

**UNIVERZITET U BEOGRADU  
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE**

**Bogomir Bolka B. Prokić**

**ISPITIVANJE BIOKOMPATIBILNOSTI  
FUNKCIONALIZOVANIH KARBONSKIH  
VLAKANA U POTKOŽNOM I MIŠIĆNOM  
TKIVU KUNIĆA**

**doktorska disertacija**

Beograd, 2017. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE  
**FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

**Bogomir Bolka B. Prokić**

**BIOCOMPATIBILITY OF FUNCTIONALIZED  
CARBON FIBERS IMPLANTED IN RABBIT  
SUBCUTANEOUS AND MUSCLE TISSUES**

**doctoral thesis**

Belgrade, 2017

Članovi komisije:

dr Nikola Krstić, redovni profesor, mentor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr Vera Todorović, redovni profesor, komentor

Stomatološki fakultet Pančevo Univerziteta „Privredna akademija“, Novi Sad

Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu

dr Jugoslav Vasić, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr Danica Marković, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr Marko Daković, docent

Fakultet za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

Doktorska disertacija pod naslovom „Ispitivanje biokompatibilnosti funkcionalizovanih karbonskih vlakana u potkožnom i mišićnom tkivu kunića” realizovana je na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu (Katedra za hirurgiju, ortopediju i oftalmologiju; Katedra za radiologiju i radijacionu higijenu), Institutu za primenu nuklearne energije „Vinča” Univerziteta u Beogradu (Laboratorija za fiziku), Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI) Univerziteta u Beogradu (Laboratorija za humanu molekularnu genetiku), Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije – IORS (Klinika za radiološku onkologiju i dijagnostiku, Odsek za kompjuterizovanu tomografiju i magnetnu rezonancu), Institutu za anatomiju “Niko Miljanić” Medicinskog fakulteta u Beogradu i Službi za patohistologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu.

Doktorska disertacija rezultat je ostvarivanja istraživačkih ciljeva projekata „Fizika i hemija sa jonskim snopovima” (III 45006, rukovodilac dr Srđan Petrović, naučni savetnik Instituta za nuklearne nauke „Vinča” u Beogradu) i realizovana je u okviru podprojekta „Nanomodifikacija i analiza materijala sa jonskim snopovima”, kojim rukovodi dr Zoran Laušević, naučni savetnik Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, a koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, za istraživački period 2011-2017. godina.

Najsrdajnije se zahvaljujem svom mentoru prof. dr Nikoli Krstiću (Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu) i komentoru prof. dr Veri Todorović (Stomatološki fakultet Pančevo Univerziteta Privredna akademija, Novi Sad i Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu) na poverenju, izuzetnoj požrtvovanosti i uložnim naporima tokom sprovođenja istraživanja i svim fazama realizacije ove doktorske disertacije. Oni su svojom ogromnom stručnom i prijateljskom podrškom doprineli da se ova teza realizuje i finalizuje.

Zahvaljujem se dr Zoranu Lauševiću, naučnom savetniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča” i dr Mili Laušević, redovnom profesoru u penziji Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, bez čijeg entuzijazma i usmeravanja u izboru teme i velikoj stručnoj pomoći u radu sa karbonskim vlaknima, ne bi bila moguća realizacija ove doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem akademiku Mileni Stevanović, dr Mariji Mojsev, naučnom saradniku i dr Mariji Švrtlih, naučnom saradniku iz IMGGI za pomoć u realizaciji istraživanja citotoksičnosti karbonskih vlakana. Akademiku Miodragu Čoliću i dr sci. Milanu Markoviću

(Medicinski fakultet VMA Univerziteta odbrane u Beogradu) dugujem zahvalnost za pomoć oko realizacije istraživanja vezanih za uticaj karbonskih vlakana na funkciju makrofaga u ćelijskim kulturama.

Za pomoć oko pregleda na magnetnoj rezonanci eksperimentalnih životinja kojima su implantirana standardna i funkcionalizovana karbonska vlakna, kao i stručnoj pomoći oko tumačenja rezultata, zahvaljujem se doc. dr Marku Dakoviću (Fakultet za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu).

Profesor dr Milan Milisavljević (Institut za anatomiju „Niko Miljanić“ Medicinskog fakulteta u Beogradu) uložio je veliki trud oko moje edukacije u morfometrijskim istraživanjima i korišćenju propratnog softverskog sistema, i svojom nesebičnom stručnom pomoći značajno je doprineo segmentu rezultata koji se odnose na dimenzije fragmentisanih i nefragmentisanih karbonskih vlakana na mestu implantacije, te mu se najsrdačnije zahvaljujem.

Zahvaljujem se dr Marjanu Micevu, višem naučnom saradniku i direktoru Službe za patohistologiju KCS, koji je omogućio tehničku podršku oko pripreme uzoraka za patohistološka istraživanja, a svojom stručnim savetima usmerio me ka pravilnom tumačenju patohistoloških nalaza.

Dugujem zahvalnost dr Neli Puškaš, docentu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (Institut za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“) oko pomoći prilikom prikupljanja tkivnih uzoraka.

Kolektivu Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu zahvalan sam na razumevanju i stalnoj brizi da ne zastanem u najznačajnijim koracima na putu stručnog i naučnog usavršavanja.

# ISPITIVANJE BIOKOMPATIBILNOSTI FUNKCIONALIZOVANIH KARBONSKIH VLAKANA U POTKOŽNOM I MIŠIĆNOM TKIVU KUNIĆA

## REZIME

U ovoj doktorskoj disertaciji upotrebljena su dobro okarakterisana komercijalna visokočvrsta karbonska vlakna (KV) marke *Torayca* (T300B, 6000-50B, No 2610622), debljine 4-6  $\mu\text{m}$ . Ova vlakna funkcionalizovana su tretiranjem  $\text{HNO}_3$  i  $\text{KOH}$ , što je značajno izmenilo sadržaj površinskih grupa. Biokompatibilnost tako funkcionalizovanih karbonskih vlakana ispitivana je na eksperimentalnim životinjama (kunići, varijetet činčila), a procenjavana je *in vitro*, na ćelijskim kulturama (fibroblastvoj i makrofagnoj), *in vivo* aplikacijom vlakana u potkožno tkivo i *m. longissimus dorsi* i primenom nuklearne magnetne rezonance (NMR).

Rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da ne postoji razlika u stepenu citotoksičnosti između modifikovanih i standardnih KV, koja je u ovom eksperimentu prvo procenjavana na osnovu testa vijabilnosti ćelija (kalorimetrijski MTT) i testa ćelijske adhezije (trodimenzionalna / 3D kultivacija ćelija u *Matrigelu*) na humanim fibroblastima kontinuirane ćelijske linije MRC-5. Međutim, ova istraživanja dopunjena su testovima na kulturi humane makrofagne linije U937, u kojima je procenjavana vijabilnost ćelija, internalizacija vlakana (fagocitoza) i produkcija proinflamatornih citokina,  $\text{IL-1}\alpha$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IL-8}$  i  $\text{TNF-}\alpha$ . Ćelijska vijabilnost bila je nenarušena u kulturama humane makrofagne linije U937 ukoliko su se dodavala KV u koncentraciji od 125  $\mu\text{g/ml}$ . Međutim, dodavanjem KV u koncentraciji od 250  $\mu\text{g/ml}$  ili 500  $\mu\text{g/ml}$ , dolazilo je do značajnog dozno-zavisnog linearnog smanjenja vijabilnosti ćelija kod sve tri primenjene grupe KV, i to naročito kod dodavanja baznih KV. Znatno veći broj makrofagnih ćelija fagocitovao je KV tretirana bazom, u odnosu na fagocitozu standardnih i kiselih KV. Postojala je povećana koncentracija proinflamatornih citokina  $\text{TNF-}\alpha$  i  $\text{IL-1}\beta$  u supernatantima kulture humanih makrofaga linije U937 nakon dodavanja standardnih ili kiselih KV u koncentraciji od 125  $\mu\text{g/ml}$ , dok je dodavanje baznih KV u istoj koncentraciji uslovalo smanjenu produkciju ovih citokina. U istoj koncentraciji, standardna KV su uslovila značajno smanjenja sekrecije  $\text{IL-8}$ , a kisela i bazna KV izrazito povećanje sekrecije  $\text{IL-6}$  i  $\text{IL-8}$ . Pri tome, vlakna tretirana kiselinom bila su snažniji stimulator sekrecije  $\text{IL-8}$  iz makrofaga u odnosu na vlakna tretirana bazom. Standardna KV u koncentraciji od 250  $\mu\text{g/ml}$  smanjivala su sekreciju  $\text{IL-}$

1 $\beta$ , a bazna povećavala. Međutim, produkcija IL-6 i IL-8 snažno je stimulirana pod uticajem standardnih KV, a višestruko inhibirana nakon dodavanja kiselih ili baznih KV u navedenoj koncentraciji. Kisela, a naročito bazna KV, dovela su do smanjenja koncentracije TNF- $\alpha$ .

Najveći odgovor tkiva procenjen preko vrednosti tkivnog iritacionog indeksa (IrI) pri *subkutanoj aplikaciji* KV postojao je 21. dana nakon implantacije standardnih i kiselih KV, a 21. i 28. dana u slučaju implantirane bazna KV. Pri tome, IrI potkožnog tkiva kod subkutane aplikacije kiselih KV bio je značajno veći 21. dana nakon implantacije u poređenju sa IrI kod subkutane aplikacije baznih KV. Kod *intramuskularne aplikacije* kiselih KV, vrednosti IrI bile su značajno veće 7. dana od implantacije. Postojao je znatno veći tkivni IrI kod intramuskularno aplikovanih kiselih KV u odnosu standardna KV 7, 21. i 28. postoperativnog dana, a značajna razlika u veličini ovog indeksa registrovana je između kiselih i baznih KV u 7. postoperativnom danu, u korist kiselih vlakana. Poređenjem *subkutane i intramuskularne aplikacije* KV, izvodi se zaključak da je 7. dana nakon implantacije IrI značajno veći prilikom intramuskularne aplikacije *standardnih, kiselih i baznih karbonskih vlakna* u poređenju sa subkutanom aplikacijom istih tipova vlakana, dok je 21. danu IrI značajno veći kod subkutane aplikacije u odnosu na intramuskularnu. Najviše su bila *fragmentisana* intramuskularno aplikovana kisela i standardna KV, a najmanje subkutano aplikovana standardna KV. Intramuskularna aplikacija uslovlila je kidanje vlakana na manje fragmente u odnosu na potkožnu aplikaciju KV. Subkutano, najviše su bila fragmentisana bazna KV i razlika je bila značajna u odnosu na standardna i kisela KV, dok su intramuskularno najviše bila fragmentisana kisela KV, a ta fragmentacija bila je veća u odnosu na fragmentaciju baznih KV aplikovanih na istio način. Nalazi na NMR i patohistološka procena odgovora potkožnog i mišićnog tkiva na implantaciju KV, podudarali su se delimično.

Sve primenjene analize rasvetlile su različite aspekte biokompatibilnosti implantata.

Ključne reči: funkcionalizovana karbonska vlakna, biokompatibilnost, zamorac, meka tkiva

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Hirurgija

UDK broj: 617:619]:598.325.1(043.3)

# BIOCOMPATIBILITY EVALUATION OF FUNCTIONALIZED CARBON FIBERS IN SUBCUTANEOUS AND MUSCLE TISSUES OF THE RABBIT

## SUMMARY

In this doctoral dissertation, it was used the well-characterized commercial high strength carbon fibers (CF) Torayca (T300B, 6000-50B, No 2610622), 4-6  $\mu\text{m}$  thick. These fibers were functionalized by treatment with  $\text{HNO}_3$  and  $\text{KOH}$ , which significantly changed the content of the surface groups. Biocompatibility of functionalized carbon fibers was tested *in vivo* by implanting fibers in the subcutaneous tissue and *m. longissimus dorsi* of the experimental animals (rabbits, chinchilla variety), then followed with nuclear magnetic resonance (NMR), and assessed *in vitro* on cell cultures (fibroblast and macrophage).

The results of this doctoral dissertation showed that there is no difference in the degree of the cytotoxicity level between modified and standard CFs, which was in this experiment evaluated first basing on the cell viability test (calorimetric MTT) and cell adhesion test (three-dimensional / 3D cell cultivation in Matrigel) on human fibroblasts of the continuous MRC-5 cell line. However, these studies were supplemented with tests on the culture of the human macrophage line U937, in which cell viability was assessed, than internalization of fibers (phagocytosis) and production of proinflammatory cytokines,  $\text{IL-1}\alpha$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IL-8}$  and  $\text{TNF-}\alpha$ . When CFs were added at concentration of  $125 \mu\text{g} / \text{ml}$ , cell viability was uninhabited in the culture of the human macrophage line U937. By adding CFs at concentration of  $250 \mu\text{g} / \text{ml}$  or  $500 \mu\text{g} / \text{ml}$ , there was a significant dose-dependent linear decrease in cell viability by all three applied CF groups, especially in case of adding base CFs. Significantly higher number CFs treated with base was phagocytosed by macrophage cells, compared to the phagocytosis of standard and acidic CFs. There was an increased concentration of proinflammatory cytokines  $\text{TNF-}\alpha$  and  $\text{IL-1}\beta$  in human macrophage culture U937 line supernatants after adding of the standard or acidic CFs at concentration of  $125 \mu\text{g} / \text{ml}$ , while the adding of the base CFs in the same concentration caused a reduced production of these cytokines. At the same concentration, standard CFs resulted in significant reductions in  $\text{IL-8}$  secretion, while acid and base CFs pronouncedly increased secretion of  $\text{IL-6}$  and  $\text{IL-8}$  secretion. In addition, the acid-treated fibers were stronger stimulant of  $\text{IL-8}$  secretion from macrophages, compared to the base-treated fibers. Standard CFs at the concentration of  $250 \mu\text{g} / \text{ml}$  decreased  $\text{IL-1}\beta$  secretion, and base line increased. However,



production of the IL-6 and IL-8 was stimulated strongly under the influence of standard CFs and multiple inhibited after addition of acidic or base CFs in said concentration. Acidic, especially base CFs, has led to the decrease in TNF- $\alpha$  concentration.

The highest tissue response estimated from the tissue irritation index (IrI) in subcutaneous CFs administration was 21 day after implantation of standard and acidic CFs, and on the 21st and 28th day in case of the base implanted CFs. In addition, IrI of subcutaneous tissue in subcutaneous application of acidic CFs was significantly higher on the 21st day after implantation, compared to the IrI of the base CFs in subcutaneous application. In the intramuscular application of acidic CFs, IrI values were significantly higher on the 7th day of implantation. There was a significantly higher tissue IrI in the intramuscularly administered acidic CFs versus the standard CFs 7, 21 and 28 days after implantation, and a significant difference in the size of this index was recorded between acidic and base CFs on the 7th postoperative day, in favor of acidic fibers. Comparison of the subcutaneous and intramuscular application of CFs, it can be concluded that on the 7th day after implantation, IrI was significantly higher in the intramuscular application of standard, acidic and basic carbon fibers, compared to the subcutaneous application of the same types of fibers, while on the 21st day, IrI was significantly higher in subcutaneous application, in relation to the intramuscular. The most fragmented were intramuscularly administered acid and standard CFs, and the least subcutaneously administered standard CFs. The intramuscular application caused tearing of fibers into smaller fragments compared to the subcutaneous application of CFs. Subcutaneously, the most fragmented were base CFs, and the difference was significant in relation to the standard and acidic CFS, while intramuscularly the most fragmented were acidic CFs, and that fragmentation was higher than the fragmentation of base CFs applied in the same manner. NMR and pathohistological assessment of the response of the subcutaneous and muscular tissue to the implantation of the CFs findings partly coincided.

All applied analyzes highlighted various aspects of biocompatibility of the implants.

Key words: functionalized carbon fibers, biocompatibility, rabbits, soft tissue

Scientific area: Veterinary medicine

Specific scientific field: Surgery

UDK number: 617:619]:598.325.1(043.3)

# S A D R Ž A J

1.	UVOD	1
2.	PREGLED LITERATURE	3
2.1.	Istorijat – prve transplantacije, prve upotrebe prirodnih i sintetskih materijala u tkivnoj regeneraciji i pojam biomaterijala	3
2.2.	Ugljenični (karbonski) materijali	7
2.2.1.	Grafit	8
2.3.	Karbonska vlakna	10
2.3.1.	Istorijat karbonskih vlakana	11
2.3.2.	Struktura karbonskih vlakana	13
2.3.3.	Dobijanje karbonskih vlakana	21
2.3.4.	Osobine karbonskih vlakana	28
2.4.	Biokompatibilnost materijala uključujući i karbonska vlakna	38
2.4.1.	Definicija biokompatibilnosti materijala	38
2.4.2.	Standardi za ispitivanje biokompatibilnosti	39
2.4.3.	Testovi za ispitivanje biokompatibilnosti materijala	39
2.4.4.	Biokompatibilnost ugljeničnih materijala i, posebno, karbonskih vlakana	43
2.5.	Primena karbonskih vlakana u humanoj i veterinarskoj medicini	44
2.5.1.	Primena karbonskih vlakana u medicini	44
2.5.2.	Primena karbonskih vlakana u veterinarskoj medicini	55
3.	CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA	60
4.	MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA	62
4.1.	Karakteristike standardnih (komercijalnih) karbonskih vlakana korišćenih u eksperimentu	62
4.2.	Dobijanje funkcionalizovanih karbonskih vlakana i njihova karakterizacija	62
4.2.1.	Tretiranje karbonskih vlakana visokom temperaturom	63
4.2.2.	Pravljenje implanata	63
4.2.3.	Promena površinskih grupa	64
4.2.4.	Određivanje tačke nultog naelektrisanja	65

4.2.5.	Metoda kiselo/bazne titracije	65
4.3.	Ekperimentalne životinje i procedure implantacije karbonskih vlakana	65
4.3.1.	Izbor eksperimentalnih životinja i određivanje mesta implantacije	65
4.3.2.	Plan implantacije standardnih (nefunkcionalizovanih) i funkcionalizovanih ugljeničnih vlakana	66
4.3.3.	Hirurška tehnika implantacije	67
4.3.4.	Monitoring životinja	69
4.4.	Ispitivanje citotoksičnosti	70
4.4.1.	Kultivacija humane ćelijske linije fibroblasta pluća MRC-5 sa karbonskim vlaknima	70
4.4.2.	MTT test za određivanje vijabilnosti ćelija linije MRC-5	71
4.4.3.	Trodimenzionalna (3D) kultivacija ćelija linije MRC-5 u Matrigelu	72
4.4.4.	Određivanje efekata karbonskih vlakana na funkciju humane makrofagne linije U937	72
4.5.	Nuklearna magnetna rezonanca (NMR)	73
4.6.	Patohistološka ispitivanja	75
4.6.1.	Priprema uyoraka	75
4.6.2.	Bojenje po Weigert-Van Giesonu za elastična vlakna i vezivo	76
4.6.3.	AYAN trihromsko bojenje	76
4.6.4.	Bojenje po Gordon-Sweetu za retikularna vlakna	76
4.6.5.	Procena indeksa tkivne iritacije (iritacionog indeksa) na mestu implantacije	76
4.7.	Morfometrijska ispitivanja	79
4.8.	Statistička obrada rezultata	82
5.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA	83
5.1.	Karakteristike standardnih i funkcionalizovanih karbonskih vlakana	83
5.1.1.	Karakteristike standardnih vlakana	83
5.1.2.	Tačka nultog naelektrisanja i količina kiselih i baznih površinskih grupa na funkcionalizovanim karbonskim vlaknima	83
5.2.	Citotoksičnost standardnih i funkcionalizovanih kiselih i baznih karbonskih vlakana	84

5.2.1.	Vijabilnost ćelija kontinuirane linije humanih fibroblasta MRC-5	84
5.2.2.	Efekat karbonskih vlakana na ćelijsku adheziju u kulturi kontinuirane linije humanih fibroblasta MRC-5	85
5.2.3.	Efekat karbonskih vlakana na vijabilnost funkciju ćelija humane makrofagne linije U937	86
5.3.	Nuklearna magnetna rezonanca implantirane zone	96
5.4.	Patohistološka i morfometrijska ispitivanja	104
5.4.1.	Iritacioni indeks kod implantacije karbonskih vlakana u potkožno tkivo	115
5.4.2.	Iritacioni indeks kod implantacije karbonskih vlakana u mišićno tkivo	121
5.4.3.	Poređenje rezultata implantata karbonskih vlakana u potkožnom i mišićnom tkivu	127
5.4.4.	Poređenje rezultata istraživanja standardnih, kiselih i baznih karbonskih vlakana u pogledu vrednosti iritacionog indeksa tkiva prilikom njihove subkutane ili intra-muskularne aplikacije	134
5.4.5.	Histološki izgled parenhimskih organa životinja sa implantiranim KV	142
5.4.6.	Fragmerntacija vlakana – rezultati morfometrijskih ispitivanja	143
5.4.7.	Komparacija rezultata patohistoloških nalaza i nalaza dobijenih na nuklearnoj magnetnoj rezonanci	147
6.	DISKUSIJA	148
7.	ZAKLJUČCI	178
8.	LITERATURA	181

# 1. UVOD

U patologiji i terapiji oboljenja domaćih životinja procesi koji izazivaju defekte tkiva zauzimaju značajno mesto. Do nastanka oštećenja tkiva može doći povredom, dejstvom štetnih noksi ili starenjem. U većini slučajeva organizam je sposoban da nadoknadi nastalo oštećenje. Nekada to nije moguće i tada je potrebno upotrebiti adekvatan materijal kao potporu, matricu ili zamenu nastalog oštećenja. U mnogim slučajevima je zbog nastalog oštećenja tkiva potrebno izvršiti hiruršku intervenciju. Za uspeh hirurške intervencije potrebno je imati dobar plan operacije, instrumente, obučeno osoblje i adekvatne implantate. Ukoliko se vrši implantacija materijala, u fazi planiranja operacije treba definisati, pripremiti i/ili izraditi implantat koji odgovara pacijentu koji se podvrgava operativnom zahvatu i isto tako prilagoditi implantat morfološkim osobenostima tkiva u koji se implantira.

Biokompatibilni materijali se koriste kod zamene ili nadogradnje strukturnih komponenti organizma. U direktnom su kontaktu sa tkivima, ćelijama i telesnim tečnostima organizma, zbog čega moraju imati odgovarajuća svojstva i ispunjavati određene uslove. Rad sa biokompatibilnim materijalima zahteva multidisciplinarni pristup u kome se udružuju napori veterinara, lekara, genetičara, tehnologa i inženjera. Multidisciplinarni pristup povezuje znanja iz tehničkih i biomedicinskih nauka i ima za cilj bolje razumevanje načina kako i na koji način nadomestiti funkcionalni nedostatak organizma implantacijom odgovarajućeg implantata pacijentu, kako bi mu se vratile neophodne funkcije i poboljšao kvalitet svakodnevnog života.

Danas se u medicini koristi niz različitih ugljeničnih materijala od kojih se, komercijalno ili još uvek na eksperimentalnom nivou, proizvode delovi za implanataciju. Karbonska vlakna (KV) su jedna od njih. Ugljenični materijali koriste se u kardiovaskularnoj hirurgiji za izradu srčanih zalistaka, ortopediji [sanacija odlomnih fraktura, zamena delova kosti, hirurgija zglobova (karbonske endoproteze), tetiva i ligamenata (kompletna zamena ili poboljšanje poremećene strukture, elastičnosti i jačine tetiva i ligamenata)], hirurgiji neurokranijuma (sanacija defekta pljosnatih kostiju lica i svoda lobanje), hirurgiji mekih tkiva (rekonstrukcija defekta potkožnog i mišićnog tkiva, hirurgiji hernija – izrada karbonskih mrežica) i stomatologiji (izrada ležišta nosača zuba). Međutim, polje njihove primene stalno se proširuje, pa smo danas svedoci primene karbonskih vlakana i kao materija koji indukuju ćelijski rast u tkivnom inženjerstvu.

Biokompatibilnost KV bila je predmet istraživanja brojnih studija, od vremena njihove prve primene u medicini i veterinarskoj medicini (sedamdesetih godina prošlog veka) pa sve do

danas. Neki od istraživača zaključili su da su KV biokompatibilna i da podstiču rast tkiva. Međutim, neki radovi ne pružaju dovoljno podataka o biokompatibilnosti KV i smatra se da je to jedan od ključnih razloga neuspeha u određenim slučajevima kliničke primene. Različiti stavovi o biokompatibilnosti ovih vlakana mogu se objasniti upotrebom različitih tipova vlakana u pogledu njihovih fizičkih, strukturnih i hemijskih svojstava, što je rezultat mnogih tehnoloških parametara. Pokazano je da ćelijski odgovor na vlaknaste karbonizovane materijale zavisi od stepena kristalizacije materijala. Visokokristalizirana KV sa velikim modulom nisu pogodna za medicinsku upotrebu, dok su amorfna vlakna odlična za implantaciju. Neki radovi su pokazali da toksičnost karbonskih materijala zavisi od dimenzije vlakana i da već nakon 24h u ćelijskim kulturama karbonske nanotube pokazuju povećanu citotoksičnost u poređenju sa karbonskim vlaknima i nanovlaknima. Stoga samo selekcionirani tipovi KV mogu biti izabrani za primenu u humanoj i veterinarskoj medicini. Ukoliko se radi o vrsti biokompatibilnih KV, ona nisu biološki aktivna u onoj meri u kojoj su to biostaklo ili biokeramika, tako da modifikacija površine KV stiže sve veću primenu. Načini modifikacije su različiti, od oblaganja keramičkim česticama hidroksiapatita i porilitičkog karbona radi boljeg prianjanja za okolnu kost, do modifikacije aktivnih hemijskih grupa na površini KV. Da bi se postigla maksimalna iskoristljivost biokompatibilnih osobina ugljenika, potrebno je razviti nove hemijske metode u cilju funkcionalizacije poroznih površina ugljeničnih implantata. Pažljiva oksidacija poboljšava efekat vlaženja pora i povećava broj mikropora i površinu ugljenika. Za oksidaciju ugljeničnih materijala najčešće se upotrebljava koncentrisana ili razblažena azotna kiselina. Oksidacija površine ugljenika azotnom kiselinom je vrlo efikasan proces koji se koristi za stvaranje površinskih funkcionalnih, odnosno karboksilnih grupa. Suprotno tome je tretiranje površine karbonskih materijala bazama, kao što je KOH.

Polazeći od svih napred iznetih činjenica, cilj ove doktorske disertacije bio je da se ispita da li se menja biokompatibilnost (procenjena testovima u *in vivo* i *in vitro* uslovima) tzv. funkcionalizovanih karbonskih vlakana tretiranih bazom ili kiselinom, u odnosu na standardna karbonska vlakna.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. ISTORIJAT – PRVE TRANSPLANTACIJE, PRVE UPOTREBE PRIRODNIH I SINTETSKIH MATERIJALA U TKIVNOJ REGENERACIJI I POJAM BIOMATERIJALA

Ideja o zameni obolelih ili oštećenih delova tela stara je milenijumima. Podaci o transplantaciji životinjskog tkiva na čoveka postoje još iz drevnog Egipta, iz vremena Hipokrata. Šest stotina godina pre Hrista začeta je ideja da autologi kožni režanj može da se upotrebi za nadoknadu odsečenog ili izgubljenog nosa, međutim, tek u šesnaestom veku, 1597. godine, to je pošlo za rukom Gašpareu Tagliakozi (Gaspere Tagliacozzi) i prvim plastičnim hirurzima toga vremena. U hrišćanstvu se veruje da su sveti Kozma i Damjan, vračevi (lekari), besrebrenici i čudotvorci, koji su živeli u trećem veku, svojim darom za isceljenje mogli da uspešno transplantiraju celu nogu. Počev od 17. veka registruje se čitav niz pokušaja presađivanja „slobodnih“ graftova od samog pacijenta ili od drugih donora, ali sve do dvadesetog veka nikad se nije razmišljalo o tome da kalemljenje (tj. transplantacija) može biti bezuspešno. Čak i veliki eksperimentator dr Džon Hanter (John Hunter, 1728 – 1793), škotski lekar, znameniti anatom i jedan od najvećih hirurga svih vremena, koji je transplantirao ljudske zube, nije bio svestan mogućnosti da homograft može da bude bezuspešan. Tek u poslednjoj polovini 20. veka napravljen je konsenzus oko mišljenja da se ishod homografta razlikuje od autotransplantanata [*Huebsch and Monney, 2009; Barker and Markman, 2013*].

Na osnovu relevantnih dokumenata, holandski doktor Džon van Mekren (Job Van Meekren) prvi je 1668. godine transplantirao kost sa životinje na čoveka. On je ispunjavao kranijalne defekte kod jednog vojnika sa komadićima pseće lobanje. Ovakav ksenograft je potom bio zabranjen od strane crkve, da bi se tek krajem XVII veka ponovo napravili uslovi za slične pokušaje. Osnovni problemi koji su nastajali sa upotrebom ksenografta bili su gnojenje, odbacivanje grafta ili sepsa. Škotski hirurg Vilijem Mejsiven (William Macewan) izveo je 1880. godine prvi koštani alograft, kada je zamenio inficirani humerus 4-godišnjeg dečaka sa tibijom uzetom od deteta sa rahitisom. U svojoj publikaciji iz 1914. godine Femajster (Phemister) je istakao važnost „hemostaze, asepsa i prihvatanje stranog materijala“ u uspešnom presađivanju kosti. Naime, Femajster i Albe (Albee) razjasnili su početkom 20. veka važne činioce koji utiču na transplantaciju kosti, utirući put ka današnjim saznanjima o važnosti osteokonduktivnih

skafolda, osteoinduktivnih faktora rasta i osteogenih progenitornih matičnih ćelija u uspešnoj transplantaciji [*Phemister, 1914; Albee, 1923; Williams and Szabo, 2004*].

Upotreba stranih prirodnih materija za obnovu tkiva u organizmu je davno poznata i zabeležena još u zapisima starih civilizacija. Poznato je u istoriji da su se za zamenu izgubljenih tkiva koristile staklene oči, komadići drveta su zamenjivali izgubljene prste, a kamen je korišćen u sanaciji povreda na telu i glavi ljudi i životinja [*Huebsch and Monney, 2009*].

Upotreba sintetičkih materijala u medicini i stomatologiji koja omogućava regeneraciju i funkciju oštećenog tkiva, značajno je narasla u poslednjih 30-40 godina, iako je koncept korišćenja takvih veštačkih materijala vrlo star. Na primer, krajem 19. veka gips je bio prvi zamenik za kost, a zubni ispuni, uključujući amalgam, u upotrebi su od pre više od 150 godina.

Korišćenje gotovih konstrukcija od metala i polimera u ortopedskoj hirurgiji novijeg je datuma i započinje sa radom doktora (kasnije sera) Džona Černlija (Sir John Charnley), ranih 1960-tih, na zamenu kuka oštećenog artrozom [*Jackson, 2012*]. U ovom hirurškom zahvatu poznatom kao totalna artroplastika kuka, odstranjenu glavu bedrene kosti dr Černli je zamenio metalnim implantatom koji je fiksiran sa akrilnim cementom, i koristeći *politetrafluoretilensku* utičnicu (PTFE, poznat kao teflon), umetnuo je implantat u acetabulum. U početku se činilo da je rezultat zadovoljavajući, međutim, godinu dana nakon prvih operacija (oko 1960), postalo je jasno da PTFE nije bio pogodan materijal. To su pokazali znakovi njegovog trošenja i, što je najvažnije, reakcija sa mekim tkivima ovog materijala uzrokovala je formiranje granulomatoznih masa koje su zahtevale naknadnu reoperaciju. Nakon početnog i privremenog obeshrabrenja, dr Černli je počeo da traga za alternativnim materijalima. Vrlo brzo se pokazalo da *polietilen visoke molekularne mase* (engl. High Molecular Weight Polyethylene, HMWP) ima veliki potencijal, i nakon nekoliko testova dr Černli ga ugrađuje prvi put 1962. godine. Pet godina je pažljivo pratio klinički tok i oporavak operisanih pacijenata i kada je bio uveren da je HMWP siguran materijal, objavio je svoje otkriće i pružio mogućnost da ga koriste i drugi hirurzi. Kako je tokom sledećih godina broj operacija značajno povećan, dr Černli je dizajnirao mašinu za automatsku proizvodnju proteza i utičnica, kao i pomagalo koje se koristi pri hodu kod pacijenata sa obolelim kukom pre i posle operacije. Takođe, on je bio uveren da je najbolji način da se reši uspešna proteza u femuru, taj u kome će se koristiti koštani cement u cilju da se imlantat i kost u koju se on umeće dobro "isprepletu". Smatrao je da cement mora da ima neke bitne osobine: mora biti pripremljen bez upotrebe aditiva, mora se znati njegov tačan hemijski sastav i mora biti



sterilizovan s formaldehidom. Cement koji odražava ove osobine ubrzo je proizveden (CMW Laboratories Limited) i nazvan je CMW koštani cement. Doktor Černli je takođe shvatio veliki značaj patohistološkog pregleda veštačkih kukova pacijenata koji su umrli nekoliko godina nakon operacije, kako bi se dobio uvid u trošenje materijala i promene u tkivima i na taj način omogućilo poboljšanje u postupku transplantacije [Charnley, 1974]. Totalna artroplastika kuka, zahvaljujući ovom velikanu medicine, doživela je kasnije neverovatan napredak uvođenjem mnoštva novih materijala i novih dizajna za implantaciju kuka, a to je sada na raspolaganju ne samo za kukove, već i za kolena i prste.

U prvoj polovini dvadesetog veka, prirodno dobijeni materijali počeli su da se intenzivno zamenjuju sintetskim polimerima, keramikom i metalnim legurama, koji daju bolje performanse, povećavaju funkcionalnost i lakše se obnavljaju u odnosu na svoje prirodne „partnere“. Ti pomoci su doveli do spasavanja i poboljšanja kvaliteta života miliona ljudi, jer su zahvaljujući biomaterijalima pre svega poboljšani medicinski uređaji kao što su vaskularni stentovi, zubni ispuni, veštački kukovi, kontaktna sočiva itd. Na temelju takve njihove početne primene, biomaterijali su bili definisani kao vrsta materijala koji se koriste za izradu medicinskih uređaja. Kako je cilj primene takvih materijala pre svega njihova mehanička funkcija, kako bi se spriječilo biološko odbacivanje bilo je poželjno da budu „inertni, a ne u biološkoj interakciji s organizmom domaćina [Ratner and Bryant, 2004].

Međutim, nagli razvoj molekularne biologije počev od 1970-ih i napredak u genomici i proteomici u 1990-im i 2000-im godinama, značajno je uticao na način na koji se biomaterijali danas osmišljavaju i koriste. Specifični molekuli uključeni u fiziološki značajne procese (kao što je na primer, koštani morfogeni protein – BMP uključen u osteogenezu), počeli su da se ugrađuju u materijale kao bioaktivne komponente. Takvi kombinovani proizvodi, koji su u kontaktu direktno sa ćelijama i tkivima, kroz dobro definisane molekularne puteve za usmeravanje bioloških odgovora, već predstavljaju stanje tehnike komercijalnih proizvoda. Takvi su npr. *ehuirajući vaskularni stentovi* i *Medtronikov uređaj za koštani graft (INFUSE Bone Graft device, Medtronic, Burlington, Massachusetts)*. Ovaj poslednji uređaj, koji kombinuje sintetske komponente s BMP (tj. tradicionalnu protetsku komponentu – čelični kavez, s jedne strane, i naprednu komponentu koja je rezultat tkivnog inženjerstva – sunderasti goveđi kolagen tipa 1 u kome je utopljen BMP, s druge strane), omogućava stabilnost tkiva kičmenog stuba za vreme regeneracije, a godišnja prodaja danas mu doseže milijardu dolara [Huebsch and Monney, 2009].

Za razliku od većine sintetskih materijala, materijali koji se koriste u živim sistemima često su multifunkcionalni i dinamični. Sami materijali i biofizički procesi uključeni u njihov nastanak su stalno polje za inspirativno oblikovanje i sintezu novih vrsta sintetičkih materijala koji su potencijalno korisni u širokom rasponu medicinskih i nemedicinskih aplikacija [Čolić, 2007; Huebsch and Monney, 2009].

**Izraz biomaterijali** nastao je 1967. godine na Prvom međunarodnom simpozijumu o biomaterijalima koji je održan na Univerzitetu Klimson (Clemson University), u Južnoj Karolini (SAD). Pojam biomaterijal ima mnogo značenja i opredeljenje za jedno od njih uvek je restriktivno, jer je jednom definicijom nemoguće obuhvatiti na pravilan način sve uređaje i sintetske materijale namenjene upotrebi u humanoj i veterinarskoj medicini i stomatologiji. Prema prvim definicijama biomaterijala, pojam se odnosio na materijale koji se koriste za izradu medicinskih uređaja i koji su bioinertni. Ova definicija usvojena je konsenzusom na konferenciji Evropskog društva za biomaterijale, koja je održana u Česteru (Chester), u Velikoj Britaniji, 1987. godine, i od tada je široko prihvaćena. Ta definicija odražavala je tadašnji veliki pomak u izradi sintetskih materijala namenjenih izradi medicinskih instrumenata i pomagala. Međutim, kako se polje istraživanja i tehnološke izrade pomeralo sve više ka biomaterijalima namenjenim regeneraciji i reparaciji tkiva, tj. nadoknadi oštećenih i izgubljenih tkiva i organa, tako je i ova definicija trpela izmene i podvrgnuta je mnogobrojnim modifikacijama.

Mi ćemo, s obzirom na temu ove doktorske disertacije, usvojiti definiciju da su ***biomaterijali bilo koji sintetski materijali koji se koriste za zamenu ili vraćanje funkcija oštećenim i izgubljenim tkivima i u stalnom su ili privremenom dodiru sa telesnim tečnostima.*** Ova definicija je nešto ograničavajuća, jer ne uključuje materijale koji se koriste za uređaje poput hirurških ili stomatoloških instrumenata. Takođe, isključeni su i materijali koji se koriste za spoljašnje proteze, poput veštačkih udova ili slušnih aparata. Ti materijali nisu izloženi telesnim tečnostima. Izloženost telesnim tečnostima obično podrazumeva da se biomaterial nalazi u unutrašnjosti tela, a to nameće nekoliko strogih ograničenja materijalima koji se mogu koristiti. Prvo i najvažnije, biomaterijal mora biti biokompatibilan. Osim toga, mora biti netoksičan, nealergen i nekancerogen. Biomaterijal treba da ima odgovarajuća fizička i mehanička svojstva, naročito ukoliko služi za augmentaciju (povećanje) ili zamenu tkiva. Njegova proizvodnja treba da obezbedi različite oblike i forme, da izrada ima relativno nisku cenu i da je lako dostupan [[www.asminternational.org](http://www.asminternational.org)].

## 2.2. UGLJENIČNI (KARBONSKI) MATERIJALI

Pod **ugljeničnim (karbonskim) materijalima** podrazumevamo materijale od elementarnog ugljenika, što znači da se isključuju jedinjenja ugljenika sa drugim elementima. Od elementarnog ugljenika građeni su grafit i dijamant, fulereni, ugljenične nanocevi, karbini i karbolajt [*Marinković i sar., 1999*].

Pod **savremenim karbonskim materijalima** podrazumevaju se sve prirodne i sintetičke supstancije koje se sastoje uglavnom od atoma ugljenika i imaju strukturu grafita (tj. ravne ugljenične slojeve – grafenske ravni), ili se bar sastoje od dvodimenzionalno uređenih slojeva ugljenikovih atoma. Veze među atomima ugljenika unutar grafenskog sloja su vrlo jake i teško se kidaju. Za razliku od njih, veze među slojevima su vrlo slabe, pa slojevi lako mogu da se pomeraju i razdvajaju, usled čega se struktura grafita veoma lako *kvari*, tako da umesto idealnog rasporeda atoma, vrlo često postoji struktura sa mnogo različitih defekata. Međuatomske veze između grafenskih slojeva čine da on bude jako anizotropan, tj. da u različitim pravcima ima različite osobine. Zahvaljujući anizotropnosti i prisustvu defekata, omogućeno je stvaranje niza novih materijala koji u osnovi imaju strukturu grafita, ali se međusobno razlikuju u stepenu anizotropije i prisustvu različitih defekata u strukturi [*Marinković i sar., 1999*].

**Karbonska vlakna - KV** (engl. Carbon Fibres, CF), ili ugljenična, ili grafitna vlakna, su vlakna promera oko 5-10  $\mu\text{m}$ , koja se sastoje uglavnom od ugljenikovih atoma. Za proizvodnju grafitnih vlakana, ugljenikovi atomi povezani su zajedno u kristale koji su više ili manje paralelno postavljeni na uzdužnu osovinu vlakana, tako da ovakvo usklađivanje kristala čini da je vlakno velike čvrstine u odnosu na volumen (što ga praktično čini jačim u odnosu na veličinu). Nekoliko hiljada karbonskih vlakana grupisanih za vuču, mogu se koristiti kao takva ili u obliku fabrički proizvedene tkanine.

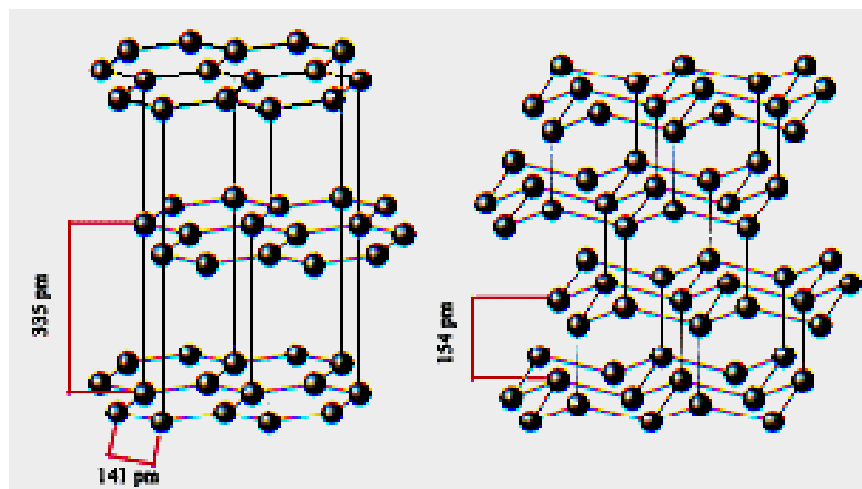
Svojstva karbonatnih vlakana, kao što su velika krutost, otpornost (čvrstoća) na istezanje, mala težina, visoka hemijska otpornost, tolerancija na visoke temperature i niska ekspanzija prilikom zagrevanja, učinila su ih vrlo popularnim u vazduhoplovstvu, građevinarstvu, vojnoj i automobilskoj industriji, sportskim takmičenjima i slično. Međutim, ona su relativno skupa u poređenju sa sličnim vlaknima, kao što su staklena ili plastična vlakna, što na određeni način ograničava njihovu upotrebu.

Ugljenična vlakna se obično kombinuju s drugim materijalima i tako nastaju kompoziti. U kombinaciji s plastičnom smolom nastaje polimer sa karbonskim vlaknima kao ojačanjem (često se označava samo kao karbonsko vlakno), koji ima vrlo velik odnos snage prema težini vlakna, a izuzetno je krut i pomalo krt. Međutim, karbonska vlakna takođe se kombinuju s drugim materijalima, kao što su grafit, pa se dobijaju kompoziti ugljenik-ugljenik, koji imaju vrlo visoku toleranciju na zagrevanje.

## 2.2.1. Grafit

### Struktura i osobine grafita

Atom ugljenika ima četiri valentna elektrona – dva  $s$  (nespareni elektroni) i dva  $p$  (spareni elektroni). Normalna valencija ugljenika je četiri iako ima samo dva nesparena elektrona; razlog tome je taj što jedan od  $s$  elektrona prelazi u stanje  $p$  (sa nešto većom energijom), čime se dobijaju četiri nesparena elektrona, koji sada kruže u četiri elektronske orbitale – tri  $p$  i jedna  $s$ . Takozvana *hibridizacija* orbitala čini da od  $s$  i  $p$  orbitala nastaju nove, kombinovane orbitale. Ako sve četiri elektronske orbitale učestvuju u hidridizaciji (tzv. hibridizacija  $sp^3$ ), nastaju četiri međusobno  $\sigma$ -orbitale, ekvivalentne sa tetraedarskim rasporedom u prostoru [Marinković i sar., 1999]. Ovaj tip hibridizacije karakterističan je za strukturu dijamanta (slika 2.1., desno).



Slika 2.1. Kristalne strukture grafita (levo) i dijamanta (desno) sa hibridizovanim orbitalama.

