. Jedan od pristupa je imitiranje strukture prirodne kosti (hidroksiapatit i kolagen) i formiranje kompozita hidroksiapatita sa različitim polimerima u cilju poboljšanja adhezivnih i mehaničkih svojstava. Polimeri imaju „zadatak“ da oponašaju ulogu organske faze u prirodnom tkivu, pošto su visoka žilavost loma i zatezna čvrstoća kosti posledica prisustva kolagenih vlakana.

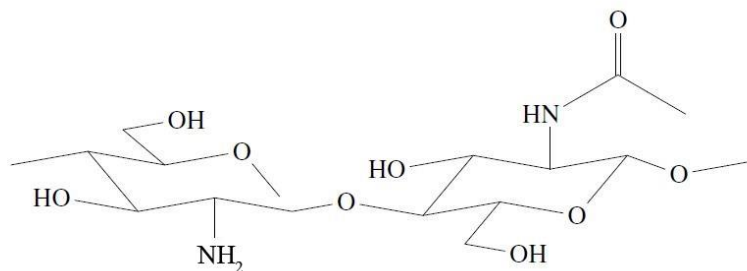
2.3.2. Polimeri

Polimeri imaju veoma važnu ulogu u procesu formiranja kompozitnih biomaterijala, jer omogućavaju dizajniranje materijala prilagođenih postavljenim zahtevima u medicini. Formiranjem kompozita, moguće je uticati na povećanje biokompatibilnosti, poboljšanje mehaničkih svojstava, obezbeđivanje biološke funkcionalnosti istovremeno omogućavajući kontrolu razgradljivosti. Zbog tih karakteristika, oni su ključni u razvoju novih biomaterijala i obuhvataju oblasti kao što su inženjerstvo tkiva [55,56], veštačka koža [57,58], stomatologija [59,60], kontrolisano oslobađanje lekova [61,62], ortopedski uređaji [63–65] i kardiovaskularna hirurgija [66,67]. Polimeri se koriste kao matrica u kojoj se mogu inkorporirati različiti materijali (hidroksiapatit, vlakna, antibiotici...) u cilju poboljšanja funkcionalnosti implantata.

Polimeri koji se koriste u proizvodnji biomaterijala mogu biti prirodni ili sintetički [54]. Najznačajniji sintetički polimeri su: polilaktidna kiselina (PLA, za kožne i koštane implantate, u sistemima za isporuku lekova, u proizvodnji materijala za 3D štampanje implantata) [68], poliglikolna kiselina (PGA, za implantate mekih tkiva, kao resorptivni šavovi u hirurgiji) [69], poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA, u implantatima, kao nosači lekova, za medicinske šavove, za tretman regeneracije kostiju i mekih tkiva) [70,71], poli-kaprolakton (PCL, u implantatima za regeneraciju kostiju, medicinskim prevlakama, implantatima za meka tkiva) [72], polipropilen (PP, u proizvodnji medicinskih implantata, protetici, za hirurške šavove) [73], poli(metil metakrilat) (PMMA, u dentalnim i oftalmološkim implantatima, protezama), prevlakama za medicinske uređaje) [74], poli(vinil-alkohol) (PVA, fleksibilan, biokompatibilan i biorazgradiv polimer sa visokom zateznom čvrstoćom) [75].

Prirodni polimeri se mogu koristiti kod regeneracije tkiva, za izradu implantata, prekrivanja rana i u farmaceutskoj industriji [76,77]. Najznačajniji prirodni polimeri koji se primenjuju u biomaterijalima su: kolagen (za tretman rana, u implantatima za regeneraciju kostiju, u kozmetici) [78], hijaluronska kiselina (u regeneraciji kože, medicinskim implantatima, oftalmologiji) [79], kazein (u biokompozitima za izradu biomaterijala, implantata, nosač lekova), hitozan (u gelovima za zarastanje rana, hidrogelovima kao nosači lekova, u biokompozitima za regeneraciju kostiju i mekih tkiva), alginat (gelovi za zarastanje rana, nosač lekova, u bioaktivnim implantatima za regeneraciju kostiju) [80], lignin (antioksidativna i antibakterijska svojstva, biokompatibilnost) [81,82], skrob (u implantatima za regeneraciju tkiva, nosač lekova, materijal za kapsule lekova) [83], celuloza (u medicinskim implantatima, gelovima za zarastanje rana, kao pomoćni materijal u tabletama) [84].

Hitozan (CS) je prirodni polisaharid koji se dobija iz najrasprostranjenijeg prirodnog polimera hitina (osnovni strukturni materijal u spoljnim skeletima morskih organizama, kod insekata). Deacetilovani oblik hitina, hitozan, može se dobiti hemijskom ili enzimskom hidrolizom [85–87]. Hitozan je kopolimer sastavljen od β -1,4-2-amino-2-deoksi- β -D-glukoze (deacetilovani D-glukozamin) i N-acetil-D-glukozamin jedinice.[88] Na slici 2. predstavljena je strukturna formula hitozana.



Slika 2. Strukturna formula hitozana

Hitozan je netoksičan, bez mirisa, biokompatibilan i biorazgradiv do neškodljivih proizvoda (amino šećera) koji se potpuno apsorbuju u telu, što ga čini izuzetnim kandidatom za primenu u vidu nosača lekova, proteina/peptida, faktora rasta, vakcina kao i u genskoj terapiji [89–91]. Imajući u vidu da je hitozan polimer prirodnog porekla, bezbedan za ljudsku upotrebu, biokompoziti na bazi hitozana imaju prednost u odnosu na kompozite sa sintetičkim polimerima. Pored toga, hitozan ima hidrofилnu površinu koja podstiče ćelijsku adheziju i proliferaciju. U literaturi su prikazani rezultati koji potvrđuju sposobnost hitozana da ubrzava lečenje rana u kliničkim slučajevima [92]. Hitozan i njegovi derivati ispoljavaju antiinflamatorna, antibakterijska, antitumorska, antifungalna, hemostatska i analgetska svojstva. Brojni eksperimenti su pokazali izvanredan antibakterijski efekat hitozana prema širokom spektru bakterija [90].

U inženjerstvu koštanog tkiva, hitozan se može koristiti za dobijanje trodimenzionalnih skafolda sa različitom strukturom pora koje promoviraju proliferaciju koštanih ćelija i doprinose formiranju mineralizovane matrice kostiju. Veoma je pogodan za izradu skafolda jer se razgrađuje uporedo sa formiranjem novog tkiva bez pojave inflamatornih reakcija ili toksičnih produkata [87].

2.3.3. Grafen

Grafen je alotropska modifikacija ugljenika i može se definisati kao monosloj ugljenika u strukturi grafita. Ovaj monosloj je sastavljen od sp^2 -hibridizovanih atoma ugljenika, između kojih se uspostavljaju veze dužine 0,142 nm i gusto spakovanih u rešetku strukture saća, formirajući dvodimenzioni kristal [93]. Grafen i njegovi derivati se mogu primeniti u inženjerstvu koštanog tkiva, za obnavljanje koštanog tkiva i reparaciju većih koštanih defekata. U literaturi, [93] je pokazano, da grafen, derivati grafena kao i neki kompozitni materijali sa grafenom pokazuju antibakterijsku aktivnost, netoksični su za ljudske osteoblaste i predstavljaju pogodne materijale za adheziju i proliferaciju osteoblasta, kao i za mineralizaciju apatita [94,95]. Antibakterijska aktivnost prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim vrstama bakterija je potvrđena u brojnim studijama [96,97].

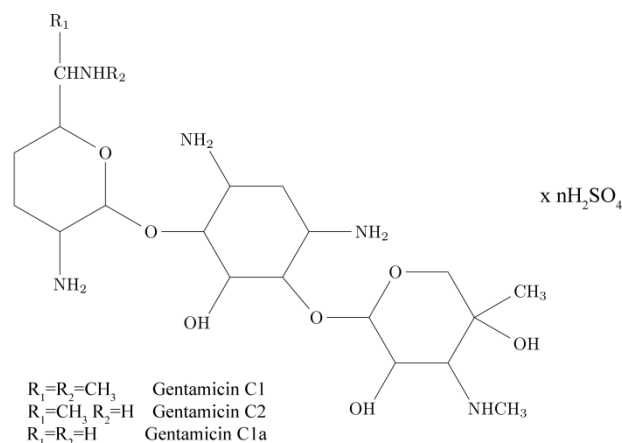
U biokompozitnim materijalima, grafen se može primeniti kod tretmana rana i regeneracije tkiva (u biosenzorima ili kao podloga za rast ćelija, jer omogućavaju povećanje adhezije ćelija), za implantate i proteze (zbog dobrih mehaničkih svojstava povećava izdržljivost i vek trajanja). Takođe, zbog svoje hemijske inertnosti i prisustva slobodnih p elektrona, grafen predstavlja perspektivni materijal koji se može primeniti kao nosač lekova [94,98,99].

Primena grafena kao punioca u kompozitnim materijalima sa hidroksiapatitom i polimerima može da indukuje povećanu sposobnost formiranja kosti, povećanu specifičnu površinu, da neutrališe negativno površinsko naelektrisanje privlačeći jone kalcijuma iz okolnog rastvora doprinoseći formiranju novog sloja koji po strukturi odgovara koštanom apatitu, kao i dobru citokompatibilnost [100].

2.3.4 Antibiotici

Infekcije koje se potencijalno mogu javiti nakon ugradnje koštanih implantata u oblasti ortopedije i stomatologije značajno utiču na ukupan ishod operacije i mogu čak dovesti do odbacivanja implantata i potrebe za ponovnim hirurškim zahvatom. Lečenje ovih infekcija zahteva primenu antibiotika, a odabir antibiotika zavisi od vrste patogena. Neki od najčešćih uzročnika infekcija su *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitivne bakterije), *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* i *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativne bakterije), kao i stafilokoke, streptokoke i enterokoke. Lečenje ovih infekcija uključuje primenu različitih vrsta antibiotika, u zavisnosti od vrste patogena i jačine infekcije. Poznato je da se u kliničkoj praksi primenjuju sledeći antibiotici: cefazolin, vankomicin, daptomicin, rifampicin, penicilin, ampicilin, gentamicin, ciprofloksacin, tobramicin, fluorohinoloni [14,15]. Ukupno, terapija može trajati i tri meseca.

Gentamicin je efikasan antibiotik iz aminoglikozidne grupe dobijen iz vrste bakterije (aktinomicete) *Micromonospora purpurea* i predstavlja mešavinu tri glavne komponente nazvane gentamicin C1, C1a i C2. Na slici 3. je prikazana strukturna formula gentamicin-sulfata.



Slika 3. Strukturna formula gentamicin-sulfata

Ove tri komponente su strukturno veoma slične i poseduju sličnu antibiotsku aktivnost. Pretpostavlja se da se antibakterijski mehanizam aminoglikozidnih antibiotika zasniva na inhibiciji sinteze proteina usled pogrešnog očitavanja informacija na iRNK. Antibiotik se vezuje za 30S subjedinicu ribozoma bakterijske ćelije što dovodi do pogrešnog očitavanja podataka na iRNK [101]. Postoje tri glavne faze antibakterijskog dejstva i ulaska aminoglikozida u ćelije. Prvu fazu predstavlja “jonsko vezivanje” do kog dolazi kada se polikatjonski aminoglikozidi elektrostatički vežu za negativno naelektrisane sastojke citoplazmatične membrane bakterijskih ćelija, i to za tejihoičnu kiselinu i fosfolipide unutar citoplazmatične membrane Gram-pozitivnih bakterija i lipopolisaharide i fosfolipide unutar spoljne membrane Gram-negativnih bakterija [102,103]. Ovo vezivanje dovodi do povećanja propustljivosti citoplazmatične membrane i ulaska aminoglikozida u ćelije. Druga faza je “energetski zavisna faza I” koja podrazumeva ulazak aminoglikozida u citoplazmu, oslanjajući se na proton-motornu silu i koja omogućava da samo ograničena količina aminoglikozida dospe do 30S ribozomalne subjedinice gde remeti proces translacije proteina i narušava citoplazmatičnu membranu. Poslednja faza je “energetski zavisna fazi II” gde dolazi do uništavanja bakterija u zavisnosti od koncentracije antibiotika. U ovoj fazi dolazi do ubrzanog nagomilavanja aminoglikozida u ćelijama i “ubrzavanja” pogrešnog čitanja iRNK što sve dovodi do inhibicije sinteze proteina. Ovo ukazuje da aminoglikozidi ostvaruju antibakterijski efekat na dva načina: neposredno – narušavanjem citoplazmatične membrane i odloženim efektima – inhibicijom sinteze proteina [104,105].

Postoji više načina za sprečavanje pojave infekcija nakon implantacije od kojih je najefikasnija inhibicija bakterijske adhezije. Tokom sistemske primene antibiotika, zahtevaju se visoke doze antibiotika što može imati štetne efekte na jetru i bubrege. Stoga su savremena istraživanja usmerena na razvijanje mogućnosti za ciljanim oslobađanjem antibiotika i delovanje lekova na željenim mestima bez izazivanja toksičnih efekata i uz značajno smanjenje primenjenih doza leka [4,106–110].

Gentamicin je jedan od najčešće primenjivanih aminoglikozidnih antibiotika zbog širokog spektra antibakterijske aktivnosti, povoljne cene i dostupnosti [4,108,111]. Takođe, gentamicin pokazuje antibakterijsku efikasnost i prema Gram-pozitivnim i prema Gram-negativnim vrstama bakterija, ali je veća efikasnost uočena u slučaju teških infekcija izazvanih Gram-negativnim vrstama bakterija poput *Pseudomonas aeruginosa*. Iako je gentamicin antibiotik koji je dugo u upotrebi u kliničkoj praksi, on može da izazove nekoliko neželjenih efekata poput nefrotoksičnosti i ototoksičnosti zbog čega njegova upotreba može biti ograničena.

Gentamicin se uspešno može inkorporirati u različite matrice – uključujući biokeramiku, polimerne matrice i hidrogelove – što omogućava kontrolisano oslobađanje leka na mestu implantacije. Ovakvi kompoziti obezbeđuju lokalizovanu antibakterijsku aktivnost, smanjujući potrebu za sistemskom primenom antibiotika čime se utiče na pojavu rezistencije i nuspojava. Poseban značaj imaju kompoziti na bazi bioaktivnog stakla, kalcijum-fosfata i grafenskih derivata,

koji u kombinaciji sa gentamicinom omogućavaju istovremenu antibakterijsku zaštitu i osteokonduktivnost, što je ključno za uspešnu ugradnju implantata u koštano tkivo [40,91,112–114].

2.4. Elektroforetsko taloženje

Elektroforetsko taloženje (eng. *Electrophoretic deposition*, EPD) omogućava taloženje metala, metalnih oksida, keramike, polimera, proteina, lekova kao i njihovih kombinacija u vidu različitih kompozitnih materijala [90]. Čelija za elektroforetsko taloženje se obično sastoji od dve elektrode, radne i pomoćne elektrode uronjene u suspenziju iz koje se vrši taloženje, i može da ima kao izvor napajanja jednosmernu (DC) ili naizmerničnu struju (AC). Taloženje se vrši iz suspenzija, u kojima pod dejstvom električnog polja dolazi do migracije naelektrisanih čestica ka suprotno naelektrisanom supstratu. Taloženje se odvija u dve faze: 1) elektroforeza – formiranje i migracija naelektrisanih čestica u suspenziji ka suprotno naelektrisanom elektrodi primenom električnog polja i 2) taloženje naelektrisanih vrsta na suprotno naelektrisanom elektrodi usled koagulacije čestica. Elektroforetsko taloženje može da bude katodno (taloženje pozitivnih čestica na negativno naelektrisanom elektrodi – katodi) i anodno (taloženje negativno naelektrisanih čestica na pozitivno naelektrisanom elektrodi – anodi). Kataforetsko taloženje je pogodniji postupak od anodnog taloženja jer ne dovodi do rastvaranja metalnog supstrata (samim tim omogućava dobijanje kvalitetnije prevlake) i izdvojeni vodonik ne stupa u reakciju sa prevlakom na katodi [115–118]. Elektroforetsko taloženje je u velikoj meri našlo primenu u oblasti biomaterijala, za dobijanje kompozitnih prevlaka za koštane implantate. Velika prednost u odnosu na ostale metode dobijanja prevlaka kao što su plazma-sprej tehnika, toplo izostatsko presovanje, hemijsko taloženje pod hidrotermalnim uslovima, taloženje jonskim snopom, taloženje iz parne faze, sol-gel postupak, pulsno lasersko taloženje i drugi, jeste mogućnost taloženja na supstratima različitog oblika uključujući i kompleksne oblike, taloženje na sobnoj temperaturi, kao i mogućnost kontrole debljine i morfologije istaloženih prevlaka variranjem i optimizacijom parametara taloženja (vreme i napon taloženja, sastav suspenzije i mnogi drugi) [119,120]. Elektroforetsko taloženje predstavlja veoma pogodnu metodu za formiranje prevlaka koje se mogu koristiti kao nosači terapijskih agenasa. Ova metoda omogućava taloženje i osetljivih lekova iz razblaženih vodenih suspenzija na sobnoj temperaturi, što je posebno važno za očuvanje njihove bioaktivnosti. Kao matrice za isporuku terapijskih agenasa putem elektroforetskog taloženja najčešće se koriste biopolimeri, keramički materijali i ugljenični nanomaterijali, zahvaljujući njihovim povoljnim fizičko-hemijskim svojstvima [90].

Terapijski agensi mogu da se inkorporiraju u prevlake postupkom elektroforetskog taloženja na tri načina; 1) istovremenim taloženjem u jednom koraku aktivne supstance i matrice prevlake, 2) prethodnim korakom inkorporacije aktivne supstance u mikronosače, praćeno taloženjem kompleksa, 3) naknadnom inkorporacijom aktivne supstance na prethodno istaložene prevlake. Istovremeno taloženje i prethodna inkorporacija se mnogo češće primenjuju od naknadnih modifikacija formirane prevlake [41].

Otpuštanje terapijskih agenasa iz kompozitnih prevlaka dobijenih elektroforetskim taloženjem odvija se u tri faze [121]. Prva faza je „naglo“ otpuštanje leka i odnosi se na oslobađanje slabo vezanih lekova sa površine prevlake. Ovaj efekat nastaje usled gradijenta koncentracije koji izaziva prisustvo antibakterijskog agensa u prevlaci. Tako je u slučaju prevlake hitozana sa inkorporiranim antibiotikom vankomicinom, dobijenih elektroforetskim taloženjem, primećeno difuzijom kontrolisano „naglo“ otpuštanje leka u početnom periodu koje je direktno proporcionalno gradijentu koncentracije usled fizičkog vezivanja vankomicina za matricu hitozana. Otpuštanje je inicirano difuzijom polarnih molekula vode u prostor između lanaca hitozana, dovodeći do raskidanja vodoničnih veza između polimera i vezanog leka [41]. Drugu fazu otpuštanja antibakterijskih agenasa karakteriše sporo i kontrolisano otpuštanje, određeno difuzijom leka iz unutrašnjosti prevlake kao i

razlaganjem same polimerne matrice, dok se u trećoj fazi brzina otpuštanja antibakterijskog agensa značajno smanjuje [41].

2.5. Kompozitne prevlake na bazi hidroksiapatita i polimernih komponenti

Hidroksiapatit je krta materijal koji mora da se kombinuje sa drugim materijalima, najčešće sa polimerima u cilju poboljšanja mehaničkih i adhezivnih svojstava koji neće uticati na njegovu biokompatibilnost i bioaktivnost za potencijalnu primenu u oblasti biomaterijala. Sintetički ili prirodni polimeri se često koriste u inženjerstvu koštanog tkiva kako bi unapredili i kontrolisali poroznost i stepen degradacije kompozitnih prevlaka, kao i stepen oslobađanja antibiotika. [122,123]. Prednosti njihove primene u rekonstruktivnoj hirurgiji, bilo u nativnom obliku ili u vidu kompozitnih materijala, su brojne.

Poli(laktid-ko-glikolid), PLGA, u kombinaciji sa hitozanom ispitivan je za primenu u vidu prevlake za oblaganje stentova [70], dok je u kombinaciji sa hidroksiapatitom i antibiotikom atorvastatinom pronašao primenu u inženjerstvu koštanog tkiva [71]. Poli(glikolna kiselina), PGA, u formi kompozita sa hidroksiapatitom poboljšava diferencijaciju osteoblasta i formiranje mineralizovane koštane matrice nakon implantacije [69]. Kompozitni materijal na bazi polietar-eterketona, PEEK, hidroksiapatita i hitozana u vidu trokomponentne prevlake, pokazao je odlične rezultate antibakterijske aktivnosti prema *E. coli* i *S. aureus* [124]. U slučaju poli(mlečne kiseline) (biokompatibilnog, biorazgradivog polimera, visokog modula elastičnosti) uočeno je da dodatak hidroksiapatita značajno poboljšava mehanička svojstva kompozita [125,126]. Dispergovanjem nanočestica hidroksiapatita i mikrokristalne celuloze u matrici poli-L-mlečne kiseline je uspešno sintetisan nanokompozit sa strukturom i mehaničkim svojstvima sličnim trabekularnoj kosti [127]. Poli(vinil-alkohol) je biokompatibilan i biorazgradiv polimer sa visokom zateznom čvrstoćom. U kombinaciji sa hitozanom formira nanovlaknastu matricu pogodnu za inkorporaciju hidroksiapatita, oponašajući ekstracelularni matriks kosti. Pokazano je da PVA/hitozan/HAP skafold u obliku nanovlakana omogućava prijanjanje i proliferaciju osteoblasta [75].

Jedan od najčešće primenjivanih sintetičkih polimera u oblasti inženjerstva koštanog tkiva i stomatologiji je poli(metil-metakrilat), PMMA, – akrilni materijal koji se ima odlične mehaničke karakteristike. Dodavanjem hidroksiapatita u PMMA matricu dobijen je kompozitni materijal veće gustine i bolje mehaničke otpornosti [74].

Prilikom dizajniranja materijala u inženjerstvu tkiva veoma je važno „imitirati“ svojstva i funkcije prirodnih tkiva. Iz tog razloga su prirodni polimeri kao što su kolagen, fibrinogen, hijaluronska kiselina, elastin, alginat, hondroitin-sulfat, lignin i hitozan, našli veliku primenu u izradi materijala za regeneraciju tkiva [76]. Njihova efikasnost u inženjerstvu tkiva ogleda se u sposobnosti da budu prepoznati od strane ćelija domaćina, zahvaljujući specifičnim aminokiselinskim sekvencama [77]. Pored toga, ovi polimeri mogu indukovati zarastanje i integraciju tkiva odnosno podsticati migraciju, proliferaciju i diferencijaciju ćelija [77]. Na primer, fibrinogen, glavna glikoproteinska komponenta plazme koja učestvuje u koagulaciji, ima ključnu ulogu u adheziji, širenju i agregaciji ćelija. Dodatkom fibrinogena nanočesticama hidroksiapatita poboljšava se adhezija ćelija [128].

Kombinovanjem alginata i želatina dobijeni su skafoldi u kojima je naknadnom mikroenkapsulacijom hidroksiapatita dobijen materijal koji je poslužio kao osnova za osteogenu diferencijaciju i proliferaciju ćelija [129]. Hondroitin-sulfat je poznat po sposobnosti da podstiče proliferaciju ćelija i poseduje antitrombogene svojstva. Kombinacijom hondroitin-sulfata i kolagena moguće je dobiti vaskularni skafold sa antitrombotičnom i endotelizacionom funkcijom [130].

Usled izvanrednih karakteristika, hitozan često predstavlja dobar materijal za regeneraciju mekih i tvrdih tkiva, kao nosač lekova, ili kao deo kompozitnih prevlaka na površini metalnih

implantata [90,131,132], zbog izvanrednih svojstava: biokompatibilnosti [64], biorazgradivosti [133], antibakterijske aktivnosti [134,135] i velikog potencijala za primenu u sistemima za isporuku lekova [136,137]. Nakon implantacije, hidrofilna površina hitozana ima sposobnost da poboljša proliferaciju, adheziju i diferencijaciju ćelija. Dodatno, u *in vivo* uslovima je pokazano da neki enzimi (uglavnom lizozimi) razgrađuju hitozan do neškodljivih oligosaharida [138]. Kao nosač leka u ortopedskim implantatima, hitozan omogućava lokalnu primenu antibiotika pri čemu se postiže odličan terapijski efekat uz nižu ukupnu dozu leka. Pored toga što ima sposobnost da indukuje ćelijsku adheziju, diferencijaciju i proliferaciju podržavajući oporavak tkiva, hitozan je jedini polisaharid koji je u kiselj sredini u obliku polikatjona što omogućava njegovu primenu u vidu pH-zavisnih nosača lekova i koji se pokazao kao efikasno sredstvo za transport odnosno isporuku lekova i terapijski aktivnih molekula koji poboljšavaju antibakterijska svojstva kompozitnih materijala [139].

Kompozitne prevlake na bazi hitozana i hidroksiapatita pokazuju izuzetnu biokompatibilnost, što je potvrđeno formiranjem novog sloja hidroksiapatita nakon samo 7 dana potapanja u simuliranu telesnu tečnost (eng. *Simulated Body Fluid*, SBF) [140]. Zbog pomenutih dobrih svojstava, hitozan zauzima važno mesto u oblasti sinteze biomaterijala zahvaljujući i izuzetnoj sposobnosti formiranja filmova [90,141]. Kao katjonski polisaharid, hitozan se uspešno koristi u procesu elektroforetskog taloženja – jednoj od najperspektivnijih metoda za dobijanje bioaktivnih prevlaka [140,142–144]. Hitozan bi, kao komponenta kompozitnih prevlaka, trebalo da doprinese poboljšanju adhezije prevlaka za supstrat, da poboljša mehanička svojstva hidroksiapatita i da ima ulogu matrice za vezivanje, a zatim i kontrolisano otpuštanje lekova [9,90].

Primena sintetičkih biomaterijala u velikoj meri zavisi od mehaničkih svojstava materijala, od sastava, poroznosti, bioaktivnosti, toksičnosti i mnogih drugih. Elektroforetsko taloženje, kao metoda za dobijanje prevlaka na metalnom supstratu, ima niz prednosti kao što su: taloženje u jednom koraku iz višekomponentnog sistema, kao i mogućnost kontrole uniformnosti, morfologije i debljine prevlaka variranjem parametara taloženja. Elektroforetsko taloženje je uspešno primenjeno za dobijanje čistih ili kompozitnih HAP/CS/Gr prevlaka na metalnom supstratu. Tokom poslednje decenije, interesovanje za primenu elektroforetskog taloženja za dobijanje kompozitnih prevlaka je značajno poraslo [145–150]. Glavna prednost elektroforetskog taloženja u poređenju sa drugim metodama jeste mogućnost taloženja kompozitnih prevlaka u jednom koraku iz višekomponentnih suspenzija na sobnoj temperaturi [140,151–153].

Prilikom implantacije postoji mogućnost pojave infekcije i formiranja biofilma što dovodi do ozbiljnih komplikacija i potencijalnog odbacivanja implantata. Obećavajući, u poslednje vreme sve češće korišćen pristup u borbi protiv infekcija nakon implantacije, formiranja biofilma i adhezije bakterijskih ćelija, temelji se na dizajniranju metalnih implantata sa inkorporiranim antibakterijskim agensima koji se kontrolisano otpuštaju. Da bi se postigao što efikasniji antibakterijski efekat, koriste se različiti agensi koji se mogu podeliti na organske (biljni ekstrakti, antibiotici i drugi prirodni materijali) i neorganske agense (grafenski materijali, metalne nanočestice, bioaktivna stakla i drugi neorganski materijali) [39]. Neorganski i ugljenični materijali kao antibakterijski agensi i njihova primena u dizajniranju/proizvodnji antibakterijskih medicinskih sredstava je zasnovana na izraženoj antibakterijskoj aktivnosti prema širokom spektru bakterijskih sojeva, naročito Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama.

Ugljenični materijali, poput grafena i njegovih derivata su izazvali veliko interesovanje istraživača za primenu u oblasti biomaterijala zbog izraženih mehaničkih svojstava, velike specifične površine koja omogućava njihovu primenu u vidu nosača različitih aktivnih komponenti, ali i zbog antibakterijskog efekta [77]. Elektroforetskim taloženjem se u vidu prevlaka, mogu nanositi redukovani grafen oksid (RGO) i oksid grafena (GO) [115].

Kompozitne prevlake sa antibiotikom dobijene postupkom elektroforetskog taloženja su privukle dosta pažnje u nedavnim studijama kada su vankomicin [154,155], ciprofloksacin [5,156], ampicilin [157], levofloksacin [157], tetraciklin [158,159], doksiciklin [160,161] i gentamicin [107,108,110,111] tetraciklina i/ili ibuprofena, deksametazona i ampicilina [5,106,107,111] uspešno uključeni u kompozite za kontrolisanu isporuku lekova.

Izbor antibiotika je veoma važan i u prevenciji i u tretmanu bakterijskih infekcija. Značajno smanjenje broja bakterijskih ćelija (meticilin-osetljivih sojeva *S.aureus* – MSSA i meticilin-rezistentnih sojeva *S.aureus* – MRSA) na kostima i implantatima se može postići primenom implantata sa inkorporiranim antibioticima. Prilikom izbora antibiotika za koštane implantate, gentamicin se pokazao kao dobar izbor, jer se već koristi u kliničkoj praksi za lečenje ortopedskih infekcija izazvanih meticilin-osetljivim sojevima *S.aureus* (MSSA) i jer je termostabilan. Gentamicin pokazuje efikasnost u kratkom vremenskom periodu, a njegova aktivnost zavisi od upotrebjene koncentracije. Dodatkom gentamicina u kompozitne prevlake omogućio bi se brz terapijski efekat na mestu infekcije odnosno implantacije i zaobišli bi se neželjeni efekti poput ototoksičnosti do koje dolazi usled sistemske primene antibiotika.

Primenom elektroforetskog taloženja, gentamicin je uspešno inkorporiran u prevlaku hitozan/želatin na Ti6Al4V i hitozan/želatin/silika na hirurškom čeliku, zatim vankomicin kao deo prevlaka hitozan/želatin, hitozan/bioaktivno staklo, fibroin svile, fibroin svile/trikalcijum-fosfat, titan-dioksid nanotube na titanskom supstratu. Takođe, Bigham i saradnici su uspešno elektroforetskim taloženjem dobili mezoporoznu prevlaku magnezijum-silikata na titanu [39].

U uporednom ispitivanju prevlaka karbonatnog hidroksiapatita na titanskim implantima sa različitim antibioticima (amoksicilin, cefalotin, vankomicin, karbenicilin, tobramicin, gentamicin i cefamandol) primećeni su različiti modeli oslobađanja agenasa i antibakterijske aktivnosti u zavisnosti od hemijske strukture primenjenog antibiotika [113]. Uočeno je da su se tobramicin i gentamicin, koji ne sadrže karboksilne grupe, brzo oslobađali, dok je cefalotin bio čvrsto vezan u prevlaci i postepeno se otpuštao u dugom vremenskom periodu uz postizanje jakog antibakterijskog efekta prema *S. aureus*.

Kada je ampicilin dodat u kompozitnu prevlaku hitozana dobijenu elektroforetskim taloženjem na titanskoj podlozi, primećeno je da se lek oslobađao kontinuirano tokom 28 dana, bez efekta „naglog“ otpuštanja na samom početku, i uz podstaknuti efekat adhezije i proliferacije pre-osteoblastnih ćelija (MC3T3-E1) na površini prevlake [162]. Levofloksacin je takođe, uspešno inkorporiran tehnikom EPD sloj-po-sloj [163]. U sličnim studijama, titanski implantati su modifikovani nanošenjem polimerizovanog poli(di(etilenglikol) metil eter metakrilata) sa temperaturno kontrolisanim otpuštanjem levofloksacina, pri čemu su koncentracije antibiotika dostigle vrednosti za minimalnu inhibitornu koncentraciju za *S. aureus* ATCC 13709 u neposrednoj blizini površine implantata [164]. Elektroforetskim taloženjem su dobijene prevlake hidroksiapatita sa inkorporiranim gentamicin-sulfatom i ciprofloksacinom [5], koje su pokazale poboljšanu bioaktivnost usled taloženja jona iz SBF rastvora, slično biomineralizaciji u *in vitro* uslovima. Ove prevlake su istovremeno pokazale jaku antibakterijsku aktivnost prema vrsti bakterije *Pseudomonas aeruginosa*.

Primenom elektroforetskog taloženja dobijene su prevlake na bazi grafen-oksida i hitozana (GO/CS) sa inkorporiranim vankomicinom, i pokazano je da ove bioaktivne prevlake imaju sposobnost da otpuštaju lek, a pokazan je povećan sadržaj antibiotika u prevlaci kao rezultat prisustva GO nanoslojeva u polimernoj matrici [165]. Otpuštanje leka bilo je brzo u početku, dok je zatim usledilo sporije otpuštanje tokom 4 nedelje. Antibakterijsko dejstvo je ispitano prema *S. aureus*, pri čemu je utvrđeno da koncentraciju antibiotika $>0,5$ g/L nije preživela nijedna ćelija bakterije. Citotoksičnost prevlaka testirana je na humanoj liniji osteosarkoma, kada je pokazano da zavisi od koncentracije GO komponente.

Postoji više načina za inkorporaciju antibakterijskih agenasa u kompozitne prevlake primenom elektroforetskog taloženja:

- mešanje i direktno zajedničko taloženje agensa sa polimernom matricom,
- hemijska imobilizacija agensa na suspendovanim česticama pre EPD procesa,
- inkorporacija agensa u nosačima koji mogu da obezbede kontrolisano otpuštanje poput nanocevi titan-dioksida, mezoporoznih nanočestica na bazi silicijum-dioksida, polimernih čestica, nanocevi halozita ili magnetnih nanočestica koje se zatim istovremeno talože sa ostalim komponentama prevlake,
- kao i postupak nanošenja višeslojnih prevlaka primenom nekoliko uzastopnih EPD ciklusa.

Primenom elektroforetskog taloženja moguće je sintetisati različite kompozitne, višeslojne prevlake sa različitim inkorporiranim aktivnim komponentama poput grafena, metalnih nanočestica, antibiotika i ostalih molekula koje omogućavaju istovremeno otpuštanje antibakterijskih komponenti i zaštitu od infekcija. Ovakav pristup se zasniva na sinergističkom ili aditivnom efektu više bioaktivnih i antibakterijskih agenasa koji ima za cilj da se smanji koncentracija pojedinačnih komponentata i njihov citotoksični efekat uz istovremeno postizanje adekvatne antibakterijske zaštite od infekcija [77,166].

Kako bi se omogućio razvoj prevlaka sa kontrolisanim i dugotrajnim profilima otpuštanja aktivnih komponentata istraživanja su se usmerila ka razvoju prevlaka sa aktivnim komponentama do čijeg otpuštanja dolazi aktiviranjem nekim spoljašnjim faktorom:

- specifični fiziološki uslovi (određena pH vrednost, temperatura, prisustvo nekog metabolita koje luče bakterije)
- spoljni faktori ili stimuli – električni, magnetni, fototermalni, primena UV zračenja.

Primer ovakvih sistema može da predstavlja elektroforetski taložen fotosenzitivni oktaedarski kompleksni molekul molibdena sposoban da obrazuje singletni kiseonik $O_2(^1\Delta g)$ na staklene pločice prekrivene indijum–kalaj oksidom. Ovo je prvi primer molekularnih slojeva fotosenzitivatora koji su u stanju da foto-inaktiviraju (svetlom talasne dužine 460 nm) bakterijske biofilme i koji su pokazali da kontinuirano zračenje slojeva doprinosi uklanjanju zrelih biofilmova Gram-pozitivnih vrsta bakterija *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis*, kao i Gram-negativnih vrsta bakterija *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* [167]. Još jedan primer ovakvih sistema je predstavljen od strane Wanga i saradnika [168] gde je nakon osvetljavanja vidljivom svetlošću na površini prevlaka od mezoporoznog grafitnog azotida ugljenika došlo do smanjenja broja živih ćelija bakterija na 3% kod vrsta *Pseudomonas aeruginosa* i 10% kod vrsta *Staphylococcus aureus*.

Tao i saradnici [168] su elektroforetskim taloženjem dobili prevlake nanočestičnog zeolitnog imidazolnog okvira - 8 (ZIF-8) sa inkorporiranim antibiotikom levofloksacinom na titanu (prethodno funkcionalizovan kolagenom), a zatim su višeslojni filmovi želatina i hitozana naneti tehnikom "spin coating". Na ovaj način postignut je jak dvostruki antibakterijski efekat ovih prevlaka prema *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* – prvi efekat je uočen nakon inicijalnog otpuštanja antibiotika i jona cinka i drugi, posledični efekat nastao formiranjem alkalnog mikrookruženja koje je dodatno narušilo metaboličke funkcije ispitivanih vrsta bakterija, a koje je izazvala pH-zavisna razgradnja ZIF-8. Međutim, i ovakvi sistemi pokazuju niz nedostataka poput razgradnje organskih komponentata pod dejstvom zračenja, nepoželjno (pozadinsko) oslobađanje, kao i nedovoljno eluiranje aktivnih komponentata.

U oblasti antibakterijskih prevlaka namenjenih za medicinske primene razvijene su i kontaktno-baktericidne prevlake koje su dobijene direktnim vezivanjem nekih katjonskih supstanci poput hitozana, antimikrobnih katjonskih peptida (AMP) ili enzima (AME) ili kvaternernih amonijum-jona na površinu supstrata [169]. Hitozan je najčešće ispitivani i primenjivani katjonski polimer, naročito za dobijanje prevlaka primenom elektroforetskog taloženja. Antibakterijski efekat ovakvih sistema zasniva se najčešće na privlačenju putem elektrostatičkih interakcija, negativno naelektrisanih površina bakterijskih ćelija od strane pozitivno naelektrisanih molekula (na primer, hitozan) što izaziva pucanje citoplazmatične membrane, curenja ćelijskog sadržaja i time inhibicije esencijalnih hranljivih materija neophodnih za rast i razmnožavanje ćelija bakterija [90,169]. Ionescu i saradnici [170] su koristili *ex vivo* mikrobiološki model kako bi dokazali antibakterijska svojstva nanočestica hitozana. Oni su ispunili zubni korenski kanal suspenzijom hitozanskih nanočestica i primenili napon između dve elektrode postavljene u korenu i parodontalnom ligamentu, kako bi izvršili dezinfekciju.

Za razliku od “aktivnih” prevlaka postoje i “pasivne” antibakterijske prevlake koje imaju za cilj da smanje početno prijanjanje ćelija na površinu implantata. Ovo se može postići, primenom elektroforetskog taloženja, formiranjem superhidrofobnih kompozitnih prevlaka koristeći materijale niske površinske energije [65,84,85].

Primenom elektroforetskog taloženja, na površini nerđajućeg čelika su dobijene superhidrofobne prevlake na bazi hitozana koje sadrže mikro-nanostrukture titan-fosfata (TiP) nalik cvetovima. Poređenjem rezultata antibakterijske aktivnosti za hitozan-TiP prevlaku na nerđajućem čeliku i rezultata za netretiranu površinu nerđajućeg čelika uočen je 10 puta manji broj vezanih ćelija vrste bakterije *E.coli*. Međutim, izmenjena topografija površine prevlaka često ne omogućava dugoročnu zaštitu od formiranja biofilma, i sposobnost adhezije ćelija bakterija u velikoj meri zavisi od same bakterije i od njenog broja ćelija. U tabeli 3 je prikazan kratak pregled nekih materijala (prevlaka) za koštane implantate sa dodatkom antibakterijskog agensa (antibiotika), kao i supstrata i metoda kojom su ti materijali dobijeni.

Tabela 3. Pregled kompozitnih materijala za koštane implantate sa dodatkom antibakterijskog agensa

Redni broj	Sistem	Metoda dobijanja	Supstrat	REF
1.	hitozan/želatin/bioaktivno staklo sa inkorporiranim gentamicinom	EPD	nerđajući čelik	[107]
2.	celuloza/alginat/bioaktivno staklo/gentamicin	EPD	Nanovlakna celuloze	[171]
3.	hitozan/želatin-silika-gentamicin/bioaktivno staklo	EPD	titan, nerđajući čelik	[110]
4.	hitozan/želatin/gentamicin	EPD	3D-odštampani porozni titan	[40]
5.	nanocevi halozita/hitozan sa inkorporiranim gentamicinom	EPD	titan	[111]
6.	hitozan/želatin/silika-gentamicin	EPD	nerđajući čelik	[4]
7.	fibroin svile/gentamicin	EPD	3D-odštampani CoCrMo skafoldi	[106]
8.	gentamicin/hidroksiapatit	EPD	titan	[5]

9.	kalcijum-fosfat/hitozan-gentamicin sa inkorporiranim karbonskim nanocevima	EPD	AZ91D legura magnezijuma	[109]
10.	hitozan/bioaktivno staklo/gentamicin	EPD	nerđajući čelik	[108]
11.	nHAP/polivinil-alkohol/ciprofloksacin	EPD	Ti-6Al-4V	[156]
12.	Vankomicin/TiO ₂ nanotube	EPD, potapanje + anodizacija Ti	Ti-6Al-4V	[172]
13.	Vankomicin/hitozan/nanočestice bioaktivnog stakla	Metoda nakapavanja	Ti	[173]
14.	Gentamicin/hitozan/želatin/silika nanočestice	EPD	316LSS	[4]
15.	Gentamicin/hitozan/želatin/silika nanočestice/bioaktivno staklo	Sprej tehnika + EPD	316LSS	[174]
16.	Vankomicin/protein svile	EPD	Ti	[10]
17.	Vankomicin/hitozan/želatin Gentamicin/hitozan/želatin	EPD	Ti-6Al-4V	[40]
18.	Vankomicin/svila/trikalcijum-fosfat	EPD	Ti	[175]
19.	Apatit/kolagen/vankomicin	EPD anodizacija	Ti TiO ₂ nanotube	[176]
20.	Vankomicin/hitozan/nanotube halozita	EPD	Ti	[177]
21.	Tetraciklin hidrohlorid/hitozan/bioaktivno staklo/nanotube halozita	EPD	Ti	[178]

2.5.1. Bioaktivnost kompozitnih prevlaka u simuliranim *in vitro* uslovima

Simulirane telesne tečnosti su uglavnom rastvori formulisani u cilju oponašanja hemijskog sastava i svojstava različitih telesnih tečnosti. Pokazuju veliki potencijal u istraživanju i testiranju u medicinske svrhe gde stvarne telesne tečnosti možda nisu praktične ili etičke za korišćenje. U svim ovim slučajevima, simulirane telesne tečnosti obezbeđuju sprovođenje testova bioaktivnosti u kontrolisanoj i standardizovanoj sredini. Ovi testovi mogu pomoći da se utvrdi kako materijal ili supstanca stupa u interakciju sa biološkim sistemima, bilo da promovise adheziju ćelija, inhibira rast ćelija bakterija, potpomaže rast kostiju ili bilo koje drugo specifično bioaktivno ponašanje.

Simulirana telesna tečnost je razvijena u cilju simulacije neorganskog sastava ljudske krvne plazme i prvenstveno je namenjen za ispitivanje bioaktivnosti materijala predviđenih za regeneraciju koštanog tkiva, kao što su biokeramika i ortopedski implantati. Sastav simulirane telesne tečnosti blisko oponaša sastav ljudske krvne plazme odnosno koncentraciju jona i pH vrednost plazme. Sadrži jone kao što su kalcijum, fosfat, natrijum, kalijum, magnezijum i bikarbonat, koji su ključni za formiranje hidroksiapatita, mineralne komponente kostiju. Bioaktivnost ispitivanog biomaterijala se procenjuje njegovim potapanjem u SBF i posmatranjem da li tokom vremena na njegovoj površini dolazi do formiranja sloja sličnog hidroksiapatitu. Sposobnost materijala da formira novi sloj hidroksiapatita ukazuje na njegov potencijal za integraciju sa koštanim tkivom.

Postoje brojne studije o testiranju bioaktivnosti primenom simulirane telesne tečnosti. Ove studije su često usmerene na procenu sposobnosti materijala da indukuju formiranje hidroksiapatitnog sloja na svojoj površini, oponašajući prirodni proces mineralizacije koji se javlja u koštanom tkivu. Kokubo i Takadama su testirali bioaktivnost potapanjem materijala u SBF i praćenjem sposobnosti formiranja hidroksiapatita na površini materijala. Takođe, testirani su i drugi materijali kao staklo-keramika i pokazano je da postoji mogućnost formiranja sloja apatita nalik koštanom apatitu, pokazujući njihov potencijal za upotrebu kao zamena za kosti [179,180]. Rezultati ispitivanja bioaktivnost titanskih implantata u simuliranoj telesnoj tečnosti je prvi put ispitana od strane Kima i saradnika [181] i pokazano je da je površina titanskih implantata nakon potapanja u simuliranu telesnu tečnost prekrivena slojem novoformiranog hidroksiapatita, ukazujući na potencijal implantata da se veže za koštano tkivo. Ispitivana je i bioaktivnog silikatnog stakla [182] potapanjem u simuliranu telesnu tečnost i uočen je rast sloja hidroksiapatita na površini stakla nakon potapanja što ukazuje na potencijal ovog materijala za primenu u medicini. U istraživanjima Bose i saradnika [183], bioaktivnost 3D skafolda na bazi kalcijum-fosfata je takođe potvrđena rastom hidroksiapatita nakon potapanja u simuliranu telesnu tečnost i konstatovan je pozitivan uticaj 3D arhitekture na razvijanje bioaktivnosti. Visok potencijal u vidu rasta novog sloja hidroksiapatita i vezivanja sa koštanim tkivom su pokazala i ispitivanja koštanih cementa [184] i mezoporoznog bioaktivnog stakla [112] u simuliranoj telesnoj tečnosti. Primena simulirane telesne tečnosti je standardni pristup za procenu bioaktivnosti i potencijalne biokompatibilnosti širokog spektra materijala i medicinskih uređaja namenjenih za regeneraciju koštanog tkiva i druge biomedicinske primene.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je sinteza i karakterizacija novih antibakterijskih, biokompatibilnih hidroksiapatit/hitozan (HAP/CS) i hidroksiapatit/hitozan/grafen (HAP/CS/Gr) kompozitnih prevlaka sa i bez dodatka gentamicina na titanu postupkom elektroforetskog taloženja iz stabilnih vodenih suspenzija.

Detaljna karakterizacija dobijenih prevlaka biće izvršena primenom sledećih metoda:

- rendgenskom difrakcionom analizom (XRD), za određivanje faznog sastava i strukture HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaka,
- infracrvenom spektroskopijom sa Furijeovom (Fourier) transformacijom u ATR modu (ATR-FT-IR), za određivanje prisutnih funkcionalnih grupa i vrste veze između hidroksiapatita, hitozana i gentamicina,
- Ramanovom spektroskopijom za ispitivanje strukture dobijenih prevlaka i prisustva grafena,
- skenirajućom elektronskom mikroskopijom sa energetsom disperzionom spektroskopijom (SEM-EDS), za ispitivanje mikrostrukture i morfologije prevlaka
- rendgenskom fotoelektronskom spektroskopijom (XPS), za ispitivanje hemijskog sastava i strukture površine prevlaka,
- termogravimetrijskom analizom (TGA), za određivanje termičke stabilnosti dobijenih prevlaka,
- tečnom hromatografijom visokih performansi sa masenim detektorom (HPLC-MS) za praćenje kinetike otpuštanja gentamicina u dejonizovanoj vodi na 37 °C tokom 21-og dana i fitovanjem dobijenih profila različitim kinetičkim i difuzionim modelima,
- metodom spektroskopije elektrohemijske impedancije i metodom polarizacionih krivih (PDS) u simuliranoj telesnoj tečnosti na 37 °C tokom 28 dana za ispitivanje biomineralizacije i korozijske stabilnosti dobijenih prevlaka.
- *In vitro* ispitivanjem sposobnosti biomineralizacije potapanjem prevlaka u rastvor simulirane telesne tečnosti i ispitivanje novoastalog sloja apatita metodama XRD, FT-IR i FE-SEM
- praćenjem kinetike bakterijskog rasta i agar-difuzionim testom prema bakterijskim sojevima *Staphylococcus aureus* TL i *Escherichia coli* ATCC 25922 za ispitivanje antibakterijske aktivnosti prevlaka,
- MTT i DET testom prema ćelijskim linijama humanih (MRC-5) i mišjih (L929) fibroblasta u cilju ispitivanja citotoksičnosti prevlaka
- testom alkalne fosfataze (ALP), za ispitivanje aktivnosti osteoblasta u prisustvu prevlaka, i mogućnosti mineralizacije odnosno formiranja novog sloja kostiju.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

4.1. Materijali

U postupku elektroforetskog taloženja HAP/CS i HAP/CS/Gr prevlaka sa i bez gentamicina korišćeni su: hidroksiapatit (nanoprah, veličina čestica <200 nm, Sigma-Aldrich, SAD), hitozan (prah, stepen deacetilacije 75-85 %, srednja molarna masa (MW=190-310 kDa), Sigma-Aldrich, SAD), grafen (nanoprah, čistoća 99,2 %, Graphene Supermarket, SAD) i gentamicin-sulfat (vodeni rastvor, BioReagent, 50 mg/ml u dejonizovanoj vodi, Sigma-Aldrich, SAD), bez daljeg prečišćavanja. Kao supstrat za taloženje korišćena je titanska folija (debljine 0,25 mm, 99,7 % čistoće, Sigma Aldrich, SAD).

Za ispitivanje antibakterijske aktivnosti prevlaka korišćeni su: KH_2PO_4 (Centrohem, Srbija), K_2HPO_4 , NaCl (Sigma Aldrich, SAD), tripton, agar, ekstrakt kvasca, hranljivi bujon (Institut za virusologiju, vakcine i serume "Torlak", Srbija) kao i Gram-negativni bakterijski soj *Escherichia coli* ATCC 25922 (referentni soj, eng. *American Type Culture Collection*, ATCC, SAD) i Gram-pozitivni bakterijski soj *Staphylococcus aureus* TL (Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Katedra za Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, laboratorija za industrijsku mikrobiologiju). Citotoksičnost prevlaka je ispitana MTT i DET testom prema ćelijskim linijama humanih plućnih MRC-5 (ATCC[®] CCI-171TM) i mišjih L929 (ATCC[®] CRL-6364TM) fibroblasta. Eksperimentalna procedura se sastojala od uzgajanja i ispitivanja dobijenih ćelijskih kultura uz korišćenje sledećih hemikalija: MTT tetrazolijumova so, medijum DMEM (eng. *Dulbecco Modified Eagle's Medium*), EDTA, fetalni teleći serum i rastvor antibiotika i antimikotika (Sigma Aldrich, SAD). Za pripremu svih rastvora korišćena je ultra-čista dejonizovana voda (18 M Ω , Millipore, SAD).

4.1.1. Priprema vodenih suspenzija hidroksiapatit/hitozan i hidroksiapatit/hitozan/grafen sa i bez dodatka gentamicina

Hidroksiapatit/hitozan (HAP/CS) suspenzija je pripremljena rastvaranjem praha hitozana (0,05 mas.%) u 1,0 vol.% vodenom rastvoru sirćetne kiseline uz intenzivno mešanje na magnetnoj mešalici i ultrazvučnom kupatilu u osam uzastopnih ciklusa, gde je svaki korak trajao po 15 minuta i zatim postepenim dodavanjem nanopraha HAP-a (1,0 mas.%) uz intenzivno mešanje kao u slučaju hitozana. pH vrednost suspenzije je iznosila 4,40. Vodena suspenzija hidroksiapatit/hitozan/grafen (HAP/CS/Gr) je pripremljena tako što je u suspenziju HAP/CS (pripremljenu kao što je opisano) dodat grafen (0,01 mas.%), koji je prethodno dispergovan u vodi u 25 ml dejonizovane vode u 5 ciklusa homogenizovanja na ultrazvučnom kupatilu i magnetnoj mešalici (5 x 15 min) svaki korak.