(<http://www.carbonfiber.gr.jp/english/tech/faq/#1> n.d; Marinković i sar., 1999)

Kada u hibridizaciji učestvuju tri od četiri orbitale, dobijaju se tri ekvivalentne  $\sigma$ -orbitale, sve u istoj ravni koje međusobno zaklapaju ugao od  $120^\circ$ . Četvrti elektron daje  $\pi$ -orbitalu usmerenu pod pravim uglom na ravan  $\sigma$ -orbitala. Ovaj tip hibridizacije, koji se označava kao  $sp^2$ , tipičan je za strukturu grafita (slika 2.1., levo), u kojoj je svaki atom vezan za tri susedna, gradeći ravne slojeve sa heksagonalnim rasporedom atoma u njemu. U strukturi grafita atomi unutar slojeva su međusobno vezani čvrstim  $\sigma$ -vezama, dok su slojevi međusobno vezani  $\pi$ -vezama koje su slabije od  $\sigma$ -veza. Unutar sloja atomi su međusobno udaljeni 0,141 nm, a najbliži atomi iz susednih slojeva su na rastojanju od 0,335 nm. Ravni slojevi u grafitu su dakle međusobno slabo vezani, i relativno samostalni, zbog čega se nazivaju grafeni. S obzirom da su veze između atoma unutar slojeva grafita vrlo jake, one se teško kidaju. Na drugoj strani, veze između slojeva su slabe van der Waalsove (*van der Waals*) veze, zbog čega se one lako razdvajaju i slojevi klize jedan preko drugog što čini grafit mekim. Zbog pomeranja slojeva, oni nisu uvek pravilno postavljeni kao u idealnom grafitu, pa se u njemu prave defekti pakovanja. Ako takvih defekata ima mnogo, onda je to karbon [Marinković i sar., 1999; <http://www.carbonfiber.gr.jp/english/tech/faq/#1> n.d].

Razlike u strukturi dijamanta i grafita određuju i razliku u njihovim osobinama. Grafit je čvrst, mek, sa osobinama čvrstog maziva i proizvodi elektricitet, dok je dijamant prozračan, izvanredno tvrd i odličan izolator. Dijamant je izotropan, a grafit je izvanredno anizotropan.

Moguće je da samo dva od četiri elektrona iz atoma ugljenika učestvuju u hibridizaciji (hibridizacija  $sp$ ), formirajući dve ekvivalentne  $\sigma$ -orbitale, obe na jednoj pravoj, dok preostala dva elektrona daju dve  $\pi$ -orbitale, koje su pod pravim uglom i međusobno i prema  $\sigma$ -orbitalama. Alotropna modifikacija elementarnog ugljenika sa „lančanim“ vezama kakve odgovaraju ovom tipu hibridizacije su **karbini**, kasnije nađeni u meteoritima, kao i tzv. **karbolajt**, supstancija dobijena prvi put 1995. godine pri pokušaju sinteze karbina [Marinković i sar., 1999].

### **Prirodni i sintetički grafit**

Idealnoj strukturi grafita je najpribližniji prirodni grafit, kod koga, zavisno od nalazišta, čistoća, verličina kristala i osobine jako variraju. Za razliku od prirodnog, industrijski grafit se sastoji od velikog broja sitnih kristalita usmerenih u svim mogućim pravcima.

## Defekti u strukturi grafita – karboni

Zbog lakog pomeranja slojeva, u grafitu vrlo često postoje defekti pakovanja, što znači da slojevi nisu međusobno pravilno postavljeni kao u idealnom grafitu. Ako takvih defekata pakovanja ima mnogo, onda se za takav karbon (jer nije više grafit) kaže da ima *turbostatičku strukturu*. Karbon se može dobiti iz mnogo različitih supstancija koje sadrže ugljenik procesom karbonizacije, pri kome zagrevanjem u inertnoj atmosferi iz tih supstancija odlaze drugi elementi. Proces karbonizacije je donekle sličan sa procesom ugljenisanja, pri kome u prirodi nastaje ugalj od drveća i drugog rastinja. Razlika je u tome što je karbonizacija brza (njeno trajanje se meri satima) i vrši se pri visokoj temperaturi (do i preko  $1.000^{\circ}\text{C}$ ), dok je ugljenisanje spor proces (traje hiljadama godina) koji se vrši na niskoj temperaturi. Proces karbonizacije je obično čist, tj na ovaj način dobijeni karbon sadrži malo drugih elemenata pored ugljenika. Važno je napomenuti da razlikujemo grafitabilne i negrafitabilne karbone, s obzirom da se od nekih karbona može dobiti grafit zagrevanjem do preko  $2.500^{\circ}\text{C}$ , dok se od drugih grafit ne dobija čak ni pri najvišim temperaturama [Marinković i sar., 1999].

U grafitu, a pogotovo u karbonu, postoje još i razni drugi defekti: 1) ivični (tj. defekti na krajevima slojeva), koji potiču od nezasićenih veza atoma – te veze se najčešće zasite vezivanjem stranih atoma ili atomskih grupa (OH, O itd.); 2) defekti u heksagonalnoj strukturi slojeva (npr. kada nedostaje neki atom ugljenika), 3) defekti izomernih veza, gde neki atomi nemaju hibridizaciju  $sp^2$  tipičnu za grafit nego hibridizaciju  $sp^3$ ; 4) hemijski defekti, tj. ugrađivanje stranih atoma u kristalnu rešetku; 5) promena orijentacije grupe ugljeničnih slojeva. Često jedan tip defekta sa sobom povlači nastajanje drugog; npr. defekt u strukturi slojeva ima za posledicu defekte pakovanja, a promene u orijentaciji grupe slojeva mogu da dovedu do stvaranja pora [Marinković i sar., 1999].

## 2.3. KARBONSKA VLAKNA

Industrijski grafit je mek i ne odlikuje se dobrim mehaničkim osobinama. U njegovoj strukturi, unutar grafenskih slojeva, veze su izuzetno čvrste. Da bi se ova osobina iskoristila napravljen je **jednodimenzionalni materijal u obliku vlakna, u kojem su slojevi usmereni u pravcu ose vlakna**. Dužina vlakna daleko prevazilazi druge dve dimenzije, pa se može govoriti o jednodimenzionalnom materijalu. Pošto su grafenski slojevi paralelni osi, vlakno ima izuzetnu

čvrstinu u tom pravcu, dok druge slabe veze, takođe prisutne i usmerene upravno na osu vlakna, ne dolaze do izražaja. Pošto karbonska vlakna spadaju u najčvršće danas korišćene materijale, koriste se kao ojačanje kompozitnih konstrukcionih materijala [Marinković i sar., 1999].

Postoje dva osnovna konstrukciona kompozitna materijala sa karbonskim vlaknima kao ojačanjem. Jedno su kompoziti sa polimernom, a drugo sa karbonskom osnovom. Potencijal koji nude karbonska vlakna potpuno se može iskoristiti samo u kompozitima sa karbonskom osnovom, koji se primenjuju kao frikcioni (za kočnice aviona) ili konstrukcioni materijali (raketni motori, delovi kosmičkih letilica) izloženi najvišim temperaturama (preko 2.500<sup>0</sup>C). Ipak, visoki troškovi njihove proizvodnje čine da je primena kompozita sa polimernom osnovom daleko veća i raznovrsnija. Kompoziti sa polimernom osnovom koriste se najviše u vazduhoplovstvu i za sportsku opremu [Marinković i sar., 1999].

### **2.3.1. Istorijat karbonskih vlakana**

Karbonska vlakna su upotrebljena prvi put u sijalicama, 1860. godine, od strane Džozefa Svona (Swan Joseph). Godine 1879. Tom Edison (*Thomas Edison*) je zagrevao pamučna vlakna ili bambusove stabljike pri visokim temperaturama i uspeo da ih karbonizuje u vlakna kompletno sastavljena od atoma ugljenika, koja su upotrebljena u prvim sijalicama u kojima se sijalična nit grejala na struju. Godine 1880, Luis Satimer (*Lewis Latimer*) unapredio je ovu metodu.

Rodžer Bekon (Roger Bacon) je 1958. godine stvorio karbonska vlakna sa visokim performansama u Jedinici za karbide Parma tehničkog centra (*Union Carbide Parma Technical Center*), sada Internacionalni holding GrafTek (*GrafTech International Holdings, Inc.*), koji se nalazi pored Klivlenda, Ohajo. Ta vlakna proizvedena su karbonizacijom pramenova rajona. Međutim, ovaj postupak pokazao se kaoneefikasan, jer su dobijena vlakna sadržala samo oko 20% ugljenika i imala su malu čvrstoću i krutost. Ubrzo posle toga, ranih 1960-ih, proces je razvio dr Akio Šindo (*Akio Shindo*) u Agenciji industrijske nauke i tehnologije Japana (*Agency of Industrial Science and Technology of Japan*) polazeći od poliakrilonitrila (PAN) kao početne sirovine. Pri tome su proizvedena ugljenična vlakna koja su sadržala oko 55% ugljenika. Godine 1960. Ričard Milington (*Richard Millington*) iz Kompanije za staklasta vlakna H. I. Tompson (*H.I. Thompson Fiberglas Co.*) patentirao je postupak za proizvodnju karbonskih vlakana sa sadržajem ugljenika od 99% (*US Patent No. 3.294.489*), koristeći kao sirovinu vlakna rajona. Ova ugljenična vlakana imala su dovoljnu čvrstoću (modul elastičnosti i čvrstoću na istezanje) koja

će biti iskorišćena kao pojačanje za kompozite koji imaju svojstvo velike čvrstoće u odnosu na težinu i otporni su na delovanje visoke temperature. Prvi put je velika potencijalna snaga karbonskih vlakana praktično upotrebljena 1963. godine u postupku koji su razvili Vat (W. Watt), Filips (L. N. Phillips) i Džonson (W. Johnson) na *Royal Aircraft Establishment at Farnborough*, u Hampširu (Hampshire), Velika Britanija. Proces je patentiran od strane Ministarstva obrane Velike Britanije, a zatim licenciran od strane tri britanske kompanije: *Rolls-Royce*, *Morganite* i *Courtaulds*. U roku od nekoliko godina nakon uspešne primene, 1968. godine od Hyfil-ugljeničnih vlakana sklapa se ventilator, a Rols-Rojs je iskoristio prednost svojstava novih materijala da se probije na američko tržište sa svojim RB-211-motorima za avione koji su imali lopatice kompresora izgrađene od karbonskih vlakana. Nažalost, lopatice su se pokazale osetljivim na oštećenja od udara ptica. Ovaj problem, zajedno sa nekim drugim, izazvao je Rols-Rojsu takve nedaće da je fabrika nacionalizovana 1971. godine, a prouzvodni pogon karbonskih vlakana je rasprodat kao „*Bristol Composites*” [<http://www.carbonfiber.gr.jp/english/tech/faq/#1n.d>].

U kasnim 1960-im, Japanci su preuzeli vođstvo u proizvodnji ugljeničnih vlakana dobijenih od PAN. Sporazum iz 1970. godine o zajedničkoj tehnologiji između Japana i SAD, omogućilo je da *Union Carbide* preuzme izradu vrhunskih proizvoda japanske *Toray Industries*, pa su ove dve države postale dominantne na tržištu. Kompanija *Morganite* iz Velike Britanije odlučila je da je proizvodnja karbonskih vlakana marginalna u odnosu na njeno osnovno poslovanje, ostavljajući *Courtaulds* kao jedinog velikog proizvođača karbonskih vlakana u Velikoj Britaniji. *Courtaulds* je danas dominantan na tržištu po avio-opremi i sportskoj opremi. Međutim, iako su niska cena i dostupnost bile u početku potencijalna prednost ove kompanije, anorganski proces na bazi vode koji se koristio za proizvodnju, učinio je proizvod osetljivim na nečistoće. Ipak, tokom 1980-ih *Courtaulds* je i dalje glavni dobavljač ugljeničnih vlakana za tržište sportske opreme, a *Mitsubishi* je bio glavni kupac. Ipak, poslovni potez koji je imao za cilj proširenje, uključujući i izgradnju postrojenja za proizvodnju u Kaliforniji, nije bio uspešan. Investicija nije dovela do očekivanog profita, što je rezultiralo odlukom da se kompanija povuče sa tog područja i u *Courtaulds* je 1991. godine prestala proizvodnja ugljeničnih vlakana. Ironično je da je jedini preživeli proizvođač karbonskih vlakana u Velikoj Britaniji i dalje napredovao u izradi vlakana na temelju svog prethodnika *Courtaulds*. Taj proizvođač, *Inverness-based RK*



*Carbon Fibres Ltd.* usmerio je proizvodnju ugljeničnih vlakana za industrijsku primenu [<http://www.carbonfiber.gr.jp/english/tech/faq/#1> n.d].

Tokom 1960-ih, eksperimentalnim radom došlo se do pronalaska alternativnih sirovina, što je dovelo do primene KV izrađenih od sirovina dobijenih preradom nafte. Ova vlakna sadrže oko 85% ugljenika i imaju odličnu čvrstoću na savijanje. Takođe, u tom razdoblju, japanska vlada snažno je podržala nacionalnu proizvodnju KV i nekoliko japanskih fabrika, kao što su *Toray*, *Nippon Carbon*, *Toho Rayon* i *Mitsubishi* ponovo su započele svoj vlastiti razvoj i proizvodnju. Paralelno sa tim, razvijale su se i fabrike u SAD i u Evropi, i danas su vodeće kompanije za proizvodnju KV u SAD *Hercules*, *BASF* i *Celanese*, a u Evropi je to *Akzo* [<http://www.carbonfiber.gr.jp/english/tech/faq/#1> n.d].

Od kasnih 1970-ih, na globalnom tržištu nalaze se KV s većom čvrstoćom na istezanje i s većim modulom elastičnosti. Na primer, T400 proizvođača *Toray* imaju čvrstoću na istezanje od 4000 MPa, a M40 su s koeficijentom od 400 GPa. Intermedijarna KV, kao što je IM 600, proizvođača *Toho Rayon* imaju čvrstoću do 6000 MPa. Karbonska vlakna iz *Toray*, *Celanese* i *Akzo* pronašla su svoj put do primene u avionskoj industriji, od sekundarnih do primarnih osnovnih delova, prvo u vojsci, a kasnije u civilnim avionima, kao što su *McDonnell Douglas*, *Boeing* i *Airbus* avioni. Takođe, u toku 1970-tih pronađene su alternativne sirovine za proizvodnju KV dobijene preradom nafte. Ova vlakna sadrže oko 85% ugljenika i imao odličnu čvrstoću na savijanje. Nažalost, zbog ograničene snage kompresije nisu široko prihvaćena.

Počev od 2000. godine, industrijska primena karbonskih vlakana za visoko sofisticirane mašinske delove u srednjoj Evropi postaje sve važnija. Treba posebno naglasiti da se kapacitet proizvodnje karbonskih vlakana u svetu značajno povećao počev od 2000. godine, budući da su pušteni u rad glavni proizvodni pogoni u Turskoj, Kini i Južnoj Koreji [<http://www.carbonfiber.gr.jp/english/tech/faq/#1> n.d].

## **2.3.2. Struktura karbonskih vlakana**

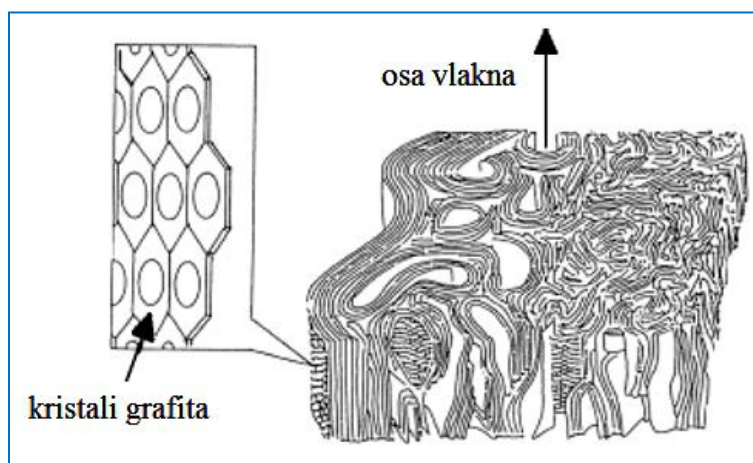
### **Osnovna struktura karbonskih vlakana**

Karbonska vlakna najčešće su dostupna u obliku kontinuiranog svitka namotanog na kalem. Kalem od karbonskih vlakana je snop od hiljade kontinuiranih pojedinačnih vlakana ugljenika koja se drže zajedno i zaštićena su obično sa organskim slojem, kao što su polietilen-oksidi (PEO) ili polivinil-alkohol (PVA). Veličina vlakana u kalemu takođe može da bude mera

zaštite. U cilju upotrebe, svitak od vlakana može da se uspešno odmota sa kalema. Svaki karbonski filament u svitku je kontinuirani cilindar s dijametrom od od 5-10  $\mu\text{m}$ , a sastoji se gotovo isključivo od ugljenika. Najranije generacije karbonskih vlakana (npr T300, HTA i AS4) imale su dijametar od 16-22  $\mu\text{m}$ . Kasnije su proizvedena vlakna (npr. IM6 ili IM600) koja imaju dijametar od oko 5  $\mu\text{m}$  [Marinković, 1999].

Već je ranije istaknuto da je atomska struktura KV slična onoj u grafitu, koji se sastoji od listova ugljenikovih atoma koji su raspoređeni na heksagonalan način (grafenski listovi/slojevi), s tom razlikom što se duž grafenskih slojeva u KV nalaze razmaci. Grafit je kristalni materijal u kojem se grafenski slojevi slažu međusobno paralelno, u pravilnim nizovima. Grafit ima uređene grafenske slojeve čija je pojedinačna čvrstoća velika, dok su veze između atoma veoma jake. Slojevi su međusobno vezani slabim intermolekularnim silama (van der Valsove sile), zbog čega se lako pomeraju jedan u odnosu na drugi i koje daju grafitu meke i lomljive karakteristike. Zatezanjem grafitnih vlakana dolazi do uzajamnog klizanja slojeva [Marinković, 1999].

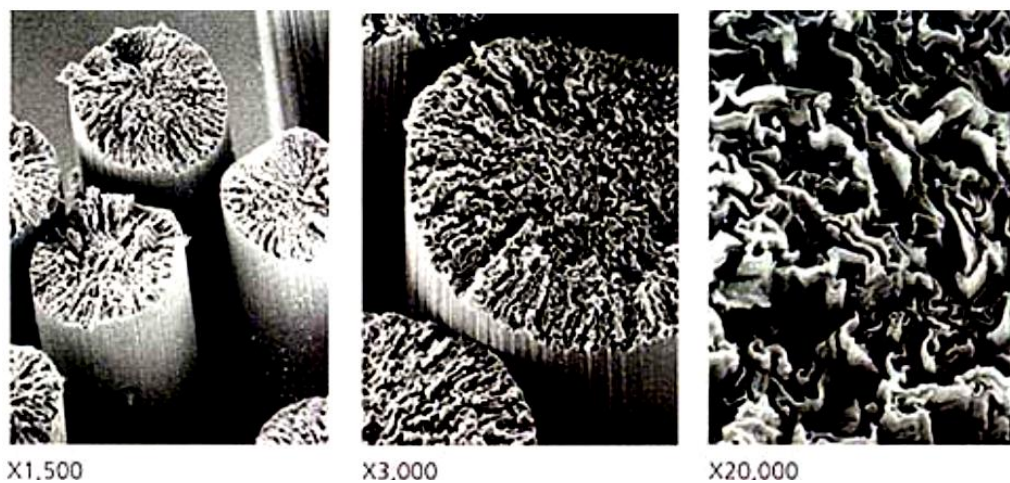
Za razliku od grafita, karbonska vlakna sadrže defekte u pakovanju što rezultira povećanim rastojanjem između grafenskih slojeva na mestima gde se defekti nalaze (0,335 na 0,344 nm). Slojevi su zbog toga talasasti, jer na mestima defekata dolazi do savijanja. Prilikom zatezanja karbonskih vlakana klizanje između slojeva je otežano, čime je čvrstoća povećana [Marinković, 1999].



Slika 2.2. Trodimenzionalni model strukture visokočvrstih vlakana dobijenih od PAN.  
(Fitzer, 1985; <http://www.torayca.com/en/techref/index.html> n.d.)

Zavisno od materijala iz kojih se dobijaju (tj. prekursora), karbonska vlakna mogu biti *turbostratična* i *grafitna*, ili imaju *hibridnu strukturu* u kojoj su prisutni i grafitni i turbostratični delovi. U turbostratičnim karbonskim vlaknima listovi ugljenikovih atoma nasumično su presavijeni ili zgužvani zajedno. Ugljenična vlakna dobijena od PAN su turbostratična (slika 2.2), dok su karbonska vlakna dobijena iz tzv. mezofaze nakon toplotne obrade na temperaturama većim od 2200°C, grafitna. Turbostratična karbonska vlakna imaju veliku čvrstoću na istezanje, dok ona dobijena iz mezofaze imaju velik Jungov (Young) modul (odnosno, visoku krutost i otpornost na širenje pod opterećenjem) i veliku toplotnu sprovodljivost.

Tipična struktura karbonskih vlakana dobijenih iz PAN prikazana je na slici 2.3. Spoljašnji deo vlakana pokazuje relativno visoku uređenost i orijentaciju grafenskih slojeva. Trake sačinjene od skupa grafenskih slojeva, u unutrašnjosti se savijaju, uvrću, i razdvajaju, ali ostaju pretežno paralelne osi vlakna. Karbonska vlakna dobijena iz PAN pokazuju veći stepen neuređenosti na poprečnom nego na uzdužnom preseku (slika 2.3).

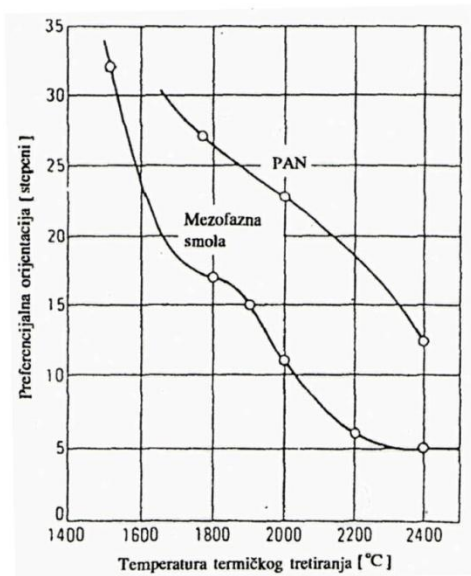


Slika 2.3. Poprečni presek karbonskih vlakana.  
[Bunsell, 1988]

Kao što je već istaknuto, zatezni modul karbonskih vlakana (modul elastičnosti, Jungov modul) zavisi od stepena preferencijalne orijentacije grafenskih slojeva paralelno osi vlakna, dok na čvrstoću, pored toga što ona zavisi od aksijalne i radijalne teksture, jako utiču defekti prisutni u strukturi. Razlika između čvrstoće i Jungovog modula je u tome što je čvrstoća sila koju treba upotrebiti da bi došlo do razaranja materijala, dok je modul elastičnosti mera sposobnosti materijala da se suprotstavi deformaciji pod dejstvom sile. Kad se radi o modulu zatezanja vlakana, jasno je da će se vlakna najjače suprotstavljati istezanju ako su ugljenični slojevi u njima

dobro uređeni. Stoga postoji jasna korelacija između preferencijalne orijentacije i Jungovog modula: grafitna vlakna od mezofazne smole imaju najjači modul elastičnosti, potom slede karbonska vlakna od mezofazne smole, visokotemperaturna vlakna od PAN i na kraju niskotemperaturna vlakna od PAN [Marinković, 1999].

Zavisnost preferencijalne orijentacije vlakana od temperature termičkog tretiranja prikazana je na grafikonu 2.1. Karbonska vlakna dobijena od PAN i od mezofazne smole pokazuju sličan tok krivih, ali je kriva za PAN pomerenka ka višoj temperaturi za nekih 400°C.



Grafikon 2.1. Zavisnost preferencijalne orijentacije vlakana od temperature termičkog tretiranja i polaznog materijala [Savage, 1993]

### Poroznost karbonskih vlakana

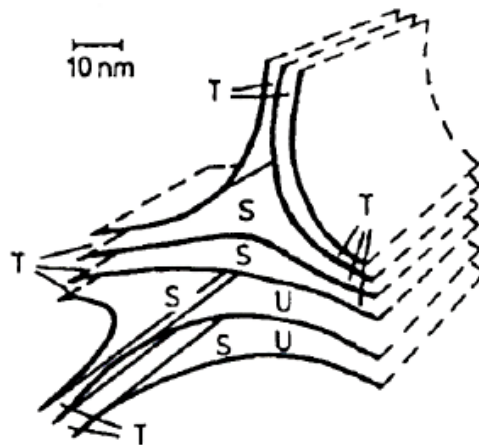
Ugljenični materijali poseduju specifičnu površinu i visok stepen površinske aktivnosti. Vrednosti specifične površine ovih materijala se nalazi u okvirima od 500 do 1400 m<sup>2</sup>/g, mada je poznato da specifična površina aktivnog uglja može imati vrednost i veću od 2500 m<sup>2</sup>/g. Veličina specifične površine je posledica prisustva pora različite veličine.

Pore se obično karakterišu svojom širinom, što znači prečnikom za pore cilindričnog preseka, odnosno rastojanjem između dve strane za pore oblika proreza. Dubinin (1960) je na osnovu toga predložio sledeću klasifikaciju pora (tabela 2.1), koja je kasnije usvojena od strane IUPAC-a (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) [Vukčević, 2013].

Tabele 2.1. Klasifikacija pora prema širini

Klasifikacija pora	Širina pora
Mikropore	Manje od ~2 nm
Mezopore	Između ~2 i 50nm
Makropore	Više od~50nm

Granulisani aktivni ugalj sadrži sve tri vrste pora dok se ugljenična vlakna odlikuju uglavnom mikroporama (slika 2.4).



Slika 2.4. Model strukture mikroporoznih karbona [Ermolenko, 1990].

U-ultramikropore (0,35-0,6nm); S-supermikropore (0,6-2nm); T-rastojanje između slojeva u grafitu (manje od 0,34nm)

Prisustvo mikropora na molekularnom nivou je osnovna adsorpciona karakteristika vlaknastih karbonskih materijala. Mikropore se mogu predstaviti sistemom finih, uzanih (*slit-like*) pora između grafenskih slojeva. Ultramikropore (U) čine uzani paralelni prostori dimenzija 0,35-0,6 nm; supermikropore (S) su širi paralelni i neparalelni prostori dimenzija 0,6-2,0 nm, dok niskotemperaturski karboni pokazuju i mali broj rastojanja čije dimenzije odgovaraju rastojanjima između slojeva u grafitu (T) dimenzija manjih od 0,34 nm. Pri aktivaciji, sagorevanjem zidova koji razdvajaju manje mikropore, stvaraju se supermikropore u kojima dolazi do povećanja adsorpcionog potencijala usled preklapanja polja sila suprotnih zidova pora. Potencijal interakcije u mikroporama je mnogo veći nego u porama veće širine, zbog blizine zidova pora [Vukčević, 2013].

### **Tretiranje površine karbonskih vlakana**

Karbonska vlakna, naročito visokomodulna, imaju „glatku“ površinu, sa veoma malo nesparenih veza i stoga se vrlo teško vezuju sa polimerima. To važi i za epoksidne smole koje predstavljaju najvažniju osnovu kompozita karbonsko vlakno-polimer. Ako je veza vlakno-osnova, pa prema tome i adhezija, slaba, mehaničko naprezanje se neće prenositi sa osnove na vlakno. Takav kompozit je vrlo slab. Dakle, da bi se iskoristile velike mehaničke osobine vlakana, neophodno je povećati adheziju vlakno-osnova. To se ostvaruje promenom površinskog stanja vlakana, bilo uvođenjem funkcionalnih površinskih grupa, koje bi omogućile vezu sa atomima ugljenika iz smole, ili „ogrubljivanjem“ površine koje bi pomoglo da se ostvari mehanička veza sa smolom [Marinković, 1999].

Među mnogim metodama tretiranja površine vlakana, najvažnije su metode oksidacije koje se vrše kiseonikom iz vazduha sa ili bez dodataka ( $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{O}_3$ ), vodenim rastvorima oksidanasa ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{HClO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{Cr}_2\text{O}_4$ ), ili elektrohemijском (anodnom) oksidacijom koja je posebno pogodna za kontinualne industrijske procese. Današnje metode tretiranja površine vlakana, kakve se koriste u industrijskoj proizvodnji, omogućuju povećanje adhezije, koja čini da se čvrstoća kompozita na smicanje poveća 2-4 puta, što povećava zateznu čvrstoću kompozita do visokih vrednosti [Marinković, 1999].

Pored poboljšanja veze vlakno-osnova, potrebna je i zaštita vlakana od oštećenja do kojih može da dođe pri manipulisanju vlaknima. Kao zaštita koriste se tanke prevlake koje se obično nanose na vlakna pre transporta. Prevlake, koje su podešene za kombinacije vlakana sa najčešće korišćenim epoksidnim smolama, sprečavaju abraziju vlakana, olakšavaju manipulisanje i obezbeđuju kompatibilnost sa smolama [Marinković, 1999].

### **Površinske grupe aktivnih karbonskih vlaknastih materijala**

Pri apsorpciji neorganskih i organskih polarnih materijala, pored struktura pore, od izuzetnog je značaja i hemijska priroda površine aktivnih karbona/karbonskih materijala. Zbog delimično uređene aromatične strukture, defekti u strukturi predstavljaju aktivna mesta na površini materijala na kojima atomi ugljenika stupaju u reakciju sa različitim atomima prisutnim u okolini, najčešće sa kiseonikom i vodonikom. Kao rezultat nepotpune karbonizacije polaznog materijala, ili zato što se hemijski vezuju za površinu za vreme aktivacije ili naknadnog

hemijskog tretiranja, na površini karbonskih vlakana prisutni su heteroatomi O, H, Cl, N, S [Polovina, 1999].

U reakciji sa  $\text{NH}_3$  formiraju se stabilna površinska jedinjenja ugljenik-azot; reakcija sa  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{CS}_2$ , ili S daje strukturu ugljenik-sumpor; reakcija sa  $\text{Cl}_2$  uslovljava površinske karakteristike i površinsko ponašanje aktivnih karbona. Reakcija sa koncentrovanom  $\text{H}_2\text{SO}_4$  i  $\text{H}_3\text{PO}_4$  daje karbonska vlakna sa sulfatnim i fosfatnim grupama, koja imaju jonoizmenjivačke karakteristike i pogodna su za selektivnu adsorpciju polarnih jedinjenja kako u gasovitoj, tako i u tečnoj fazi [Polovina, 1999].

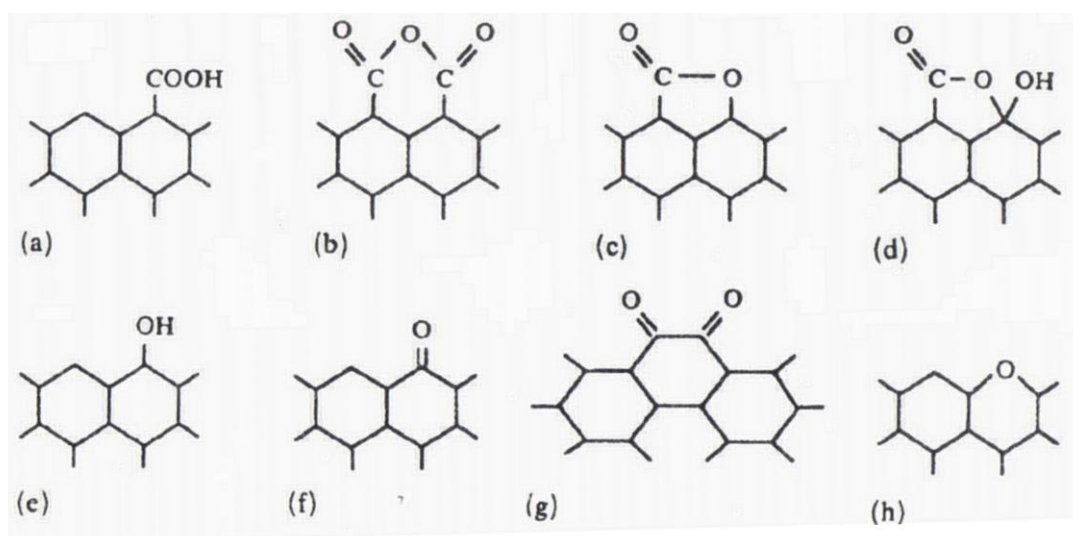
Površinske strukture ugljenik-kiseonik su najbrojnije i od najvećeg značaja jer utiču kako na adsorpcione karakteristike, tako i na sposobnost vlaženja, katalitička i električna svojstva. Priroda i količina ovih grupa zavise od prirode karbona, njegove površine i načina formiranja (temperatura, aktivator), ali se one mogu formirati i naknadnim hemijskim tretiranjem materijala, najčešće različitim oksidacionim agensima kao što su vazduh, kiseonik, kiselina (azotna, sumporna, fosforna), vodonik-peroksid, rastop nitrata gvožđa itd. Vezani kiseonik može se sa površine karbona ukloniti samo kao oksid ( $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$ ) i to na visokim temperaturama u vakumu ili u inertoj sredini [Polovina, 1999].

Bemov (Boehm) model (slika 2.5) prikazuje strukture mogućih kiselih kiseoničnih grupa na površini karbona. Grupe mogu biti jako kisele karboksilne grupe, slobodne (a) ili u obliku anhidrida (b), srednje kisele laktonske (c) i laktonske (d) grupe, slabo kisele hidroksilne grupe fenolnog tipa (e), karbonilne grupe, izolovane (f), ili kombinovane u hinonski tip strukture (g) i etarski ili ksantenski tip kiseoničnih grupa (h) koje spadaju u bazne. Bazne grupe koje, za razliku od kiselih, nastaju na višim temperaturama aktivacije ( $800\text{-}1000^\circ\text{C}$ ), pripadaju pretežno hromenskim i pironskim strukturama. Površinske grupe se mogu analizirati nizom specifičnih hemijskih reakcija, termičkom desorpcijom, kao i elektrohemijskim, spektroskopskim i potenciometrijskim metodama [Polovina, 1999].

Ako se zanemari gubitak mase na temperaturu ispod  $200^\circ\text{C}$ , koji potiče od odlaska higroskopne vode, oksidacionim tretiranjem postiže se znatna količina površinskih grupa (veliki gubitak mase) u odnosu na polazni uzorak, koji i bez oksidacije ima veliki sadržaj površinskih grupa zbog prirode polazne sirovine i načina karbonizacije i aktivacije [Polovina, 1999].

Pored razlika u količini formiranih grupa, uočava se i njihova različita temperaturna stabilnost, što ukazuje na različitu prirodu grupa u zavisnosti od oksidacije. Bemovom metodom

selektivne neutralizacije, koja se sastoji u neutralizaciji površinskih grupa različite kiselosti bazama različite jačine, dobijaju se podaci za ukupni sadržaj površinskih grupa, kao i njihov pojedinačni udeo. Analiza kiselih kiseoničnih grupa na aktivnim karbonskim tkaninama pokazala je da je pored ukupne kiselosti, važna i priroda grupa – uzorci sa dominantnim sadržajem karboksilnih grupa pokazuju izraženiji afinitet prema adsorpciji kadmijuma. Prisustvo kiselih karboksilnih i laktonskih grupa čini karbonsku površinu polarnom, što smanjuje adsorpciju nepolarnih aromatičnih jedinjenja, a sa druge strane povećava adsorpciju polarnih molekula kao što su alkoholi [Polovina, 1999; Kalijadis et al., 2011].



Slika 2.5. Moguće strukture kiseoničkih površinskih grupa [Boehm, 1990].

karboksilne grupe, slobodne (a) ili u obliku anhidrida (b), srednje kisele laktonske (c) i laktonske (d) grupe, slabo kisele hidroksilne grupe fenolnog tipa (e), karbonylne grupe, izolovane (f), ili kombinovane u hinonski tip strukture (g), etarski ili ksantenski tip kiseoničnih grupa (h) koje spadaju u bazne

### 2.3.3. Dobijanje karbonskih vlakana

Kao polazna sirovina za dobijanje KV mogu se koristiti različite supstance koje u svom sastavu sadrže ugljenik. Kao što je već napred detaljno opisano, nekada su se vlakna dobijala karbonizacijom i termičkom obradom celuloze. Pamuk i lan se karbonizuju od davnina, dok je prvi zabeleženi slučaj karbonizacije prirodnih vlakana izvršio Edison 1878. godine radi primene u sijalicama. Kompanija *Union Carbide* je na sličan način 50-ih godina prošlog veka proizvela karbonska vlakna polazeći od rajona, beskonačnih industrijskih celuloznih vlakana. Dobijena

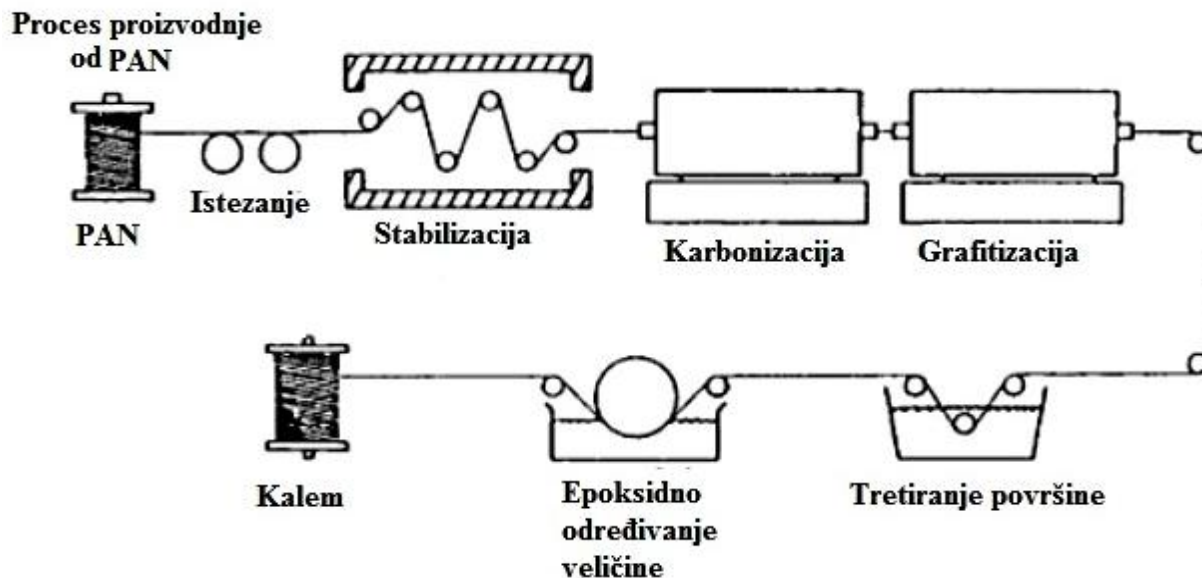


vlakna su imala loše mehaničke osobine. Istezanjem vlakana pri temperaturi većoj od 2200<sup>0</sup>C dobijena su vlakna visokog modula, do 500 GPa, koja su zatim komercijalizovana. Proces je bio skup i korišćen je za proizvodnju malih količina vlakana.

Shindo je 60-ih godina u Japanu ispitivao PAN, kao potencijalni polazni materijal u postupku proizvodnje KV. Postupak dobijanja vlakana sa PAN je bio daleko uspješni od postupka sa celulozom. Danas se preko 90% KV dobija iz PAN i tečno-kristalne smole, katrana, uglja ili nafte. Tokom oba postupka najpre se proizvede orijentisano polazno vlakno koje se stabilizuje oksidacijom, posle čega se karbonizuje zagrevanjem na temperaturi preko 800<sup>0</sup>C. Proizvode se i KV sa niskim mehaničkim osobinama (modul je niži od 60 GPa) i to polazeći od rajona ili izotropne katranske smole.

### Proizvodnja karbonskih vlakana polazeći od PAN-a

Način na koji se generiše korak po korak pojedinačno KV od PAN pod odgovarajućim uslovima karbonizacije, prikazan je na slici 2.6. U toku postupka, ugljenikovi atomi postaju uređeni duž longitudinalnog pravca dejstvom visoke temperature i istezanja [Buckley and Edie, 1993].



Slika 2.6. Proces proizvodnje karbonskih vlakana [Buckley and Edie, 1993].

Poliakrilonitril ima neprekidan lanac atoma ugljenika koji čini kičmu polimera, pored koje postoje bočne atomske grupe koje su reaktivne i pogodne za dobijanje ciklične, a zatim i aromatične strukture kakva postoji i u grafitu. Od PAN se dobija ***negrafitabilan karbonski materijal***. Proces proizvodnje KV od PAN ima više faza koje obuhvataju termički i hemijski tretman polaznog prekursora. Prekursor se ispreda u duge niti, koje se izlažu visokoj temperaturi bez kontakta sa kiseonikom. Bez kiseonika vlakna ne mogu izgoreti, dok većina nekarbonskih atoma napušta vlakno dejstvom visoke temperature. Ovaj proces se naziva karbonizacija, a kao finalni produkt nastaju duga čvrsta vlakna. Vlakna se na kraju proizvodnje oblažu zaštitnim slojem kako bi se sprečilo njihovo oštećenje.

### ***Ispredanje***

Akrilonitril je plastični prah koji se meša sa supstancama, kao što su metil-akrilat ili metil-metakrilat. Uz prisustvo katalizatora dolazi do procesa polimerizacije pri čemu se formira PAN, koji se zatim centrifugira ***i ispreda u vlakna*** primenom različitih metoda. Meša se sa određenim hemikalijama i pumpa kroz mlaznice malog promera u posudu sa hemikalijama u kojoj se plastika zgrušava i učvršćuje u vlakna. U drugim postupcima, smeša se zagreva i pumpa kroz mlaznice malog promera u komoru gde rastvarači ispare, ostavljajući vlakno. Ispredanje je važan korak u proizvodnji vlakana jer se tokom ovog procesa formira njihova unutrašnja atomska struktura. Vlakna se zatim ***ispiraju i istežu do željenog prečnika***. Istezanje pomaže poravnanje molekula unutar vlakana i pruža osnovu za formiranje čvrsto vezanih kristala ugljenika nakon procesa karbonizacije [Marinković, 1999].

### ***Stabilizacija vlakana***

Stabilizacija je složen proces i uključuje više koraka, od kojih se neki obavljaju istovremeno. Vlakna se na prvom mestu stabilišu tako što se u vazduhu zagrevaju do temperature od 200-300<sup>0</sup> C u trajanju od 30 do 120 minuta, da ne bi došlo do degradacije strukture i gubitka preferencijalne orijentacije u procesu karbonizacije vlakana. Pri stabilizaciji od linearnog polimera PAN postaje ciklični polimer, koga je mnogo teže razoriti (zato se ova faza ponekad naziva i „ciklizacija“). Podatak da ostatak nakon pirolize do 600<sup>0</sup> C iznosi 70% ako je stabilizacija izvršena, a samo 30% za nestabilisani PAN, pokazuje koliko stabilizacija doprinosi smanjenju gubitka mase pri karbonizaciji. Značajno je da se ***uz proces stabilizacije vrši i zatezanje vlakana***, tako da se postigne orijentacija molekulskih lanaca duž ose vlakana. Tako se postiže preferencijalna orijentacija kod polimera i zadržava pri karbonizaciji i termičkom

tretiranju. Atmosfera u kojoj se vrši stabilizacija može biti vazduh obogaćen kiseonikom ili ozonom, sumpor-dioksid i azot-dioksid. Tokom procesa se oslobađa toplota, koja se mora kontrolisati kako bi se izbeglo pregrevanje vlakana. U nekim procesima, vlakna se provlače kroz seriju toplotnih komora, ili prelaze preko zagrejanih valjaka [Marinković, 1999].