U ovako pripremljene i homogenizovane HAP/CS i HAP/CS/Gr suspenzije postepeno je dodavan rastvor gentamicin-sulfata (0,01 mas.%) uz intenzivno mešanje na magnetnoj mešalici i ultrazvučnom kupatilu u cilju dobijanja stabilnih, vodenih HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent suspenzija. U cilju stabilizacije, suspenzija sa gentamicinom je ostavljena u na 4 °C frižideru 5 dana da stari, pre taloženja.

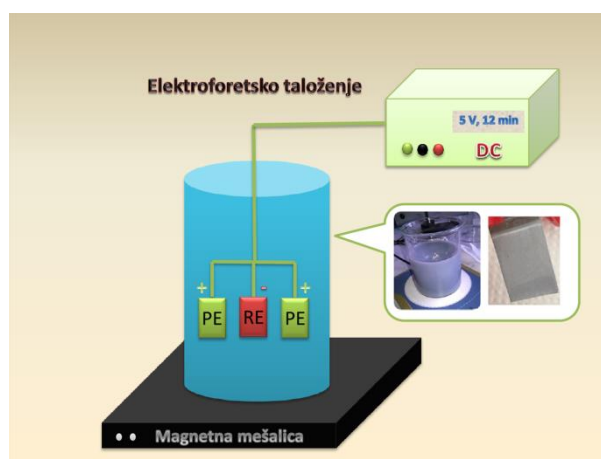
4.1.2. Priprema površine titana za taloženje hidroksiapatit/hitozan i hidroksiapatit/hitozan/grafen sa i bez dodatka gentamicina

Površina Ti pločica, dimenzija 20 mm x 10 mm x 0,25 mm je pre postupka elektroforetskog taloženja podvrgnuta mehaničkom tretmanu – poliranju sa grubim 800, a potom sa finim 1200 brusnim papirom, nakon čega je mokro ispolirana aluminom (0,3 μm). Priprema površine Ti pločica je podrazumevala i sukcesivno odmašćivanje u acetonu (5 min) i etanolu (15 min) u ultrazvučnom kupatilu. Pločice su držane u etanolu do početka eksperimenta.

4.1.3. Elektroforetsko taloženje hidroksiapatit/hitozan i hidroksiapatit/hitozan/grafen prevlaka sa i bez dodatka gentamicina iz vodenih suspenzija na površini titana

Za taloženje prevlaka korišćen je uređaj ELECTROPHORESIS POWER SUPPLY EV231 (PEQLAB, Erlangen, Germany). Na slici 4 prikazana je šema ćelije za elektroforetsko taloženje HAP/CS, HAP/CS/Gr, HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka. Ćelija se sastojala od radne elektrode, katode, (Ti pločica (20 x 15 x 0.25 mm) koja je korišćena kao supstrat za taloženje prevlaka i dve pomoćne elektrode, anode, (Pt pločice, 10 x 10 mm) postavljene paralelno na rastojanju od 1,5 cm u odnosu na radnu elektrodu, kao pomoćne elektrode, uz konstantno mešanje suspenzije magnetnom mešalicom. Dobijene prevlake osušene su na sobnoj temperaturi tokom 24 h. Određena je masa dobijenih prevlaka kao razlika u masi katoda (Ti pločica) pre i posle taloženja.

Uslovi kataforetskog taloženja su optimizovani variranjem vrednosti napona u opsegu od 1-10 V i vremena taloženja od 5-15 min, na sobnoj temperaturi. Najbolji rezultati su dobijeni pri naponu od 5 V za vreme taloženja od 12 min (optimalni uslovi taloženja). Dobijene prevlake su sušene na sobnoj temperaturi tokom 24h.



Slika 4. Šema aparature za kataforetsko taloženje (RE-radna elektroda, PE-pomoćna elektroda, DC-izvor struje)

4.2. Fizičko-hemijska karakterizacija kompozitnih prevlaka

4.2.1. Rendgenska difrakciona analiza (XRD)

Fazni sastav prevlaka određen je metodom rendgenske difrakcione analize (eng. *X-ray diffraction*, XRD). Uzorci su analizirani na rendgenskom difraktometru marke Philips PW 1710 (Netherlands). Intenzitet difraktovanog $\text{CuK}\alpha$ zračenja ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) je meren na sobnoj temperaturi, metodom skeniranja u opsegu $2\theta = 10\text{-}70^\circ$ u intervalima $0,05^\circ$ i vremenu od 1 s. Detektovane faze analizirane su korišćenjem softvera PowderCell [185].

4.2.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom (Fourier) transformacijom – FT-IR

Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (eng. *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*, FT-IR) korišćena je u režimu totalne refleksije (eng. *Attenuated Total Reflection*, ATR) na spektrofotometru Nicolet iS50 Thermo Fisher Scientific (SAD). Skeniranje je izvršeno u oblasti talasnih brojeva $400\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$ sa spektralnom rezolucijom od 4 cm^{-1} .

4.2.3. Ramanova spektroskopija

Ramanovi spektri (eng. *Raman spectroscopy*) uzoraka sa grafenom su snimljeni pomoću instrumenta Invia Raman spectrophotometer Renishaw plc (UK) sa argonovim laserom kao izvorom monohromatske svetlosti talasne dužine 514 nm u režimu intenziteta 10 % od ukupne snage i sa spektralnom rezolucijom od 3500 cm^{-1} do 100 cm^{-1} .

4.2.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija sa energetsom disperzionom spektroskopijom (SEM-EDS)

Morfologija površine HAP/CS, HAP/CS/Gr, HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka, dobijenih elektroforetskim taloženjem analizirana je skenirajućom elektronskom mikroskopijom sa emisijom polja (eng. *Field Emission Scanning Electron Microscopy with Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy*, FE-SEM/EDS) na instrumentu LEO SUPRA 55 (Carl Zeiss AG, Nemačka), sa In-Lens detektorom u kombinovanom modu SE-BSE pri naponu ubrzanja od 10 kV.

4.2.5. Rendgenska fotoelektronska spektroskopija (XPS)

K-Alpha System (Thermo Electron, SAD) sa mikro-fokusiranim monohromatorom i primenom $\text{AlK}\alpha$ radijacije X-zraka od 1486,6 eV je korišćen za rendgensku fotoelektronsku spektroskopiju (eng. *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*, XPS) prevlaka.

4.2.6. Termogravimetrijska analiza (TGA)

Termička stabilnost dobijenih prevlaka je ispitana termogravimetrijskom analizom (eng. *Thermogravimetric Analysis*, TGA) na instrumentu TGA Q5000 IR/SDT Q600 (TA Instruments, SAD). Ispitivanje je izvršeno u opsegu temperatura od 30–1000 °C, pri kontinualnom protoku N_2 (50 ml/min), sa brzinom zagrevanja od 20 °C/min. Diferenciranjem eksperimentalnih krivih TGA za odgovarajuće temperaturne oblasti pomoću softvera OriginPro 8.5 (OriginLab Corp., SAD) dobijene su odgovarajuće diferencijalne termogravimetrijske krive (eng. *Differential Thermogravimetric Analysis*, DTG).

4.3. Ispitivanje sposobnosti biomineralizacije hidroksiapatit/hitozan i hidroksiapatit/hitozan/grafen prevlaka sa i bez dodatka gentamicina

4.3.1. Ispitivanje biomineralizacije u *in vitro* uslovima

Sposobnost biomineralizacije HAP/CS, HAP/CS/Gr, HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka u *in vitro* uslovima ispitivana je potapanjem prevlaka u 20 ml rastvora simulirane telesne tečnosti na 37 °C tokom 7 dana, uz promenu rastvora svakih 24 h. Nakon 7 dana izlaganja SBF-u, prevlake su osušene na sobnoj temperaturi i ispitane metodama XRD, FT-IR i FE-SEM.

4.3.1.1. Priprema simulirane telesne tečnosti

Sposobnost biomineralizacije HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaka u *in vitro* uslovima ispitana je potapanjem prevlaka u 20 ml rastvora SBF na 37 °C. Sastav simulirane telesne tečnosti je naveden u tabeli 4. Sve hemikalije su prethodno sušene na 50 °C u trajanju od 2 h. Vrednost pH dobijenog rastvora je 7,4.

Tabela 4. Sastav simulirane telesne tečnosti

Reagensi	$c / \text{g dm}^{-3}$
NaCl	7,996
NaHCO ₃	0,350
KCl	0,224
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,228
MgCl ₂ ·2H ₂ O	0,305
CaCl ₂	0,278
Na ₂ SO ₄	0,071
(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	6,057
1M HCl	40 mL

Nakon sedam dana potapanja u SBF, HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlake su osušene na sobnoj temperaturi. Prevlake su dalje ispitivane i okarakterisane primenom rendgenske difrakcione analize, infracrvenom spektroskopijom sa Furijeovom transformacijom u ATR modu, i skenirajućom elektronskom mikroskopijom sa energetsom disperzionom spektroskopijom.

4.3.2. Ispitivanje sposobnosti biomineralizacije prevlaka nakon potapanja u SBF

Sposobnost biomineralizacije prevlaka je ispitana metodom spektroskopije elektrohemijske impedancije (SEI) i metodom polarizacionih krivih (eng. *Potentiodynamic Polarization Scanning*, PDS). Elektrohemijska merenja su vršena tokom 28 dana izlaganja istaloženih prevlaka simuliranoj telesnoj tečnosti na 37 °C. Ispitivani su uzorci titanske folije dimenzija (30 x 20 x 0,25 mm) sa elektroforetski istaloženim prevlakama HAP/CS, HAP/CS/Gr, HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent i njihovo ponašanje u SBF-u.

Spektroskopija elektrohemijske impedancije (SEI) je korišćena za ispitivanje korozione stabilnosti HAP/CS, HAP/CS/Gr, HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka na titanu tokom 28 dana u SBF rastvoru na temperaturi od 37 °C. Površina uzorka izložena rastvoru SBF-a iznosila je 1 cm². Čelija za elektrohemijska merenja je sačinjena od tri elektrode, gde je kao radna elektroda korišćena je pločica titana, referentna elektroda je zasićena kalomelova elektroda (ZKE), dok je platinska mrežica sa većom površinom od ispitivane korišćena kao pomoćna elektroda sistema. Ispitivanja su vršena pomoću instrumenta GAMRY Reference 600TM potenciostat/galvanostat/ZRA (Gamry Instruments, SAD), a rezultati su obrađeni uz pomoć Gamry Instruments Echem Analyst softvera, verzija 5,50. Svakom eksperimentu je prethodilo praćenje potencijala otvorenog kola sve dok nije postignuta stabilnost od 0,01 mV/s. Elektrohemijska impedancija je merena na širokom opsegu frekvencija (od 300 kHz do 10 mHz), na potencijalu otvorenog kola i pri amplitudi napona naizmenične struje od 5 mV. Polarizaciona merenja su vršena pri opsegu napona jednosmerne struje od ±600 mV, pri brzini promene potencijala od 0,5 mV/s.

4.4. Ispitivanje profila otpuštanja gentamicina

4.4.1. Određivanje koncentracije otpuštenog gentamicina tečnom hromatografijom visokih performansi u sprezi sa UV spektroskopijom

Za praćenje koncentracije otpuštenog gentamicina u dejonizovanoj vodi tokom određenog vremenskog perioda (21 dan) korišćena je metoda tečne hromatografije visokih performansi u sprezi sa UV-spektroskopijom (eng. *High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Ultraviolet Detection*, HPLC-UV).

U cilju određivanja ukupne količine inkorporiranog gentamicina, ispitivana prevlaka je uklonjena sa supstrata, a dobijeni prah resuspendovan u dejonizovanoj vodi (dH₂O). Pre HPLC analize, gentamicin je podvrgnut derivatizaciji. Reagens za derivatizaciju pripremljen je rastvaranjem 130 mg o-ftalaldehida u 0,5 ml metanola, uz dodatak 3,8 ml boratnog pufera (pH 10,4) i 290 µl 2-merkaptetanola. Dobijeni rastvor je homogenizovan i razblažen boratnim puferom do ukupne zapremine od 5 ml. Pripremljeni derivatizacioni reagens je stabilan 2 do 3 dana.

Uzorci HAP/CS/Gent (pripremljeni u triplicatu) rekonstituisani su u 100 µl dejonizovane vode i homogenizovani ultrazvučnom agitacijom. Zatim je svakom uzorku dodato po 40 µl derivatizacionog reagensa i 120 µl 2-propanola. Derivatizacija je sprovedena inkubacijom u ultrazvučnom kupatilu na 50 °C tokom 15 minuta, nakon čega su uzorci filtrirani kroz membranski filter i preneseni u HPLC bočice.

Hromatografska separacija izvedena je na HPLC sistemu Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, SAD) opremljenom automatskim uzorkivačem. Uzorci su analizirani korišćenjem Chromolith RP-18 kolone dimenzija 100 mm × 4,6 mm, veličine čestica 2 µm (Merck, Nemačka). Mobilna faza se sastojala od glacialne sirćetne kiseline, prečišćene vode i metanola u zapreminskom odnosu 5:25:70, uz dodatak 0,5% natrijum oktansulfonata. Protok mobilne faze bio je 1,3 ml/min, a temperatura kolone održavana na 20 °C. Detekcija derivatizovanog gentamicina vršena je na talasnoj dužini od 330 nm, uz ukupno vreme analize od 15 minuta.

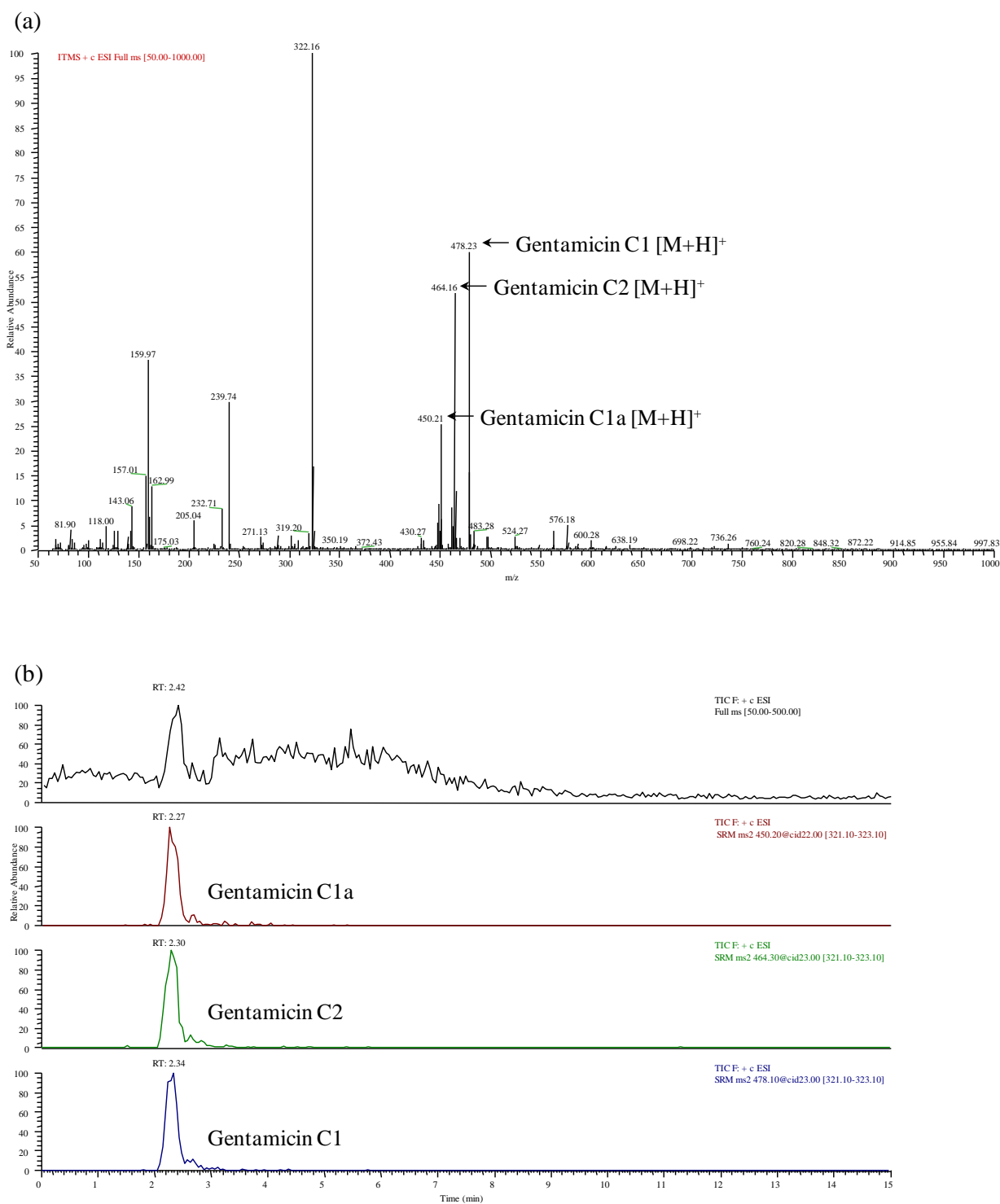
4.4.2. Određivanje koncentracije otpuštenog gentamicina tečnom hromatografijom visokih performansi u sprezi sa masenom spektrometrijom

Ukupna količina gentamicina i odgovarajući profili otpuštanja su ispitani i metodom tečne hromatografije visokih performansi u sprezi sa MS-spektrometrijom (eng. *High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectroscopy*, HPLC-MS), zbog veće osetljivosti MS detektora i mogućnosti detekcije nižih koncentracija leka u prevlakama. U cilju simuliranja fizioloških uslova u organizmu, kinetika otpuštanja gentamicina je praćena u dejonizovanoj vodi (1 ml) na 37 °C, tokom 1, 2, 7, 14 i 21 dana. Koncentracija otpuštenog gentamicina iz HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka je određena metodom tečne hromatografije visokih performansi u sprezi sa masenom spektrometrijom (HPLC-MS). Za maseno-spektrometrijsku analizu korišćen je Surveyor HPLC sistem (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) u sprezi sa LCQ Advantage (Thermo Fisher Scientific) jonskim trapom, kao masenim spektrometrom. Razdvajanje analita izvršeno je na Zorbax Eclipse® XDB-C18 reverzno-faznoj koloni (Agilent Technologies, SAD), dimenzija: 4,6 mm × 75 mm × 3,5 µm. Ispred kolone postavljena je predkolona, dimenzija 4,6 mm × 12,5 mm × 5 µm. Korišćena je mobilna faza koja se sastojala od metanola, dejonizovane vode i 10 % rastvora sirćetne kiseline. Sva merenja su vršena u triplicatu. Optimalno hromatografsko razdvajanje gentamicina postignuto je korišćenjem gradijenta mobilne faze prikazanog u tabeli 5.

Tabela 5. Optimalni HPLC-MS parametri za detekciju i kvantitativno određivanje gentamicina: optimalni gradijent mobilne faze i reakcije kvantifikacije sa optimizovanim kolizionim energijama (KE)

	HPLC					MS		
	Vreme (min)	Protok (ml min ⁻¹)	CH ₃ OH (%)	H ₂ O (%)	10% CH ₃ COOH (%)	Prekursor jon (m/z)	Reakcija kvantifikacije	KE (%)
	Zorbax Eclipse® XDB-C18 kolona							
Gentamicin C1a	0,00	0,3	50	49	1	450[M+H] ⁺	450→322	22
	3,00	0,3	50	49	1			
Gentamicin C2	3,01	0,5	0	100	0	464[M+H] ⁺	464→322	23
	8,00	0,5	0	100	0			
Gentamicin C1	8,01	0,3	50	49	1	478[M+H] ⁺	478→322	23
	15,00	0,3	50	49	1			

Maseni spektri gentamicina su snimljeni u opsegu m/z 50–1000, uz korišćenje elektrosprej jonizacije (slika 5a). Za detektovanje gentamicina optimizovani su radni parametri jonskog izvora: temperatura kapilare (290 °C), protok glavnog gasa (22 au), protok pomoćnog gasa (8 au) i napon izvora 4,5 kV. Najintenzivniji joni u MS spektru su dalje fragmentisani, uz optimizaciju energije sudara za dobijanje najintenzivnijeg i najstabilnijeg fragmentnog jona. Za prekursor jone odabrani su protonovani molekuli analita [M+H]⁺. Na osnovu rezultata MSn analize, izabrane su karakteristične reakcije fragmentacije za kvantitativno određivanje gentamicina u uzorcima (tabela 5, slika 5b).



Slika 5. Maseni spektar gentamicina (a) i maseni hromatogrami gentamicina dobijeni analizom uzorka HAP/CS/Gent nakon otpuštanja gentamicina tokom 7 dana (b)

Eksperimentalni podaci su fitovani korišćenjem dva kinetička modela u cilju ispitivanja mehanizma otpuštanja gentamicina i izračunavanja koeficijenta difuzije gentamicina iz prevlaka.

4.5. Biološka karakterizacija prevlaka

4.5.1. Antibakterijska aktivnost

Antibakterijska aktivnost HAP/CS, HAP/CS/Gr, HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka ispitivana je prema Gram-pozitivnom, patogenom bakterijskom soju *Staphylococcus aureus* TL i Gram-negativnom bakterijskom soju *Escherichia coli* ATCC 25922 agar difuzionom metodom i praćenjem kinetike antibakterijske aktivnosti.

4.5.1.1. Agar difuziona metoda

Prevlake na Ti su prvo sterilisane u autoklavu (30 minuta na 121 °C), a zatim nakon hlađenja nanete na površinu hranljivog top agara (0,7 % agara) prethodno zasejanog sa razblaženom prekonocnom kulturom ispitivanih sojeva (*Staphylococcus aureus* TL i *Escherichia coli* ATCC 25922). Ukratko, sloj otopljenog hranljivog top agara temperature oko 55 °C zasejan je sa razblaženom prekonocnom kulturom ispitivanih sojeva (ne starija više od 18h), kako bi ukupan broj ćelija u podlozi bio u opsegu 10^5 - 10^6 CFU/ml (CFU- Colony Forming Unit). Po zasejavanju, hranljivi top agar je izliven u sterilnu Petri šolju preko sloja hranljivog agara (1,5 % agara) debljine ~4 mm.

Nakon očvršćavanja sloja hranljivog top agara, na njegovu površinu su poređani uzorci prevlaka HAP/CS, HAP/CS/Gr, HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent na titanu (oko 10 mg materijala) i pripremljene Petri šolje su inkubirane 24h na 37 °C. Antibakterijska aktivnost ispitivanih prevlaka potvrđena je obrazovanjem zone inhibicije, čije su dimenzije izmerene i upoređene sa efikasnošću čistog rastvora gentamicin-sulfata (1 mg/ml), koji je u eksperimentu korišćen kao kontrola.

4.5.1.2. Ispitivanje kinetike antibakterijske aktivnosti

Ispitivanje kinetike antibakterijske aktivnosti omogućava kvantitativno praćenje promene broja ćelija ispitivanih vrsta bakterija u suspenziji tokom 24h inkubacije. Razblažena prekonocna bakterijska kultura (ne starija više od 18h) je dodata u epruvete sa 7 ml sterilnog fosfatnog pufera u kome su se nalazili prethodno u autoklavu sterilisani ispitivani uzorci prevlaka (15 mg prevlaka na titanskim pločicama, tretirano 30 minuta na 121 °C) kako bi početni broj ćelija u suspenziji bio između 10^4 i 10^6 CFU ml⁻¹. Svi uzorci su inkubirani u termostatu 24h, na 37 °C bez mešanja. Kao kontrola, korišćena je ista zapremina sterilnog rastvora fosfatnog pufera bez ispitivanih uzoraka, zasejana sa istim početnim brojem ćelija testiranih sojeva bakterija. Broj ćelija u suspenzijama uzoraka određivan je na samom početku eksperimenta (0h) i nakon 1h, 3h i 24h inkubacije. U odabranim vremenskim intervalim iz suspenzija je uzimano po 100 µl uzorka, koji su po potrebi dalje razblaživani (10^2 , 10^4), da bi se u njima odredio broj živih ćelija. Nakon razblaživanja uzoraka, po 100 µl odgovarajućeg razblaženja preneto je u sterilnu Petri šolju, preliveno sa otopljenim LB agarom temperature oko 55 °C, a zatim sadržaj promešan, da bi se ćelije bakterija što bolje rasporedile u dodatoj zapremini podloge. Petri šolje su inkubirane 24h u termostatu na 37 °C, nakon čega su prebrojane formirane kolonije, a dobijeni rezultati su izraženi kao CFU/ml.

4.5.2. Citotoksičnost

U cilju testiranja biokompatibilnosti HAP/CS, HAP/CS/Gr, HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka u *in vitro* uslovima, korišćene su dve različite linije ćelija fibroblasta (L929 i MRC-5). L929 (ATCC CRL-636) je ćelijska linija mišjeg porekla, dok je MRC-5 (ATCC CCL-171) humana fibroblastna ćelijska linija. Ćelije su kultivisane u Dulbekovom modifikovanom Iglovom medijumu (DMEM) sa 4,5 % glukoze, suplementiranom sa 10 % fetalnog telećeg seruma (Sigma, SAD) i antibiotikom-antimikotikom (Sigma, SAD). Sve ćelijske linije su kultivisane u flaskonima površine 25 cm² (Costar, Corning Inc, SAD) na 37 °C u atmosferi sa 100 % vlažnosti i 5 % CO₂. Tokom eksperimenta korišćene su eksponencijalno rastuće ćelije (vijabilnost > 90 %).

4.5.2.1. Test odbacivanja boje (DET)

Gustina ćelija (broj ćelija po jedinici zapremine) i procenat preživelih (vijabilnih) ćelija je praćen korišćenjem testa odbacivanja boje 0,1 % tripan plavo. Vijabilne ćelije su zasejane u Petri šoljama (Costar) u koncentraciji od 10^5 /ml. Kontrolni uzorci su sadržali samo ćelije, bez uzoraka (prevlaka). Petri šolje sa uzorcima i zasejanim ćelijama su ostavljene u termostatu na $37\text{ }^\circ\text{C}$ u atmosferi sa 100 % vlažnosti i 5 % CO_2 , tokom narednih 48 h. Nakon završetka inkubacije, ćelije su razdvojene tripsinizacijom (dodatkom tripsina). Broj i vijabilnost ćelija su određeni korišćenjem metode odbacivanja boje 0,1 % tripan plavo. Tako dobijena suspenzija ćelija je razblažena pomoću 0,1 % rastvora boje tripan plavo, a zatim je izlivena u Neuerbauerovu komoru-hemocitometar, nakon čega su vijabilne (nebojane) i mrtve (ojojane plavo) ćelije direktno izbrojane pomoću invertnog mikroskopa. Inhibicija rasta je izražena kao procenat kontrole, po formuli:

$$K=(N_s/N_k) \times 100 \%, \quad (1)$$

gde je N_k ukupan broj ćelija uzorka, a N_s je broj ćelija u ispitivanom uzorku.

4.5.2.2. MTT

Inhibicija rasta je procenjena korišćenjem kolorimetrijskog MTT testa (Sigma, SAD). Metoda se zasniva na redukciji 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid soli (MTT), žute boje i rastvorne u vodi do ružičastog formazana koji je nerastvoran u vodi pod uticajem mitohondrijalnih dehidrogenaza u vijabilnim ćelijama. Test je izvršen tako što su vijabilne ćelije zasejavane u posudama za ćelijske kulture sa 12 otvora ravnog dna Costar (Corning Inc., SAD) u koncentraciji od 10^5 /ml. Kontrolni uzorci su sadržali samo ćelije. Zasejane ćelijske linije su inkubirane 48 h na $37\text{ }^\circ\text{C}$ u atmosferi vazduha sa 100 % vlažnosti i 5 % CO_2 . Nakon inkubacije, ćelije su odvojene od uzoraka tripsinizacijom. Prikupljane su samo ćelije u eksponencijalnom rastu (vijabilne ćelije), i zasejane u mikrotitar ploče sa 96 bunara Costar (Corning Inc., SAD) pri optimalnoj gustini zasejanja od $5 \cdot 10^3$ ćelija po bunaru, kako bi se osigurao logaritamski rast broja ćelija tokom perioda testiranja. Vijabilne ćelije su zasejane u 100 μl zapremine po bunaru, u kompletnom medijumu na $37\text{ }^\circ\text{C}$ tokom 48 h. Tri sata pre završetka perioda inkubacije svim bunarima je dodato 10 μl rastvora MTT. U cilju sterilizacije i uklanjanja male količine nerastvornih ostataka, MTT je rastvoren u medijumu na 5 mg/ml i filtriran. Nakon toga je proizvod, formazan, rastvoren u 100 μl 0,04 M HCl u izopropanolu. Vijabilnost ćelija je utvrđena na spektrofotometarskom čitaču za mikrotitar ploče (Multiscan MCC340, Thermo Labsystems, Finska) na talasnim dužinama 540/690 nm. Bunari sa medijumom i dodatim MTT, bez ćelija su korišćeni kao kontrola [186]. Inhibicija rasta je određena pomoću formule:

$$S(\%) = \frac{A_{\text{test}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (2)$$

Kod izračunavanja preživljavanja ćelija (S), A_{test} je vrednost apsorbancije ispitivanog uzorka sa ćelijama a A_{control} je apsorbancija kontrole.

4.5.3. Aktivnost alkalne fosfataze

Kolorimetrijska procena oslobađanja alkalne fosfataze (ALP) u praćenim ćelijskim linijama (L929 i MRC-5) izvršena je korišćenjem kompleta za detekciju ALP (Abcamov komplet za testiranje alkalne fosfataze) prema uputstvima proizvođača. Test je ponovljen 3 puta da bi se osigurala reproduktivnost testa. Apsorbancija rastvora je merena na 405 nm koristeći bioanalizator.

Kit Abcam's Alkaline Phosphatase Assai Kit (Colorimetric) (ab83369) [187] je vrlo osetljiv, jednostavan, direktan i HTS-spreman kolorimetrijski test zasnovan na merenju aktivnosti alkalne

fosfataze (ALP) u serumu i biološkim uzorcima. Kit koristi p-nitrofenil fosfat (pNPP) kao supstrat fosfataze koji postaje žut ($\lambda_{\text{max}} = 405 \text{ nm}$) kada se defosforiliše pomoću ALP-a.

4.5.4. Statistička analiza

Statistička analiza je izvršena metodom analize varijanse (ANOVA), praćene post-hoc testom višestrukog poređenja, kako bi se utvrdile razlike između pojedinačnih uzoraka.

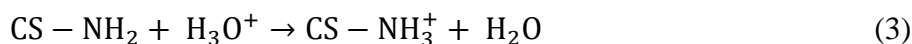
Izabran je nivo značajnosti od 1 %, tako da su statistički značajnim smatrani oni rezultati za koje je dobijena vrednost verovatnoće od $p < 0,01$. Svi biološki eksperimenti su rađeni u triplikatu, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Hidroksiapatit/hitozan i hidroksiapatit/hitozan/gentamicin prevlake

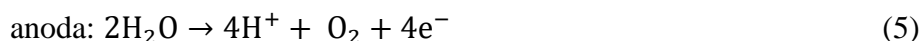
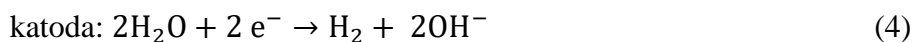
5.1.1. Elektroforetsko taloženje hidroksiapatit/hitozan prevlaka sa i bez dodatka gentamicina na površini titana

Hitozan ima pH-zavisnu rastvorljivost zbog prisustva amino grupa u strukturi (slika 2), zahvaljujući čemu je omogućeno taloženje iz vodene suspenzije [188]. pKa vrednost hitozana iznosi oko 6,3. Pri pH vrednosti manjoj od pKa dolazi do protonovanja primarnih amino grupa hitozana, usled čega hitozan postaje pozitivno naelektrisan i rastvorljiv u vodi, u kiseloj sredini prema jednačini [108,189,190]:

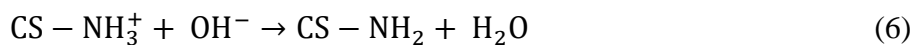


U kiselom vodenom rastvoru, površina hidroksiapatita vezuje protone iz rastvora, dovodeći do protonovanja površinskih hidroksilnih grupa i pozitivnog površinskog naelektrisanja hidroksiapatita [191]. Gentamicin (slika 3) pripada aminoglikozidnoj porodici antibiotika. Ima visoku rastvorljivost u vodi i potpuno je stabilan u širokom opsegu pH vrednosti (2,0 - 10,0). U kiseloj sredini, molekul gentamicina je pozitivno naelektrisan, zbog protonovanja hidroksilnih i amino grupa [108]. Pored toga, može doći do formiranja vodoničnih veza između amino i hidroksilne grupe u hitozanu i gentamicinu, kao i hidroksilne grupe u hidroksiapatitu.

Mehanizam elektroforetskog taloženja HAP/CS i HAP/CS/Gent pri konstantnom naponu se može objasniti na sledeći način. U vodenoj suspenziji dolazi do elektrolize vode i elektrohemijskih reakcija izdvajanja vodonika i kiseonika, što dovodi do povećanja lokalnog pH na katodi [108,192]:



Protonovani molekuli hitozana (jednačina (3)) migriraju prema katodi i reaguju sa OH^- formirajući nerastvorne prevlake CS-NH_2 na katodi:



Površina hidroksiapatita je pozitivno naelektrisana u kiselom rastvoru, tako da čestice hidroksiapatita, pod uticajem električnog polja migriraju do katode (Ti pločica) gde dolazi do deprotonovanja i formiranja prevlake hidroksiapatita istovremeno sa koagulacijom hitozana (jednačina (6)). Kod taloženja HAP/CS/Gent pozitivno naelektrisan gentamicin takođe migrira ka katodi, deprotonuje se i formira kompozitnu prevlaku sa hidroksiapatitom i hitozanom na katodi.

U cilju optimizacije parametara taloženja za HAP/CS prevlaku taloženje je izvedeno pri različitim vrednostima konstantnog napona u intervalu 1–10 V i za različita vremena taloženja, između 5 i 15 min. Za taloženje pri naponima manjim od 5 V, produžavanje vremena taloženja od 5 do 8 min nije dovelo do značajnijeg porasta mase HAP/CS prevlake, što znači da primenjeno električno polje prouzrokuje sporu migraciju čestica. Pri naponima taloženja većim od 6V, za sva vremena taloženja od 5 do 15 min, dobijene su HAP/CS prevlake sa većom masom, ali dobijene prevlake su bile porozne i nehomogene. Naime, pri naponima većim od 6 V, zahvaljujući primeni jačeg električnog polja veća količina čestica dospeva do katode. Istovremeno, porast jačine

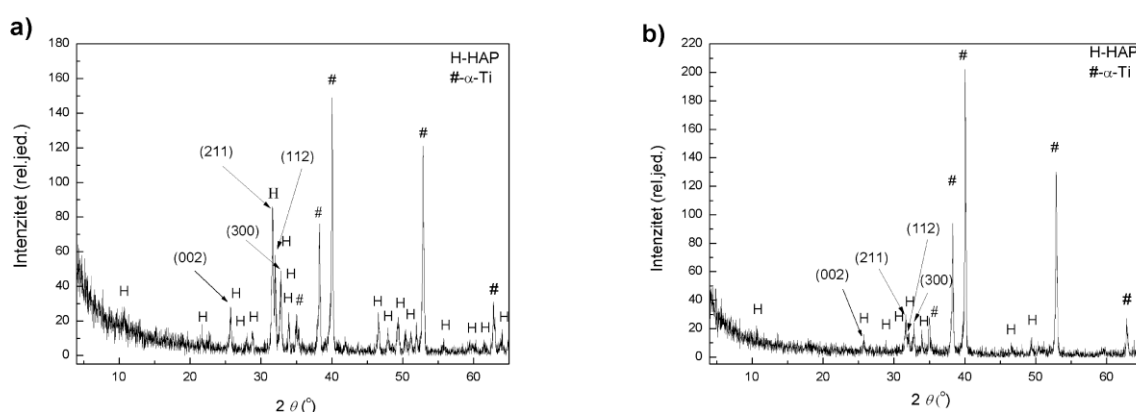
električnog polja povećava količinu izdvojenog vodonika na katodi (jednačina (4)), što dovodi do formiranja porozne strukture istaloženih prevlaka. Homogena HAP/CS prevlaka najveće mase ($0,67 \text{ mg/cm}^2$) je dobijena pri naponu taloženja od 5 V za vreme taloženja od 12 min.

Optimizacija procesa elektroforetskog taloženja u slučaju HAP/CS/Gent prevlake je izvedena prema prethodno opisanom postupku za HAP/CS prevlaku. Kompozitna HAP/CS/Gent prevlaka najboljih karakteristika i najveće mase ($0,67 \text{ mg/cm}^2$) je dobijena pri naponu od taloženja od 5 V i vremenu taloženja od 12 min.

5.1.2. Fizičko-hemijska karakterizacija hidroksiapatit/hitozan prevlaka sa i bez dodatka gentamicina

5.1.2.1. Rendgenska difrakciona analiza (XRD)

Difraktogrami prevlaka HAP/CS i HAP/CS/Gent su predstavljeni na slici 6a i b, redom.



Slika 6. Difraktogram (a) HAP/CS i (b) HAP/CS/Gent prevlake na titanu.

Na oba difraktograma, detektovani difrakcioni maksimumi odgovaraju hidroksiapatitu (JCPDS 09-0432) i titanu, koji potiče od supstrata (JCPDS 89-2762). Karakteristični difrakcioni maksimumi za hitozan i gentamicin nisu detektovani u slučaju obe HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlake, usled niskog sadržaja hitozana i gentamicina u polaznoj suspenziji. Difrakcioni maksimumi za obe HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlake su prošireni, i ukazuju na manju veličinu kristalita hidroksiapatita u prevlakama.

U Tabeli 6 prikazane su izračunate vrednosti d -rastojanja za karakteristične HAP ravni (002), (211), (112) i (300), parametara jedinične ćelije a i c , zapremine jedinične ćelije, V i veličine kristalita. Dobijeni rezultati ukazuju da inkorporacija gentamicina u HAP/CS prevlaku nije uticala na vrednosti d -rastojanja, parametre jedinične ćelije ili zapreminu jedinične ćelije HAP-a.

Veličina kristalita hidroksiapatita, izračunata za ravan (002), difrakcionog maksimuma sa najvećim intenzitetom, za HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlake iznosi 511 i 397 \AA , redom (tabela 6). Manja veličina kristalita u slučaju HAP/CS/Gent u odnosu na veličinu kristalita za HAP/CS prevlaku može se objasniti na sledeći način: gentamicin, inkorporiran u HAP/CS/Gent prevlaku je uticao na veličinu kristalita hidroksiapatita na dva načina. I to tako što sulfatni joni, poreklom iz gentamicin-sulfata, imaju mogućnost da stvaraju veliki broj mesta za nukleaciju tokom procesa sušenja, ograničavajući brzinu rasta kristala hidroksiapatita.

Pored toga, molekul gentamicina je veliki (slika 3), tako da se može pretpostaviti da je ograničio dalji rast kristala hidroksiapatita, što dovodi do stvaranja manjih kristalita u HAP/CS/Gent prevlaci u odnosu na HAP/CS prevlaku. Poželjno je da kristaliti hidroksiapatita za biološke primene budu vrlo fini, zato što veća specifična površina pospešuje osteointegraciju, poboljšava adsorpciju

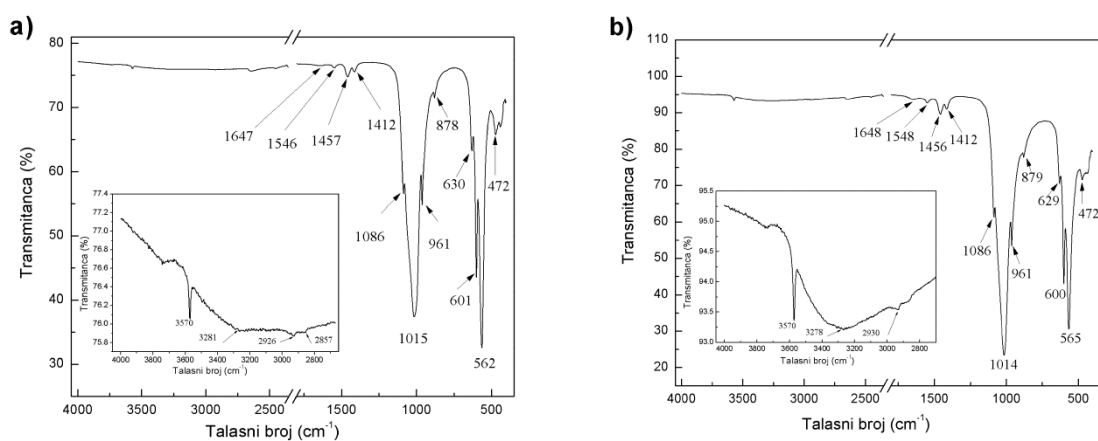
adhezivnih proteina i doprinosi formiranju apatita sličnog koštanom apatitu [152,193–197]. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da gentamicin ima pozitivan uticaj na veličinu kristalita hidroksiapatita u prevlaci HAP/CS/Gent.

Tabela 6. Vrednosti d -rastojanja karakterističnih kristalnih ravni, parametara jedinične ćelije a i c , zapremine jedinične ćelije, V i veličine kristalita za HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlake.

Prevlaka	Kristalne ravni				Parametar			Veličina kristalita, Å
	(002)	(211)	(112)	(300)	a , Å	c , Å	V , Å ³	
	d -rastojanje							
HAP/CS	3,4499	2,8217	2,7859	2,7270	9,447	6,900	533,3	511
HAP/CS/Gent	3,4505	2,8228	2,7866	2,7282	9,451	6,901	533,8	397

5.1.2.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)

Na slikama 7a i 7b su prikazani FT-IR spektri HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaka, redom, gde su označene karakteristične apsorpcione trake.



Slika 7. FT-IR spektri (a) HAP/CS i (b) HAP/CS/Gent prevlaka na titanu.

U oblasti talasnih brojeva od 3000 cm^{-1} do 3500 cm^{-1} (insert na slici 7a), uočava se široka traka koja se može pripisati istežućoj vibraciji -OH grupe, u slučaju HAP/CS prevlake. Izražena, široka traka na 3281 cm^{-1} ukazuje na prisustvo intermolekularnih i intramolekularnih vodoničnih veza [198]. Do interakcija HAP–hitozan dolazi usled formiranja intermolekularnih vodoničnih veza, na primer -OH grupe iz hidroksiapatita u interakciji sa -OH i -NH_2 grupama hitozana. Intramolekularne vodonične veze se odnose na međusobno vezivanje -NH_2 i -OH grupa na lancu hitozana.

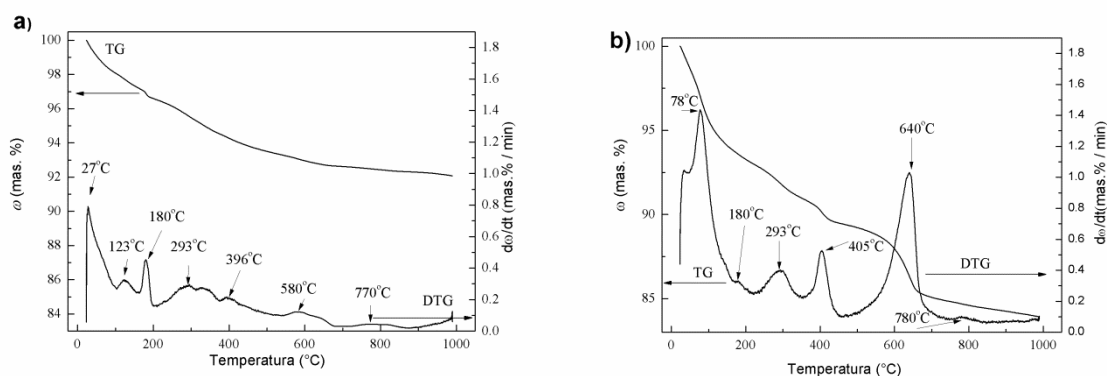
Izraženi pik na 3570 cm^{-1} može se pripisati istežućoj vibraciji -OH grupe u strukturi hidroksiapatita. Traka na 630 cm^{-1} je posledica vibracije strukturne -OH grupe u HAP-u [199]. Prisustvo CO_3^{2-} funkcionalne grupe u hidroksiapatitu je identifikovano karakterističnim trakama koje se pojavljuju na 878 cm^{-1} (karakteristične za ν_2 vibracioni režim) i trakama na 1412 cm^{-1} i 1457 cm^{-1} (pripisane simetričnom i asimetričnom istežanju CO_3^{2-} grupe, redom). Položaj karbonatnih traka je pokazao da je došlo do supstitucije "AB-tipa" u strukturi hidroksiapatita, što znači da je deo fosfatnih i hidroksilnih jona supstituisan CO_3^{2-} grupom [200]. Koštani apatit (mineralna komponenta) ljudske kosti je karbonatno supstituisani apatit. Na osnovu podataka iz literature, smatra se da apatit koji čini mineralnu komponentu ljudske kosti ima "AB-tip" supstitucije. Karbonatno supstituisani hidroksiapatit je poznat po svojoj bioaktivnosti [201].

Traka na 472 cm^{-1} odgovara savijajućoj vibraciji fosfatne grupe u hidroksiapatitu (na primer ν_2 O–P–O). Trake registrovane na 562 cm^{-1} i 601 cm^{-1} se odnose na simetrične i asimetrične deformacione vibracije fosfatne grupe (na primer ν_4 O–P–O). Traka na 961 cm^{-1} potiče od ν_1 simetričnog istezanja P–O veze u fosfatnoj grupi. Trake na 1015 cm^{-1} i 1086 cm^{-1} pripisane su ν_3 vibracionom režimu fosfatne grupe [199,202]. Pored toga, na FT-IR spektru HAP/CS prevlake uočeno je nekoliko karakterističnih traka koje su potvrdile prisustvo hitozana u prevlakama. Traka na 1546 cm^{-1} (amid II traka) može se pripisati savijajućim vibracijama N–H veze u hitozanu. Pik na 1647 cm^{-1} (amid I traka) je uzrokovana istezanjem C=O grupe u hitozanu. Trake na 2857 cm^{-1} i 2926 cm^{-1} predstavljaju tipične C–H istežuće vibracije u strukturi hitozana [203].

Na slici 7b prikazan je FT-IR spektar za HAP/CS/Gent prevlaku. Sve karakteristične trake odgovaraju hidroksiapatitu i hitozanu. Glavne vibracione trake karakteristične za gentamicin se javljaju na istim talasnim brojevima kao u slučaju hitozana i potiču od N–H i O–H veza. Zbog niskog sadržaja gentamicina u HAP/CS/Gent prevlaci i usled preklapanja sa karakterističnim trakama za hitozan, nisu detektovani karakteristični pikovi koji odgovaraju gentamicinu [108]. U opsegu između 3000 cm^{-1} i 3500 cm^{-1} (insert na slici 7b), kao posledica inkorporacije gentamicina uočava se blago pomeranje široke sa 3281 cm^{-1} (HAP/CS, slika 7a) prema nižem talasnom broju (3278 cm^{-1}) za HAP/CS/Gent ukazujući na formiranje vodoničnih veza između hidroksiapatita i hitozana sa gentamicinom. Ovo je posledica interakcija amino i hidroksilnih grupa iz gentamicina sa hidroksilnim grupama hidroksiapatita i amino i hidroksilnim grupa hitozana.

5.1.2.3. Termička stabilnost

Termička stabilnost HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaka ispitana je TG i DTG metodama (Slika 8a i b, redom).



Slika 8. TG/DTG krive (a) HAP/CS i (b) HAP/CS/Gent prevlaka na titanu.

Prvi stupanj gubitka mase za obe HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlake, koji odgovara desorpciji vode, uočen je u temperaturnom opsegu od $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $160\text{ }^{\circ}\text{C}$, sa gubitkom mase od $2,8\text{ mas.}\%$ i od $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ sa gubitkom mase od $6,3\text{ mas.}\%$, redom (slike 8a i b). Značajna razlika u gubitku mase u prvom stupnju može se objasniti manjom veličinom kristalita u slučaju HAP/CS/Gent prevlake (tabela 6). Dodatak gentamicina je uticao na povećanje specifične površine prevlake, što je omogućilo adsorpciju vode na većoj površini.

Imajući u vidu da je prah gentamicin-sulfata higroskopian, [204] tako da povećanje sadržaja adsorbovane vode na površini HAP/CS/Gent prevlake može biti pripisano dodatku antibiotika.

Drugi stupanj gubitka mase uočen je između $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $202\text{ }^{\circ}\text{C}$ sa gubitkom mase od $0,6\text{ mas.}\%$, za HAP/CS prevlaku (slika 8a) i u intervalu od $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $221\text{ }^{\circ}\text{C}$ sa gubitkom mase od $0,7\text{ mas.}\%$, za HAP/CS/Gent prevlaku (slika 8b). Za obe prevlake uočeni su maksimumi na DTG krivama na

180 °C. Gubitak mase u oba slučaja se može pripisati oslobađanju kristalne vode, na primer početak dehidroksilacije HAP-a kroz gubitak OH⁻ grupa [140].

Treći stupanj gubitka mase za HAP/CS prevlaku može se detektovati u temperaturnom opsegu od 202 °C do 312 °C, sa gubitkom mase od 1,3 mas.%, i između 220 °C i 352 °C, sa gubitkom mase od 2,0 mas.%, za HAP/CS/Gent. Jasno definisan pik na 293 °C, za obe prevlake, (Slika 8a i 8b) može se pripisati razgradnji hitozana [205–208].

Termičko razlaganje hitozana se odigrava kroz depolimerizaciju lanaca hitozana, razlaganje piranoznih prstenova (kroz dehidraciju i deaminaciju) i termičku destrukciju piranoznih prstenova, na primer reakcijom otvaranja prstena, uglavnom putem mehanizma slobodnih radikala. Spontana rekombinacija međuproizvoda radikala dovodi do formiranja umreženih struktura, koje su stabilnije od linearnih lanaca [207,209]. Sa druge strane, na osnovu literaturnih podataka, tačka topljenja čistog gentamicin-sulfata se nalazi u opsegu temperatura od 200 °C do 240 °C [210,211]. Proces topljenja gentamicin-sulfata se odigrava kroz topljenje različitih izoformi gentamicina i njihovom fuzijom, što vodi stvaranju različitih jedinjenja, koja se razgrađuju na višim temperaturama. Temperatura topljenja različitih izoformi gentamicina, na osnovu nekih istraživanja iznosi oko 293 °C [204]. Iz tog razloga, razlika u gubitku mase između HAP/CS prevlake (1,3 mas.%) i HAP/CS/Gent prevlake (2,0 mas.%) stoga može se pripisati termičkoj dekompoziciji izoformi gentamicina.

Četvrti stupanj gubitka mase za HAP/CS prevlaku nalazi se u temperaturnom intervalu od 372 °C i 537 °C, sa gubitkom mase od 1,2 mas.%, (TG kriva, slika 8a) i pikom na 396 °C (DTG kriva, slika 8a), i u temperaturnom intervalu od 352 °C i 468 °C, sa gubitkom mase od 1,6 mas.%, (TG kriva, slika 8b) i pikom na 405 °C (DTG kriva, slika 8b) za HAP/CS/Gent prevlaku. Gubitak mase za obe HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlake u ovom stupnju može se pripisati daljem razlaganju hitozana, ili hitozana i gentamicin-sulfata, zajedno, uz istovremeni gubitak karbonatnih jona iz strukture hidroksiapatita kao CO₂ molekula [209,211–213]. Veći gubitak mase u slučaju HAP/CS/Gent prevlake se može pripisati daljoj razgradnji gentamicina.