### ***Karbonizacija***

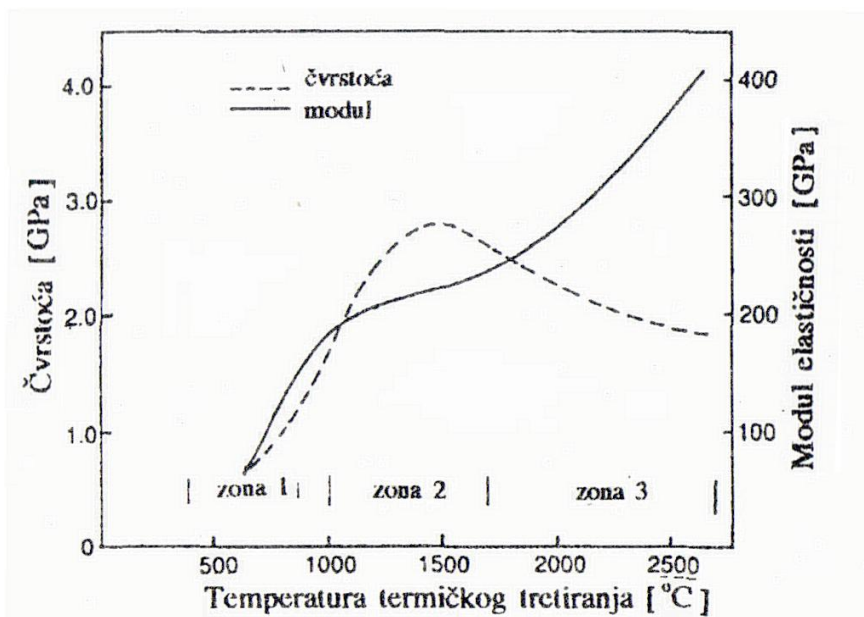
Karbonizacija je stadijum u procesu proizvodnje KV iz PAN. Tokom ovog procesa vrši se zagrevanje materijala do temperature koja je dovoljno visoka da omogući razne hemijske reakcije pri kojima iz oksidisanog PAN postupno izlaze svi atomi izuzev ugljenika i da se pri tome dobije struktura slojeva koja se više približava strukturi grafena, dok je celokupna struktura približna grafitnoj. Tokom niza kompleksnih reakcija dolazi i do gubitka ugljenika zajedno sa izdvajanjem brojnih gasovitih proizvoda:  $\text{NH}_3$ ,  $\text{HCN}$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_4$ . Prva vlakna se dobijaju pri nižim temperaturama, imaju maksimalnu čvrstoću i nizak modul, i nazivaju se visokočvrsta vlakna. Drugi tip vlakana su visokomodulna vlakna koja se dobijaju na temperaturama većim od  $2500^{\circ}\text{C}$ , koja imaju umerenu čvrstoću i maksimalan modul. U standardnom procesu proizvodnje visokočvrstih KV, stabilisana vlakna PAN se karbonizuju na  $1000^{\circ}\text{C}$ , nakon čega se tretiraju do  $1300\text{-}1400^{\circ}\text{C}$  da bi se dobila maksimalna čvrstoća [Marinković, 1999].

Tokom procesa karbonizacije dolazi do značajnih promena hemijskog sastava i fizičkih osobina. Vlakna gube oko 50% mase u vidu  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{HCN}$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{N}_2$ . Zapremina gasova oslobođenih tokom procesa je pet redova veličine veća od zapremine vlakana, a oko 1000 puta veća od zapremine peći za karbonizaciju. Tokom kontinualnog postupka karbonizacije vlakna se nalaze u atmosferi proizvoda njihovog razlaganja. Proces karbonizacije se često izvodi u inertnoj protočnoj atmosferi čistog azota ili argona da bi se atmosfera razblažila i da bi se sprečio ulazak vazduha [Marinković, 1999].

Tokom procesa karbonizacije i termičkog tretiranja, vlakno se postepeno menja od polimernog, koje ima nisku čvrstoću i modul, ali veliko prekidno izduženje (približno 10%), do krtog karbonskog vlakna sa visokom čvrstoćom i modulom, ali sa malim prikidima dužine 1-2%. Gustina se povećava sa 1,45 na  $1,7\text{ g/cm}^3$  ili više, dok se prečnik smanjuje sa 10-15  $\mu\text{m}$  na 6-9  $\mu\text{m}$ . Longitudinalno skupljanje bez primena sile zatezanja je manje od 10%. Nakon procesa karbonizacije vlakno sadrži više od 92% ugljenika [Marinković, 1999].

Osobine karbonskih vlakana zavise od temperature na kojoj se vrši proces karbonizacije. Kriva zavisnosti čvrstoće karbonskih vlakana od temperature pokazuje maksimum, čiji se položaj

nalazi u intervalu 1200-1600<sup>0</sup>C (grafikon 2.2). Jungov model KV raste sa temperaturom, zbog čega postoje dva osnovna tipa karbonskih vlakana.

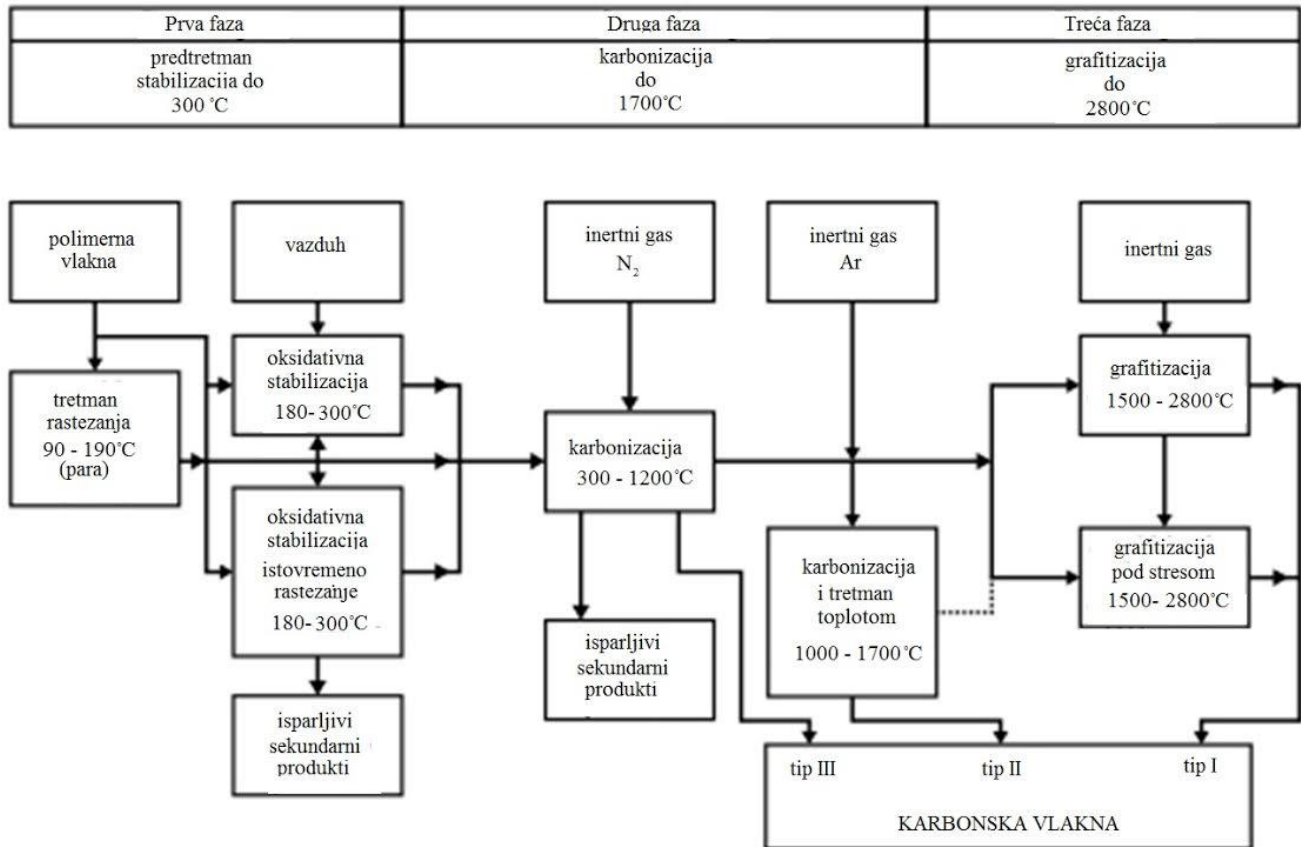


Grafikon 2.2. Promena modula elastičnosti i čvrstoće vlakana u zavisnosti od temperature [Savage 1993]

U prvoj temperaturnoj zoni, do 1000<sup>0</sup>C, dolazi do glavnog gubitka mase (do 50%), ali se mehaničke osobine povećavaju: modul ide do oko 200 GPa a čvrstoća do 2 GPa. Na ovoj temperature se proizvode visokočvrsta, visokomodulna i niskomodulna vlakna (E približno 200 GPa). U drugoj temperaturnoj zoni, od 1000 do 1500<sup>0</sup>C, dolazi do minimalnih hemijskih promena (odlazi azot), rastu kristaliti, povećava se orijentacija, a u ovoj zoni se nalazi maksimum čvrstoće dok se modul relativno malo menja. U trećoj temperaturnoj zoni od 1900 do 3000<sup>0</sup>C, modul se mnogo brže menja. Termičkim tretiranjem na visokoj temperaturi postiže se veća orijentacija grafenskih ravni paralelno osi vlakna, hemijske promene su minimalne ali su značajane strukturne promene (rast kristalita i orijentacije). Pretpostavlja se da većina proizvođača izdvaja termičko tretiranje na najvišim temperaturama iz kontinualnog procesa, jer je potražnja za visokomodulnim vlaknima relativno mala (slika 2.7).

Polazeći od PAN-vlakna sa modulom oko 15 GPa, može se pokriti čitav interval vrednosti modula (čvrstoće). Od komercijalne važnosti su vlakna sa vrednostima višim od onih za staklena (E približno 70 GPa) ili aramidna vlakna (E približno 125 GPa). To je i razlog što se proizvodi tri

vrste karbonskih vlakana, i to niskomodulna (tip III) (E približno 200 GPa), koja se dobijaju na 1000°C, visokočvrsta (tip II) i visokomodulna (tip I).



Slika 2.7. Stabilizacija, karbonizacija i grafitizacija prilikom proizvodnje karbonskih vlakana.

### ***Površinski tretman vlakana***

Karbonska vlakna imaju „glatku“ površinu sa vrlo malo nesparenih veza zbog čega se teško vezuju sa polimerima. Ako je veza vlakno-osnova slaba, mehanička naprezanja se neće prenositi sa osnove na vlakno. Takav kompozit je vrlo slab. Da bi se iskoristile visoke mehaničke osobine vlakana, neophodno je povećati adheziju vlakno-osnova. To se može ostvariti promenom stanja površine vlakana, bilo uvođenjem funkcionalnih površinskih grupa, koje bi omogućile vezu sa atomima ugljenika iz smole, ili „ogrubljivanjem“ površine koje bi pomoglo da se ostvari mehanička veza sa smolom [Marinković, 1999].

Dodavanje atoma kiseonika na površinu obezbeđuje bolje osobine hemijskih veza i takođe ogрубljavanje površine za bolje mehaničke osobine vezivanja. Oksidacija se može postići izlaganjem vlakana raznim gasovima kao što su vazduh, ugljen dioksid ili ozon; ili raznim

tečnostima kao što je natrijum-hipohlorit ili azotna kiselina. Proces tretmana površina mora biti pažljivo kontrolisan, kako bi se izbeglo stvaranje oštećenja na površini vlakana.

### ***Dimenzionisanje***

Posle površinskog tretmana, vlakna se oblažu radi zaštite od oštećenja tokom namotavanje ili tkanja. Ovaj proces se zove dimenzionisanje. Standardni materijal za prevlačenje vlakana su smeše poliestera, najlona, uretanske i druge. Obložena vlakna se namotavaju na kalemove [Marinković, 1999].

### **Proizvodnja karbonskih vlakana polazeći od katranske smole**

Katranske smole su izotropne smeše poliaromatičnih molekula kakve se dobijaju kao nuzpropizvodi pri preradi katrana uglja i nafte. Iz njihovih rastopa se relativno lako dobijaju vlakna istiskivanjem kroz mlaznice, ali takva izotropna vlakna imaju niske mehaničke osobine (tabela 3), koje se ne poboljšavaju ni pri karbonizaciji ni pri termičkom tretiranju, osim ako se ne primeni istezanje pri ekstremno visokoj temperaturi (2700-3000<sup>0</sup>C). Izotropna karbonska vlakna se koriste kao relativno jeftin punilac za plastiku, a u novije vreme za poboljšanje čvrstoće i žilavosti betona, gde je vrlo značajna njihova otpornost prema atmosferilijama [Marinković, 1999].

Pošto su katranske smole grafitabilne, za razliku od PAN, postoje načini da se od njih naprave vrlo anizotropni tečni kristali, tzv. metafaza. Naime pri zagrevanju smole do 400<sup>0</sup>C, u tečnoj fazi se odigravaju reakcije dehidrogenacije i kondenzacije, pri kojima lako nastaju planarni aromatični molekuli koji se lako spajaju u tečno-kristalnu mezofazu. Osobine izotropnih KV dobijenih iz metafaze prikazani su u tabeli 2.3, u sledećem poglavlju [Marinković, 1999].

Očekivalo se da će proizvodnja KV iz katranske smole biti jeftin proces, pre svega iz razloga što je smola jeftinija od PAN, što sam proces omogućava visoku orijentaciju molekula pa nije potrebno veliko zatezanje i što odsustvo stranih atoma (azot, vodonik, kiseonik) u mezofazi treba da omogući veći prinos i manju potrošnju energije da bi se dobila visokoorijentisana KV. Međutim, kao najveći problem pokazalo se to da viskozitet smole zavisi od temperature, pa je potrebno održavati temperaturu u vrlo uskim granicama, što je i teško i skupo. Posle istiskivanja, vlakna se i ovde podvrgavaju oksidaciji u kiseoniku na 200-300<sup>0</sup>C, a zatim se posle naglog hlađenja u inertoj atmosferi, karbonizuju i termički tretiraju do temperature od 2500–2700<sup>0</sup>C [Marinković, 1999].

## **Proizvodnja karbonskih vlakana od otpadnih vlaknastih materijala**

Poslednjih godina zapaža se bojazan za ugroženost stanovništva, ekološke sredine, resursa i energenata povećanom industrijskom proizvodnjom u svetskim razmerama. Zato se pažnja usmerava sve više ka korišćenju otpadnih materijala kao resursa u proizvodnji.

Sa smanjenjem cene vlaknastih produkata, smanjuje se i njihov vek trajanja. Samo u Japanu, godišnje se proizvede dva miliona tona otpadnih materijala. Oko 10% svih vlaknastih produkata se reciklira, prvenstveno putem spaljivanja ili amelioracije. Pored toga, postoje i druge forme recikliranja, kao što su hemijska razgradnja i regeneracija vlakana poliestera, ponovna upotreba pamuka kao automobilskog izolacionog materijala i izvoz polovne odeće u jugoistočnu Aziju i druge siromašne krajeve sveta. Zabeležene su i druge namene recikliranja, kao što je upotreba vlaknastih produkata za ojačavanje zidova i recikliranje odeće. Međutim, zapaža se da se na globalnom planu ne povećava recikliranje odeće pre svega zbog toga što potrošači nemaju dovoljno interesovanja za reciklirane proizvode, ali i zbog cene recikliranja odeće [*Kawasaki et al., 2012*].

Poznato je da su tokom pisane istorije ljudi upotrebljavali vunu, pamuk i druge prirodne materijale. Upotreba veštačkih materijala počinje tek od 1884. godine, ali ona danas čini oko 60% zapremine svih vlaknastih materijala koji se koriste u svetu. Većina hemijskih vlakana su vlakna bazirana na naftnim polimerima i veoma je poželjna njihova efikasna upotreba.

Aktivirani karboni, koji se proizvode od palmine kore, naftne smole i uglja, široko se koriste za adsorpciju organskih materija i štetnih supstanci. Aktivirana KV karakterišu se visoko specifičnom površinom i visokim stepenom i efikasnošću adsorpcije u odnosu na granulirane aktivne karbone. Međutim, njihova proizvodnja je kompleksna i skupa. Poslednjih godina beleži se trend u proizvodnji jeftinih, korisnih karbonskih materijala od biomase, kao što je koštica kajsije, guma, drvena piljevina, bambus, vlakna jute i drugi poljoprivredni nusprodukti. Istraživanja su takođe usmerena na proizvodnju aktiviranih pamučnih prediva korišćenjem kao aktivatora 4% kalcijum-fosfata. Opisane su različite metode za proizvodnju aktiviranih karbonskih materijala, koje uključuju karbonizaciju i aktivaciju sa parama hemijskih materija. Međutim, Kawasaki i sar. su razvili metodu za proizvodnju karbonskih materijala od otpadnih vlakana – vune, poliestera i pamuka, procesom karbonizacije bez aktivacije. Ovakva proizvodnja je od izuzetnog značaja jer se troši manje energije i manje se zagađuje okolina (zbog smanjene emisija ugljen-dioksida) [*Kawasaki et al., 2012*].

Rezultati ovakvog eksperimenta su pokazali da se tendencija ka formiranju pora i specifične površine vlakana bitno menja u zavisnosti od uslova karbonizacije. Povećanje temperature i retencionog vremena od dva sata rezultira stvaranjem najveće specifične površine. Primenom maksimalne vrednosti temperature karbonizacije od 1000<sup>0</sup> C, pokazano je da je do karbodizacije vune došlo na temperaturi od 900–1000<sup>0</sup> C, a pamuka i poliestera na temperaturi od 1000<sup>0</sup> C. Temperatura karbonizacije od 900–1000<sup>0</sup> C dovela je do maksimalnog stvaranja mikropora i specifične površine u karbonskim materijalima dobijenim od pamuka i poliestera, ali ne i od onih koji su dobijeni karbonizacijom vune. Karbonizacija poliestera i pamuka na 1000<sup>0</sup> C dovela je do stvaranja specifične površine veće od 1000 m<sup>2</sup>/g za oba materijala, a za karbonski materijal dobijen od pamuka je oznosila 1253 m<sup>2</sup>/g. Prinos materijala generalno se smanjuje sa povećanjem temperature karbonizacije. Takođe, broj kiselih funkcionalnih grupa u vuni i pamuku povećava se sa povećanjem temperature karbonizacije, ali se isti kod poliestera smanjuje. Vlaknasta forma vune i poliestera se gubi nakon karbonizacije, što je dokazano skenirajućom elektronskom mikroskopijom, ali to nije slučaj sa pamučnim vlaknima. Iz svega se može zaključiti, da je na osnovu dobijene specifične površine pamuka nakon karbonizacije na 1000<sup>0</sup> C, zadržavanja vlaknaste forme i drugih fizičkih i hemijskih osobina, moguća jeftina konverzija otpadnih pamučnih vlakana u karbonska vlakna, samo postupkom karbonizacije [*Kawasaki et al., 2012*].

#### **2.3.4. Osobine karbonskih vlakana**

Karbonska vlakna karakterišu se nizom osobina na kojima se zasniva njihova upotreba. Te osobine su: 1) veliki odnos čvrstoće prema specifičnoj težini; 2) velika rigidnost; 3) velika rezistentnost na koroziju; 4) dobra električna sprovodljivost; 5) velika otpornost na zamor na istezanje; 6) dobra jačina istezanja ali i krtost; 7) rezistentnost na dejstvo visokih temperatura (nisu zapaljiva); 8) visoka toplotna sprovodljivost, u nekim formama vlakana; 9) mali koeficijent termalne ekspanzije; 10) netoksičnost; 11) biološka inertnost; 12) propustljivost za X-zrake; 13) samovlaženje; 14) odlična zaštita ekrana od elektromagnetnih smetnji; 15) relativno su skupa; 16) zahtevaju znanje, iskustvo i specijalnu opremu u cilju upotrebe.



Tabela 2.2. Osobine karbonskih vlakana proizvedenih od PAN [Marinković, 1999]

Osobine	Niskomodulna	Visokočvrsta	Visokomodulna
Gustina ( $\text{g/cm}^3$ )	1,76	1,8	1,9
Prečnik ( $\mu\text{m}$ )	7-8	6-7	4-6
Sadržaj ugljenika (%)	92	96	100
<i>Aksijalne</i>			
Zatezna čvrstoća (GPa)	3,3	4-5	2,4
Zatezni modul (GPa)	230	270	390
Prekidno izduženje (%)	1,4	1,7-1,9	0,6
Toplotna provodljivost (W/mK)	8,5	-	70
Električna otpornost ( $\Omega\text{m}$ )	18	-	9,5
Koeficijent termičkog širenja na $21^\circ\text{C}$ ( $10^{-6}\text{K}^{-1}$ )	-0,7	-	-0,5
<i>Radijalne</i>			
Zatezni modul (GPa)	40	-	21
Koeficijent termičkog širenja na $50^\circ\text{C}$ ( $10^{-6}\text{K}^{-1}$ )	10	-	7

Tabela 2.3. Osobine izotropnih karbonskih vlakana proizvedenih od katranske smole [Marinković, 1999]

Osobine	Vrednost
Gustina ( $\text{g/cm}^3$ )	1,6
Prečnik ( $\mu\text{m}$ )	8,5
Sadržaj ugljenika (%)	99
<i>Aksijalne</i>	
Zatezna čvrstoća (GPa)	1,0
Zatezni modul (GPa)	41
Prekidno izduženje (%)	2,5
Električna otpornost ( $\Omega\text{m}$ )	20

U tabeli 2.2. prikazane su tipične osobine KV proizvedenih od PAN, u tabeli 2.3 od katranske smole, a u tabeli 2.4. od metafazne smole [Marinković, 1999], dok će neke važne osobine KV biće detaljnije opisane u daljem tekstu.

Tabela 2.4. Tipične osobine karbonskih vlakana proizvedenih od mezofazne smole [Marinković, 1999]

Osobine	Niskomodulna	Visokočvrsta	Ultra visokog modula
Gustina (g/cm <sup>3</sup> )	1,9	2,0	2,15
Prečnik (μm)	11	10	10
Sadržaj ugljenika (%)	>97	>99	>99
<i>Aksijalne</i>			
Zatezna čvrstoća (GPa)	1,4	1,7	2,2
Zatezni modul (GPa)	160	380	725
Prekidno izduženje (%)	0,9	0,4	0,3
Toplotna provodljivost (W/mK)	-	100	520
Električna otpornost (Ωm)	13	7,5	2,5
Koeficijent termičkog širenja na 21 °C (10 <sup>-6</sup> K <sup>-1</sup> )	-	-0,9	-1,6
<i>Radijalne</i>			
Zatezni modul (GPa)	-	21	-
Koeficijent termičkog širenja na 50 °C (10 <sup>-6</sup> K <sup>-1</sup> )	-	7,8	-

### Gustina

Gustina (gustoća) materijala zavisi od vrste materijala i stanja u kome se materijal nalazi, a definisana je odnosom jedinice mase prema jedinici zapremine materijala. Razlikuju se dve fizičke veličine vezane za gustinu materijala: apsolutna gustina ( $\rho$ ), zapreminska, odnosno volumenska gustina ( $d$ ).

*Apsolutna gustina* određuje se iz odnosa mase materijala (bez pora i šupljina), prema jedinici njegove zapremine:

$$\rho = \frac{m}{V} \quad [\text{kg/m}^3]$$

gde je:  $m$  - masa [kg];  $V$  - zapremina bez pora i šupljina [m<sup>3</sup>].

*Zapreminska (volumenska) gustina* izražava se odnosom mase materijala prema jedinici zapremine materijala, zajedno sa porama i šupljinama:

$$\rho = \frac{m_s}{V} \quad [\text{kg/m}^3]$$

gde je:  $m_s$  - stalna masa epruvete [kg];  $V$  - zapremina sa porama i šupljinama [m<sup>3</sup>].

U zavisnosti od stanja u kome se materijal nalazi razlikuju se: zapreminska gustina pri određenoj vlažnosti ( $dw$ ), zapreminska gustina u rastresitom stanju ( $dr$ ), zapreminska gustina u zbijenom stanju ( $dz$ ), i dr. Gustina i zapreminska gustina određuju se laboratorijski, pomoću odgovarajuće opreme.

*Poroznost* materijala predstavlja stepen ispunjenja zapremine porama i šupljinama, i određuje se na osnovu poznate gustine i zapreminske gustine:

$$\rho = \frac{\rho - d}{\rho^2} 100\%$$

gde je:  $\rho$  – gustina [ $\text{kg/m}^3$ ];  $d$ - zapreminska gustina [ $\text{kg/m}^3$ ].

Zapremina koju zauzimaju pore i šupljine u poroznom materijalu dobija se kao razlika između ukupne zapremine i zapremine bez pora i šupljina, odnosno apsolutne zapremine materijala. Od poroznosti zavisi više važnih karakteristika materijala, kao što su čvrstoća, upijanje vode, itd.

Jedna od savremenijih i preciznijih metoda kojom se određuje gustina čvrstih tela je metoda pomoću piknometra. Gustina karbonskih vlakana, u zavisnosti od prekursora iz koga su proizvedena, iznosi od 1,6 – 2,15  $\text{g/cm}^3$ .

### Čvrstoća

Čvrstoća je veličina najveće moguće ili dopuštene sile po jediničnom preseku koju je potrebno upotrebiti da bi došlo do razaranja materijala. U zavisnosti od načina dejstva spoljašnjih sila razlikujemo *zateznu čvrstoću* ( $R_m$ ), *pritisnu čvrstoću* ( $R_c$ ), *čvrstoću na savijanje* ( $R_f$ ), *čvrstoću na uvijanje* ( $\tau_m$ ) i *čvrstoću na smicanje* ( $\tau_{ms}$ ).

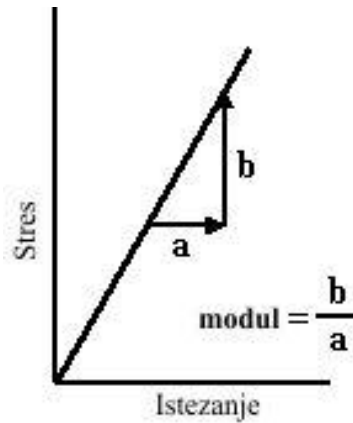
Čvrstoće na zatezanje (zatezna čvrstoća), pritisak i smicanje dobijaju se se iz odnosa maksimalne sile  $F_m$ , koja je proizvela razaranje uzorka, i prvobitnog preseka uzorka  $S_0$ , tj. predstavlja napon u trenutku loma:

$$R_m = \frac{F_m}{S_0} \quad [\text{MPa}]$$

Savojna čvrstoća se izračunava iz odnosa maksimalnog momenta savijanja  $M_f$  i otpornog momenta preseka uzorka  $W$ :

$$R_f = \frac{M_f}{W} \quad [\text{MPa}]$$

Veliki uticaj na čvrstoću materijala ima homogenost i poroznost materijala, tj. zapreminska gustina. Smanjenjem poroznosti, čvrstoća materijala se povećava [Lapčević 2004].



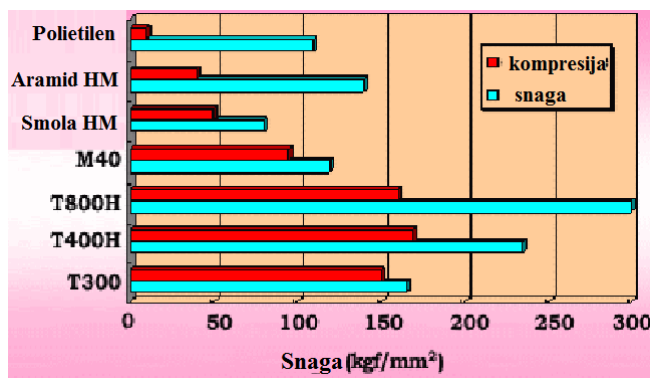
Slika 2.8. Kriva zatezne čvrstoće karbonskih vlakana



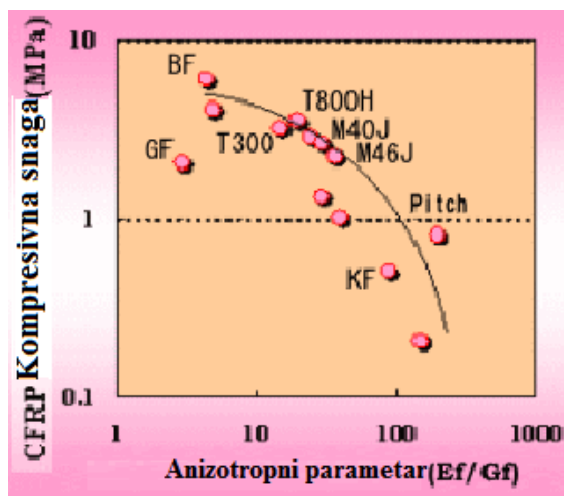
Slika 2.9. Određivanje zatezne čvrstoće uzoraka na kidalici

Jedna od najatraktivnijih osobina KV je njihova velika čvrstoća. Čvrstoća vlakana se teže kontroliše i zavisi od prisustva defekata na površini i unutar vlakana. S obzirom da se defekti ne mogu izbjeći, čvrstoća je uvek niža od izračunate. Kod visokomodulnih vlakana čvrstoća je samo oko 4%, a kod visokočvrstih oko 10% od one izračunate na osnovu njihovog modula. Čvrstoća KV na bazi PAN je statistički kompleksna. Rasipanje vrednosti čvrstoće pojedinih filamenata je u vezi sa veličinom i učestalošću defekata unetih tokom procesa proizvodnje. Zbog toga proizvođači karbonskih vlakana poklanjaju veliku pažnju svim fazama proizvodnje počevši od kontrole čistoće, sprečavanja unošenja mehaničkih defekata kod dobijanja polaznog PAN vlakna,

sprečavanja međusobnog lepljenja pri oksidaciji, do sprečavanja oksidacije na vazduhu pri karbonizaciji i termičkom tretiranju. Osim toga, čvrstoća KV zavisi i od drugih varijabli, uključujući test dužine, stvarni dijametar vlakana i distribuciju pukotina u materijalu. Ponekad je radi preciznog određivanja zatezne čvrstoće potrebno testiranje pojedinačnog KV visoke čvrstoće kako bi se utvrdilo opterećenje i pritisak pod kojim vlakna pucaju. Radi procene morfologije površine vlakana i preciznog merenja dijametra svakog vlakna, primenjuje se skenirajuća elektronska mikroskopija. Rezultati istraživanja su pokazali da su zatezna čvrstoća, deformacija i Youngov modul vrlo pravilno prikazani od strane proizvođača na 20 mm baždarene dužine KV, ali da ove vrednosti značajno odstupaju na drugim baždarenim dužinama [Langston, 2016].



Grafikon 2.3. Snaga istezanja i sabijanja različitih vlakana (balans zatezna/kompresivna čvrstoća). (<http://www.torayca.com/en/techref/index.html> n.d.)



Grafikon 2.4. Anizotropni parametri u zavisnosti od zatezne snage. (<http://www.torayca.com/en/techref/index.html> n.d.)

Kada su izloženi zateznom opterećenju, pucanje karbonskih vlakna se dešava u lokalnom regionu jedinog vlakna zbog uticaja lokalne vrednosti vlakna i geometrije tog regiona. Kriva zatezne čvrstoće karbonskih vlakana (slika 2.8) može se grubo smatrati kao linearna, što znači da su snaga i istežanje proporcionalni.

**Zatezna čvrstoća** je osnovno mehaničko svojstvo materijala, koje predstavlja granicu razvlačenja. Na osnovu zatezne čvrstoće materijali se vrednuju prema njihovoj mehaničkoj otpornosti na naprezanje. Zatezna čvrstoća predstavlja odnos maksimalne sile postignute pri ispitivanju vlakna na kidalici (slika 2.9) i početnog preseka uzorka koji se ispituje. Na kidalici se direktno meri zatezna čvrstoća materijala  $\sigma_M$ , izduženje ispitivanog uzorka  $\Delta L$  i suženje poprečnog preseka uzorka  $\Delta A$ . Iz rezultata ispitivanja mogu se odrediti Youngov modul elastičnosti  $E$ , Poissonov promer  $\nu$ , granica razvlačenja i rad plastične deformacije [Balać i sar., 2010].

Na grafikonu 2.3. pokazani su snaga istežanja i sabijanja različitih vlakana. Kao što se vidi, povećanje zatezne čvrstoće Torajka vlakana (od T300 do T800H ) ne može jednostavno osigurati povećanje pritiska kompresije. Otpornost vlakana na pritisak opada kako se anizotropija vlakna povećava (grafikon 2.4) (<http://www.torayca.com/en/techref/index.html> n.d.)

### **Modul elastičnosti (Jungov modul)**

Jungov modul elastičnosti (modul elastičnosti, zatezni modul) predstavlja meru krutosti/rigidnosti materijala i jednak je odnosu zateznog naprezanja i linijske zatezne deformacije, u linearnom ili elastičnom delu dijagrama naprezanja.

$$E \equiv \frac{\text{zatezno naprezanje}}{\text{izduženje}} = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{F/A_0}{\Delta L/L_0} = \frac{FL_0}{A_0\Delta L}$$

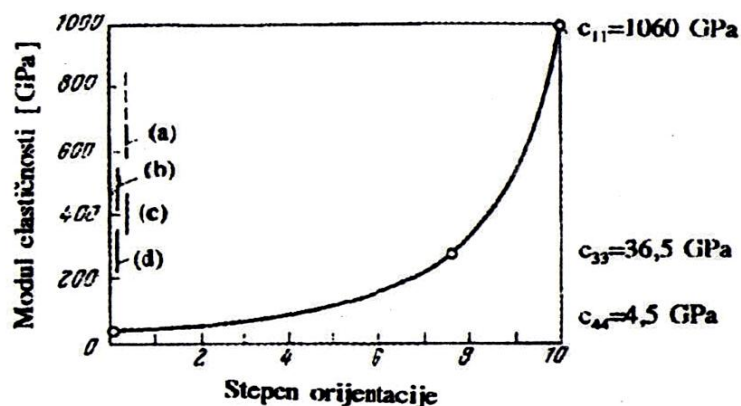
gde je:  $E$  - Jungov modul elastičnosti ( $\text{N/mm}^2$ );  $F$  - sila koja izdužuje uzorak ( $\text{N}$ );  $A_0$  - početni poprečni presek uzorka u mirovanju ( $\text{mm}^2$ );  $\Delta L$  - izduženje uzorka ( $\text{m}$ );  $L_0$  - početna dužina uzorka ( $\text{m}$ );  $\sigma$  - naprezanje u uzorku ( $\text{N/mm}^2$ ),  $\varepsilon$  - odnos izduženja uzorka i dužine uzorka (bez dimenzije ili  $\Delta L / L_0$ )

Ukoliko je njegov iznos veći utoliko je za jednaki presek materijala potrebna veća sila da bi nastala deformacija. Nizak modul znači da se materijal lako deformiše pri opterećenju. U materijalima koji pokazuju linearnu zavisnost između napona i jediničnog izduženja modul elastičnosti se praktično određuje tako što se u području elastičnosti za nekoliko uzastopnih

jednakih priraštaja sile  $\Delta F$ , pomoću ekstenziometra očitaju priraštaj  $\Delta L$  koji pri idealnim uslovima treba da budu međusobno jednaki. Modul elastičnosti zavisi od vrste materijala i u vezi je sa unutrašnjom građom materijala [Balać i sar., 2010].

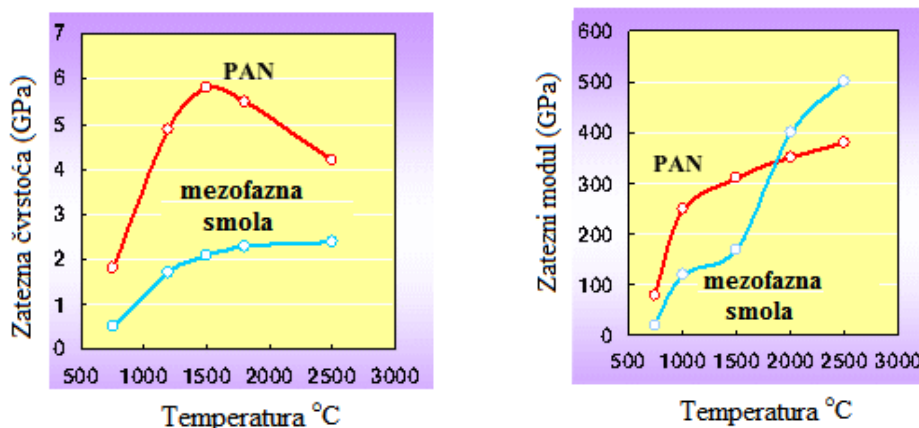
Kod grafita elastična konstanta u pravcu slojeva  $C_{11}$  ima vrednost 1060 GPa, dok je vrednost  $C_{33}$ , koja se odnosi na pravac upravno na grafenske slojeva, samo 36 GPa, a modul smicanja, tj. međusobnog pomeranja slojeva,  $C_{44}$  je 4,6 GPa.

Kada se pogleda zatezni modul KV, uočljivo je da se vlakna najjače suprotstavljaju istezanju ako su ugljenični slojevi u njima dobro uređeni, zbog čega postoji jasna povezanost između preferencijalne orijentacije i modula (grafikon 2.5).



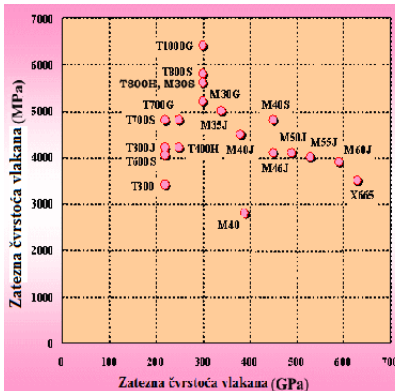
Grafikon 2.5. Zavisnost modula elastičnosti od stepena preferencijalne orijentacije [Fitzer, 1985]

Naznačene su vrednosti najvažnijih konstanti elastičnosti. Dati su intervali vrednosti pojedinih tipova karbonskih vlakana: a) grafita (od mezofazne smole) ; b) karbonska (od mezofazne smole); c) visokotemperaturna (od PAN); d) niskotemperaturna (od PAN).



Grafikon 2.6. Zatezna čvrstoća (levo) i zatezni modul (desno) karbonskih vlakana u odnosu na temperaturu (<http://www.torayca.com/en/techref/index.html> n.d.).

Zatezni modul i zatezna čvrstoća KV zavise od temperature njihovog dobijanja (grafikon 2.6). Vlakna Torajka nalaze se u rasponu modula elastičnosti od 230 GPa - 650 GPa sa različitim opsegom zatezne čvrstoće (slika 2.10). U laboratoriji se mogu dobiti vlakna još većeg modula elastičnosti.



Grafikon 2.7. Osobine vlakana Torajka  
(<http://www.torayca.com/en/techref/index.html> n.d.)

Naime, prema **zateznom modulu**, KV delimo na vlakna niskog, standardnog, intermedijarnog, visokog i ultravisokog zateznog modula. Engleska jedinica mere za zatezni modul je funta/inču površine preseka, ili psi (engl. **p**ound per **s**quare **i**nch), a međunarodna mera je kPa, tj. GPa. Karbonska vlakna niskog zateznog modula imaju vrednost zateznog modula ispod 240 GPa (34,8 miliona psi), a ultravisokog zateznog modula od oko 400-1.000 GPa (60-145 miliona psi). U poređenju sa čelikom čiji je zatezni modul oko 200 GPa, najjača karbonska vlakna su i do 10 puta čvršća od čelika i osam puta čvršća od aluminijuma, a pri tome su znatno lakša i od čelika (5x) i od aluminijuma (1,5x) [Balać i sar., 2010].

### Ostale osobine karbonskih vlakana

Karbonska vlakna zbog velike čvrstoće i male težine, imaju **velik količnik čvrstoće/specifičnoj težini**. Materijali kao što su aluminijum, titanijum, magnezijum, karbonska vlakna, staklena vlakna, viksokočvrste legure čelika, tropsko balza-drvo, svila pauka i dr. imaju vrlo velik navedeni količnik. Ovaj količnik za KV iznosi 2.450 kN. m/kg, a npr. za staklena vlakna 1307kN.m/kg, a za svilu pauka 1069 kN.m/kg [<http://www.carbonfiber.gr.jp/english/tech/faq/#1> n.d]. Karbonska vlakna su, u principu, **veoma rigidna** (imaju visok modul elastičnosti, tj. zatezni modul), o čemu je već bilo reči. Ona su **rezistentna na koroziju i**



**hemijski su stabilna.** Međutim, epoksidna smola u koju se uklapaju KV radi zaštite prilikom transporta, osetljiva je na sunčevu svetlost i mora biti zaštićena. I ostale matrice, takođe mogu biti osetljive. Radi zaštite, najčešće se koriste lakovi otporni na UV-zrake. Karbonska vlakana pokazuju **dobru električnu sprovodljivost** [Petersen, 2011]. Rezistentnost (1/sprovodljivost) na sprovođenje električne energije iznosi  $0,95 - 1,8 \times 10^{-5} \Omega\text{m}$ . Ova karakteristika može biti korisna, ali i štetna. Tako npr. električna sprovodljivost KV može olakšati koroziju na galvanskim priključcima, a prašina od KV akumulirana u prodavnicama može izazvati iskrenje ili kratki spoj na električnim uređajima i opremi. Karbonska vlakna i kompoziti imaju dobru **otpornost na zamor**. Međutim, kada i dođe do zaumora, šteta od njega se vidi kao smanjenje krutosti s većim brojem ciklusa naprezanja (i pored visoke temperature). Veći problem nastaje tek kada se ciklična naprezanja podudaraju s usmerenošću vlakana. Što se tiče karbonskih kompozita, orijentacija vlakana i različita orijentacija slojeva vlakana imaju velik uticaj na to kako će kompozitni materijali odolevati zamoru. Zamor će zavisiti i od vrste sile koja deluje na materijal (istezanje, sabijanje ili razvlačenje) [<http://www.carbonfiber.gr.jp/english/tech/faq/#1> n.d].

Zavisno od procesa proizvodnje i prekursorskog materijala, od KV se izrađuje zaštitna odeća za gašenje požara, s obzirom da ova vlakna **nisu zapaljiva**. Zbog dodatne **hemijske inertnosti**, KV se mogu koristiti i u akcidentima u kojima požar deluje u kombinaciji s korozivnim sredstvima. *Deka KV* koriste se kao zaštita kod zavarivanja. **Toplotna sprovodljivost** je količina toplote koja se prenosi kroz jedinicu debljine materijala, u smeru koji je upravan na jedinicu površine, zbog temperaturnog gradijenta jedinice, pod stabilnim uslovima. Drugim rečima, to je mera kolikom lakoćom toplota teče kroz materijal. Toplotna sprovodljivost je veoma različita kod različitih KV. Neke vrste KV su posebno dizajnirane za visoku ili nisku toplotnu sprovodljivost [Zhao and Gou, 2009; <http://www.carbonfiber.gr.jp/english/tech/faq/#1> n.d].

Karbonska vlakna imaju u principu **mali koeficijent termalne ekspanzije (CTE)**. Međutim, u zavisnosti od smera tkanja kod karbonskih tkanina, ili od prekursorskog materijala, koeficijent termalne ekspanzije nalazi se u opsegu od  $-1$  do  $8^+$ . Tako npr. KV na bazi PAN imaju veliku čvrstoću i veliki CTE, dok ona na bazi katranskih smola imaju veliki modul elastičnosti/krutosti, a mali CTE. Mali koeficijent termalne ekspanzije čini KV pogodnim za aplikacije u situacijama u kojima mali pokreti mogu biti kritični (npr. kod teleskopa i drugih optičkih instrumenata) [<http://www.carbonfiber.gr.jp/english/tech/faq/#1> n.d].

Najzad KV su netoksična, biološki su inertna i propustljiva su za X-zrake, o čemu će biti više reči u narednom poglavlju.

## 2.4. BIOKOMPATIBILNOST MATERIJALA UKLJUČUJUĆI I KARBONSKA VL.

Materijali koji se koriste u medicinskim sredstvima, pogotovo u onim aplikacijama u kojima je sredstvo u kontaktu sa telom ili je privremeno ili trajno implantirano u telu, obično se opisuju kao biomaterijali i moraju biti jedinstveno dizajnirani. Konsenzus konferencija za razvoj Nacionalnog instituta za zdravlje SAD, novembra 1982. godine definisala je biomaterijale kao „bilo koje supstance (osim leka) ili kombinacije supstanci, sintetičkog ili prirodnog porekla, koje se mogu koristiti za bilo koji vremenski period, u celini ili kao deo sistema koji tretiraju, povećavaju, ili zamenjuju bilo koje tkivo, organ ili funkciju tela” [Boretos and Eden, 1984].

Materijali za medicinska sredstva mogu se okarakterisati kao sintetički polimeri, biorazgradivi polimeri, biološki aktivni materijali, prirodni makromolekuli (tj. biopolimeri), materijali s neaktivnim površinama, bioaktivni ili adhezivni materijali, metali, keramika, stakleni ugljenici i nanomaterijali. Oni mogu biti implantirani za stalnu zamenu, kao što je slučaj s veštačkim srčanim zaliscima ili protezom kuka, ili za privremeno korišćenje, kao što je slučaj s intravenskim kateterima ili koštanim pločama i šipkama. Sterilna sredstva, tj. materijali od kojih su izgrađeni, moraju ispunjavati osnovne zahteve biokompatibilnosti, uglavnom kao što je definisano standardima ISO 10993 (*The International Organization for Standardization, ISO*): da budu **netoksična, netrombogena, nekancerogena, neantigena i nemutagena**. Takođe, biodegradacija i infekcija postaju sve važnije u dugoročnim aplikacijama, kao što su centralni venski kateteri i trajni implantati [Helmus et al., 2008].

### 2.4.1. Definicija biokompatibilnosti materijala

Biokompatibilnost se definiše kao sposobnost materijala da nakon aplikacije obavlja određenu funkciju u organizmu ne izazivajući neželjeni odgovor tkiva domaćina. Ona podrazumeva harmoniju međusobne interakcije tkiva domaćina, korištenog materijala i funkcije koju obavlja, pri čemu se reakcija tkiva domaćina zadržava u granicama tolerancije [Williams, 1987].