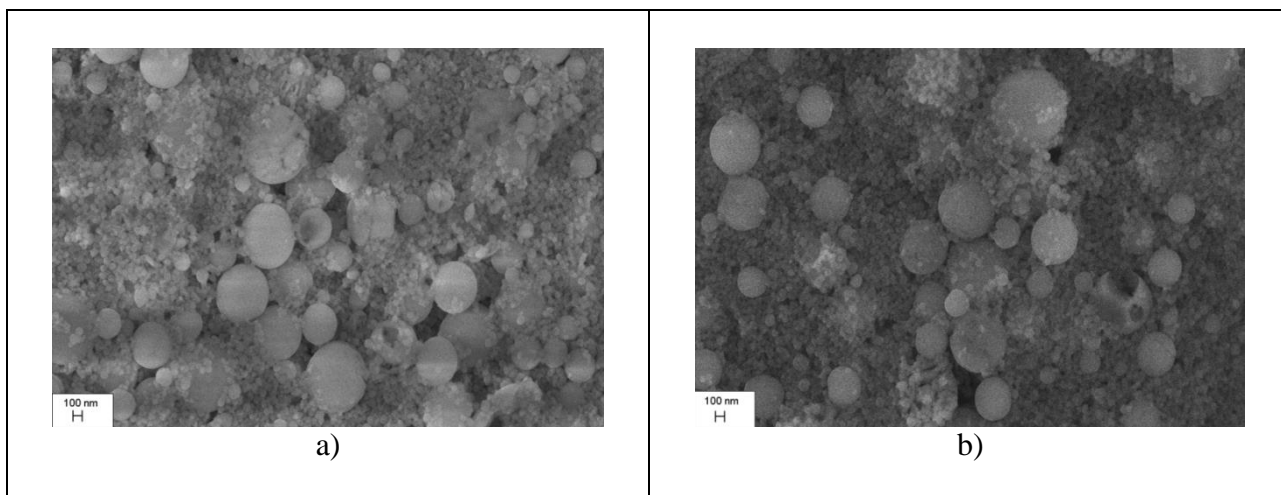
Sledeći stupanj gubitka mase od oko 0,7 mas.%, za HAP/CS prevlaku je uočen u temperaturnom intervalu od 537 °C do 683 °C, sa maksimumom na DTG krivoj (slika 8a) na 580 °C i od oko 4,6 mas.%, za HAP/CS/Gent prevlaku u opsegu temperatura od 468 °C do 746 °C, sa oštrim maksimumom na DTG krivoj (slika 8b) na 640 °C. Ovaj gubitak mase za obe prevlake može se pripisati dekarbonizaciji i dehidroksilaciji hidroksiapatita [200,212,214,215]. Dekarbonizacija hidroksiapatita se odigrava putem oslobađanja CO₂ (g) tokom strukturnog preuređivanja kristalne rešetke hidroksiapatita (gubitkom karbonata sa tetraederskih pozicija), dok kondenzacija HPO₄²⁻ dovodi do otpuštanja vode iz strukture HAP-a. Veći gubitak mase za HAP/CS/Gent u odnosu na HAP/CS prevlaku može se objasniti dekompozicijom rezidualnih sulfata iz gentamicina.

Poslednji stupanj gubitka mase se može pripisati daljoj dehidroksilaciji i termičkom razlaganju hidroksiapatita [214]. Za HAP/CS prevlaku, u intervalu temperatura od 683 °C do 1000 °C, sa širokim maksimumom na 770 °C (slika 8a), detektovan je gubitak mase od 0,6 mas.%. Takođe, za HAP/CS/Gent prevlaku u opsegu temperatura između 746 °C i 1000 °C, sa širokim maksimumom na DTG krivoj na 780 °C (slika 8b), detektovan je gubitak mase od 0,9 mas.%. U ovom temperaturnom opsegu, nastavlja se dehidroksilacija hidroksiapatita putem daljeg gubitka OH⁻ grupa, odnosno molekula vode, što dovodi do stvaranja oksihidroksiapatita koji se može transformisati u β-trikalcijum-fosfat, kalcijum-oksidi ili tetrakalcijum-fosfat na višim temperaturama [216].

Ukupni gubitak mase u celom temperaturnom intervalu od 22 °C do 1000 °C iznosio je 8,0 mas.% za HAP/CS prevlaku i 16,1 mas.% za HAP/CS/Gent prevlaku, što ukazuje na manju termičku stabilnost HAP/CS/Gent prevlake što može biti posledica dodatka gentamicina.

5.1.2.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija (FE-SEM)

FE-SEM mikrografije HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaka prikazane su na slici 9. Analiza SEM mikrografije početnog HAP praha [215] ukazuje na to da se HAP aglomerati sastoje od velikog broja finih čestica. Analiza površine HAP/CS kompozitne prevlake (slika 9a) ukazuje na prisustvo većih sfernih aglomerata HAP kao i na postojanje manjih sfernih čestica, prečnika do nekoliko desetina nanometara, ugrađenih u polimernu matricu hitozana.

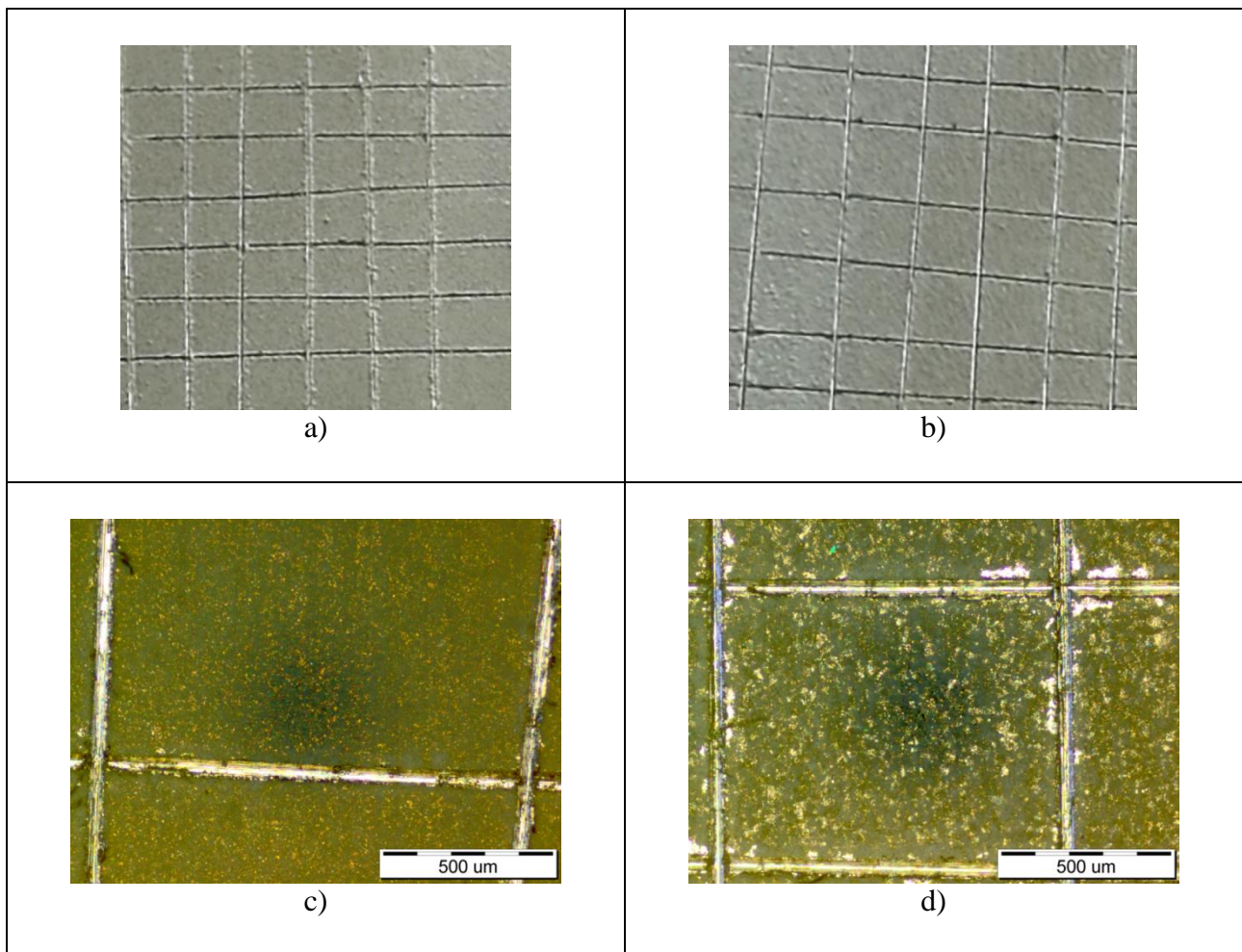


Slika 9. FE-SEM mikrografije (a) HAP/CS i (b) HAP/CS/Gent prevlaka na titanu

Analizom FE-SEM mikrografija HAP/CS/Gent prevlake (slika 9b) nije uočena značajna razlika u poređenju sa kompozitnom prevlakom bez antibiotika, što navodi na zaključak da inkorporacija gentamicina nije uticala na morfologiju HAP/CS/Gent prevlake. Imajući u vidu da je gentamicin makromolekul, očekivano je da je uniformno dispergovan kroz celu prevlaku. Obe HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlake imaju homogenu, poroznu površinu bez pukotina koja ukazuje na snažnu interakciju između čestica hidroksiapatita i polimerne matrice hitozana. Pored toga, međusobne interakcije se mogu objasniti stvaranjem vodoničnih veza između hidroksilnih grupa hitozana i hidroksiapatita. Hitozan uspostavlja vodonične veze sa OH^- i PO_4^{3-} grupama iz hidroksiapatita [217].

5.1.2.5. Ispitivanje adhezije prevlaka

Adhezija između HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaka i pločica titana procenjena je kvalitativno pomoću testa adhezije, u skladu sa standardom ISO 2409 [218]. Test adhezije izveden je na tri uzorka svake prevlake. Rešetkasti uzorak sa po šest useka u svakom pravcu načinjen je sečivom od nerđajućeg čelika. Razmak između useka u svakom pravcu bio je jednak i iznosio je 1 mm. Fotografije HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaka nakon ispitivanja adhezije prikazani su na slikama 10a i 10b, redom.



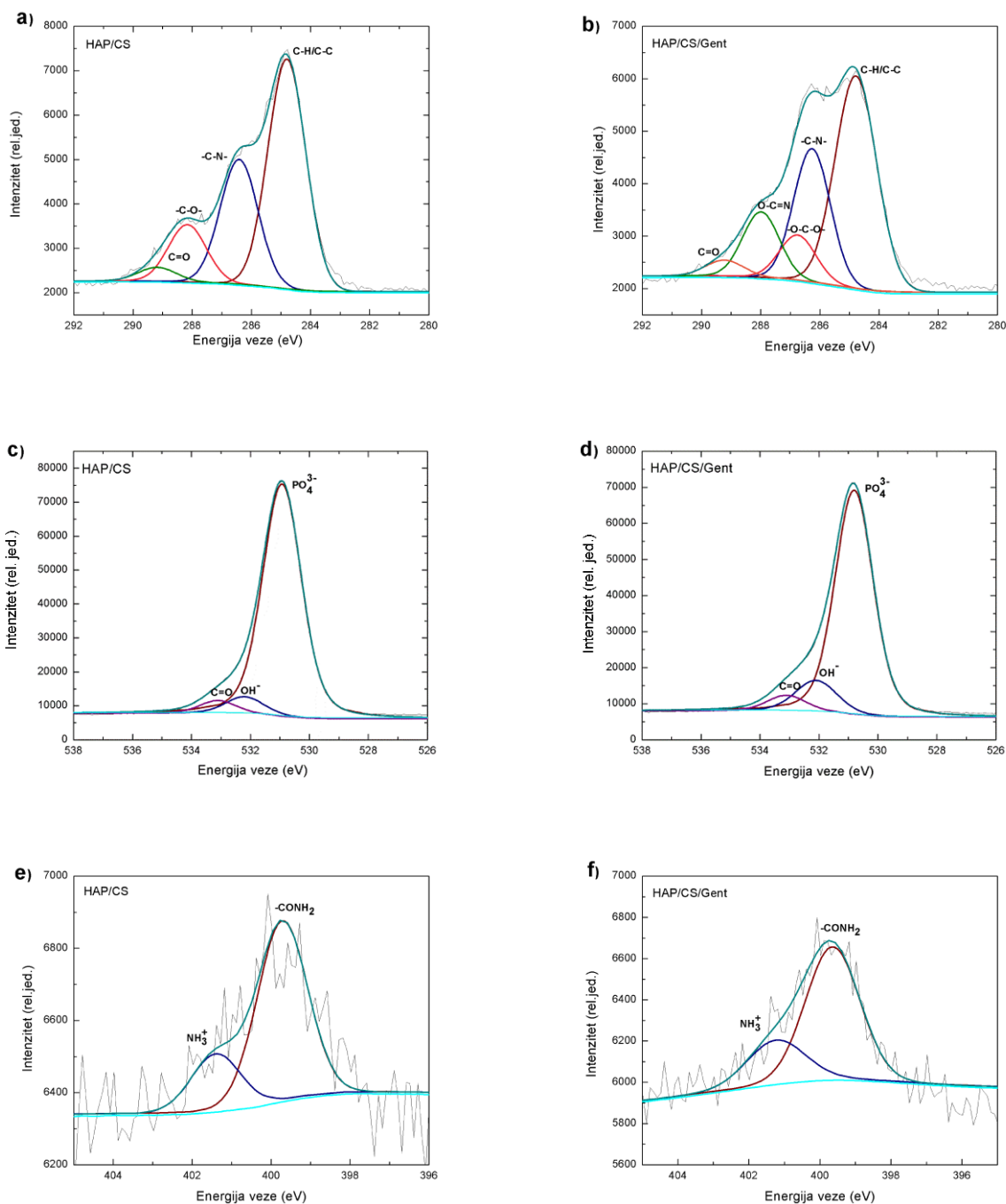
Slika 10. Fotografije prevlaka HAP/CS (a) i HAP/CS/Gent (b) nakon ispitivanja adhezije i optičke mikrofografije prevlaka HAP/CS (c) i HAP/CS/Gent (d) nakon ispitivanja adhezije

Ivice useka su takođe analizirane i optičkim mikroskopom na površinama HAP/CS (slika 10c) i HAP/CS/Gent (slika 10d) prevlaka u cilju detaljnije analize. Rezultati ispitivanja klasifikovani su prema šestostepenoj skali definisanoj standardom ISO 2409.

Prema ovoj klasifikaciji, kvalitet adhezije HAP/CS prevlake odgovara kategoriji „0”, što ukazuje na potpuno glatke ivice bez odvajanja rešetkastih segmenata. HAP/CS/Gent prevlaka se može svrstati u kategoriju „1” zbog pojave sitnih ljuspica prevlake na preseku useka. Prema ISO 2409 klasifikaciji ovi rezultati ukazuju na dobra adheziona svojstva obe prevlake (HAP/CS i HAP/CS/Gent).

5.1.2.6. Rendgenska fotoelektronska spektroskopija (XPS)

Analiza sadržaja elemenata u HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlakama je izvršena metodom XPS. XPS spektri pikova C1s, O1s i N1s za HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlake su prikazani na slici 11.



Slika 11. XPS spektri visoke rezolucije (a) C1s; (c) O1s; (e) N1s za HAP/CS i b) C1s; (d) O1s; (f) N1s HAP/CS/Gent prevlaku

Za HAP/CS prevlaku, C1s spektar (slika 11a) se sastoji od četiri pika sa energijama veze od 284,8, 286,4, 288,2 i 289,2 eV, pripisanih vezama C–H/C–C (284,8 eV), C–N (286,4 eV), C–O (288,2 eV) i C=O (289,2 eV), redom, koje potiču od hidroksilnih i acetamidnih grupa hitozana [219]. C1s spektar za HAP/CS/Gent (slika 8b) sadrži pikove na 284,8, 286,3, 286,7, 288 i 289,2 eV, koji potiču od C–H/C–C, C–N, O–C–O, O–C=N i C=O veza, redom. Nakon dodatka gentamicina, dolazi do pojave pikova na 286,7 eV (O–C–O) i 288 eV (O–C=N) usled prisustva acetalnih veza i metil-amino grupa u gentamicinu [220].

Procentualni udeli navedenih ugljeničnih veza su iznosili 64,3 % (C–H/C–C), 15,8 % (C–N), 16,0 % (C–O) i 3,8 % (C=O) za HAP/CS i 48,2 % (C–H/C–C), 26,6 % (C–N), 8,9 % (O–C–O) i 13,0 % (O–C=N) i 3,2 % (C=O) za HAP/CS/Gent prevlaku. Sa dodatkom gentamicina, dolazi do povećanja procentualnog udela C–N veza u HAP/CS/Gent prevlaci (26,6 %), u poređenju sa HAP/CS prevlakom (15,8 %), kao i do smanjenja udela C=O veza u HAP/CS/Gent prevlaci (3,2 %) u odnosu na HAP/CS (3,8 %).

Prisustvo navedenih veza je potvrđeno i ispitivanjem O1s pikova (slike 11c i 11d). O1s spektar visoke rezolucije sadrži tri pika sa vrednostima energije veze od 530,9 eV, 532,2 eV i 533,1 eV za HAP/CS (slika 11c) i 530,8 eV, 532,1 eV i 533,1 eV za HAP/CS/Gent prevlaku (slika 11d), koje odgovaraju PO_4^{3-} , –OH i C=O grupama [221].

Glavna komponenta O1s pik signala na ~ 531 eV za HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlake pripisuje se doprinosu PO_4^{3-} grupa hidroksiapatita. Drugi O1s pik na ~ 532,2 eV može poticati od hidroksilnih (–OH) grupa prisutnih u HAP-u i hitozanu [222] [223]. Treći O1s pik na ~ 533,1 eV dodeljen je karbonilnim (C=O) grupama, koje potiču iz hitozana [221].

N1s spektri obe prevlake sadrže dve komponente, odnosno, dva pika (slike 11e i 11f), sa energijama veze od 399,7 i 401,4 eV za HAP/CS (Slika 11e) i 399,6 i 401,2 eV za HAP/CS/Gent prevlaku (slika 11f), koji se mogu pripisati slobodnim i protonovanim aminima, redom [224]. Povećanje sadržaja protonovanih amina u HAP/CS/Gent prevlaci (25,6 %) u poređenju sa HAP/CS prevlakom (23,3 %) ukazuje na uspešnu inkorporaciju gentamicina u kompozit. Takođe je primećeno smanjenje ukupnog sadržaja aaminskih grupa u HAP/CS/Gent prevlaci (74,4 %), u odnosu na HAP/CS prevlaku (76,7 %).

XPS spektar HAP/CS prevlake prikazao je spektre visoke rezolucije za Ca2p i P2p (podaci nisu prikazani), sa pikovima Ca 2p_{1/2} (350,5 eV), Ca 2p_{3/2} (347,0 eV) i P 2p_{3/2} (133,1 eV), što potvrđuje prisustvo hidroksiapatita. Za HAP/CS/Gent prevlaku, Ca2p spektar (podaci nisu prikazani) otkrio je pikove Ca 2p_{1/2} (350,4 eV) i Ca 2p_{3/2} (346,9 eV), dok je P2p spektar (podaci nisu prikazani) prikazao komponentu P2p_{3/2} pri 133,0 eV. Spektar visoke rezolucije S2p (podaci nisu prikazani), sa pikom na 168,1 eV, ukazuje na uspešnu inkorporaciju gentamicina u HAP/CS/Gent prevlaku.

Površinski sadržaji elemenata za obe prevlake su prikazani u tabeli 7. Značajne razlike u sastavu prevlaka su primetne samo u slučaju sadržaja azota i sumpora. Sadržaj azota je gotovo dvostruko veći u slučaju HAP/CS/Gent (1,0 %), u poređenju sa HAP/CS prevlakom (0,6 %), dok je sumpor prisutan samo u HAP/CS/Gent prevlaci (1,0 %), što potvrđuje uspešnu inkorporaciju gentamicina u HAP/CS/Gent prevlaku.

Na osnovu analize sadržaja elemenata (XPS analiza), određen je i atomski odnos Ca/P, koji iznosi 1,30 i 1,20 za HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlake, redom. Ovi rezultati se slažu sa rezultatima FT-IR spektroskopije i potvrđuju prisustvo kalcijum-deficitarnog hidroksiapatita, za koji odnos Ca/P varira između 1,33 i 1,67 [225,226]. Kalcijum-deficitarni hidroksiapatit obično podleže supstituciji sa karbonatnim jonima, usled čega dolazi do nastajanja karbonatnog hidroksiapatita „AB-tipa”. Imajući u vidu da je karbonatno supstituisani hidroksiapatit poznat po svojoj izuzetnoj bioaktivnosti i osteoinduktivnosti, može se zaključiti da su ovakvi rezultati pogodni u pogledu primene prevlaka na ortopedskim implantatima.

Tabela 7. Površinski sadržaj elemenata u HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlakama, određen metodom XPS

	Sadržaj elemenata, at. %	
	HAP/CS	HAP/CS/Gent
C1s	16,85	16,75
O1s	52,60	52,81
N1s	0,76	1,45
P2p	12,97	12,22
Ca2p	16,82	16,09
S2p	/	0,67
Ca/P odnos	1,30	1,32

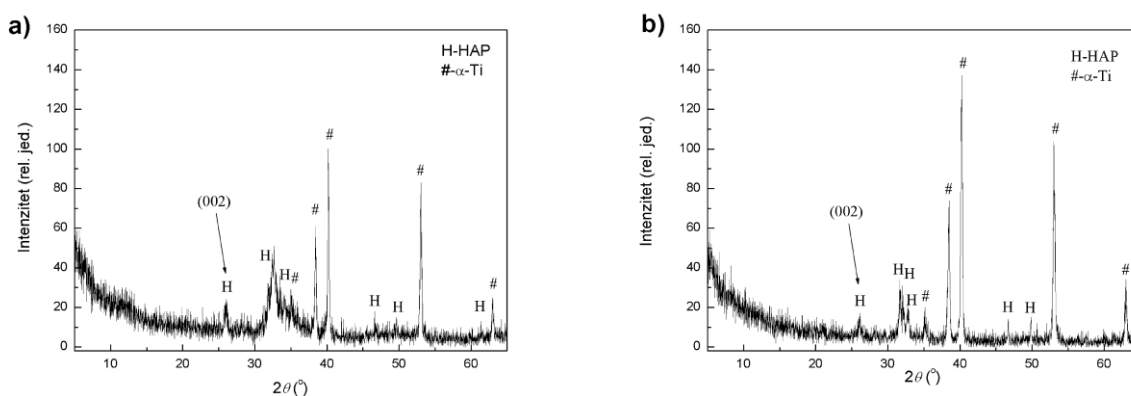
5.1.3. Ispitivanje sposobnosti biomineralizacije hidroksiapatit/hitozan prevlaka sa i bez dodatka gentamicina

5.1.3.1. Formiranje biomimetičkog hidroksiapatita na površini prevlaka nakon potapanja u SBF

In vitro biomineralizacija HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaka je ispitana potapanjem pločica titana sa prevlakama u 20 ml rastvora SBF na 37 °C. Nakon 7 dana izlaganja rastvoru SBF-a, HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlake su osušene na sobnoj temperaturi i dalje ispitivane i karakterisane primenom rendgenske difrakcije analize (XRD), infracrvenom spektroskopijom sa Furijeovom (Fourier) transformacijom u ATR modu (ATR-FT-IR), i skenirajućom elektronskom mikroskopijom sa energetsom disperzionom spektroskopijom (FE-SEM/EDS).

5.1.3.2. Rendgenska difrakciona analiza (XRD) prevlaka nakon potapanja u SBF

Na slici 12 su prikazani difraktogrami biomimetičkog hidroksiapatita dobijenog nakon potapanja prevlaka HAP/CS (Slika 12a) i HAP/CS/Gent (Slika 12b) u SBF na temperaturi od 37 °C tokom 7 dana. Difrakcioni maksimumi biomimetičkih prevlaka, dobijenih na površini obe prevlake (HAP/CS i HAP/CS/Gent) odgovaraju hidroksiapatitu (JCPDS 09-0432) i titanskom supstratu (JCPDS 89-2762).



Slika 12. Difraktogrami prevlaka biomimetičkog hidroksiapatita dobijenog nakon potapanja prevlaka (a) HAP/CS i (b) HAP/CS/Gent u simuliranu telesnu tečnost tokom 7 dana

Širenje difrakcionih maksimuma ukazuje na prisustvo finih kristalita hidroksiapatita u formiranim biomimetičkim prevlakama. Razlika u difraktogramima biomimetičkog hidroksiapatita formiranog na površini HAP/CS (Slika 12a) i HAP/CS/Gent (slika 12b) prevlaka, u intervalu $2\theta =$

30–40° može se objasniti razlikama u prevlakama HAP/CS i HAP/CS/Gent pre potapanja u SBF, veličini kristalita i parametrima jedinične ćelije, kao što je opisano u odeljku 5.1.2.1 (XRD analiza) [52].

Veličine kristalita, računate za ravan (002), parametri (a i c) i zapremine jediničnih ćelija (V), kao i vrednosti za d -rastojanja za ravni (002), (211), (112), i (300) dobijeni nakon potapanja prevlaka HAP/CS i HAP/CS/Gent u simuliranu telesnu tečnost tokom 7 dana prikazani su u tabeli 8. Pokazano je da je veličina kristalita nešto manja u slučaju biomimetičkog hidroksiapatita formiranog na površini HAP/CS/Gent prevlake (374 Å), u u poređenju sa novoformiranim biomimetičkim hidroksiapatitom na površini HAP/CS prevlake (387 Å). Formiranje manjih kristalita na površini prevlake sa gentamicinom mogla bi biti posledica manjih kristalita u HAP/CS/Gent prevlaci pre potapanja u SBF (397 Å), u odnosu na veličinu kristalita HAP/CS prevlake pre potapanja (511 Å)[52].

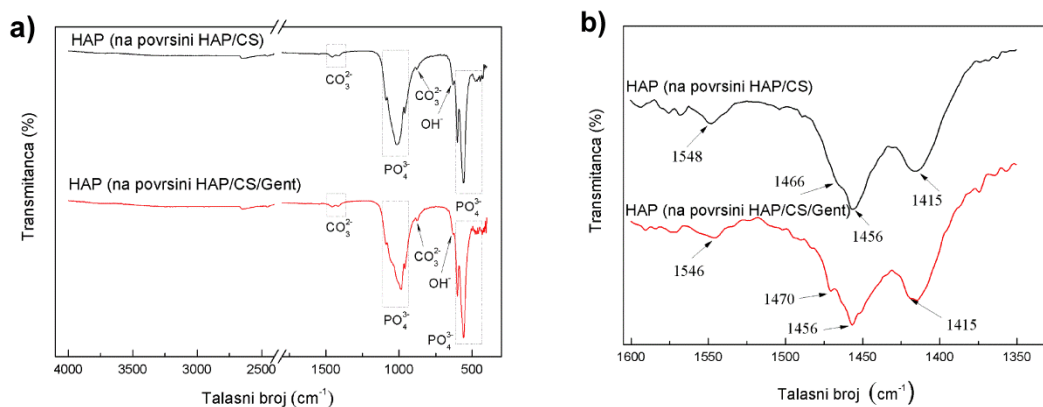
Na osnovu rezultata za vrednosti parametara jedinične ćelije, za biomimetički HAP, formiran na površini HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaka, može se uočiti blago povećanje vrednosti parametra za a -osu (9,440 i 9,491 Å, respektivno) u odnosu na teorijsku vrednost od 9,418 Å [227]. Sa druge strane, blago smanjena vrednosti za c -osu od 6,881 Å (HAP/CS) i 6,820 Å (HAP/CS/Gent), u odnosu na teorijsku vrednost od 6,884 Å [227]) ukazuje na inkorporaciju karbonatne grupe u strukturu hidroksiapatita. Naime, kada dodje do delimične supstitucije OH⁻ ili PO₄³⁻ joni u strukturi hidroksiapatita karbonatnim jonima formira se A-, B- ili AB tip karbonatnog HAP [228]. Zamena linearnih OH⁻ ili tetraedarskih PO₄³⁻ jona planarnim CO₃²⁻ jonima dovodi do promene u parametrima jedinične ćelije (ekspanziju ili kontrakciju a i/ili c -ose) [229]. Koštani apatit predstavlja karbonatni hidroksiapatit AB-tipa, gde dolazi do istovremene supstitucije OH⁻ ili PO₄³⁻ jona karbonatnim jonima. Izraženije promene u parametrima kristalne rešetke mogu da ukažu na veći stepen karbonatne supstitucije u strukturi hidroksiapatita [230].

Promene u parametrima jedinične ćelije (tabela 8) su ukazale da je biomimetički HAP, dobijen na površini HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaka u suštini karbonatno supstituisan hidroksiapatit. Izraženije promene za vrednosti a i c parametara u poređenju sa teorijskim vrednostima pojavljuju se u slučaju biomimetičkog hidroksiapatita formiranog na površini HAP/CS/Gent prevlake, ukazujući da je veći procenat OH⁻ i PO₄³⁻ jona supstituisan CO₃²⁻ jonima, u poređenju sa biomimetičkim hidroksiapatitom formiranim na površini HAP/CS prevlake.

Imajući u vidu da se apatiti sa Ca/P odnosom nižim od 1,67 obično smatraju karbonatno supstituisanim, [225,231] energetska disperziona analiza (EDS) je dodatno dokazala da je biomimetički HAP, formiran na površini HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaka, karbonatni hidroksiapatit, jer su izračunati Ca/P odnosi iznosili 1,64 i 1,46 redom. Dobijeni rezultati su veoma perspektivni jer je poznato da supstituisani hidroksiapatit poboljšava bioaktivnost i osteokonduktivnost i povećava adheziju, rast i diferencijaciju ćelija osteoblasta u odnosu na stehiometrijski hidroksiapatit [232,233].

5.1.3.3. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) prevlaka nakon potapanja u SBF

Na slici 13a prikazan je FT-IR spektar biomimetičkog hidroksiapatita dobijenog na površini HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaka nakon potapanja u rastvor SBF na 37 °C tokom 7 dana, dok je na slici 13b predstavljen deo spektra koji odgovara intervalu u kojima se pojavljuju karbonatne trake.

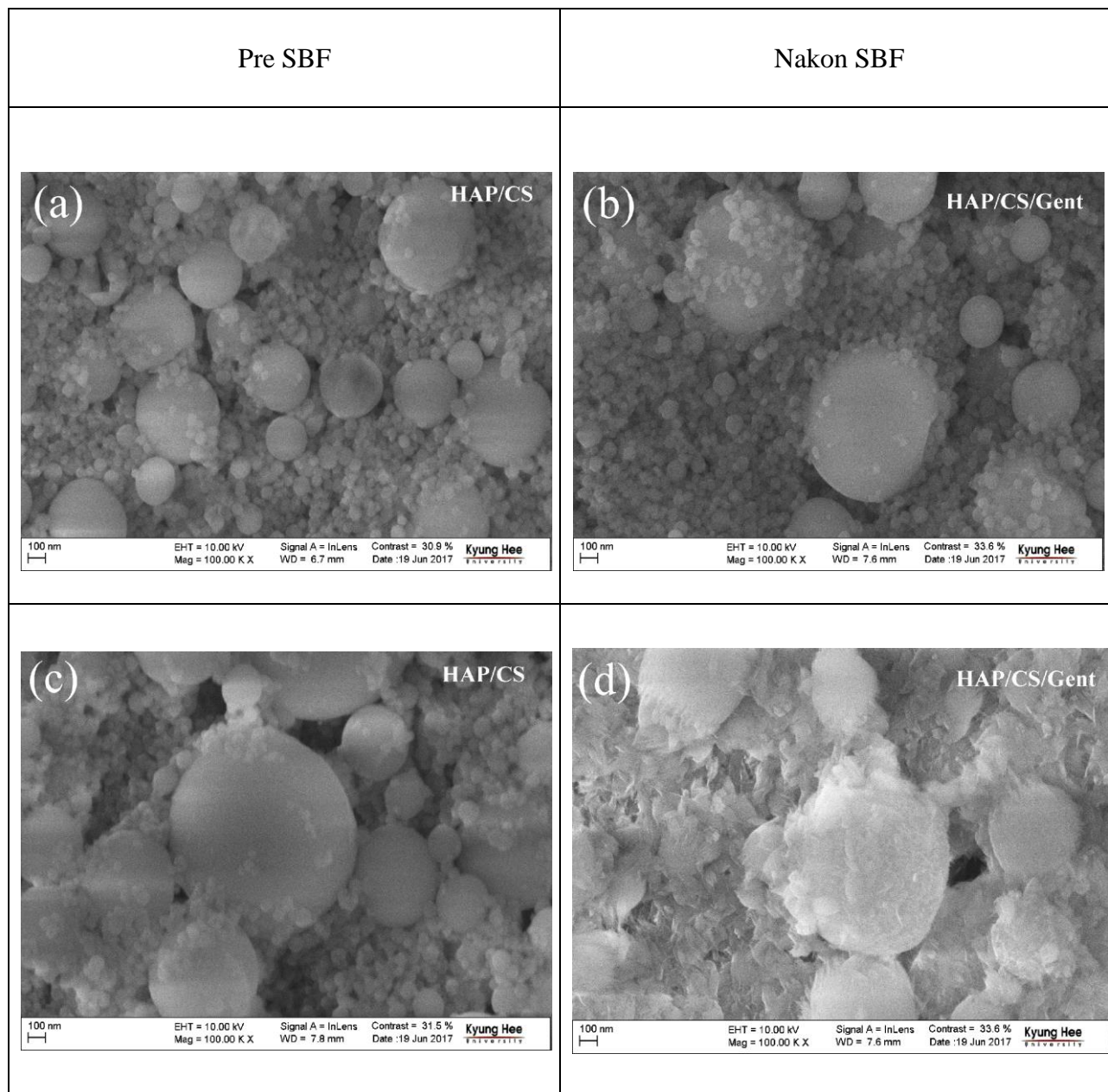


Slika 13. FT-IR spektri biomimetičkog hidroksiapatita formiranog na površini (a) HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaka nakon 7 dana potapanja u SBF na 37 °C, i (b) detaljna pozicija karbonatnih traka

Intenzivne trake u oblasti talasnih brojeva od 960 do 1200 cm^{-1} (960, 1014, i 1087 cm^{-1} za HAP/CS prevlaku, i 959, 985, i 1087 cm^{-1} za HAP/CS/Gent prevlaku) su pripisane (P–O) istežućim vibracijama PO_4^{3-} grupe (slika 13a). Promena položaja trake koja odgovara fosfatnoj grupi se može objasniti odstupanjem fosfatnih jona od njihove idealne tetraedarske strukture [234]. O–P–O savijajuće vibracije su detektovane na 558 i 600 cm^{-1} za obe prevlake, potvrđujući prisustvo hidroksiapatita [234,235]. Prisustvo strukturne OH^- grupe u hidroksiapatitu potvrđeno je prisustvom trake na oko 630 cm^{-1} u spektru obe prevlake [153,199]. Na FT-IR spektru hidroksiapatita može se detektovati oštra traka na oko 3570 cm^{-1} i pripisati istežanju OH^- grupe u strukturi hidroksiapatita [52,199]. Međutim, ova traka nije prisutna na FT-IR spektrima hidroksiapatita formiranog nakon 7 dana potapanja u SBF (slika 13a), što ukazuje na prisustvo supstituisanog, odnosno biomimetičkog hidroksiapatita, koji nastaje kada karbonatne grupe supstituišu OH^- grupe. Biomimetička priroda hidroksiapatita, formiranog na površini obe prevlake je na taj način potvrđena, s obzirom na činjenicu da je ova traka odsutna na FT-IR spektru koji odgovara prirodnoj kosti [230]. Takođe, položaji nekoliko traka ukazuju na AB-tip karbonatne supstitucije u biomimetičkom hidroksiapatitu (slika 13b) [52,236–238]. Različiti vibracioni modovi CO_3^{2-} grupe su detektovani na FT-IR spektru obe prevlake (slika 13b): 878 cm^{-1} (O–C–O), 1415 i 1456 cm^{-1} (O–C), “rame” na 1466 cm^{-1} (HAP/CS) i ~1470 cm^{-1} (HAP/CS/Gent), i konačno ~1546 cm^{-1} (HAP/CS) i ~1548 cm^{-1} (HAP/CS/Gent). Detektovan položaj karbonatne trake ukazuje da je struktura biomimetički dobijenog hidroksiapatita slična strukturi bioloških apatita. U slučaju obe biomimetičke prevlake, XRD i EDS rezultati su u saglasnosti sa rezultatima FT-IR analize, potvrđujući da biomimetički hidroksiapatit pripada karbonatno supstituisanom hidroksiapatitu [236].

5.1.3.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija (FE-SEM) prevlaka nakon potapanja u SBF

FE-SEM mikrografije HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaka na titanu pre i nakon 7 dana potapanja u rastvor SBF na temperaturi od 37 °C prikazani su na slici 14.



Slika 14. FE-SEM mikrografije HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaka pre (a,b) i nakon (c,d) potapanja u SBF, redom

Važno je istaći da inkapsulacija gentamicina nije uticala na promenu morfologije prevlake – sferni aglomerati različitih veličina su prisutni na površinama obe prevlake (slike 14a,b). Nakon 7 dana potapanja u SBF, sferni aglomerati biomimetičkog HAP uočeni su na površini HAP/CS prevlake (slika 14c), dok su se nesferične čestice pojavile u slučaju biomimetičkog hidroksiapatita na HAP/CS/Gent prevlaci (slika 14d). Pored promena u obliku novonastalih čestica, veličina aglomerata biomimetičkog hidroksiapatita se promenila odnosno smanjila u prevlaci sa inkorporiranim antibiotikom (HAP/CS/Gent) u odnosu na prevlaku bez gentamicina (HAP/CS). Ova promena morfologije može se pripisati prisustvu gentamicina, inkapsuliranog unutar prevlake

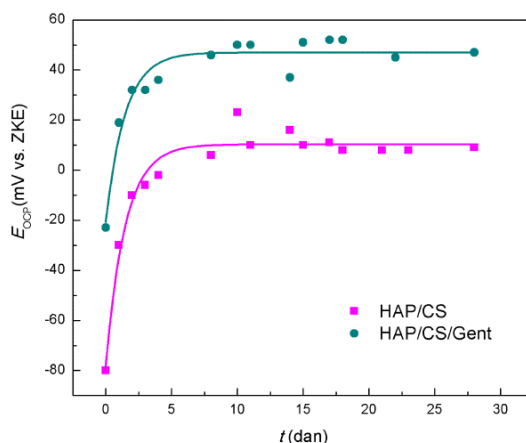
hitozan/hidroksiapatit, na taj način potvrđujući uspešno ugrađivanje antibiotika tokom taloženja. Naime, prilikom potapanja u SBF rastvor prodire u prevlaku i rastvara lek. U ovom početnom periodu rastvaranja leka, u prvih 48 h uočen je efekat naglog otpuštanja gentamicina, o čemu će se detaljnije govoriti u odeljku 5.1.4. (otpuštanje gentamicina). Kao posledica rastvaranja leka, nastaje promena u topografiji prevlake sa antibiotikom, što dovodi do taloženja nesferičnih aglomerata hidroksiapatita.

5.1.3.5. Ispitivanje sposobnosti biomineralizacije prevlaka elektrohemijским metodama u SBF-u

Elektrohemijška merenja su korišćena za ispitivanje elektrohemijških svojstava HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaka i praćenje rasta nove apatitne faze tokom izlaganja rastvoru SBF na 37 °C. Titan generalno nije veoma sklon koroziji, zbog termodinamički povoljnog formiranja stabilnog oksidnog sloja na površini metala u veoma širokom opsegu potencijala i pH vrednosti [239]. Ovaj oksidni sloj na površini titana je pasivan i ima ulogu da zaštiti metal od korozije. Elektrohemijška ispitivanja parametara korozije u slučaju titanskih pločica sa istaloženim prevlakama mogu indirektno pružiti uvid u bioaktivnost samih prevlaka [140,153]. Različiti elektrohemijški testovi su sprovedeni kako bi se ispitao rast apatitne faze u slučaju produženog perioda izloženosti pločica SBF-u kao sredini koja indukuje biomineralizaciju.

5.1.3.5.1. Potencijal otvorenog kola

Na slici 15 je prikazana vremenska zavisnost potencijala otvorenog kola (E_{ocp}) za oba ispitivana uzorka (HAP/CS i HAP/CS/Gent na titanu) tokom 28 dana potapanja u SBF-u na 37 °C.



Slika 15. Vremenska zavisnost potencijala otvorenog kola (E_{ocp}) za HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaku tokom 28 dana potapanja u SBF-u na 37 °C

Početne vrednosti potencijala otvorenog kola su bile negativne za oba uzorka (-80 mV za HAP/CS i -23 mV za HAP/CS/Gent), ali E_{ocp} vrednosti su brzo postale pozitivnije tokom izlaganja SBF-u. E_{ocp} se povećao tokom prvih 5 dana i dostigao skoro konstantne vrednosti u poslednjem vremenskom periodu. Ovo bi moglo ukazivati na brz rast apatita nakon početnog izlaganja SBF-u, nakon čega je novonastali apatitni sloj ostao praktično nepromenjen do kraja ispitivanja. Formiranje apatitnog sloja je dalje ispitivano metodama spektroskopije elektrohemijške impedancije (SEI) i metodom polarizacionih krivih (PDS).

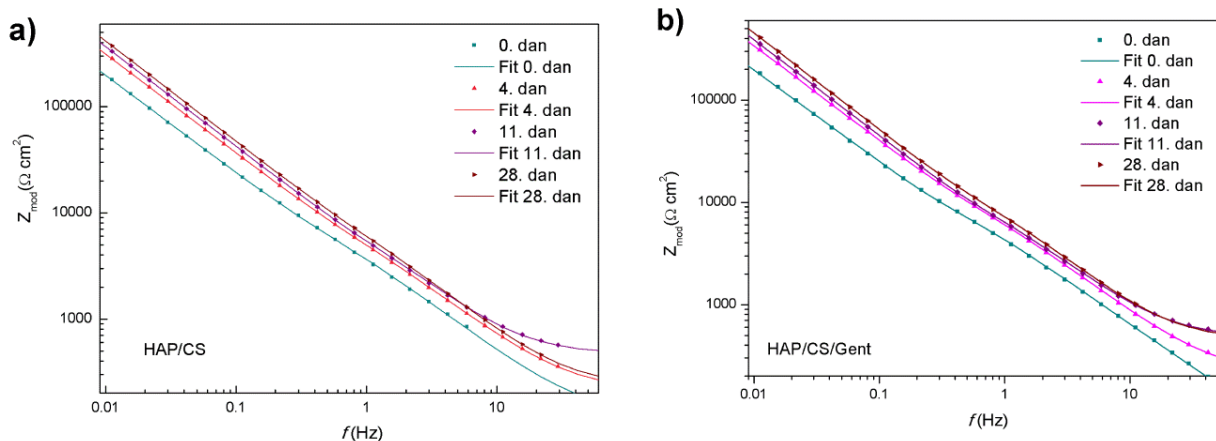
5.1.3.5.2. Spektroskopija elektrohemijške impedancije (SEI)

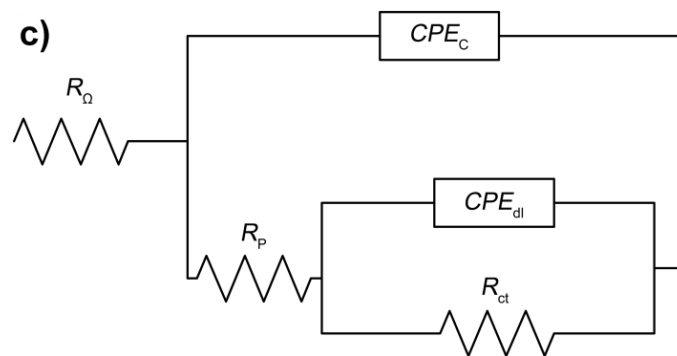
SEI predstavlja jednu od najsavremenijih metoda za ispitivanje zaštitnih svojstava prevlaka i korozije metalnih supstrata zbog velikih prednosti kao što su mogućnost proučavanja korozije i u slabo provodnim sredinama, mogućnost određivanja električnih parametara prevlaka (otpornost u porama i kapacitivnost prevlake), kao i nedestruktivno dejstvo same metode [20].

Rezultati merenja spektroskopije elektrohemijske impedancije mogu se grafički predstaviti Bodeovim i Najkvistovim dijagramima. Na Bodeovom dijagramu se očitava zavisnost apsolutne vrednosti impedancije, $|Z|$, i faznog pomeraja, θ , (ordinate) od velikog raspona frekvencija, f , (apscisa), dok Najkvist dijagram predstavlja zavisnost realnog, Z' , od imaginarnog dela impedancije, Z'' , za širok opseg frekvencija. Na Najkvistovom dijagramu u kompleksnoj ravni uočavaju se dva polukruga, manji - koji se javlja na visokim frekvencijama i odražava električne karakteristike prevlake i jonsku provodljivost kroz nju, i veći - koji se javlja pri niskim frekvencijama i odnosi se na svojstva na graničnoj površini supstrat-elektrolit i opisuje korozione procese na površini metala. Spektroskopijom elektrohemijske impedancije je ispitivano elektrohemijsko ponašanje HAP/CS, HAP/CS/Gr, HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka na titanu tokom 28 dana izlaganja SBF rastvoru na 37 °C.

SEI spektri za obe ispitivane prevlake nakon različitih perioda potapanja (do 28 dana) u SBF-u na 37 °C su prikazani na Slici 16 a,b. Bodeovi dijagrami (slika 16 a,b) su pokazali povećanu ukupnu impedanciju za HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlake potvrđujući na taj način formiranje i rast novog apatitnog sloja tokom potapanja u SBF-u. Najveće povećanje impedancije je primećeno u periodu između početnog izlaganja i četvrtog dana, ukazujući da do najbržeg formiranja apatitne faze dolazi nakon inicijalnog kontakta sa SBF-om, kao što je detektovano E_{ocp} merenjima (slika 16 a,b). Teorijski, proces biomineralizacije je reverzibilni proces, u kome se proces rastvaranja prevlake i taloženja apatitne faze odigravaju istovremeno i u kom dominantna reakcija zavisi od koncentracije Ca^{2+} i PO_4^{3-} jona [240]. Međutim, mehanizmi rastvaranja i taloženja su različiti: razmena jona definiše proces rastvaranja, dok gradijent koncentracije i rastvorljivost čestica utiču na taloženje apatitne faze [240,241].

Brz rast vrednosti impedancije tokom prvih 4 dana je pokazao da je predominantna reakcija bila taloženje kalcijum-fosfata i formiranje novog sloja hidroksiapatita. Dalji rast apatitne faze bi mogao da uspori usled dostizanja ravnoteže, zato što je rast impedancije bio dosta sporiji između 11.og i 28.og dana (slika 16 a,b).





Slika 16. Bodeovi dijagrami za a) HAP/CS i b) HAP/CS/Gent prevlake tokom 28 dana potapanja u SBF-u na 37 °C i (c) ekvivalentno električno kolo (EEK) korišćeno za fitovanje SEI spektara

U cilju ispitivanja elektrohemijskog ponašanja ispitivanih uzoraka, impedansni spektri su fitovani pomoću ekvivalentnog električnog kola (EEK) prikazanog na slici (slika 16c). EEK se sastojalo od otpornosti elektrolita (R_{Ω}), serijski vezane sa paralelnim RC kolom koje se odnosi na karakteristike prevlake (sa CPE_c - elementom sa konstantnim faznim uglom koji se odnosi na kapacitivnost prevlake i R_p - otpornosti u porama prevlake). Element sa konstantnim faznim uglom (CPE) je korišćen kako bi se uzela u obzir sve nehomogenosti ispitivanog sistema i odstupanja od ponašanja idealnog dielektrika. Drugo paralelno RC kolo je bilo serijski vezano sa R_p i sadržalo je otpornost prenosa naelektrisanja na graničnoj površini metal-elektrolit (R_{ct}) i element sa konstantnim faznim uglom, CPE_{dl} , koji predstavlja sve elektrohemijske fenomene zavisne od frekvencije, kapacitivnost dvojnog sloja, C_{dl} i difuzione procese. Ova druga vremenska konstanta opisuje procese prenosa naelektrisanja i elektrohemijske reakcije na granici faza metal/elektrolit, a prisutna je usled visoke poroznosti prevlake, koja omogućava elektrolitu da proдре kroz pore i dosegne metal ispod prevlake. Impedancija elementa (Z_{CPE}) se može izraziti koristeći jednačinu (7), [242] gde je Y_0^{-1} admitansa, ω je ugaona frekvencija, α je parametar koji kvantifikuje odstupanje od idealnog kondenzatora, $i^2 = -1$. Vrednost kapacitivnosti se mogu izračunati korišćenjem jednačine (8), gde je ω_{max} ugaona frekvencija pri kojoj imaginarna komponenta impedancija dostiže svoj maksimum [242].

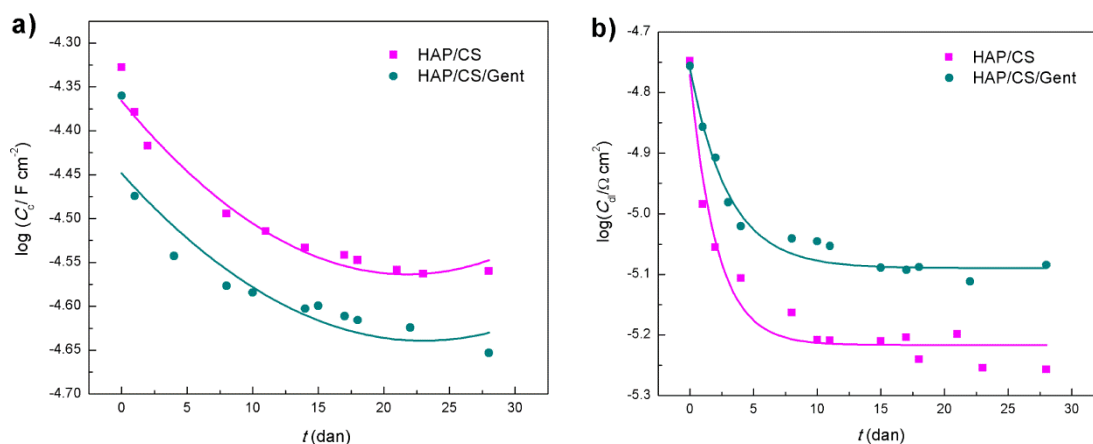
$$Z_{CPE} = Y_0^{-1} \cdot (i \cdot \omega)^{-\alpha} \quad (7)$$

$$C_{CPE} = Y_0 (\omega_{max})^{\alpha-1} \quad (8)$$

Očigledno je da za vrednosti α koje su bliske jedinici $C_{CPE} = Y_0$. Kako je α vrednost za obe prevlake bila uvek veća od 0,8 Y_0 vrednosti dobijene fitovanjem su korišćene kao kapacitivnost prevlake i kapacitivnost dvojnog sloja bez daljih proračuna. Vrednosti pokazatelja kvaliteta fita (χ^2) su uvek bile u opsegu $10^{-6} - 10^{-4}$. Vrednosti C_c i C_{dl} tokom ispitivanog perioda potapanja su prikazani na slici 17 a,b. I C_c i C_{dl} su pokazali opadajući trend tokom ispitivanog perioda, što je u skladu sa poboljšanjem antikorozijskih svojstava sistema metal/prevlake. Niže vrednosti C_c su ukazale na postojanje debljeg sloja prevlake usled taloženja biomimetičkog HAP-u koji je zatvorio (popunio) pore prevlake i na taj način sprečio prodor elektrolita.

Vrednosti kapacitivnosti prevlake u početnim periodima izlaganja SBF-u (slika 17a) su bile u skladu sa E_{ocp} merenjima (slika 15) kao i Bodeovim dijagramima (slika 16a,b), pokazujući najznačajnije promene između 0. i 4. dana, nakon čega sledi period relativne stagnacije. Ovo ukazuje da je ključni period u formiranju nove apatitne faze upravo period nakon početnog izlaganja ispitivanih uzoraka rastvoru, odnosno okruženju koje indukuje proces biomineralizacije. I u slučaju vrednosti C_{dl} (slika 17b) takođe je primećen značajan opadajući trend. Poznato je da je vrednost kapacitivnosti dvojnog sloja proporcionalna površini metala koja je direktno izložena elektrolitu.

Dakle, smanjenje vrednosti C_{dl} je u korelaciji sa smanjenom graničnom površinom površinom metal/elektrolit usled formiranja novog apatitnog sloja ili usled formiranja tankog sloja titan-oksida na površini metala.



Slika 17. Vremenska zavisnost a) kapacitivnosti prevlake (C_c) i b) kapacitivnosti dvojnog sloja (C_{dl}) za HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlake dobijena SEI merenjima tokom 28 dana potapanja u SBF na 37 °C

Što se tiče otpornosti u porama prevlake i otpornosti prenosa naelektrisanja na graničnoj površini metal-elektrolit uočeno je slično ponašanje. Vrednosti R_p su porasle nakon 4 dana za obe prevlake (27,8 k Ω cm² za HAP/CS i 33,1 k Ω cm² za HAP/CS/Gent), u poređenju sa vrednostima na početku potapanja (17,6 k Ω cm² za HAP/CS i 25,9 k Ω cm² za HAP/CS/Gent), ukazujući na porast debljine prevlake usled taloženja novoformiranog apatitnog sloja. Nakon ove inicijalne četvorodnevne faze, dalji rast je bio sporiji dostižući 38,7 k Ω cm² za HAP/CS i 32,4 k Ω cm² za HAP/CS/Gent nakon 28 dana potapanja u SBF-u. Kao što je već objašnjeno iznad rastvaranje i taloženje HAP-a su paralelni procesi i njihovo istovremena pojava je bila očekivana tokom izlaganja SBF-u. Prevlake sa manjom veličinom kristalita su sklonije rastvaranju zato što je specifična kontaktna površina sa rastvorom veća u ovom slučaju [240]. Dakle, niže R_p vrednosti u slučaju HAP/CS/Gent prevlake se mogu pripisati manjoj veličini kristalita pre potapanja kao što je već objašnjeno u XRD analizi (397 Å za HAP/CS/Gent u odnosu na 511 Å za HAP/CS) [52].

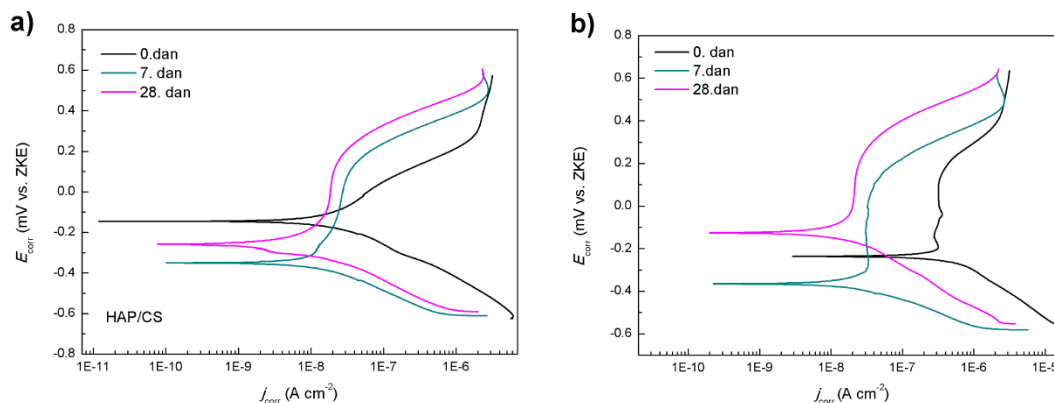
Vrednosti otpornosti prenosa naelektrisanja na graničnoj površini metal-elektrolit, R_{ct} se nisu značajno promenile nakon inicijalnog kontakta u periodu između 0. i 4. dana (0,0087-0,12 G Ω cm² za HAP/CS i 2,97-2,68 G Ω cm² za HAP/CS/Gent) budući da je elektrolit ostvario kontakt sa površinom metala kroz pore prevlake, i ukazao da je tanki oksidni sloj već bio prisutan na površini metala koji je sprečavao direktan kontakt čistog metala sa elektrolitom. Dalje su vrednosti R_{ct} rasle do završetka posmatranog perioda (1,24 G Ω cm² za HAP/CS i 13,1 G Ω cm² za HAP/CS/Gent), ukazujući na pasivizaciju površine metala koja ometa proces korozije. Štaviše, R_{ct} vrednosti su se tokom celog perioda kretale u opsegu vrednosti 10⁷-10⁹ G Ω cm² ukazujući na slabu sveopštu sklonost titana prema koroziji u SBF-u.

5.1.3.5.3. Polarizaciona merenja (PDS)

PDS metoda, iako destruktivna, daje značajne kvalitativne podatke o procesu korozije na metalnom supstratu ispod prevlake. Grafički prikaz rezultata pokazuje zavisnost korozionog potencijala, E_{corr} , od gustine struje korozije, j_{corr} . Praćenjem pomeranja polarizacionih krivih ka višim ili nižim vrednostima gustine struje dolazi se do zaključka o promeni otpornosti prema koroziji sa

promenom vremena izlaganja sistema metal-prevlaka korozionom agensu ili promenom sastava prevlake.

Polarizaciona merenja su sprovedena u cilju ispitivanja elektrohemijskog ponašanja HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaka, nakon unapred određenih perioda (0, 7 i 28 dana) izloženosti SBF-u. PDS merenja se mogu koristiti i za procenu sposobnosti biomineralizacije, praćenjem korozivnih parametara sa vremenom. Polarizacione krive prikazane na slici 18, su ukazale na povećanu stabilnost prevlaka prema koroziji sa produženom izloženosti SBF-u za oba uzorka, što sve ukazuje na poboljšana svojstva prevlaka usled formiranja biomimetičkog hidroksiapatita.



Slika 18. Potenciodinamičke polarizacione krive uzoraka a) HAP/CS i b) HAP/CS/Gent

Korozioni potencijali (E_{corr}) su dobijeni iz PDS kriva, dok su gustine struje korozije (j_{corr}) izračunate ekstrapolacijom katodnih krivih, koje su bile linearne u rasponu od najmanje jedne dekade struje, u odnosu na E_{corr} . Dobijeni podaci su prikazani u tabeli 9.

Tabela 9. PDS parametri: korozioni potencijal (E_{corr}), gustina struje korozije (j_{corr}) i vrednost nagiba katodnog dela Tafelove krive (b_c) za HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlake

Dan	Prevlaka	E_{corr} (mV vs. ZKE)	j_{corr} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	b_c (mV dec ⁻¹)
0.	HAP/CS	-145	0.061	-220
	HAP/CS/Gent	-238	0.52	-220
7.	HAP/CS	-351	0.012	-150
	HAP/CS/Gent	-365	0.035	-140
28.	HAP/CS	-258	0.011	-180
	HAP/CS/Gent	-128	0.017	-200

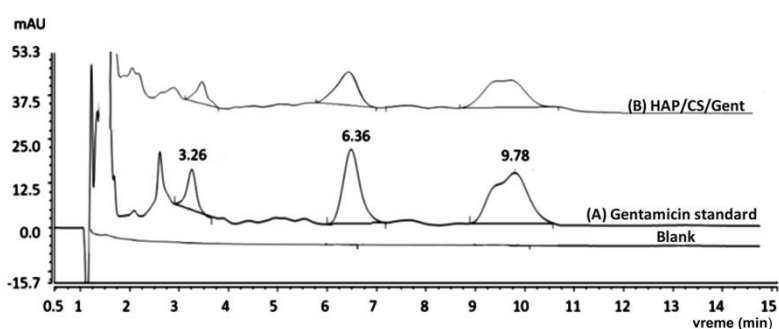
Stalno smanjenje j_{corr} vrednosti je uočeno za oba uzorka, potvrđujući poboljšanu otpornost prema koroziji kao posledicu novoformiranog sloja apatita. Nagibi katodnih delova Tafelovih krivih su ukazali na višestepeni mehanizam katodne reakcije, dok anodni nagibi nisu mogli da se izračunaju usled promenljive prirode anodne reakcije. PDS rezultati su se složili dobro sa rezultatima SEI analize, ukazujući na porast debljine HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaka odnosno na rast novog sloja biomimetičkog hidroksiapatita koji je povoljan sa aspekta osteointegracije koštanih implantata.

5.1.4. Ispitivanje otpuštanja gentamicina iz hidroksiapatit/hitozan/gentamicin prevlake

5.1.4.1. Određivanje koncentracije otpuštenog gentamicina tečnom hromatografijom visokih performansi u sprezi sa UV spektroskopijom

Količina gentamicina inkorporiranog u HAP/CS/Gent prevlaku (pripremljenog u tri nezavisna uzorka) sprovedena je primenom HPLC-UV metode nakon derivatizacije. Retenciona vremena detektovanih komponenti gentamicina iznosila su približno 3,3, 6,4 i 9,8 minuta, dok je ukupno vreme analize bilo 15 minuta.

Na osnovu eksperimentalnih podataka, utvrđeno je da prosečna količina gentamicina adsorbovanog na površini od 1 cm² HAP/CS/Gent prevlake iznosi $7,3 \pm 0,1$ µg. Reprezentativni hromatogrami gentamicina inkorporiranog u HAP/CS/Gent prevlaku, kao i referentnog rastvora antibiotika, prikazani su na slici 19.

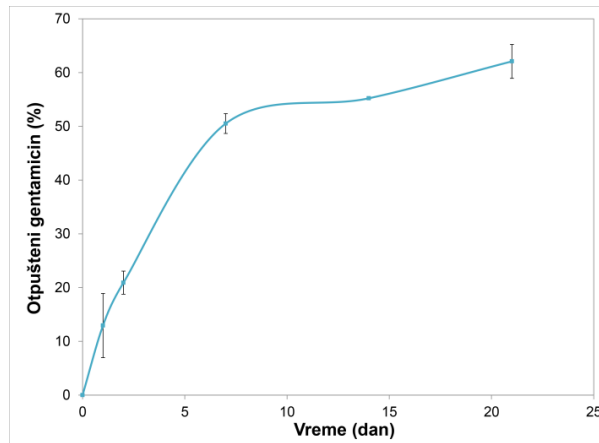


Slika 19. Hromatogrami dobijeni za (A) standardni rastvor gentamicina i (B) gentamicin inkorporiran u HAP/CS/Gent prevlaku; UV detekcija izvršena je na 330 nm

5.1.4.2. Određivanje koncentracije otpuštenog gentamicina tečnom hromatografijom visokih performansi u sprezi sa masenom spektrometrijom

HPLC-UV metodom je uspešno određena ukupna količina gentamicina inkorporirana u prevlaci ali odgovarajući profili otpuštanja gentamicina nisu dobijeni, verovatno zbog niskih koncentracija leka i manje osetljivosti instrumenta. Stoga su količina inkorporiranog gentamicina u prevlaku i odgovarajući profili otpuštanja dobijeni tečnom hromatografijom visokih performansi u sprezi sa masenom spektrometrijom (HPLC-MS). Ukupna količina gentamicina je određena rastvaranjem prevlake u 10 % rastvoru HCl u pa merenjem na HPLC-MS instrumentu. Ovako određena masa gentamicina inkorporirana u 1 cm² HAP/CS/Gent prevlake je iznosila 9,4 µg.

Otpuštanje gentamicina iz HAP/CS/Gent prevlake je ispitivano tokom 21-og dana potapanja u dejonizovanoj vodi. Kumulativni profil otpuštanja za HAP/CS/Gent prevlaku u unapred određenim vremenskim intervalima (24h, 48h, 7 dana, 14 dana i 21 dan) je prikazan na slici 20 kao prosečna vrednost tri uzorka. Profil otpuštanja gentamicina je potvrdio inicijalno naglo otpuštanje gentamicina iz prevlake, odnosno više od 50 % inkorporiranog antibiotika je otpušteno u prvih 7 dana.



Slika 20. Kumulativno otpuštanje gentamicina iz HAP/CS/Gent prevlake tokom 21 dana u dejonizovanoj vodi na 37 °C

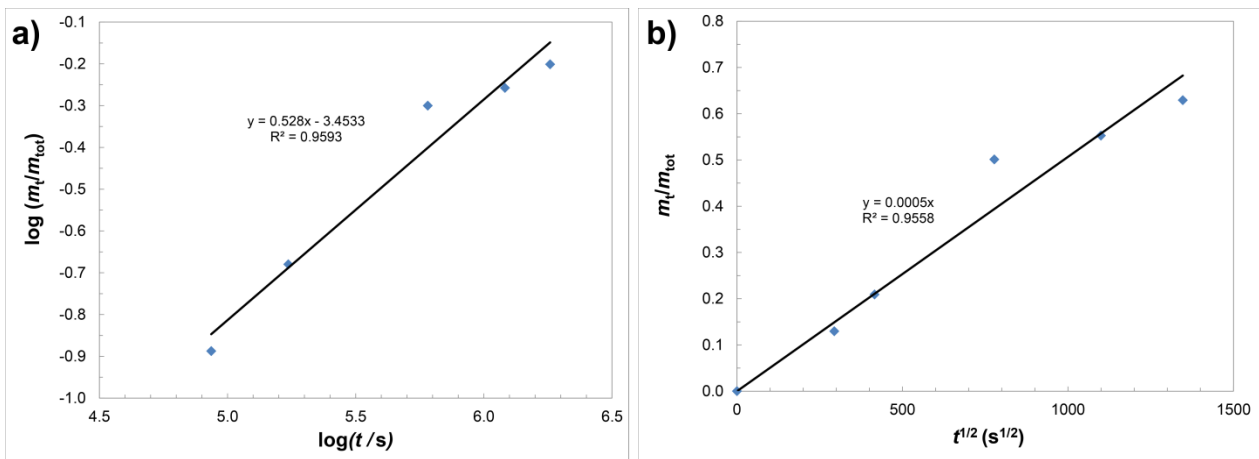
Izraženo naglo otpuštanje antibiotika (~21 %) je takođe primećeno u prvih 48h, što je efekat koristan u prevenciji formiranja biofilma. Nešto sporije otpuštanje, od 13 % ukupne količine leka je zabeleženo u periodu od 7. do 21.-og dana. Razmatrajući dobijene profile otpuštanja, ispitivane prevlake mogu da imaju potencijalnu primenu kao sistemi za produženu isporuku lekova za lečenje ortopedskih infekcija.

U cilju ispitivanja mehanizama otpuštanja i određivanja difuzionog koeficijenta otpuštanja, izvršeno je fitovanje eksperimentalnih podataka sa nekoliko difuzionih modela. Prvi korišćeni model je Korsmejer-Peppas model [243], koji se može opisati jednačinom (9), gde m_t predstavlja masu gentamicina otpuštenu u vremenu t , m_{tot} predstavlja inicijalnu (ukupnu) masu gentamicina u prevlaci pre eksperimenta, k_{KP} je Korsmejer-Peppas konstanta, koja obuhvata određena svojstva nosača sistema, i n je koeficijent koji zavisi od tipa difuzije ($n \sim 0,5$ za Fikovsku i $n > 0,5$ za ne-Fikovsku difuziju) i trebalo bi da ukaže na mehanizam prenosa mase. Korsmejer-Peppas model je primenjen u njegovom linearnom obliku, gde su podaci transformisani u logaritamsku skalu (jednačina (10)) [243].

$$\frac{m_t}{m_{tot}} = k_{KP} \times t^n \quad (9)$$

$$\log\left(\frac{m_t}{m_{tot}}\right) = \log k_{KP} + n \times \log t \quad (10)$$

Na ovaj način je moguće izračunati eksponent n iz nagiba Korsmejer-Peppas krive (slika 21). Dobijena je vrednost od 0,528 za prevlaku HAP/CS/Gent. S obzirom da je n vrednost bliska 0,5, mehanizam otpuštanja gentamicina iz HAP/CS/Gent prevlake određen je Fikovim zakonom difuzije.



Slika 21. Rezultati fitovanja profila otpuštanja gentamicina iz HAP/CS/Gent prevlake: a) Korsmeyer–Peppas model i b) aproksimacija ranog vremena (ETA)

Kako je vremenski eksponent iz Korsmeyer-Peppas modela iznosio 0,528, primenjen je model koji pretpostavlja linearnu zavisnost količine otpuštenog gentamicina od kvadratnog korena vremena, odnosno model aproksimacije ranog vremena (eng. *Early Time Approximation*, ETA) koji omogućava izračunavanje koeficijenta difuzije otpuštanja gentamicina iz prevlaka (jednačina (11)). Prema Ritgeru i Pepasu [244] ovaj model je pogodan za jednodimenziono otpuštanje iz tankih filmova.

$$\frac{m_t}{m_{tot}} = 4 \times \left(\frac{Dt}{\pi\delta^2} \right)^{1/2} \quad (11)$$

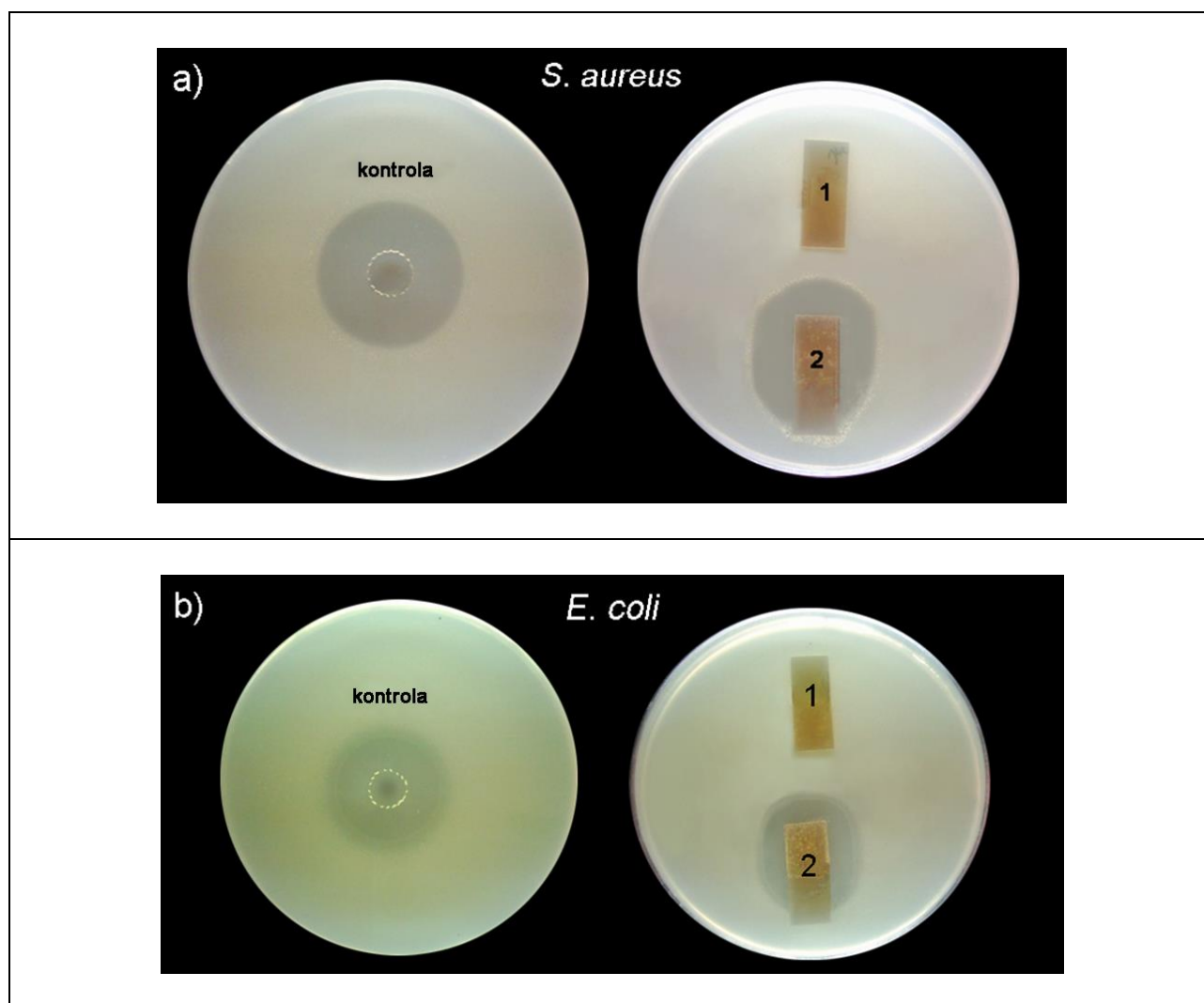
Parametri jednačine (11) su sledeći: m_t - masa gentamicina otpuštena u vremenu t , m_{tot} - inicijalna (ukupna) masa gentamicina u prevlaci pre eksperimenta, D - koeficijent difuzije gentamicina, t - vreme, i δ - debljina prevlake. ETA je aproksimacija koja se odnosi na Fikov difuzioni model za otpuštanje iz tankih polimernih-kompozitnih uzoraka, i važi za prvih 60 % otpuštanja (što je upravo postignuto u ovom eksperimentu). ETA model je primenjen na profilu otpuštanja gentamicina iz HAP/CS/Gent i [244] prikazan je na slici 21b. Koeficijent difuzije, D , za HAP/CS/Gent prevlaku iznosio je $2,4 \times 10^{-14} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, ukazujući na sporo otpuštanje gentamicina iz prevlake tokom 21 dana. Sporo otpuštanje tokom perioda od 21 dana može da ukaže na dobro vezivanje gentamicina za matricu prevlake kao i uspešno EPD nanošenje antibiotika. Ovi rezultati su u dobroj korelaciji sa rezultatima otpuštanja gentamicina koje su dobili Pishbin i saradnici [108], gde je ustanovljeno da je ~70 % gentamicina oslobođeno nakon 56 dana iz prevlake biostakla dobijene elektroforetskim taloženjem. Ovo sporo i produženo otpuštanje bi moglo da bude veoma korisno za predviđenu primenu kao prevlake ortopedskih implantata, gde je stopa postoperativnih infekcija visoka i gde sistemska primena antibiotika nosi sa sobom mnogo rizika, kao što je pojava otpornih bakterijskih sojeva. Stoga, prevlake sa inkorporiranim antibioticima bi mogle da predstavljaju dobro rešenje, pošto obezbeđuju brzu i ciljanu isporuku lekova. Naglo otpuštanje, kao što se može videti na profilu otpuštanja gentamicina (slika 20) je potrebno za suzbijanje početne bakterijske infekcije i sprečavanje formiranja biofilma. Međutim, bilo bi neprihvatljivo jer bi velika količina inkorporiranog leka bila otpuštena odjednom mogla da izazove toksičan efekat na okolno tkivo. Produženim otpuštanjem u toku 21-og dana, zaštita mesta implantacije od infekcije je obezbeđena u kritičnom periodu posle operacije.

5.1.5. Ispitivanje bioloških svojstava hidroksiapatit/hitozan prevlaka sa i bez dodatka gentamicina

5.1.5.1. Antibakterijska aktivnost

5.1.5.1.1. Agar difuziona metoda

Antibakterijska aktivnost HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaka (dobijenih taloženjem iz suspenzije sa 1 mg/ml gentamicina) je ispitana prema dva bakterijska soja *S. aureus* TL i *E. coli* ATCC 25922, vrsta koje su najčešće uzročnici postoperativnih infekcija u slučaju ortopedskih zahvata. Rezultati agar difuzionog testa su prikazani na slici 22.



Slika 22. Antibakterijska aktivnost rastvora gentamicina (kontrola, 1 mg/ml), HAP/CS (uzorak 1) i HAP/CS/Gent (uzorak 2) prevlaka prema a) *S. aureus* TL i b) *E. coli* ATCC 25922

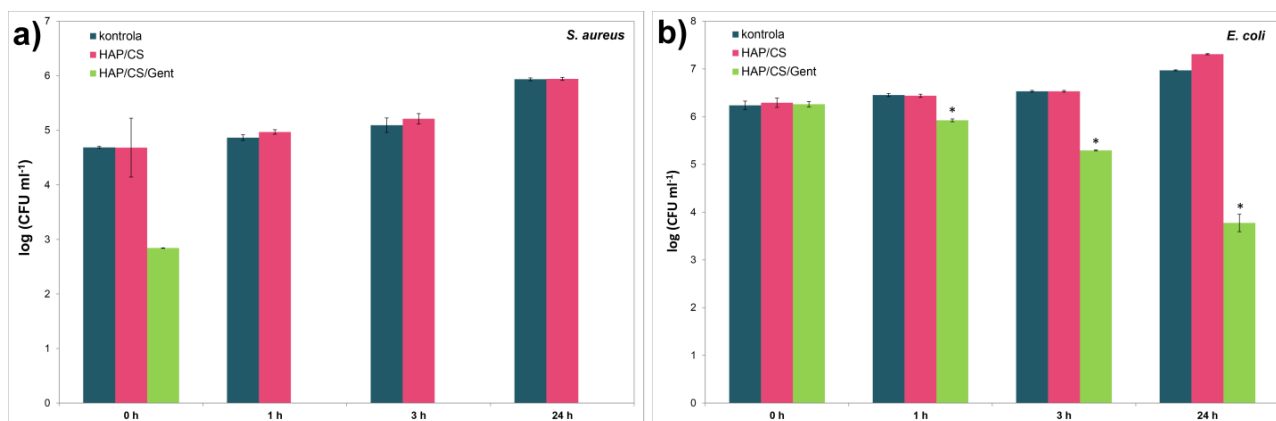
Pravougaoni uzorci Ti pločica sa prevlakama dimenzija 10 x 10 mm su postavljeni na površinu hranljivog top agara zasejanog sa ispitivanim sojevima bakterija. U slučaju oba bakterijska soja, kao kontrola je korišćen čist rastvor gentamicina (50 μ L rastvora gentamicina koncentracije 1 mg/mL je dodato u bunare prečnika 8 mm). Kod soja *S. aureus* TL, uočeno je da kontrolni uzorak rastvora gentamicina daje zonu inhibicije prečnika 31 mm (slika 22a), dok oko HAP/CS prevlake nije primećeno formiranje zone inhibicije (slika 22a, uzorak 1). Dodatkom gentamicina u prevlaku (HAP/CS/Gent), oko uzorka se pojavljuje jasna i široka zona inhibicije, dimenzija 35 x 27 mm (slika 22a, uzorak 2). Zona inhibicije uočena kod soja *E. coli* ATCC 25922, i u kontrolnom uzorku rastvora

gentamicina, se sastojala od jedne svetlije oblasti prečnika 24 mm, koja ukazuje na maksimalnu osetljivost bakterija, kao i druge tamnije oblasti prečnika 30 mm, što ukazuje na različitu osetljivost ćelija prisutnih u populaciji ove kulture na antibiotik gentamicin (slika 22b). Kao i kod soja *S. aureus*, zona inhibicije nije zapažena oko uzorka HAP/CS (slika 22b, uzorak 1), dok je kod HAP/CS/Gent uzorka (slika 22b, uzorak 2) primećena jasna zona inhibicije, koja se, kao i pri ispitivanju kontrolnog uzorka rastvora gentamicina prema soju *E. coli*, sastojala od svetlije (26 x 23 mm) i tamnije oblasti (30 x 26 mm). Na osnovu izmerenih dimenzija zona inhibicije formiranih oko uzorka sa dodatkom gentamicina (uzorak 2 – HAP/CS/Gent), može se zaključiti da prevlake dobijene elektroforetskim taloženjem iz suspenzije sa gentamicinom koncentracije 1 mg/ml ispoljavaju veoma jaku antibakterijsku aktivnost prema ispitivanim sojevima *S. aureus* TL i *E. coli* ATCC 25922. Na osnovu rezultata dobijenih agar difuzionom metodom može se primetiti da prevlaka sa dodatkom gentamicina (HAP/CS/Gent) pokazuje jaču antibakterijsku aktivnost prema *S. aureus* TL nego prema soju *E. coli* ATCC 25922.

Gentamicin pokazuje jaku antibakterijsku aktivnost prema vrstama roda *Staphylococcus*, kao i vrstama iz roda *Streptococcus* [256], pa je i njegovo jako baktericidno dejstvo postignuto u ovom radu prema soju *Staphylococcus aureus* očekivano. Prikazani rezultati agar difuzionog testa potvrdili su antibakterijsku aktivnost HAP/CS/Gent prevlake i otvorili mogućnost njihove primene u biomedicini, jer je gentamicin jedan od retkih termički stabilnih antibiotika koji zadržava svoju antibakterijsku aktivnost i nakon sterilizacije u autoklavu (30 minuta na 121 °C), što ga čini posebno interesantnim za dobijanje antibakterijskih prevlaka za koštane implantate i nosače lekova.

5.1.5.1.2. Ispitivanje kinetike antibakterijske aktivnosti

Na slikama 23a i 23b prikazana je kinetika antibakterijske aktivnosti HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaka prema sojevima *S. aureus* TL i *E. coli* ATCC 25922, praćenjem tokom perioda od 24h promene ukupnog broja preživelih u suspenziji sa i bez ispitivanih uzoraka (HAP/CS, HAP/CS/Gent).



Slika 23. Kinetika antibakterijske aktivnosti i opadanje ukupnog broja živih ćelija kod sojeva a) *S. aureus* TL i b) *E. coli* ATCC 25922 nakon inkubacije suspenzije sa HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlakama u fosfatnom puferu tokom 0, 1h, 3h i 24h na 37 °C (*-p < 0,01)

HAP/CS prevlaka bez dodatka antibiotika nije pokazala antibakterijsku aktivnost ni prema jednom ispitivanom bakterijskom soju (slika 23). Iako je u nekim istraživanjima utvđeno da hitozan poseduje antibakterijsku aktivnost, njegova efikasnost umnogome zavisi od stepena deacetilacije, molarne mase i koncentracije. Tako je u jednoj studiji pokazano da minimalna koncentracija, neophodna da dođe do potpune inhibicije rasta i razmnožavanja ćelija *E. coli* iznosi 0,02 mas. % za hitozan stepena deacetilacije 85 % [257], dok se u drugoj studiji minimalna inhibitorna koncentracija za *S. aureus* kretala u opsegu od 0,04 mas. % do 0,1 mas. % [258]. Prevlaka bez antibiotika, HAP/CS,

nije pokazala značajnu antibakterijsku aktivnost prema ispitivanim bakterijskim sojevima (Slika 23), što se može pripisati nedovoljnoj koncentraciji korišćenog hitozana u prevlaci da bi samostalno mogao da ispolji antibakterijski efekat. Međutim, korišćeni hitozan je formirao adekvatnu matricu za efikasnu inkorporaciju gentamicina, čime je omogućena njegova antibakterijska aktivnost. S druge strane, HAP/CS/Gent prevlaka je ispoljila jako baktericidno dejstvo prema soju *S. aureus* TL i to odmah nakon kontakta sa ćelijama, što je dovelo do opadanja ukupnog broja ćelija u suspenziji za 2 logaritamske jedinice kao rezultat naglog efekta otpuštanja antibiotika iz formiranih prevlaka. Kod ovog soja primećeno je da već nakon 1h inkubacije u suspenziji sa HAP/CS/Gent prevlakom dolazi do potpune redukcije početnog broja ćelija (slika 23a). U poređenju sa sojem *S. aureus* TL, antibakterijska aktivnost HAP/CS/Gent prevlake prema *E. coli* (slika 23b) je bila slabije izražena, iako u ovom slučaju dolazi do statistički značajnog ($p < 0,01$) opadanja ukupnog broja ćelija u suspenziji nakon 24h inkubacije (redukcija od ~3 logaritamske jedinice). Ovakvo antibakterijsko dejstvo se, međutim, ne može klasifikovati kao baktericidno, već samo kao bakteriostatsko [259].

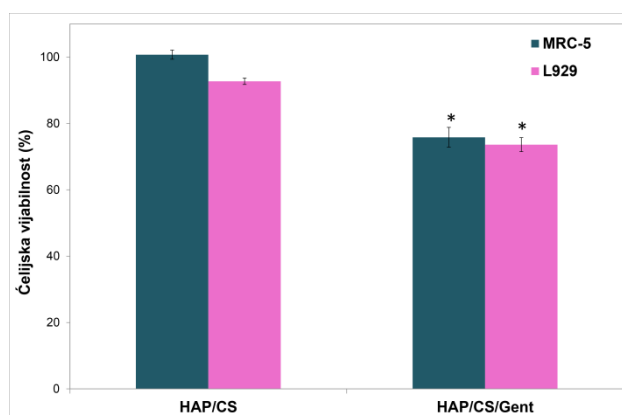
Poređenjem ovih rezultata sa rezultatima otpuštanja gentamicina iz prevlaka, uočena je visoka efikasnost otpuštene količine gentamicina u početnom periodu (efekat “naglog” otpuštanja) prema bakterijskom soju *Staphylococcus aureus* gde je broj ćelija opao za ~5 logaritamskih jedinica, dok je opadanje ukupnog broja ćelija uočeno i kod soja *Escherichia coli* za ~ 2 logaritamske jedinice čime je potvrđena dobra antibakterijska aktivnost prevlaka u kratkom vremenskom periodu, odnosno već u toku 24h inkubacije [52]. Ovaj efekat naročito je bio izražen prema soju *S. aureus* TL, vrsti koja je česti uzročnik postoperativnih infekcija nakon ugradnje implantata. Primenom HAP/CS/Gent prevlaka na implantatima omogućilo bi se, da se na mestu njihove primene, 100% smanji broj ćelija ove vrste u periodu svega 3h [52], što je u saglasnosti sa brzim otpuštanjem gentamicina iz prevlaka na samom početku ispitivanja.

5.1.5.2. Citotoksičnost

5.1.5.2.1. MTT test

In vitro testovi citotoksičnosti se koriste kako bi se ispitao nivo citotoksičnosti materijala različitog sastava. Citotoksičnost u *in vitro* uslovima se često procenjuje MTT testom. Raspadanjem rastvorne tetrazolijumske boje MTT nastaje nerastvoran proizvod, formazan, za koji su ćelijske membrane nepropusne i koji se usled toga taloži i akumulira u zdravim ćelijama.

Formazan je čvrsta supstanca ljubičaste boje, pa se praćenjem promene boje rastvora sa ćelijama može pratiti i ćelijska aktivnost [245]. Rezultati MTT testa za prevlake HAP/CS i HAP/CS/Gent su prikazani na slici 24, kao srednja vijabilnost ćelija izražena procentualno u odnosu na kontrolu (rastvor koji sadrži samo ćelije, bez uzorka prevlake). Na osnovu deskriptivne skale citotoksičnosti, (S , ćelijska vijabilnost $> 90\%$ – necitotoksični, $60 - 90\%$ – blago citotoksični, $30 - 60\%$ – umereno citotoksični, $\leq 30\%$ – citotoksični) [246], može se zaključiti da HAP/CS prevlaka nije citotoksična prema MRC-5 i L929 ćelijskim linijama, jer su vrednosti vijabilnosti ćelija bliske 100% . Blago smanjenje vijabilnosti L929 ćelija u odnosu na MRC-5 se može pripisati pojačanoj osetljivosti mišje ćelijske linije prema prevlakama, u poređenju sa MRC-5 humanim fibroblastima.

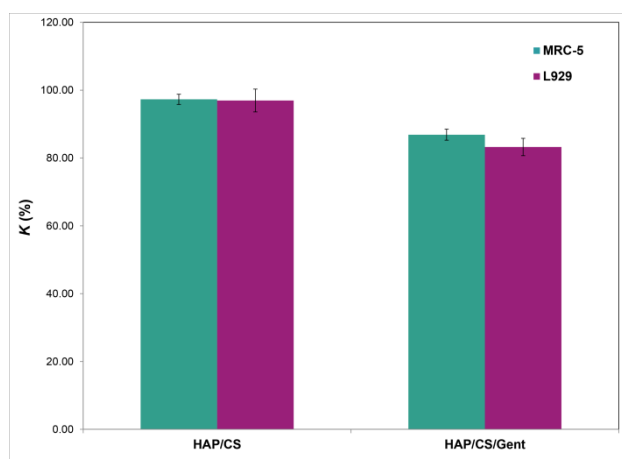


Slika 24. Srednja vijabilnost MRC-5 i L929 ćelijskih kultura nakon inkubacije sa uzorcima Ti pločica sa HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlakama (*-p < 0,01)

U slučaju HAP/CS/Gent prevlake, dolazi do statistički značajnog ($p < 0,01$) smanjenja vijabilnosti obe ćelijske linije, u poređenju sa HAP/CS prevlakom bez dodatka antibiotika. Kako je ovo smanjenje vijabilnosti primetno u slučaju obe ćelijske linije, može se zaključiti da su ovakvi rezultati posledica prisustva gentamicina. Gentamicin je široko korišćen antibiotik u laboratorijskim ispitivanjima [247]. Pokazao se efikasnim protiv širokog spektra mikroorganizama u koncentraciji od 0,5 do 50 $\mu\text{g/ml}$. Gentamicin je stabilan u širokom pH opsegu, termostabilan i netoksičan za ćelijske kulture u datim dozama. Koristi se za održavanje ćelijskih linija kako bi se sprečila kontaminacija, ali i za tretman inficiranih ćelijskih kultura [248]. Eksperimentalno je pokazano da određeni tipovi ćelija mogu ispoljiti povećanu osetljivost na gentamicin [249] koja može dovesti do apoptoze [250] iako se gentamicin već dugo koristi za lečenje ljudi i životinja [251]. Vrednosti vijabilnosti ćelija su bile više od 75 % i za MRC-5 i za L929 ćelijske linije, pa se, prema gore navedenoj skali citotoksičnosti, HAP/CS/Gent prevlake mogu klasifikovati kao blago citotoksične, i mogu se smatrati pogodnim materijalima za koštane implantate.

5.1.5.2.2. Test odbacivanja boje tripan-plavo (DET)

Test isključenja boje se najčešće koristi za procenu udela vijabilnih ćelija [186,252]. Žive ćelije imaju neoštećenu membranu pa ne upijaju boju dok mrtve ćelije imaju oštećenu membranu i upijaju boju. Procenat obojenih/neobojene ćelije ili inhibicija rasta (% K) je izražen kao procenat kontrole. Rezultati DET testa za MRC-5 (ljudski fibroblasti) i L929 (mišji fibroblasti) u prisustvu HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaka su dati na slici 25.



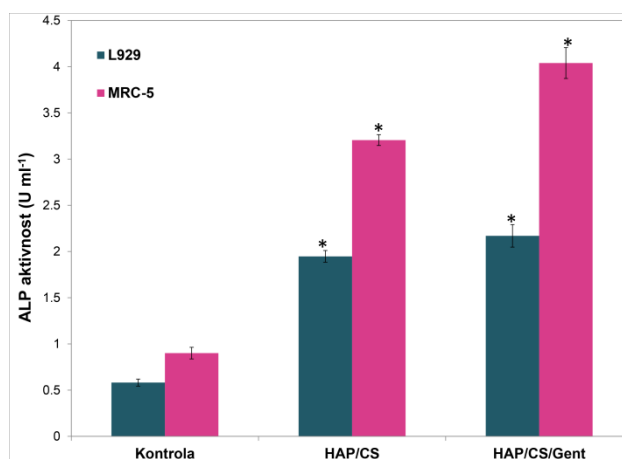
Slika 25. Inhibicija rasta (% K) MRC-5 i L929 ćelijskih linija u prisustvu HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaka

U slučaju HAP/CS prevlake nije primećena inhibicija rasta za obe ćelijske linije MRC-5 i L929, s obzirom da su vrednosti bile bliske 100 %. I u slučaju DET testa, oslobađanje gentamicina je dovelo do smanjenja rasta ćelija u prisustvu HAP/CS/Gent prevlake (slika 25). Procenat vijabilnosti za obe testirane ćelijske linije je bio iznad 85 %. Prema statističkoj analizi izvršenoj primenom jednofaktorske metode analize varijanse, razlika u vijabilnosti obe MRC-5 i L929 ćelijske linije je bila statistički zanemarljiva ($p > 0,01$).

Oba testa, MTT i DET su potvrdila necitotoksični efekat HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaka na obe testirane ćelijske linije, koje bi se stoga mogle smatrati sigurnim materijalom za primenu u medicini.

5.1.5.3. Test alkalne fosfataze

Alkalna fosfataza (ALP) je najviše korišćen biohemijski marker za procenu aktivnosti osteoblasta. Iako se o njegovoj preciznoj funkciji malo zna, veruje se da ima ulogu u mineralizaciji skeleta. Alkalna fosfataza (ALP) katalizuje hidrolizu fosfatnih estara u alkalnom puferu i proizvodi organske radikale i neorganske fosfate. Promene nivoa i aktivnosti alkalne fosfataze povezane su sa različitim stanjima bolesti kostiju. Diferencijacija ćelija sličnih osteoblastima je važna u procesu zaceljenja, a sposobnost indukovanja diferencijacije je jedan od zahteva kako bi se neki biomaterijal mogao smatrati bioaktivnim. ALP je membranski vezan biohemijski marker za rast kostiju, koji luče osteoblasti. Rezultati ALP testa koji su izvedeni na ćelijskom ekstraktu su pokazali da su prevlake HAP/CS/Gent prouzrokovale najviši sadržaj ALP u ćelijskom ekstraktu (slika 26). Obično se ALP test izvodi na ćelijama osteoblasta ili drugim ćelijskim linijama koje mogu da diferenciraju u osteoblaste. Međutim, u okviru ove doktorske disertacije odlučeno je da se prvo testira osnovni potencijal ekspresije ALP-a prevlaka na nespecifičnim ćelijskim linijama, iz dva razloga: da bi se potvrdio osnovni biomineralizacioni potencijal HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlaka pre nego što se pređe na specifičnije ćelije, kao što su osteoblasti, a i da bi se obezbedila konzistentnost između dva biološka testa korišćenjem istih ćelijskih linija (MRC-5 i L929) koje su korišćene u studiji biokompatibilnosti (DET test citotoksičnosti). Pored toga, pokazano je da fibroblasti MRC-5 reaguju na faktore diferencijacije koji promovisu osteoblastni fenotip u ćelijskim kulturama poreklom iz kosti [260]. Rezultati ALP testa izvedenog na ekstraktu ćelija pokazali su da HAP/CS/Gent prevlaka utiče na ispoljavanje najvišeg nivoa ALP u ćelijskom ekstraktu (slika 26).



Slika 26. Nivo ALP u ćelijskom ekstraktu MRC-5 i L920 u prisustvu HAP/CS i HAP/CS/Gent prevlake (*-p < 0,01).

Obe prevlake HAP/CS i HAP/CS/Gent su ispoljile značajno povećanu aktivnost ALP u poređenju sa kontrolom (3 puta i 4 puta povećanje nivoa ekspresije ALP za MRC-5 ćelijsku liniju, redom). Međutim, HAP/CS/Gent (4,039 U ml⁻¹) prevlaka je značajno više povećala nivo ekspresije ALP u MRC-5 ćelijama u poređenju sa HAP/CS (3,206 U ml⁻¹), što ukazuje na poboljšani biomineralizacioni potencijal prevlake sa gentamicinom. Zbog kompatibilnosti ćelija nije bilo iznenađenje da je celokupna linija MRC-5 bolje reagovala u ovom testu. Dobijeni rezultati pokazuju da oba materijala mogu da se izazovu diferencijaciju osteoprogenitora do zrelih osteoblasta. U slučaju obe prevlake, dolazi do statistički značajnog povećanja nivoa ALP-a za obe ćelijske linije, MRC-5 i L929, u odnosu na kontrolni uzorak (p < 0,01). Rezultati ALP testa su pokazali da oba materijala mogu indukovati biomineralizaciju i stoga su jaki kandidati za dalja istraživanja sa specifičnim ćelijama (osteoblastima) ili matičnim ćelijama, i mogli bi se smatrati perspektivnim prevlakama za koštane implantate.

5.2. Hidroksiapatit/hitozan/grafen i hidroksiapatit/hitozan/grafen/gentamicin prevlake

5.2.1. Elektroforetsko taloženje hidroksiapatit/hitozan/grafen prevlaka sa i bez dodatka gentamicina na površini titana

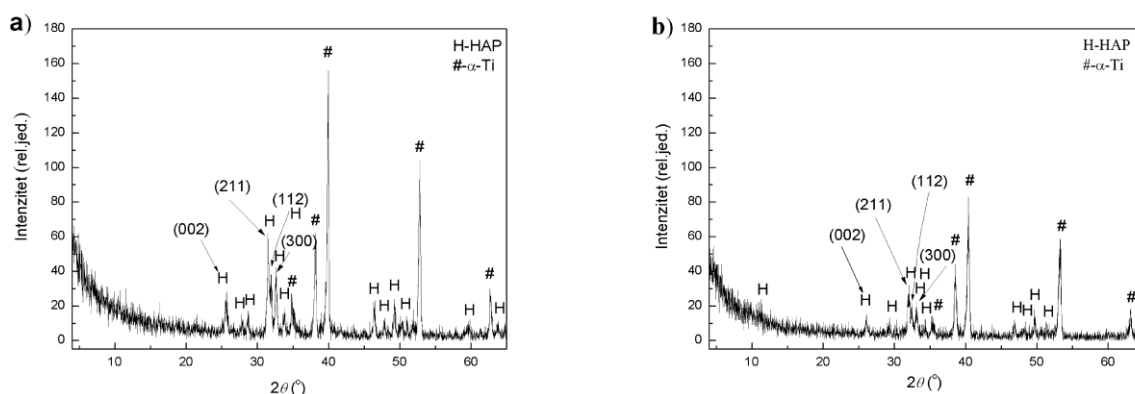
Poznato je da grafen ima sposobnost da formira jake veze sa matricom hitozana, što je posledica velikog broja p elektrona u sp^2 orbitalama koji čine površinu listova grafena negativno naelektrisanom. Negativno naelektrisana površina grafena stupa u interakciju sa protonovanim amino grupama hitozana, formirajući stabilnu suspenziju za taloženje prevlaka [140]. Sa druge strane dolazi do uspostavljanja Van der Valsovih interakcija između listova grafena i hidroksiapatita [144,153,206]. Dodatno, usled protonovanja amino i hidroksilnih grupa, gentamicin ima pozitivno naelektrisanje u vodenom sistemu u kiseljoj sredini, kao što je detaljno opisano u poglavlju 5.2.1. [108]. Na taj način sve prisutne komponente, (CS, Gr, HAP i Gent) intereaguju međusobno doprinoseći formiranju dobro dispergovane, stabilne suspenzije pogodne za taloženje kompozitnih prevlaka.

Elektroforetsko taloženje HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka na titanu je izvedeno iz vodene suspenzije u jednom koraku, iz četvorokomponentne vodene suspenzije.

5.2.2. Fizičko-hemijska karakterizacija hidroksiapatit/hitozan/grafen prevlaka sa i bez dodatka gentamicina

5.2.2.1. Rendgenska difrakciona analiza (XRD)

XRD analizom HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka (slika 27a,b), potvrđeno je prisustvo hidroksiapatita (JCPDS 09-0432) i titana (JCPDS 89-2762), koji potiče od supstrata. Difrakcioni maksimumi za hitozan, grafen i gentamicin nisu detektovani, verovatno zbog niske koncentracije u prevlakama, a sa druge strane zbog mogućnosti da su preklapljeni izraženijim difrakcionim maksimumima hidroksiapatita.



Slika 27. Difraktogrami (a) HAP/CS/Gr i (b) HAP/CS/Gr/Gent prevlaka

U slučaju obe prevlake, (slika 27a,b), može se uočiti širenje difrakcionih maksimuma, ukazujući na male kristalite hidroksiapatita. Koristeći karakteristične ravni za hidroksiapatit ((002), (211), (112) i (300)) izračunate su vrednosti d rastojanja (Tabela 10), zapremina jedinične ćelije (V), parametri jedinične ćelije (a i c) i veličina kristalita. Kao posledica inkorporacije gentamicina dolazi do smanjenja vrednosti d rastojanja za HAP/CS/Gr/Gent prevlaku u poređenju sa HAP/CS/Gr (Tabela 10).