### 2.4.2. Standardi za ispitivanje biokompatibilnosti

Glavni cilj standardizacije procedura za ispitivanje biokompatibilnosti jeste poboljšanje reproduktivnosti i mogućnost ponavljanja testova, kao i lakša komparacija rezultata dobijenih u različitim laboratorijima.

Međunarodna organizacija za standardizaciju (ISO) (*The International Organization for Standardization, ISO*) je svetska federacija nacionalnih tela za standardizaciju. U ovom trenutku, postoje nacionalni standardi za metode testiranja biokompatibilnosti. Međunarodni standardi pokrivaju posebno i stomatološke materijale (ISO 7405) i medicinska sredstva (ISO 10993), koja obuhvataju i stomatološke materijale.

Međunarodni standard ISO 10993, pod nazivom *Biološka procena medicinskih sredstava* je kombinacija i usklađivanje internacionalnih i nacionalnih standarda i smernica. Primarni cilj ISO 10993 je zaštita ljudi. Ovaj dokument se stalno ažurira, a sadrži sve smernice za izbor testova koji se koristi za procenu bioloških odgovora relevantnih za medicinske ili stomatološke materijale i sigurnost medicinskih sredstava (tabela 5) [*Helmus et al., 2008*].

### 2.4.3. Testovi za ispitivanje biokompatibilnosti materijala

U tabeli 6 prikazane su vrste biokompatibilnosti koje treba da se okarakterišu u svakoj kategoriji biomaterijala. Ova razmatranja su opšta, a vrsta biokompatibilnosti pre svega zavisi od prirode materijala (npr. biostabilni ili biorazgradibilni) i aplikacije (npr. aplikacija u meka tkiva, krv, ili tvrda tkiva). Problemi koji su izneti su oni od posebnog značaja za tu kategoriju materijala. Fizički integritet i nebiokompatibilnost imaju značajan uticaj na bezbednost primene i efikasnost primenjenih medicinskih sredstava i zbog toga su rangirani u ovoj tabeli. Tabela uključuje i osnovne podatke o ispitivanju biokompatibilnosti karbonskih materijala (odnosi se na staklaste karbone) i kompozita. Danas se intenzivno ispituje mogućnost aplikacije u ortopediji novijih kompozita KV i plastike dobijenih bioinženjerstvom. Smatra se da ovi kompoziti imaju potencijal za upotrebu kao strukturne komponente za veštačko srce i srčane zalistke [*Helmus et al., 2008*].

Smernice ISO 10993 sadrže preporuke standardne prakse za biološku evaluaciju biomaterijala. Ukratko, tu spadaju: (A) dužnost proizvođača materijala namenjenoj za upotrebu u živom organizmu da odabere odgovarajuće testove na osnovu namene materijala, i da sazna i prihvati profil toksičnosti materijala ili njegovih komponenti; (B) proizvođač može izabrati jedan

od tri testa citotoksičnosti, koji ima prednosti nad drugima zbog troškova, iskustva ili iz drugih razloga; (C) generalno, postoje četiri nivoa testiranja – testiranje inicijalne citotoksičnosti, sekundarni tkivni skrining-testovi, opsežni eksperimenti na životinjama i klinička ispitivanja; (D) rezultate testa uvek treba vrednovati i tumačiti uzimajući u obzir upotrebu materijala koju je naveo proizvođač.

Tablica 2.5. Međunarodni standard ISO 10993.

Standard	Naziv
ISO 10993-1	Smernice za odabir testova
ISO 10993-2	Zahtevi za dobrobit životinja
ISO 10993-3	Ispitivanja genotoksičnosti, karcinogenosti i reproduktivne toksičnosti
ISO 10993-4	Odabir testova za interakcije sa krvlju
ISO 10993-5	Testovi za citotoksičnost: metoda <i>in vitro</i>
ISO 10993-6	Testovi za lokalne efekte posle ugradnje
ISO 10993-7	Ostaci sterilizacije etilen-oksidom
ISO 10993-8	Povučen: kliničko ispitivanje medicinskih sredstava
ISO 10993-9	Procena biodegradacije medicinskih sredstava
ISO 10993-10	Testovi za iritaciju i preosetljivost
ISO 10993-11	Testovi za sistemsku toksičnost
ISO 10993-12	Priprema i referentni materijali
ISO 10993-13	Identifikacija i kvantifikacija degradacije proizvoda od polimera
ISO 10993-14	Statični test za kvantitativnu degradaciju keramike <i>in vitro</i>
ISO 10993-15	Identifikacija i kvantifikacija degradacije proizvoda od metalnih materijala koji se koriste u medicinske svrhe
ISO 10993-16	Toksiko-kinetičko ispitivanje dizajna za degradaciju proizvoda i ispiranje
ISO 10993-17	Ostaci glutaraldehida i formaldehida u industrijski sterilisanim medicinskim sredstvima
ISO 10993-18	Karakterizacija materijala
ISO 10.993-19	Fizičko-hemijska, morfološka i topografska karakterizacija materijala
ISO 10.993-20	Načela i metode za ispitivanje imunotoksikologije medicinskih sredstava

Tabela 2.6. Primeri biokompatibilnosti [*Helmus et al., 2008*].

	Kategorija biomaterijala									
	Sintetički	Biodegra- dabilni	Iz tkiva	Iz prirode	Sa neaktiv. omotačem	Sa aktivnim omotačem	Metali i legure	Keramika i karboni	Kompoziti	Nanomater.
BIOKOMPATIBILNOST										
ADME, biodegradacija nusprodukti, biodepozicija		+	+	+		+		+		+
Bioaktivnost			+	+		+	+	+		+
Biodegradacija čestica		+		+		+				
Biodegradacija efekat infekcije, kiseli pH		+	+	+		+				
Biodegradacija efekat hematoma, bazni pH		+	+	+		+				
Kalcifikacija	+		+	+		+				
Čelijska membrana i prolazak kroz krvno-moždanu barijeru										+
Čelijska vijabilnost (krioprezerviran alograft)			+							
Nusprodukti korozije							+			
Citotoksični konzervansi			+							
Decelularizacija			+							
Mogućnost ekstrakcije	+	+	+	+	+	+			+	
Reakcija hipersenzibilizacije	+		+	+		+	+		+	
Imunološki odgovor			+	+		+				
Infekcija: bakterije, virusi, gljivice, prioni			+	+		+				
Unos lipida	+		+	+					+	
Podudarnost sa biomehani-kom originalnog tkiva			+				+	+	+	
Nekroza, apoptoza										+
Čistoća				+		+				
Apsorpcija proteina: hidrofilna	+				+					
Apsorpcija proteina: hidrofobna	+				+					
Rezidue sterilizacije	+	+	+	+	+	+				
Izloženost površine složenih									+	

čestica										
Fagocitoza od strane RES										+
Tromborezistentnost		+		+		+			+	
FIZIČKI INTEGRITET										
Biostabilnost	+		+	+	+	+	+	+	+	+
Oblaganje površine						+		+		
Korozija:								+		
Karijes, trenje, stres										
Unakrsni efekti na svojstvima			+	+						
Trajnost	+		+		+	+			+	+
Otpornost na zamor	+	+						+	+	+
Fraktura										
Vreme curenja <i>in situ</i> : koštani cement, tkivni adhezivi	+					+			+	+
Stopa biorazgradnje: površina			+						+	
Stopa biorazgradnje: zapremina			+	+	+					
Habanje	+				+			+	+	

Legenda: ADAM – apsorpcija, depozicija, ekskrecija i metabolizam; RES – retikuloendotelni sistem.

#### **2.4.4. Biokompatibilnost ugljeničnih materijala i, posebno, karbonskih vlakana**

U ugljenične materijale spadaju svi prirodni i veštački proizvodi koji se sastoje od preko 90% ugljenika i koji u osnovi imaju slojevitu, grafitnu, strukturu. U poslednjih trideset godina razvijen je niz tehnologija dobijanja savremenih ugljeničnih materijala sa širokim spektrom osobina koje određuju njihovu primenu. Različite osobine ugljeničnih materijala je moguće dobiti, ako se proces dobijanja vodi na taj način, da se favorizuje bilo jedna ili kombinacija više specifičnih karakteristika ugljenične strukture.

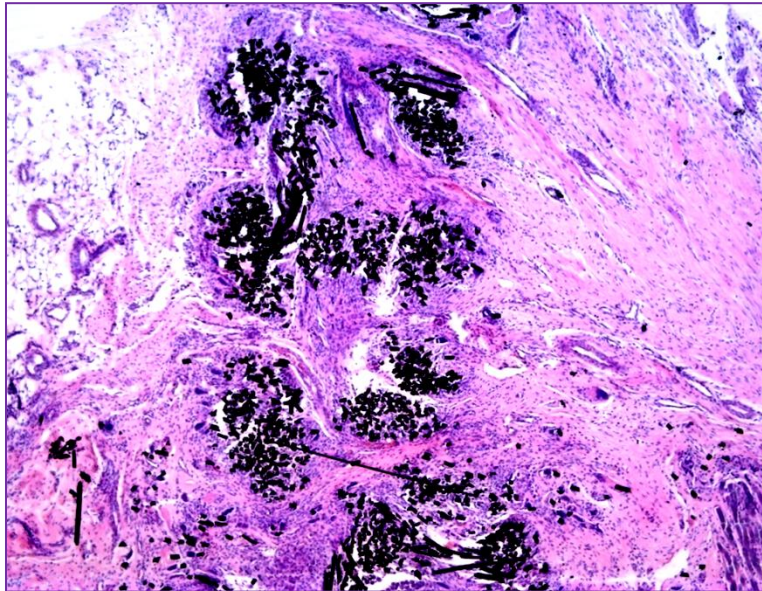
Danas se u medicini koristi niz različitih ugljeničnih materijala od kojih se komercijalno ili još uvek na eksperimentalnom nivou proizvode delovi za implantaciju. Među ovim materijalima najznačajniji su: elektrografit, elektrografit impregnisani organskim polimerima ili silicijumom, pirokarbon, staklasti ugljenik, ugljenična vlakna i karbon-karbon kompoziti.

Od svih reakcija organizma na strano telo najbrži letalno proces je zgrušavanje krvi na površini stranog tela. Krajem šezdesetih godina je slučajno primećeno da površine nekih ugljeničnih materijala imaju dragocenu osobinu da ne izazivaju koagulaciju [Haubold and Norman, 1977]. Posle ovog otkrića, započela su proučavanja veze između brzine koagulacije krvi na površini ugljeničnih materijala i kristalne strukture, izgleda i hemijskih karakteristika površine. Višegodišnja istraživanja u laboratorijskim uslovima, na životinjama i u kliničkom radu, pokazala su da su ugljenični materijali tromborezistentni, mada promene na njihovoj površini do kojih dolazi u kontaktu sa krvlju, nisu još uvek potpuno objašnjene.

Ispitivanje biokompatibilnosti ugljeničnih materijala sa mekim tkivima i kostima nisu dala definitivne rezultate, zbog toga što su u ovom slučaju reakcije organizma mnogo sporije. Višegodišnja ispitivanja na životinjama, i naknadna primena ugljeničnih implantata kod ljudi, pokazala su da pri ugradnji ugljeničnih materijala organizam uglavnom ne pokazuje reakciju na strano telo. Ovako dobra biokompatibilnost može da se objasni činjenicom da je ugljenik jedan od osnovnih sastojaka organskih materija organizma.

Danas se ugljenični materijali koriste u kardiovaskularnoj hirurgiji za izradu srčanih zalistaka, ortopediji [sanacija odlomnih fraktura, zamena delova kosti, hirurgija zglobova (karbonske endoproteze), tetiva i ligamenata (kompletna zamena ili poboljšanje poremećene strukture, elastičnosti i jačine tetiva i ligamenata)], hirurgiji neurokranijuma (sanacija defekta pločastih kostiju lica i svoda lobanje), hirurgiji mekih tkiva [rekonstrukcija defekta potkožnog i

mišićnog tkiva, hirurgiji hernija - izrada karbonskih mrežica (slika 2.8)] i stomatologiji (izrada ležišta nosača zuba i sl.).



Slika 2.10. Karbonska mrežica implantirana u ingvinalnu regiju zamorca (H&E, x 4).

## 2.5. PRIMENA KARBONSKIH VLAKANA U HUMANOJ I VETERINARSKOJ MEDICINI

### 2.5.1. Primena karbonskih vlakana u medicini

U nauci je veoma aktuelno, već niz godina, ispitivanje biokompatibilnih materijala koji služe kao potpora organizmu kod rekonstrukcije tkiva. Ti materijali moraju ispuniti rigorozne standarde kako biokompatibilnosti, tako i mehaničkih karakteristika.

#### **Korišćenje implantata od karbonskih vlakana ili materijala ojačanih karbonskim vlaknima u sanaciji fraktura kostiju udova i kostiju glave**

Za fiksaciju *koštanih fraktura u ortopediji* koriste se najčešće metalni implantati – npr. titanijumske pločice. Međutim, neka istraživanja su pokazala da implantati od poli-eter-eterketona (PEEK) ojačani karbonskim vlaknima (CFB-PEEK) imaju niz prednosti u odnosu na konvencionalne metalne implantate. Radiotransparentnost je bolja od metalnih implantata, dok kod radiografskog snimanja nema artefakata [Hak et al., 2014; Steinberg et al., 2013; Tarallo et al., 2014; Xu et al., 2015]. Modul elastičnosti odgovara vrednosti za kost, dok je zatezna



čvrstoća veća od većine metalnih implantata [Hak et al., 2014]. Smatra se da je CFB-PEEK adekvatan material kod ortopedskih intervencija zbog njegove biokompatibilnosti, mehaničkih osobina, dužine trajanja implantata i manje mogućnosti pojave alergija u odnosu na metalne implantate [Tarallo et al., 2014; Li et al., 2015]. Vrlo efikasnom pokazala se klinička primena pločica za osteosintezu izrađenih od CFB-PEEK kod sanacije *fraktura proksimalnog dela humerusa* i *distalnog dela radiusa* [Katthagen et al., 2016; Behrendt et al., 2017]. Međutim, zaključak o tome da li implantati za osteointegraciju izgrađeni od CFR-PEEK manje pucaju od metalnih, nije definitivno izveden. Naime, neka istraživanja na kadaverima ukazuju na mogućnost pucanja pri torziji pločica izgrađenih od CFR-PEEK i primenjenih kod *frakture distalnog dela fibule*, pa stoga daju prednost implantatima izgrađenim od nerđajućeg čelika [Wilson et al., 2016]. Takođe, biomehanička ispitivanja su pokazala manju fiksacionu snagu CFB-PEEK u poređenju sa titanijumskim pločicama [Schliemann et al., 2017], a slično tome, nije uočena značajna razlika u otpornosti na pucanje potpornih šrafova napravljenih od titanijum-PEEK i CFB-PEEK [Neumann et al., 2014].

Upotreba intramedularnih (IM) klinova u sanaciji *dijafiznih fraktura* osnovni je način stabilizacije koštanih fragmenata i konvencionalno se vrši IM klinovima izgrađenim od titanijumskih legura. IM klinovi za osteosintezu izrađeni od KV su aksijalno fleksibilni, relativno kruti na savijanje i uvijanje i dovoljno jaki u svim vrstama fizioloških opterećenja, pa mogu biti dobra alternativa za IM klinove izrađene od titanijumskih legura [Samiezadeh et al., 2016].

*Kranioplastika* korišćenjem implantata izgrađenih od polimera ojačanih KV (CFRP) i dizajniranih CAD/CAM tehnikom ili proizvedenih stereolitografijom, pokazala se dobrim izborom, pogotovo kod pacijenata sa *velikim defektima u fronto-orbitalnoj i temporo-zigomatičnoj regiji*. Ovakav operativni pristup garantovao je kraće vreme operacije, kao i dobre funkcionalne i estetske rezultate [Saringer et al., 2002; Wurm et al., 2004]. Opisana je i rekonstrukcija *defekata i malformacija u maksilofacijalnoj regiji* upotrebom polimera od KV i sintetičkih materijala ojačanih ovim vlaknima [Ying, 1985; Zeilhofer et al., 1997].

Uspešna terapija intramedularnog *osteomijelitisa dugih kostiju* je veoma kompleksna jer su pacijenti najčešće sa imunodeficijencijom i jer zahteva višestruke hirurške intervencije. Terapija se zasniva na primeni antibiotika (sistemski ± lokalno), na hirurškom odstranjivanju infektivnih zona i stabilizaciji kosti. Od kako je opisana 2002, metoda primene „noktiju“ obloženih antibiotikom postala je značajna metoda za terapiju osteomijelitisa, ali je njena

primena na žalost limitirana, zbog tehničkih problema u proizvodnji i artefaktima na magnetnoj rezonanci. Međutim, klinovi od KV prekriveni antibiotikom mogu biti dobro rešenje za terapiju osteomijelitisa, s obzirom da omogućavaju stabilizaciju sa jedne, i lokalnu distribuciju visokih doza antibiotika, sa druge strane [Mauffrey et al., 2016].

### **Implantati od karbonskih vlakana i terapija oboljenja kičmenog stuba**

*Zamena dela tela oštećenih pršljenova i lumbalna međupršnjenska fuzija* polimernim implantatima ojačanim KV nudi nekoliko prednosti u poređenju sa konvencionalnim metalnim implantatima: veliki izbor različitih implantata, dobra biološka i mehanička svojstva i bolje praćenje implantacije jer nema ometanja radiografske procene koštane fuzije [Ciappetta et al., 1997; Sardar and Jarzem, 2013]. U hirurgiji *anteriorne korpektomije* pokazano je da CFB-PEEK može da sadrži mnogo više graft-materijala u odnosu na standardni alograft fibule. Sposobnost materijala da sadrži veću količinu grafta kod korpektomije značajno poboljšava brzinu fuzije [Heary et al., 2016].

Implantati od KV našli su primenu u terapiji *cervikalne mijeloradikulopatije* [Tancredi et al., 2004], *posteriorne lumbalne međupršljenske fuzije* [Brantigan and Steffee, 1993; Vavruch et al., 2002; Stromberg et al., 2003] i kod revizije istim postupkom nakon hirurģije diskus hernije [Chitnavis et al., 2001]. Nakon endoskopske L5-S1 *anteriorne lumbalne fuzije* korišćenjem implantata od KV, rezultati dvogodišnjeg praćenja pacijenata pokazali su da je stepen fuzije nizak, ali je klinička slika u poređenju sa preoperativnim stanjem značajno poboljšana [Pellisé et al., 2002]. Opisana je uspešna *cirkumferencijalna fuzija* lumbalnih i lumbosakralnih pršljenova upotrebom pločica od KV [Zelle et al., 2002]. Implantati od KV koriste se dosta uspešno već dugi niz godina u *anteriornoj cervikalnoj fuziji* nakon *anteriorne cervikalne diskektomije (ACD)* [Brooke et al., 1997]. Takođe, kod ACD, implantat od KV sa osteofitima prikupljenim lokalno sa kosti tokom operativnog zahvata, pokazao se kao siguran, efikasan i tehnički odgovarajući postupak kod navedene intervencije [Salame et al., 2002]. Međutim, posebna pažnja mora da se obrati na oblik implantata, jer neadekvatan oblik može da dovede do lordoze [Bartels et al., 2001; 2006]. Slično tome, implantati od KV kao kavezi koji sadrže koralni HAP, efikasni su u zameni kosti kod *anteriorne cervikalne fuzije* kod pacijenata sa *cervikalnom discus hernijom* nakon mikrohirurģske diskektomije. Kod pacijenata sa ovim implantatima, 12 meseci nakon intervencije registrovana je kompletnu fuzija bez znakova deformiteta, protruzije i pseudoartroze

i nije bilo paloške absorpcije kosti i nekroze [Agrillo et al., 2002]. ACD i anteriorna cervikalna fuzija je i najčešća hirurška tehnika kojom se sanira *cervikana spodiloza*. Pored autologe kosti, koja je zlatni standard u postizanju fuzije, koriste se i alternativni materijali, među kojima se izdavaju KV, titanijumski šrafovi, keramički implantati, implantati od plastike ojačani karbonskim vlaknima i implantati bazirani na PEEK [Früh et al., 2002; Chong et al., 2016]. Implantati od KV popunjeni hidroksiapatitom (HAP) koriste se kod sanacije *cervikalne spondilodiskartroze*. Postoperativno praćenje 167 pacijenata pokazalo je dobre rezultate i zadovoljavajući stepen fuzije [Marotta et al., 2011]. Međutim, danas se smatra da su kod ACD i fuzije implantati od nanokristalnog hidroksiapata (nHA) dobra alternativa implantatima od KV i PEEK [Timothy et al., 2016].

Implantati od KV dobar su izbor kod rekonstrukcije tkiva u slučajevima vertebrektomije ili korpektomije u *hirurgiji tumora i trauma*. Prednost ovih imlantata je bolja fleksibilnost u poređenju sa metalnim, rana inkorporacija grafta, brže zarastanje kosti, radiotransparentnost i nedostatak rizika od prenošenja infekcije [Claes, 1989; Boriani et al., 2002; Vavruch et al., 2002; Morrow, 2016]. Prilikom otklanjanja tumora na kičmi i dekompresije kičmene moždine, uspešno je primenjen implantat od polisulfona ojačanog KV na mestu otklonjenog tela pršljena [Burri et al., 1989]. Radiotransparentnost ovog materijala je prednost u poređenju sa metalnim implantatima kod kojih postoji problem refleksije, i ova osobina omogućava tačnu kalkulaciju postoperativne doze zračenja tumora. Eksperimenti na životinjama i klinička istraživanja pločica, šrafova, kao i zamene spinalnih segmenata implantatima od polisulfona ojačanih KV, pokazali su dobre rezultate [Claes, 1989]. Međutim, prilikom ugradnje *leopard* međupršljenskih implantata od KV kod spinalne fuzije, treba voditi računa o pozicioniranju implantata, jer njegova ugradnja može dovesti do poremećaja biomehanike [Quigley et al., 2008].

### **Eksterni fiksatori od karbonskih vlakana u sanaciji koštanih preloma**

Karbonska vlakna su se pokazala kao dobar materijal za izradu eksternih fiksatora. Tako je kod 90-godišnjeg pacijenta sa subtrohanteričnim prelomom i prisustvom brojnih koštanih fragmenata, postavljanjem eksternog fiksatora od KV postignuta uspešna fiksacija, a ugradnjom Shanzovih šrafova sanirane su frakture [Atik et al., 2016]. Takođe, opisana je sanacija frakture karlice pomoću privremenih eksternih fiksatora izgrađenih od KV, koji su postavljeni pomoću supra-acetabularnih Schanzovih šrafova [Queipo-de-Llano et al., 2016].

## **Primena proteza i ortoza izgrađenih od kompozita sa karbonskim vlaknima**

Postoje brojni napori istraživača da se nađu alternativna rešenja za komercijalne metalne *proteze za kuk*. Jedna od njih je i izrada proteza kuka od kompozita koji sadrže KV i poliamid. Međutim, ispitivanje mehaničkih karakteristika proteza izrađenih od ovog kompozita pokazalo je da su otpornost na pritisak i krutost niži u poređenju sa standardnim komercijalnim metalnim protezama [Bougherara et al., 2011]. Slično je pokazala i procena mehaničkih karakteristika modela kuka napravljenog od kompozita PEEK/karbonska vlakna. Naime, zabeleženo je i do 40% povećanje stresa u proksimalnim delovima femura kod kompozitnih implantata u poređenju sa metalnim [Dworak and Błażewicz, 2016].

Nakon *parcijalne amputacije stopala* kod 20-godišnjeg pacijenta izrađena je parcijalna proteza od KV kao ortoza koja je podržavala plantarni deo stopala. Ova ortoza je kod navedenog pacijenta poboljšala snagu, kinetiku i kinematiku zglobova tokom šetnje [Lalberge-Malo et al., 2016]. Danas se uspešno primenjuju i *ortoze skočnog zgloba* izgrađene od KV [Sheehan and Figgins, 2016]. Proteza sa KV može biti dobar izbor obuće kod pacijenata sa *transmetatarsalnom amputacijom* [Tang et al., 2004]. CFR-PEEK predstavlja mogući alternativni materijal za primenu u *totalnim protezama kolena*, posle rane kliničke neuspešnosti primene polietilena u tim protezama [Schierjott et al., 2016].

Prva klinička iskustva sa *ortozama od KV kod neuromišićnih bolesti i oštećenja CNS* pokazala su dobre rezultate. Studija kojom su praćena 283 pacijenta sa neuromišićnom slabošću u distalnim delovima nogu, kojima je postavljena ortoza za skočni zglob izgrađena od KV, kao i studija na 478 pacijenata sa karbonskim ortozama koleno-skočni zglob-stopalo, pokazale su značajno kliničko poboljšanje upotrebom navedenih pomagala [O'Connor et al., 2016; Mnatsakanian et al., 2017].

Kod pacijenata nakon *enukleacije očne jabučice*, implantacija *proteze* od karbonskih tkanina izaziva urastanje vezivnog tkiva između vlakana implantata bez znakova inflamacije, dobru vaskularizaciju tkiva i formiranje vezivnotkivne kapsule oko celog implantata [Filatova et al., 2006].

## **Karbonska vlakna u rekonstrukciji oštećenih tetiva i ligamenata**

Pionirski pokušaji *plasiranja pletenice od KV u vidu veštačkog ligamenta* kroz vrat i glavu femura, zatim kroz karlicu i fiksacija na mestu gde je pozicioniran *lig. teres*, pokazao se

uspešnim u stabilizaciji dislokacije kuka kod pacijentkinje sa paraplegijom [Aithal and Jenkins, 1992].

*Rupturu Ahilove tetive* moguće je sanirati resorptivnim polimernim kompozitom sa KV. Pri tome implantirani materijal ponaša se kao matrica za rast kolagenog tkiva, pa je jačina sanirane tetive obezbeđena implantatom i novoformiranim tkivom; debljina novoformirane tetive iznosi 148% normalne debljine, a prosečna jačina mišića doseže 88% fiziološke vrednosti [Howard et al., 1984; Parsons et al., 1989]. Kod saniranja *hronične nestabilnosti skočnog zgloba* modifikovanom Evansovom tenodezom ili zamenom lateralnog ligamenta skočnog zgloba KV, obe primenjene metode daju slične rezultate [Becker et al., 1996].

*Rekonstrukciju ligamentum coracoclaviculare* KV uspešno se sprovodi kod pacijenata sa akromioklavikularnom dislokacijom [Milka et al., 1994].

Prva velika klinička studija o zameni *ligamenta kolena* kod 82 pacijenta ligamentima od karbonskih polimera, pokazala je značajno poboljšanje stabilnosti, odsustvo bola, poboljšanje funkcije i snage zgloba u periodu praćenja od 24 meseca. Artroskopskim pregledom i histološkim ispitivanjima uočeno je dobro vaskularizovano tkivo uraslo u implantat [Weiss et al., 1985]. Rezultati desetogodišnjeg praćenja ovakvih pacijenata pokazali su efikasnost primene KV u zameni ligamenta kolena [Hehl et al., 1997]. Takođe, izvedena je i uspešna rekonstrukcija implantatima od KV prednjeg *talofibularnog i kalkaneofibularnog ligamenta* [Kinzl et al., 1983]. Međutim, istovremeno su se pojavila istraživanja koja su pokazala da prilikom rekonstrukcije *lateralnog kolateralnog ligamenta kolena* kod ljudi, implantirana KV izazivaju kontinuiranu iritaciju tkiva, s obzirom da su obavijena konzistentnom tkivnom strukturom sačinjenom od fibroblasta i kolagenih vlakana, pa se postavilo pitanje opravdanosti njihove primene kod ove indikacije [Mendes et al., 1985]. U tom smeru išli su i rezultati studije o rekonstrukciji *anteriornog krucijatnog ligamenta* kod 37 pacijenata 8 godina nakon implantacije KV, koja je na osnovu primene fizičkih testova, Lysholmove procene i radiografskog snimanja, pokazala izostanak očekivanog kliničkog poboljšanja [Mäkisalo et al., 1996].

### **Karbonska vlakna u rekonstrukciji osteohondralnog defekta i sanaciji osteoartritis**

Lezije *hrskavice kolenog zgloba* najčešće nastaju sekundarno, kao posledica traume ili degenerativnih promena [Avramović i Todorović, 2012]. Unutrašnji potencijal za zaceljenje lezije je mali, a spontana regeneracija izostaje. Iz tog razloga, ulažu se permanentni istraživački

napori da se nađu efikasni terapijski modaliteti za rešavanje ovog problema, među kojima su i implantacija karbonskih mrežica i karbonskih kočica od poliakrilonitrila, kao i različite hirurške tehnike. Značajan hirurški postupak u lečenju malih artikularnih hrskavičnih lezija je postupak stimulacije matičnih ćelija koštane srži koji se postiže abrazionom hondroplastikom i mikrofrakturama [Dasar et al., 2016].

Na mesto *ostehondralnog defekta kolenog zgloba* kod ljudi i životinja mogu se implantirati karbonske mrežice. Nakon implantacije, mrežica se prožima strukturno jakim i solidnim fibroznom tkivom i uglavnom ne izaziva sinovijalnu reakciju [Muckle et al., 1990]. Matrica od KV korišćena je i u *sanaciji ranog osteoartritisa kolenog zgloba* kod mladih i srednjovećnih pacijenata, a rezultati prospektivne četvorogodišnje studije praćenja pokazali su zadovoljavajuće rezultate [Brittberg et al., 1994]. Međutim, ispitivanje dugoroćnih efekata implantata od KV kod pacijenata koji su patili od hroniće nestabilnosti kolena, pokazalo je da su KV prouzrokovala hroniću inflamatornu reakciju [Deshmukh and Hui, 2001; Debnath et al., 2004]. Zato se danas u rešavanju ovog problema prednost daje tehnici mikrofraktura. Ona indukuje hemoragiju u zoni lezije i dovodi do aktivacije matičnih ćelija iz subhondralne zone koje proliferacijom i diferencijacijom za 6 do 8 nedelja nadomešćuju defekt fibroznom hrskavicom. Radi se o brznoj i jeftinoj tehnici koja ne zahteva primenu implantata [Dasar et al., 2016].

### **Kočići od karbonskih vlakana u nadogradnji zuba i zubne proteze ojaćane KV**

Osnovu za rekonstrukciju endodontski tretiranih zuba mogu obezbediti metalni ili nemetalni kočići. Naime, poznato je da se u nadogradnji zuba pored kočića od titanijuma i staklastih vlakana, PEEK, koriste i karbonska vlakna [Glazer, 2000; Ferrari et al., 2007; Nauman et al., 2007; Amaral et al., 2015; Bolla et al., 2016], ali do danas, ni nakon sistematskih ispitivanja, nije precizirano koje tipove kočića treba koristiti u cilju najefikasnije rekonstrukcije [Bolla et al., 2016]. Jedna studija na uzorku od 139 zubnih nadogradnji izvedenih pomoću kočića od KV, pokazala je da nakon trogodišnjeg perioda kliničkog praćenja pacijenata, nisu zabeleženii gubitak, tj. fraktura kočića, niti centralne tj. vertikalne / horizontalne frakture korena i sekundarni karijes [Amaral et al., 2015]. Slične rezultate dobili su i drugi autori [Glazer et al., 2000]. Neuspeh intervencije registrovan je kod 5,35% slučajeva nakon 8 godina od ugradnje kočića od KV [Piovesan et al., 2007], tj. 8% nakon 7-11 godina od ugradnje [Ferrari et al., 2007].

Međutim, ispitivanja *in vitro* kako postavljanje karbonskih kočica od KV, staklastih vlakana i smola utiče na otpornost na frakture endodonski tretiranih sekutića maksile sa cervikalnim kavitetom kod ljudi, pokazala su da staklasti kočici značajno poboljšavaju otpornost na frakturu ovih zuba [Abduljawad et al., 2016]. Međutim, kod sličnog ispitivanja efekta postavljanja vlaknastih kočica na otpornost na frakture endodonski tretiranih sekutića maksile klase III, zaključeno je da vlaknasti kočici nisu uticali na otpornost na frakturu endodonski terapiranih sekutića maksile sa restoracijom klase III, tj. da otpornost nije zavisila od ispitivanog materijala od kojeg je kočic izgrađen [Abduljawad et al., 2016a].

Ponovno oživljavanje koncepta imedijatnog opterećenja i modernih saznanja u implantnoj protetici, doveli su do uvođenja koncepta „All-on-Four“. Karakteristike ovog koncepta su: 1) kompletna rehabilitacija sa samo četiri implantata i to dva prava i dva pod uglom od 30 stepeni; 2) imedijatno opterećenje u roku od 24 h od postavljanja implantata i 3) izbegavanje procedura augmentacije alveolarnog grebena maksimalnim iskorišćavanjem raspoložive zubne kosti, što tretman ovim konceptom treba da učini manje bolnim, bržim i jeftinijim. Procena kliničkog efekta privremenih „All-on-Four“ proteza kod 60 pacijenata sa 71-om privremenom protezom (28 maksila i 43 mandibula) pokazala je da je dodatak od KV između nosača postavljenih na „All-on-Four“ privremenu fiksnu protezu, klinički efikasan u prevenciji fraktura proteze, što je važno za njihovu kliničku upotrebu [Li et al., 2016]. Slično tome, ispitivanja bioloških i mehaničkih karakteristika implantno nošenih kompletnih proteza ojačanih okvirom od kompozita KV, pokazala su optimalnu biokompatibilnost i mehaničke karakteristike, te stoga mogu biti uspešna zamena implantno nošenim kompletnim protezama ojačanim metalom [Menini et al., 2017, Pera et al., 2017]. Ove proteze pokazuju manji gubitak marginalne kosti oko implantata i duži vek trajanja implantata u odnosu na metalne proteze [Pera et al., 2017].

U ekspanziji su istraživanja za novim zubnim implantatima od karbonskih kompozita i već su dobijeni prvi povoljni rezultati [Petersen et al., 2014; Maté Sánchez de Val et al., 2016]. Karbonska vlakna daju PEEK dentalnim implantatima jaku stabilnost [Schwitalla et al., 2015, 2015a; 2016], a višeslojne TiO<sub>2</sub> nanostrukture kojima su obloženi CFR-PEEK implantati, selektivno pojačavaju integraciju mekog tkiva gingive i implantata i inhibiraju rast bakterija [Wang et al., 2016].

### **Implantati od karbonskih vlakana u sanaciji dekubitusnih rana**

Neke studije su pokazale da se mekotkivni defekti nakon sanacije dekubitusnih rana kod ljudi mogu uspešno tretirati implantatima od KV. Tako je jedna studija obuhvatila praćenje 20 pacijenata u periodu od 4-8 godina nakon implantacije karbonskih vlakana na prethodno sanirano mesto dekubitusne rane (u predelu *os ishii* i *trochantera*). Sedam implantata kod četvoro pacijenta je zbog oštećenja i infekcije moralo biti uklonjeno, dok kod 16 pacijenata sa 18 implantata u periodu praćenja narednih 4-8 godina nije bilo komplikacija [Minns et al., 1991].

### **Karbonska vlakna i antimikrobna odeća**

Patogene bakterije su značajni uzročnici različitih oboljenja u čitavoj svetskoj populaciji. Poslednjih godina ulažu se značajni naponi u pronalaženju antimikrobnih materijala koji bi sprečili ulazak bakterija iz spoljašnje sredine u ljudski organizam. Takvi materijali su komercijalna KV sa nanostrunama od telurijuma, za koja je dokazano da poseduju odlična antibakterijska svojstva i biokompatibilnost, pa se smatra da će u bliskoj budućnosti naći primenu u proizvodnji antimikrobne odeće [Chou et al., 2016].

### **Karbonska vlakna kao model za praćenje mijelinizacije pomoću Švanovih ćelija, usmerene migracija prekursora glija ćelija i podsticanja izrastanja aksona**

Karbonska vlakna suspendovana u medijumu mogu da se koriste za praćenje mijelinizacije perifernih nerava. Naime, pojedinačno vlakno koje nije u dodiru sa zidovima posude za kultivaciju, služi kao matrica na koju se obmotavaju humane Schwanove ćelije, pri čemu je pokazano da i nakon 9 dana ove ćelije zadržavaju vitalnost i eksprimiraju mijelin-bazni protein i mijelin-glikoprotein. Zatoa se smatra da navedeni model može umnogome da doprinese razumevanju procesa mijelinizacije/ demijelinizacije, kao i da može biti esencijalan za tkivni inženjering u regeneraciji nerva [Merolli and Kohn, 2017]

Funkcionalizovana elektroaktivna KV (nastala kovalentnim vezivanjem *poly(4-styrenesulfonic acid)-co-(maleic acid)* na elektroaktivnu površinu vlakana) mogu da budu multifunkcionalan model za kontrolu interakcije neurona i glije i podsticanje reparacije neurona [Collazos-Castro et al., 2016].

Mikroelektrode modifikovane sa karbonskim nanotubama (CNTs) mogu da se koriste za detekciju neurotransmitera (uključujući i dopamin), zato što CNTs pojačavaju senzitivnost i



imaju elektrokatalitički efekat. Studija Yanga i sar. je pokazala sa CNT- mikroelektrode, naročito one obložene niobijumom, mogu da budu veoma korisne u monitoringu stimulisano oslobađanja dopamina kod anesteziranih pacova [Yang *et al.*, 2016].

### 5.2.2. Primena karbonskih vlakana u veterinarskoj medicini

Eksperimentalna upotreba KV u medicini i veterini započela je još 70-ih godina prošlog veka. Vlakna su u početku ispitivana kao materijal za zamenu, tj. rekonstrukciju ligamenata i tetiva kod životinja [Valdez *et al.*, 1982]. Operativnim zahvatom tetive i ligamenti su odstranjivani i zamenjivani KV koja su služila kao matrica za formiranje novog ligamenta. Iskustva su bila različita, što se može videti po literaturnim podacima. Kasnije je njihova primena znatno proširena, slično kao i u humanoj medicini.

Uspeh u **zameni Ahilove tetive** kod ovaca i kunica implantatima od KV uglavnom nije bio zadovoljavajući. Ukoliko se kod zamene Ahilove tetive kod ovaca upotrebi implantat od poliestera, novoformirana tetiva u blizini poliesterskih vlakana je gušća, sa više kolagena i u boljem kontaktu sa tkivom, nego tetiva sa bazom od KV. Pored toga, fragmentacija KV izaziva kontinuiranu celularnu reakciju sa prisustvom makrofaga i multinuklearnih gigantskih ćelija, koja je uz edem prisutna i nakon godinu dana od hirurške intervencije [Amis *et al.*, 1984]. Ni zamena Ahilove tetive kod kunica implantatima od KV nije dala zadovoljavajuće rezultate [Foster *et al.*, 1978]. Mnogo veći uspeh pri implantaciji dobijen je sanacijom povređene Ahilove tetive kod kunića živom veštačkom tetivom koja je dobijena nakon kultivisanja autogenih ćelija tetive sa KV. Kolagena vlakna implantata su se povezala sa krajevima tetiva što je značilo da je implantat sanirao oštećenu tetivu. Ćelije tetive su pratile KV ravnomerno, dok su se kolagena vlakna povezala i formirala mrežu i bila su paralelna sa KV [Zhang *et al.*, 1997]. Međutim, u eksperimentima na pacovima, zamena Ahilove tetive implantatima od KV, 30 dana nakon intervencije izaziva pojavu džinovskih multijedarnih ćelija, fagocitozu fragmenata KV i proliferaciju krvnih sudova, fibroblasta i kolagenih vlakana, dok se tri meseca kasnije registruje skoro kompletno prožimanje vezivnog tkiva na mestu implantacije [Gerosa *et al.*, 1987].

Neka istraživanja na mladim kunićima pokazala su da se **zamena medijalnog kolateralnog ligamenta kolenog zgloba** može uspešno izvesti KV različite debljine. Tokom 12-nedeljnog istraživanja praćene su histološke promene na svetlosnom i elektronskom mikroskopu nakon implantacije KV. Rezultati su pokazali da se KV nezavisno od njihovog promera tokom

vremena fragmentišu, resorbuju i zamenjuju fibrozim tkivom. Postojala je korelacija između promene sile i povećane proizvodnje, orijentacije i organizacije novih kolagenskih fibrila, kao i istovremene fragmentacije KV [Gleason et al., 1984]. Zamena ligamenata kolenog zgloba kod ovaca pokazala je prožimanje implantata vezivnim tkivom, koje se tokom vremena umnožavalo bez znakova prateće resorpcije materijala [Neugebauer and Claes, 1983]. Zamena **anteriornog krucijalnog ligamenta** kod životinja implantatima od KV pokazala je takođe kontradiktorne rezultate. Studija na zamorcima pokazala je da su neka KV pucala izazivajući nestabilnost kolena, a fragmenti KV uzrokovali su hroničnu inflamaciju, dok su intaktna vlakna bila obavijena vezivnim tkivom [Amis et al., 1988]. Druga studija u kojoj je ispitivana mogućnost rekonstrukcije anteriornog krucijalnog ligamenta Novozenlandskih kunića pomoću različitih vrsta biokompatibilnih materijala (sama KV, karbonska vlakna i Dakron kompozit, sam Dakron i goveđi ksenograft), pokazala je da kod svih životinja, bez obzira na vrstu primenjenog implantata, postoji blagi sinovitis nakon 3, 6 i 12 meseci od implantacije, bez značajnog rasta ligamenta. Karbonska vlakna i ksenograft nisu dala zadovoljavajuće rezultate, dok su KV i Dacron kompozit doveli do progresivnog urastanja fibroznog tkiva uz inkorporaciju pojedinih vlakana u kost [Thomas et al., 1987]. Pokušaji zamene dela **patelarnog ligamenta** nakon resekcije implantatima od KV kod zamorca takođe nisu dali zadovoljavajuće rezultate. Histološkim ispitivanjem nije uočeno uklanjanje implantata fagocitozom, a karbonska vlakna su bila okružena gustim vezivnim tkivom nalik ožiljku. U dubokim slojevima karbonskog implantata nije registrovano vitalno gusto regularno vezivno tkivo čak ni nakon 3 i 12 meseci od implantacije. Nije došlo do zamene implantata novim ligamentom ili tetivom, ali je bila prisutna hronična inflamatorna reakcija tipa oko stranog tela. S obzirom na ovakve rezultate istaknuta je sumnja da se mogu očekivati zadovoljavajući efekti zamene ligamenata ili tetiva implantatima od KV [Rohe et al., 1986]. Slični rezultati dobijeni su i kod pasa. Naime, kliničko, laboratorijsko, histopatološko i biomehaničko praćenje zamene anteriornog krucijalnog ligamenta kolenog zgloba KV ili autograftom od *fascia lata* pokazalo je da jačina novoformiranog ligamenta nije dostigla jačinu fiziološkog kod obe primenjene procedure [Lesić et al., 1994]. Oko KV registrovano je dugo vremena nakon implantacije prisustvo limfocita i džinovskih ćelija i zaključeno je da KV nisu idealan veštački ligament [Lesić et al., 1995]. Suprotni podaci izneti su u drugoj studiji o primeni implantata od KV u sanaciji rupture kranijalnog krucijalnog ligamenta kolenog zgloba kod 52 psa. Tehnika postavljanja implantata bila je identična kao kod operativne

sanacije iste povrede s *fascia lata*. Rezultati su pokazali da su KV stimulisala urastanje fibroznog tkiva, a nakon dužeg vremena ona su se lomila i bivala okružena biološkim tkivom koje preuzima njihovu funkciju [Steyn, 1984]. Naime, novoformirana struktura oko implantata je vrlo konzistentna: u njenom centru nalaze se KV obavijena koncentričnim slojevima fibroblasta i kolagenih vlakana. Nakon godinu dana ovako zamenjena tetiva kod pasa imala je 88% prirodne čvrstoće na istezanje. Karbonska vlakna bez okolnog vezivnog tkiva zadržala su svoju izvornu čvrstoću, ali je njihovo izlaganje i probavljanje od strane komponenti okolnog vezivnog tkiva nešto umanjilo početnu čvrstoću na istezanje. Ipak, kontinuirana proizvodnja kolagenog tkiva koje okružuje KV produkovala je ligamentoznu strukturu koja je fiziološki kompatibilna i biomehanički adekvatna [Mendes et al., 1985b; Mendes et al., 1986].

Ispitivanje efikasnosti zamene implantatima od KV *tetiva fleksora* kod majmuna pokazalo je da je jačina, fleksibilnost i mogućnost stvaranje nove tkivne strukture nalik tetivi dobra osobina ispitivanog materijala, dok se kao nepovoljne osobine izdvajaju izazivanje fibroze i prateće povećanje samog implantata [Rawlins, 1983]. Karbonska vlakna su korišćena i za sanaciju povreda tetiva kod 46 konja starosti između 3 i 15 godina. Većina životinja je imala povrede površinskog digitalnog fleksora, dok je nekoliko konja imalo povrede suspenzornih ligamenata. Nakon oporavka, od 34 konja sa akutnim i hroničnim tendinitisom, 14 se vratilo trkama, 7 je korišćeno u lovu, a 7 za rekreativno jahanje. Rezultati ispitivanja su bili bolji nego kod materijala koji su ranije korišćeni za sanaciju navedenih povreda [Vaughan et al., 1985]. Kod konja je takođe uspešno primenjena terapija *dislokacije skočnog zgloba* implantacijom KV [Edwards and Vaughan, 1984].

Neka istraživanja pokazala su mogućnost uspešne zamene kod životinja *meniskusa* implantatima od KV. Kod rekonstrukcije arteficialne lezije velikog promera na meniskusu kolenog zgloba kod kunića, na mestu implantacije uočava se formiranje fibroznog tkiva, kao i sporadično formiranje fibrozne hrskavice, a urastajući fibroblasti pokazuju direktnu orijentaciju [Veth et al., 1983]. Slično je pokazano i u rekonstrukciji istih lezija kod pasa. Lezije su popunjavane graftom od polimera KV i poliuretan-poli(L-laktida). Nakon 8 nedelja nije bilo znakova infekcije, a rekonstruisana lezija je skoro upotpunosti popunjena fibroznim tkivom sa prisustvom hijaline hrskavice na pojedinim delovima [Veth et al., 1986]. U kasnijim eksperimentima na novozelanskim kunićima, medijalni meniskus zamenjen je sa polimernom bioprotezom od poliestera i KV. Nakon 3 i 6 meseci od intervencije, implantati su bili

inkorporisani u kapsulu sa minimalnom invazijom fibroznog tkiva na površini implantata. Obim fibrilacije zglobne hrskavice je bio značajniji u predelu gde je meniskus pokriven tibijom [Wood et al., 1990]. Do sličnih rezultata došli su i drugi autori [Curtin et al., 1994]. Mrežica od karbonskih vlakana dijametra 3 mm implantirana u *patelu* kunića u cilju ispitivanja mehaničkih karakteristika i histološke reakcije tkiva na implantirani materijal, pokazala je da je nakon 3 meseca od hirurške intervencije došlo do jake vaskularizacije kolagenog matriksa unutar i oko implantata koji je bio sigurno pričvršćen za kost i koji je pružao kontinuiranu potporu na zglobnoj površini. Formirana struktura je bila funkcionalna i bez znakova fragmentacije implantata [Minns and Muckle, 1989].

Karbonske mrežice od staklastog ugljenika preporučene su kao materijal za obnovu zglobne površine kod *osteoartritisa i osteohidroze dissecans*. U jednoj studiji korišćena je mrežica od staklastog ugljenika za intrartikularnu sanaciju *ostehondralnog defekta na kondilusu femura* kod kunića. Implantati su nakon 6 nedelja izazivali obnavljanje površine zgloba, koji je mehanički bio jak i otporan na opterećenje. Utvrđeno je da implantati podstiču zarastanje osteohondralnih defekata na femoralnom kondilu kod kunića podržavajući dobro organizovano hrskavičavo tkivo preko obnovljene subhondralne kosti [Kang et al., 1991]. Karbonska vlakna su pokazala dobre rezultate i u terapiji *ostehondralnog defekta na artikularnoj površini patele kod kunića*. Nakon šest meseci od operativnog zahvata defekt je bio popunjen fibroznim tkivom, čiji je superficijelni deo bio organizovan paralelno sa površinom zgloba. Nakon 9. i 12. meseca defekt je bio prekriven hijalinom hrskavicom. Smatra se da KV stimulišu hondroците u okolnoj hrskavici ili u njenim dugokim slojevima, a moguće je i da dovode do hondrogeneze iz nediferentovanih mezenhimanlnih ćelija subhondralne koštane srži ili sinovije [Carranza-Bencano et al., 2000].

Kao *implantati za srednje uho* ispitivani su staklasti ugljenik i ugljenik ojačan ugljениčnim vlaknima [CFRC]. Staklasti ugljenik je implantiran u srednje uho 20 pacova i praćen je 6 meseci, dok su implantati CFRC implantirani u srednje uho kod 98 zamoraca i praćeni su 4 meseca. Reakcije tkiva na implantaciju procenjena je stereoskopski i standardnim svetlosnim mikroskopom, kao i elektronskom mikroskopijom sa hemijskom analizom [EDAKS, VDAKS]. Rezultati su pokazali da staklasti karbon i CFRC mogu da se koriste u navedenu svrhu i da je moguće rezultate ekstrapolirati i na primenu kod ljudi [Blayney et al., 1986]. Kao implantat za

srednje uho kod mačaka moguće je primeniti kompozit od poli-tetra-fluoro-etilena i karbonskih vlakana (Proplast) [Teichgraeber et al., 1983].

Karbonska vlakna mogu da se uspešno koriste prilikom zamene *supraspinalnog i interspinalnog ligamenta* kod ovaca [Olesen et al., 1988].

Biokompatibilni materijali mogu da se koriste i u sanaciji *defekta mekih tkiva*. Tako je defekt cervikalnog dela traheje pasa saniran protezom izgrađenom od HAP i KV. Prsten od HAP na implantiranom materijalu je čvrsto srastao sa trahejom, dok je hrskavica traheje prožela makropore HAP [Takahama et al., 1988]. Komplikacije koje se mogu javiti prilikom ovakve intervencije su infekcija anastomoze na mestu implantacije proteze izgrađene od KV ili silikona [Qi et al., 1998]. Ukoliko se za rekonstrukciju velikih defekata vratnog dela traheje kod pasa koristi karbon-karbon kompozit, dolazi do pojave hipergranulacija i formiranja ožiljka na krajevima proteze, dok se na površini proteze stvara epitelno tkivo [Liu et al., 2010].

Injekcioni koštani cement može se posmatrati kao idealan materijal u *obnovi koštanog defekta*, s obzirom da se radi o osnovnoj gradivnoj materiji koštanog tkiva. Na žalost, loše mehaničke osobine, nedovoljna sposobnost geneze kosti i nedovoljna osteoinduktivnost ozbiljno ograničavaju njegovu kliničku primenu. Međutim, ukoliko se kalcijum-fosfatni koštani cement ojača s KV (CCPSC) i implantira u epifizu femura pasa rase Bigl radi praćenja osteokonduktivnost, kao i kada se isti materijal implantira intramuskularno u cilju praćenja osteoindukcije, KV značajno poboljšavaju mehaničke osobine primenjenog implantata. Pojava na heterotopičnim mestima osteoida već nakon mesec dana od implantacije ukazuje na osteoinduktivna svojstva materijala. Zaključeno je da je CCPSC moguća bioaktivna zamena za kost u određenim okolnostima [Zheng et al., 2015].

U *in vivo* eksperimentima na pacovima dokazana je daleko veća osteokondukcija primenom koštanih implantata od *bisfenilskih polimera ojačanih karbonskim vlaknima* u poređenju sa klasičnom legurom titanium-6-4. Fragmentacija KV na mestu implantacije, i pored izazivanja inflamacije, stimuliše izgradnju kosti i povećava integraciju kosti i implantata. Fabrikacija polimera na niskim temperaturama dozvoljava inkorporaciju minerala i farmaceutika, sa mogućim značajnim potencijalom u budućem tkivnom inženjerstvu. Zato se ovaj materijal smatra novim unapređenim materijalom za zamenu metalnih koštanih implantata [Petersen, 2011]. Poređenje koštanih klinova implantiranih u femur kod pasa, izgrađenih od *karbonskih kompozita* od kojih su jedni bili *obloženi HAP* a drugi ne, sa implantatima od titanijskih

legura sa poroznom površinom, pokazalo je da je osteointegracija bila veća kod klinova prekrivenih hidroksiapatitom u odnosu na neprekrivene. Test vađenja implantata, 7 meseci od hirurške intervencije pokazao je da titanijumska legura sa poroznom površinom ima najviše vrednosti smicanja i da je oko nje bilo najviše remodeliranja kosti [Maistrelli et al., 1992]. Ispitivanje međuprostorne snage smicanja **CFR/PEEK obloženog HAP**, *in vivo* u femuru kunića, pokazalo je da je oblaganjem HAP značajno povećana snaga smicanja između kosti i CFR / PEEK [Nakahara et al., 2012]. Rezultati praćenja primene koštanih šrafova od PEEK ojačanih karbonskim vlaknima i obloženih titanijumom [TI], postupkom raspršivanja plazme vakuumom ili fizičkim taloženjem, pokazali su da **šrafovi od CFR/PEEK presvučeni Ti** i implantirani u tibiju ovce značajno poboljšavaju apoziciju kosti i olakšavaju njihovo kasnije uklanjanje, u poređenju sa neprevučanim CFR/PEEK koštanim šrafovima [Dewine et al., 2013]. Rezultati najnovijih studija potvrđuju prethodne rezultate. Tako sloj titanijuma i hidroksiapatita nanešen u tankom sloju na PEEK ili CFR-PEEK značajno poboljšava integraciju materijala sa kostima, ukoliko se ovi implantati ugrade kod ovce u karličnu kost [Stübinger et al., 2016].

Kao što je već ranije istaknuto, CFR/PEEK je teoretski pogodan materijal za **proteze kuka**, jer nudi dobru biokompatibilnost i mehaničke osobine i ne poseduje metalne jone. CFR/PEEK se pokazao kao dobar materijal za fiksaciju proteze kuka kod ovaca [Nakahara et al., 2013].

Mogućnost **lumbalne fuzije** kod svinja novim implantatom **sa osnovom od KV** koja je prekrivena tankim biokompatibilnim **metalnim slojem tantaluma**, dokazana je odličnom integracijom kosti na direktnom kontaktu sa implantatom, bez prateće inflamatorne reakcije [Li et al., 2007]. Kod **cervikalne anteriorne diskektomije i fuzije** kod krava uspešno se može primeniti nosač od **kompozita KV ispunjen graftom od spongiozne kosti** [Shono et al., 1993]. Takođe, kod svinja, spinalna fuzija sa karbonskim nosačima ispunjenim koštanim autograftom može da se poboljša kratkotrajnom aplikacijom alodronata u niskim dozama [Zou et al., 2003].

Ispitivanje kulture fibroblasta u trodimenzionalnoj matrici baziranoj na karbonskim vlaknima pokazalo je da 3D aktivirani sloj karbonskih vlakana ima potencijal biološki funkcionalizovanog sloja koji ubrzava **zarastanje rane** na koži pacova [Huang et al., 2012]. Naime, opisan je novi materijal sastavljen od dva sloja: 1) 3D aktiviranog sloja karbonskih vlakana koji omogućava olakšan rast ćelija fibroblasta i njihovu migraciju u ranu i 2) sloja

gentamicina inkorporisanog u poli( $\gamma$ -glutaminska kiselina)/želatinoznu membranu u cilju prevencije bakterijske infekcije.

Kod bikova postoje tri osnovne **devijacije penisa**: spinalna devijacija je daleko najčešća, dok su ventralna devijacija i devijacija u vidu slova s, retke. Za korekciju ove anomalije mogu da se upotrebe implantati od karbonskih vlakana koji se postavljaju u predeo između dorzalnog apikalnog ligamenta i tunike albuginee penisa. Ovi implantati dovode do jake adhezije apikalnog ligamenta za tuniku albugineu, jer se tkivo od fibroblasta i kolagenih vlakna dobro organizuje duž karbonskih vlakana [*Mobini et al., 1982*].

Sigurno je da se napred iznetim primerima primene materijala izgrađenih od KV u humanoj i veterinarskoj medicini spisak ne završava i da se stalno dopunjuje novim indikacijama za primenu tehnički unapredjenih materijala sa karbonskim vlaknima.

#### 4. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Neusaglašeni stavovi o biokompatibilnosti karbonskih vlakana mogu se objasniti upotrebom različitih tipova vlakana u pogledu njihovih fizičkih, strukturnih i hemijskih svojstava. Pokazano je da ćelijski odgovor na vlaknaste karbonizovane materijale zavisi od stepena kristalizacije materijala i da visokokristalizirana karbonska vlakna sa velikim modulom elastičnosti nisu pogodna za medicinsku upotrebu, dok su amorfna vlakna odlična za implantaciju. Neki radovi su pokazali da toksičnost karbonskih materijala zavisi i od dimenzije vlakana. Stoga samo selekcionirani tipovi karbonskih vlakana mogu biti izabrani za primenu u humanoj i veretinarskoj medicini.

Karbonska vlakna nisu biološki aktivna u onoj meri u kojoj su to biostaklo ili biokeramika, tako da modifikacija površine karbonskih vlakana stiče sve veću primenu. Načini modifikacije su različiti, od oblaganja keramičkim česticama hidroksiapatita do modifikacije aktivnih hemijskih grupa na površini karbonskih vlakana. Da bi se postigla maksimalna iskoristljivost biokompatibilnih osobina ugljenika, potrebno je razviti nove hemijske metode u cilju funkcionalizacije poroznih površina ugljeničnih implantata. Pažljiva oksidacija (uključujući i primenu azotne kiseline) poboljšava efekat vlaženja pora i povećava broj mikropora i površinu ugljenika, s obzirom da se stvaraju površinske funkcionalne (karboksilne) grupe. Suprotno tome je tretiranje površine karbonskih materijala bazama, kao što je kalijum-hidroksid (KOH).

Uvažavajući iznete činjenice kao polaznu osnovu, kao osnovni zadatak ove doktorske disertacije postavilo se ispitivanje i komparacija biokompatibilnosti (procenjena testovima u *in vivo* i *in vitro* uslovima) tzv. funkcionalizovanih karbonskih vlakana tretiranih bazom ili kiselinom, u odnosu na standardna karbonska vlakna.

Zadaci istraživanja obuhvaćenih ovom doktorskom disertacijom su:

1. da se odrede fizičko-hemijske karakteristike funkcionalizovanih karbonskih vlakana (tretiranih s KOH i HNO<sub>3</sub>),
2. da se ispita citotoksičnost standardnih, netretiranih i funkcionalizovanih karbonskih vlakana na odredjenim ćelijskim linijama,
3. da se utvrdi efekat navedenih vlakana na funkciju makrofaga u uslovima *ex vivo* (na ćelijskoj liniji), uključujući fagocitozu fragmenata vlakana i produkciju proinflamatornih citokina (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-8),



4. da se MRI dijagnostikom izvrši egzaktna evaluacija tkivnih manifestacija izazvanih implantacijom karbonskih vlakana u potkožno i mišićno tkivo eksperimentalnih životinja, (detekcija implantata, analiza interakcije tkivo-implantat, procena širine polja inflamacije) i obavi komparacija s rezultatima histopatoloških ispitivanja,

5. da se utvrdi tkivni iritacioni indeks potkožnog i poprečnoprugastog mišićnog tkiva, kao osnovna mera odgovora tkiva na implantirane materijale.

Na osnovu obavljenih analiza i uporedne analize dobijenih rezultata, proceniće se biokompatibilnost funkcionalizovanih karbonskih vlakana i daće se odgovor na pitanje da li funkcionalizovana karbonska vlakna opravdavaju zahteve biokompatibilnih materijala i da li na osnovu dobijenih rezultata postoji mogućnost kliničke primene funkcionalizovanih ugljeničnih vlakana u sanaciji oštećenja mekog tkiva abdominalnog zida životinja, čime bi se znatno proširio spektar hirurških metoda u lečenju povreda abdominalnog zida u veterinarskoj medicini. Očekuje se bolja biokompatibilnost i bolja adaptabilnost funkcionalizovanih karbonskih vlakana u sanaciji povreda trbušnog zida ispitivanih životinja u odnosu na standardne ugljenične materijale za implantaciju.

## 4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

### 4.1. KARAKTERISTIKE STANDARDNIH (KOMERCIJALNIH) KARBONSKIH VLAKANA KORIŠĆENIH U EKSPERIMENTU

Za potrebe ovog istraživanja korišćena su komercijalna visokočvrsta karbonska vlakna marke Torayca (T300B, 6000-50B, N° 2610622) (slika 4.1). Vlakna imaju 6000 filamenata u jednom snopu.

Fizičke karakteristike karbonskih vlakana korišćenih u eksperimentu prikazane su u tabeli 4.1.



Slika 4.1. Karbonska vlakna Torayca namotana na kalem

Tabela 4.1. Karakteristike standardnih karbonskih vlakana korišćenih u eksperimentu\*

Oznaka	Tip vlakana	Broj filamenata	Zatezna čvrstoća (MPa)	Zatezna čvrstoća (kgf/mm <sup>2</sup> )	Zatezni modul (GPa)	Zatezni modul (kgf/mm <sup>2</sup> )	Elongacija (%)	Masa po jedinici dužine tex (g/1000 m)	Gustina (g/cm <sup>3</sup> )
T300B-6000	T300B	6000	3530	360	230	23500	1,5	396	1,76

\*[http://www.torayca.com/en/lineup/product/pro\\_001\\_01.html](http://www.torayca.com/en/lineup/product/pro_001_01.html)

### 4.2. DOBIJANJE FUNKCIONALIZOVANIH KARBONSKIH VLAKANA I NJIHOVA KARAKTERIZACIJA

Ispitivanje biokompatibilnosti karbonskih vlakana sprovedeno je sa tri različite grupe uzoraka: 1) karbonska vlakna tretirana sa kalijum hidroksidom (KOH) – „bazna vlakna”; 2) karbonska vlakna tretirana sa azotnom kiselinom (HNO<sub>3</sub>) – „kisela vlakna” i 3) kontrolna grupa

netretiranih karbonskih vlakana (Torayca (T300B, 6000-50B, N° 2610622) – „standardna vlakna“.

#### **4.2.1. Tretiranje karbonskih vlakana visokom temperaturom**

Priprema uzoraka započeta je izdvajanjem karbonskih vlakana sa kalema, i njihovim tretiranjem visokom temperaturom. Vlakna se izlažu visokoj temperaturi kako bi se uklonio zaštitni sloj na vlaknima nanet tokom procesa proizvodnje, u fazi dimenzionisanja. Zaštitni sloj se sastoji od poliestera, uretana, i štiti vlakna od mehaničkih oštećenja i rasipanja. Temperaturom se eliminiše zaštitni sloj i omogućava se nesmetan pristup površinskim grupama na površini vlakana. Vlakna su na početku eksperimenta zagrevana na temperaturu od  $850\text{C}^0$ . Brzina zagrevanja je iznosila  $10\text{C}^0/\text{minutu}$ . Zagrevanjem je odklonjen zaštitni sloj na vlaknima.

#### **4.2.2. Pravljenje implanatata**

Jedan implantat se sastojao iz 8 snopova ugljeničnih vlakana. Jedan snop sadrži 6000 vlakana, što znači da se u jednom implantatu nalazilo 48000 vlakana. Vlakna su pomoću epoksi-smole fiksirana na jednom kraju u obliku vrha strele (slika 4.2). To je omogućilo lakše tretiranje vlakana reagensima, sušenje, sterilizaciju i manipulaciju tokom operativnog zahvata.



Slika 4.2. Implantat napravljen od karbonskih vlakana

### 4.2.3. Promena površinskih grupa

Već je napomenuto da su ispitivanjem obuhvaćene tri grupe uzoraka: 1) karbonska vlakna tretirana sa kalijum hidroksidom (KOH) – „bazna vlakna”; 2) karbonska vlakna tretirana azotnom kiselinom ( $\text{HNO}_3$ ) – „kisela vlakna” i 3) kontrolna grupa netretiranih vlakana – „standardna vlakna”.

Prva grupa uzoraka karbonskih vlakana tretirana je sa KOH. Postupak je sproveden tako što je u 400 ml destilovane vode dodato 44,8 g KOH, prethodno odmerenog na digitalnoj vagi. Dobijeni rastvor je dvomolarni. Uzorci karbonskih vlakana su potopljeni u rastvor i izloženi su temperaturi od  $100\text{ C}^\circ$  naredna 2h uz lagano mešanje (slika 4.3). Uzorci su nakon toga ispirani 15 minuta destilovanom vodom i stavljeni u sušilicu na sušenje.



Slika 4.3. Zagrevanje uzoraka vlakana potopljenih u 2M rastvor KOH

Druga grupa uzoraka karbonskih vlakana tretirana je sa  $\text{HNO}_3$ . U posudu je sipano 70 ml 65%  $\text{HNO}_3$ , prethodno odmerene pipetom, nakon čega je polako dodata destilovana vode do 500 ml. Na ovaj način dobijen je dvomolarni rastvor  $\text{HNO}_3$ . Karbonska vlakna su potopljena u rastvor i izložena su temperaturi od  $100^\circ\text{ C}$  u toku 2 h. Uzorci su nakon toga ispirani destilovanom vodom 15 minuta i stavljeni u sušilicu na sušenje.

#### **4.2.4. Određivanje tačke nultog naelektrisanja**

Tačka nultog naelektrisanja (engl. point of zero charge – PZC) određivana je metodom masene titracije (tabela 4.2).

Odmerene su različite mase (0,05; 0,1; 0,5; 1 i 10 masenih procenata) uzoraka ugljeničnih materijala i prelivene sa 10 cm<sup>3</sup> 0,1 M rastvora KCl u odgovarajućim sudovima. Rastvor KCl je pripremljen sa prokuvanom destilovanom vodom u cilju uklanjanja CO<sub>2</sub>. Kako bi se sprečio kontakt rastvora sa okolnim vazduhom, sudovi su držani u atmosferi argona. Rastvor sa materijalom je držan preko noći na konstantnoj temperaturi uz mešanje. Po uravnoteženju, merene su ravnotežne pH vrednosti smeša, a granična pH vrednost jednaka je vrednosti PZC.

#### **4.2.5. Metoda kiselo/bazne titracije**

Za određivanje količine kiselih i baznih površinskih grupa korišćena je metoda kiselo/bazne titracije.

Za određivanje kiselih grupa uzorci ugljeničnih materijala mase 0,1 g preliveni su sa 10,0 cm<sup>3</sup> baze (0,1M NaOH) i vršeno je uravnoteženje u toku 24 h. Posle isteka 24 h rastvori sa uzorcima materijala procedeni su u normalne sudove od 50,0 cm<sup>3</sup>, uzorci isprani i normalni sudovi dopunjeni destilovanom vodom do oznake. Odpipetirano je po 25,0 cm<sup>3</sup> svakog od rastvora i titrirano rastvorom 0,1 M HCl. Bazne grupe su određivane na sličan način, potapanjem 0.1 g ugljeničnih materijala u 10 cm<sup>3</sup> 0.1 M rastvora HCl. Posle uravnoteženja procedeni rastvori su titrirani rastvorom 0.1 M NaOH. Paralelno su titrirane i slepe probe (rastvori baze i kiseline bez uzoraka materijala).

### **4.3. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE I PROCEDURE IMPLANTACIJE KARBONSKIH VLAKANA**

#### **4.3.1. Izbor eksperimentalnih životinja i određivanje mesta implantacije**

Za implantaciju karbonskih vlakana u potkožno i mišićno tkivo životinja korišćeni su eksperimentalni kunići (varijetet činčila), pol muški, starosti od 3 do 4 meseca, težine oko 2 kg. U eksperimentu je bilo ukupno 24 životinje.

Životinje, kako one kojima je učinjena subkutana implantacija, tako i one kojima je učinjena intramuskularna implantacija, podeljene su u IV grupe, u zavisnosti od vremena žrtvovanja nakon implantacije (7, 14, 21 i 28. dan nakon implantacije). U svakoj grupi nalazilo

se po 3 jedinke, a eksperiment je izveden dva puta. Intramuskularne i subkutane implantacije izvedene su na svakoj životinji istovremeno, tako da se u svakom od ispitivanih eksperimentalnih postimplantacionih termina (7, 14, 21 i 28. dan) nalazilo nalazilo po 6 jedinski.

#### **4.3.2. Plan implantacije standardnih (nefunkcionalizovanih) i funkcionalizovanih ugljeničnih vlakana**

Implantati su plasirani u leđni mišić (torakalni i lumbalni deo *longissimus dorsi* levo i desno) i potkožno tkivo (neposredno iza poslednjeg rebra u sredini bočnog dela abdominalnog zida, levo i desno). Plasiranje implantata u mišić i potkožno tkivo je izvedeno sa minimalnim stepenom invazivnosti po tkivo, korišćenjem odgovarajućih instrumenata za preparisanje tkiva i postavljanjem implantata na željeno mesto.

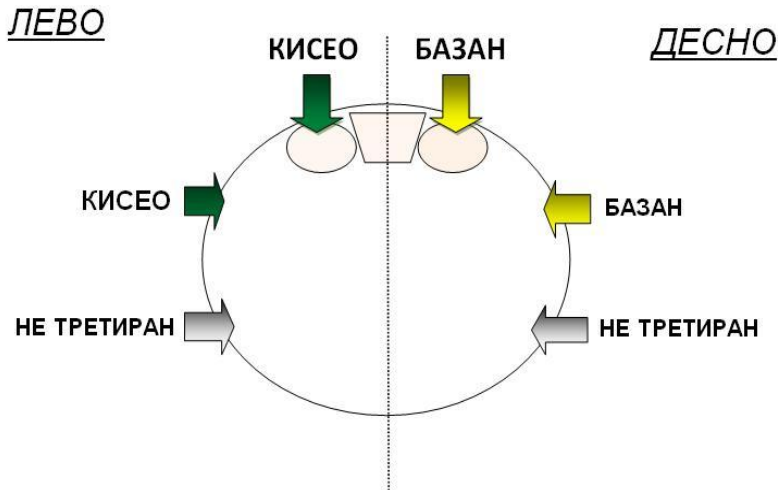
Šematski prikaz zona implantacije prikazan je na slici 4.4.

Potkožni implantati bili su postavljeni u sledeće zone, za svaki od termina žrtvovanja životinja (7, 14, 21 i 28. dan nakon implantacije):

- abdominalni zid levo i desno, neposredno iza zadnjeg rebra, potkožna implantacija – nefunkcionalizovana vlakna (ne tretirana vlakna – kontrolna);
- sredina abdominalnog zida levo, potkožna implantacija, funkcionalizovana vlakna tretirana sa HNO<sub>3</sub>;
- sredina abdominalnog zida desno, potkožna implantacija – funkcionalizovana vlakna tretirana sa KOH.

Intramuskularni implantati bili su postavljeni u sledeće zone, za svaki od termina žrtvovanja životinja (7, 14, 21 i 28. dan nakon implantacije), kod istih životinja kod kojih su postavljeni i subkutani implantati:

- torakalni deo leđnog mišića levo i desno – nefunkcionalizovana vlakna (netretirana vlakna – kontrolna);
- lumbalni deo leđnog mišića, levo – funkcionalizovana vlakna tretirana sa HNO<sub>3</sub>;
- lumbalni deo leđnog mišića, desno – funkcionalizovana vlakna tretirana sa KOH.



Slika 4.4. Shematski prikaz implantiranih karbonskih vlakana

### 4.3.3. Hirurška tehnika implantacije

S obzirom da postupak implantacije ima određeni stepen invazivnosti, kao i da su životinje jako osjetljive na stres i bol, sama implantacija je izvedena u opštoj anesteziji [Ketamidor 10% (Richter pharma AG) u dozi od 35 mg/kg IM, u kombinaciji sa Ksilazinom (Xylased 2%, Bioveta) 5mg/kg IM]. Kao mesto implantacije ugljeničnih implantata određeni su leđni mišić i potkožno tkivo abdomena.

Pre implantacije vlakna su sterilisana u autoklavu 25 minuta na 134<sup>0</sup>C. Set instrumenata potreban za implantaciju (slika 4.5) takođe je sterilizovan u autoklavu. Pridržavajući se principa asepse-antiseptice, pripremljeno je operaciono polje i hirurški tim za implantaciju. Priprema životinja podrazumevala je: klinički pregled, pripremu operacionog polja i indukovanje životinje u opštu anesteziju.

Implantati su plasirani u odgovarajuće zone, ranije opisane. Plasiranje implantata u mišić i potkožno tkivo je izvedeno sa minimalnim stepenom invazivnosti po tkivo, korišćenjem odgovarajućih instrumenata za preparisanje tkiva i postavljanje implantata na željeno mesto.

Postupak implantacije počinje postavljanjem incizije na koži u kranio-kaudalnom pravcu, dužine 6 cm neposredno iznad kičmenog stuba u torako-lumbalnom delu (slika 4.6.) Neposredno ispod reza se nalazi kičma, a sa njene leve i desne strane se prostire leđni mišić – *m. longissimus dorsi*. Nakon preparisanja potkožnog tkiva tkivnim makazama za preparisanje omogućen je pristup impantacionim mestima na *m.longissimus dorsi* (slika 4.7)



Slika 4.5. Instrumenti korišćeni za postupak implantacije karbonskih vlakana u potkožno i mišićno tkivo



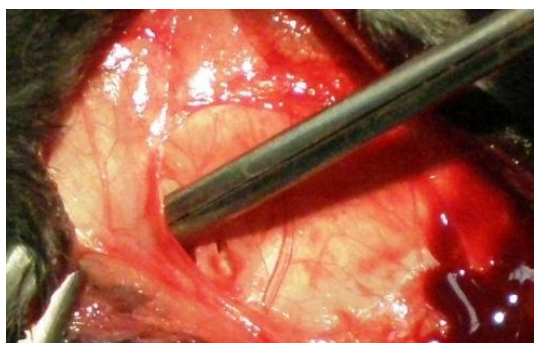
Slika 4.6. Postavljanje incizije

Na mišiću je napravljen mali rez, kroz koji je plasiran u mišić forceps aligator. Forceps je provučen kroz sredinu leđnog mišića, paralelno sa kičmom, dužine 3-4 cm, u kranijalnom pravcu. Na vrha instrumenta napravljen je rez, koji omogućava, nakon otvaranja instrumenta, prihvatanje vrha vlakna. Vraćanjem instrumenta u prvobitan položaj, vlakno je provlačeno kroz mišić. Krajevi vlakna skraćeni su makazama. Implant je plasiran kroz sredinu mišića (slika 4.8.). Potom je pristupljeno adaptaciji tkiva. Šivenje potkožnog tkiva, mišića i kože je učinjeno korišćenjem resorptivnog konca 4/0.





Slika 4.7. Mesto implantacije karbonskih vlakana u *m.longissimus dorsi*



A



B



C

Slika 4.8. Hirurški postupak implantacije KV u mišić

A) postavljanje reza na *m. longissimus dorsi*

B) implantacija karbonskih vlakana pomoću aligator-forcepsa

C) karbonska vlakna implantirana u mišić

#### 4.3.4. Monitoring životinja

Eksperimentalne životinje su bile pod konstantnim monitoringom tokom pripreme i trajanja operativnog zahvata. U cilju monitoringa korišćen je aparat Votem v7 Veterinary

Monitor (Votem, Korea) (slika 4.9). Praćeni su rad srca, respiracija, saturacija, telesna temperatura i krvni pritisak.



Slika 4.9. Votem v7 pacijent-monitor

#### 4.4. ISPITIVANJE CITOTOKSIĆNOSTI

Cilj ovog dela istraživanja je bio da se upoređi citotoksićnost modifikovanih (kiselih i baznih) i standardnih karbonskih vlakana na humanim fibroblastima kontinuirane ćelijske linije MRC-5. Citotoksićnost ispitivanih materijala određivana je analizom njihovog uticaja na vijabilnost (MTT-test) i adheziju ćelija (trodimenzionalna (3D) kultivacija ćelija u "Matrigel"-u).

Osim napred navedenog, ispitivan je i efekat standardnih i funkcionalizovanih karbonskih vlakana (kiselih i baznih) na funkciju humane makrofagne linije U937. Određivani su: relativna vijabilnost ćelija u kulturama bojenjem sa tripan-plavim, internalizacija karbonskih vlakana (% ćelija sa fagocitovanim partikulama, analizom nativnih kultura) i koncentracija citokina – faktora tumorske nekroze –alfa (TNF- $\alpha$ ), interleukina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleukina 6 (IL-6) i interleukina 8 (IL-8), u supernatantima kultura pomocu Citomix-a i protoćne citometrije.

##### 4.4.1. Kultivacija humane ćelijske linije fibroblasta pluća MRC-5 sa karbonskim vlaknima

Kao model sistem za ispitivanje citotoksićnosti karbonskih vlakana korišćena je komercijalno dostupna humana ćelijska linija fibroblasta pluća MRC-5 (ATTC), izolovana iz zdravog fetusa starog ćetnaest nedelja [*Jacobs et al., 1970*].

MRC-5 ćelije su gajene u DMEM medijumu (eng. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM, Sigma-Aldrich®) sa visokim sadržajem glukoze (4500 mg glukoze), sa dodatkom 10% goveđeg fetalnog seruma (eng. *Fetal bovine serum*, FBS, Invitrogen), 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich®), 100 I.U./mL penicilina i 100 µg/mL streptomicina (Sigma-Aldrich®) (medijum). Ćelije su gajene u inkubatoru na temperaturi od 37°C i automatskim protokom 5% CO<sub>2</sub>.

Prilikom subkultivacije ćelije su dva puta isprane PBS-om (eng. *Phosphate Buffered Saline*- 137 mM NaCl/2,7 mM KCl/10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Ćelije su zatim odvajane od podloge suda za gajenje, inkubiranjem u rastvoru 0,05% tripsina/0.025% EDTA (Invitrogen™) u PBS-u tokom 5 min na 37°C. Tripsin je inaktiviran dodavanjem medijuma za gajenje ćelija. Nakon toga ćelije su istaložene centrifugiranjem 5 min na 200 g na sobnoj temperaturi i resuspendovane u medijumu za gajenje ćelija u odnosu 1:4 do 1:8 u zavisnosti od potrebe eksperimenta.

#### **4.4.2. MTT test za određivanje vijabilnosti ćelija linije MRC-5**

MTT test je kvantitativna kolorimetrijska metoda koja se koristi za određivanje vijabilnosti ćelija. Ova metoda se zasniva na sposobnosti mitohondrijske dehidrogenaze da redukuje žuti 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolijum-bromid (MTT) u ljubičasti formazan. Reakcija se odvija samo u živim ćelijama u kojima su dehidrogenaze aktivne pa je količina dobijenog formazana proporcionalna broju vijabilnih ćelija.

Za ovaj esej,  $3 \times 10^4$  MRC-5 ćelija je zasejano u svaki bunarić mikrotitarske ploče površine 1,88cm<sup>2</sup>. Vlakna (standardna, "bazna" ili "kisela") su dodata u kulture 18 sati nakon zasejavanja u različitim koncentracijama (0,1 mg ili 0,5 mg po mililitru medijuma) u triplikatu. Sledećeg dana (24 sata od početka tretmana) ćelijama je zamenjen medijum i kultivisane su dodatnih 18 sati u standardnim uslovima. Nakon toga, medijum je odstranjen, a ćelije su inkubirane 2 sata na 37°C u MTT rastvoru finalne koncentracije 0,5 mg/ml (MTT je rastvoren u medijumu za gajenje ćelija). Po isteku inkubacije, MTT rastvor je uklonjen i dodat je DMSO (dimetil-sulfoksid) koji je omogućio oslobađanje formazana iz ćelija. Apsorbanca je merena u "microplate reader" aparatu tipa Tecan (Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland) na talasnoj dužini od 550 nm.

#### 4.4.3. Trodimenzionalna (3D) kultivacija ćelija linije MRC-5 u Matrigel-u

Bazalna membrana je tanka vanćelijska struktura na koju naležu ćelije *in vivo* (epitelne ćelije) ili koja ih obavija (mišićne ćelije, masne ćelije, Švanove ćelije). Matrigel (engl. Basement Membrane Matrix, *BD Bioscience*) je solubilni ekstrakt bazalne membrane izolovane iz Engelbreth-Holm-Swarm (ESH) sarkoma miša, tumora koji je bogat proteinima vanćelijskog matriksa. Pored laminina, kao glavne komponente, "Matrigel" sadrži i kolagen tipa IV, heparan-sulfat proteoglikan entaktin/nidogen, faktor transformacije rasta  $-\beta$  (engl. Transforming Growth Factor beta, TGF- $\beta$ ), epidermalni faktor rasta (engl. Epidermal Growth Factor, EGF), faktor rasta sličan insulinu (engl. Insuline-like Growth Factor, IGF), faktor rasta fibroblasta (engl. Fibroblast Growth Factor, FGF), tkivni aktivator plazminogena (engl. Tissue Plasminogene Activator, TPA) i druge faktore.

MRC-5 ćelije ( $3 \times 10^4$ ) su resuspendovane u Matrigel-u zajedno sa modifikovanim (kiselim ili baznim) karbonskim vlaknima. Zatim su ćelije zasejane i gajene 30 minuta u inkubatoru na 37° C. Nakon toga, ćelijama je dodat medijum za gajenje ćelija. 3-D strukture su gajene u standardnim uslovima narednih 72 sata.

Ćelije su analizirane i fotografisane pomoću DM IL LED invertnog svetlosnog mikroskopa Leica (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

#### 4.4.4. Određivanje efekata karbonskih vlakana na funkciju humane makrofagne linije U937

U937 ćelije (ATCC, Rockville, MA, USA) su kultivisane u medijumu RPMI 1640 sa dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma, 2 mM L-glutamina, 1 mM HEPES-a, 20  $\mu$ g/ml folne kiseline i 40 nM forbol-miristat-acetata (PMA) u bazenima plastičnih ploča sa 24 bazena ( $1 \times 10^5$  ćelija u 1ml medijuma). U bazene su dodate 3 različite koncentracije karbonskih vlakana (500, 250 i 125  $\mu$ g/ml) nakon čega su ćelije kultivisane 48 časova. Bazeni sa ćelijama bez karbonskih vlakana su služili kao kontrola. Sve kulture su rađene u triplikatima. Komponente medijuma su nabavljene od kompanije Sigma, Minhen, Nemačka a ploče za kulture od kompanije Sarsted, Dordrecht, Nemačka. Nakon inkubacionog perioda kulture su slikane pod invertnim mikroskopom (Olympus CX29), a zatim je sakupljen supernatant. Kulture su pažljivo isprane sa fosfatnim puferom radi uklanjanja krupnijih partikula vlakana. Adherentne ćelije su ponovo fotografisane pod invertnim mikroskopom i analizirane radi identifikacije ćelija sa fagocitovanim

mikropartikulama vlakana. Nakon toga su isprane sa fosfatnim puferom sa dodatkom 0,2% Na-EDTA, a zatim tretirane sa rastvorom 0,25% tripsina (Sigma) sa dodatkom 0,2 % Na-EDTA u RPMI-medijumu bez seruma. Čelije su sakupljene snažnijim pipetiranjem, centrifugirane i izbrojane. Brojane su vijabilne ćelije korišćenjem 1% rastvora tripan- plavog. Relativni procenat vijabilnih ćelija u kulturama sa karbonskim vlaknima je izračunat u odnosu na kontrolne kulture (vijabilnost uzeta kao 100%). Od ćelija su napravljeni citospin-preparati na citocentrifugi (Shendon tip 4), obojeni po May-Grünwald – Giemsa i analizirani pod svetlosnim mikroskopom. Supernatanti su centrifugirani a zatim smrznuti na  $-70^{\circ}\text{C}$  do određivanja nivoa citokina.

Citokini – TNF-1, IL-1b, IL-6 i IL-8, određeni su u supernatantima pomoću Citomix-a i protočne citometrije.

#### **4.5. NUKLEARNA MAGNETNA REZONANCA (NMR)**

Nuklearnom magnetnom rezonancom - NMR (eng. Magnetic Resonance Imaging, MRI) praćena je pozicija implantata u tkivu, reakcija okolnog tkiva i razgradnja vlakana u tkivu. Implantati ne daju signal na magnetnoj rezonanci jer nemaju pokretne atome vodonika. Stepen reakcije tkiva neposredno uz sam implantat, kao i eventualne promene signala tkiva oko implantata uočavale su se u vidu promene intenziteta signala, hipointenzivnog i hiperintenzivnog. Promena jačine signala zavisi od količine vodonikovih jona u tkivu, tako da se može kontrolisati reakcija okolnog tkiva na implantat, kao i stepen reakcije. Rezultati ispitivanja NMR poređeni su sa rezultatima histopatološke analize uzoraka tkiva dobijenih nakon žrtvovanja životinja.

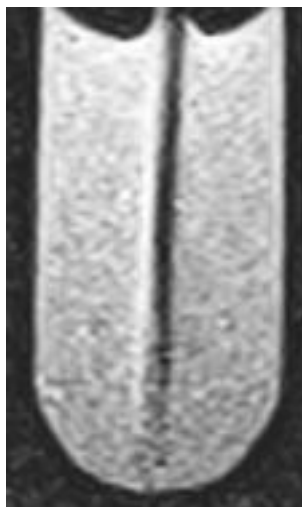
Pregled životinja magnetnom rezonancom rađen je 1, 2, 3 i 4. nedelje nakon operativnog zahvata, na aparatu *1.5 T imager (Avanto, Siemens, Nemačka)*, komercijalnom zavojnicom za koleno (slika 4.10). Korišćene su dve MRI sekvence, Turbo spin echo T1W (TR =820 ms, TE = 11 ms ) i T2W (TR = 8620 ms, TE = 81 ms), kao i sekvence za optimizaciju protokola snimanja, T2W TrueFISP, T2W SPACE, i T1W FLASH.



Slika 4.10. Aparat za magnetnu rezonancu 1.5 T imager (*Avanto, Siemens, Nemačka*)

Životinje su za potrebe pregleda podvrgnute opštoj anesteziji u trajanju od 45 minuta. Lekovi korišćeni za indukciju opšte anestezije su Ketamidol 10% (Richter pharma AG) u dozi od 35 mg/kg IM, u kombinaciji sa Ksilazinom (Xylased 2%, Bioveta) 5mg/kg IM. Životinjama je nakon nativnog snimanja dato kontrastno sredstvo Magnetvist (Bayer-Schering, Nemačka) u *v. saphena magna* u dozi od 0,2 mmol/kg.

Pre snimanja životinja izrađeni su gel-fantomi radi optimizacije tehnike snimanja. Gel fantomi često služe kao imitacija mekih tkiva na NMR i za ocenu artefakata koje proizvode implantati. Fantomi su izrađeni od 2 % agar-agar gela u plastičnim bocama od 300 ml u koje su postavljeni ispitivani implantati, netretirana karbonska vlakna, vlakna tretirana bazom i vlakna tretirana kiselinom. Sve tri vrste vlakana su postavljene u uspravan položaj, kao što je prikazano na slici 4.11. Fantomi su napravljeni 36 sati pre snimanja NMR. Slike 4.12 i 4.13 prikazuju rezultate snimanja fantoma, netretiranih vlakana, vlakana tretiranih kiselinom, i vlakana tretiranih bazom.



Slika 4.11. Fantom, implantat karbonskih vlakana u 2% agar-agar gelu snimljen u uspravnom položaju

#### 4.6. PATOHISTOLOŠKA ISPITIVANJA

Nakon žrtvovanja životinja u svakom od eksperimentalnih termina (7, 14, 21 i 28. dana), uzimani su uzorci tkiva iz odgovarajućih zona implantacije (potkožno tkivo i mišić), kao i kontrolni uzorci tkiva iz zdravih zona udaljenih od mesta implantacije. Prilikom uzimanja potkožnog tkiva sa mesta implantacije, uzimani su i pregledani i uzorci kože iznad mesta implantacije.

##### 4.6.1. Priprema uzoraka

Materijal za patohistološku analizu pripreman je na standardni način. Uzorci su fiksirani u 4% neutralnom puferisanom rastvoru formaldehida, a potom su dalje pripremani rutinskom procedurom, koja obuhvata dehidraciju, prosvetljavanje, impregnaciju i kalupljenje u parafinu / paraplastu (*Bio-Plast plus, BioOptica, Italy*). Tkivni uzorci sečeni su na mikrotomu (*RM 2255, Leica Microsystems GmbH, Frangfurt, Germany*), a tkivni preseći debljine 4-5  $\mu\text{m}$  montirani su na specijalne visokoadhezivne staklene pločice (*SuperFrost Plus, DAKO, Denmark*), sušeni 60 minuta u termostatu na 56°C, a potom bojeni standardnim postupkom bojenje hematoksilin eozinom, trihromskim bojenjem po Weigert-Van Giesonu, AZAN trihromskim bojenjem i bojenjem po Gordon-Sweetu za retikularna vlakna. Za bojenje su korišćeni komercijalni kitovi proizvođača Bio-Optica (*Wiegert-Van Gieson for elastic fibers and connectivum-long method*

04-051802; *Azan trichrome 04-001802; Gordon-Sweet method for reticular fibres 04-040802; Strumentazioni Scientifiche, Milano, Italy*) i poštovani su protokoli za upotrebu kitova.

#### **4.6.2. Bojenje po Weigert-Van Giesonu za elastična vlakna i vezivo**

Ova metoda služi za prikazivanje elastičnih vlakana, vezivnog tkiva, kolagena i jedara, kao i za dokazivanje gljivica na tkivnim presecima.