Tabela 10. Vrednosti d -rastojanja karakterističnih kristalnih ravni za HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlake

Prevlaka	Kristalne ravni			
	(002)	(211)	(112)	(300)
	d - rastojanje, Å			
HAP/CS/Gr	3.4537	2.8271	2.7899	2.7326
HAP/CS/Gr/Gent	3.4313	2.8032	2.7695	2.7085

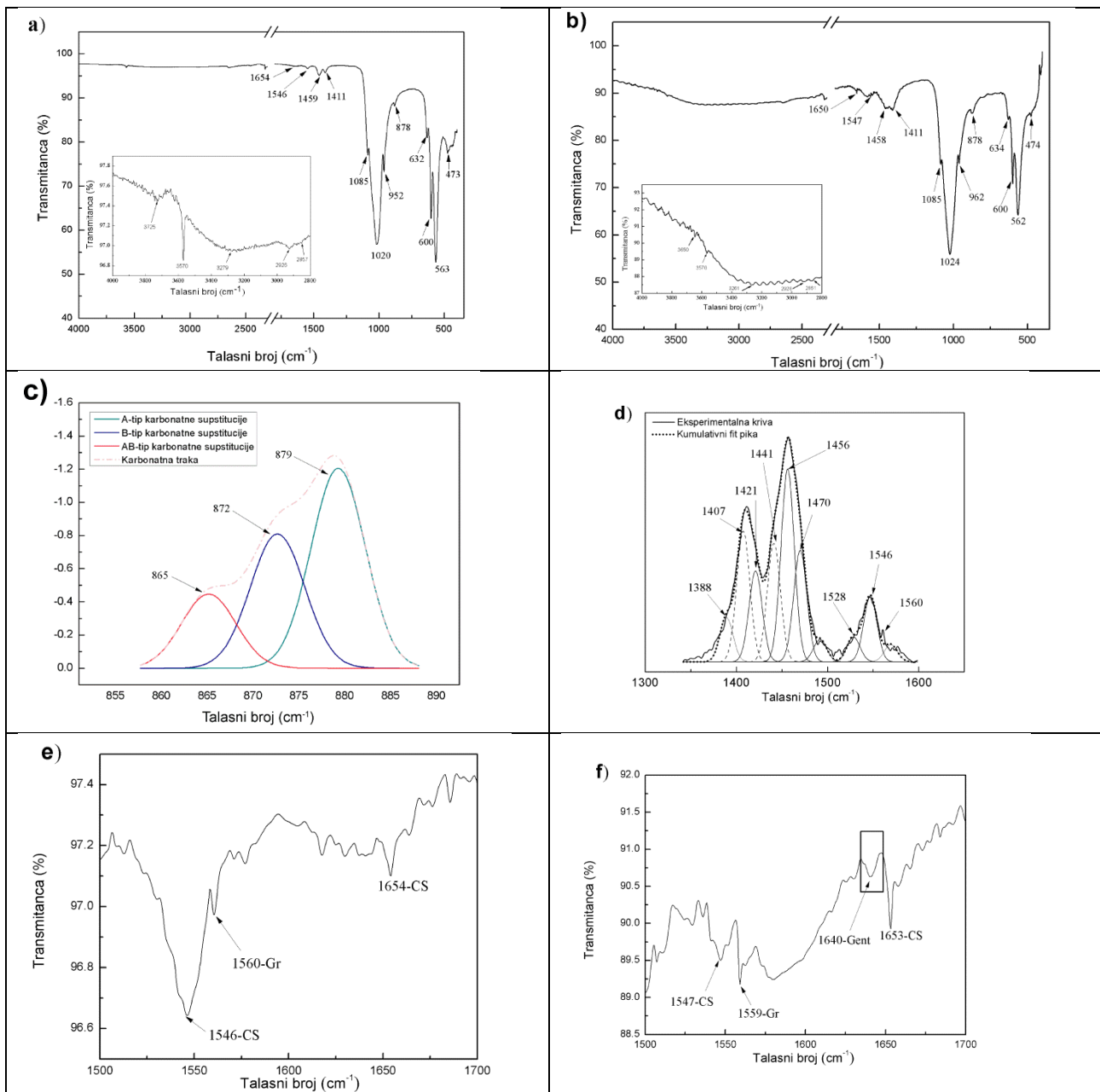
Tabela 11. Parametri jedinične ćelije a i c , zapremina jedinične ćelije V , i veličina kristalita za HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlake

Prevlaka	Parametar			Veličina kristalita, Å
	a , Å	c , Å	V , Å	
HAP/CS/Gr	9.446	6.907	536.1	435
HAP/CS/Gr/Gent	9.383	6.863	523	311

Gentamicin kao aminoglikozidni antibiotik ima brojne amino i hidroksilne grupe, omogućavajući interakciju sa $-OH$ grupama hidroksiapatita, formirajući vodonične veze ili elektrostatičkim interakcijama [5]. Dodatno, vezivanje se može ostvariti kroz međusobnu interakciju hidroksilnih i amino grupa iz hitozana i gentamicina. Sve ove interakcije su praćene intermolekulskim vezivanjem, izazivajući kontrakcije matrice hitozana i posledično smanjenje vrednosti d rastojanja [261]. Kao posledica, parametri jedinične ćelije (a i c) i zapremina jedinične ćelije (V), kao i veličina kristalita imaju niže vrednosti za HAP/CS/Gr/Gent u poređenju sa HAP/CS/Gr (Tabela 11). Veličina kristalita zavisi od kinetike kristalizacije i brzine rasta kristala. Tokom procesa sušenja prevlake, sulfatni joni (iz gentamicin-sulfata) utiču na formiranje velikog broja nukleacionih mesta. Istovremeno, pošto je gentamicin veliki molekul, postoji takođe mogućnost da on sprečava dalji rast kristala. Oba ova efekta dovode do finije strukture i manje veličine kristalita u slučaju HAP/CS/Gr/Gent prevlake, što potencijalno može doprineti i boljoj osteointegraciji usled formiranja apatita nalik koštanom apatitu [152,194].

5.2.2.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)

Karakteristične trake za HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlake na FT-IR spektru u oblasti od 400 do 4000 cm^{-1} su prikazane na slici 28a,b, redom. Dodatno, prikazani su rezultati dobijeni dekonvolucijom specifičnih spektralnih traka za HAP/CS/Gr prevlaku (slika 28c,d). Uticaj dodatka antibiotika na položaj (pomeranje) karakterističnih traka za HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlaku prikazano je na slici 28e i f, redom.



Slika 28. FT-IR spektri (a) HAP/CS/Gr i (b) HAP/CS/Gr/Gent prevlake; dekonvolucija FT-IR traka za HAP/CS/Gr prevlaku u specifičnim intervalima: karbonatne trake u intervalu od (c) 800 do 900 cm^{-1} i od (d) 1350 do 1600 cm^{-1} ; FT-IR spektri za (e) HAP/CS/Gr i (f) HAP/CS/Gr/Gent prevlaku u intervalu od 1500 do 1700 cm^{-1}

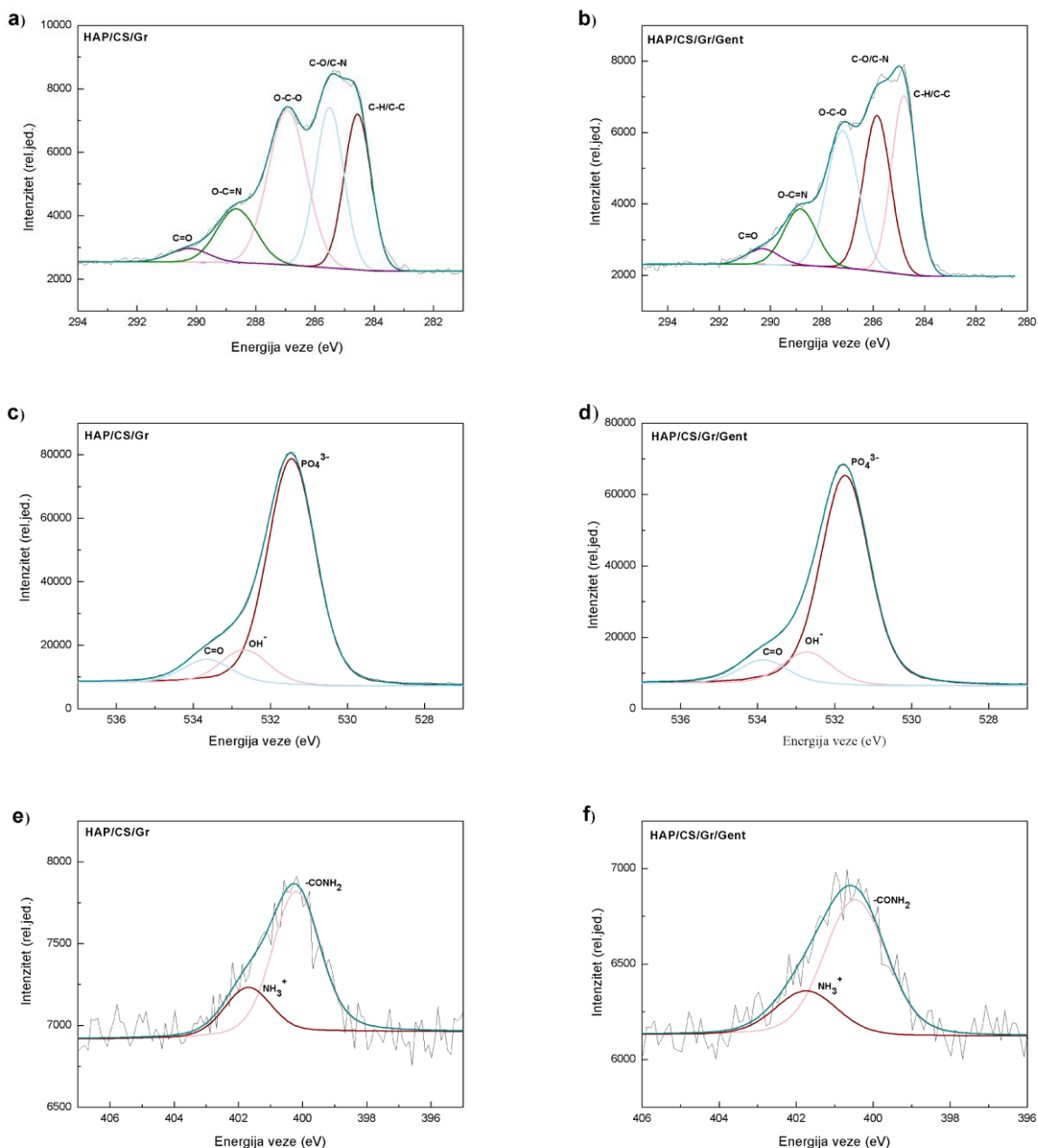
Spektralne karbonatne trake za HAP/CS/Gr prevlaku nalaze se u oblasti između 800 i 900 cm^{-1} i između 1350 i 1600 cm^{-1} (Slika 28a) [236]. Karbonatni joni mogu da supstituišu hidroksilne i/ili fosfatne grupe, formirajući karbonatni hidroksiapatit. Kada se OH^- grupa supstituiše CO_3^{2-} grupom, promena u strukturi hidroksiapatita se označava kao A tip supstitucije, a kada su PO_4^{3-} grupe zamenjene CO_3^{2-} grupama onda se takav tip supstitucije označava kao B tip [236]. Na FT-IR spektru za HAP/CS/Gr prevlaku (Slika 28a) detektovane trake na 878 cm^{-1} mogu se pripisati vibracionom modu O–C–O grupe [52,236]. U cilju određivanja tipa karbonatne supstitucije u hidroksiapatitu izvršena je dekonvolucija karbonatnog pika u oblasti 800-900 cm^{-1} (slika 28c) i 1350-1600 cm^{-1} (slika 28d). Dekonvolucijom karbonatne trake na 878 cm^{-1} je pokazano da postoje tri različita pika (slika 28c). Pik na 879 cm^{-1} se može pripisati A tipu karbonatne supstitucije, pik na 872 cm^{-1} je ukazao na prisustvo supstitucije B tipa, dok je pik na 865 cm^{-1} ukazao na prisustvo ne-apatitnih karbonata [262].

Dekonvolucija FT-IR pikova u oblasti od 1350 cm^{-1} do 1600 cm^{-1} (Slika 28d) je potvrdila prisustvo A i B tipa supstitucije u hidroksiapatitu, takođe. Trake na 1421 i 1470 cm^{-1} , kao i dublet na 1407 i 1441 cm^{-1} se mogu pripisati B tipu supstitucije [230], dok je prisustvo trake na 1528 cm^{-1} [236] ukazalo na A tip supstitucije u hidroksiapatitu (slika 28d). Traka na 1456 cm^{-1} može da se pripiše i A i B tipu karbonatne supstitucije HAP [262]. Na osnovu položaja svih karbonatnih traka, može se zaključiti da je došlo do supstitucije “AB-tipa” u HAP/CS/Gr prevlaci. Karbonatna supstitucija u strukturi hidroksiapatita je poželjna sa aspekta bioaktivnosti i biomineralizacije jer koštani apatit je po hemijskoj strukturi karbonatni hidroksiapatit [262]. Dve karakteristične trake na 1654 cm^{-1} (amid I traka) i 1546 cm^{-1} (amid II traka) za HAP/CS/Gr prevlaku (Slika 28e) su se mogu pripisati C=O istežujućoj vibraciji –NHCO- grupe i N-H savijanju u NH_2 grupi hitozana, redom [52,263]. Prisustvo hitozana u HAP/CS/Gr prevlaci je takođe potvrđeno trakama na 2857 cm^{-1} i 2926 cm^{-1} (Slika 27a), koji potiču od C-H istežanja u CS strukturi [263,264]. Na 1388 cm^{-1} (Slika 28d) je moguće uočiti traku za CH_3 simetričnu deformaciju u strukturi hitozana [265]. Trakama na 473 , 563 , 600 , 952 , 1020 , i 1085 cm^{-1} potvrđeno je prisustvo hidroksiapatita u HAP/CS/Gr prevlaci. Sve ove trake su pripisane različitim vibracionim modovima PO_4^{3-} grupe [52]. Traka na 1560 cm^{-1} se može pripisati vibraciji strukture grafena, potvrđujući na taj način njegovu uspešnu inkorporaciju u HAP/CS/Gr prevlaku [140][266]. Na dodatku (inset) na slici 28a izdvojena je oblast od 3000 cm^{-1} do 3600 cm^{-1} , gde se može uočiti izražena traka na 3570 cm^{-1} koja odgovara –OH istežanju u strukturi hidroksiapatita [199]. Široka traka na oko 3279 cm^{-1} (za HAP/CS/Gr) se može pripisati valentnim vibracijama hidroksilnih grupa, osetljivih na vodonične veze [263]. Na osnovu prethodnih tumačenja, može se pretpostaviti da se uspostavila vodonična veza između hidroksilnih grupa iz hidroksiapatita i hidroksilnih i amino grupa hitozana.

Na slici 28b je prikazan FT-IR spektar za HAP/CS/Gr/Gent prevlaku. Uopšteno, karakteristične trake, koje odgovaraju hidroksiapatitu, hitozanu i grafenu se mogu uočiti za HAP/CS/Gr/Gent prevlaku kao i u slučaju HAP/CS/Gr prevlake. Nakon inkorporacije gentamicina u HAP/CS/Gr/Gent prevlaku, uočena je nova traka na 1640 cm^{-1} (slika 28f). Ova traka se može pripisati N–H savijajućoj vibraciji primarnih aromatičnih amina [267], potvrđujući prisustvo gentamicina u kompozitnim prevlakama. Pomeranjem karakterističnih traka za hitozan ka nižim talasnim brojevima, u slučaju prevlake sa gentamicinom, dodatno je potvrđena interakcija gentamicina sa hidroksiapatitom i hitozanom. Malo pomeranje trake za HAP/CS/Gr sa 3279 cm^{-1} (inset na slici 28a) na 3261 cm^{-1} za HAP/CS/Gr/Gent prevlaku (inset na slici 28b) je posledica uvođenja gentamicina u prevlaku. Ove trake su pripisane valentnim vibracijama hidroksilnih grupa, osetljivih na vodonične veze [263]. Zato je moguće pretpostaviti da je došlo do uspostavljanja vodoničnih veza između hidroksilnih grupa hidroksiapatita i amino i hidroksilnih grupa hitozana sa amino i hidroksilnim grupama gentamicina.

5.2.2.3. Rendgenska fotoelektronska spektroskopija (XPS)

Dekonvoluirani XPS C1s, O1s, i N1s spektri visoke rezolucije za HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlake su prikazani na slici 29. C1s pik je fitovan i razložen na 5 različitih modova (Slika 29a,b) koji su pripisani C–H/C–C ($284,6\text{ eV}$), C–O/C–N ($285,5\text{ eV}$), O–C–O ($286,9\text{ eV}$), O–C=N ($288,65\text{ eV}$) i C=O ($290,2\text{ eV}$) koji potiče iz grafena [268], i acetatne i amidne grupe karakteristične za hitozan [269]. Slične energije vezivanja na $284,8$, $285,8$, $287,2$, $288,8$ i $290,3\text{ eV}$ za C1s pik su pronadjene i u slučaju HAP/CS/Gr/Gent prevlake i pripisane su C–H/C–C, C–O/C–N, O–C–O, O–C=N i C=O, respektivno. Karakteristični pikovi za gentamicin na $287,2\text{ eV}$ (O–C–O) i $288,8\text{ eV}$ (O–C=N) koji potiču iz acetatnih i metilamino grupa iz gentamicina, preklapljenih sa acetatnim i amidnim grupama iz hitozana [219,220], tako da su slični pikovi dobijeni za obe prevlake.



Slika 29. XPS spektri visoke rezolucije HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka: (a) i (b) C1s; (c) i (d) O1s; (e) i (f) N1s.

O1s pik visoke rezolucije je fitovan u tri različita moda (slika 29c,d). Pikovi na 531,4 i 531,7 eV za HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent respektivno se mogu pripisati PO_4^{3-} grupi iz HAP-a, dok pikovi na 532,7 eV u slučaju obe prevlaka mogu da predstavljaju doprinos iz hidroksilnih grupa iz HAP-a, CS-a i Gent-a. Pikovi na 533,6 eV za HAP/CS/Gr i 533,8 eV za HAP/CS/Gr/Gent se mogu pripisati C=O interakcijama, koje potiču iz hitozana i gentamicina [52]. Slike 29e,f predstavljaju dekonvoluciju N1s spektara visoke rezolucije za HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent. Pikovi na 400,2 i 400,5 eV za HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent, respektivno su pripisani C-NH₂ interakcijama (slobodni amini) [270], dok su pikovi na 401,7 eV za oba spektra pripisani C-NH₃⁺ interakcijama (protonovani amini) [52,220].

Imajući u vidu da je u eksperimentima korišćen rastvor gentamicin-sulfata, XPS spektar HAP/CS/Gr/Gent prevlaka je pokazao S2p pik, koji je jasno potvrdio inkorporaciju gentamicina. S2p pik je fitovan komponentom na 170 eV [52]. Elementarni sastav, izračunat iz XPS-a (tabela 12) potvrdio je inkorporaciju gentamicina prisustvom sumpora za HAP/CS/Gr/Gent prevlaku (0,7 at. %).

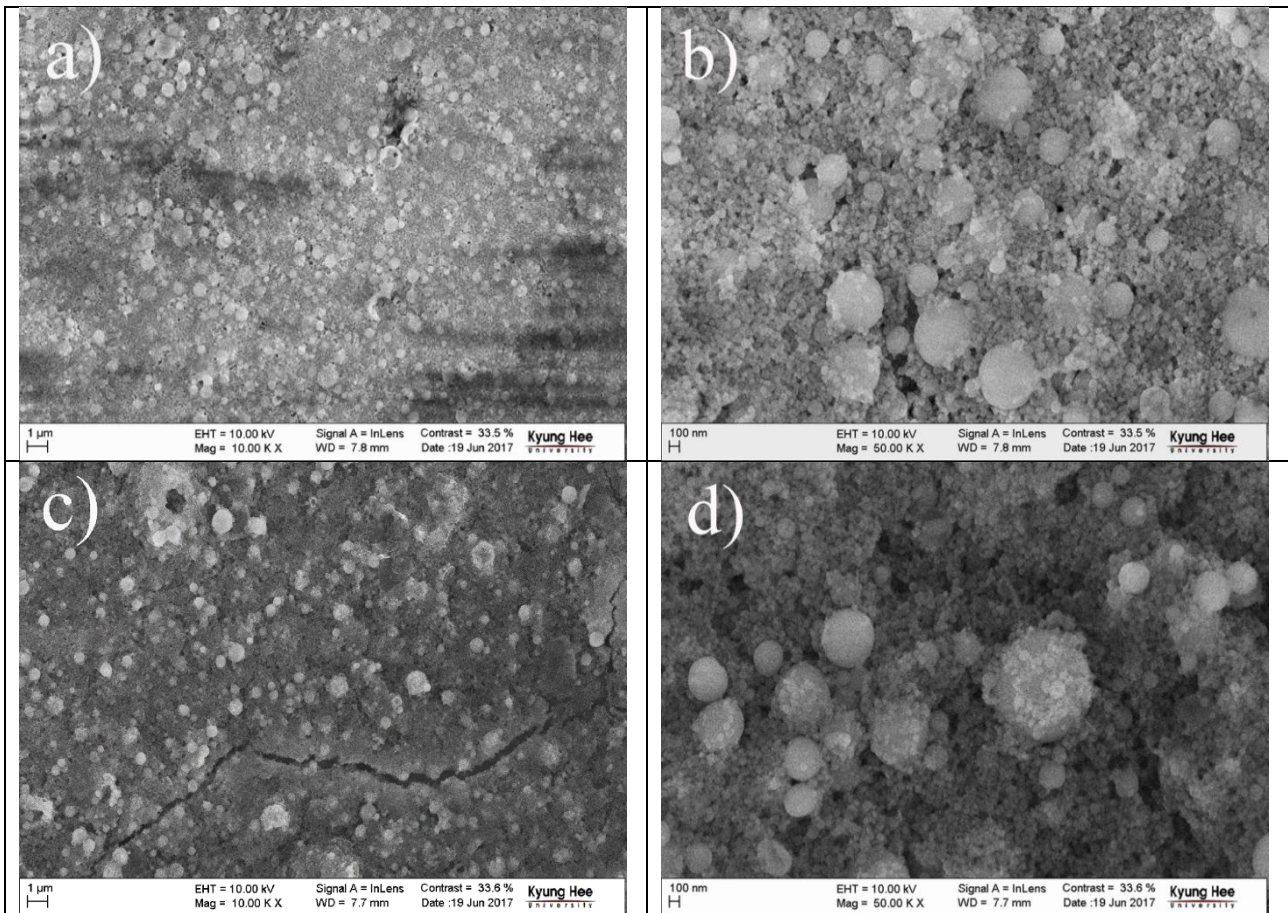
Izračunate vednosti Ca/P odnosa su iznosile 1,26 i 1,27 za HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlake, respektivno. Štaviše ove vrednosti su bile u korelaciji sa rezultatima FTIR analize potvrđujući prisustvo kalcijum-deficitarnog HAP-a. Poznato je da su bioaktivnost i osteoinduktivnost poboljšane u slučaju supstituisanog HAP-a u poređenju sa HAP-om koji zadržava stehiometrijski odnos [271,272].

Tabela 12. Površinski sadržaj elemenata u HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlakama, određen metodom XPS

	Sadržaj elemenata, at. %	
	HAP/CS/Gr	HAP/CS/Gr/Gent
C1s	21,0	21,5
O1s	51,6	51,3
N1s	1,30	1,20
P2p	11,6	11,1
Ca2p	14,6	14,1
S2p	/	0,70
Ca/P odnos	1,26	1,27

5.2.2.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija (FE-SEM)

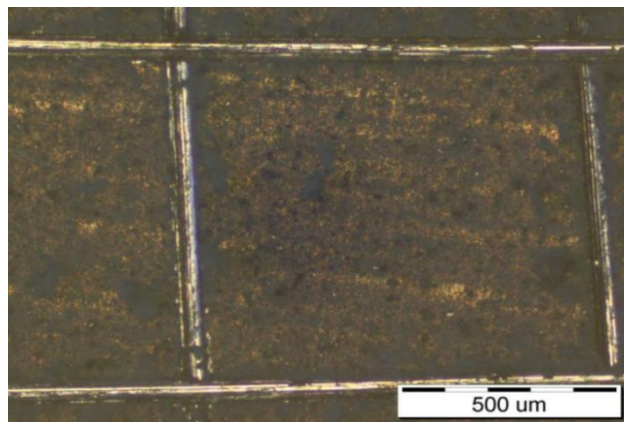
Slika 30 predstavlja morfologiju HAP/CS/Gr (slika 30a,b) i HAP/CS/Gr/Gent (slika 30c,d) prevlaka na različitim uvećanjima. Na površini HAP/CS/Gr prevlake, uočava se veliki broj sfernih čestica različite veličine (slika 30a), koje odgovaraju hidroksiapatitu koji je uniformno dispergovan unutar polimer/grafenske matrice. Na manjim uvećanjima (slika 30a,c) se mogu uočiti slojevi hitozana za obe prevlake. Na površini HAP/CS/Gr/Gent prevlake, Slika 30a, moguće je uočiti postoji nekoliko pukotina, verovatno formiranih tokom procesa sušenja na vazduhu usled visokog sadržaja vode u HAP/CS/Gr/Gent prevlaci (prema rezultatima TG analize, opisanih u Odeljku 5.2.2.7.) kao i usled skupljanja polimerne matrice tokom procesa sušenja. Usled slične morfologije HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka, može se zaključiti da inkorporacija gentamicina nije značajno uticala na površinu na mikro nivou, što se jasno vidi sa slika 30c i d. Na većim uvećanjima, površina HAP/CS/Gr prevake (slika 30b) pokazuje prisustvo sfernih aglomerata hidroksiapatita koji su prekriveni aglomeratima HAP manjih dimenzija. Moguće je pretpostaviti da do aglomeracije čestica najverovatnije dolazi usled interakcija na granici faza hidroksiapatit/polimerna matrica i može se pripisati visokoj specifičnoj površinskoj energiji čestica hidroksiapatita [261]. Čak i pri većim uvećanjima, površina obe prevlake (slika 30b,d) izgleda porozno i homogeno. Ova dobro dispergovana mreža je ojačana grafenom (Gr), koji je poznat po tome što deluje kao „materijal za vezivanje“, praveći mostove kroz polimerni matriks i sprečavajući formiranje pukotina u prevlakama [269].

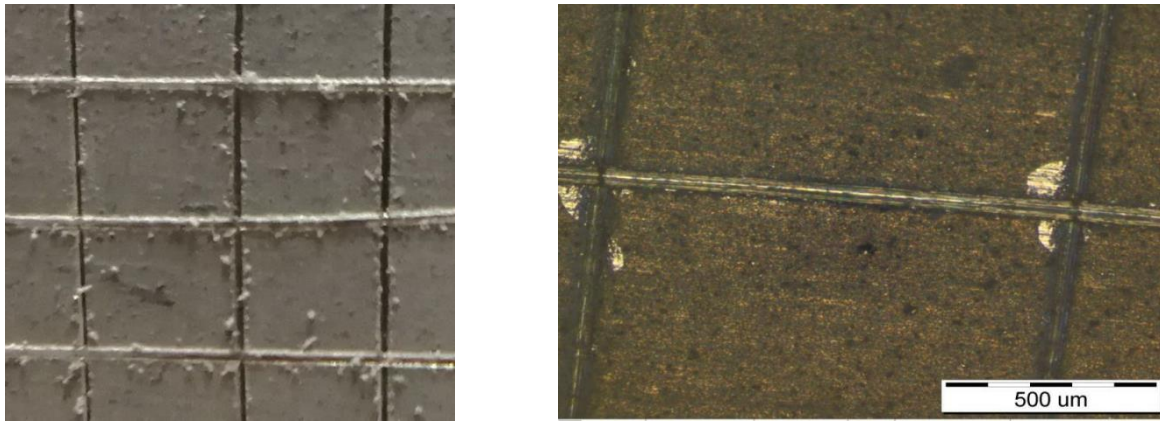


Slika 30. FE-SEM mikrofografije (a,b) HAP/CS/Gr i (c,d) HAP/CS/Gr/Gent prevlaka

5.2.2.5. Ispitivanje adhezije prevlaka

Adhezija između HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka i titanskih pločica kvalitativno je ispitana primenom ISO 2409 standarda. Test je izveden u triplikatu. U svakom pravcu izvedeno je po šest rezova oštricom od nerđajućeg čelika, raspoređenih u mrežasti obrazac sa razmakom od 1 mm između svakog reza kako bi se osigurala uniformnost. Slika 31 prikazuje digitalne fotografije HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka nakon izvršenog testa adhezije.



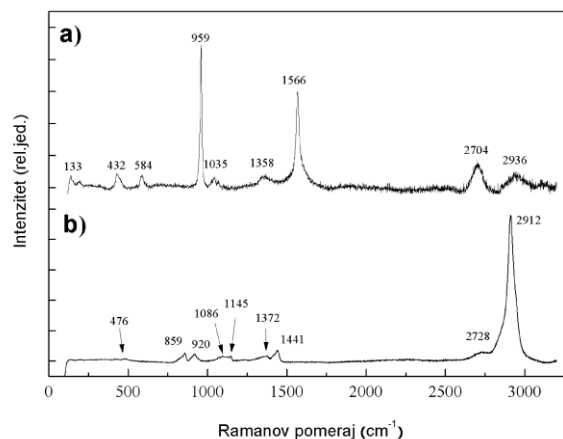


Slika 31. Digitalne (a,c) i optičke (b,d) fotografije HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka nakon testa adhezije

Procena adhezivnih svojstava obavljena je pomoću optičkog mikroskopa (slika 31b, d) kako bi se stekao bolji uvid u ivice useka (rezova) nakon izvođenja testa. Prema ISO 2409 [218] standardu, određivanje adhezivnih svojstava trebalo bi da se izvrši korišćenjem klasifikacije iz standarda. Pažljivim praćenjem šestostepenih smernica iz standarda, kvalitet adhezije oba uzorka (HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent) ocenjen je ocenom “1”, jer su preseki rezova bili blago oštećeni, sa pojavom sitnih ljuspica što je klasifikovano kao “1”, a manje od 5 % površine bilo je pogođeno promenama. Pošto predložena skala iz standarda ima opseg od “0 – 5”, gde “0” predstavlja najbolja adhezivna svojstva, može se smatrati da adhezija između prevlaka i titanske podloge daje ohrabrujuće rezultate i ukazuje na dobra adheziona svojstva oba uzorka (HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent).

5.2.2.6. Ramanova spektroskopija

Slike 32a i b predstavljaju Ramanove spektre HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka, respektivno.



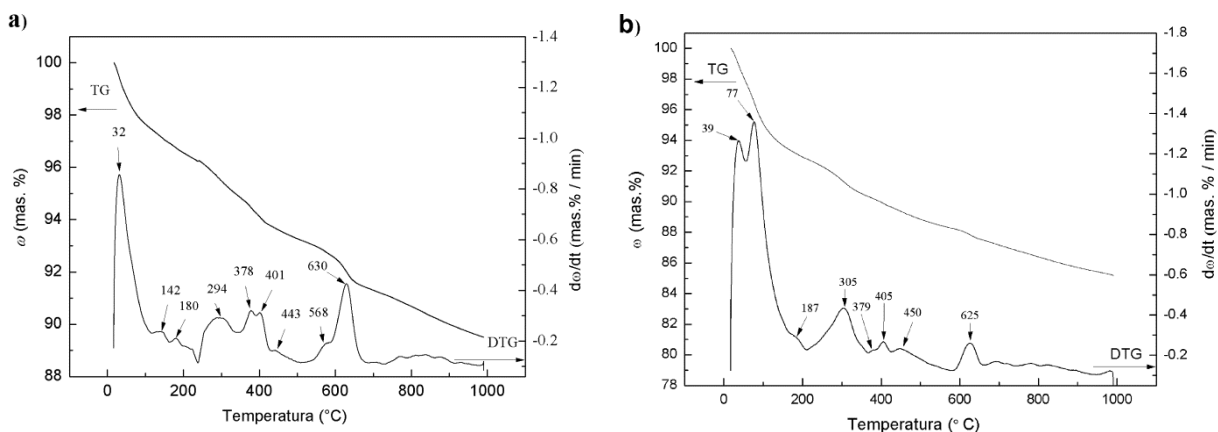
Slika 32. Raman spektar a) HAP/CS/Gr i b) HAP/CS/Gr/Gent prevlaka na titanu

Prva razlika je uočena u talasnoj dužini i intenzitetu trake koja odgovara γ_1 istežućim vibracijama PO_4^{3-} grupe čije su vrednosti bile niže za HAP/CS/Gr/Gent prevlaku (920 cm^{-1}) u odnosu na odgovarajuće vrednosti za HAP/CS/Gr prevlaku 959 cm^{-1} . Uvođenje gentamicina je izazvalo promenu u vibracionom režimu PO_4^{3-} grupe ostvarivanjem hemijskih veza između hidroksilnih grupa hidroksiapatita sa OH-grupama iz hitozana i gentamicina.

Dalje je uočena traka na 1566 cm^{-1} koja je pripisana G traci karakterističnoj za preklapanje Gr-a sa $-\text{NH}_2$ savijajućim vibracijama u ravni iz hitozana [273][274] na HAP/CS/Gr spektru, dok u slučaju HAP/CS/Gr/Gent prevlake ova traka nije uočena usled interakcija između amino grupa hitozana i gentamicina. Međutim trake na 1358 cm^{-1} i 1372 cm^{-1} za HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent, respektivno, koje potiču od D-trake (povezane sa nepravilnostima u strukturi grafena), su ukazale na inkorporaciju grafena. Štaviše, karakteristična 2D-traka za prisustvo grafena je primećena na 2704 cm^{-1} za HAP/CS/Gr i na 2728 cm^{-1} za HAP/CS/Gr/Gent [273]. Spektralne trake na 2936 cm^{-1} i 2912 cm^{-1} u slučaju HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent, respektivno, su pripisane simetričnom istezanju C–H veze iz $-\text{CH}_2$ grupe u hitozanu. Nakon uvođenja gentamicina, traka na 2912 cm^{-1} je postala izraženija u poređenju sa pikom na 2936 cm^{-1} usled promene u vibracionom režimu $-\text{CH}$ i $-\text{CH}_2$ grupa nakon uvođenja gentamicina [263].

5.2.2.7. Termička stabilnost

TG/DTG analiza je sprovedena u cilju ispitivanja termičke stabilnosti HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlake (slika 33a,b) i u cilju ispitivanja uticaja gentamicina na termička svojstva HAP/CS/Gr/Gent prevlake.



Slika 33. TG i DTG krive a) HAP/CS/Gr i b) HAP/CS/Gr/Gent prevlaka

HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlake su ispoljile postepeni gubitak mase kroz nekoliko koraka. Dodatak gentamicina je izazvao značajno povećanje gubitka mase u početnom periodu – 2,6 mas. % (16-118 °C) za HAP/CS/Gr u poređenju sa 6,5 mas. % (18-158 °C) za HAP/CS/Gr/Gent što se može pripisati desorpciji vode, zbog manje veličine kristalita, odnosno veće specifične površine HAP/CS/Gr/Gent prevlake u odnosu na HAP/CS/Gr prevlaku, kao što je već pokazano rezultatima XRD analize. Sledeća faza gubitka mase je pripisana oslobađanju kristalne vode i početku dehidroksilacije HAP-a, [140] u temperaturnom intervalu od 166 do 212 °C (0,6 mas. % gubitka mase) za HAP/CS/Gr i 117-238 °C (1,2 mas. % gubitka mase) za HAP/CS/Gr/Gent prevlaku. U trećoj fazi gubitka mase (240-345 °C (1,4 mas. %) za HAP/CS/Gr i 213-365 °C (2,4 mas. %) za HAP/CS/Gr/Gent) dolazi do termalne dekompozicije hitozana [205] zajedno sa dekompozicijom gentamicina [275]. Štaviše, DTG analiza je ukazala na izražen pik na 294 °C (pripisan razlaganju CS-a) za HAP/CS/Gr prevlaku (Slika 33a) koji je pomeren na 305 °C za HAP/CS/Gr/Gent prevlaku (slika 33b). Imajući u vidu da je HAP iz obe prevlake karbonatno supstituisani, što je već potvrđeno FT-IR analizom (odjeljak 5.2.2.2.), sledeći gubici mase od 1,2 mas. % (345-433 °C) za HAP/CS/Gr i 0,7 mas. % (364-425 °C) za HAP/CS/Gr/Gent prevlaku su pripisani gubitku karbonatnih jona u obliku CO_2 kao i daljoj degradaciji hitozana (za HAP/CS/Gr) i hitozana i gentamicina za HAP/CS/Gr/Gent [108,157]. U sledećoj fazi gubitka mase sa 0,5 mas. % gubitka mase (433-509 °C) za HAP/CS/Gr i 1,4 mas. % gubitka mase (425-580 °C) za HAP/CS/Gr/Gent prevlake, dva maksimuma na DTG krivoj

(slika 33a,b) na 443 °C za HAP/CS/Gr i na 450 °C za HAP/CS/Gr/Gent prevlaku su uočena. Ova dva pika mogu se pripisati razgradnji grafena u kompozitima [144,276], zajedno sa gubitkom karbonatnih jona iz HAP strukture, razgradnji preostalih komponenti iz CS-a, kao i gubitku preostalih funkcionalnih grupa gentamicina [157,212,277,278].

U poslednjoj fazi dolazi do procesa dehidroksilacije i dekarbonizacije HAP-a [212] sa gubitkom mase od 1,8 mas. % (514-685 °C) za HAP/CS/Gr prevlaku i gubitkom mase od 0,8 mas. % (582-662 °C) za HAP/CS/Gr/Gent. Ukupni gubitak mase je bio veći za HAP/CS/Gr/Gent prevlaku (14,8 mas. %) u poređenju sa HAP/CS/Gr prevlakom (10,5 mas. %), ukazujući na nižu termičku stabilnost ove prevlake.

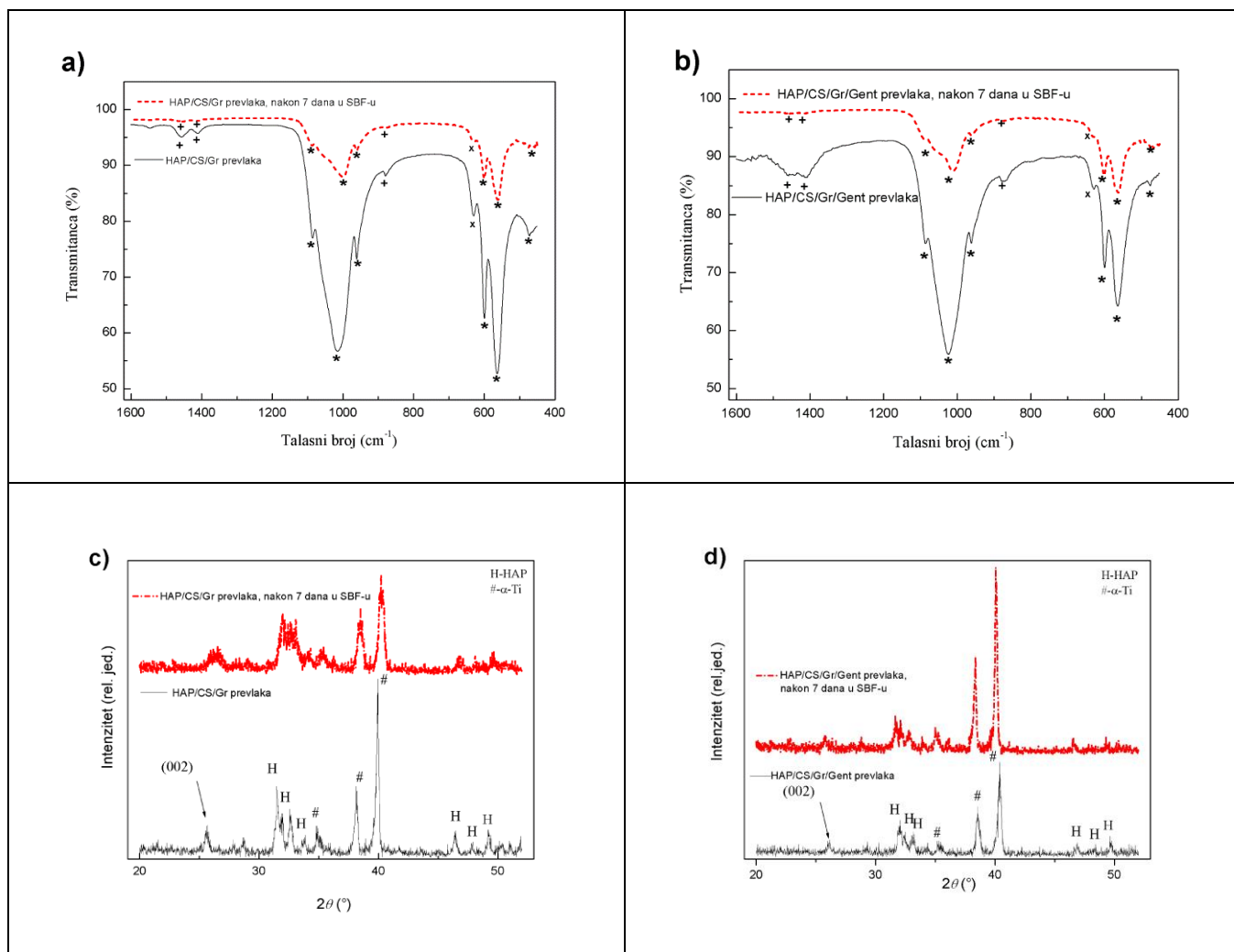
5.2.3. Ispitivanje sposobnosti biomineralizacije hidroksiapatit/hitozan/grafen prevlaka sa i bez dodatka gentamicina

Biomineralizacija je proces koji se prirodno javlja u živim organizmima i koji olakšava i kontroliše kristalizaciju minerala. Zasniva se na prisustvu organskih matrica (kao što su kolagen I u strukturi kostiju) i drugih rastvornih biomolekula koji kontrolišu i utiču na brzinu rasta kristala i morfologiju [279].

U oblasti inženjerstva tkiva ovaj proces služi kao osnovni kriterijum za razvoj i dizajn novih biomaterijala koji su namenjeni imitaciji prirodne funkcije kostiju. Ipak, prilikom dizajniranja materijala za koštane implantate, jedan od prvih koraka pri evaluaciji bioaktivnosti jeste procena sposobnosti biomaterijala da izazove bilo koji efekat na živi organizam, ispitan *in vitro* eksperimentima u SBF rastvoru [280]. Iako SBF okruženje sadrži samo jone, bez ikakvih proteina ili ćelija, neka istraživanja [281,282] su pokazala visoku efikasnost u predviđanju sposobnosti formiranja apatita kada se kasnije uporedi sa *in vivo* rezultatima. Prema studiji objavljenoj od strane Zadpoor-a i saradnika [283] rezultati 25 od 33 naučnih studija za *in vitro* i *in vivo* ispitivanja bioaktivnosti u SBF-u su bili u dobroj saglasnosti. Imajući u vidu sličnost u strukturi hidroksiapatita sa strukturom mineralnog dela prirodne kosti, očekuje se da su prevlake HAP-a bioaktivne i da poseduju sposobnost da indukuju rast novog apatitnog sloja, odnosno da promovišu vezivanje, proliferaciju i diferencijaciju osteoblasta unapređujući na taj način bioaktivnost i sposobnost osteointegracije biomaterijala [284,285]. U cilju ispitivanja bioaktivnosti HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka na titanu sprovedene su FT-IR, XRD, i FE-SEM analiza i ispitana su njihova svojstva elektrohemijским merenjima.

5.2.3.1. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) prevlaka nakon potapanja u SBF

FTIR spektri za HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlake na titanu, pre i posle potapanja u SBF na 37 °C tokom 7 dana su prikazani na slici 34a i b, respektivno.



Slika 34. FT-IR spektri a) HAP/CS/Gr i b) HAP/CS/Gr/Gent prevlaka (oznake traka: * PO_4^{3-} ; + CO_3^{2-} ; x OH^-) u oblasti od 450 do 1600 cm^{-1} i XRD difraktogrami za c) HAP/CS/Gr i d) HAP/CS/Gr/Gent prevlaka, u oblasti od 20 do 50 2θ , pre i posle potapanja u SBF na 37 °C tokom 7 dana

Razlike u položajima traka na FT-IR spektrima za obe prevlake, HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent, pre i nakon potapanja, su ukazale na formiranje novog, biomimetičkog sloja HAP-a u SBF-u na 37 °C (tabela 13).

Tabela 13. Položaji karakterističnih traka i dodela vibracija u FT-IR spektrima HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka pre i nakon potapanja u SBF na 37°C tokom 7 dana

Dodela vibracionih modova	PREVLAKA			
	Pre SBF-a		Nakon SBF-a	
	HAP/CS/Gr	HAP/CS/Gr/Gent	Biomimetički HAP na HAP/CS/Gr	Biomimetički HAP na HAP/CS/Gr/Gent
	Talasni broj, cm^{-1} [29]		Talasni broj, cm^{-1} [24–26,40–44]	
Vibracioni modovi PO_4^{3-} grupe	473	474	475	474
	563	562	561	562
	600	600	600	601
	952	962	960	961
	1020	1024	1001	1012
	1085	1085	1087	1088

Vibracioni modovi CO₃²⁻ grupe	878	878	878	878
	1411	1411	1414	1412
	1459	1458	1456	1457
Vibracioni modovi strukturne OH⁻ grupe	632	634	628	631

Trake u oblasti 450-600 cm⁻¹ predstavljaju (O–P–O) deformacione vibracije u fosfatnoj grupi, dok se karakteristične trake (P–O) istežućih vibracija PO₄³⁻ grupe mogu uočiti u oblasti 900-1200 cm⁻¹ [52,199,235,286,287]. U strukturi HAP-a, hidroksilni i/ili fosfatni joni mogu da budu supstituisani karbonatnim jonima, što dovodi do formiranja A-, B- ili AB tipa karbonatno-supstituisanog HAP-a [236]. Na osnovu položaja karbonatnih traka na FT-IR spektrima obe prevlake (HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent) nakon potapanja u SBF-u na 37 °C tokom 7 dana, mogu da se uoče vibracioni modovi (O–C–O) (878 cm⁻¹) i O–C grupa (oblast 1400-1500 cm⁻¹) [52,236,286]. Položaj ovih karbonatnih traka je potvrdio da je došlo do supstitucije AB-tipa u novoformiranom HAP-u [237,286]. Karbonatno-supstituisani HAP je poznat po izraženim bioaktivnim svojstvima [201]. Trake dodeljene strukturnom savijanju hidroksilne (OH⁻) grupe dodatno su potvrdile prisustvo strukture HAP-a [199].

Prisustvo karbonatno-supstituisanog hidroksiapatita na površini ispitivanih prevlaka je poželjno iz više razloga, a najvažniji je njegoa strukturna i hemijska sličnost sa mineralnom komponentom ljudskog koštanog i dentinskog tkiva [288].

5.2.3.2. Rendgenska difrakciona analiza (XRD) prevlaka nakon potapanja u SBF

XRD analiza je takođe potvrdila formiranje karbonatno supstituisanog HAP-a nakon 7 dana potapanja u SBF-u, potvrđujući rezultate FT-IR analize. Slike 35c i d predstavljaju XRD difraktograme za HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlake, pre i nakon potanja u rastvor SBF-a na 37 °C tokom 7 dana, respektivno.

Difrakcioni maksimumi su identifikovani pomoću standardnih JCPDS fajlova br. 09-0432 za HAP i standardni JCPDS fajl br. 89-2762 za titan (supstrat na kome se nalaze prevlake). Kao što je već pokazano iznad (odjeljak 5.2.2.1. XRD analiza) veličina kristalita za prevlake pre potapanja je iznosila 43,5 nm za HAP/CS/Gr i 31,1 nm za HAP/CS/Gr/Gent [286,289]. Na osnovu proširenja difrakcionih maksimuma može se zaključiti da se novoformirani HAP na površini obe HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlake nakon potapanja u SBF sastojao od veoma finih kristalita. Da bi se potvrdila ova tvrdnja preračunata je veličina kristalita za novoformirani HAP na površini obe HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlake i iznosila je 16,6 i 36,0 nm, respektivno [289].

Karbonatni joni mogu da supstituišu OH⁻ (A-tip), PO₄³⁻ (B-tip) ili OH⁻ i PO₄³⁻ (AB-tip supstitucije, zastupljen u biološkim apatitima) jone [52,228–230,286] u kristalnoj rešetki HAP-a, izazivajući promene u parametrima jedinične ćelije i kristaliničnosti [290]. Poznato je da A-tip supstitucije izaziva ekspanziju duž *a*-ose i kontrakciju duž *c*-ose suprotno B-tipu koji izaziva kontrakciju duž *a*-ose i ekspanziju duž *c*-ose [229]. Izračunato je da novoformirani HAP na HAP/CS/Gr prevlaci, dobijen nakon potapanja u SBF-u pokazao promene u vrednostima za obe ose - *a* (9,390 Å) i *c* (6,871 Å) u poređenju sa vrednostima *a* (9,446 Å) i *c* (6,907 Å) za HAP/CS/Gr prevlaku pre potapanja u SBF [286]. U slučaju novoformiranog HAP-a na HAP/CS/Gr/Gent prevlaci uočene su promene u oba parametra jedinične ćelije - *a* (9,451 Å) i *c* (6,912 Å) u odnosu na HAP/CS/Gr/Gent prevlaku pre potapanja - *a* (9,383 Å) i *c* (6,863 Å) [286] ukazujući na prisustvo AB-tipa karbonatne supstitucije u novoformiranom HAP-u. Prema literaturi,[291] vrednosti parametara jedinične ćelije HAP-a su sledeći: *a*= 9,418 Å, *c*=6,884 Å (JCPDS 09-0432). Razlika između teorijske i eksperimentalne vrednosti u *a*- i *c*-osi je veća u slučaju novoformiranog HAP-a na površini HAP/CS/Gr/Gent prevlake, ukazujući da je više hidroksilnih i fosfatnih jona supstituisano

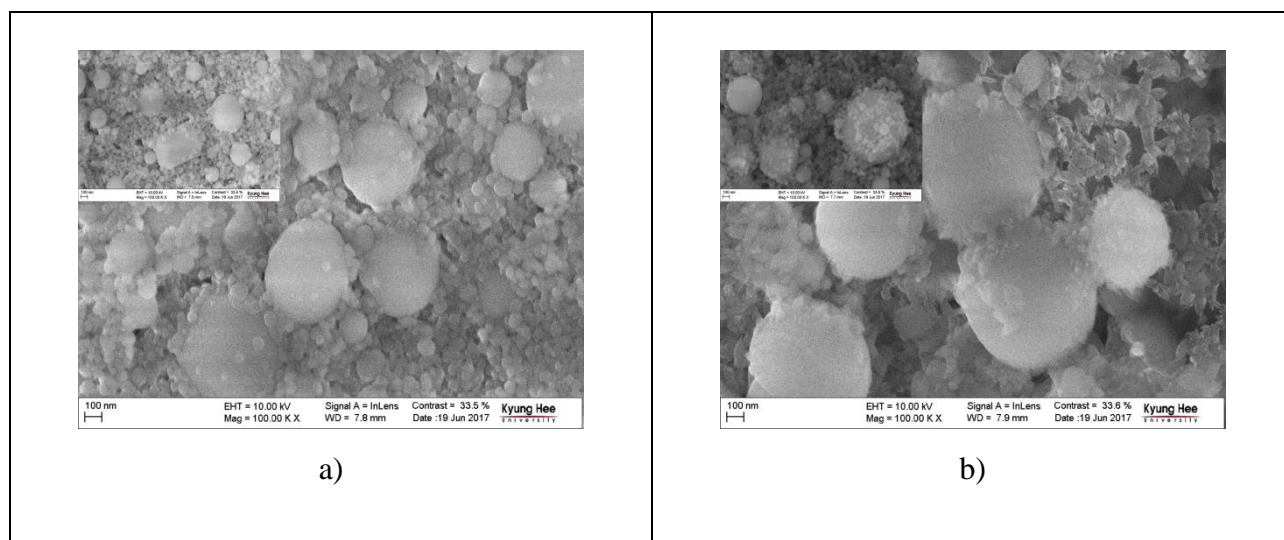
karbonatnim jonima, u poređenju sa novoformiranim hidroksiapatitom na površini HAP/CS/Gr prevlake.

Prema energetska-disperzionoj spektrometriji (EDS), Ca/P odnosi su preračunati na 1,61 i 1,36 za HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlake (slika nije prikazana), pre potapanja u SBF, redom. Nakon potapanja u SBF, Ca/P odnos je pokazao nižu vrednost za obe prevlake, odnosno 1,52 i 1,24 za HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gent, respektivno, potvrđujući formiranje novog biomimetičkog sloja HAP-a na površini obe prevlake. Pošto je vrednost Ca/P odnosa za stehiometrijski HAP 1,67, [292] dobijene Ca/P vrednosti koje su niže ukazuju da je novoformirani HAP na površini obe prevlake karbonatno supstituisan [231,293]. Niža vrednost Ca/P odnosa u slučaju HAP-a naraslog na površini HAP/CS/Gr/Gent prevlake (1,24) u odnosu na novoformirani HAP na površini prevlake bez antibiotika (1,52), dodatno ukazuje da je ostvaren veći stepeni karbonatne supstitucije u kristalima HAP-a formiranim na površini prevlake sa antibiotikom.

Ovi rezultati su prilično obećavajući, pošto je poznato da karbonatno supstituisani HAP može da poboljša biološke performanse materijala za prostetičke implantate (bioaktivnost, osteokonduktivnost, rast i diferencijaciju osteoblastnih ćelija) u odnosu na stehiometrijski HAP [232,233], zahvaljujući prisustvu karbonatnih jona u strukturi HAP-a koji istovremeno doprinose povećanoj rastvorljivosti i smanjenoj kristaliničnosti HAP-a [294].