Metoda se zasniva na afinitetu rezorcina-fuksina prema elastičnim vlaknima pri čemu dolazi do precipitacije zbog reakcije između rezorcija i baznog fuksina i feri-hlorida. Regensi koji se koriste kod ovog bojenja su rastvor perjodne kiseline, Weigertov rastvor, Weigertov gvožđeviti hematoksilin i Van Giesonov rastvor pirofuksina. Rezultat bojenja su: elastična vlakna su obojena u nijansama od tamnoplavog do crnog, kolagena vlakna su obojena različitim nijansama crvene boje, vezivo i eritrociti su žuti, a jedra ćelija obojena su crno.

#### **4.6.3. AZAN trihromsko bojenje**

Ova metoda predlaže se za prikazivanje vezivnog tkiva, kao i za prikazivanje mišićnog tkiva, neuroglije, kolagenih i retikularnih vlakana, eritrocita i jedarnog hromatina, strome glomerula bubrega, adenohipofize.

U metodi se koriste dve kisele boje: azokarmin i anilinsko plavo. Rezultati bojenje su: kolagena i retikularna vlakna su obojena tamnoplavo, mišići su obojeni narandžasto, eritrociti i hromatin su crveni.

#### **4.6.4. Bojenje po Gordon-Sweetu za retikularna vlakna**

Ovom metodom prezentuju se argirofilna retikularna vlakna u vezivnom tkivu. U vrlo kratkom vremenu bojenja moguće je izvršiti selektivnu impregnaciju retikularnih vlakana zahvaljujući dvoma faktorima: preliminarnoj impregnaciji sa solima gvožđa i upotrebi kao izvora srebra nestabilnog diamino-kompleksa (amonijačni rastvor) koji je reaktivniji od srebro-nitrata. Rezultat bojenja su crno bojena retikularna i nervna vlakna i crveno obojena jedra ćelija.

#### **4.6.5. Procena indeksa tkivne iritacije (iritacionog indeksa) na mestu implantacije**

Ispitivanje biokompatibilnosti ugljeničnih vlakana je urađeno pomoću međunarodnih standarda ISO 10993-6: 2007 i ISO-10993-10: 2002, sa odgovarajućim izmenama. Primenjeni



standardi uključivali su testiranja i procenu lokalne reakcije tkiva na mestu gde je implantiran ispitivani materijal. Semikvantitativna procena histoloških promena mekog tkiva (subkutisa) kod kunića sa implantiranim vlaknima obuhvatala je promenu epitela (od normalnog epitela, preko ćelijske degeneracije, metaplazije i fokalnih erozija, do generalizovanih erozija), procenu stepena infiltracije leukocita, prisustvo vaskularne kongestije i edem. Takođe, registrovano je i prisustvo kapsule, kao i njena relativna debljina (tabela 4.1). Slična procena odnosila se i na mišićno tkivo (tabela 4.2). Na osnovu procene svih navedenih parametara izračunat je iritacioni indeks (IrI), kao mera težine oštećenja tkiva na mestu implantacije (tabela 4.3).

Tabela 4.1. Sistem ocene patohistološkog pregleda subkutisa na mestu implantacije

Reakcija	Numeričko ocenjivanje
<b>EPITEL</b>	
Normalni, intaktni	0
Ćelijska degeneracija	1
Metaplazija	2
Fokalna erozija	3
Generalizovana erozija	4
<b>LEUKOCITNA INFILTRACIJA</b> (na velikom uveličanju)	
Odsutni	0
Minimalno (manje od 25)	1
Blago (od 26-50)	2
Umereno (od 51-100)	3
Izrazito (preko 100)	4
<b>VASKULARNA KONGESTIJA</b>	
Odsutna	0
Minimalna	1
Blaga	2
Umerena	3
Izrazita, sa pucanjem krvnog suda	4
<b>EDEM</b>	
Odsutan	0
Minimalan	1
Blagi	2
Umeren	3
Izrazit	4
<b>KAPSULA</b>	
Odsutna	0
Minimalna	1
Tanka	2
Umerena	3
Debela	4

Tabela 4.2. Sistem ocene patohistološkog pregleda mišićnog tkiva

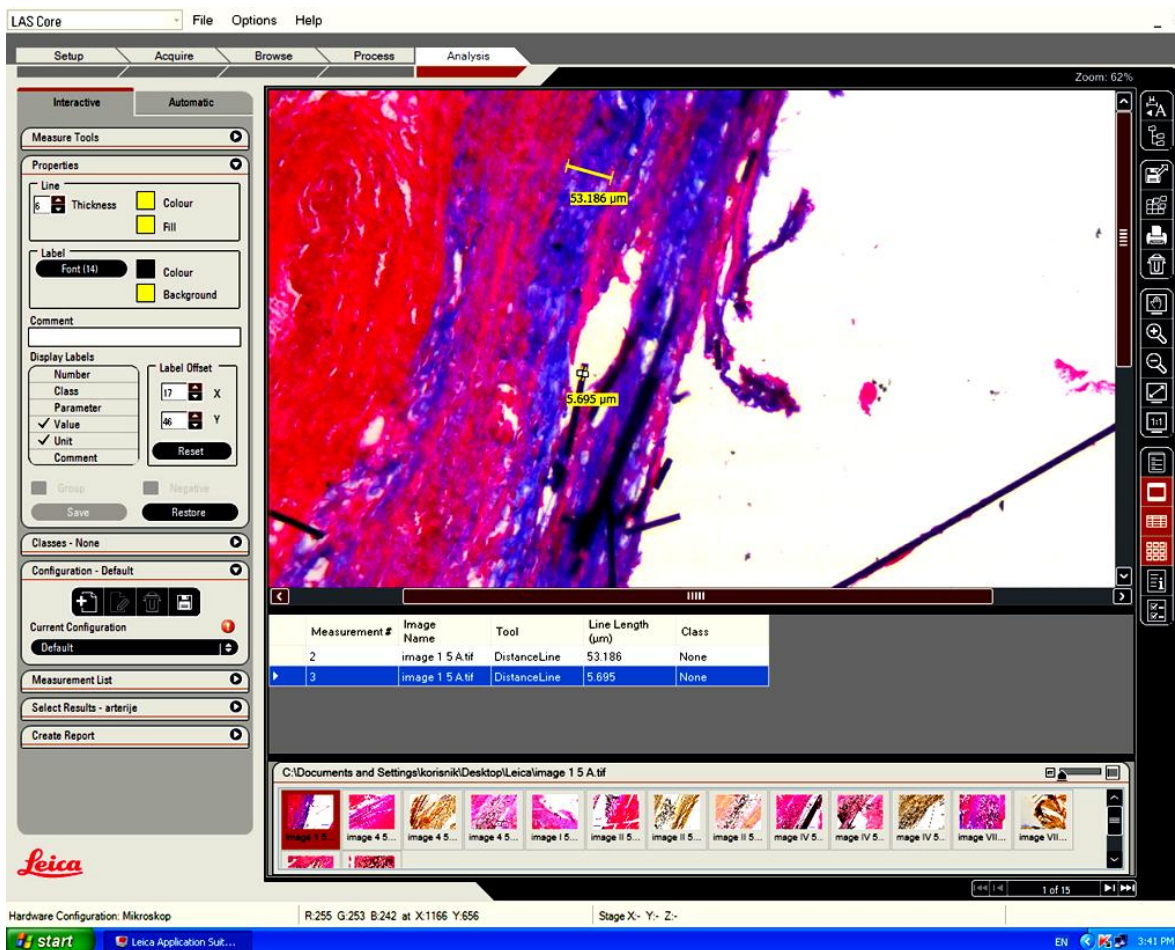
REAKCIJA	NUMERIČKO OCENJIVANJE
<b>MIŠIĆNO TKIVO</b>	
Normalni, intaktni mišić	0
Ćelijska degeneracija ili stanjivanje	
fokalno	1
opsežno	2
Nekroza	3
fokalna	4
opsežna	
<b>LEUKOCITNA INFILTRACIJA</b> (na velikom uveličanju)	
Odsutna	0
Minimalna (manje od 25)	1
Blaga (od 26-50)	2
Umerena (od 51-100)	3
Izrazita (preko 100)	4
<b>VASKULARNA KONGESTIJA</b>	
Odsutna	0
Minimalna	1
Blaga	2
Umerena	3
Izrazita, sa pucanjem krvnog suda	4
<b>EDEM</b>	
Odsutan	0
Minimalan	1
Blagi	2
Umeren	3
Izrazit	4
<b>KAPSULA</b>	
Odsutna	0
Minimalna	1
Tanka	2
Umerena	3
Debela	4

Table 4.3. Procena indeksa tkivne iritacije (iritacionog indeksa)

IRITACIONI INDEKS (IrI)	
Prosečan odgovor	Opis odgovora
0	Nema
1-5	Minimalni
6-10	Blag
11-15	Umeren
16-20	Jak

#### 4.7. MORFOMETRIJSKA ISPITIVANJA

Sva merenja izvršena su na mikroskopu *Leica DMSL*, uz pomoć kamere i softverskog sistema *Leica Interactive Measurements* (*Leica Microsystems GmbH, Frangfurt, Germany*).

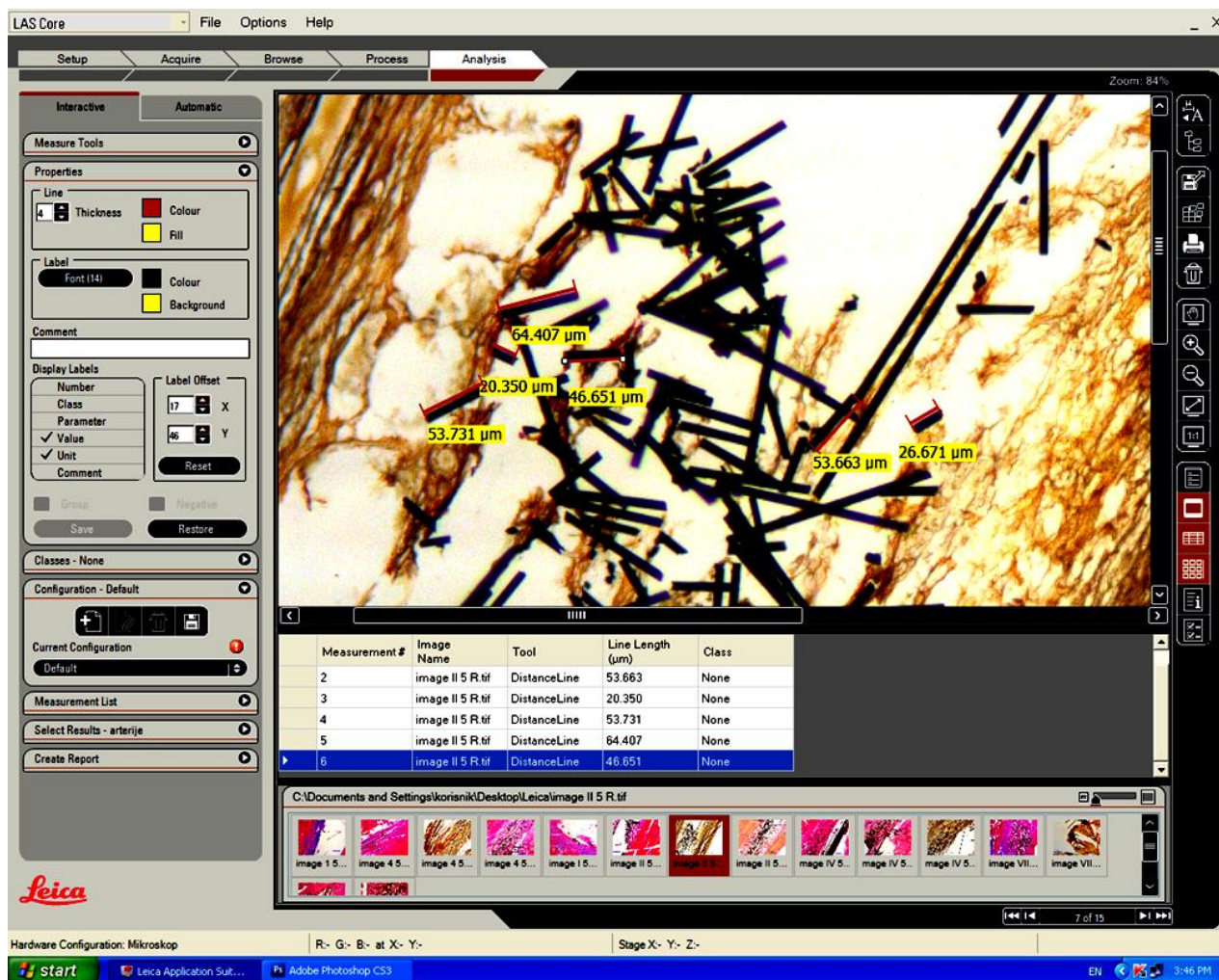


Slika 4.12. Prikaz morfometrijske analize debljine kapsule i debljine karbonskih vlakana uz pomoć softverskog sistema (*Leica Interactive Measurements, Leica Microsystems GmbH, Frangfurt, Germany*) Slika prikazuje intramuskularno implantirana karbonska vlakna na preparatu obojenom AZAN-trihromskim bojenjem.

Morfometrijske metode podrazumevale su određivanje broja inflamatornih ćelija i fibroblasta po jedinici površine tkiva sa implantiranim karbonskim vlaknima, neposredno u zoni implantacije. U slučaju postojanja fibrozne kapsule oko implantiranog materijala, merena je

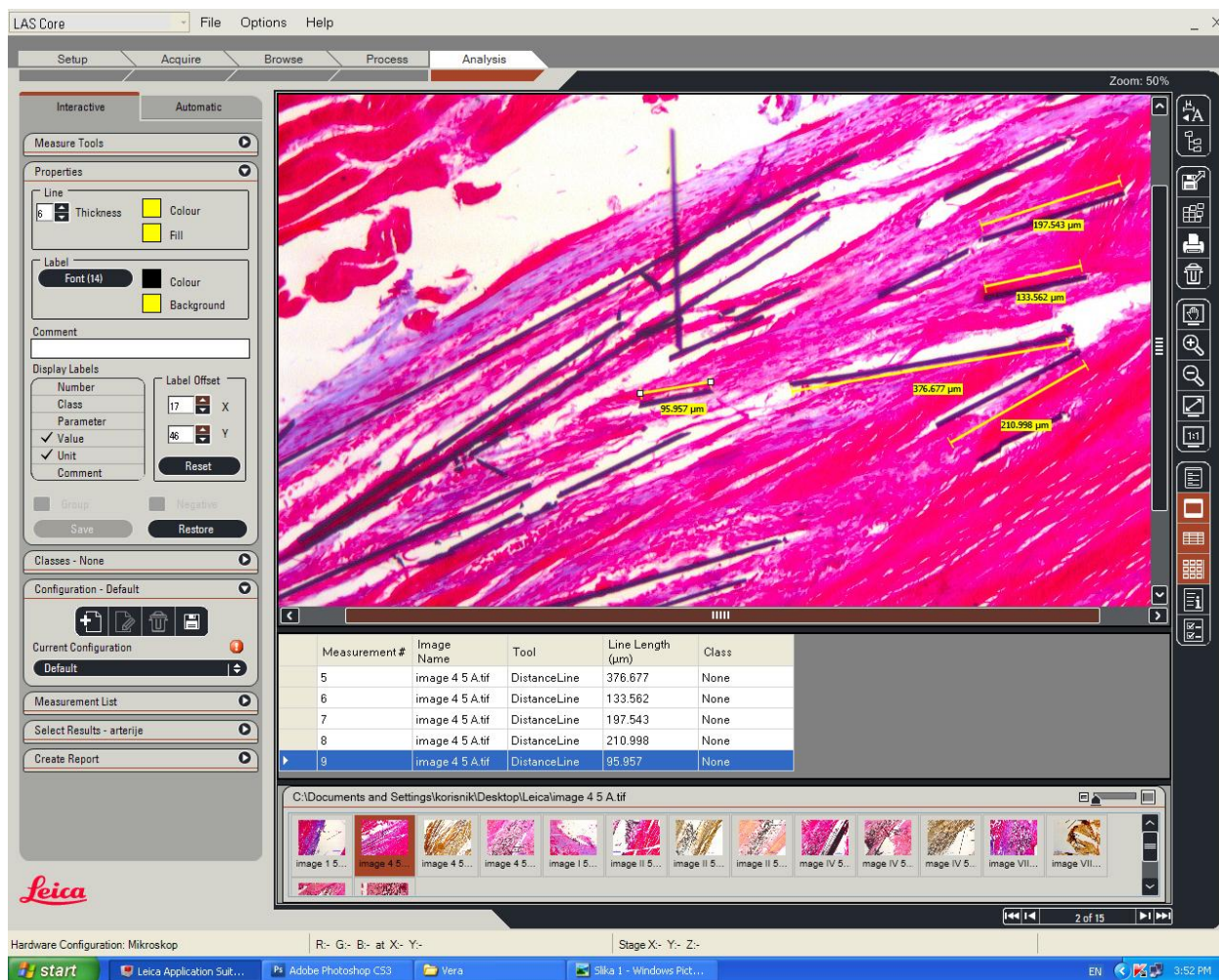
njena debljina, na deset nasumično izabranih mesta, i izražavana kao srednja vrednost izvršenih merenja (slika 4.12).

Takođe, određivani su broj fragmenata kao i njihove dimenzije u uzorcima u kojima je registrovana fragmentacija implantiranih vlakana, bilo da je ona bila izrazita (slika 4.13), bilo da je bila blaga (slika 4.14).



Slika 4.13. Prikaz morfometrijske analize dužine fragmenata karbonskih vlakana uz pomoć softverskog sistema (*Leica Interactive Measurements, Leica Microsystems GmbH, Frangfurt, Germany*)

Slika prikazuje intramuskularno implantirana karbonska vlakna na preparatu obojenom po Gordon-Sweetu za retikularna vlakna.



Slika 4.14. Prikaz morfometrijske analize dužine fragmenata karbonskih vlakana uz pomoć softverskog sistema (*Leica Interactive Measurements, Leica Microsystems GmbH, Frangfurt, Germany*)

Slika prikazuje intramuskularno implantirana karbonska vlakna sa blagom fragmentacijom, na preparatu obojenom AZAN-trihromskim bojenjem.

Što se tiče broja i dimenzija fragmenata karbonskih vlakana, ove morfometrijske vrednosti određivane su na čitavoj površini tkivnog preseka, na mikroskopskom uveličanju 20x, kod 6 – 8 životinja iz svake grupe, zbirno u 21. i 28. postoperativnom danu. Ovi termini su za svaku grupu karbonskih vlakana implantiranih potkožno prikazivani zbirno za oba termina, a isti postupak je primenjen i kod karbonskih vlakana implantiranih intramuskularno.

#### 4.8. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Od podataka prikupljenih eksperimentalnim istraživanjem formirana je datoteka u statističkom programskom paketu SPSS 20 (IBM korp.) uz pomoć kojeg su podaci i analizirani. Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  SD. Minimalni nivo statističke značajnosti je ustanovljen na  $p < 0,05$ .

Primenjene su metode deskriptivne i analitičke statistike. Od deskriptivnih statističkih metoda korišćene su mere centralne tendencije i mere varijabiliteta, a od analitičkih statističkih metoda korišćena je, u okviru generalnog linearnog modela, analiza varijanse za ponovljena merenja. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

U statističkoj obradi koncentracije citokina u supernatantima humane makrofagne linije U937, nakon dodavanja karbonskih vlakana, primenjen ni su ANOVA i Studentov t-test.

Sve morfometrijske i stereološke analize dobijene kompjuterizovanim programom (*Leica Interactive Measurements, Leica Microsystems GmbH, Frangfurt, Germany*), obrađene su statističkim programom po Kolmogorov-Smirnovom testu, gde je homogenost varijansi procenjena F-testom. Kraskal-Volisovim testom upoređivane su razlike u dužini fragmentisanih vlakana između grupa. Minimalni nivo statističke značajnosti ustanovljen je na  $p < 0,05$ .

## 5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

### 5.1. KARAKTERISTIKE STANDARDNIH I FUNKCIONALIZOVANIH KISELIH I BAZNIH KARBONSKIH VLAKANA

#### 5.1.1. Karakteristike standardnih vlakana

Za potrebe ovog istraživanja korišćena su komercijalna visokočvrsta karbonska vlakna marke Torayca (T300B, 6000-50B, No 2610622), debljine 4-6  $\mu\text{m}$ . Kao što je prikazano u tabeli 4.1. u poglavlju Materijal i metode, vlakna imaju 6000 filamenata u jednom snopu; debela su 10  $\mu\text{m}$ ; zatezna čvrstoća im je 3530 MPa, tj. 360  $\text{kgf/mm}^2$ ; zatezni modul je 230 Gpa, tj. 23500  $\text{kgf/mm}^2$ ; masa po jedinici dužine je 396 g/1000 m, a gustina je 1,76  $\text{g/cm}^3$ .

#### 5.1.2. Tačka nultog naelektrisanja i količina kiselih i baznih površinskih grupa na funkcionalizovanim karbonskim vlaknima

Tačka nultog naelektrisanja (engl. point of zero charge – PZC) određivana je metodom masene titracije, a količina kiselih i baznih površinskih grupa metodom kiselobazne titracije. Rezultati promene površinskih grupa dejstvom  $\text{HNO}_3$  i  $\text{KOH}$  sumirani su u tabeli 5.1. Rezultati izneti u tabeli pokazuju značajno izmenjen sadržaj površinskih grupa kod vlakana tretiranih azotnom kiselinom u odnosu na vlakna tretirana kalijum-hidroksidom: „kisela“ vlakna imala su na svojoj površini 0,5135 mmol/g kiselih grupa, a baznih 0,3040 mmol/g; „bazna“ vlakna imala su na svojoj površini 0,1011 mmol/g kiselih grupa, a baznih 0,3843 mmol/g. Odnos kiselih prema baznim površinskim grupama je kod kiselih vlakana bio 1,7, a kod baznih 0,3, dok je tačka nultog naelektrisanja za ove dve grupe funkcionalizovanih vlakana bila 5,3 i 8,5.

Tabela 5.1. Površinske grupe funkcionalizovanih kiselih i baznih karbonskih vlakana i PZC

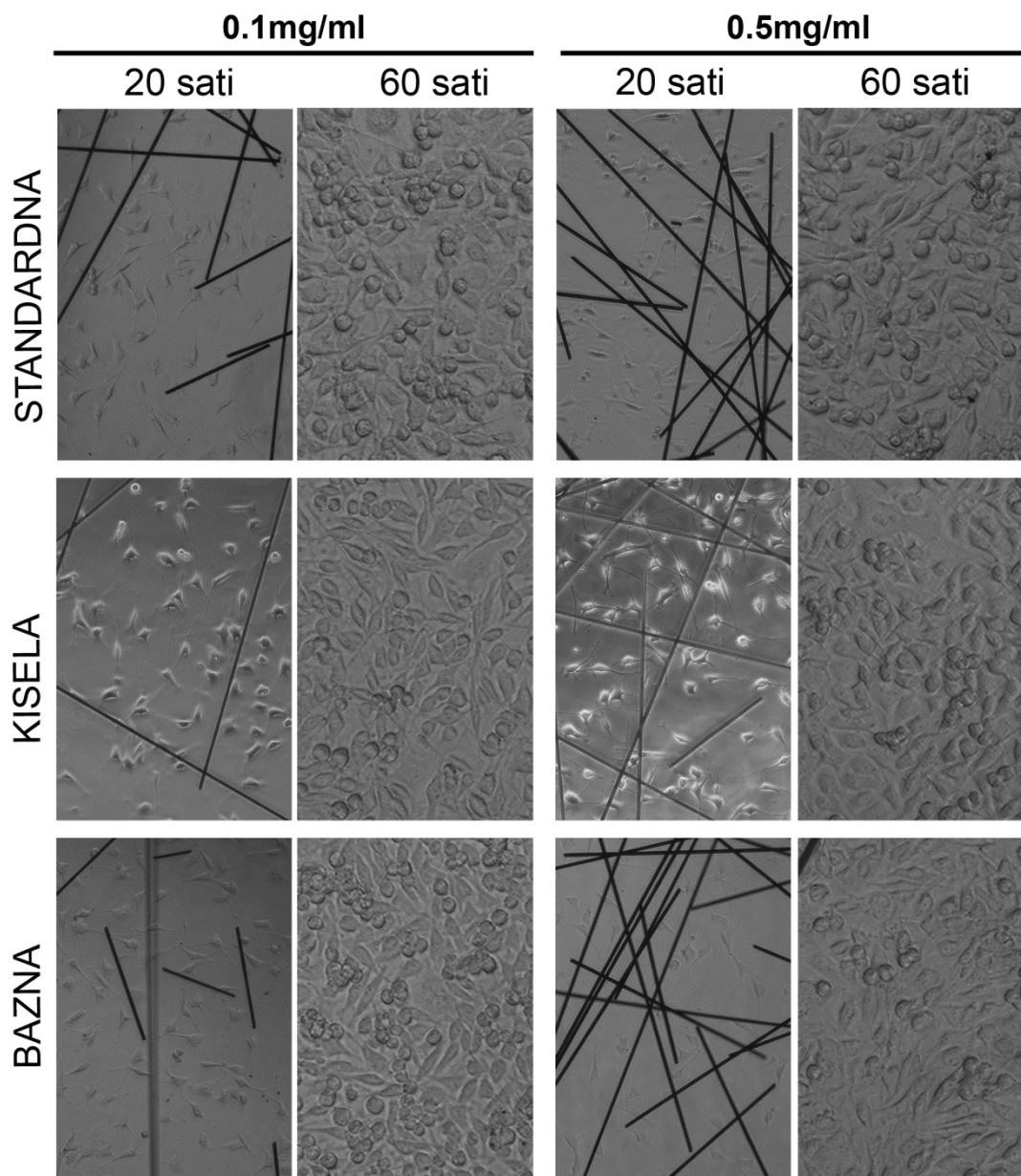
Vrsta vlakna	Kisele grupe (mmol/g)	Bazne grupe (mmol/g)	Kisele : bazne grupe	PZC
K-Kvl*	0,5135	0,3040	1,7	5,3
B-Kvl	0,1011	0,3843	0,3	8,5

K-Kvl, kisela karbonska vlakna; B-Kvl, bazna karbonska vlakna

## 5.2. CITOTOKSIČNOST STANDARDNIH I FUNKCIONALIZOVANIH KISELIH I BAZNIH KARBONSKIH VLAKANA

### 5.2.1. Vijabilnost ćelija kontinuirane linije humanih fibroblasta MRC-5

Citotoksičnost ispitivanih materijala određivana je analizom njihovog uticaja na vijabilnost i adheziju ćelija.

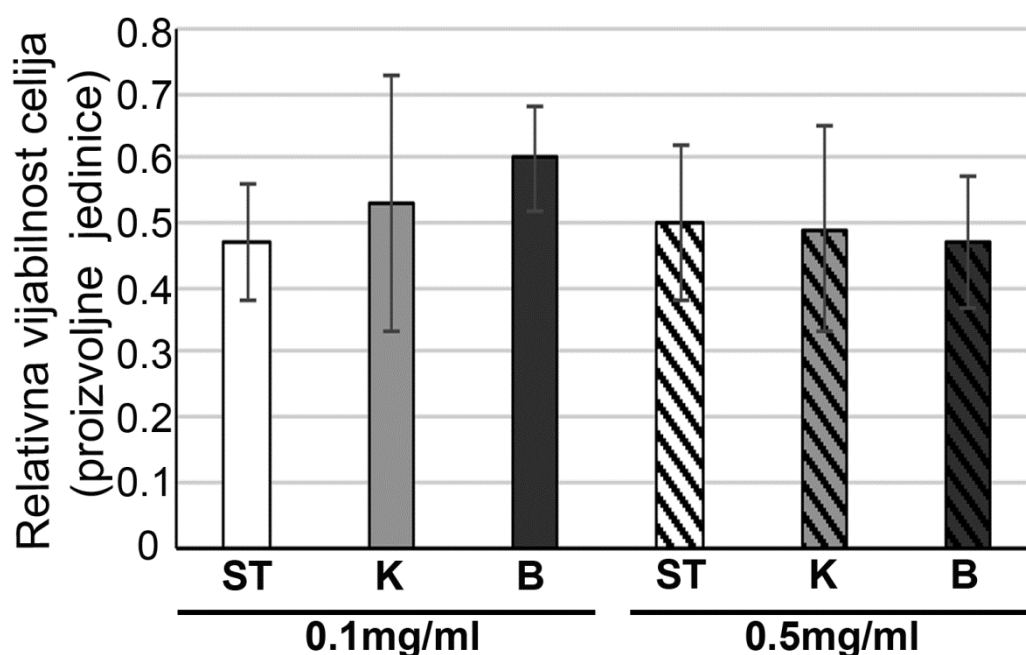


Slika 5.1. Izgled humanih fibroblasta ćelijske linije MRC-5 u prisustvu karbonskih vlakana.



Upoređena je citotoksičnost modifikovanih (kiselih i baznih) i standardnih karbonskih vlakana na humanim fibroblastima kontinuirane ćelijske linije MRC-5. Fibroblasti su gajeni u prisustvu različitih vrsta i koncentracija vlakana (0.1 mg i 0.5 mg/ml medijuma) tokom 24 sata (slika 5.1), a relativni broj vijabilnih ćelija određivan je kolorimetrijskim MTT testom i prikazan na grafikonu kao  $X \pm SD$  (grafikon 5.1).

Morfološki izgled kulture ćelija kojima su dodata vlakna u različitim koncentracijama, kao i rezultati kalorimetrijskog MTT-a, pokazali su da se broj vijabilnih ćelija nije statistički značajno promenio u zavisnosti od vrste i koncentracije prisutnih vlakana, 24 sata nakon dodavanja vlakana u medijum za ćelijsku kulturu.



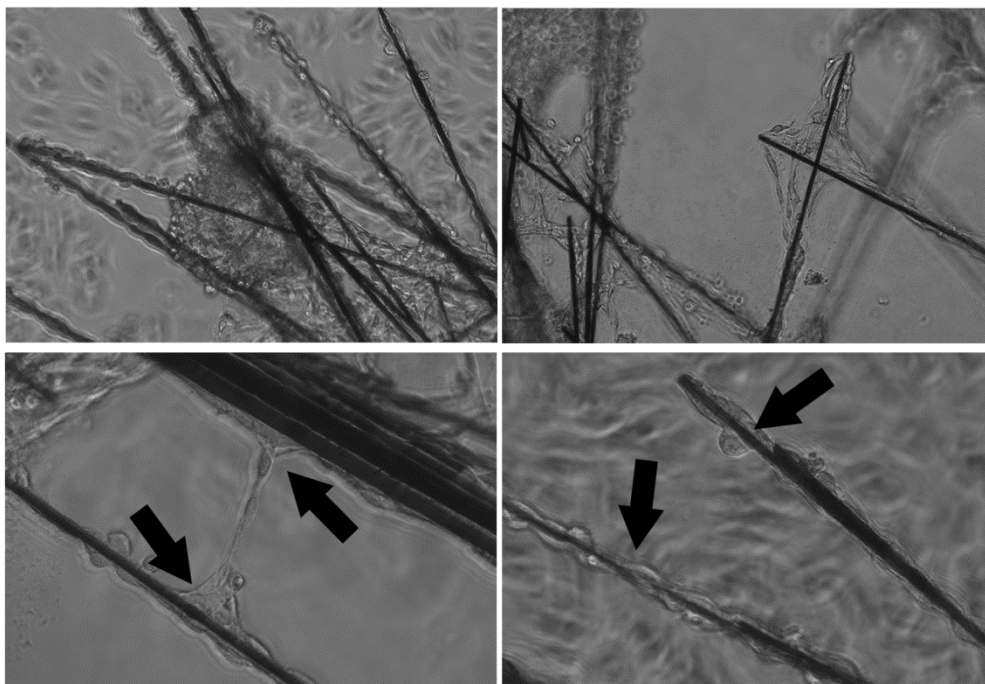
Grafikon 5.1. Relativna vijabilnost ćelija humanih fibroblasta kontinuirane ćelijske linije MRC-5 u prisustvu karbonskih vlakana, procenjena kalorimetrijskim MTT.

### 5.2.2. Efekat karbonskih vlakana na ćelijsku adheziju u kulturi kontinuirane ćelijske linije humanih fibroblasta MRC-5

Potencijalni efekat modifikovanih karbonskih vlakana na adheziju ćelija analiziran je u 3D strukturama formiranim u Matrigelu, ekstraktu bazalne membrane (slika 5.2). Kao što je prikazano na slici, MRC-5 ćelije su adherirale i za kiselomodifikovana i baznomodifikovana vlakna oko kojih su formirale tzv. „ćelijski omotač“. Slično su se ponašale i ćelije u odnosu na standardna vlakna.

KISELA VLAKNA

BAZNA VLAKNA



Slika 5.2. Efekat prisustva karbonskih vlakana u kulturi kontinuirane ćelijske linije humanih fibroblasta MRC-5, na ćelijsku adheziju.

Prikazane su reprezentativne fotografije 3D struktura formiranih u Matrigelu 72 sata nakon zasejavanja ćelija humanih fibroblasta MRC-5 linije.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ne postoji statistički značajna razlika u stepenu citotoksičnosti između modifikovanih („kiselih“ i „baznih“) i standardnih vlakana, koja je u ovom eksperimentu procenjivana na osnovu testa vijabilnosti ćelija (kalorimetrijskog MTT-a) i testa ćelijske adhezije (trodimenzionalna/3D kultivacija ćelija u Matrigel-u) na humanim fibroblastima kontinuirane ćelijske linije MRC-5.

### **5.2.3. Efekat karbonskih vlakana na vijabilnost i funkciju ćelija humane makrofagne linije U937**

**Vijabilnost ćelija** humane makrofagne linije U937 u prisustvu različite koncentracije karbonskih vlakana u kulturi (125  $\mu\text{g/ml}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$  i 500  $\mu\text{g/ml}$  medijuma) prikazana je u tabeli 5.2.

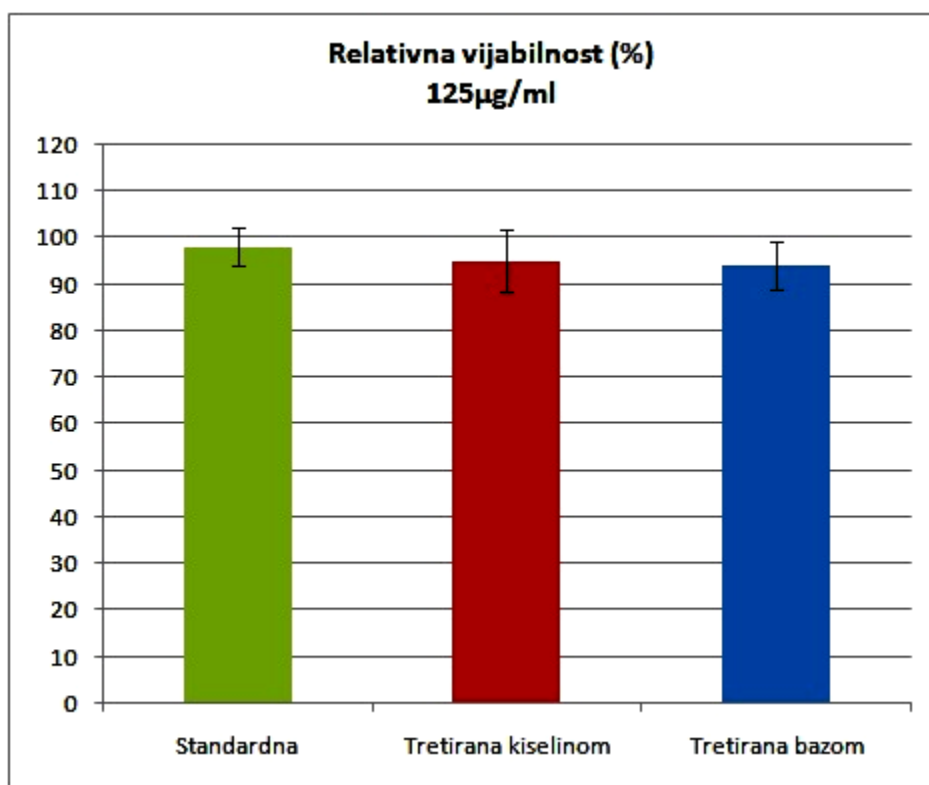
Tabela 5.2. Vijabilnost ćelija humane makrofagne linije U937 u prisustvu karbonskih vlakana.

Tip karbonskih vlakana (KV)	Relativna vijabilnost (%) 500µg/ml	Relativna vijabilnost (%) 250µg/ml	Relativna vijabilnost (%) 125µg/ml
Standardna KV	36,4±7,3***	89,1±3,7*	98,2±3,9
Tretirana kiselinom	27,1±4,6***	82,1±4,2**	95,1±6,6
Tretirana bazom	22,2±4,0***, <sup>a</sup>	76,3±4,9***, <sup>a</sup>	94,0±5,1

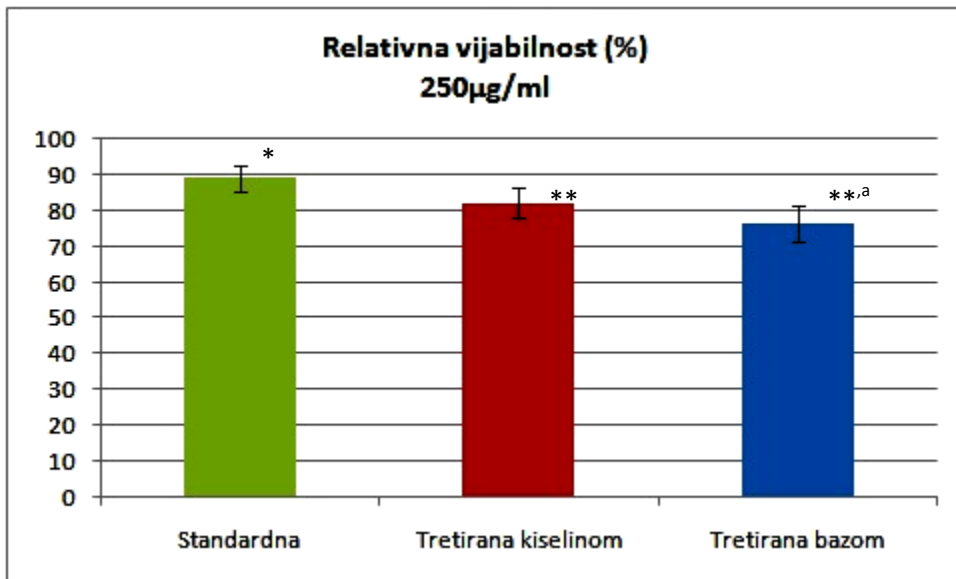
zajednička kontrola :103.1±4.9

\*=p<0,05; \*\*=p<0,01; \*\*\*=p<0.001 u odnosu na kontrolu,

<sup>a</sup>=p<0,05 u odnosu na standardna vlakna

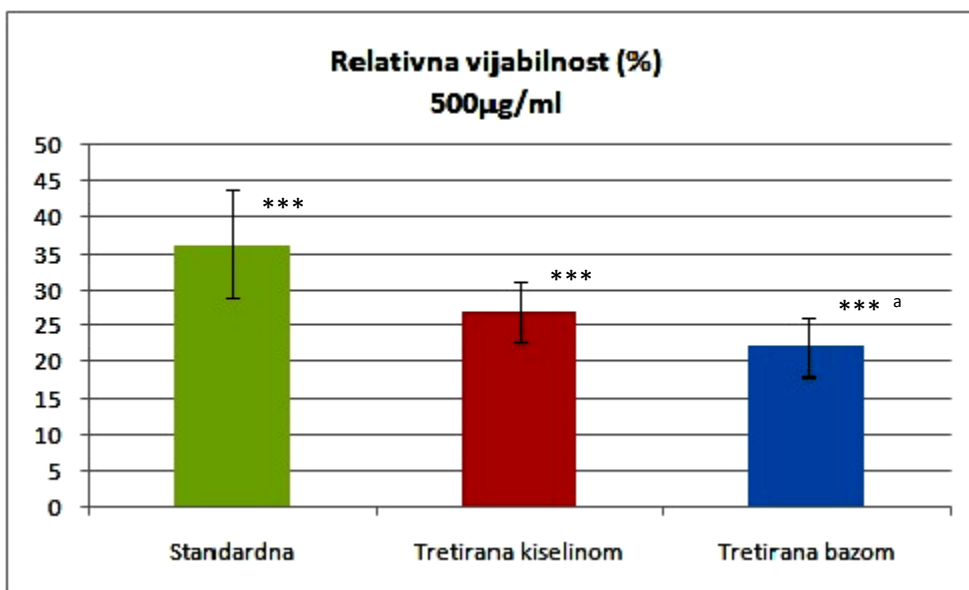


Grafikon 5.2. Vijabilnost ćelija humane makrofagne linije U937 nakon dodavanja u kulturu 125 µg/ml standardnih, kiselih ili baznih karbonskih vlakana.



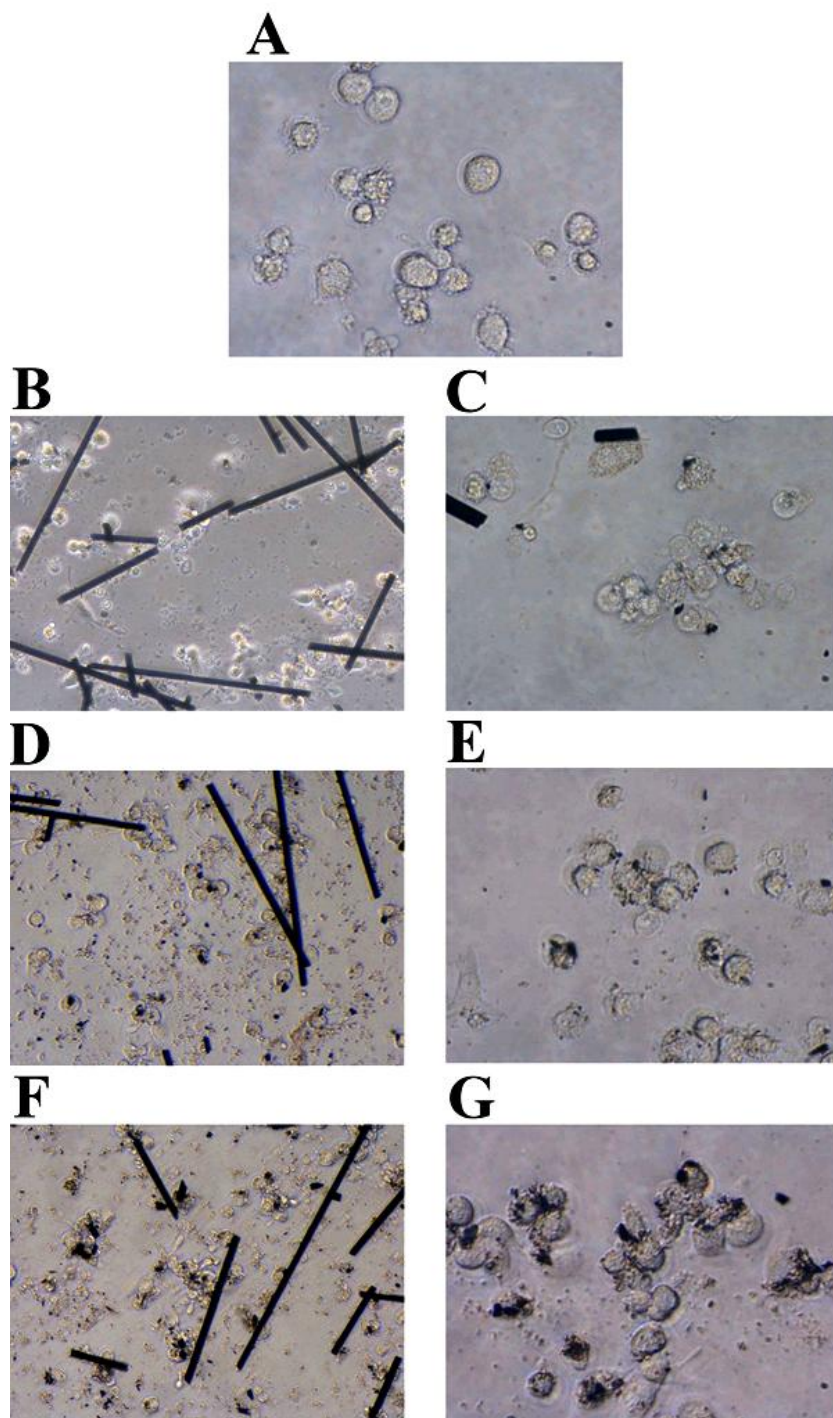
Grafikon 5.3. Vijabilnost ćelija humane makrofagne linije U937 nakon dodavanja u kulturu 250 µg/ml standardnih, kiselih ili baznih karbonskih vlakana

Zajednička kontrola :103.1±4.9; \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; <sup>a</sup>= $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu; a= $p < 0,05$  u odnosu na standardna vlakna



Grafikon 5.4. Vijabilnost ćelija humane makrofagne linije U937 nakon dodavanja u kulturu 500 µg/ml standardnih, kiselih ili baznih karbonskih vlakana.

Zajednička kontrola :103.1±4.9; \*\*\*= $p < 0,001$  u odnosu na kontrolu; <sup>a</sup>= $p < 0,05$  u odnosu na standardna vlakna



Slika 5.3. Izgled humanih makrofaga ćelijske linije U937 na invertnom mikroskopu, u prisustvu 250 µg karbonskih vlakana.

A – kontrola, U937 48h nakon ispiranja 40x1; B – U937 sa dodatih 250 µg standardnih KV, 48h nakon ispiranja 20x4; C – U937 sa dodatih 250 µg kiselih KV, 48h nakon ispiranja 40x3; D – U937 sa dodatih 250 µg kiselih KV, 48h nakon ispiranja 20x2; E – U937 sa dodatih 250 µg kiselih KV, 48h nakon ispiranja 40x4; F – U937 sa dodatih 250 µg baznih KV, 48h nakon ispiranja 20x1; G – U937 sa dodatih 250 µg baznih KV, 48h nakon ispiranja 40x1.

Relativna vijabilnost ćelija bila je veoma slična kontrolnim vrednostima i nepromenjena u kulturama humane makrofagne linije U937, nakon dodavanja 125 µg/ml karbonskih vlakana, bilo da se radilo o standardnim vlaknima (98,2±3,9%), ili vlaknima tretiranim kiselinom (95,1±6,6) ili bazom (94,0±5,1) (tabela 5.2 i grafikon 5.2), u odnosu na kontrolne vrednosti.

Međutim, dodavanjem vlakana u koncentraciji od 250 µg/ml ili 500 µg/ml, dolazi do statistički značajnog linearnog smanjenja relativne vijabilnosti ćelija u kulturama sa dodatim standardnim, kiselim ili baznim karbonskim vlaknima, s tim što vijabilnost ćelija generalno rapidno opada nakon primene vlakana u koncentraciji od 500 µg/ml (tabela 5.2 i grafikoni 5.3 i 5.4) u odnosu na kontrolne vrednosti. Uočljivo je da do najvećeg smanjenja vijabilnosti humanih makrofaga linije U937 prilikom primene vlakana u koncentraciji od 250 i 500 µg/ml, dolazi nakon dodavanja baznih, potom kiselih i na kraju standardnih karbonskih vlakana. Tako je npr. vijabilnost makrofaga nakon dodavanja 250 µg/ml baznih vlakana 76,3±4,9%, a nakon dodavanja 500 µg/ml istog tipa vlakana svega 22,2±2,4%. Smanjenje vijabilnosti statistički je značajno za svaku grupu vlakana kod obe primenjene doze u odnosu na kontrolne vrednosti, a u pogledu baznih karbonskih vlakana i u odnosu na standardna vlakna (tabela 5.2, slika 5.3).

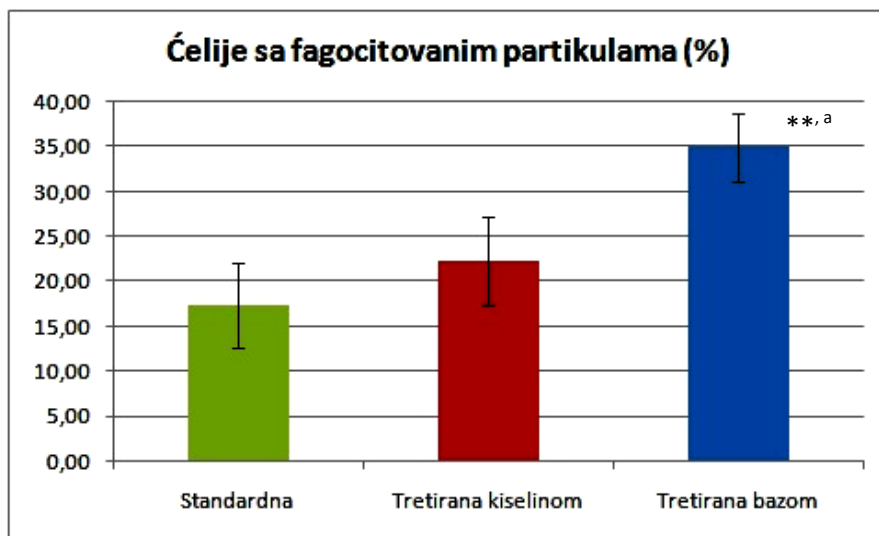
Rezultati **internalizacije karbonskih vlakana** u kulturama humane makrofagne linije U937, prikazani su u tabeli 5.3, na grafikonu 5.5. i na slici 5.4. Analizirane su native kulture, a prikazani su rezultati za koncentraciju vlakana od 250 µg/ml kulture. Statistički znatno veći broj makrofagnih ćelija fagocitovao je vlakna tretira bazom (34,9±3,8%), u odnosu na fagocitozu standardnih karbonskih vlakana (17,3±4,7%), pri čemu je postojala i statistički značajna razlika između broja ćelija sa fagocitovanim partikulama baznih karbonskih vlakana u odnosu na kiselina, u korist baznih vlakana (34,9±3,8% : 22,3±4,9%; p<0,05).

Tabela 5.3. Internalizacija karbonskih vlakana u kulturama humane makrofagne linije U937.

Tip karbonskih vlakna (KV)	% ćelija sa fagocitovanim partikulama
Standardna	17,3±4,7
Tretirana kiselinom	22,3±4,9
Tretirana bazom	34,9±3,8** <sup>a</sup>

Napomena: Prikazani su rezultati analiziranih kultura sa 250 µg/ml KV.

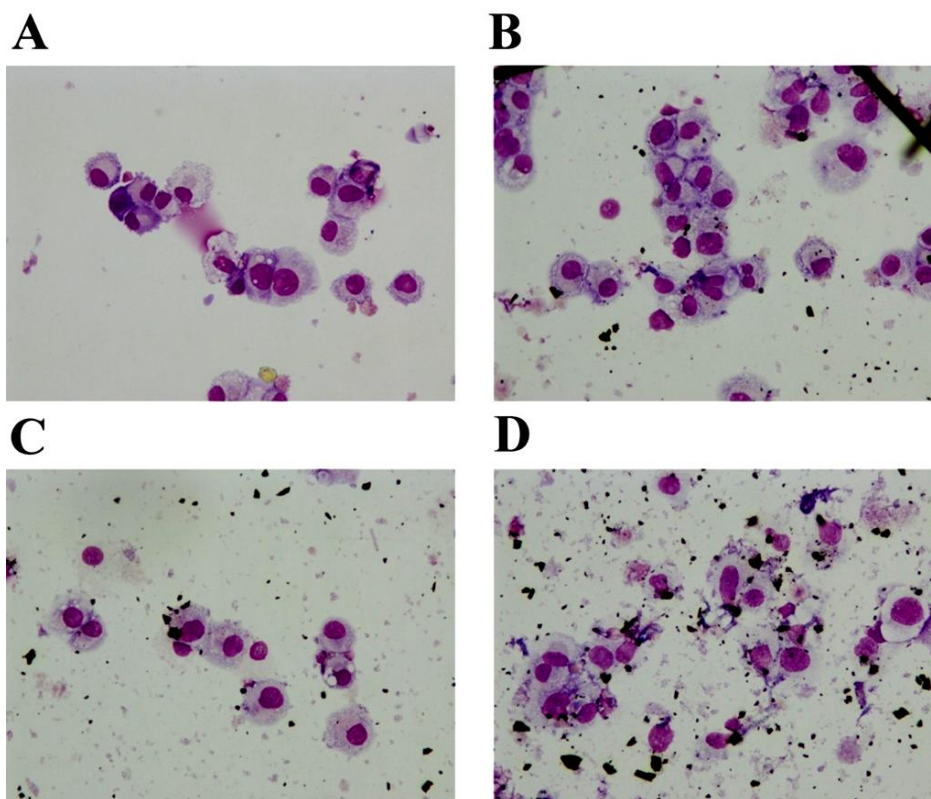
\*\*=p<0.01 u odnosu na standardna vlakna; <sup>a</sup>=p<0.05 u odnosu na vlakna tretirana kiselinom



Grafikon 5.5. Makrofagne ćelije iz kulture U937 sa fagocitovanim partikulama karbonskih vlakana dodatih u kulturu.

Napomena: Prikazani su rezultati analiziranih kultura sa 250  $\mu\text{g/ml}$  KV.

\*\*= $p < 0.01$  u odnosu na standardna vlakna; a= $p < 0.05$  u odnosu na vlakna tretirana kiselinom



Slika 5.4. Izgled makrofaga iz kulture U937 sa fagocitovanim partikulama karbonskih vlakana dodatih u kulturu. Citospin preparati obojeni po *May-Grünwald – Giemsa*.

A – U937, kontrola, nakon ispiranja 40x1; B – U937, 250  $\mu\text{g}$  standardnih KV, nakon ispiranja 40x3; C – U937, 250  $\mu\text{g}$  kiselih KV, nakon ispiranja 40x1; D – U937, 250  $\mu\text{g}$  baznih KV, nakon ispiranja 40x2.

**Koncentracije citokina TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-8** u supernatantima kultura humane makrofagne linije U937 tretirane karbonskim vlaknima u koncentracijama 125 i 250  $\mu$ g/ml, prikazane su u tabeli 5.4 i grafikonima 5.7 do 5-12.

Tabela 5.4. Koncentracija citokina TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-8 u supernatantima kultura humane makrofagne ćelijske linije U937 tretirane karbonskim vlaknima

Tip vlakna	koncentracija	TNF- $\alpha^{\wedge}$	IL-1 $\beta^{\wedge}$	IL-6 $\wedge$	IL-8 $\wedge$
<b>Kontrola</b>		2980 $\pm$ 401	108 $\pm$ 32	65 $\pm$ 14	206 $\pm$ 43
<b>Standardna</b>	250 $\mu$ g/ml	3004 $\pm$ 286	75 $\pm$ 8*	564 $\pm$ 78***	795 $\pm$ 106***
	125 $\mu$ g/ml	4325 $\pm$ 488*	165 $\pm$ 21	43 $\pm$ 7	114 $\pm$ 23*
<b>Tretirana kiselinom</b>	250 $\mu$ g/ml	1410 $\pm$ 277**	97 $\pm$ 5	6 $\pm$ 5***	11 $\pm$ 8***. k
	125 $\mu$ g/ml	4215 $\pm$ 422*	170 $\pm$ 21*	923 $\pm$ 123***	1437 $\pm$ 311***
<b>Tretirana bazom</b>	250 $\mu$ g/ml	277 $\pm$ 182***. c	113 $\pm$ 12 <sup>f</sup>	27 $\pm$ 9**	16 $\pm$ 7***. i
	125 $\mu$ g/ml	2395 $\pm$ 304 <sup>a, b</sup>	78 $\pm$ 10 <sup>d, e</sup>	944 $\pm$ 116***	575 $\pm$ 78***. g, h

♠Vrednosti su date kao pg/ml

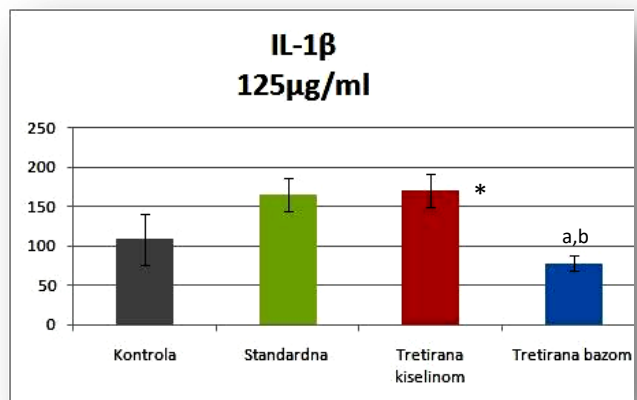
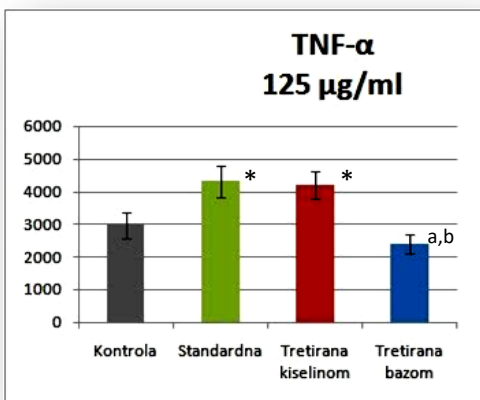
\*=p<0,05; \*\*=p<0,01; \*\*\*=p<0,001 u odnosu na kontrolu

a=p<0,05 u odnosu na KV tretirana kiselinom; b=p<0,05 u odnosu na standardna KV; c=p<0,01 u odnosu na KV tretirana kiselinom; d=p<0,05 u odnosu na KV tretirana kiselinom; e=p<0,05 u odnosu na standardna KV; f=p<0,05 u odnosu na standardna KV; g=p<0,01 u odnosu na KV tretirana kiselinom; h=p<0,001 u odnosu na standardna KV; i=p<0,001 u odnosu na standardna KV; k=p<0,001 u odnosu na standardna KV.

Rezultati su pokazali povećanu koncentraciju proinflammatoryh citokina TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  u supernatantima kulture humanih makrofaga linije U937 nakon dodavanja standardnih ili kiselih vlakana **u koncentraciji od 125  $\mu$ g/ml** u odnosu na kontrolne vrednosti, dok je dodavanje baznih vlakana u istoj koncentraciji uslovalo smanjenu produkciju ovih citokina u odnosu na vrednosti za kiselina i bazna vlakna (tabela 5.4 i grafikonima 5.6 i 5.7). U istoj koncentraciji, standardna vlakna su dovela do statistički beznačajnog smanjenja IL-6 i statistički značajnog smanjenja IL-8, a kiselina i bazna vlakna do izrazitog visoko statistički značajnog povećanja produkcije proinflammatoryh citokina IL-6 i IL-8 iz humanih makrofaga ćelijske linije U937 u odnosu na kontrolne vrednosti. Pri tome, vlakna tretirana kiselinom bila su snažniji stimulator produkcije

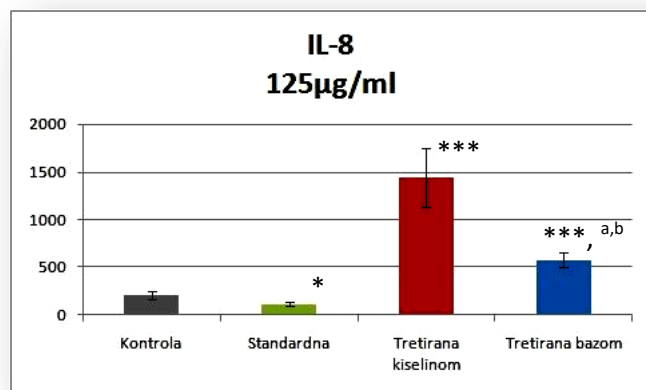
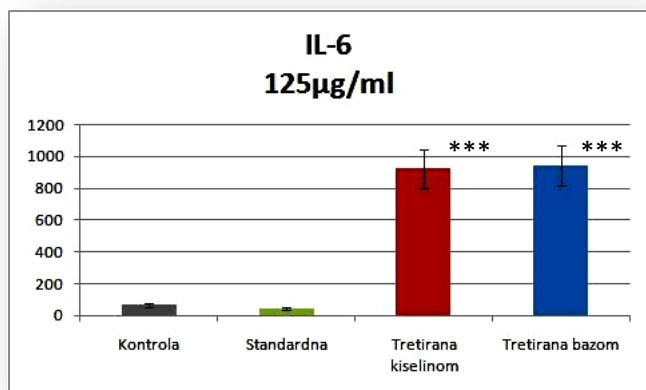


IL-8 iz makrofaga u odnosu na vlakna tretirana bazom, dok u odnosu na produkciju IL-6 nije bilo razlike u stepenu stimulacije produkcije ovog citokina između kiselih i baznih vlakana (tabela 5.4 i grafikoni 5.8 i 5.9).



Grafikoni 5.6 (levo) i 5.7 (desno). Koncentracija TNF-α i IL-1b u supernatantu kulture humanih makrofaga linije U937, nakon dodavanja 125 mg/ml standardnih, kiselih ili baznih KV.

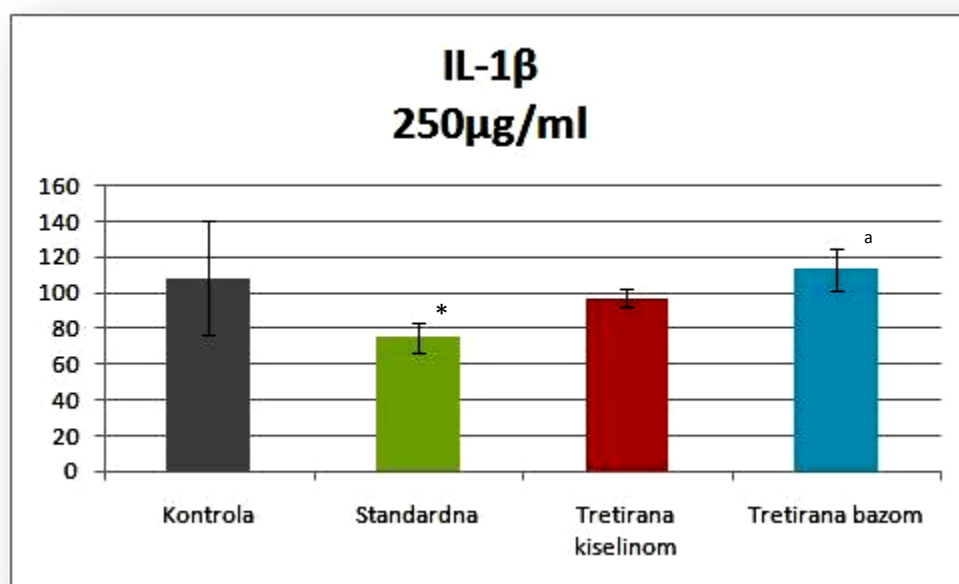
\*=p<0,05 u odnosu na kontrolu; a=p<0,05 u odnosu na KV tretirana kiselinom; b=p<0,05 u odnosu na standardna KV



Grafikoni 5.8 (levo) i 5.9 (desno). Koncentracija IL1-6 i IL-8 u supernatantu kulture humanih makrofaga linije U937, nakon dodavanja 125 mg/ml standardnih, kiselih ili baznih karbonskih vlakana.

\*=p<0,05 u odnosu na kontrolu; \*\*\*=p<0,001; a=p<0,01 u odnosu na istu koncentraciju KV tretiranih kiselinom; b=p<0,001 u odnosu na istu koncentraciju standardnih KV

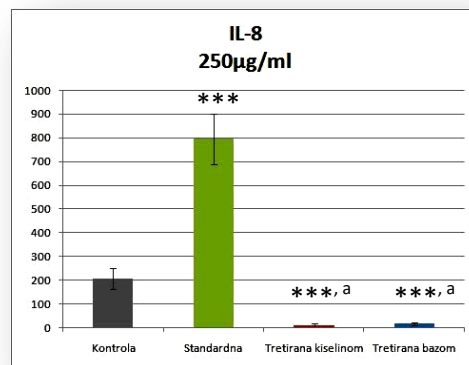
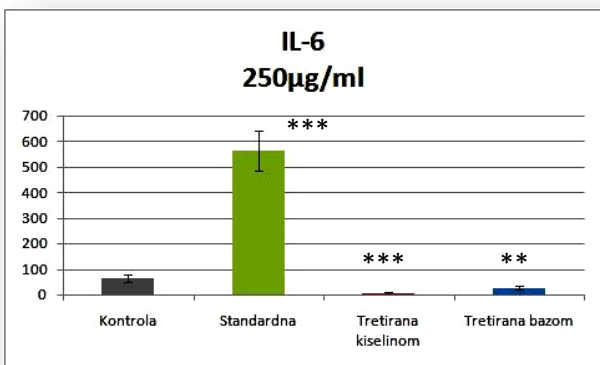
Rezultati koncentracije ispitivanih citokina nakon dodavanja standardnih, kiselih ili baznih vlakana u koncentraciji od 250  $\mu\text{g/ml}$  u kulture humanih makrofaga ćelijske linije U937, znatno su se razlikovali u odnosu na efekte koje su izazivala KV dodata u koncentraciji od 125  $\mu\text{g/ml}$ . Vrednosti koncentracija IL-1 $\beta$  bile su vrlo slične kontrolnim vrednostima ukoliko se dodaju KV ma koje vrste u koncentraciji od 250  $\mu\text{g/ml}$ . Ipak, sa niskom značajnošću ( $p < 0,05$ ), standardna vlakna su smanjivala produkciju ovog interleukina u odnosu na kontrolne vrednosti (75+8 pg/ml : 108+32 pg/ml), a bazna povećavala, pri čemu je postojala niska statistička značajnost između vrednosti koncentracije ovog interleukina pri primeni baznih vlakana u odnosu na standardna (113+12 pg/ml : 75+8 pg/ml,  $p < 0,05$ ) (tabela 5.4 i grafikon 5.10).



Grafikon 5.10. Koncentracija IL-1 $\beta$  u supernatantu kulture humanih makrofaga linije U937, nakon dodavanja 250  $\mu\text{g/ml}$  standardnih, kiselih ili baznih karbonskih vlakana.  
 \*= $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu; a= $p < 0,001$  u odnosu na primenu iste koncentracije standardnih KV.

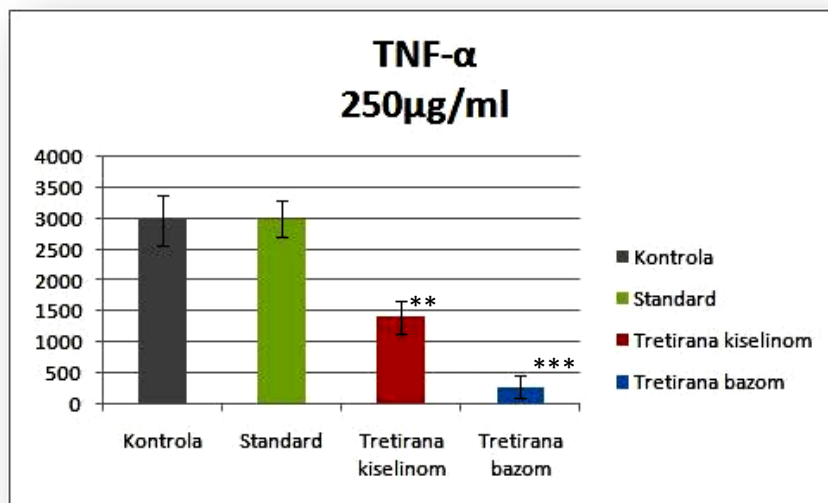
Međutim, produkcija IL-6 i IL-8 snažno je stimulisana pod uticajem standardnih karbonskih vlakana u koncentraciji od 250  $\mu\text{g/ml}$ , a višestruko inhibirana nakon dodavanja kiselih ili baznih vlakana u istoj koncentraciji, u odnosu na kontrolne vrednosti. Sve razlike bile su statistički visoko značajne. Takođe, postojala je statistička značajnost razlika između koncentracije IL-8 uslovljene primenom baznih i kiselih vlakana u odnosu na standardna karbonska vlakna (tabela 5.4 i grafikoni 5.11 i 5.12).

Što se tiče koncentracije TNF- $\alpha$ , standardna karbonska vlakna u koncentraciji od 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  nisu dovela do promene koncentracije ovog citokina u supernatantu humane makrofagne ćelijske linije U937 u odnosu na kontrolne vrednosti, dok su kisela, a naročito bazna vlakna u istoj koncentraciji, dovela do smanjenja koncentracije ovog citokina; pri tome, smanjenje sekrecije u prisustvu baznih vlakana desetostruko je bilo manje u poređenju sa kontrolnim vrednostima (tabela 5.4 i grafikon 5.13).



Grafikoni 5.11 (levo) i 5.12 (desno). Koncentracije IL-6 i IL-8 u supernatantu kulture humanih makrofaga U937, nakon dodavanja u kulturu 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  standardnih, kiselih ili baznih karbonskih vlakana.

\*\*= $p < 0,01$  u odnosu na kontrolu; \*\*\*= $p < 0,001$  u odnosu na kontrolu;  
a= $p < 0,001$  u odnosu na standardna karbonska vlakna.



Grafikon 5.13. Koncentracija TNF- $\alpha$  u supernatantu kulture humanih makrofaga linije U937, nakon dodavanja u kulturu 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  standardnih, kiselih ili baznih karbonskih vlakana.

\*\*= $p < 0,01$  u odnosu na kontrolu; \*\*\*= $p < 0,001$  u odnosu na kontrolu.

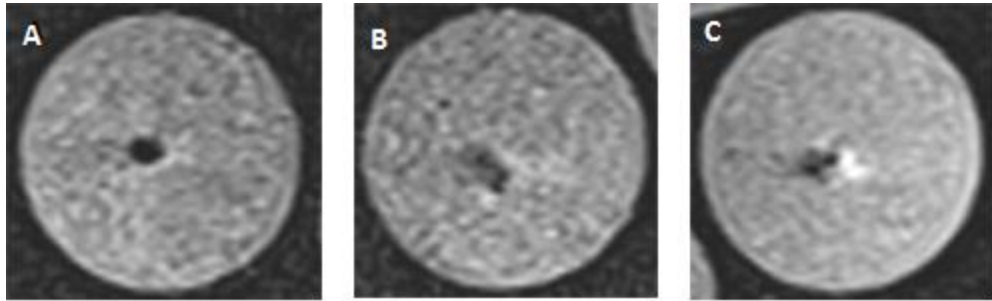
### 5.3. NUKLEARNA MAGNETNA REZONANCA IMPLANTIRANE ZONE

Nuklearnom magnetnom rezonancom (NMR) praćena je pozicija implantata u tkivu i reakcija okolnog tkiva, na osnovu koje se mogla procenjivati biokompatibilnost. Implantati ne daju signal na magnetnoj rezonanci jer nemaju pokretne atome vodonika. Stepem reakcije tkiva neposredno uz sam implantat, kao i eventualne promene signala tkiva oko implantata uoćavale su se u vidu promene intenziteta signala – hipointenzivnog ili hiperintenzivnog. Promena jaćine signala zavisi od kolićine vodonikovih jona u tkivu, tako da se moće kontrolisati reakcija okolnog tkiva na implantat, kao i stepen te reakcije. Rezultati ispitivanja NMR porećeni su sa rezultatima histopatoloćke analize uzoraka tkiva dobijenih nakon ųrtvovanja ųivotinja.

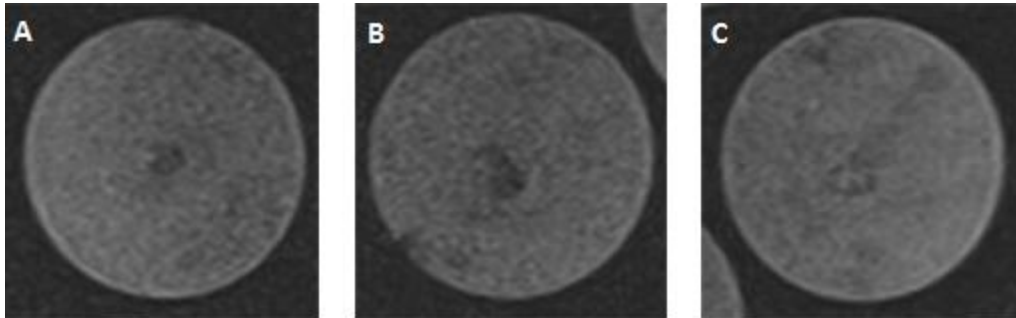
ųivotinje su za potrebe pregleda pripremljene na naćin opisan u poglavlju Materijal i metode. Pregled ųivotinja nuklearnom magnetnom rezonancom (slika 5.3) raćen je 1, 2, 3. i 4. nedelje nakon operativnog zahvata, na aparatu *1.5 T imager* (Avanto, Siemens, Nemaćka), komercijalnom zavojnicom za koleno. Koriććene su pretećno dve MRI (ebgl. Magnetic Resonance Imaging) sekvence, *Turbo spin echo T1W* (TR = 820 ms, TE = 11 ms ) i *T2W* (TR = 8620 ms, TE = 81 ms), kao i sekvence za optimizaciju protokola snimanja, *T2W TrueFISP*, *T2W SPACE*, i *T1W FLASH*.



Slika 5.3. Postupak praćenja NMR zone implantacije kod kunića.



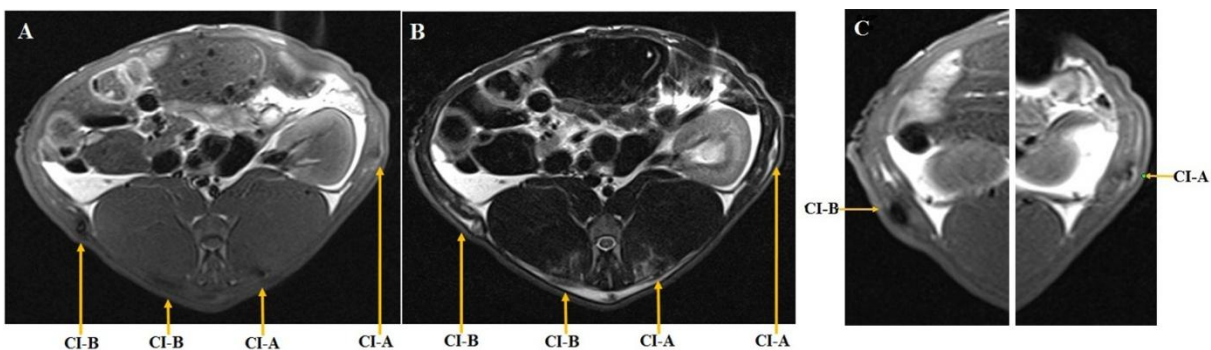
Slika 5.4. MR T1W slike gel-fantoma, longitudinalni slajs, A. netretiranih vlakana, B. vlakana tretiranih kiselinom, i C. vlakana tretiranih bazom.



Slika 5.5. MR T2W slike gel fantoma, longitudinalni slajs, A. netretiranih vlakana, B. vlakana tretiranih kiselinom, i C. vlakana tretiranih bazom.

Na osnovu rezultata dobijenih posmatranjem gel-fantoma (slika 5.5), čini se da modifikacije površine implantata nemaju uticaj na izgled NMR-slike, jer su dimenzije praznine signala u suštini iste kod sve tri vrste implantata. Treba istaći da izgled implantata na NMR ne oslikava stvarne dimenzije implantata. Magnetna osetljivost artefakata povećava prazninu signala, tako da je razlika između prečnika NMR implantata i njihove stvarne veličine različita za oko 10%. Promena površine implantata nema nikakav efekat na njihov prikaz na NMR, s obzirom da to zavisi od grupne osetljivosti između implantata i okolnih medija.

Reakcija tkiva i stanje implantata od karbonskih vlakana tretiranih kiselinom (CI-A), ili bazom (CI-B) u mišiću (i.m.) ili potkožnom tkivu/ supkutano (s.c.), 7. dana nakon implantacije prikazani su na slici 5.6.



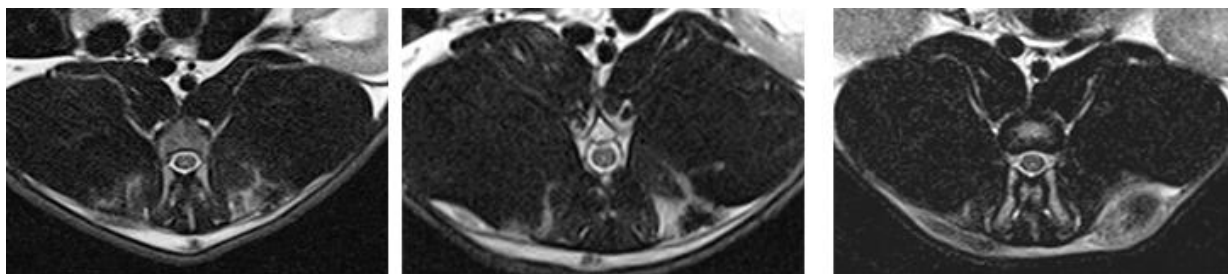
Slika 5.6. NMR kunića sa implatiranim CI-A i CI-B u mišić ili potkožno tkivo 7. dana nakon operativnog zahvata.

A i B – T1W i T2W slike istog preseka sa intramuskularnim i potkožnim implantatima. C–T1W slika potkožnih implantata (levo–CI-B, desno– CI-A).

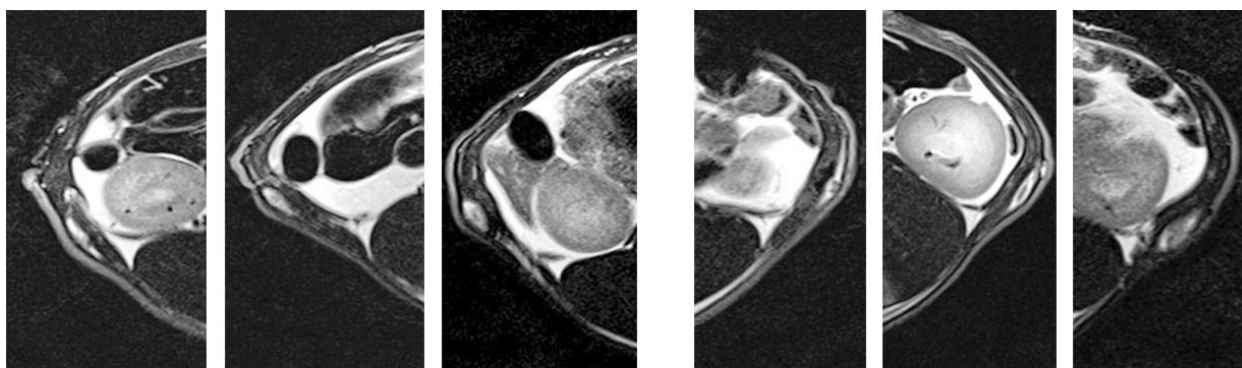
Slika 5.6A i B pokazuje vidljivost sva 4 implantata – CI-A-i.m., CI-A-s.c., CI-B-i.m. i CI-B-s.c. Iako se sva četiri implantata mogu prikazati na jednom NMR preseku, zbog nedovoljne preciznosti pristupilo se daljoj analizi (slika 5.6C). Implantati su bolje naznačeni na slikama T1W nego na slikama T2W (poređenje slika A i B). Isto tako, izgled implantata je promenljiv u zavisnosti od preseka, i kreće se od okruglog oblika, do spljoštenog (CI-B-i.m.), što može biti posledica operativne tehnika implantacije. Najvažnije oblasti povećanja intenziteta signala (hiperintenzivno, u poređenju sa normalnim mišićnim tkivom), nalaze se oko implantata u mišiću na T2W slici (slika 5.6B). Hiperintenzivna mesta na T2W slikama pokazuju edematozno ili inflamirano tkivo koje može biti posledica traume nastale tokom hirurške intervencije, ili inflamatorne reakcije tkiva na implantat. Ovo nije vidljivo na T1W slikama s obzirom da voda ima niži stepen intenziteta na ovim slikama.

**Reakcija mišićnog tkiva na implantate** od kiselih i baznih karbonskih vlakana u mišićnom tkivu u toku perioda praćenja **7,14 i 21. dana nakon implantacije**, prikazana je na slici 5.7. Na sklici 5.8. prikazana je **reakcija tkiva na potkožnu implantaciju** istih vrsta vlakana u istom periodu praćenja. Obe kompozitne slike odnose se na T2W MR. Treba primetiti da je nemoguće snimiti identičan slajs svakog narednog snimanja zbog različitog položaja životinje pri svakom pregledu NMR.

Na slici 5.7. vidi se hiperintenzivno područje na mestu intramuskularne implantacije CI-A i CI-B vlakana. Hiperintenzivno područje se zadržava oko CI-A-i.m. implantata do 21. dana, dok se blago gubi oko CI-B-i.m. implantata, osim na njegovoj neposrednoj površini.

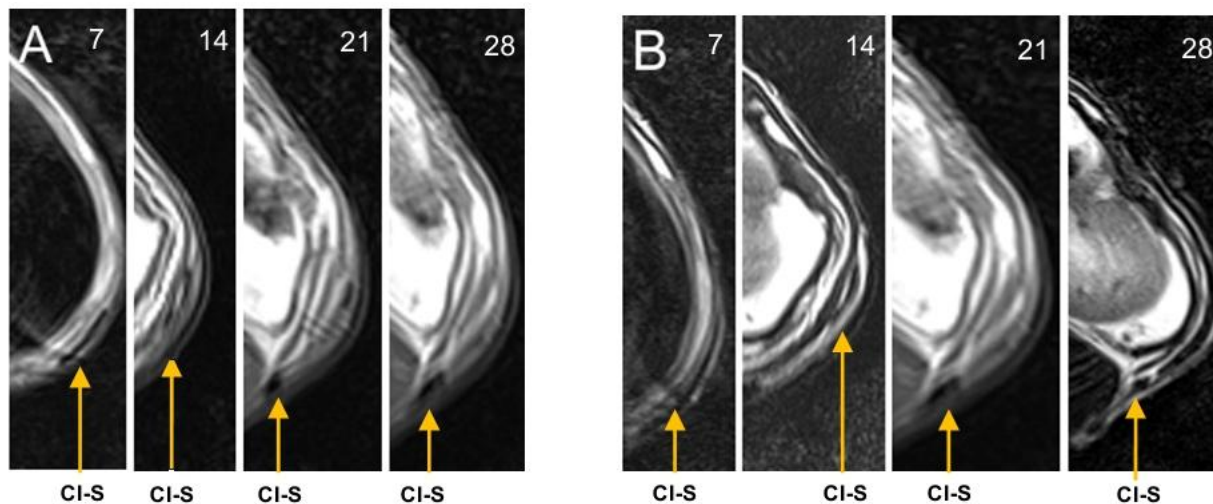


Slika 5.7. Longitudinalne T2W MR slike odgovora mišićnog tkiva na implantate 7, 14. i 21. dana nakon implantacije.



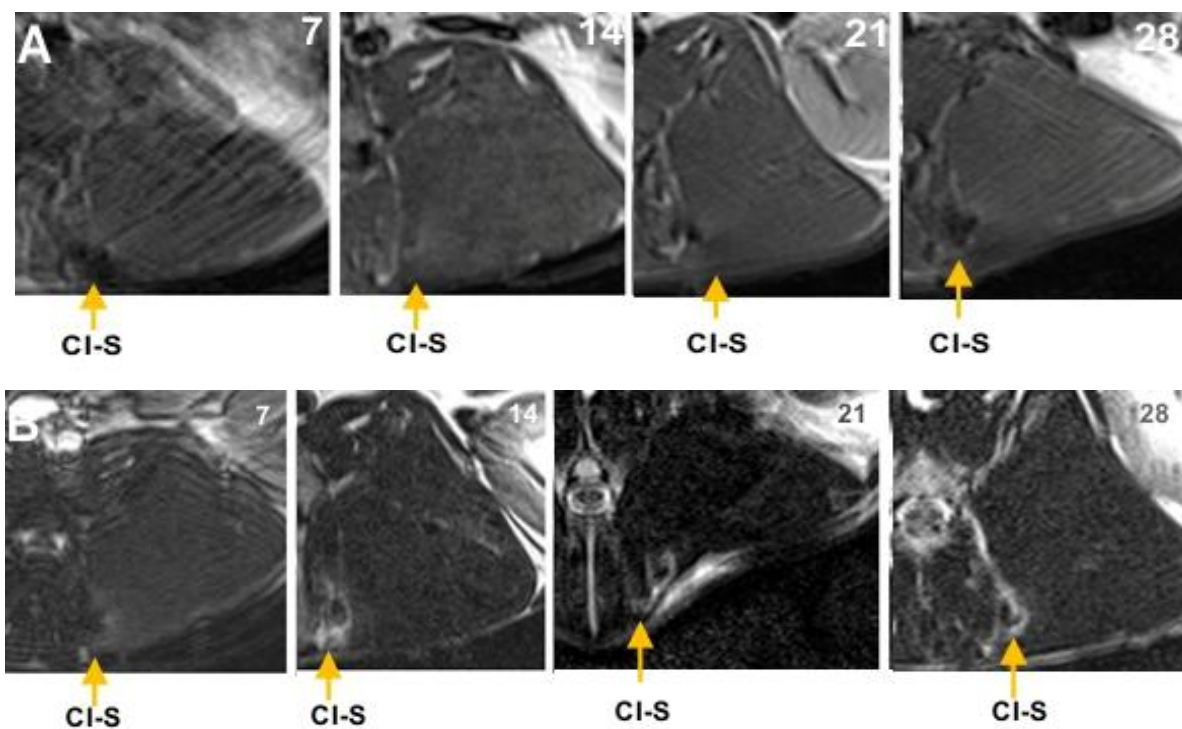
Slika 5.8. Longitudinalne T2W MR slike odgovora potkožnog tkiva na implantate 7, 14. i 21. dana posle implantacije.

**Reakcija potkožnog tkiva na implantate** od kiselih i baznih karbonskih vlakana 7, 14. i 21. dana (slika 5.8) je manje-više slična reakciji mišićnog tkiva, ali je manjeg intenziteta. Razlika u reakciji tkiva na CI-A i CI-B implantate je takođe manje izražena u poređenju sa intramuskularnim implantacijama. Progresija hiperintenzivnog područja oko CI-A implanta je jasno vidljiva sve do 21. dana praćenja.



Slika 5.9. NMR kunića sa potkožno implantiranim standardnim vlaknima (CI-S), 7,14, 21. i 28. dana nakon operativnog zahvata.

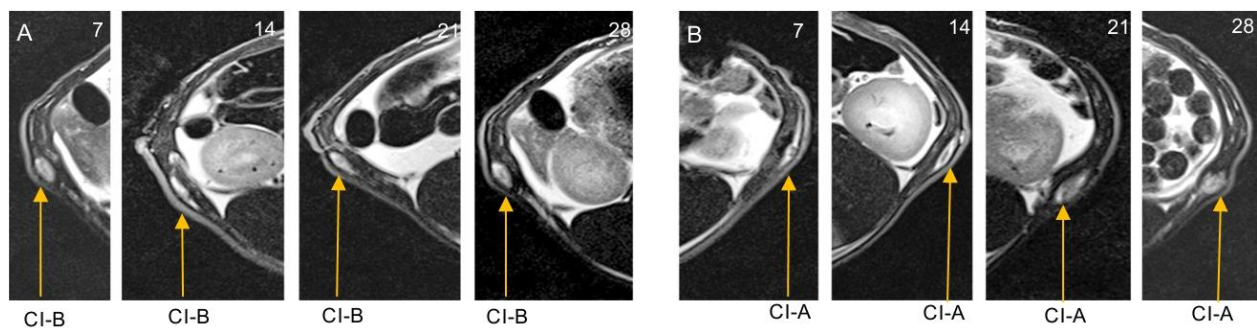
Sekvence: A – T1W i B-T2W slike istog preseka.



Slika 5.10. NMR kunića sa intramuskularno implantiranim standardnim vlaknima (CI-S), 7,14, 21. i 28 dana nakon operativnog zahvata.

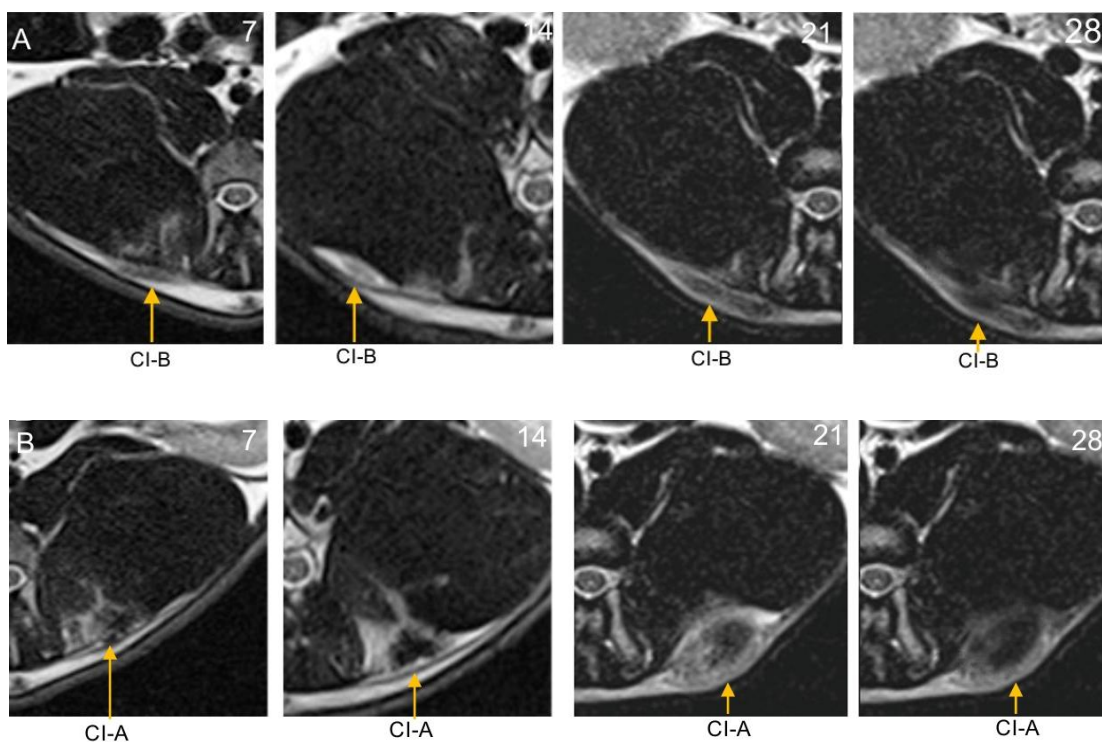
Sekvence: A – T1W i B – T2W slike istog preseka.