5.2.3.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija (FE-SEM) prevlaka nakon potapanja u SBF

Poznato je da nakon potapanja uzoraka u SBF koncentracija jona kalcijuma i fosfatnih jona na površini prevlaka raste, stvarajući uslove za rast novog biomimetičkog sloja HAP-a kroz istovremene (simultane) reakcije taloženja i rastvaranja [152]. Rastvaranje i taloženje HAP-a u SBF-u su reverzibilne reakcije [240,295,296]. Mikrografije HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka nakon potapanja u SBF-u tokom 7 dana, su prikazane na slici 39, sa odgovarajućim slikama pre potapanja u SBF prikazanim u vidu inserata (umetaka) (slika 39 a i b, redom).



Slika 36. FE-SEM mikrografije a) HAP/CS/Gr i b) HAP/CS/Gr/Gent prevlaka nakon 7 dana potapanja u SBF na 37°C (Inserti: odgovarajući prevlake pre potapanja u SBF)

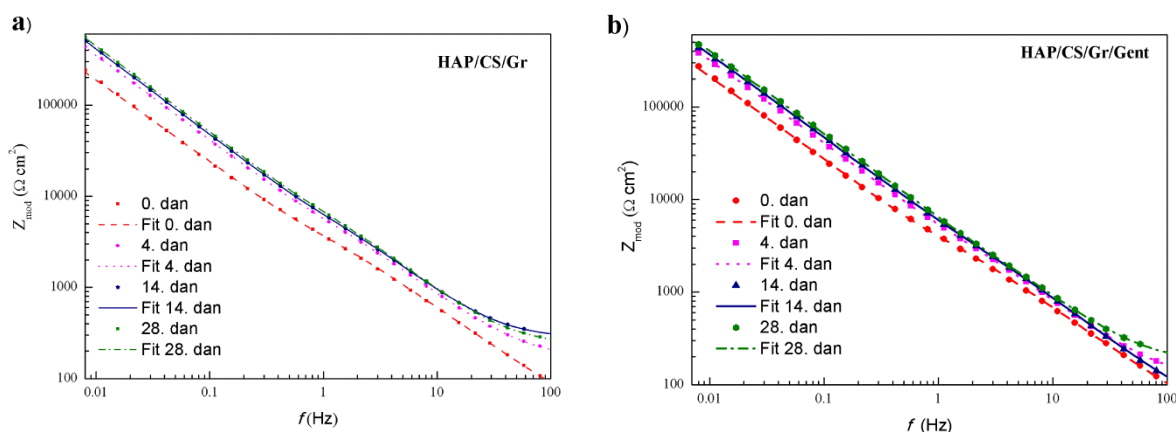
Prisustvo novoformiranog hidroksiapatita u obliku karakterističnih sfernih aglomerata na površini obe HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlake se može jasno uočiti na slici 39.

5.2.3.4. Ispitivanje sposobnosti biomineralizacije prevlaka elektrohemijским metodama u SBF-u

Elektrohemijška merenja, odnosno spektroskopija elektrohemijške impedancije (SEI) i merenja polarizacionih krivih (PDS) su korišćena za analizu elektrohemijških svojstava HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka, jer mogu da pruže značajne informacije o pojavi novog sloja HAP-a nakon potapanja u SBF-u. Praćenje elektrohemijških parametara tokom dužeg perioda (28 dana) u fiziološkom medijumu bi trebalo da indirektno predvidi ponašanje prevlaka u ljudskom telu.

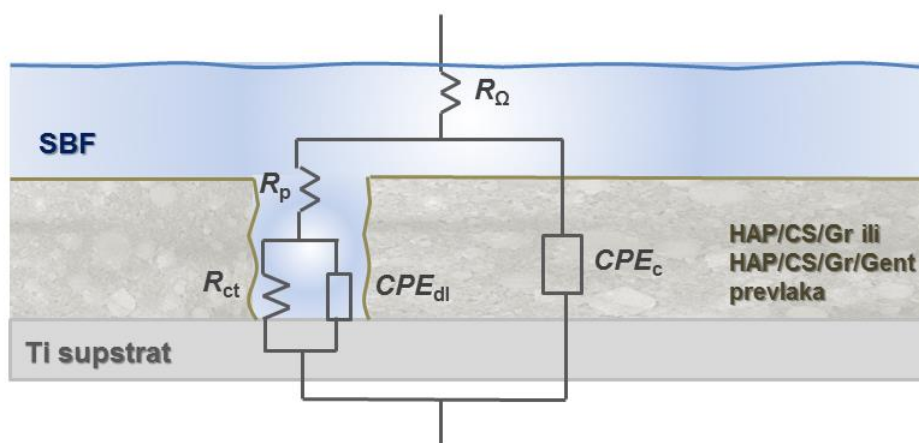
5.2.3.4.1. Spektroskopija elektrohemijške impedancije (SEI)

Elektrohemijška impedancija je praćena tokom 28 dana izlaganja SBF-u i rezultujući Bodeovi dijagrami za odgovarajuće reprezentativne periode su prikazani na slici 37a i b.



Slika 37. Bodeovi dijagrami SEI za a) HAP/CS/Gr i b) HAP/CS/Gr/Gent prevlake tokom 28 dana potapanja u SBF na 37 °C

Obe HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlake su pokazale povećane ukupne vrednosti za impedanciju tokom trajanja eksperimenta što se može pripisati rastu novog sloja biomimetičkog hidroksiapatita, kao što je već objašnjeno u odeljcima 5.2.3.1., 5.2.3.2. i 5.2.3.3. (FT-IR, XRD, FE-SEM) redom. Najveći porast impedancije, koji je ukazao na najintenzivniji rast sloja hidroksiapatita je postignut nakon 4 dana. Pošto je biomineralizacija kompleksan proces koji se sastoji od istovremenih procesa rastvaranja prevlake i taloženja kalcijum-fosfata [240], dominantna reakcija u ovom početnom periodu može da se pripiše taloženju aglomerata novoformiranog hidroksiapatita. Ova pojava se može objasniti visokim početnim koncentracionim gradijentom između rastvora SBF-a i potopljenih prevlaka kao i rastvorljivošću čestica u SBF-u, što sve dovodi do taloženja hidroksiapatita. Kasnije, rast vrednosti impedancije je bio dosta sporiji ukazujući na sporiji rast novog sloja hidroksiapatita. Kako bi se dobio bolji uvid u elektrohemijške parametre ispitivanih uzoraka, dobijeni eksperimentalni podaci za impedanciju su fitovani pomoću ekvivalentnog električnog kola prikazanog na slici 41.

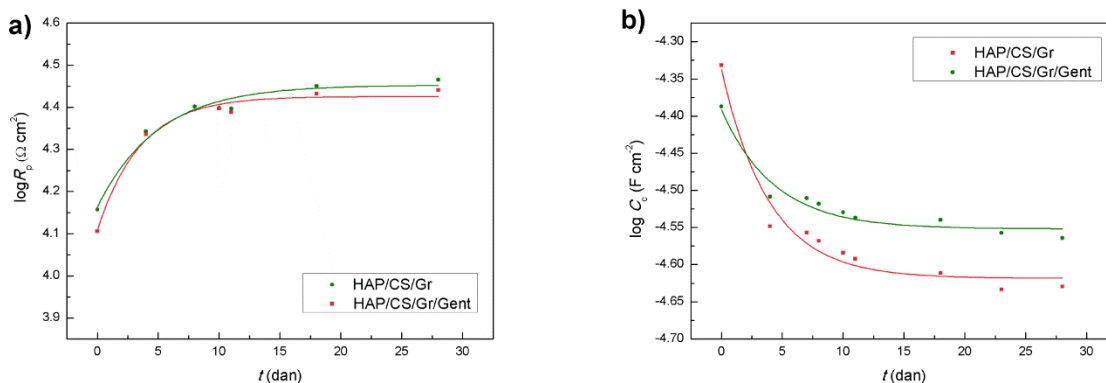


Slika 38. Šematski prikaz HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka u SBF-u, sa šemom ekvivalentnog električnog kola korišćenog za fitovanje SEI spektara

Ovaj tip ekvivalentnog električnog kola se generalno koristi kako bi se objasnila svojstva prevlaka na metalnom supstratu, uključujući bioaktivne prevlake hidroksiapatita na titanu [287]. Elementi izabranog kola prikazanog na slici 38 su šematski prikazani zajedno sa komponentama fizičkog sistema i uključuju otpornost elektrolita, R_{Ω} , a zatim sledi paralelno kolo koje se sastoji od elementa sa konstantnim faznim uglom koji se odnosi na kapacitivnost prevlaka, CPE_c , i otpornost u porama prevlake, R_p . Krajnji element predstavljaju električna svojstva samog metala, dvojnog sloja formiranog na graničnoj površini metal/elektrolit, opisanog otpornošću prenosa naelektrisanja na graničnoj površini metal-elektrolit, R_{ct} , i i elementom sa konstantnim faznim uglom koji se odnosi na kapacitivnost dvojnog sloja i difuzione procese, CPE_{dl} .

Impedancija CPE elementa (Z_{CPE}) se može predstaviti jednačinom (8) [242], gde je Y_0^{-1} admitansa, ω je kružna frekvencija, α je parametar koji kvantifikuje odstupanja od idealnog kondenzatora $i^2=-1$. Kapacitivnost se može izračunati korišćenjem jednačine (9), gde ω_{max} predstavlja ugaonu frekvenciju pri kojoj imaginarna komponenta impedancije dostiže svoj maksimum [242]. Očigledno je da za vrednosti α bliske jedinice, $C_{CPE}=Y_0$. Kako je α za obe prevlake bila uvek veća od 0,8 Y_0 vrednosti dobijene fitovanjem eksperimentalnih rezultata su korišćene kao kapacitivnosti prevlake i dvojnog sloja bez daljih izračunavanja. Podaci za impedanciju u kompleksnoj ravni su dobro fitovani predloženim ekvivalentnim električnim kolom. Odgovarajući pokazatelj kvaliteta fita (χ^2) u opsegu $10^{-6} - 10^{-4}$ i relativno nizak procenat greške za svaki element (manje od 10 %) su potvrdili primenljivost predloženog modela na ispitivane sisteme.

Formiranje i rast novog apatitnog sloja na površini HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka tokom 28 dana izlaganja SBF-u se direktno odnosi na kvantitativne vrednosti za otpornost u porama, R_p , i kapacitivnost prevlake, C_c , koji su dobijeni fitovanjem eksperimentalnih rezultata SEI analize i predstavljeni su na slici 42.

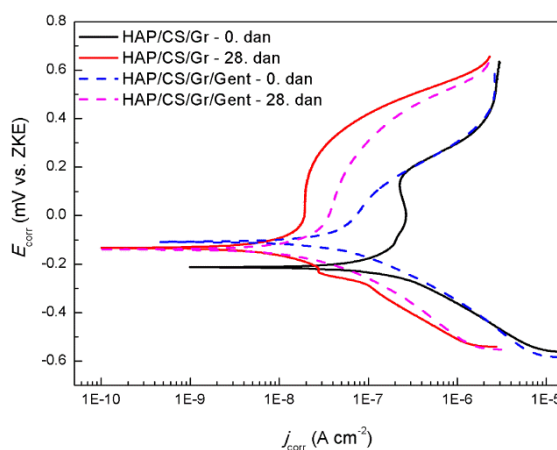


Slika 39. Vremenska zavisnost a) otpornosti u porama prevlake, R_p , i b) kapacitivnosti prevlake, C_c , za HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlake tokom 28 dana izlaganja SBF na 37°C

Brzo povećanje vrednosti R_p i brzo smanjenje C_c vrednosti (za obe prevlake) su primećeni tokom prvih nekoliko dana, ukazujući na porast debljine prevlake usled taloženja i rasta novoformiranog sloja hidroksiapatita. Nakon prvih 4 dana, rast R_p vrednosti i pad C_c vrednosti su postali sporiji, što je u saglasnosti sa ranije diskutovanim vrednostima impedancije (slika 37).

5.2.3.4.2. Polarizaciona merenja (PDS)

Bioaktivna priroda HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka kada su izložene rastvoru SBF-a tokom 28 dana, je takođe ispitana polarizacionim merenjima koja su dala uvid u korozione parametre. Slika 43 predstavlja polarizacione krive za HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlake na samom početku (0 dana) i na kraju (28 dana) izlaganja rastvoru SBF-a.



Slika 40. Potenciodinamičke polarizacione krive HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka pre i nakon 28 dana potapanja u SBF na 37°C

Katodne krive su bile linearne tokom jedne dekade struje (slika 40) pa su ekstrapolirane u cilju određivanja vrednosti gustine struje korozije, j_{corr} , i katodnih Tafelovih nagiba, b_c , koji su izračunati iz njihovih nagiba. Sa druge strane, anodni delovi polarizacionih krivih nisu ispoljili dovoljnu linearnost (linearno ponašanje) usled promenljive prirode anodnih reakcija, te nisu mogli da budu korišćeni za izračunavanje j_{corr} , niti za dobijanje anodnih Tafelovih nagiba. Gustina struje korozije se značajno smanjila nakon 28 dana izlaganja SBF-u – značajno smanjenje je uočeno za HAP/CS/Gr (od 0,17 do 0,016 mA cm⁻²) i HAP/CS/Gr/Gent (od 0,14 do 0,043 mA cm⁻²) što se može objasniti povećanom stabilnošću novoformiranog biomimetičkog sloja hidroksiapatita prema

koroziji, kao što je već objašnjeno FT-IR, XRD i FE-SEM analizom (odjeljak 5.2.3.1., 5.2.3.2. i 5.2.3.3.). Katodni Tafelovi nagibi, b_c , nisu se značajno promenili od 0. do 28-og dana za obe prevlake, u slučaju HAP/CS/Gr od 220 do 215 mV dec⁻¹, i za HAP/CS/Gr/Gent od 276 do 264 mV dec⁻¹, što znači da se mehanizam reakcije nije menjao tokom izlaganja SBF-u. Pažljivim sagledavanjem svih elektrohemijskih rezultata dobijenih iz SEI i PDS analiza, povećanjem vrednosti R_p i smanjenjem vrednost C_c i j_{corr} može se zaključiti da je u slučaju obe prevlake – HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent uočen porast debljine prevlaka kao posledica rasta novog sloja hidroksiapatita nakon izlaganja fiziološkom rastvoru.

5.2.4. Ispitivanje otpuštanja gentamicina iz hidroksiapatit/hitozan/grafen/gentamicin prevlake

5.2.4.1. Određivanje koncentracije otpuštenog gentamicina tečnom hromatografijom visokih performansi u sprezi sa UV spektroskopijom (HPLC-UV)

Ukupna količina antibiotika (tri nezavisna eksperimenta) je određena korišćenjem HPLC-UV metode nakon procesa derivatizacije. Tri najzastupljenije komponente gentamicina su C1, C1a i C2 sa minimalnom razlikom u njihovoj strukturi [254] imala su retencionna vremena od 3,3, 6,4 i 9,8 min. Prosečna količina gentamicina po cm² za HAP/CS/Gr/Gent prevlaku je iznosila 8,2 ±0,1 µg. U poređenju sa rezultatima za HAP/CS/Gent prevlaku (7,3 ±0,1 µg po cm²) ovo povećanje od više od 10 % je značajno i očigledno rezultat prisustva grafena, što nije iznenađujuće s obzirom da Gr predstavlja moćnu nano-platfomu za inkorporaciju antibiotika gentamicina [282].

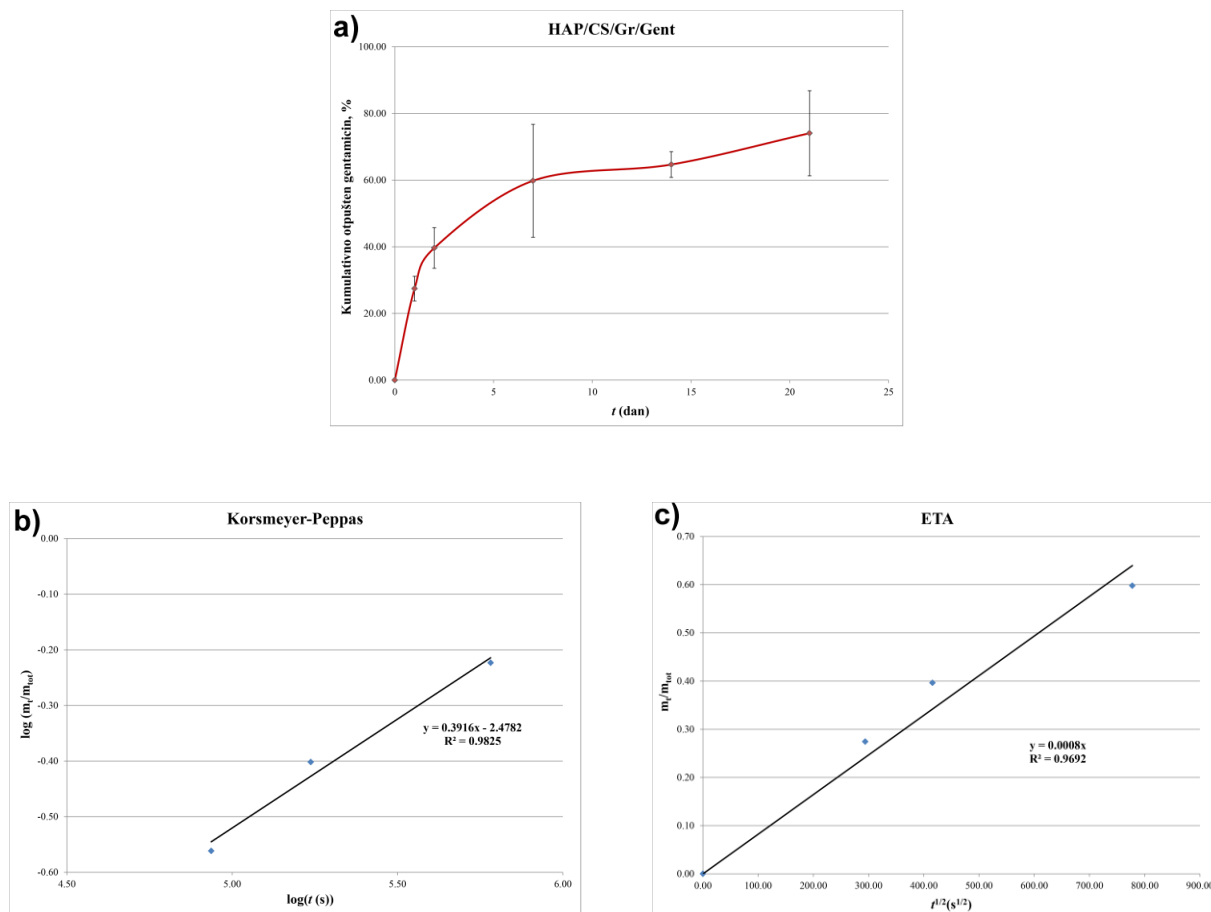
HPLC-UV metodom je uspešno određena ukupna količina gentamicina u prevlakama, ali odgovarajući profili otpuštanja nisu dobijeni, verovatno usled niskih koncentracija leka i manje osetljivosti same metode.

5.2.4.2. Određivanje koncentracije otpuštenog gentamicina tečnom hromatografijom visokih performansi u sprezi sa masenom spektrometrijom (HPLC-MS)

Inkorporacijom antibakterijskih agenasa u kompozitne strukture smanjuju se primenjene doze, redukuje citotoksičnost i olakšava se postepeno otpuštanje i dostupnost leka. HPLC-MS metoda je korišćena za određivanje ukupne količine gentamicina u prevlakama, kao i za ispitivanje procesa otpuštanja gentamicina pod uslovima koji imitiraju fiziološke. Ukupna količina gentamicina u HAP/CS/Gr/Gent prevlaci po 1 cm² je određena metodom HPLC-MS prethodnim rastvaranjem prevlake u 10 % rastvoru HCl. Izmerena količina iznosila je 13,9 µg. Dalje je otpuštanje gentamicina iz HAP/CS/Gr/Gent prevlake u dejonizovanoj vodi praćeno je tokom 21-og dana. Prosečni kumulativni profili otpuštanja su prikazani na slici 41a.

Veoma poželjan efekat inicijalnog naglog otpuštanja gentamicina je ispoljen tokom prvih 7 dana, kada je ~60 % oslobođeno u tako kratkom period što može da bude veoma obećavajuće za početnu zaštitu implantata od adhezije bakterijskih ćelija i formiranja biofilma. Brzo otpuštanje gentamicina se nastavilo sporijim otpuštanjem dostižući 74 % nakon 21-og dana. Profil otpuštanja gentamicina se može jasno podeliti u 2 različite faze. Otpuštanje antibiotika u prvoj fazi (prvih 7 dana), gde je efekat naglog otpuštanja gentamicina uočen, je verovatno posledica difuzije površinski adsorbovanih molekula gentamicina. Druga faza (7.-21. dan) je bila okarakterisana kontrolisanim i produženim otpuštanjem gentamicina što bi moglo da bude povezano sa difuzijom gentamicina kroz pore prevlake i prodiranjem medijuma u kome se vrši otpuštanje u pore prevlake, rastvaranjem leka i obezbeđivanjem sporijeg otpuštanja.

Eksperimentalni podaci su fitovani i upoređeni sa Korsmeyer-Peppas i aproksimacijom ranog vremena kinetičkim modelima otpuštanja (slika 41b i c).



Slika 41. a) Srednji kumulativni profil oslobađanja gentamicina, b) Korsmeyer-Peppas model i c) aproksimacija ranog vremena (ETA) primenjeni na profil otpuštanja gentamicina iz HAP/CS/Gr/Gent prevlake

Korsmeyer-Peppas model (jednačina (9)) je opisan odnosom otpuštene mase gentamicina (m_t) u vremenu t , i ukupnom početnom masom gentamicina m_{tot} , dok k_{KP} predstavlja Korsmeyer-Peppas konstantu, svojstvenu ispitivanom materijalu (prevlake) a n je koeficijent koji ukazuje na mehanizam difuzije ($n \sim 0,5$ - Fikovska i $n > 0,5$ ne-Fikovska). Korsmeyer-Peppas model je primenjen u njegovom linearnom obliku, gde su podaci transformisani u logaritamsku skalu (jednačina (10)).

Dobijeni Korsmeyer-Peppas grafik (slika 41b) je korišćen za izračunavanje vrednosti eksponenta n iz nagiba krive i iznosio je 0,392. Ovaj rezultat je ukazao da proces otpuštanja gentamicina sledi Fikov zakon difuzije i da je stoga određen koncentracionim gradijentom gentamicina u kompozitnoj matrici. Nakon što je mehanizam otpuštanja gentamicina određen koristili smo još jedan kinetički model – aproksimaciju ranog vremena (ETA) koji opisuje otpuštanje aktivne supstance prema Fikovom zakonu difuzije iz tankih polimer-kompozitnih uzoraka.

Prema Ritgeru i Peppas-u [282] ovaj model je odgovarajući za jednodimenziono otpuštanje iz tankih filmova- za početnih 60 % otpuštenog agensa [282] i predstavlja korisnu metodu za izračunavanje koeficijenta difuzije u procesu otpuštanja gentamicina. Pošto je ~ 60 % otpuštanja gentamicina ostvareno u prvih 14 dana (64 %) ETA model je primenjen na ovaj period.

Model ETA je opisan jednačinom (11) sa odgovarajućim parametrima: m_i -masa gentamicina otpuštena iz prevlake u vremenu t , m_{tot} -ukupna početna masa gentamicina unutar prevlake, D – koeficijent difuzije gentamicina, t -vreme, i δ – debljina prevlake.

Slika 41c prikazuje ETA model primenjen na eksperimentalne podatke otpuštanja (u prvih 14 dana) za HAP/CS/Gr/Gent prevlaku. Izračunat koeficijent difuzije, D , iznosio je $4,5 \times 10^{-14} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, ukazujući na sporo otpuštanje gentamicina iz prevlake tokom prvih 14 dana. Poređenjem dobijenih koeficijenata difuzije za otpuštanje gentamicina iz HAP/CS/Gr/Gent prevlake sa koeficijentom difuzije za HAP/CS/Gent prevlaku ($D= 2,4 \times 10^{-14} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) [294] uočeno je da HAP/CS/Gr/Gent prevlaka ispoljava skoro duplo brže otpuštanje u poređenju sa HAP/CS/Gr prevlakom.

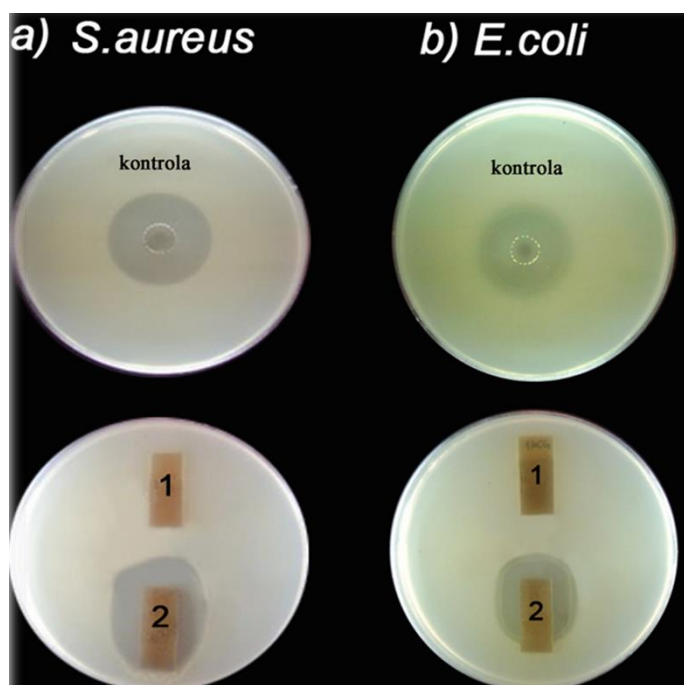
Ovaj zaključak je u skladu sa rezultatima za ukupnu koncentraciju gentamicina u HAP/CS/Gr/Gent prevlaci za koju je određena veća vrednost (13,9 μg) u odnosu na HAP/CS/Gent (9,4 μg) ukazujući da dodatak grafena poboljšava inkorporaciju gentamicina dok u isto vreme izaziva brže otpuštanje iz prevlake. Primena grafena kao nosača lekova je predmet mnogih istraživanja zahvaljujući njegovoj velikoj specifičnoj površini koja omogućava vezivanje gentamicina sa obe strane grafenskih listova [282,305,306]. Ovo bi moglo da bude objašnjenje većeg stepena inkorporacije gentamicina u HAP/CS/Gr/Gent prevlaci u poređenju sa HAP/CS/Gent prevlakom.

5.2.5. Ispitivanje bioloških svojstava hidroksiapatit/hitozan/grafen prevlaka sa i bez dodatka gentamicina

5.2.5.1. Antibakterijska aktivnost

5.2.5.1.1. Agar difuzionna metoda

Antibakterijska aktivnost HAP/CS/Gr/Gent (1 mg/ml gentamicina) i HAP/CS/Gr prevlaka je ispitivana agar difuzionom metodom i rezultati su predstavljeni na slici 42.

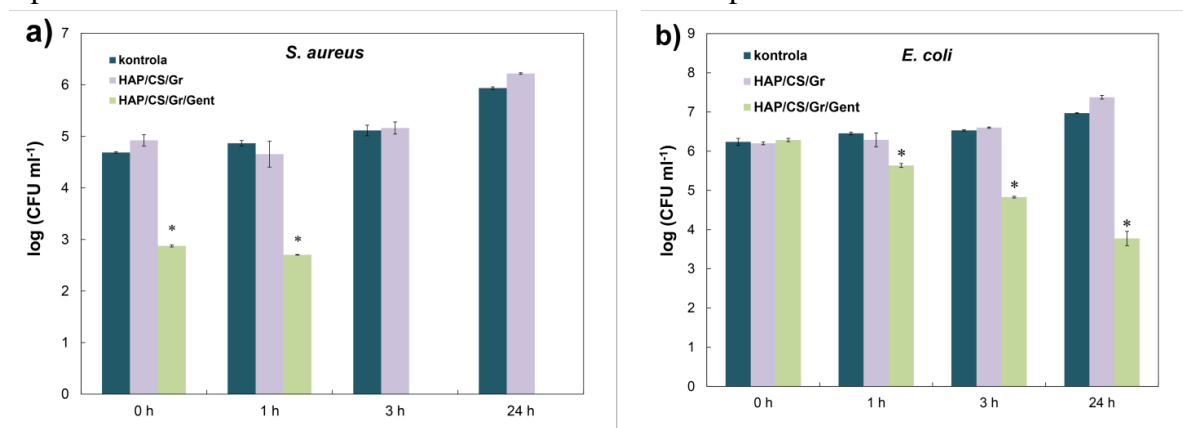


Slika 42. Antibakterijska aktivnost rastvora gentamicina (kontrola, 1 mg/ml), HAP/CS/Gr (uzorak 1) i HAP/CS/Gr/Gent (uzorak 2) prevlaka prema a) *S. aureus* TL i b) *E. coli* ATCC 25922

Rastvor gentamicina koncentracije 1 mg/ml obrazovao je jasnu, široku zonu inhibicije (31 mm u prečniku, slika 42a) prema soju *S.aureus* TL. Međutim, kod soja *E.coli* ATCC 25922 formirana je široka zona inhibicije sastavljena od jedne svetlije (D=24 mm) i druge tamnije (D=30 mm) oblasti što sugerira na različitu osetljivost prisutnih ćelija u populaciji prema ispitivanoj koncentraciji gentamicina (slika 42b). Nijedan od ispitivanih sojeva bakterija nije pokazao osetljivost u prisustvu HAP/CS/Gr prevlake, što se može uočiti odsustvom zone inhibicije oko testiranog uzorka (slika 42a,b, uzorak 1). Za razliku od HAP/CS/Gr uzorka, oko uzorka HAP/CS/Gr/Gent formirana je široka zona inhibicije prema *S.aureus* TL (slika 42a, uzorak 2, 36 x 27 mm) i dve jasno uočljive oblasti unutar formirane zone prema *E.coli* ATCC 25922 (slika 42b, uzorak 2, svetla oblast 24 x 21 mm i tamna zona 28 x 25 mm). Uočeni antibakterijski efekat kod HAP/CS/Gr/Gent uzorka je potvrda da prisustvo gentamicina čak i u tako niskim koncentracijama (1 mg/ml) može uticati na rast i razmnožavanje ispitivanih sojeva bakterija. Međutim, izraženiji antibakterijski efekat postignut je sa HAP/CS/Gr/Gent uzorkom prema *S.aureus* TL, nego prema *E.coli* ATCC 25922 što ukazuje da ova prevlaka pokazuje određeni stepen selektivnosti i bolju aktivnost prema Gram-pozitivnim vrstama bakterija.

5.2.5.1.2. Ispitivanje kinetike antibakterijske aktivnosti

Na slici 43a i b prikazana je kinetika antibakterijske aktivnosti HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka prema *S.aureus* TL i *E.coli* ATCC 25922 u fosfatnom puferu.



Slika 43. Kinetika antibakterijske aktivnosti i opadanje ukupnog broja živih ćelija kod sojeva a) *S. aureus* TL i b) *E.coli* ATCC 25922 nakon kontakta sa HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlakama tokom 0, 1, 3 i 24 sata u fosfatnom puferu, u poređenju sa kontrolom u fosfatnom puferu bez uzoraka. Statistička analiza uzoraka je rađena u triplikatu korišćenjem jednosmerne ANOVA metode, sa post hoc analizom za višestruka poređenja

Iako, je antimikrobni efekat hitozana (CS), grafena (Gr) i grafenu sličnih materijala već potvrđen u literaturi, [95,299] očekivani sinergistički efekat HAP/CS/Gr prevlake utvrđen je prema testiranim sojevima *S. aureus* TL i *E.coli* ATCC 25922. Na slici 43a i b može se videti da ispitivani sojevi inkubirani u fosfatnom puferu bez uzoraka (kontrola) i sa HAP/CS/Gr uzorkom pokazuju sličan trend rasta i razmnožavanja, odnosno uočena razlika u ukupnom broju živih ćelija je unutar dozvoljene greške. Za razliku od HAP/CS/Gr uzorka, HAP/CS/Gr/Gent prevlaka je odmah ispoljila jak baktericidni efekat prema soju *S.aureus* TL, smanjujući početni broj ćelija za 2 logaritamske jedinice (0h). Međutim, posle prvog sata inkubacije oslobađanje leka čini se da je znatno usporeno, što je verovatno posledica formiranih jakih vodoničnih veza, podržanih nespecifičnim interakcijama gentamicina sa hitozanom i grafenom. Dalji trend opadanja ukupnog broja živih ćelija kod soja *S.aureus* TL nastavljen je između 1h i 3h sata inkubacije, tako da već u 3h u fosfatnom puferu nisu pronađene žive ćelije bakterija čime je potvrđen jak baktericidni efekat HAP/CS/Gr/Gent prevlake prema soju *S.aureus* TL [259].

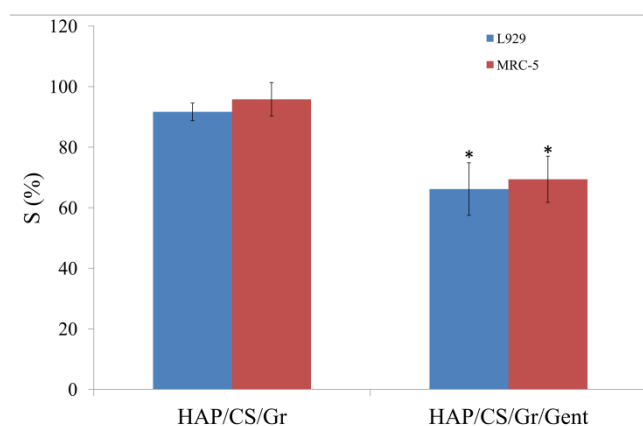
Antibakterijski efekat HAP/CS/Gr/Gent prevlake je uočen prema soju *E.coli* ATCC 25922 (slika 43b). Na samom početku inkubacije, sadržaj otpuštenog gentamicina u fosfatnom puferu minimalno je uticao na ukupan broj bakterijskih ćelija, jer je njihova osetljivost pri postignutim koncentracijama antibiotika u suspenziji bila slaba. Trend opadanja ukupnog broja ćelija kod ovog uzorka nastavljen je sve do 24h inkubacije kada je u fosfatnom puferu utvrđeno 10^3 CFU/ml, što je za oko 3 logaritamske jedinice niži ukupan broj ćelija u odnosu na početni broj u suspenziji. Na osnovu posmatrane kinetike antibakterijske aktivnosti, ispitivana HAP/CS/Gr/Gent prevlaka poseduje samo bakteiostatski efekat prema soju *E.coli* ATCC 25922.

Kada se analiziraju rezultati otpuštanja gentamicina (slika 41) i uporede sa rezultatima za antibakterijsku aktivnost za HAP/CS/Gr/Gent prevlaku, koja je pokazala značajnu efikasnost prema *S. aureus* TL i *E.coli* ATCC 25922 na osnovu širine zone inhibicije određene agar difuzionim testom (slika 42) kao i na osnovu otpuštanja gentamicina u okolnu suspenziju [286], interesantna korelacija može da se primeti. HAP/CS/Gr/Gent prevlaka je ispoljila jak antibakterijski efekat prema oba testirana bakterijska soja, a posebno dobro izražen prema *S.aureus* TL, izazivajući potpunu redukciju bakterijskih ćelija već nakon samo 3h izlaganja (od $5,66 \times 10^2$ do 0 CFU ml⁻¹), dok je u slučaju soja *E.coli* ATCC 25922 značajna redukcija primećena između 3h i 24h inkubacije. (od $1,46 \times 10^6$ do $2,53 \times 10^3$ CFU ml⁻¹). Brz i jak antibakterijski efekat zapažen tokom prvih 24 h inkubacije poklapa se sa intenzivnim otpuštanjem gentamicina na samom početku eksperimenta uočenim na kumulativnom profilu otpuštanja gentamicina (slika 41a).

5.2.5.2. Citotoksičnost

5.2.5.2.1. MTT test

MTT test je korišćen u cilju *in vitro* ispitivanja citotoksičnosti na dve ciljane ćelijske linije, MRC-5 (ljudski fibroblasti) i L929 (mišji fibroblasti). HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent su upoređeni korišćenjem standardnog MTT testa za procenu broja vijabilnih ćelija koje konvertuju vodorastvornu žutu MTT boju u nerastvorni ljubičasti formazan. Spektrofotometrijski određena količina formazana na 540/690 nm je direktno proporcionala broju živih ćelija, procenjujući stepen citotoksičnosti. Rezultati MTT testa su prikazani na slici 44, upoređujući ćelijsku vijabilnost u prisustvu HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent sa kontrolom (slepom probom koja sadrži samo ćelije).

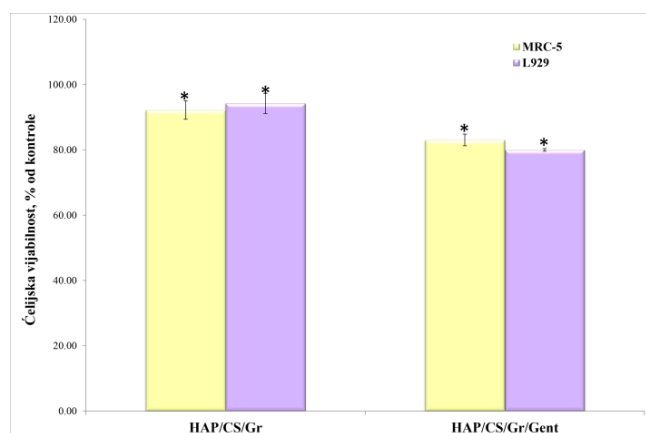


Slika 44. Vijabilnost MRC-5 i L929 ćelija za HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlake. Statistička evaluacija uzoraka urađena u triplikatu izvedena je korišćenjem jednosmerne ANOVA metode, sa post hoc analizom višestrukih upoređivanja (*p < 0.01 unutar ćelijske linije)

Prema jednoj od skala citotoksičnosti materijala [246] nema dokaza o citotoksičnosti HAP/CS/Gr prevlake za obe testirane ćelijske linije (vijabilnost > 90 %), dok je u slučaju HAP/CS/Gr/Gent umerena citotoksičnost uočena (vijabilnost 60-90 %). Ćelijska linija L929 je ispoljila blago smanjenu vijabilnost u prisustvu oba uzorka, u poređenju sa MRC-5 ćelijskom linijom što se može objasniti povećanom osetljivošću L929 ćelijske linije.

5.2.5.2.1. Test odbacivanja boje tripan-plavo (DET)

Slika 45 predstavlja rezultate tripan plavog DET testa koji je sproveden na dve ćelijske linije fibroblasta – humanim MRC-5 i mišjim L929 u cilju procene udela vijabilnih ćelija u prisustvu HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka.



Slika 45. Inhibicija rasta MRC-5 i L929 ćelija (izražena kao procenat u odnosu na kontrolu) prilikom izlaganja HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlakama.

Slika 41c prikazuje ETA model primenjen na eksperimentalne podatke otpuštanja (u prvih 14 dana) za HAP/CS/Gr/Gent prevlaku. Izračunat koeficijent difuzije, D , iznosio je $4,5 \times 10^{-14} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, ukazujući na sporo otpuštanje gentamicina iz prevlake tokom prvih 14 dana. Poređenjem dobijenih koeficijenata difuzije za otpuštanje gentamicina iz HAP/CS/Gr/Gent prevlake sa koeficijentom difuzije za HAP/CS/Gent prevlaku ($D= 2,4 \times 10^{-14} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) [294] uočeno je da HAP/CS/Gr/Gent prevlaka ispoljava skoro duplo brže otpuštanje u poređenju sa HAP/CS/Gr prevlakom.

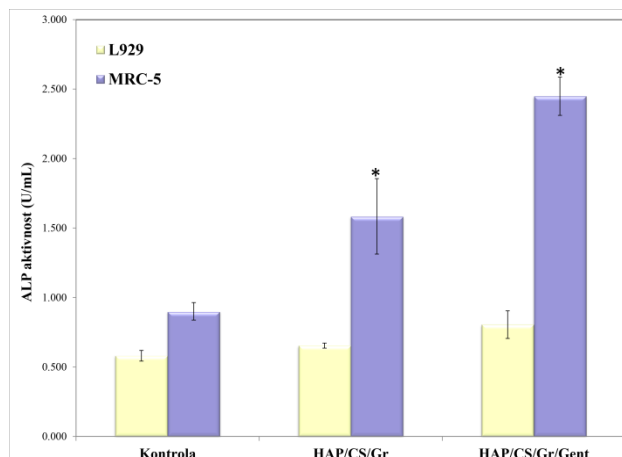
Ovaj zaključak je u skladu sa rezultatima za ukupnu koncentraciju gentamicina u HAP/CS/Gr/Gent prevlaci za koju je određena veća vrednost (13,9 μg) u odnosu na HAP/CS/Gent (9,4 μg) ukazujući da dodatak grafena poboljšava inkorporaciju gentamicina dok u isto vreme izaziva brže otpuštanje iz prevlake. Primena grafena kao nosača lekova je predmet mnogih istraživanja zahvaljujući njegovoj velikoj specifičnoj površini koja omogućava vezivanje gentamicina sa obe strane grafenskih listova [282,305,306]. Ovo bi moglo da bude objašnjenje većeg stepena inkorporacije gentamicina u HAP/CS/Gr/Gent prevlaci u poređenju sa HAP/CS/Gent prevlakom.

5.2.5.3. Aktivnost alkalne fosfataze

Slika 41c prikazuje ETA model primenjen na eksperimentalne podatke otpuštanja (u prvih 14 dana) za HAP/CS/Gr/Gent prevlaku. Izračunat koeficijent difuzije, D , iznosio je $4,5 \times 10^{-14} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, ukazujući na sporo otpuštanje gentamicina iz prevlake tokom prvih 14 dana. Poređenjem dobijenih koeficijenata difuzije za otpuštanje gentamicina iz HAP/CS/Gr/Gent prevlake sa koeficijentom difuzije za HAP/CS/Gent prevlaku ($D= 2,4 \times 10^{-14} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) [294] uočeno je da HAP/CS/Gr/Gent prevlaka ispoljava skoro duplo brže otpuštanje u poređenju sa HAP/CS/Gr prevlakom.

Ovaj zaključak je u skladu sa rezultatima za ukupnu koncentraciju gentamicina u HAP/CS/Gr/Gent prevlaci za koju je određena veća vrednost (13,9 μg) u odnosu na HAP/CS/Gent

(9,4 µg) ukazujući da dodatak grafena poboljšava inkorporaciju gentamicina dok u isto vreme izaziva brže otpuštanje iz prevlake. Primena grafena kao nosača lekova je predmet mnogih istraživanja zahvaljujući njegovoj velikoj specifičnoj površini koja omogućava vezivanje gentamicina sa obe strane grafenskih listova [282,305,306]. Ovo bi moglo da bude objašnjenje većeg stepena inkorporacije gentamicina u HAP/CS/Gr/Gent prevlaci u poređenju sa HAP/CS/Gent prevlakom.



Slika 46. Nivo ALP u ćelijskom ekstraktu MRC-5 i L929 u prisustvu HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka. * $p < 0,05$ za odgovarajuću ćelijsku liniju

Kada se poredе rezultati ALP nivoa u prisustvu HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka za ispitivane ćelijske ekstrakte (MRC-5 i L929) sa kontrolom, primećeno je statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje za oba uzorka. MRC-5 ćelijska linija fibroblasta je ispoljila veće vrednosti nivoa ALP u odnosu na L929 ćelijsku liniju u prisustvu oba ispitivana uzorka. Prevlaka sa antibiotikom, HAP/CS/Gr/Gent je ispoljila znatno izraženiji ALP potencijal (2,449 U/mL za MRC-5 i 0,805 U/mL za L929) u odnosu na HAP/CS/Gr prevlaku (1,584 U/mL za MRC-5 i 0,654 U/mL za L929). Na osnovu dobijenih rezultata za ALP, može se konstatovati da oba uzorka poseduju visok potencijal biomineralizacije čak i u slučaju nespecifičnih ćelijskih linija fibroblasta. Visok nivoi ALP-a u ćelijskim ekstraktima predstavljaju ohrabrujuće rezultate za dalja ispitivanja HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka prema tkivno specifičnim ćelijskim linijama.

6. ZAKLJUČAK

U ovoj doktorskoj disertaciji uspešno su dobijene nove, antibakterijske prevlake na bazi hidroksiapatita, hitozana, grafena i gentamicina na titanu, postupkom elektroforetskog taloženja. Taloženje je izvedeno iz stabilnih, koloidnih vodenih suspenzija pri prethodno optimizovanim uslovima taloženja (konstantan napon – 5V, vreme taloženja – 12 minuta). Grafen je uspešno inkorporiran u neorgansko-polimernu matricu prevlaka, i njegov uticaj na strukturu dobijenih prevlaka je detaljno ispitan. Takođe, inkorporacija antibakterijskog agensa (antibiotika gentamicina) i njegov uticaj na strukturu, svojstva i antibakterijsku aktivnost novosintetisanih prevlaka je detaljno ispitan i verifikovan. Detaljnim fizičko-hemijskim ispitivanjima, kao i detaljnom analizom kinetike otpuštanja gentamicina, sposobnosti biomineralizacije, citotoksičnosti i antibakterijske aktivnosti prevlaka, izvedeni su sledeći zaključci:

- Dobijene su stabilne, koloidne, vodene HAP/CS, HAP/CS/Gr, HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent suspenzije koje su omogućile taloženje novih kompozitnih prevlaka na titanu. Optimizovani su uslovi taloženja prevlaka postupkom elektroforetskog taloženja
- Sinteza kompozitnih HAP/CS, HAP/CS/Gr, HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka je uspešno izvršena postupkom kataforetskog taloženja pri konstantnom naponu od 5V i vremenu taloženja od 12 min.
- XRD analizom potvrđeno je prisustvo hidroksiapatita na površini titana. U slučaju obe prevlake sa gentamicinom (HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent), potvrđeno je da inkorporacija gentamicina dovodi do smanjenja veličine kristalita sa vrednostima od 397 Å za HAP/CS/Gent prevlaku u poređenju sa 511 Å za HAP/CS prevlaku, i sa vrednostima od 311 Å za HAP/CS/Gr/Gent prevlaku u poređenju sa 435 Å za HAP/CS/Gr prevlaku. Manja veličina kristalita, nakon dodatka antibiotika gentamicina je ukazala na veću kontaktnu površinu prevlaka, čime se doprinosi interakcijama između ćelija i površine biomaterijala i poboljšanoj bioaktivnosti.
- FT-IR analizom je detaljno ispitana hemijska struktura novosintetisanih kompozita i potvrđeno je prisustvo svih komponentata prevlaka – HAP, CS, Gr i Gent. Zbog sličnosti u strukturi hitozana i gentamicina (aminoglikozidna struktura) došlo je do preklapanja karakterističnih traka za ove komponente na FT-IR spektru HAP/CS/Gent prevlake dok je u slučaju HAP/CS/Gr/Gent prevlake uočena traka na 1640 cm^{-1} koja je potvrdila prisustvo gentamicina. Takođe, FT-IR analizom je uočeno prisustvo vodoničnih veza između –OH grupa hidroksiapatita i –OH i –NH₂ grupa hitozana. Takođe, dekonvolucija specifičnih FT-IR traka potvrdila je "AB-tip" karbonatne supstitucije hidroksiapatita.
- XPS analizom je ispitan hemijski sastav i priroda veze u prevlakama. Dobije rezultati Ca/P odnosa su ukazali na prisustvo kalcijum-deficitarnog hidroksiapatita za sve sintetisane prevlake (Ca/P=1,3 za HAP/CS; Ca/P=1,26 za HAP/CS/Gr, Ca/P=1,2 za HAP/CS/Gent, Ca/P=1,27 za HAP/CS/Gr/Gent) što je u skladu sa FT-IR rezultatima. Dekonvolucija C1s spektra visoke rezolucije je ukazala na uspešno vezivanje funkcionalnih grupa gentamicina za HAP/CS i HAP/CS/Gr kompozitnu matricu. Takođe, prisustvo sumpora, kao i skoro duplo veći sadržaj azota detektovan XPS-om je potvrdio prisustvo gentamicina u HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent prevlakama.

- Ramanovom spektroskopijom je potvrđena inkorporacija grafena u HAP/CS matricu, u slučaju HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent prevlake, pojavom karakterističnih vibracionih traka – G trake na 1566 cm^{-1} , D trake na 1358 cm^{-1} , i 2D trake na 2704 cm^{-1} za HAP/CS/Gr, i D trake na 1372 cm^{-1} i 2D trake na 2728 cm^{-1} za HAP/CS/Gr/Gent. Uvođenje gentamicina u HAP/CS i HAP/CS/Gr matrice je dovelo do promena u vibracionom režimu PO_4^{3-} grupe (manji intenzitet trake koja odgovara vibraciji istezanja PO_4^{3-} nakon uvođenja antibiotika za HAP/CS/Gr/Gent).
- Morfološke karakteristike prevlaka su ispitane FE-SEM analizom i dobijeni rezultati su ukazali na prisustvo homogene, porozne površine bez prisustva pukotina. Na površini svih prevlaka (HAP/CS, HAP/CS/Gr, HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent) uočeno je prisustvo pravilnih, sfernih čestica sintetičkog HAP-a, dispergovanog u matrici hitozana. Morfologija prevlaka nije bilse promenila inkorporacijom gentamicina, ali je njegova prisutnost uzrokovala manju veličinu kristalita za HAP/CS/Gr/Gent prevlaku (311 \AA) u poređenju sa HAP/CS/Gr prevlakom (435 \AA), što je povoljno sa stanovišta bioaktivnosti.
- Ispitivanjem adhezije prema ISO 2409 standardu uočena je dobra adhezija svih prevlaka za titanski supstrat, odnosno podlogu, bez sklonosti delaminaciji. Prema klasifikaciji iz standarda, HAP/CS i HAP/CS/Gr se mogu klasifikovati kao „0“ sa potpuno glatkim ivicama i bez oštećenja useka nastalih tokom analize, dok HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent se mogu klasifikovati kao „1“ sa pojavom ljuspica na mestima ukrštanja useka.
- Termogravimetrijskom analizom i diferencijalno skenirajućom kalorimetrijom su potvrđena dobra termička svojstva i veća stabilnost u slučaju prevlaka koje su sadržale grafen (HAP/CS/Gr i HAP/CS/Gr/Gent). TGA analiza je ukazala i na smanjenje termičke stabilnosti prevlake nakon inkorporacije gentamicina, što je potvrđeno značajnom razlikom u ukupnom gubitku mase između HAP/CS (8,0 mas. %) i HAP/CS/Gent (16,1 mas. %) prevlaka i između HAP/CS/Gr (10,5 mas. %) i HAP/CS/Gr/Gent (14,8 mas. %) prevlaka.
- Ukupna količine gentamicina inkorporirane u HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent prevlake su određene korišćenjem HPLC metode sa UV detekcijom. Prosečne dobijene vrednosti su iznosile $7,3 \pm 0,1\text{ }\mu\text{g}$ po površini od 1 cm^2 za HAP/CS/Gent prevlaku i $8,2 \pm 0,1\text{ }\mu\text{g}$ po 1 cm^2 za HAP/CS/Gr/Gent. Veća količina inkorporiranog gentamicina u slučaju HAP/CS/Gr/Gent prevlake je pripisana prisustvu grafena i njegovoj velikoj specifičnoj površini koja je omogućila adsorpciju/vezivanje veće količine leka u poređenju sa prevlakom bez grafena (HAP/CS/Gent).
- Ukupna količina gentamicina i odgovarajući profili otpuštanja su ispitani i HPLC metodom sa MS detektorom, zbog veće osetljivosti MS detektora i mogućnosti detekcije nižih koncentracija leka u prevlakama. Ukupna količina gentamicina inkorporirana u HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent prevlake određena HPLC-MS metodom je iznosila $9,4\text{ }\mu\text{g cm}^{-2}$ i $13,9\text{ }\mu\text{g cm}^{-2}$, redom. Kinetika otpuštanja gentamicina je ispitivana u uslovima koji imitiraju fiziološke uslove ($37\text{ }^\circ\text{C}$) praćenjem otpuštanja gentamicina iz prevlaka u dejonizovanoj vodi tokom 21 dana. Analizom profila otpuštanja gentamicina iz HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka, utvrđeno je postepeno otpuštanje antibiotika tokom 21 dana otpuštanja, sa velikom količinom otpuštenog antibiotika tokom prvih 7 dana (50,1 % od ukupne količine Gent prisutne u HAP/CS/Gent prevlakama, odnosno 61,1 % od ukupne

količine Gent prisutne u HAP/CS/Gr/Gent prevlakama) što je ključni faktor pri suzbijanju infekcija nakon implantacije. Nakon 21-og dana, prevlake sa dodatkom grafena su otpustile veći procenat gentamicina (74 % od ukupne količine prisutne u prevlaci) u poređenju sa prevlakama bez grafena (62,9 % od ukupne količine prisutne u prevlaci) te je zaključeno da je grafen poželjna komponenta biokompozitnih prevlaka, mada se i HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent prevlake mogu okarakterisati kao pogodni kandidati za lokalnu administraciju lekova u medicini.

- Dobijeni profili otpuštanja gentamicina fitovani su Korsmeyer-Peppas i ETA teorijskim difuzionim modelima, koji su pokazali da je mehanizam otpuštanja difuziono kontrolisan i da sledi Fikov zakon difuzije. Ovaj zaključak je donešen na osnovu vrednosti eksponenta n izračunatog iz Korsmeyer-Peppas modela ($n < 0,5$ za sve ispitivane uzorke). Izračunati su i koeficijenti difuzije otpuštanja gentamicina iz HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent prevlaka na osnovu modela aproksimacije ranog vremena i iznosili su $2,4 \times 10^{-14} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ za HAP/CS/Gent i $4,5 \times 10^{-14} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, za HAP/CS/Gr/Gent što ukazuje na sporo oslobađanje gentamicina iz prevlake tokom prvih 14 dana. Upoređujući dobijeni koeficijent difuzije za oslobađanje gentamicina iz HAP/CS/Gr/Gent prevlake sa koeficijentom za HAP/CS/Gent prevlaku uočeno je da HAP/CS/Gr/Gent prevlaka pokazuje gotovo dvostruko bržu stopu oslobađanja u poređenju sa HAP/CS/Gent prevlakom. Ovaj zaključak je u skladu sa rezultatima ukupne koncentracije gentamicina u HAP/CS/Gr/Gent prevlaci, koja je pokazala veću vrednost (13,9 μg) u odnosu na HAP/CS/Gent prevlaku (9,4 μg), što ukazuje da dodatak grafena utiče na bolju adsorpciju i vezivanje leka za kompozitnu matricu, ali takođe i doprinosi povećanju brzine otpuštanja leka u odnosu na prevlaku bez grafena.
- Antibakterijska aktivnost svih uzoraka ispitana je agar difuzionom metodom i praćenjem kinetike antibakterijske aktivnosti prema dve vrste bakterija (*S. aureus* TL i *E. coli* ATCC 25922) koje su često uzrok postoperativnih infekcija. Dobijeni rezultati su ukazali na jak antibakterijski efekat prevlaka sa gentamicinom (HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent) prema obe vrste bakterije. Agar difuzionom metodom su uočene jasne, široke zone inhibicije prema soju *S. aureus* TL, dok se zona inhibicije prema soju *E. coli* ATCC 25922 sastojala sastojale od svetle i tamne oblasti što je ukazalo na različitu osetljivost populacije ćelija ovog soja prema ispitivanom antibiotiku gentamicinu (svetla oblast sa maksimalnom osetljivošću ćelija i tamna oblast unutar koje je samo jedan deo ćelija pokazao osetljivost) za HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent. Prevlake bez antibiotika (HAP/CS i HAP/CS/Gr) nisu pokazale antibakterijsku aktivnost agar difuzionom metodom. Praćenjem kinetike antibakterijske aktivnosti u fosfatnom puferu potvrđen je baktericidni efekat prevlaka sa gentamicinom (HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent) prema soju Gram-pozitivne vrste bakterije *S. aureus* TL. U prisustvu obe prevlake u fosfatnom puferu došlo je do potpune redukcije ukupnog broja ćelija soja *S. aureus* TL već 1 h nakon inkubacije sa HAP/CS/Gent uzorkom i 3 h nakon inkubacije sa HAP/CS/Gr/Gent uzorkom, čime je samo potvrđen jak antibakterijski efekat ovih prevlaka utvrđen agar difuzionom metodom. Antibakterijski efekat prevlaka sa gentamicinom (HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent) prema soju Gram-negativne vrste *E. coli* ATCC 25922 je bio slabiji i može se klasifikovati kao bakteriostatski, uz značajno smanjenja ukupnog broja ćelija tokom 24h inkubacije (oko 3 logaritamske jedinice). Tokom praćenja kinetike antibakterijske aktivnosti prevlaka bez gentamicina (HAP/CS i HAP/CS/Gr) nije uočen antibakterijski efekat hitozana ili sinergistički antibakterijski efekat hitozana i grafena, što se može pripisati njihovim niskim koncentracijama u samim ispitivanim

prevlakama. Uprkos niskoj koncentraciji gentamicina u kompozitnim HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent prevlakama, antibakterijska ispitivanja su potvrdila efikasnost ovih koncentracija u prevlakama prema sojevima *E. coli* ATCC 25922 i *S. aureus* TL.

- Citotoksičnost istaloženih prevlaka je ispitana MTT i DET testovima citotoksičnosti prema dve ćelijske linije; humanim MRC-5 i mišjim L929 fibroblastima. Rezultati ovih analiza su ukazali na necitotoksičnost ili blagu toksičnost ispitivanih prevlaka. Prema kvantitativnoj skali citotoksičnosti, HAP/CS i HAP/CS/Gr prevlake su klasifikovane kao necitotoksične, dok su HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent prevlake ispoljile blagu citotoksičnost, verovatno usled prisustva gentamicina. Mišja ćelijska linija L929 pokazala je blago smanjenu vijabilnost u prisustvu svih istaloženih uzorka, u poređenju sa humanom ćelijskom linijom MRC-5, što se može objasniti povećanom osetljivošću L929 ćelija.
- Bioaktivna svojstva istaloženih prevlaka su potvrđena biomimetičkim rastom novog sloja hidroksiapatita koji se odlikuje AB tipom supstitucije na svim ispitivanim površinama uzoraka nakon 7 dana izloženosti SBF rastvoru na 37 °C. Sposobnost biomineralizacije je detaljno ispitana primenom XRD, FT-IR i FE-SEM metode, kao i spektroskopijom elektrohemijske impedancije i potenciodinamičkim merenjima. Dodatno, ALP test na MRC-5 i L929 ćelijskim linijama kao važan marker bioaktivnog potencijala, odnosno osteointegracije je potvrdio visok nivo ALP enzima u prisustvu svih ispitivanih uzoraka. Prevlake sa gentamicinom (HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent) su ispoljile veće vrednosti ALP u poređenju sa ekvivalentnim prevlakama bez gentamicina (HAP/CS i HAP/CS/Gr) i u odnosu na kontrolu.
- XRD analiza je potvrdila prisustvo karbonatno-substituisanog HAP-a AB-tipa na površini ispitivanih prevlaka (HAP/CS, HAP/CS/Gr, HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent). Ovo je dodatno potvrđeno EDS analizom prevlaka nakon potapanja gde je uočen Ca/P odnos od 1,64 i 1,52 za HAP/CS i HAP/CS/Gr i 1,46 i 1,24 za HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent, respektivno. I u slučaju novonaraslog HAP-a je uočena manja veličina kristalita za prevlake sa gentamicinom (374 Å i Å) u odnosu na HAP/CS i HAP/CS/Gr (387 Å i Å) što je pripisano manjoj veličini kristalita u ovim prevlakama pre potapanja uzoraka u SBF. Ovi rezultati ukazuju na sličnost biomimetički formiranog HAP-a sa prirodnim biološkim apatitom, ističući njegov visok potencijal za medicinsku primenu.
- FT-IR analiza uzoraka nakon potapanja u SBF rastvor je potvrdila prisustvo AB-supstituisanog HAP-a na površini prevlaka. Traka na 3570 cm⁻¹ koja je uvek prisutna na FT-IR spektrima HAP-a i koja se pripisuje istezanju OH⁻ grupe u strukturi HAP-a je bila odsutna na FT-IR spektrima svih uzoraka nakon potapanja i direktno je ukazala na karbonatnu supstituciju novonaraslog sloja HAP-a gde su OH⁻ grupe zamenjene karbonatnim grupama. Dodatno, položaji karbonatnih grupa na FT-IR spektrima svih uzoraka su ukazali na prisustvo karbonatno-supstituisanog HAP-a čija je struktura slična strukturi prirodnih apatita.
- FE-SEM analizom je pokazano da su nakon potapanja u SBF rastvor, na površini HAP/CS prevlake zapaženi sferni aglomerati biomimetičkog HAP-a, dok su u slučaju HAP/CS/Gent prevlake zapažene čestice nepravilnog oblika. Pored promene oblika novonastalih čestica, zabeleženo je i smanjenje veličine aglomerata biomimetičkog HAP-a kod prevlaka sa gentamicinom (HAP/CS/Gent), u poređenju sa prevlakama bez gentamicina (HAP/CS).

- Elektrohemijaska merenja vršena nakon izlaganja prevlaka SBF rastvoru tokom 28 dana su ukazala na smanjenje gustine struje korozije biokompozitnih prevlake što je indirektni pokazatelj rasta novog apatitnog sloja. Vrednosti gustine korozione struje, dobijene polarizacionim merenjima, pokazale su trend opadanja tokom vremena ($0,011 \mu\text{A cm}^{-2}$ za HAP/CS i $0,017 \mu\text{A cm}^{-2}$ za HAP/CS/Gent nakon 28 dana, u poređenju sa $0,061$ i $0,52 \mu\text{A cm}^{-2}$ pre potapanja, redom). Gustina korozione struje značajno je opala i u slučaju uzoraka sa grafenom – zabeleženo je desetostruko smanjenje za HAP/CS/Gr (sa $0,17$ na $0,016 \mu\text{A cm}^{-2}$) i HAP/CS/Gr/Gent (sa $0,14$ na $0,043 \mu\text{A cm}^{-2}$). Slično tome, EIS merenja su ukazala na povećanje impedancije kod svih prevlake, uz smanjenje kapacitivnosti prevlake i dvostrukog električnog sloja, što ukazuje na formiranje novog sloja biomimetičkog HAP-a. Ovi rezultati, zajedno sa nalazima XRD i FTIR analiza, potvrđuju snažan potencijal nosivih prevlaka za biomimetičku mineralizaciju u SBF rastvoru.
- Zaključno, na osnovu svih rezultata karakterizacije i biološkog ponašanja, prevlake sa gentamicinom – HAP/CS/Gent i HAP/CS/Gr/Gent se mogu smatrati obećavajućim biomaterijalima za dalja istraživanja i potencijalnu biomedicinsku primenu kao implantati koštanog tkiva sa akcentom na lokalnoj administraciji lekova i postepenom otpuštanju antibiotika.

7. LITERATURA

- [1] A. Das, D. Pamu, A comprehensive review on electrical properties of hydroxyapatite based ceramic composites, *Mater. Sci. Eng. C.* 101 (2019) 539–563. doi:10.1016/j.msec.2019.03.077.
- [2] T. Nii, Y. Katayama, Biomaterial-Assisted Regenerative Medicine, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 1–18, <https://doi.org/10.3390/ijms22168657>.
- [3] M. Rahmati, E.A. Silva, J.E. Reseland, C. A. Heyward, H.J. Haugen, Biological responses to physicochemical properties of biomaterial surface, *Chem. Soc. Rev.* 49 (2020) 5178–5224. doi:10.1039/d0cs00103a.
- [4] T. Aydemir, L. Liverani, J.I. Pastore, S.M. Ceré, W.H. Goldmann, A.R. Boccaccini, J. Ballarre, Functional behavior of chitosan/gelatin/silica-gentamicin coatings by electrophoretic deposition on surgical grade stainless steel, *Mater. Sci. Eng. C.* 115 (2020) 111062. doi:10.1016/j.msec.2020.111062.
- [5] O. Geuli, N. Metoki, T. Zada, M. Reches, N. Eliaz, D. Mandler, Synthesis, coating, and drug-release of hydroxyapatite nanoparticles loaded with antibiotics, *J. Mater. Chem. B.* 5 (2017) 7819–7830. doi:10.1039/c7tb02105d.
- [6] A. Simchi, E. Tamjid, F. Pishbin, A.R. Boccaccini, Recent progress in inorganic and composite coatings with bactericidal capability for orthopaedic applications, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 7 (2011) 22–39. doi:10.1016/j.nano.2010.10.005.
- [7] H. yang Li, D. ni Huang, K. feng Ren, J. Ji, Inorganic-polymer composite coatings for biomedical devices, *Smart Mater. Med.* 2 (2021) 1–14. doi:10.1016/j.smaim.2020.10.002.
- [8] W. Wang, K.W.K. Yeung, Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review, *Bioact. Mater.* 2 (2017) 224–247. doi:10.1016/j.bioactmat.2017.05.007.
- [9] F. Sharifianjazi, S. Khaksar, A. Esmailkhanian, L. Bazli, S. Eskandarinezhad, P. Salahshour, F. Sadeghi, S. Rostamnia, S.M. Vahdat, Advancements in Fabrication and Application of Chitosan Composites in Implants and Dentistry: A Review, *Biomolecules.* 12 (2022). doi:10.3390/biom12020155.
- [10] X. Cheng, D. Deng, L. Chen, J.A. Jansen, S.G.C. Leeuwenburgh, F. Yang, Electrodeposited Assembly of Additive-Free Silk Fibroin Coating from Pre-Assembled Nanospheres for Drug Delivery, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 12 (2020) 12018–12029. doi:10.1021/acsami.9b21808.
- [11] S. Awasthi, S.K. Pandey, E. Arunan, C. Srivastava, A review on hydroxyapatite coatings for the biomedical applications: Experimental and theoretical perspectives, *J. Mater. Chem. B.* 9 (2021) 228–249. doi:10.1039/d0tb02407d.
- [12] B.J. McEntire, B.S. Bal, M.N. Rahaman, J. Chevalier, G. Pezzotti, Ceramics and ceramic coatings in orthopaedics, *J. Eur. Ceram. Soc.* 35 (2015) 4327–4369. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2015.07.034.
- [13] X. Han, J. Ma, A. Tian, Y. Wang, Y. Li, B. Dong, X. Tong, X. Ma, Surface modification techniques of titanium and titanium alloys for biomedical orthopaedics applications: A review, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 227 (2023) 113339. doi:10.1016/j.colsurfb.2023.113339.
- [14] W. Zimmerli, P. Sendi, Orthopaedic biofilm infections, *Apmis.* 125 (2017) 353–364. doi:10.1111/apm.12687.
- [15] Y. Chang, Y. Li, T. Fan, K. Jiang, J. Lv, J. Huang, Pathogenic bacteria characteristics and drug resistance in acute, delayed, and chronic periprosthetic joint infection: A retrospective analysis of 202 patients, *Int. Wound J.* 20 (2023) 3315–3323. doi:10.1111/iwj.14212.
- [16] N. Eliaz, N. Metoki, Calcium phosphate bioceramics: A review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications, *Materials (Basel).* 10 (2017) 1–104. doi:10.3390/ma10040334.
- [17] L. Pighinelli, M. Kucharska, Chitosan-hydroxyapatite composites, *Carbohydr. Polym.* 93 (2013) 256–262. doi:10.1016/j.carbpol.2012.06.004.
- [18] D.J. Hadjidakis, I.I. Androulakis, Bone remodeling, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1092 (2006) 385–

396. doi:10.1196/annals.1365.035.

- [19] H.M. Frost, Wolff's Law and bone's structural adaptations to mechanical usage: An overview for clinicians, *Angle Orthod.* 64 (1994) 175–188.
- [20] A.G. Doshi, G. Fernandes, J.R. Patel, V. Gaur, Role Of Wolffs Law In Basal Implantology, *IOSR J. Pharm. Biol. Sci.* 18 (2023) 32–36.
- [21] S. Feroz, P. Cathro, S. Ivanovski, N. Muhammad, Biomimetic bone grafts and substitutes: A review of recent advancements and applications, *Biomed. Eng. Adv.* 6 (2023) 100107. doi:10.1016/j.bea.2023.100107.
- [22] E.T.J. Chong, J.W. Ng, P.C. Lee, Classification and Medical Applications of Biomaterials—A Mini Review, *BIO Integr.* 4 (2023) 54–61. doi:10.15212/bioi-2022-0009.
- [23] P. Baskaran, B. Muthiah, V. Uthirapathy, A systematic review on biomaterials and their recent progress in biomedical applications: Bone tissue engineering, *Rev. Inorg. Chem.* (2025) 1–35. doi:10.1515/revic-2024-0062.
- [24] D. Aggarwal, V. Kumar, S. Sharma, Drug-loaded biomaterials for orthopedic applications: A review, *J. Control. Release.* 344 (2022) 113–133. doi:10.1016/j.jconrel.2022.02.029.
- [25] S. Marecik, I. Pudełko-Prażuch, M. Balasubramanian, S.M. Ganesan, S. Chatterjee, K. Pielichowska, R. Kandaswamy, E. Pamuła, Effect of the Addition of Inorganic Fillers on the Properties of Degradable Polymeric Blends for Bone Tissue Engineering, *Molecules.* 29 (2024) 3826. doi:10.3390/molecules29163826.
- [26] N. Arora, S. Dua, V.K. Singh, S.K. Singh, T. Senthilkumar, A comprehensive review on fillers and mechanical properties of 3D printed polymer composites, *Mater. Today Commun.* 40 (2024) 109617. doi:10.1016/j.mtcomm.2024.109617.
- [27] H.A. Hegab, Design for additive manufacturing of composite materials and potential alloys: A review, *Manuf. Rev.* 3 (2016). doi:10.1051/mfreview/2016010.
- [28] G.A. dos Santos, The Importance of Metallic Materials as Biomaterials, *Adv. Tissue Eng. Regen. Med. Open Access.* 3 (2017) 300–302. doi:10.15406/atroat.2017.03.00054.
- [29] J.W. Nicholson, Titanium Alloys for Dental Implants: A Review, *Prosthesis.* 2 (2020) 100–116. doi:10.3390/prosthesis2020011.
- [30] D. Aroussi, B. Aour, A.S. Bouaziz, A Comparative Study of 316L Stainless Steel and a Titanium Alloy in an Aggressive Biological Medium, *Eng. Technol. Appl. Sci. Res.* 9 (2019) 5093–5098. doi:10.48084/etasr.3208.
- [31] A. Vaicelyte, C. Janssen, M. Le Borgne, B. Grosogeat, Cobalt–Chromium Dental Alloys: Metal Exposures, Toxicological Risks, CMR Classification, and EU Regulatory Framework, *Crystals.* 10 (2020) 1–16. doi:10.3390/cryst10121151.
- [32] K.T. Kim, M.Y. Eo, T.T.H. Nguyen, S.M. Kim, General review of titanium toxicity, *Int. J. Implant Dent.* 5 (2019). doi:10.1186/s40729-019-0162-x.
- [33] G.L. Klein, Aluminum toxicity to bone: A multisystem effect?, *Osteoporos. Sarcopenia.* 5 (2019) 2–5. doi:10.1016/j.afos.2019.01.001.
- [34] H.F. Hildebrand, N. Blanchemain, G. Mayer, F. Chai, M. Lefebvre, F. Boschini, Surface coatings for biological activation and functionalization of medical devices, *Surf. Coatings Technol.* 200 (2006) 6318–6324. doi:10.1016/j.surfcoat.2005.11.086.
- [35] C. Holmes, M. Tabrizian, *Surface Functionalization of Biomaterials*, Elsevier Inc., 2015. doi:10.1016/B978-0-12-397157-9.00016-3.
- [36] B. Lv, J. Wu, Y. Xiong, X. Xie, Z. Lin, B. Mi, G. Liu, Functionalized multidimensional biomaterials for bone microenvironment engineering applications: Focus on osteoimmunomodulation, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10 (2022) 1–19. doi:10.3389/fbioe.2022.1023231.
- [37] P.S.V.V.S. Narayana, P.S.V.V. Srihari, Biofilm resistant surfaces and coatings on implants: A review, *Mater. Today Proc.* 18 (2019) 4847–4853. doi:10.1016/j.matpr.2019.07.475.
- [38] E.J. Tobin, Recent coating developments for combination devices in orthopedic and dental applications: A literature review, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 112 (2017) 88–100. doi:10.1016/j.addr.2017.01.007.

- [39] Z. Hadzhieva, A.R. Boccaccini, Recent developments in electrophoretic deposition (EPD) of antibacterial coatings for biomedical applications - A review, *Curr. Opin. Biomed. Eng.* 21 (2022) 100367. doi:10.1016/j.cobme.2021.100367.
- [40] F. Jahanmard, F.M. Dijkmans, A. Majed, H.C. Vogely, B.C.H. Van Der Wal, D.A.C. Stapels, S.M. Ahmadi, T. Vermonden, S. Amin Yavari, Toward Antibacterial Coatings for Personalized Implants, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 6 (2020) 5486–5492. doi:10.1021/acsbiomaterials.0c00683.
- [41] X. Cheng, Y. Liu, O. Liu, Y. Lu, Z. Liao, Z. Hadzhieva, L. Chen, S.G.C. Leeuwenburgh, A.R. Boccaccini, F. Yang, Electrophoretic deposition of coatings for local delivery of therapeutic agents, *Prog. Mater. Sci.* 136 (2023) 101111. doi:10.1016/j.pmatsci.2023.101111.
- [42] L. Liu, R. Bhatia, T.J. Webster, Atomic layer deposition of nano-TiO₂ thin films with enhanced biocompatibility and antimicrobial activity for orthopedic implants, *Int. J. Nanomedicine.* 12 (2017) 8711–8723. doi:10.2147/IJN.S148065.
- [43] S. Eraković, A. Janković, I.Z. Matić, Z.D. Juranić, M. Vukašinović-Sekulić, T. Stevanović, V. Miskovic-Stankovic, Investigation of silver impact on hydroxyapatite/lignin coatings electrodeposited on titanium, *Mater. Chem. Phys.* 142 (2013) 521–530. doi:10.1016/j.matchemphys.2013.07.047.
- [44] J. Jeong, J.H. Kim, J.H. Shim, N.S. Hwang, C.Y. Heo, Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration, *Biomater. Res.* 23 (2019) 1–11. doi:10.1186/s40824-018-0149-3.
- [45] H. Shi, Z. Zhou, W. Li, Y. Fan, Z. Li, J. Wei, Hydroxyapatite based materials for bone tissue engineering: A brief and comprehensive introduction, *Crystals.* 11 (2021) 1–18. doi:10.3390/cryst11020149.
- [46] M. Hossain, J.H. Jeong, T. Sultana, J.H. Kim, J.E. Moon, S. Im, A composite of polymethylmethacrylate, hydroxyapatite, and β -tricalcium phosphate for bone regeneration in an osteoporotic rat model, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 111 (2023) 1813–1823. doi:10.1002/jbm.b.35287.
- [47] T. Sakae, H. Nakada, J.P. LeGeros, Historical review of biological apatite crystallography, *J. Hard Tissue Biol.* 24 (2015) 111–122. doi:10.2485/jhtb.24.111.
- [48] K. Ishikawa, K. Hayashi, Carbonate apatite artificial bone, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 22 (2021) 683–694. doi:10.1080/14686996.2021.1947120.
- [49] S.B. Behbahani, S.D. Kiridena, U.N. Wijayaratna, C. Taylor, J.N. Anker, T.R.J. Tzeng, pH variation in medical implant biofilms: Causes, measurements, and its implications for antibiotic resistance, *Front. Microbiol.* 13 (2022) 1–28. doi:10.3389/fmicb.2022.1028560.
- [50] E. Fiume, G. Magnaterra, A. Rahdar, E. Verné, F. Baino, Hydroxyapatite for biomedical applications: A short overview, *Ceramics.* 4 (2021) 542–563. doi:10.3390/ceramics4040039.
- [51] A. Fahami, G.W. Beall, T. Betancourt, Synthesis, bioactivity and zeta potential investigations of chlorine and fluorine substituted hydroxyapatite, *Mater. Sci. Eng. C.* 59 (2016) 78–85. doi:10.1016/j.msec.2015.10.002.
- [52] M. Stevanović, M. Došić, A. Janković, V. Kojić, M. Vukašinović-Sekulić, J. Stojanović, J. Odović, M. Crevar Sakač, K.Y. Rhee, V. Misković-Stanković, Gentamicin-Loaded Bioactive Hydroxyapatite/Chitosan Composite Coating Electrodeposited on Titanium, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4 (2018) 3994–4007. doi:10.1021/acsbiomaterials.8b00859.
- [53] S. Bose, S. Tarafder, A. Bandyopadhyay, Hydroxyapatite coatings for metallic implants, in: *Hydroxyapatite Biomed. Appl.*, Elsevier Ltd., 2015: pp. 143–157. doi:10.1016/b978-1-78242-033-0.00007-9.
- [54] A. Bertocco, M. Capela, A.P.F. Caetano, A. Nito, A. Quarta, M.P. Seabra, R.C. Pullar, Porous hydroxyapatite – β -tricalcium phosphate ceramics produced from a rapid sol-gel process, *Sci. Rep.* 15 (2025) 1–15. doi:10.1038/s41598-025-01253-2.
- [55] P. Ma, W. Wu, Y. Wei, L. Ren, S. Lin, J. Wu, Biomimetic gelatin/chitosan/polyvinyl alcohol/nano-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering, *Mater. Des.* 207 (2021) 109865. doi:10.1016/j.matdes.2021.109865.

- [56] A. Nouri, A. Rohani Shirvan, Y. Li, C. Wen, Additive manufacturing of metallic and polymeric load-bearing biomaterials using laser powder bed fusion: A review, *J. Mater. Sci. Technol.* 94 (2021) 196–215. doi:10.1016/j.jmst.2021.03.058.
- [57] M.F.P. Graça, D. de Melo-Diogo, I.J. Correia, A.F. Moreira, Electrospun asymmetric membranes as promising wound dressings: A review, *Pharmaceutics*. 13 (2021) 1–25. doi:10.3390/pharmaceutics13020183.
- [58] D.E.M. Camarena, L.S.A.S. Matsuyama, S.S. Maria-Engler, L.H. Catalani, Development of epidermal equivalent from electrospun synthetic polymers for in vitro irritation/corrosion testing, *Nanomaterials*. 10 (2020) 1–17. doi:10.3390/nano10122528.
- [59] G. Tang, Z. Tan, W. Zeng, X. Wang, C. Shi, Y. Liu, H. He, R. Chen, X. Ye, Recent Advances of Chitosan-Based Injectable Hydrogels for Bone and Dental Tissue Regeneration, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020) 1–15. doi:10.3389/fbioe.2020.587658.
- [60] J. Durner, K. Schrickel, D.C. Watts, M. Becker, R. Hickel, M.E. Draenert, An alternate methodology for studying diffusion and elution kinetics of dimethacrylate monomers through dentinal tubules, *Dent. Mater.* 36 (2020) 479–490. doi:10.1016/j.dental.2020.02.008.
- [61] T. Feczko, Polymeric nanotherapeutics acting at special regions of body, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 64 (2021). doi:10.1016/j.jddst.2021.102597.
- [62] Y. Hu, S. Hu, S. Zhang, S. Dong, J. Hu, L. Kang, X. Yang, A double-layer hydrogel based on alginate-carboxymethyl cellulose and synthetic polymer as sustained drug delivery system, *Sci. Rep.* 11 (2021) 1–14.
- [63] D. Mitra, E.T. Kang, K.G. Neoh, Polymer-Based Coatings with Integrated Antifouling and Bactericidal Properties for Targeted Biomedical Applications, *ACS Appl. Polym. Mater.* 3 (2021) 2233–2263. doi:10.1021/acsapm.1c00125.
- [64] W.W. Li, H.Y. Wang, Y.Q. Zhang, A novel chitosan hydrogel membrane by an improved electrophoretic deposition and its characteristics in vitro and in vivo, *Mater. Sci. Eng. C*. 74 (2017) 287–297. doi:10.1016/j.msec.2016.12.005.
- [65] J. Prakash, D. Prema, K.S. Venkataprasanna, K. Balagangadharan, N. Selvamurugan, G.D. Venkatasubbu, Nanocomposite chitosan film containing graphene oxide/hydroxyapatite/gold for bone tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol.* 154 (2020) 62–71. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.03.095.
- [66] A. Dimopoulos, D.N. Markatos, A. Mitropoulou, I. Panagiotopoulos, E. Koletsis, D. Mavrilas, A novel polymeric fibrous microstructured biodegradable small-caliber tubular scaffold for cardiovascular tissue engineering, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 32 (2021) 1–12. doi:10.1007/s10856-021-06490-1.
- [67] S. Malik, S. Sundarrajan, T. Hussain, A. Nazir, F. Berto, S. Ramakrishna, Electrospun biomimetic polymer nanofibers as vascular grafts, *Mater. Des. Process. Commun.* 3 (2021) 0–2. doi:10.1002/mdp2.203.
- [68] V. DeStefano, S. Khan, A. Tabada, Applications of PLA in modern medicine, *Eng. Regen.* 1 (2020) 76–87. doi:10.1016/j.engreg.2020.08.002.
- [69] M. Takahashi, M. Yamaguchi, Y. Tanimoto, E. Yao-Umezawa, K. Kasai, Biological evaluation of a prototype material made of polyglycolic acid and hydroxyapatite, *J. Hard Tissue Biol.* 24 (2015) 375–384. doi:10.2485/jhtb.24.375.
- [70] R. Du, Y. Wang, Y. Huang, Y. Zhao, D. Zhang, D. Du, Y. Zhang, Z. Li, S. McGinty, G. Pontrelli, T. Yin, G. Wang, Design and testing of hydrophobic core/hydrophilic shell nano/micro particles for drug-eluting stent coating, *NPG Asia Mater.* 10 (2018) 642–658. doi:10.1038/s41427-018-0064-z.
- [71] F. Shokrolahi, K. Khodabakhshi, P. Shokrollahi, R. Badiani, Z.M. Moghadam, Atorvastatin loaded PLGA microspheres: Preparation, HAP coating, drug release and effect on osteogenic differentiation of ADMSCs, *Int. J. Pharm.* 565 (2019) 95–107. doi:10.1016/j.ijpharm.2019.05.005.
- [72] Y. Liu, R. Wang, S. Chen, Z. Xu, Q. Wang, P. Yuan, Y. Zhou, Y. Zhang, J. Chen, Heparan sulfate loaded polycaprolactone-hydroxyapatite scaffolds with 3D printing for bone defect

- repair, *Int. J. Biol. Macromol.* 148 (2020) 153–162. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.01.109.
- [73] P. De Vos, H.A. Lazarjani, D. Poncelet, M.M. Faas, Polymers in cell encapsulation from an enveloped cell perspective, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 67–68 (2014) 15–34. doi:10.1016/j.addr.2013.11.005.
- [74] J.M. Aldabib, Z.A.M. Ishak, Effect of hydroxyapatite filler concentration on mechanical properties of poly (methyl methacrylate) denture base, *SN Appl. Sci.* 2 (2020). doi:10.1007/s42452-020-2546-1.
- [75] I.K. Januariyasa, I.D. Ana, Y. Yusuf, Nanofibrous poly(vinyl alcohol)/chitosan contained carbonated hydroxyapatite nanoparticles scaffold for bone tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. C.* 107 (2020) 110347. doi:10.1016/j.msec.2019.110347.
- [76] K. Joyce, G.T. Fabra, Y. Bozkurt, A. Pandit, Bioactive potential of natural biomaterials: identification, retention and assessment of biological properties, *Signal Transduct. Target. Ther.* 6 (2021) 1–28. doi:10.1038/s41392-021-00512-8.
- [77] Q. Chen, Y. Liu, Q.Q. Yao, S.S. Yu, K. Zheng, M. Pischetsrieder, A.R. Boccaccini, Multilayered bioactive composite coatings with drug delivery capability by electrophoretic deposition combined with layer-by-layer deposition, *Adv. Biomater. Devices Med.* 1 (2014) 18–27.
- [78] Y. Cui, Y. Yin, Y. Zou, Y. Zhao, J. Han, B. Xu, B. Chen, Z. Xiao, H. Song, Y. Shi, W. Xue, X. Ma, J. Dai, The Rotary Cell Culture System increases NTRK3 expression and promotes neuronal differentiation and migratory ability of neural stem cells cultured on collagen sponge, *Stem Cell Res. Ther.* 12 (2021) 1–12. doi:10.1186/s13287-021-02381-y.
- [79] J.O. Eun, S.W. Kang, B.S. Kim, G. Jiang, H.C. Il, K.H. Sei, Control of the molecular degradation of hyaluronic acid hydrogels for tissue augmentation, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 86 (2008) 685–693. doi:10.1002/jbm.a.31681.
- [80] S. Salatin, M. Jelvehgari, Natural polysaccharide based nanoparticles for drug/gene delivery, *Pharm. Sci.* 23 (2017) 84–94. doi:10.15171/PS.2017.14.
- [81] M.P. Vinardell, M. Mitjans, Lignins and their derivatives with beneficial effects on human health, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017). doi:10.3390/ijms18061219.
- [82] S. Sugiarto, Y. Leow, C.L. Tan, G. Wang, D. Kai, How far is Lignin from being a biomedical material?, *Bioact. Mater.* 8 (2022) 71–94. doi:10.1016/j.bioactmat.2021.06.023.
- [83] T. Jiang, Q. Duan, J. Zhu, H. Liu, L. Yu, Starch-based biodegradable materials: Challenges and opportunities, *Adv. Ind. Eng. Polym. Res.* 3 (2020) 8–18. doi:10.1016/j.aiepr.2019.11.003.
- [84] R.J. Hickey, A.E. Pelling, Cellulose biomaterials for tissue engineering, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7 (2019) 1–15. doi:10.3389/fbioe.2019.00045.
- [85] V. Ghormade, E.K. Pathan, M. V. Deshpande, Can fungi compete with marine sources for chitosan production?, *Int. J. Biol. Macromol.* 104 (2017) 1415–1421. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.01.112.
- [86] S. Islam, M.A.R. Bhuiyan, M.N. Islam, Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering, *J. Polym. Environ.* 25 (2017) 854–866. doi:10.1007/s10924-016-0865-5.
- [87] A. Oryan, S. Sahvieh, Effectiveness of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing, *Int. J. Biol. Macromol.* 104 (2017) 1003–1011. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.06.124.
- [88] R.J. Nordtveit, K.M. Vårum, O. Smidsrød, Degradation of partially N-acetylated chitosans with hen egg white and human lysozyme, *Carbohydr. Polym.* 29 (1996) 163–167. doi:10.1016/0144-8617(96)00003-3.
- [89] A. Kumar, A. Kumar, Chitosan as a biomedical material: Properties and applications, in: *Biopolym. Struct. Perform. Appl.*, 2017: pp. 139–154.
- [90] E. Avcu, F.E. Baştan, H.Z. Abdullah, M.A.U. Rehman, Y.Y. Avcu, A.R. Boccaccini, F.E. Ba, Electrophoretic deposition of chitosan-based composite coatings for biomedical applications: A review, *Prog. Mater. Sci.* 103 (2019) 69–108. doi:10.1016/j.pmatsci.2019.01.001.

- [91] A. Ali, S. Ahmed, A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery, *Int. J. Biol. Macromol.* 109 (2018) 273–286. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078.
- [92] R. Jayakumar, D. Menon, K. Manzoor, S. V. Nair, H. Tamura, Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials - A short review, *Carbohydr. Polym.* 82 (2010) 227–232. doi:10.1016/j.carbpol.2010.04.074.
- [93] H. Xie, T. Cao, F.J. Rodríguez-Lozano, E.K. Luong-Van, V. Rosa, Graphene for the development of the next-generation of biocomposites for dental and medical applications, *Dent. Mater.* 33 (2017) 765–774. doi:10.1016/j.dental.2017.04.008.
- [94] Y. Qu, F. He, C. Yu, X. Liang, D. Liang, L. Ma, Q. Zhang, J. Lv, J. Wu, Advances on graphene-based nanomaterials for biomedical applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 90 (2018) 764–780. doi:10.1016/j.msec.2018.05.018.
- [95] H. Ji, H. Sun, X. Qu, Antibacterial applications of graphene-based nanomaterials : Recent achievements and challenges, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 105 (2016) 176–189. doi:10.1016/j.addr.2016.04.009.
- [96] H.M. Hegab, A. Elmekawy, L. Zou, D. Mulcahy, C.P. Saint, M. Ginic-Markovic, The controversial antibacterial activity of graphene-based materials, *Carbon N. Y.* 105 (2016) 362–376. doi:10.1016/j.carbon.2016.04.046.
- [97] H. Mohammed, A. Kumar, E. Bekyarova, Y. Al-Hadeethi, X. Zhang, M. Chen, M.S. Ansari, A. Cochis, L. Rimondini, Antimicrobial Mechanisms and Effectiveness of Graphene and Graphene-Functionalized Biomaterials. A Scope Review, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020) 1–22. doi:10.3389/fbioe.2020.00465.
- [98] M. Zhang, Y. Li, Z. Su, G. Wei, Recent advances in the synthesis and applications of graphene-polymer nanocomposites, *Polym. Chem.* 6 (2015) 6107–6124. doi:10.1039/c5py00777a.
- [99] N. Sharma, R. Dev Gupta, R. Chandmal Sharma, S. Dayal, A. Singh Yadav, Graphene: An overview of its characteristics and applications, *Mater. Today Proc.* 47 (2021) 2752–2755. doi:10.1016/j.matpr.2021.03.086.
- [100] L. Daneshmandi, M. Barajaa, A.T. Rad, S.A. Sydlik, and C.T. Laurencin, Graphene-Based Biomaterials for Bone Regenerative Engineering: A Comprehensive Review of the Field and Considerations Regarding Biocompatibility and Biodegradation, *Adv. Healthc. Mater.* 10 (2021) 1–25. doi:10.1002/adhm.202001414.
- [101] S. Han, J. Sun, S. He, M. Tang, R. Chai, The application of graphene-based biomaterials in biomedicine, *Am. J. Transl. Res.* 11 (2019) 3246–3260.
- [102] A. Rudin, A. Healey, C.A. Phillips, D.W. Gump, B.R. Forsyth, Antibacterial activity of gentamicin sulfate in tissue culture., *Med. Clin. North Am.* 54 (1970) 1305–1315. doi:10.1016/S0025-7125(16)32596-2.
- [103] C. BJ, T. P, Gentamicin, StatPearls Publishing, 2022. doi:32491482.
- [104] F.E. Hahn, S.G. Sarre, Mechanism of Action of Gentamicin, *J. Infect. Dis.* 119 (2016) 364–369.
- [105] National library of Medicine - National Centre for Biotechnology Information, Gentamicin, *PubChem Compd. Summ. CID 3467.* (n.d.). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3467>.
- [106] C. Han, Y. Yao, X. Cheng, J. Luo, P. Luo, Q. Wang, F. Yang, Q. Wei, Z. Zhang, Electrophoretic Deposition of Gentamicin-Loaded Silk Fibroin Coatings on 3D-Printed Porous Cobalt-Chromium-Molybdenum Bone Substitutes to Prevent Orthopedic Implant Infections, *Biomacromolecules.* 18 (2017) 3776–3787. doi:10.1021/acs.biomac.7b01091.
- [107] M.A.U. Rehman, S.A. Batool, Development of sustainable antibacterial coatings based on electrophoretic deposition of multilayers: gentamicin-loaded chitosan/gelatin/bioactive glass deposition on PEEK/bioactive glass layer, *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* 120 (2022) 3885–3900. doi:10.1007/s00170-022-09024-3.
- [108] F. Pishbin, V. Mouriño, S. Flor, S. Kreppel, V. Salih, M.P. Ryan, A.R. Boccaccini, Electrophoretic deposition of gentamicin-loaded bioactive glass/chitosan composite coatings

- for orthopaedic implants, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 6 (2014) 8796–8806. doi:10.1021/am5014166.
- [109] J. Zhang, Z. Wen, M. Zhao, G. Li, C. Dai, Effect of the addition CNTs on performance of CaP/chitosan/coating deposited on magnesium alloy by electrophoretic deposition, *Mater. Sci. Eng. C*. 58 (2016) 992–1000. doi:10.1016/j.msec.2015.09.050.
- [110] T. Aydemir, J.I. Pastore, E. Jimenez-Pique, J.J. Roa, A.R. Boccaccini, J. Ballarre, Morphological and mechanical characterization of chitosan/gelatin/silica-gentamicin/bioactive glass coatings on orthopaedic metallic implant materials, *Thin Solid Films*. 732 (2021) 138780. doi:10.1016/j.tsf.2021.138780.
- [111] A. Humayun, Y. Luo, D.K. Mills, Electrophoretic deposition of gentamicin-loaded znhnts-chitosan on titanium, *Coatings*. 10 (2020) 1–18. doi:10.3390/coatings10100944.
- [112] C. Wu, J. Chang, Mesoporous bioactive glasses: Structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application, *Interface Focus*. 2 (2012) 292–306. doi:10.1098/rsfs.2011.0121.
- [113] M. Stigter, J. Bezemer, K. De Groot, P. Layrolle, Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy, *J. Control. Release*. 99 (2004) 127–137. doi:10.1016/j.jconrel.2004.06.011.
- [114] S. Tang, B. Tian, Q.F. Ke, Z.A. Zhu, Y.P. Guo, Gentamicin-loaded carbonated hydroxyapatite coatings with hierarchically porous structures: Drug delivery properties, bactericidal properties and biocompatibility, *RSC Adv*. 40 (2014) 41500–41509. doi:10.1039/c4ra05493h.
- [115] M. Atiq Ur Rehman, Q. Chen, A. Braem, M.S.P. Shaffer, A.R. Boccaccini, Electrophoretic deposition of carbon nanotubes: recent progress and remaining challenges, *Int. Mater. Rev*. 66 (2021) 533–562. doi:10.1080/09506608.2020.1831299.
- [116] A.R. Boccaccini, S. Keim, R. Ma, Y. Li, I. Zhitomirsky, Electrophoretic deposition of biomaterials, *J. R. Soc. Interface*. 7 (2010) S581–S613. doi:10.1098/rsif.2010.0156.focus.
- [117] V.B. Mišković-Stanković, Electrophoretic Deposition of Ceramic Coatings on Metal Surfaces, in: S. Djokić (Ed.), *Electrodepos. Surf. Finish. Fundam. Appl. Mod. Asp. Electrochem.*, Springer Science+Business Media, New York, USA, 2014: p. 133–216.
- [118] V. Mišković-Stanković, A. Janković, S. Eraković, K.Y. Rhee, Graphene based biomedical composite coatings produced by electrophoretic deposition on titanium, *Eurasian Chem. J*. 17 (2015) 3–15. doi:10.18321/ectj189.
- [119] W. Suchanek, M. Yoshimura, Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants, *J. Mater. Res*. 13 (1998) 94–117. doi:10.1557/JMR.1998.0015.
- [120] S.A. Batool, A. Wadood, S.W. Hussain, M. Yasir, M.A. Ur Rehman, A Brief Insight to the Electrophoretic Deposition of PEEK-, Chitosan-, Gelatin-, and Zein-Based Composite Coatings for Biomedical Applications: Recent Developments and Challenges, *Surfaces*. 4 (2021) 205–239. doi:10.3390/surfaces4030018.
- [121] F. Ordikhani, A. Simchi, Long-term antibiotic delivery by chitosan-based composite coatings with bone regenerative potential, *Appl. Surf. Sci*. 317 (2014) 56–66. doi:10.1016/j.apsusc.2014.07.197.
- [122] S. Abdulghani, G.R. Mitchell, Biomaterials for in situ tissue regeneration: A review, *Biomolecules*. 9 (2019) 1–24. doi:10.3390/biom9110750.
- [123] H.K. Raut, R. Das, Z. Liu, X. Liu, S. Ramakrishna, Biocompatibility of Biomaterials for Tissue Regeneration or Replacement, *Biotechnol. J*. 15 (2020) 1–14. doi:10.1002/biot.202000160.
- [124] M.H. Abdulkareem, A.H. Abdalsalam, A.J. Bohan, Influence of chitosan on the antibacterial activity of composite coating (PEEK /HAp) fabricated by electrophoretic deposition, *Prog. Org. Coatings*. 130 (2019) 251–259. doi:10.1016/j.porgcoat.2019.01.050.
- [125] T.T. Nguyen, T. Hoang, V.M. Can, A.S. Ho, In vitro and in vivo tests of PLA / d-HAp nanocomposite, *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol*. 8 (2017) 1–10. doi:10.1088/2043-

6254/aa92b0.

- [126] R. Zhang, H. Hu, Y. Liu, J. Tan, W. Chen, C. Ying, Q. Liu, X. Fu, S. Hu, C.P. Wong, Homogeneously dispersed composites of hydroxyapatite nanorods and poly(lactic acid) and their mechanical properties and crystallization behavior, *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* 132 (2020) 105841. doi:10.1016/j.compositesa.2020.105841.
- [127] S. Eftekhari, I. El Sawi, Z.S. Bagheri, G. Turcotte, H. Bougherara, Fabrication and characterization of novel biomimetic PLLA/cellulose/ hydroxyapatite nanocomposite for bone repair applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 39 (2014) 120–125. doi:10.1016/j.msec.2014.02.027.
- [128] T.G.P. Galindo, I. Yamada, S. Yamada, M. Tagaya, Studies on preparation of surfactant-assisted elliptical hydroxyapatite nanoparticles and their protein-interactive ability, *Mater. Chem. Phys.* 221 (2019) 367–376. doi:10.1016/j.matchemphys.2018.09.058.
- [129] M. Alipour, N. Firouzi, Z. Aghazadeh, M. Samiei, S. Montazersaheb, A.B. Khoshfetrat, M. Aghazadeh, The osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in alginate-gelatin/Nano-hydroxyapatite microcapsules, *BMC Biotechnol.* 21 (2021) 1–12. doi:10.1186/s12896-020-00666-3.
- [130] W. Jia, M. Li, L. Liu, H. Zhou, X. Liu, G. Gu, M. Xiao, Z. Chen, Fabrication and assessment of chondroitin sulfate-modified collagen nanofibers for small-diameter vascular tissue engineering applications, *Carbohydr. Polym.* 257 (2021) 117573. doi:10.1016/j.carbpol.2020.117573.
- [131] K.S.N. Nivethaa E.A.K., Martin C.A., Frank-Kamenetskaya O.V., Chitosan and Chitosan Based Nanocomposites for Applications as a Drug Delivery Carrier: A Review, in: L.S. Frank-Kamenetskaya O., Vlasov D., Panova E. (Ed.), *Process. Phenom. Bound. Between Biog. Abiogenic Nature. Lect. Notes Earth Syst. Sci.*, Springer, Cham, 2020: pp. 23–37.
- [132] N. Lakshmi Prasanthi, H. Roy, N. Jyothi, V. Sri Vajrapriya, A Brief Review on Chitosan and Application in Biomedical Field, *A Br. Rev. Chitosan Appl. Biomed. Field. Am. J. PharmTech Res.* 6 (2016) 1–11. <http://www.ajptr.com/www.ajptr.com>.
- [133] N. Islam, I. Dmour, M.O. Taha, Degradability of chitosan micro/nanoparticles for pulmonary drug delivery, *Heliyon.* 5 (2019) 1–9. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01684.
- [134] Y. Wu, C. Yan, Y. Wang, C. Gao, Y. Liu, Biomimetic structure of chitosan reinforced epoxy natural rubber with self-healed, recyclable and antimicrobial ability, *Int. J. Biol. Macromol.* 184 (2021) 9–19. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.06.037.
- [135] S. Afrasiabi, A. Bahador, A. Partoazar, Combinatorial therapy of chitosan hydrogel-based zinc oxide nanocomposite attenuates the virulence of *Streptococcus mutans*, *BMC Microbiol.* 21 (2021) 1–8. doi:10.1186/s12866-021-02128-y.
- [136] S. Gorantla, N. Dabholkar, S. Sharma, V.K. Rapalli, A. Alexander, G. Singhvi, Chitosan-based microneedles as a potential platform for drug delivery through the skin: Trends and regulatory aspects, *Int. J. Biol. Macromol.* 184 (2021) 438–453. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.06.059.
- [137] N. Gulati, K. Dua, H. Dureja, Role of chitosan based nanomedicines in the treatment of chronic respiratory diseases, *Int. J. Biol. Macromol.* 185 (2021) 20–30. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.06.035.
- [138] F. Croisier, C. Jérôme, Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, *Eur. Polym. J.* 49 (2013) 780–792. doi:10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009.
- [139] M. Azmana, S. Mahmood, A.R. Hilles, A. Rahman, M.A. Bin Arifin, S. Ahmed, A review on chitosan and chitosan-based bionanocomposites: Promising material for combatting global issues and its applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 185 (2021) 832–848. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.07.023.
- [140] M. Došić, S. Eraković, A. Janković, M. Vukašinović-Sekulić, I.Z. Matić, J. Stojanović, K.Y. Rhee, V. Mišković-Stanković, S..J. Park, In vitro investigation of electrophoretically deposited bioactive hydroxyapatite/chitosan coatings reinforced by graphene, *J. Ind. Eng. Chem.* 47 (2017) 336–347. doi:10.1016/j.jiec.2016.12.004.

- [141] M. D'Almeida, N. Attik, J. Amalric, C. Brunon, F. Renaud, H. Abouelleil, B. Toury, B. Grosgeat, Chitosan coating as an antibacterial surface for biomedical applications, *PLoS One*. 12 (2017) 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0189537.
- [142] S. Eraković, A. Janković, D. Veljović, E. Palcevskis, M. Mitrić, T. Stevanović, D. Janačković, V. Miskovic-Stankovic, Corrosion stability and bioactivity in simulated body fluid of silver/hydroxyapatite and silver/hydroxyapatite/lignin coatings on titanium obtained by electrophoretic deposition, *J. Phys. Chem. B*. 117 (2013) 1633–1643. doi:10.1021/jp305252a.
- [143] S. Erakovic, V. Djordje, N.D. Papa, S. Tatjana, M. Miodrag, M. Slobodan, M.-S. Vesna, Electrophoretic Deposition of Biocomposite Lignin / Hydroxyapatite Coatings on Titanium *Int. J. Chem. React. Eng.* 7 (2009) 1–24.
- [144] A. Janković, S. Eraković, M. Vukašinović-Sekulić, V. Mišković-Stanković, S.J. Park, K.Y. Rhee, Graphene-based antibacterial composite coatings electrodeposited on titanium for biomedical applications, *Prog. Org. Coat.* 83 (2015) 1–10. doi:10.1016/j.porgcoat.2015.01.019.
- [145] D. Jugowiec, A. Łukaszczyk, Ł. Cieniek, K. Kowalski, Ł. Rumian, K. Pietryga, M. Kot, E. Pamuła, T. Moskalewicz, Influence of the electrophoretic deposition route on the microstructure and properties of nano-hydroxyapatite/chitosan coatings on the Ti-13Nb-13Zr alloy, *Surf. Coatings Technol.* 324 (2017) 64–79. doi:10.1016/j.surfcoat.2017.05.056.
- [146] S. Bakhshandeh, S. Amin Yavari, Electrophoretic deposition: A versatile tool against biomaterial associated infections, *J. Mater. Chem. B*. 6 (2018) 1128–1148. doi:10.1039/c7tb02445b.
- [147] N. Asgari, M. Rajabi, Enhancement of mechanical properties of hydroxyapatite coating prepared by electrophoretic deposition method, *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* 18 (2021) 147–153. doi:10.1111/ijac.13638.
- [148] A. Saadati, H. Hesarikia, M.R. Nourani, R.A. Taheri, Electrophoretic deposition of hydroxyapatite coating on biodegradable Mg–4Zn–4Sn–0.6Ca–0.5Mn alloy, *Surf. Eng.* 36 (2020) 908–918. doi:10.1080/02670844.2019.1661145.
- [149] L. Sorkhi, M. Farrokhi-Rad, T. Shahrabi, Electrophoretic Deposition of Hydroxyapatite–Chitosan–Titania on Stainless Steel 316 L, *Surfaces*. 2 (2019) 458–467. doi:10.3390/surfaces2030034.
- [150] A. Sotniczuk, S. Heise, K. Topolski, H. Garbacz, A.R. Boccaccini, Chitosan/bioactive glass coatings as a protective layer against corrosion of nanocrystalline titanium under simulated inflammation, *Mater. Lett.* 264 (2020) 127284. doi:10.1016/j.matlet.2019.127284.
- [151] S. Erakovic, A. Jankovic, G.C.P. Tsui, C.Y. Tang, V. Miskovic-Stankovic, T. Stevanovic, Novel Bioactive Antimicrobial Lignin Containing Coatings on Titanium Obtained by Electrophoretic Deposition, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 12294–12322. doi:10.3390/ijms150712294.
- [152] M.S. Djošić, M. Mitrić, V.B. Mišković-Stankovic, The porosity and roughness of electrodeposited calcium phosphate coatings in simulated body fluid, *J. Serbian Chem. Soc.* 80 (2015) 237–251. doi:10.2298/JSC140626098D.
- [153] A. Janković, S. Eraković, M. Mitrić, I.Z. Matić, Z.D. Juranić, G.C.P. Tsui, C.Y. Tang, V. Mišković-Stanković, K.Y. Rhee, S.J. Park, Bioactive hydroxyapatite/graphene composite coating and its corrosion stability in simulated body fluid, *J. Alloys Compd.* 624 (2015) 148–157. doi:10.1016/j.jallcom.2014.11.078.
- [154] S. Khanmohammadi, H. Aghajani, M. Farrokhi-Rad, Vancomycin loaded-mesoporous bioglass/hydroxyapatite/chitosan coatings by electrophoretic deposition, *Ceram. Int.* 48 (2022) 20176–20186. doi:10.1016/j.ceramint.2022.03.296.
- [155] J. Song, Q. Chen, Y. Zhang, M. Diba, E. Kolwijck, J. Shao, J.A. Jansen, F. Yang, A.R. Boccaccini, S.C.G. Leeuwenburgh, Electrophoretic Deposition of Chitosan Coatings Modified with Gelatin Nanospheres to Tune the Release of Antibiotics, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 8 (2016) 13785–13792. doi:10.1021/acsami.6b03454.

- [156] M. Hajinaebi, M. Ganjali, N. Ahmadi, Antibacterial Activity and Drug Release of Ciprofloxacin Loaded PVA- nHAp Nanocomposite Coating on Ti-6Al-4 V, *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* 32 (2022) 3521–3532.
- [157] K.D. Patel, A. El-Fiqi, H.H.H.Y. Lee, R.K. Singh, D.-A.A. Kim, H.H.H.Y. Lee, H.-W.W. Kim, Chitosan-nanobioactive glass electrophoretic coatings with bone regenerative and drug delivering potential, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 24945–24956. doi:10.1039/c2jm33830k.
- [158] Kena Ma, X. Cai, Y. Zhou, Y. Wang, T. Jiang, In Vitro and In Vivo Evaluation of Tetracycline Loaded Chitosan-Gelatin Nanosphere, *Macromol. Biosci.* 17 (2017) 1–9.
- [159] Z. Zhang, Y. Qu, X. Li, S. Zhang, Q. Wei, Y. Shi, L. Chen, Electrophoretic deposition of tetracycline modified silk fibroin coatings for functionalization of titanium surfaces, *Appl. Surf. Sci.* 303 (2014) 255–262. doi:10.1016/j.apsusc.2014.02.160.
- [160] J.C. Moses, B.B. Mandal, Mesoporous Silk-Bioactive Glass Nanocomposites as Drug Eluting Multifunctional Conformal Coatings for Improving Osseointegration and Bactericidal Properties of Metal Implants, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 14 (2022) 14961–14980. doi:10.1021/acsami.2c00093.
- [161] X. Cheng, D. Long, L. Chen, J.A. Jansen, S.C.G. Leeuwenburgh, F. Yang, Electrophoretic deposition of silk fibroin coatings with pre-defined architecture to facilitate precise control over drug delivery, *Bioact. Mater.* 6 (2021) 4243–4254. doi:10.1016/j.bioactmat.2021.03.046.
- [162] K.D. Patel, R.K. Singh, E.J. Lee, C.M. Han, J.E. Won, J.C. Knowles, H.W. Kim, Tailoring solubility and drug release from electrophoretic deposited chitosan-gelatin films on titanium, *Surf. Coat Tech.* 242 (2014) 232–236. doi:10.1016/j.surfcoat.2013.11.049.
- [163] Q. Chen, S. Cabanas-Polo, Y.P. Ding, A.R. Boccaccini, Bioactive Glass-Biopolymer Multilayer Coatings Fabricated by Electrophoretic Deposition Combined with Layer-by-Layer Assembly, *Key Eng. Mater.* 654 (2015) 170–175. doi:10.4028/www.scientific.net/kem.654.170.
- [164] H. Choi, A. Schulte, M. Müller, M. Park, S. Jo, H. Schönherr, Drug Release from Thermo-Responsive Polymer Brush Coatings to Control Bacterial, *Adv. Healthc. Mater.* 10 (2021) 1–12. doi:https://doi.org/10.1002/adhm.202100069.
- [165] F. Ordikhani, M.R. Farani, M. Dehghani, E. Tamjid, A. Simchi, Physicochemical and biological properties of electrodeposited graphene oxide/chitosan films with drug-eluting capacity, *Carbon N. Y.* 84 (2015) 91–102. doi:10.1016/j.carbon.2014.11.052.
- [166] C. Kaya, F. Kaya, S. Atiq, A.R. Boccaccini, Electrophoretic deposition of ceramic coatings on ceramic composite substrates, *Br. Ceram. Trans.* 102 (2003) 99–102. doi:10.1179/096797803225001605.
- [167] K. Kirakci, T.K.N. Nguyen, F. Grasset, T. Uchikoshi, J. Zelenka, P. Kubát, T. Ruml, K. Lang, Electrophoretically Deposited Layers of Octahedral Molybdenum Cluster Complexes: A Promising Coating for Mitigation of Pathogenic Bacterial Biofilms under Blue Light, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 12 (2020). doi:10.1021/acsami.0c19036.
- [168] B. Tao, W. Zhao, C. Lin, Z. Yuan, Y. He, L. Lu, M. Chen, Y. Ding, Y. Yang, Z. Xia, K. Cai, Surface modification of titanium implants by ZIF-8@Levo/LBL coating for inhibition of bacterial-associated infection and enhancement of in vivo osseointegration, *Chem. Eng. J.* 390 (2020). doi:10.1016/j.cej.2020.124621.
- [169] I. Francolini, C. Vuotto, A. Piozzi, G. Donelli, Antifouling and antimicrobial biomaterials: an overview, *Apmis.* 125 (2017) 392–417. doi:10.1111/apm.12675.
- [170] A. Ionescu, D. Harris, P.R. Selvaganapathy, A. Kishen, Electrokinetic transport and distribution of antibacterial nanoparticles for endodontic disinfection, *Int. Endod. J.* 53 (2020) 1120–1130. doi:10.1111/iej.13321.
- [171] R. Rahighi, M. Panahi, O. Akhavan, M. Mansoorianfar, Pressure-engineered electrophoretic deposition for gentamicin loading within osteoblast-specific cellulose nanofiber scaffolds, *Mater. Chem. Phys.* 272 (2021) 125018. doi:10.1016/j.matchemphys.2021.125018.
- [172] Z. Riahi, S.A. Seyedkhani, S.K. Sadrnezhad, Electrophoretic encapsulation for slow release

- of vancomycin from perpendicular TiO₂ nanotubes grown on Ti6Al4V electrodes, *Mater. Res. Express.* 6 (2019) 1–19. doi:10.1088/2053-1591/ab6c98.
- [173] V. Zarghami, M. Ghorbani, K.P. Bagheri, M.A. Shokrgozar, Prevention the formation of biofilm on orthopedic implants by melittin thin layer on chitosan/bioactive glass/vancomycin coatings, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 32 (2021). doi:10.1007/s10856-021-06551-5.
- [174] J. Ballarre, T. Aydemir, L. Liverani, J.A. Roether, W.H. Goldmann, A.R. Boccaccini, Versatile bioactive and antibacterial coating system based on silica, gentamicin, and chitosan: Improving early stage performance of titanium implants, *Surf. Coatings Technol.* 381 (2020) 125138. doi:10.1016/j.surfcoat.2019.125138.
- [175] Z.G. Karaji, J. F. A.H. Mirzaei, B. van der W. And, S.A. Yavari, Multifunctional silk coating on additively manufactured porous titanium to prevent implant-associated infection and stimulate bone regeneration, *Biomed. Mater.* 15 (2020) 11–14. doi:10.1088/1748-605X/aba40b.
- [176] D. Ionita, D. Bajenaru-Georgescu, G. Totea, A. Mazare, P. Schmuki, I. Demetrescu, Activity of vancomycin release from bioinspired coatings of hydroxyapatite or TiO₂ nanotubes, *Int. J. Pharm.* 517 (2017) 296–302. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.11.062.
- [177] M. Farrokhi-Rad, A. Fateh, T. Shahrabi, Electrophoretic deposition of vancomycin loaded halloysite nanotubes-chitosan nanocomposite coatings, *Surf. Coatings Technol.* 349 (2018) 144–156. doi:10.1016/j.surfcoat.2018.05.070.
- [178] N.S. Radda'a, W.H. Goldmann, R. Detsch, J.A. Roether, L. Cordero-Arias, S. Virtanen, T. Moskalewicz, A.R. Boccaccini, Electrophoretic deposition of tetracycline hydrochloride loaded halloysite nanotubes chitosan/bioactive glass composite coatings for orthopedic implants, *Surf. Coatings Technol.* 327 (2017) 146–157. doi:10.1016/j.surfcoat.2017.07.048.
- [179] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3, *J. Biomed. Mater. Res.* 24 (1990) 721–734. doi:10.1002/jbm.820240607.
- [180] T. Kokubo, Bioactive glass ceramics: properties and applications, *Biomaterials.* 12 (1991) 155–163. doi:10.1016/0142-9612(91)90194-F.
- [181] H.M. Kim, T. Himeno, M. Kawashita, T. Kokubo, T. Nakamura, The mechanism of biomineralization of bone-like apatite on synthetic hydroxyapatite: An in vitro assessment, *J. R. Soc. Interface.* 1 (2004) 17–22. doi:10.1098/rsif.2004.0003.
- [182] M.N. Rahaman, D.E. Day, B. Sonny Bal, Q. Fu, S.B. Jung, L.F. Bonewald, A.P. Tomsia, Bioactive glass in tissue engineering, *Acta Biomater.* 7 (2011) 2355–2373. doi:10.1016/j.actbio.2011.03.016.
- [183] S. Bose, S. Tarafder, Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review, *Acta Biomater.* 8 (2012) 1401–1421. doi:10.1016/j.actbio.2011.11.017.
- [184] G.A. Khoman, M.H.A. Kalijaga, N. Aisah, R. Fidyarningsih, J. Raharjo, O.P. Arjasa, E. Prajateljista, PMMA bone cement with L -arginine/nano fish bone nanocomplex for apatite formation, *R. Soc. Open Sci.* 11 (2024). doi:10.1098/rsos.231694.
- [185] W. Kraus, G. Nolze, Powder Cell for Windows, (n.d.) Version 2.4, 8.03.2002.
- [186] T. Mossmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Meth.* 65 (1983) 55–63. doi:doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- [187] Abcam, Alkaline Phosphatase Assay Kit, Abcam. 1 (2015) 1–11.
- [188] F. Ordikhani, S.P. Zustiak, A. Simchi, Surface Modifications of Titanium Implants by Multilayer Bioactive Coatings with Drug Delivery Potential: Antimicrobial, Biological, and Drug Release Studies, *Jom.* 68 (2016) 1100–1108. doi:10.1007/s11837-016-1840-2.
- [189] L.Q. Wu, A.P. Gadre, H. Yi, M.J. Kastantin, G.W. Rubloff, W.E. Bentley, G.F. Payne, R. Ghodssi, Voltage-dependent assembly of the polysaccharide chitosan onto an electrode surface, *Langmuir.* 18 (2002) 8620–8625. doi:10.1021/la020381p.
- [190] Y. Cheng, X.L. Luo, J. Betz, S. Buckhout-White, O. Bekdash, G.F. Payne, W.E. Bentley,

- G.W. Rubloff, In situ quantitative visualization and characterization of chitosan electrodeposition with paired sidewall electrodes, *Soft Matter*. 6 (2010) 3177–3183. doi:10.1039/c0sm00124d.
- [191] I. Smičiklas, S. Dimović, I. Plečaš, M. Mitrić, Removal of Co²⁺ from aqueous solutions by hydroxyapatite, *Water Res.* 40 (2006) 2267–2274. doi:10.1016/j.watres.2006.04.031.
- [192] M.S. Djošić, V.B. Mišković-Stanković, Z.M. Kačarević-Popović, B.M. Jokić, N. Bibić, M. Mitrić, S.K. Milonjić, R. Jančić-Heinemann, J. Stojanović, Electrochemical synthesis of nanosized monetite powder and its electrophoretic deposition on titanium, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 341 (2009) 110–117. doi:10.1016/j.colsurfa.2009.03.046.
- [193] P. V. Giannoudis, H. Dinopoulos, E. Tsiridis, Bone substitutes: An update, *Injury*. 36 (2005) S20–S27. doi:10.1016/j.injury.2005.07.029.
- [194] M. Okada, T. Matsumoto, Synthesis and modification of apatite nanoparticles for use in dental and medical applications, *Jpn. Dent. Sci. Rev.* 51 (2015) 85–95. doi:10.1016/j.jdsr.2015.03.004.
- [195] X. Wu, X. Song, D. Li, J. Liu, P. Zhang, X. Chen, Preparation of Mesoporous Nano-Hydroxyapatite Using a Surfactant Template Method for Protein Delivery, *J. Bionic Eng.* 9 (2012) 224–233. doi:10.1016/S1672-6529(11)60105-4.
- [196] G. Chiara, F. Letizia, F. Lorenzo, S. Edoardo, S. Diego, S. Stefano, B. Eriberto, Z. Barbara, Nanostructured biomaterials for tissue engineered bone tissue reconstruction, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 737–757. doi:10.3390/ijms13010737.
- [197] Š. Kubinová, E. Syková, Nanotechnologies in regenerative medicine, *Minim. Invasive Ther. Allied Technol.* 19 (2010) 144–156. doi:10.3109/13645706.2010.481398.
- [198] E. De Souza Costa, M.M. Pereira, H.S. Mansur, Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PVA and chemically crosslinked, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 20 (2009) 553–561. doi:10.1007/s10856-008-3627-7.
- [199] L. Berzina-Cimdina, N. Borodajenko, Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy, in: T. Theophanides (Ed.), *Infrared Spectrosc. – Mater. Sci. Eng. Technol.*, IntechOpen: London, 2012: pp. 123–148. doi:doi:10.5772/36942.
- [200] J.-P. Lafon, E. Champion, D. Bernache-Assollant, R. Gibert, A.-M. Danna, Thermal decomposition of carbonated calcium phosphate apatites, *J. Therm. Anal. Calorim.* 72 (2003) 1127–1134. doi:10.1023/A:1025036214044.
- [201] S.M. Barinov, J. V. Rau, S.N. Cesaro, J. Đurišin, I. V. Fadeeva, D. Ferro, L. Medvecký, G. Trionfetti, Carbonate release from carbonated hydroxyapatite in the wide temperature range, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 17 (2006) 597–604. doi:10.1007/s10856-006-9221-y.
- [202] C.L. Popa, M. Albu, C. Bartha, A. Costescu, C. Luculescu, R. Trusca, S. Antohe, Structural Characterization and Optical Properties of Hydroxyapatite/Collagen matrix, *Rom. Reports Phys.* 68 (2016) 1149–1158.
- [203] F. Gebhardt, S. Seuss, M.C. Turhan, H. Hornberger, S. Virtanen, A.R. Boccaccini, Characterization of electrophoretic chitosan coatings on stainless steel, *Mater. Lett.* 66 (2012) 302–304. doi:10.1016/j.matlet.2011.08.088.
- [204] R.P. Aquino, R. Adami, S. Liparoti, G. Della Porta, Design and production of gentamicin / dextrans microparticles by supercritical assisted atomisation for the treatment of wound bacterial infections, *Int. J. Pharm.* 440 (2013) 188–194. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.07.074.
- [205] E.A. El-Hefian, E.S. Elgannoudi, A. Mainal, A.H. Yahaya, Characterization of chitosan in acetic acid: Rheological and thermal studies, *Turkish J. Chem.* 34 (2010) 47–56. doi:10.3906/kim-0901-38.
- [206] V. Geetha, T. Gomathi, P.N. Sudha, Preparation and characterization of Graphene-grafted-chitosan / hydroxyapatite composite, *J. Chem. Pharm. Res.* 7 (2015) 871–876.
- [207] J. Zawadzki, H. Kaczmarek, Thermal treatment of chitosan in various conditions, *Carbohydr. Polym.* 80 (2010) 395–401. doi:10.1016/j.carbpol.2009.11.037.
- [208] S. Arora, S. Lal, S. Kumar, M. Kumar, M. Kumar, Comparative degradation kinetic studies of three biopolymers : Chitin , chitosan and cellulose, *Arch. Appl. Sci. Res.* 3 (2011) 188–

201.

- [209] T. Wanjun, W. Cunxin, C. Donghua, Kinetic studies on the pyrolysis of chitin and chitosan, *Polym. Degrad. Stab.* 87 (2005) 389–394. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2004.08.006.
- [210] T.P. Chaves, F.H.A. Fernandes, C.P. Santana, J.S. Santos, F.D. Medeiros, D.C. Felismino, V.L. Santos, R.M.R. Catão, H.D.M. Coutinho, A.C.D. Medeiros, Evaluation of the interaction between the *Poincianella pyramidalis* (Tul.) LP Queiroz extract and antimicrobials using biological and analytical models, *PLoS One.* 11 (2016) 1–23. doi:10.1371/journal.pone.0155532.
- [211] C. Dwivedi, I. Pandey, H. Pandey, S. Patil, S.B. Mishra, A.C. Pandey, P. Zamboni, P.W. Ramteke, A.V. Singh, In vivo diabetic wound healing with nanofibrous scaffolds modified with gentamicin and recombinant human epidermal growth factor., *J. Biomed. Mater. Res. A.* (2017) 1–11. doi:10.1002/jbm.a.36268.
- [212] T.I. Ivanova, O.V. Frank-Kamenetskaya, A.B. Kol'tsov, V.L. Ugolkov, Crystal Structure of Calcium-Deficient Carbonated Hydroxyapatite. Thermal Decomposition, *J. Solid State Chem.* 160 (2001) 340–349. doi:10.1006/jssc.2000.9238.
- [213] C. McManamon, J.P. De Silva, P. Delaney, M.A. Morris, G.L.W. Cross, Characteristics, interactions and coating adherence of heterogeneous polymer/drug coatings for biomedical devices, *Mater. Sci. Eng. C.* 59 (2016) 102–108. doi:10.1016/j.msec.2015.09.103.
- [214] S. Meejoo, W. Maneeprakorn, P. Winotai, Phase and thermal stability of nanocrystalline hydroxyapatite prepared via microwave heating, *Thermochim. Acta.* 447 (2006) 115–120. doi:10.1016/j.tca.2006.04.013.
- [215] N.S. V Capanema, A.A.P. Mansur, S.M. Carvalho, A.R.P. Silva, V.S. Ciminelli, H.S. Mansur, Niobium-doped hydroxyapatite bioceramics: Synthesis, characterization and In Vitro cytocompatibility, *Materials (Basel).* 8 (2015) 4191–4209. doi:10.3390/ma8074191.
- [216] J. Kamieniak, P.J. Kelly, C.E. Banks, A.M. Doyle, Mechanical, pH and Thermal Stability of Mesoporous Hydroxyapatite, *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* 28 (2017) 1–8. doi:10.1007/s10904-017-0652-3.
- [217] E.M. El-Sayed, A. Omar, M. Ibrahim, W.I. Abdel-Fattah, On the Structural Analysis and Electronic Properties of Chitosan/Hydroxyapatite Interaction, *J. Comput. Theor. Nanosci.* 6 (2009) 1663–1669. doi:DOI 10.1166/jctn.2009.1228.
- [218] S. Heise, M. Höhlinger, Y.T. Hernández, J.J.P. Palacio, J.A. Rodriguez Ortiz, V. Wagener, S. Virtanen, A.R. Boccaccini, Electrophoretic deposition and characterization of chitosan/bioactive glass composite coatings on Mg alloy substrates, *Electrochim. Acta.* 232 (2017) 456–464. doi:10.1016/j.electacta.2017.02.081.
- [219] Y. Liu, P. Ji, H. Lv, Y. Qin, L. Deng, Gentamicin modified chitosan film with improved antibacterial property and cell biocompatibility, *Int. J. Biol. Macromol.* 98 (2017) 550–556. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.01.121.
- [220] S. Degoutin, M. Jimenez, F. Chai, T. Pinalie, S. Bellayer, M. Vandenbossche, C. Neut, N. Blanchemain, B. Martel, Simultaneous immobilization of heparin and gentamicin on polypropylene textiles: A dual therapeutic activity, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 102 (2014) 3846–3854. doi:10.1002/jbm.a.35059.
- [221] B. Sreedhar, Y. Aparna, M. Sairam, N. Hebalkar, Preparation and Characterization of HAP/Carboxymethyl Chitosan Nanocomposites, *J. Appl. Polym. Sci.* 105 (2007) 928–934. doi:https://doi.org/10.1002/app.26140.
- [222] Z.Q. Yao, Y. Ivanisenko, T. Diemant, A. Caron, A. Chuvilin, J.Z. Jiang, R.Z. Valiev, M. Qi, H.J. Fecht, Synthesis and properties of hydroxyapatite-containing porous titania coating on ultrafine-grained titanium by micro-arc oxidation, *Acta Biomater.* 6 (2010) 2816–2825. doi:10.1016/j.actbio.2009.12.053.
- [223] A. Dupraz, T.P. Nguyen, M. Richard, G. Daculsi, N. Passuti, Influence of a cellulosic ether carrier on the structure of biphasic calcium phosphate ceramic particles in an injectable composite material, *Biomaterials.* 20 (1999) 663–673. doi:10.1016/S0142-9612(98)00222-1.
- [224] X. Yang, Y. Tu, L. Li, S. Shang, X.M. Tao, Well-dispersed chitosan/graphene oxide

- nanocomposites, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2 (2010) 1707–1713. doi:10.1021/am100222m.
- [225] E.C. Victoria, F.D. Gnanam, Synthesis and Characterisation of Biphasic Calcium Phosphate, *Trends Biomater. Artif. Organs*. 16 (2002) 12–14.
- [226] K. Ishikawa, P. Ducheyne, S. Radin, Determination of the Ca / P ratio in calcium- deficient hydroxyapatite using X-ray diffraction analysis, *J Mater Sci. Mater Med*. 4 (1993) 165–168.
- [227] A. Ragu, K. Senthilarasan, P. Sakthivel, Synthesis and Characterization of Nano Hydroxyapatite with Polyoxymethylene Nanocomposites for Bone Growth Studies, *Int. J. Sci. Eng. Res*. 3 (2015) 120–123. doi:10.70729/IJSER15353.
- [228] J.A. Rincón-López, J.A. Hermann-Muñoz, A.L. Giraldo-Betancur, A. De Vizcaya-Ruiz, J.M. Alvarado-Orozco, J. Muñoz-Saldaña, Synthetic and Bovine-Derived Hydroxyapatite Ceramics : A Comparison, *Materials (Basel)*. 11 (2018) 1–17. doi:10.3390/ma11020333.
- [229] F. Peng, E. Veilleux, M. Schmidt, M. Wei, Synthesis of Hydroxyapatite Nanoparticles with Tailorable Morphologies and Carbonate Substitutions Using a Wet Precipitation Method, *J. Nanosci. Nanotechnol*. 12 (2012) 2774–2782. doi:10.1166/jnn.2012.5714.
- [230] W. Yang, X. Xi, J. Li, K. Cai, Comparison of crystal structure between carbonated hydroxyapatite and natural bone apatite with theoretical calculation, *Asian J. Chem*. 25 (2013) 3673–3678. doi:10.14233/ajchem.2013.13709.
- [231] K. Ishikawa, P. Ducheyne, S. Radin, Determination of the Ca/P ratio in calcium-deficient hydroxyapatite using X-ray diffraction analysis, *J. Mater. Sci. Mater. Med*. 4 (1993) 165–168. doi:10.1007/BF00120386.
- [232] I. Cacciotti, Cationic and Anionic Substitutions in Hydroxyapatite, in: I.V. Antoniac (Ed.), *Handb. Bioceram. Biocomposites*, Springer International Publishing, Switzerland, 2016: pp. 146–188. doi:DOI 10.1007/978-3-319-12460-5_7.
- [233] W. Bonfield, I.R. Gibson, Novel synthesis and characterization of an AB-type carbonate-substituted hydroxyapatite, *J. Biomed. Mater. Res*. 59 (2002) 697–708. doi:10.1002/jbm.10044.
- [234] L. Müller, F.A. Müller, Preparation of SBF with different HCO₃⁻ content and its influence on the composition of biomimetic apatites, *Acta Biomater*. 2 (2006) 181–189. doi:10.1016/j.actbio.2005.11.001.
- [235] P. Cromme, C. Zollfrank, L. Müller, F.A. Müller, P. Greil, Biomimetic mineralisation of apatites on Ca²⁺-activated cellulose templates, *Mater. Sci. Eng. C*. 27 (2007) 1–7. doi:10.1016/j.msec.2005.11.001.
- [236] F. Ren, Y. Ding, Y. Leng, Infrared spectroscopic characterization of carbonated apatite: A combined experimental and computational study, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 102 (2014) 496–505. doi:10.1002/jbm.a.34720.
- [237] T.G.M. Bonadio, F. Sato, A.N. Medina, W.R. Weinand, M.L. Baesso, W.M. Lima, Bioactivity and structural properties of nanostructured bulk composites containing Nb₂O₅ and natural hydroxyapatite, *J. Appl. Phys*. 113 (2013) 1–9. doi:10.1063/1.4809653.
- [238] B. Čolović, D. Milivojević, B. Babić-Stojić, V. Jokanović, Pore geometry of ceramic device: The key factor of drug release kinetics, *Sci. Sinter*. 45 (2013) 107–116. doi:10.2298/SOS1301107C.
- [239] S.Y. Yu, J.R. Scully, Corrosion and Passivity of Ti-13% Nb-13% Zr in Comparison to Other Biomedical Implant Alloys, *Corros*. 53 (1997) 965–976. doi:10.5006/1.3290281.
- [240] Q. Zhang, J. Chen, J. Feng, Y. Cao, C. Deng, X. Zhang, Dissolution and mineralization behaviors of HA coatings, *Biomaterials*. 24 (2003) 4741–4748. doi:10.1016/S0142-9612(03)00371-5.
- [241] S. Vahabzadeh, M. Roy, A. Bandyopadhyay, S. Bose, Phase stability and biological property evaluation of plasma sprayed hydroxyapatite coatings for orthopedic and dental applications, *Acta Biomater*. 17 (2015) 47–55. doi:10.1016/j.actbio.2015.01.022.
- [242] C.S. Hsu, F. Mansfeld, Concerning the conversion of the constant phase element parameter y_0 into a capacitance, *Corrosion*. 57 (2001) 747–755.

doi:<https://doi.org/10.33961/jecst.2020.00815>.

- [243] R.W. Korsmeyer, R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, N.A. Peppas, Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers, *Int. J. Pharm.* 15 (1983) 25–35. doi:10.1016/0378-5173(83)90064-9.
- [244] P.L. Ritger, N.A. Peppas, A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs, 5 (1987) 23–36. doi:[https://doi.org/10.1016/0168-3659\(87\)90034-4](https://doi.org/10.1016/0168-3659(87)90034-4).
- [245] G. Fotakis, J.A. Timbrell, In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicol. Lett.* 160 (2006) 171–177. doi:10.1016/j.toxlet.2005.07.001.
- [246] G. Sjögren, G. Sletten, E.J. Dahl, J.E. Sletten, G. Dahl, Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by Millipore filter, agar overlay, and MTT tests, *J. Prosthet. Dent.* 84 (2000) 229–236. doi:10.1067/mpr.2000.107227.
- [247] A.H. Ryu, W.L. Eckalbar, A. Kreimer, N. Yosef, N. Ahituv, Use antibiotics in cell culture with caution: Genome-wide identification of antibiotic-induced changes in gene expression and regulation, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–9. doi:10.1038/s41598-017-07757-w.
- [248] American Type Culture Collection, Animal cell, *Choice Rev. Online.* 46 (2009) 46-5933-46-5933.
- [249] A. Kovacik, E. Tvrda, D. Fulopova, P. Cupka, E. Kovacikova, K. Zbynovska, P. Massanyi, In Vitro Assessment of Gentamicin Cytotoxicity on the Selected Mammalian Cell Line (Vero cells), *Adv. Res. Life Sci.* 1 (2017) 111–116. doi:10.1515/arls-2017-0018.
- [250] M. El Mouedden, G. Laurent, M.P. Mingeot-Leclercq, P.M. Tulkens, Gentamicin-induced apoptosis in renal cell lines and embryonic rat fibroblast, *Toxicol. Sci.* 56 (2000) 229–239. doi:10.1093/toxsci/56.1.229.
- [251] Committee for Veterinary Medicinal Products, European Medicines Agency, (2005).
- [252] H.J. Phillips, Dye Exclusion Tests for Cell Viability, in: P. Kruse, M. Patterson (Eds.), *Tissue Cult. Appl.*, Academic Press, Inc., Cambridge, MA, 1973: pp. 406–408. doi:10.1016/B978-0-12-427150-0.50101-7.
- [253] J.L. Kadurugamuwa, A.J. Clarke, T.J. Beveridge, Surface action of gentamicin on *Pseudomonas aeruginosa*., *J. Bacteriol.* 175 (1993) 5798–805. doi:10.1128/JB.175.18.5798-5805.1993.
- [254] F. Tangy, M. Moukkadem, E. Vindimian, M. -L L. Capmau, F. Le Goffic, Mechanism of action of gentamicin components: Characteristics of their binding to *Escherichia coli* ribosomes, *Eur. J. Biochem.* 147 (1985) 381–386. doi:10.1111/j.1432-1033.1985.tb08761.x.
- [255] W. Offermanns, S.; Rosenthal, *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*, Berlin, 2008. doi:10.1007/978-3-540-3891.
- [256] M.G. Papich, M.G. Papich, Gentamicin Sulfate, in: *Saunders Handb. Vet. Drugs*, Elsevier, 2016: pp. 353–355. doi:10.1016/B978-0-323-24485-5.00280-1.
- [257] B.K. Simpson, N. Gagné, I.N.A. Ashie, E. Noroozi, Utilization of chitosan for preservation of raw shrimp (*Pandalus borealis*), *Food Biotechnol.* 11 (1997) 25–44. doi:10.1080/08905439709549920.
- [258] H.K. No, N.Y. Park, S.H. Lee, S.P. Meyers, Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights, *Int. J. Food Microbiol.* 74 (2002) 65–72. doi:10.1016/S0168-1605(01)00717-6.
- [259] G.A. Pankey, L.D. Sabath, Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections, *Clin. Infect. Dis.* 38 (2004) 864–870. doi:10.1086/381972.
- [260] M.J. Almeida, L. Pereira, C. Milet, J. Haigle, M. Barbosa, E. Lopez, Comparative effects of nacre water-soluble matrix and dexamethasone on the alkaline phosphatase activity of MRC-5 fibroblasts, *J. Biomed. Mater. Res.* 57 (2001) 306–312. doi:10.1002/1097-4636(200111)57:2<306::AID-JBM1172>3.0.CO;2-H.
- [261] M.R. Nikpour, S.M. Rabiee, M. Jahanshahi, Synthesis and characterization of

- hydroxyapatite/chitosan nanocomposite materials for medical engineering applications, *Compos. Part B Eng.* 43 (2012) 1881–1886. doi:10.1016/j.compositesb.2012.01.056.
- [262] A. Brangule, K.A. Gross, Importance of FTIR Spectra Deconvolution for the Analysis of Amorphous Calcium Phosphates, *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 77 (2015) 1–6. doi:10.1088/1757-899X/77/1/012027.
- [263] D. Mayo, F. Miller, R. Hannah, *Course Notes On The Interpretation Of Infrared And Raman Spectra*, John Wiley and Sons Ltd, Hoboken, New Jersey, 2004.
- [264] Y.X. Xu, K.M. Kim, M.A. Hanna, D. Nag, Chitosan-starch composite film: Preparation and characterization, *Ind. Crops Prod.* 21 (2005) 185–192. doi:10.1016/j.indcrop.2004.03.002.
- [265] K. Zhang, D. Peschel, J. Helm, T. Groth, S. Fischer, FT Raman investigation of novel chitosan sulfates exhibiting osteogenic capacity, *Carbohydr. Polym.* 83 (2011) 60–65. doi:10.1016/j.carbpol.2010.07.021.
- [266] R. Surudžić, A. Janković, N.N. Bibić, M. Vukašinović-Sekulić, A. Perić-Grujić, V. Mišković-Stanković, S.J. Park, K.Y. Rhee, Physico-chemical and mechanical properties and antibacterial activity of silver/poly(vinyl alcohol)/graphene nanocomposites obtained by electrochemical method, *Compos. Part B Eng.* 85 (2016) 102–112. doi:10.1016/j.compositesb.2015.09.029.
- [267] A. Rapacz-Kmita, E. Stodolak-Zych, M. Ziabka, A. Rozycka, M. Dudek, Instrumental characterization of the smectite clay-gentamicin hybrids, *Bull. Mater. Sci.* 38 (2015) 1069–1078. doi:10.1007/s12034-015-0943-7.
- [268] Z. Fan, J. Wang, Z. Wang, Z. Li, Y. Qiu, H. Wang, Y. Xu, L. Niu, P. Gong, S. Yang, Casein phosphopeptide-biofunctionalized graphene biocomposite for hydroxyapatite biomimetic mineralization, *J. Phys. Chem. C.* 117 (2013) 10375–10382. doi:10.1021/jp312163m.
- [269] M. Li, Q. Liu, Z. Jia, X. Xu, Y. Shi, Y. Cheng, Y. Zheng, T. Xi, S. Wei, Electrophoretic deposition and electrochemical behavior of novel graphene oxide-hyaluronic acid-hydroxyapatite nanocomposite coatings, *Appl. Surf. Sci.* 284 (2013) 804–810. doi:10.1016/j.apsusc.2013.08.012.
- [270] L. Francis, D. Meng, J. Knowles, T. Keshavarz, A.R. Boccaccini, I. Roy, Controlled delivery of gentamicin using poly(3-hydroxybutyrate) microspheres, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 4294–4314. doi:10.3390/ijms12074294.
- [271] K. Igeta, Y. Kuwamura, N. Horiuchi, K. Nozaki, D. Shiraishi, M. Aizawa, K. Hashimoto, K. Yamashita, A. Nagai, A.N. Kazuki Igeta, Yuta Kuwamura, Naohiro Horiuchi, Kosuke Nozaki, Daichi Shiraishi, Mamoru Aizawa, Kazuaki Hashimoto, Kimihiro Yamashita, Morphological and functional changes in RAW264 macrophage-like cells in response to a hydrated layer of carbonate-substituted hydroxyapatite, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 105 (2008) 1063–1070. doi:10.1111/1744-1633.12020.
- [272] T. Sakae, A. Ookubo, R.Z. LeGeros, R. Shimogoryou, Y. Sato, S. Lin, H. Yamamoto, Y. Kozawa, Bone formation induced by several carbonate- and fluoride-containing apatite implanted in dog mandible, *Key Eng. Mater.* 240–242 (2003) 395–398. doi:10.4028/www.scientific.net/kem.240-242.395.
- [273] I. Childres, L. Jauregui, W. Park, H. Cao, Y. Chen, Raman Spectroscopy of Graphene and Related Materials, in: J.I. Jang (Ed.), *New Dev. Phot. Mater. Res.*, Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, 2013: pp. 1–20. doi:10.1016/B978-0-444-53175-9.00016-7.
- [274] J. Hanuza, M. Wandas, L. Dymin, Molecular and Biomolecular Spectroscopy Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy, *Spectrochim. Acta Part A.* 134 (2015) 114–120. doi:10.1016/j.saa.2014.06.071.
- [275] C. Dwivedi, H. Pandey, A.C. Pandey, P.W. Ramteke, Novel Gentamicin Loaded Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Wound Healing: an in -vitro Study, *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 4 (2013) 2230–2233. doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.4(6).2230-33.
- [276] V. Loryuenyong, K. Totepvimarn, P. Eimburanapratvat, W. Boonchompoo, A. Buasri, Preparation and characterization of reduced graphene oxide sheets via water-based exfoliation and reduction methods, *Adv. Mater. Sci. Eng.* (2013) Article ID 923403, 1-5.

doi:10.1155/2013/923403.

- [277] C. Dwivedi, H. Pandey, A.C. Pandey, P.W. Ramteke, Fabrication and Assessment of Gentamicin Loaded Electrospun Nanofibrous Scaffolds as a Quick Wound Healing Dressing Material, *Curr. Nanosci.* 11 (2015) 222–228. doi:10.2174/1573413710666141003221954.
- [278] H. Pandey, V. Parashar, R. Parashar, R. Prakash, P.W. Ramteke, A.C. Pandey, Controlled drug release characteristics and enhanced antibacterial effect of graphene nanosheets containing gentamicin sulfate, *Nanoscale.* 3 (2011) 4104–4108. doi:10.1039/c1nr10661a.
- [279] Y. Chen, Y. Feng, J.G. Deveaux, M.A. Masoud, F.S. Chandra, H. Chen, D. Zhang, L. Feng, Biom mineralization Forming Process and Bio-inspired Nanomaterials for Biomedical Application: A Review, *Minerals.* 9 (2019) 68. doi:10.3390/min9020068.
- [280] T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, *Biomaterials.* 27 (2006) 2907–2915. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.
- [281] Q. Zhang, Y. Leng, X. Lu, R. Xin, X. Yang, J. Chen, Bioactive films on metallic surfaces for osteoconduction, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 88 (2009) 481–490. doi:10.1002/jbm.a.31820.
- [282] S.C.G. Leeuwenburgh, J.G.C. Wolke, M.C. Siebers, J. Schoonman, J.A. Jansen, In vitro and in vivo reactivity of porous, electrospayed calcium phosphate coatings, *Biomaterials.* 27 (2006) 3368–3378. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.052.
- [283] A.A. Zadpoor, Relationship between in vitro apatite-forming ability measured using simulated body fluid and in vivo bioactivity of biomaterials, *Mater. Sci. Eng. C.* 35 (2014) 134–143. doi:10.1016/j.msec.2013.10.026.
- [284] N. Murugan, C. Murugan, A.K. Sundramoorthy, In vitro and in vivo characterization of mineralized hydroxyapatite/polycaprolactone-graphene oxide based bioactive multifunctional coating on Ti alloy for bone implant applications, *Arab. J. Chem.* 11 (2018) 959–969. doi:10.1016/j.arabjc.2018.03.020.
- [285] P. Mohammad Salahi Tohidi, M.S. Safavi, M. Etminanfar, J. Khalil-Allafi, Pulsed electrodeposition of compact, corrosion resistant, and bioactive HAp coatings by application of optimized magnetic field, *Mater. Chem. Phys.* 254 (2020) 123511. doi:10.1016/j.matchemphys.2020.123511.
- [286] M. Stevanović, M. Djošić, A. Janković, V. Kojić, M. Vukašinović-Sekulić, J. Stojanović, J. Odović, M. Crevar Sakač, R. Kyong Yop, V. Mišković-Stanković, Antibacterial graphene-based hydroxyapatite/chitosan coating with gentamicin for potential applications in bone tissue engineering, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 108 (2020) 2175–2189. doi:10.1002/jbm.a.36974.
- [287] M. Stevanović, M. Djošić, A. Janković, K. Nešović, V. Kojić, J. Stojanović, S. Grujić, I. Matic Bujagić, K.Y. Rhee, V. Mišković-Stanković, Assessing the Bioactivity of Gentamicin-Preloaded Hydroxyapatite/Chitosan Composite Coating on Titanium Substrate, *ACS Omega.* 5 (2020) 15433–15445. doi:10.1021/acsomega.0c01583.
- [288] H. Madupalli, B. Pavan, M.M.J. Tecklenburg, Carbonate substitution in the mineral component of bone: Discriminating the structural changes, simultaneously imposed by carbonate in A and B sites of apatite, *J. Solid State Chem.* 255 (2017) 27–35. doi:10.1016/j.jssc.2017.07.025.
- [289] M. Djošić, A. Janković, V. Mišković-Stanković, Electrophoretic Deposition of Biocompatible and Bioactive Hydroxyapatite-Based Coatings on Titanium, *Materials (Basel).* 14 (2021) 1–22. doi:https://doi.org/10.3390/ma14185391.
- [290] B.K. Sarma, P. Barman, B. Sarma, A. Das, A.R. Pal, Biomimetic deposition of carbonate apatite and role of carbonate substitution on mechanical properties at nanoscale, *Mater. Lett.* 185 (2016) 387–390. doi:10.1016/j.matlet.2016.09.028.
- [291] P. Sakthivel, A. Ragu, K. Senthilarasan, Synthesis and characterization of hydroxyapatite with tamarind kernel powder (bio-polymer) for biomedical applications, *Int. J. Eng. Sci. Res. Technol.* 4 (2015) 631–635.
- [292] X. Chen, D. Wu, J. Xu, T. Yan, Q. Chen, Gelatin / Gelatin-modified nano hydroxyapatite

composite scaffolds with hollow channel arrays prepared by extrusion molding for bone tissue engineering Gelatin / Gelatin-modified nano hydroxyapatite composite scaffolds with hollow channel arrays prepare, *Mater. Res. Express.* 8 (2021) 1–15.
doi:<https://doi.org/10.1088/2053-1591/abde1f>.

- [293] B. Wopenka, J.D. Pasteris, A mineralogical perspective on the apatite in bone, *Mater. Sci. Eng. C.* 25 (2005) 131–143. doi:[10.1016/j.msec.2005.01.008](https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.01.008).
- [294] L. Borkowski, A. Sroka-Bartnicka, P. Draczkowski, A. Ptak, E. Zięba, A. Tószarczyk, G. Ginalska, The comparison study of bioactivity between composites containing synthetic non-substituted and carbonate-substituted hydroxyapatite, *Mater. Sci. Eng. C.* 62 (2016) 260–267. doi:[10.1016/j.msec.2016.01.056](https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.056).
- [295] M. Kumar, H. Dasarathy, C. Riley, Electrodeposition of brushite coatings and their transformation to hydroxyapatite in aqueous solutions, *J. Biomed. Mater. Res.* 45 (1999) 302–310. doi:[10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19990615\)45:4<302::AID-JBM4>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19990615)45:4<302::AID-JBM4>3.0.CO;2-A).
- [296] R. Sun, K. Chen, Y. Lu, Fabrication and dissolution behavior of hollow hydroxyapatite microspheres intended for controlled drug release, *Mater. Res. Bull.* 44 (2009) 1939–1942. doi:[10.1016/j.materresbull.2009.06.015](https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2009.06.015).
- [297] S. Goenka, V. Sant, S. Sant, Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering, *J. Control. Release.* 173 (2014) 75–88. doi:[10.1016/j.jconrel.2013.10.017](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.10.017).
- [298] J. Liu, J. Dong, T. Zhang, Q. Peng, Graphene-based nanomaterials and their potentials in advanced drug delivery and cancer therapy, *J. Control. Release.* 286 (2018) 64–73. doi:[10.1016/j.jconrel.2018.07.034](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.07.034).
- [299] E.I. Rabea, M.E.T. Badawy, C. V. Stevens, G. Smagghe, W. Steurbaut, Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action, *Biomacromolecules.* 4 (2003) 1457–1465. doi:[10.1021/bm034130m](https://doi.org/10.1021/bm034130m).
- [300] E.S. Permyakova, A.M. Manakhov, P. V. Kiryukhantsev-Korneev, A.N. Sheveyko, K.Y. Gudz, A.M. Kovalskii, J. Polčák, I.Y. Zhitnyak, N.A. Gloushankova, I.A. Dyatlov, S.G. Ignatov, S. Ershov, D. V. Shtansky, Different concepts for creating antibacterial yet biocompatible surfaces: Adding bactericidal element, grafting therapeutic agent through COOH plasma polymer and their combination, *Appl. Surf. Sci.* 556 (2021) 149751. doi:[10.1016/j.apsusc.2021.149751](https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.149751).
- [301] S. Vimalraj, Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization, *Gene.* 754 (2020) 144855. doi:[10.1016/j.gene.2020.144855](https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144855).
- [302] W. Beertsen, T. Van den Bos, Alkaline phosphatase induces the mineralization of sheets of collagen implanted subcutaneously in the rat, *J. Clin. Invest.* 89 (1992) 1974–1980. doi:[10.1172/JCI115805](https://doi.org/10.1172/JCI115805).

BIOGRAFIJA KANDIDATA

Milena Stevanović je rođena 24. avgusta 1991. u Prokuplju. Završila je Medicinsku školu u Leskovcu (obrazovni profil – farmaceutski tehničar), a zatim i osnovne i master akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu (TMF) Univerziteta u Beogradu, na studijskim programima Inženjerstvo zaštite životne sredine (osnovne akademske studije) i Hemijsko inženjerstvo – izborno područje Neorganska hemijska tehnologija (master akademske studije). Doktorske akademske studije je upisala školske 2016/17. godine na TMF, na studijskom programu Inženjerstvo materijala. Od marta 2017. zaposlena je u Inovacionom centru TMF. U zvanje istraživač saradnik izabrana je 28. maja 2020. Bila je angažovana na projektu „Sinteza, razvoj tehnologija dobijanja i primena nanostrukturnih multifunkcionalnih materijala definisanih svojstava” (III45019) (2016-2019.), kao i na COST akciji TD1305-Improved Protection of Medical Devices Against Infection (iPROMEDAI) (2016-2018.). Takođe je bila angažovana na projektu PRIZMA “Biomimetično inženjerstvo tumora za ubrzani razvoj antitumorskih lekova – BioengineeredTumor” (2024-2025). koji finansira Fond za nauku. Bila je i učesnik evropskog projekta ExcellMater (GA 952033) u okviru programa Horizont 2020 (2021-2024). Trenutno učestvuje na projektu bilateralne saradnje između Srbije i Slovenije (2023-2025). Boravila je u inostranstvu na usavršavanju na Université Libre de Bruxelles ULB, Brisel, Belgija (2018), Università del Piemonte -Orientale, Novara, Italija (2024) i na Institutu Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija (2024). Učestvovala je u izradi dva završna rada. Do sada je objavila 9 radova u međunarodnim naučnim časopisima (kategorije M20), petnaest saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima (M34) i petnaest na nacionalnim (M64). Iz oblasti doktorske disertacije proisteklo je pet naučnih radova (1M21a, 2M21, 1M22, 1M23), na kojima je kandidat prvi autor i jedan rad M22 kategorije na kome je drugi autor. Član je Srpskog hemijskog društva. Govori engleski jezik, služi se nemačkim.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Милена Стевановић

Број индекса 4028/2016

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Електрофоретске композитне превлаке хидроксиапатита, хитозана и графена на титану са и без додатка гентамицина“

- 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, 20.05.2025.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Миленаа Стевановић

Број индекса: 4028/2016

Студијски програм: Инжењерство материјала

Наслов рада „Електрофоретске композитне превлаке хидроксиапатита, хитозана и графена на титану са и без додатка гентамицина“

Ментор проф. др Ђорђе Јанаћковић, редовни професор, Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Ментор др Ана Јанковић, научни саветник, Иновациони центар Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду

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, 20.05.2025.

Изјава о коришћењу

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

„Електрофоретске композитне превлаке хидроксиапатита, хитозана и графена на титану са и без додатка гентамицина“

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 20.05.2025.

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

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

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

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

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

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

ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма *iThenticate* којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „ЕЛЕКТРОФОРЕТСКЕ КОМПОЗИТНЕ ПРЕВЛАКЕ ХИДРОКСИАПАТИТА, ХИТОЗАНА И ГРАФЕНА НА ТИТАНУ СА И БЕЗ ДОДАТКА ГЕНТАМИЦИНА”, аутора **Милене Љ. Стевановић**, констатујемо да утврђено подудараре текста износи сумарно 8%, при чему оно потиче из 77 различитих извора, у оквиру којих је код 5 извора степен појединачног подудараре 1%, а код осталих ≤ 1 %. Овај степен подударности је настао као последица:

- 1) коришћења имена Универзитета и факултета, назива шире и уже научне области, личних имена наставника и колега у захвалницама и подацима о члановима комисије, имена произвођача инструмената који су коришћени за мерења и карактеризацију материјала, као и употребе уобичајених општих термина и фраза које се користе у писаном облику изражавања, независно од стручне терминологије;
- 2) коришћења стандардне научне и стручне терминологије која се односи на одређене појмове и процесе у оквиру научне области којој припада тема ове докторске дисертације, као што су називи хемијских једињења, техника синтезе хемијских једињења и процесирања материјала, као и стандардних биолошких протокола и назива бактерија и ћелијских култура;
- 3) поклапање у дефинисању општеприхваћених појмова и знања из области докторске дисертације који се као такви налазе у стручној литератури;
- 4) поклапање у опису и начину добијања материјала, дефинисању структуре материјала, као и дефинисању и рачунању физичко-хемијских параметара на основу дефинисаних модела и сл., употреба и појашњење ознака у карактеристичним једначинама за дату област, употреба одговарајућих мерних јединица у тексту и табелама;
- 5) коришћење терминологије у називима и опису одређених експерименталних метода карактеризације структуре и својстава материјала (нпр. SEM, XRD, FTIR, XPS итд.), терминологије у начину извођења тих метода, у припреми узорака и сл.;
- 6) употребе бројних вредности, ознака испитиваних узорака сопствених резултата кандидата произашлих из ове тезе, а који су већ публиковани у међународним часописима,

што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујемо да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Датум: 20.06.2025. год.

Ментори:

др Ђорђе Јанаковић, редовни професор,
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

др Ана Јанковић, научни саветник,
Иновациони центар ТМФ