Slika 5.11. Longitudinalne T2W MR slike odgovora potkožnog tkiva na implantate CI-B i CI-A, 7, 14, 21. i 28. dana posle implantacije

A – reakcija tkiva na CI-B implantate; B – reakcija tkiva na CI-A implantate.



Slika 5.12. Longitudinalne T2W MR slike odgovora mišićnog tkiva na implantate CI-B i CI-A, 7, 14, 21. i 28. dana nakon implantacije.

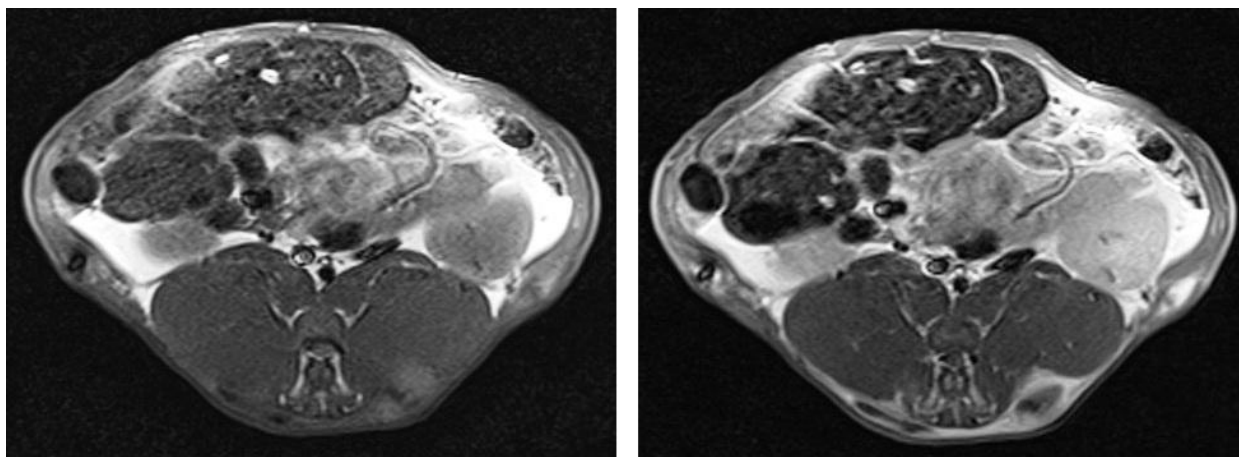
A- reakcija mišićnog tkiva na CI-B implantate; B- reakcija mišićnog tkiva na CI-A implantate.

Slike 5.9 i 5.10 prikazuju MR kunića sa potkožno (slika 5.9) ili intamuskularno (slika 5.10) implantiranim **standardnim karbonskim vlaknima u sva četiri termina praćenja – 7,14,**

21. i 28. postoperativnog dana. Sa slika se vidi da je reakcija mišićnog i potkožnog tkiva na implantirana standardna karbonska vlakna vrlo slična već prikazanoj reakciji tih tkiva na implantirana bazna karbonska vlakna i da se hiperintenzivna zona oko implantata redukuje progresivno sa protokom vremena posle operacije.

Slično prethodnim slikama, slike 5.11 i 5.12 pokazuju NMR kunića sa **potkožno** (slika 5.11) ili **intramuskularno** (slika 5.12) implantiranim **baznim i kiselim karbonskim vlaknima u sva četiri termina praćenja** – 7, 14, 21. i 28. postoperativni dan. Hiperintenzivna zona oko CI-A-i.m. implantata je jača u odnosu na istu oko CI-B-i.m. implantata, ali se redukuje progresivno sa protokom vremena posle operacije.

**Kontrastno snimanje NMR** je poboljšalo ovaj pregled i potvrdilo nalaze dobijene konvencionalnim snimanjem NMR (slike 5.13 i 5.14).



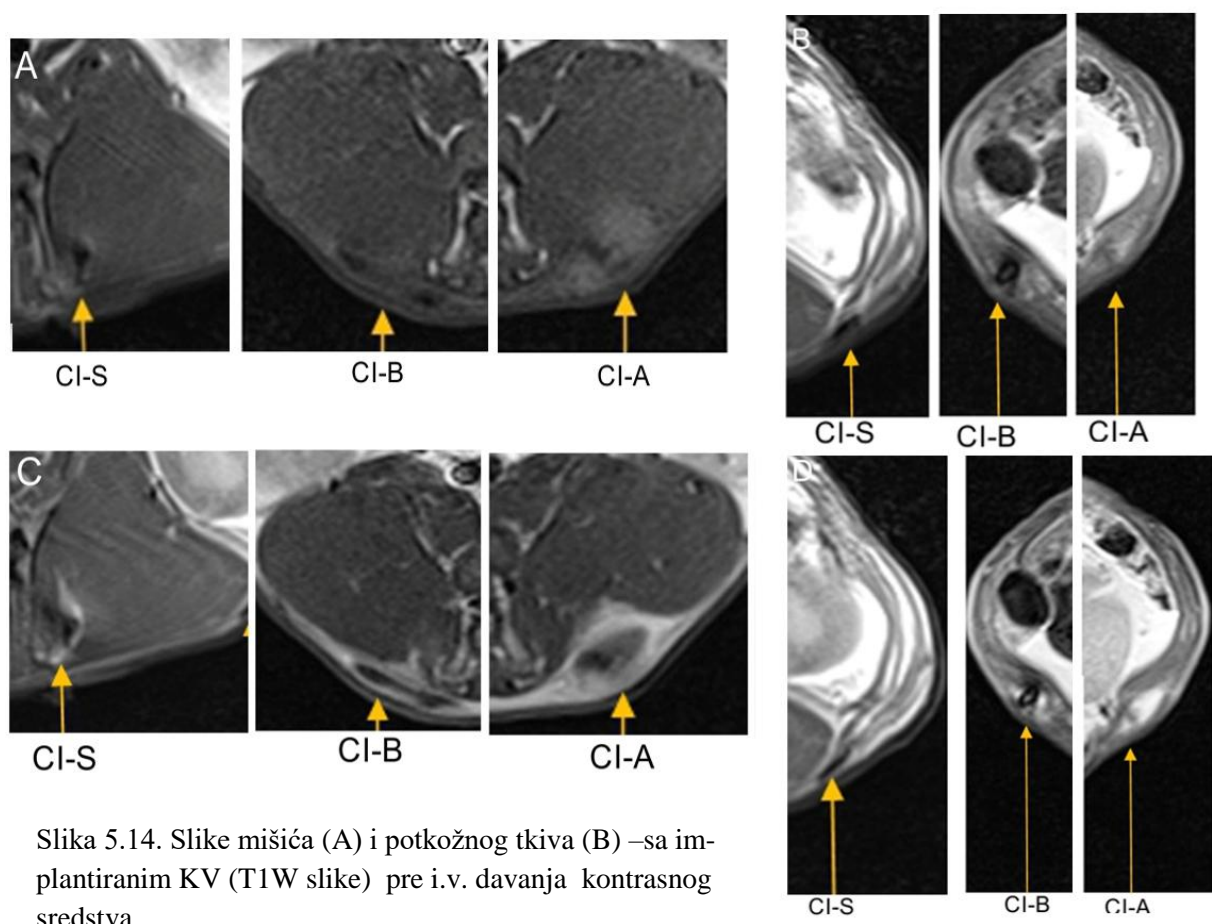
Slike 5.13. NMR slike bez kontrasta (levo) i sa kontrastom (desno), kod subkutane aplikacije kiselih i baznih KV, 21. postoperativnog dana

Kontrast poboljšava vidljivost reakcije tkiva 21. dana nakon implantacije.

levo- T1W slike pre i.v. davanja kontrastnog sredstva (približno isti slajs kao T2W slika na slici 5.8).  
desno –slika T1W posle aplikacije kontrasta.

Verovatno najbolja metoda za procenu inflamacije i demonstraciju razlika u reakciji tkiva između CI-B i CI-A implantata u ovom radu bila je metoda intravenske aplikacije kontrastnog sredstva (v. *auricularis*) koji smo upotrebili 21. dana nakon operacije. Kontrastno sredstvo bazirano je na gadolinijum-kompleksu, intravaskularnom ekstracelularnom sredstvu, napravljenom da ograniči područja pojačane propustljivosti krvnih sudova. Područja inflamacije

su generalno hipointenzivna u poređenju sa okolnim tkivom na T1W slici NMR, osim u slučajevima nastale hemoragije gde oksihemoglobin iz eritrocita može dati blago hiperintenzivnu sliku (slika 5.14A). Nakupljanje kontrasta u pojedinim tkivima je znak loše prokrvljenosti koja se detektuje na postkontrastnoj slici T1W kao zona signala jakog intenziteta, pošto gadolinijum značajno pojačava T1 relaksaciju zbog paramagnetičkog efekta. Posledično, široko polje pojačanog signala oko CI-A-i.m. implantata ukazuje na jaču inflamaciju oko implantata, dok nešto manje područje oko CI-B-i.m. implantata ukazuje na nešto slabiju reakciju lokalizovanu pretežno na površini implantata. Reakcija potkožnog tkiva oko implantata je u suštini ista, jače izražena reakcija oko CI-A implantata i nešto slabija reakcija oko CI-B implantata (slika 5.14 i 5.15).



Slika 5.14. Slike mišića (A) i potkožnog tkiva (B) –sa implantiranim KV (T1W slike) pre i.v. davanja kontrastnog sredstva.

Slika 5.15. Kontrast poboljšava vidljivost reakcije potkožnog (D) i mišićnog tkiva (C) nakon implantacije karbonskih vlakana.

C (mišić) i D (potkožno) – T1W slike nakon i.v. davanja kontrastnog sredstva.

## 5.4. PASTOHISTOLOŠKA I MORFOMETRIJSKA ISPITIVANJA

U poglavlju Materijal i metode opisan je postupak numeričkog ocenjivanja parametara koji se uzimaju u obzir prilikom izračunavanja indeksa iritacije tkiva (iritacioni indeks, IrI) ukoliko se karbonska vlakna implantiraju potkožno ili ukoliko se implantiraju intramuskularno.

U tabelama 5.5 i 5.6 date su zbirne vrednosti IrI za potkožno i mišićno tkivo prilikom implantacije sva tri tipa karbonskih vlakana – standardnih, kiselih i baznih, u svim posmatranim terminima eksperimenta – 7, 14, 21. i 28. dana nakon operacije.

Tabela 5.5. Tkivni iritacioni indeks (IrI) kod supkutane aplikacije karbonskih vlakana.

	Tkivni iritacioni indeks kod supkutane aplikacije KV			
	$\bar{x} \pm SD$			
	7. dan*	14. dan	21. dan	28. dan
<b>Standardna KV*</b>	4,00±0,89	5,17±1,94	7,67±1,37	6,00±1,67
Kontrola	0,83±0,98	0,50±0,55	0,83±0,41	0,33±0,52
<b>Kisela KV</b>	5,17±2,04	3,83±0,98	9,67±2,25	6,00±1,26
Kontrola	1,17±1,47	0,50±0,84	0,33±0,52	0,50±0,55
<b>Bazna KV</b>	3,50±1,52	3,33±0,52	5,67±1,03	6,33±1,97
Kontrola	0,67±1,03	0,50±0,55	0,83±0,98	0,33±0,52

\*U svakoj grupi, u svakom od ispitivanih termina, bilo je po 6 tkivnih uzoraka; međusobno su poređeni uzorci iz implantirane zone i kontrolni uzorci zdravog tkiva.

Tabela 5.6. Tkivni iritacioni indeks kod intramuskularne aplikacije karbonskih vlakana.

	Tkivni IrI kod intramuskularne aplikacije KV			
	$\bar{x} \pm SD$			
	7. dan	14. dan	21. dan	28. dan
<b>Standardna KV</b>	5,17±0,75	6,17±0,75	5,17±1,72	4,33±0,82
Kontrola	0,17±0,41	0	0,17±0,41	0,33±0,52
<b>Kisela KV</b>	11,50±2,35	4,33±1,03	8,00±2,37	7,33±2,16
Kontrola	0	0	0	0
<b>Bazna KV</b>	6,17±0,98	5,67±1,86	5,83±1,17	6,50±2,07
Kontrola	0	0	0	0

\*U svakoj grupi, u svakom od ispitivanih termina, bilo je po 6 tkivnih uzoraka; međusobno su poređeni uzorci iz implantirane zone i kontrolni uzorci zdravog tkiva.

Primer protokola za praćenje IrI potkožnog tkiva i IrI mišićnog tkiva prilikom implantacije odgovarajućeg karbonskog vlakna prikazan je u tabelama 5.7 i 5.8.

Tabela 5.7. Rezultati odgovora tkiva subkutisa na implantaciju standardnih karbonskih vlakana.

Reakcija / n.o.*	Standardna karbonska vlakna implantirana u subkutis												Koment.
	7. postimplantacioni dan						14. postimplantacioni dan						
	I7/15	II7/15	III7/15	1.7z	5D7	6D7	IV7/15	V7/15	VI7/15	2.7z	7D7	8D7	
EPITEL													
Normalni, intaktni.....0	0	0	0	0			0	0	0	0	0	0	
Ćelijska degeneracija.....1													
Metaplazija .....2													
Fokalna erozija.....3													
Generalizovana erozija.....4													
LEUKOCITNA INFILTR. (na velikom uveličanju)													
Odsutna.....0													
Minimalna (do 25).....1	1			1	1				1		1		
Blaga (26-50) .....2		2				2	2			2		2	
Umerena (51-100).....3			3										
Izrazita (>100) .....4								4					
VASKULARNA KONGEST.													
Odsutna.....0													
Minimalna.....1	1		1	1		1	1			1		1	
Blaga .....2		2			2				2		2		
Umerena.....3													
Izrazita, s pucanjem krv. s.....4								4					
EDEM													
Odsutan.....0													
Minimalan.....1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			1	
Blag.....2										2	2		
Umeren.....3													
Izrazit.....4													
KAPSULA													
Odsutna.....0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Minimalna.....1													
Tanka.....2													
Umereno debela.....3													
Debela.....4													

TKIVNI IRITACIONI INDEKS	3	5	5	3	4	4	4	9	4	4	5	4	
<b>Fragmentacija vlakana</b>													
Odsutna.....0								0					
Minimalna.....1	1		1	1	1	1	1		1	1	1	1	
Umerena.....2		2											
Izrazita.....3													
<b>Fagocitoza vlakana od strane makrofaga</b>													
Odsutna.....0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Prisutna.....1													

Reakcija / n.o.*	Standardna karbonska vlakna implantirana u subkutis												Koment.
	21. postimplantacioni dan						28. postimplantacioni dan						
	VII7/ 15	VIII7/ 15	IX7/ 15	3.7z 13	9D7 13	10D7 13	X7/ 15	XI7/ 15	XII7 /15	4.7z* 13	11D7 13	12D7 13	
<b>EPITEL</b>													
Normalni, intaktni.....0	0		0	0			0	0	0	0			
Ćelijska degeneracija.....1													
Metaplazija.....2													
Fokalna erozija .....3													
Generalizovana erozija.....4													
<b>LEUKOCITNA INFILTR.</b> (na velikom uveličanju)													
Odsutna .....0			1	1			1	1	1			1	
Minimalna (do 25).....1					2	2				2	2		
Blaga (26-50) .....2													
Umerena (51-100).....3	3												
Izrazita (>100) .....4													
<b>VASKULARNA KONGEST.</b>													
Odsutna.....0													
Minimalna.....1							1	1	1			1	
Blaga .....2				2	2								
Umerena.....3	3		3			3				3	3		
Izrazita, s pucanjem krv. s. ...4													

EDEM													
Odsutan.....0													
Minimalan.....1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Blag.....2													
Umeren.....3													
Izrazit.....4													
KAPSULA													
Odsutna.....0													
Minimalna.....1									1				
Tanka.....2		2		2	2	2		2		2	2	2	
Umereno debela.....3	3		3				3						
Debela.....4													
TKIVNI IRITACIONI INDEKS	10	7	8	6	7	8	6	5	4	8	8	5	
<b>Fragmentacija vlakana</b>													
Odsutna .....0	0	0		0			0						
Minimalna.....1					1	1		1		1	1		
Umerena.....2			2						2			2	
Izrazita.....3													
<b>Fagocitoza vlakana od strane makrofaga</b>													
Odsutna.....0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
Prisutna.....1													

n.o. numeričko ocenjivanje

Tabela 5.8. Rezultati odgovora mišićnog tkiva na implantaciju standardnih karbonskih vlakana.

Reakcija / n.o.*	Standardna karbonska vlakna implantirana u mišić												Koment.
	7. postimplantacioni dan						14. postimplantacioni dan						
	I5/15	II5/15	III5/15	1.5z	5D7	6D5	IV5/15	V5/15	VI5/15	2.5z	7D5	8D5	
<b>MIŠIĆ</b>													
Normalni, intaktni 0													
Degeneracija, fokalna 1			1	1		1		1	1				
opsežna 2		2			2		2				2	2	
Nekroza, fokalna 3	3									3			
opsežna 4													
<b>LEUKOCITNA INFILTR.</b> (na velikom uveličanju)													
Odsutna 0													
Minimalno (do 25).....1	1	1	1		1	2		1	1				
Blago (26-50).....2				2		2		2			2		
Umereno (51-100).....3							3					3	
Izrazito (>100).....4													
<b>VASKULARNA KONGEST.</b>													
Odsutna 0													
Minimalna.....1	1	1	1		1	1	1		1	1	1	2	
Blaga .....2				2				2					
Umerena.....3													
Izrazita, s pucanjem krvnih s.													
<b>EDEM</b>													
Odsutan.....0												0	
Minimalan.....1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1		
Blag.....2									2				
Umeren.....3													
Izrazit.....4													
<b>KAPSULA</b>													
Odsutna.....0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Minimalna.....1													
Tanka.....2													



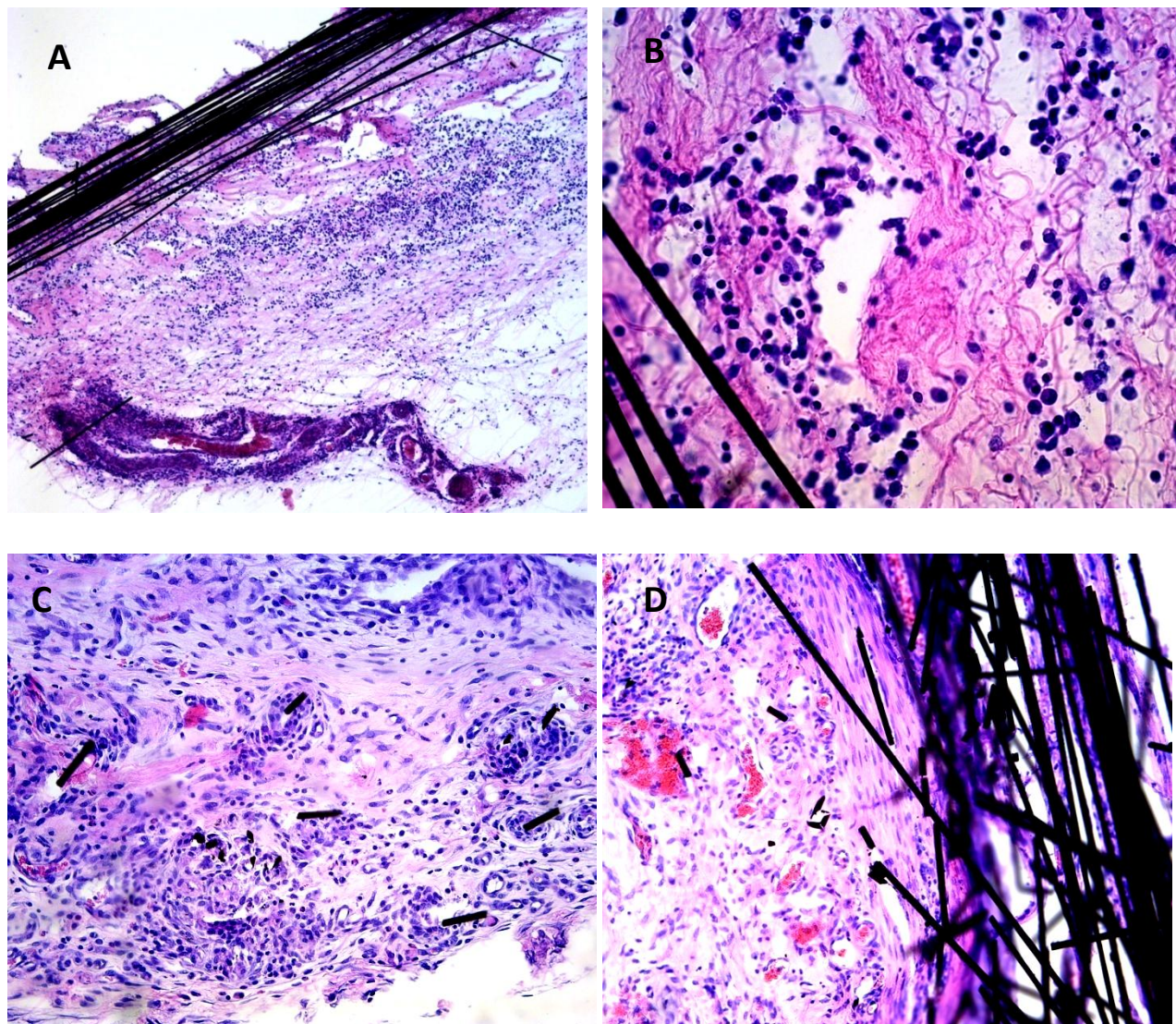
Umereno bebela.....3													
Debela.....4													
<b>TKIVNI IRITACIONI INDEKS</b>	6	5	4	6	5	5	7	6	5	6	6	7	
<b>Fragmentacija vlakana</b>													
Odsutna .0													
Minimalna.....1			1				1		1			1	
Umerena.....2	2	2		2	2	2		2			2		
Izrazita.....3										3			
<b>Fagocitoza vlakana od strane makrofaga</b>													
Odsutna 0		0	0	0	0			0	0	0		0	
Prisutna 1	1					1	1				1		

Reakcija / n.o.*	Standardna karbonska vlakna implantirana u mišić												Koment.
	21. postimplantacioni dan						28. postimplantacioni dan						
	VII5/ 15	VIII5/ 15	IX5/ 15	2.5z 13	9D5 13	10D5 13	X5/ 15	XI5/ 15	XII5 /15	3.5z* 13	11D5 13	12D5 13	
<b>MIŠIĆ</b>													
Normalni, intaktni 0								0					
Degeneracija, fokalna 1	1		1	1	1	1	1		1	1	1	1	
opsežna 2		2											
Nekroza, fokalna 3													
opsežna 4													
<b>LEUKOCITNA INFILTR.</b> (na velikom uvećanju)													
Odsutna 0													
Minimalna (do 25).....1	1		1	1		1	1	1		1		1	
Blaga (26-50) 2		2			2				2		2		
Umerena (51-100).....3													
Izrazita (>100) 4													
<b>VASKULARNA KONGEST.</b>													
Odsutna 0			0				0						
Minimalna.....1	1	1			1	1			1		1	1	
Blaga .....2								2		2			

Umerena.....3				4									
Izrazita, s pucanjem kr. s. 4													
<b>EDEM</b>										0			
Odsutan.....0													
Minimalan.....1	1	1	1		1	1	1	1	1		1	1	
Blag.....2				2									
Umeren.....3													
Izrazit.....4													
<b>KAPSULA</b>													
Odsutna.....0		0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	
Minimalna.....1	1							1					
Tanka.....2													
Umereno debela.....3													
Debela.....4													
<b>TKIVNI IRITACIONI INDEKS</b>	5	6	3	8	5	4	3	5	5	4	5	4	
<b>Fragmentracija vlakana</b>													
Odsutna 0										1			
Minimalna.....1													
Umerena.....2	2	2	2	2		2	2	2			2	2	
Izrazita.....3					3				3				
<b>Fagocitoza vlakana od strane makrofaga</b>													
Odsutna 0				0							0		
Prisutna 1	1	1	1		1	1	1	1	1	1		1	

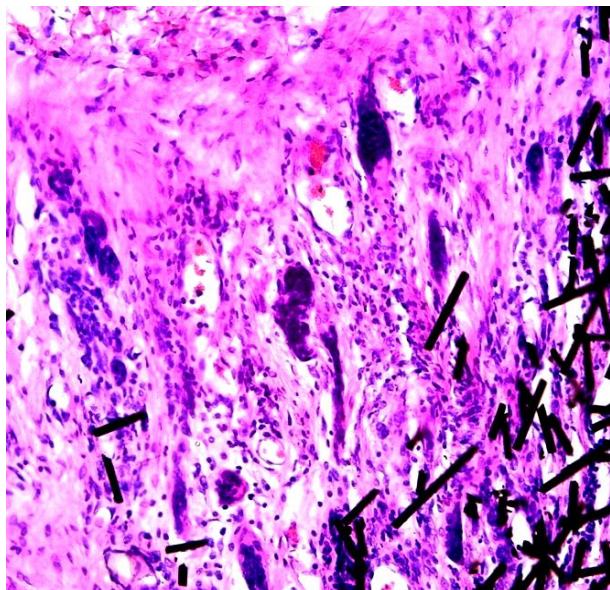
\*numeričko ocenjivanje

U numeričkom određivanju iritacionog indeksa potkožnog tkiva ili mišićnog tkiva, prilikom subkutane ili intramuskularne implantacije karbonskih vlakana, uvažavali su se brojni kriterijumi, detaljno opisani u poglavlju „Materijal i metode“, i dokumentovani na histološkim preparatima prikazanim niže (slike 5.16 do 5.25).



Slika 5.16. Histološka slika tkiva kod subkutane aplikacije karbonskih vlakana.

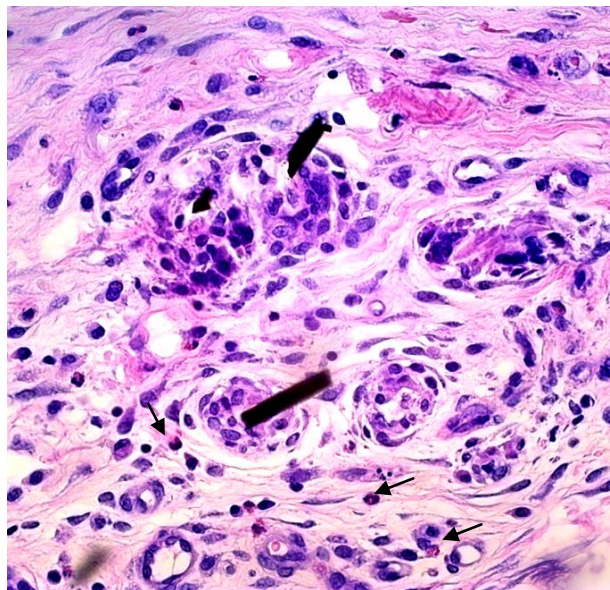
U numeričkoj oceni iritacionog indeksa potkožnog tkiva prilikom aplikacije karbonskih vlakana, procenjivani su jačina inflamacije (A i B), stepen edema (B), jačina vaskularne kongestije i debljina stvorene fibrozne kapsule oko implantiranix vlakana (C). Posebno je procenjivan i stepen fragmentacije vlakana (C i D), kao i prisustvo fagocitoze fragmentisanih vlakana od strane makrofaga na mestu implantacije (C). Bojenje hematoxilin-eozinom (H&E).



Slika 5.17.

Prisustvo džinovskih ćelija tipa oko stranog tela kod implantiranih karbonskih vlakana u potkožno tkivo.

H&E, x40.

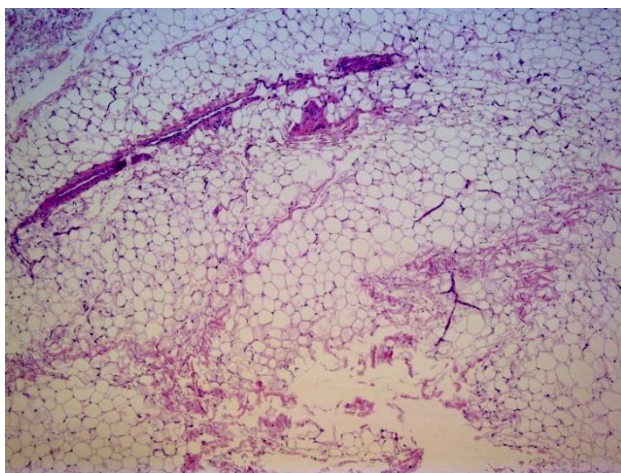


Slika 5.18.

Prisustvo eozinofila kod subkutane aplikacije karbonskih vlakana.

Eozinofili su označeni strelicama.

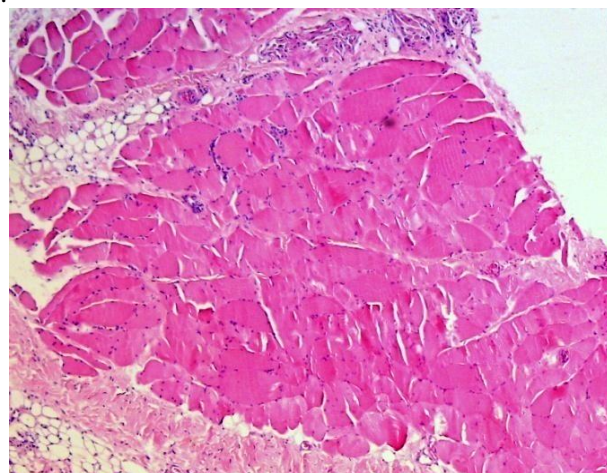
H&E, x63



Slika 5.19.

Histološki izgled kontrolnog zdravog potkožnog tkiva kod životinje sa implantacijom karbonskih vlakana.

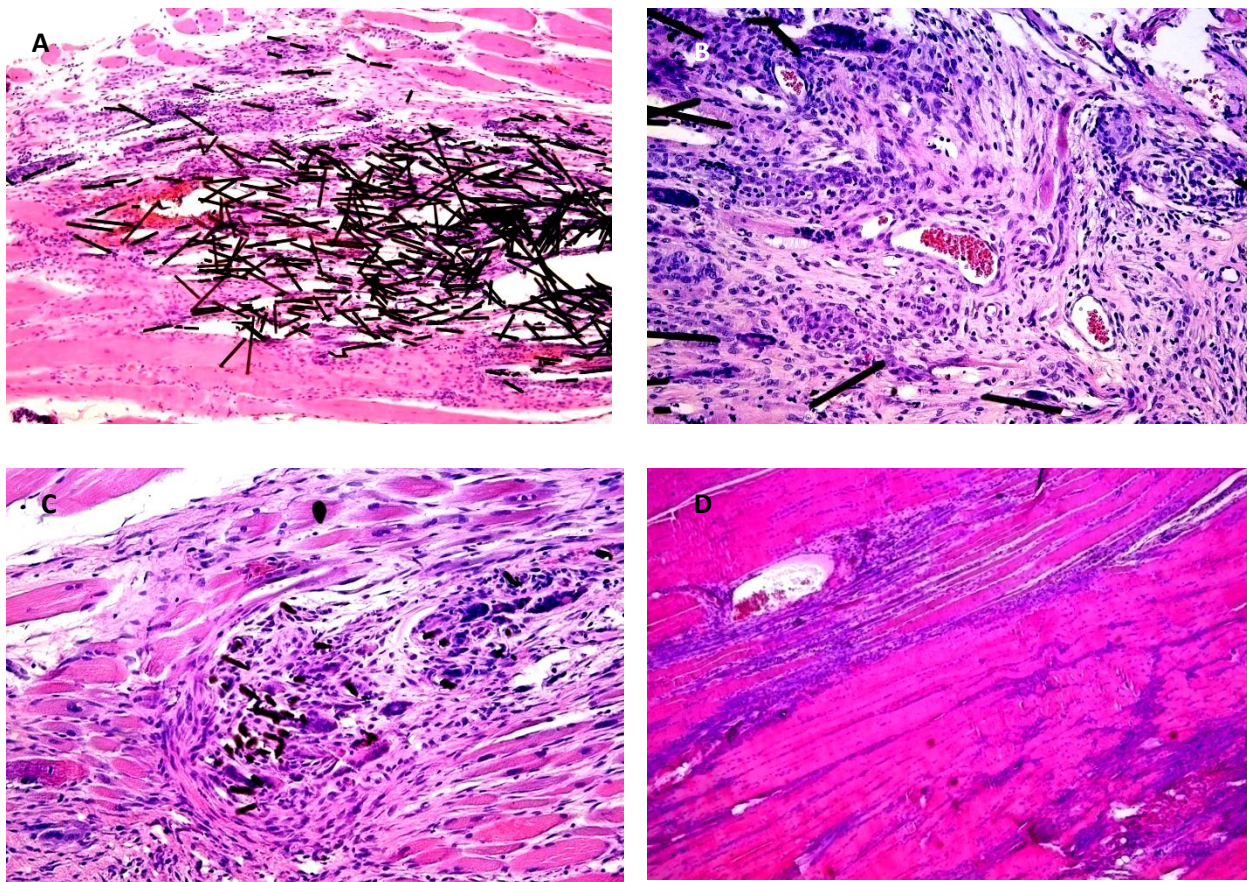
H&E, 10



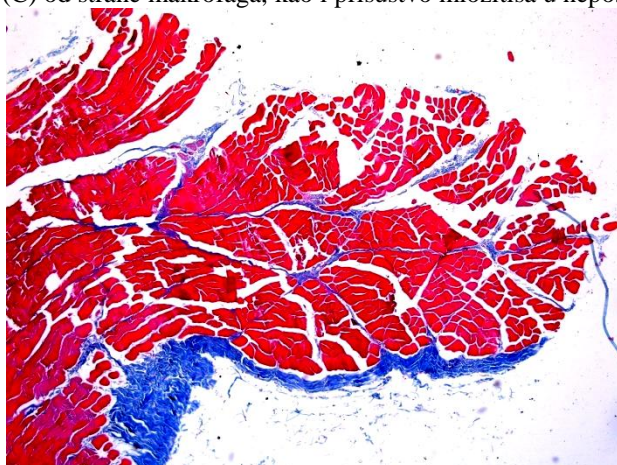
Slika 5.20.

Histološki izgled kontrolnog zdravog mišića (*m. latissimus dorsi*) kod životinje sa implantacijom karbonskih vlakana.

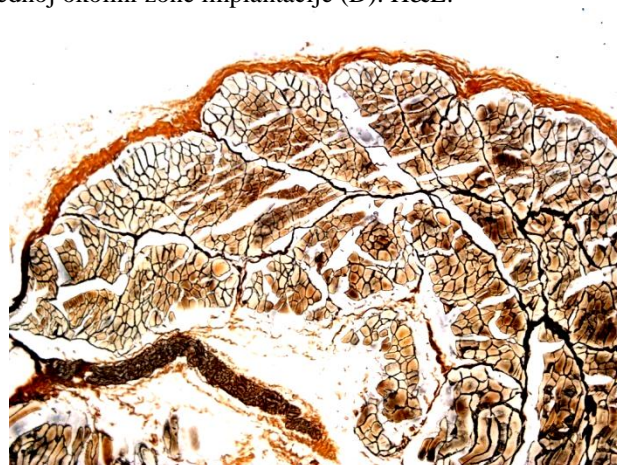
H&E, 10



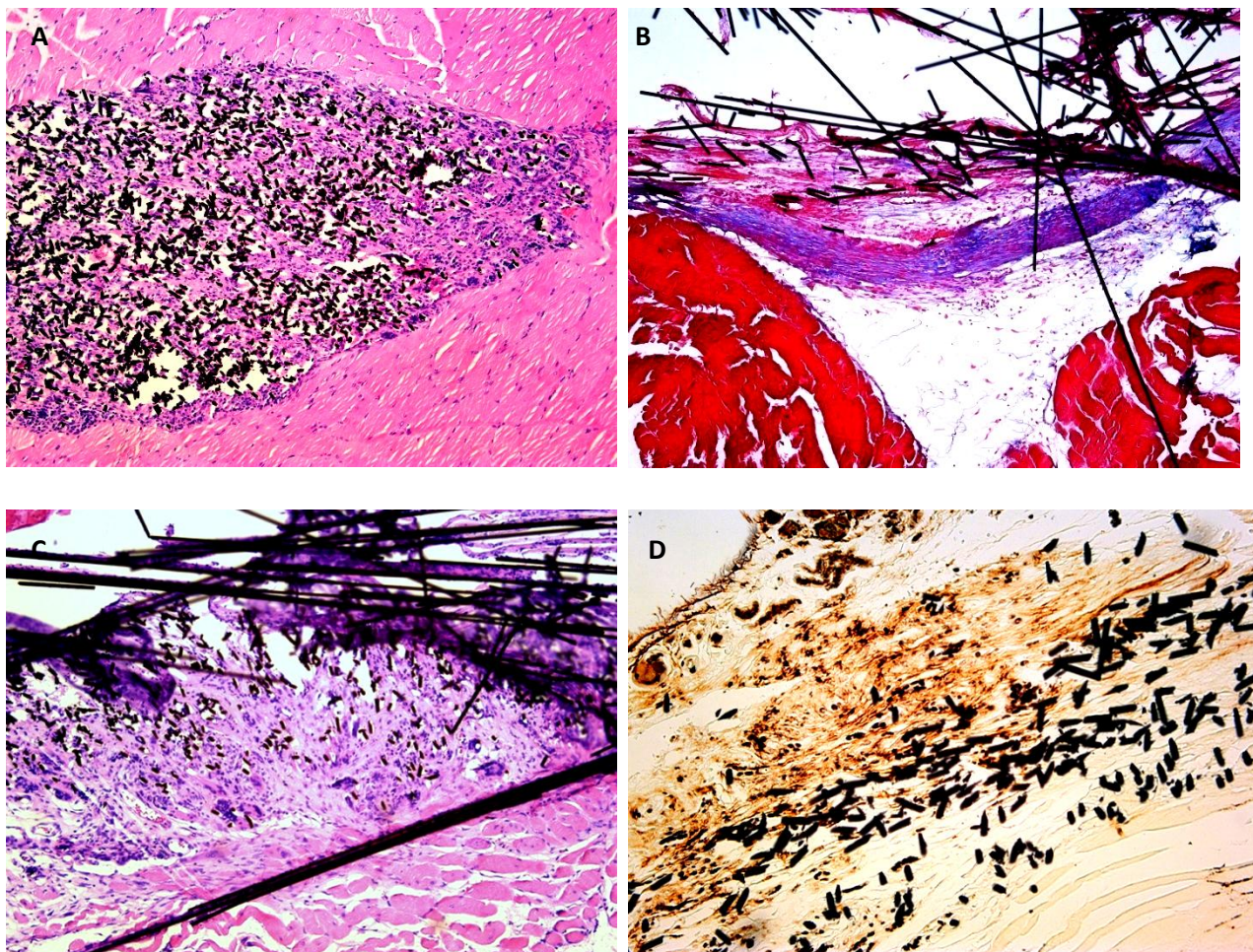
Slika 5.21. Histološki izgled mišićnog tkiva kod intramuskularne implantacije kiselih KV. Kod numeričkog određivanja iritacionog indeksa mišićnog tkiva, procenjivani su stepen degeneracije i nekroze mišićnih ćelija (A-C), stepen vaskularne kongestije (B) i inflamacije (C), kao i drugi parametri. Osim toga, registrovan je i ćelijski sastav inflamatornog infiltrata (B i C), stepen fragmentacije vlakana (A) i njihova fagocitoza (C) od strane makrofaga, kao i prisustvo miozitisa u neposrednoj okolini zone implantacije (D). H&E.



Slika 5.22. Kontrolni uzorak zdravog tkiva *m. latissimus dorsi*. AZAN trihromsko bojenje.

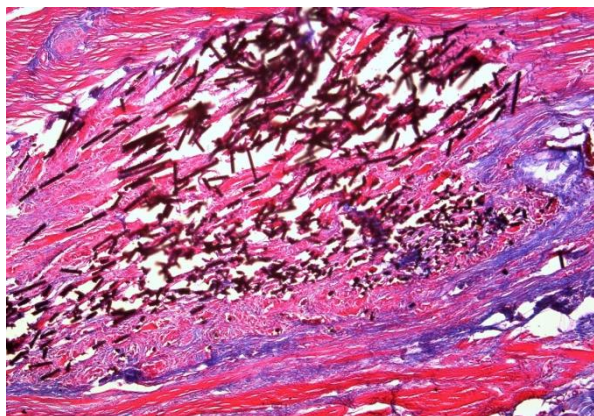


Slika 5.23. Kontrolni uzorak zdravog tkiva *m. latissimus dorsi*. Bojenje po Gordon-Sweetu za retikularna vlakna.



Slika 5.24. Histološki izgled mišića sa intramuskularno implantiranim standardnim KV.

Prilikom numeričke ocene iritacionog indeksa posebna pažnja je posvećena određivanju prisustva i debljine vezivnotkivne kapsule oko implantiranih vlakana (A i B). Dodatno su procenjivani i fragmentacija vlakana i njihova fagocitoza od strane makrofagnog sistema (C i D). H&E bojenje, A i C; AZAN trihromsko bojenje B; bojenje po Gordon-Sweetu za retikularna vlakna, D.



Slika 5.25. Histološki izgled mišićnog tkiva kod implantacije baznih karbonskih vlakana.

Sa preparata obojenih AZAN trihromskim bojenjem mogao se proceniti stepen fibroplazije (tj. brojnost fibroblasta u zoni implantacije) i količina sintetisanih kolagenih vlakana. AZAN trihromsko bojenje.

#### 5.4.1. Iritacioni indeks kod implantacije karbonskih vlakana u potkožno tkivo

Vrednosti iritacionog indeksa kod implantacije **standardnih karbonskih vlakana u potkožno tkivo** eksperimentalnih životinja tokom trajanja eksperimenta prikazani su u tabeli 5.9. U analizi iritacionog indeksa tkiva primenjena je u okviru generalnog linearnog modela, analiza varijanse za ponovljena merenja (7,14, 21. i 28. dan). Faktor „merenje“ imao je 4 gradacije: 1 – 7. dan, 2 – 14. dan, 3 – 21. dan i 4 – 28. dan. Faktor „grupa“ imao je dve gradacije E – eksperimentalni uzorci sa implantatom i K – kontrolni uzorci zdravog tkiva bez implantata.

Tabela 5.9. Prosečne vrednosti iritacionih indeksa kod implantacije standardnih vlakana u potkožno tkivo tokom trajanja eksperimenta, u eksperimentalnim i kontrolnim tkivnim uzorcima

	Grupa	$\bar{x}$	SD	N
Standardna KV 7. dan	E*	4,00	0,89	6
	K*	0,83	0,98	6
	Ukupno	2,42	1,88	12
Standardna KV 14. dan	E	5,17	1,94	6
	K	0,50	0,55	6
	Ukupno	2,83	2,79	12
Standardna KV 21. dan	E	7,67	1,37	6
	K	0,83	0,41	6
	Ukupno	4,25	3,70	12
Standardna KV 28. dan	E	6,00	1,67	6
	K	0,33	0,52	6
	Ukupno	3,17	3,19	12

\*E grupa-eksperimentalni uzorci sa implantatom; K grupa-kontrolni uzorci zdravog tkiva bez implantata

Analizom varijanse za ponovljena merenja dobijena je visoko statistički značajna razlika u vrednostima iritacionog indeksa supkutisa kod implantacije standardnih karbonskih vlakana po faktoru „merenje“ ( $F_{\text{merenje}} = 4,658$ ;  $p = 0,009$ ), po faktoru „grupa“ ( $F_{\text{grupa}} = 437,765$ ;  $p < 0,001$ ) i u interakciji oba faktora ( $F_{\text{merenje+grupa}} = 4,571$ ;  $p = 0,009$ ). Prosečne vrednosti iritacionog indeksa bile su veće u eksperimentalnim uzorcima sa implantiranim standardnim vlaknima, nego u kontrolnim zdravim uzorcima supkutisa, tokom sva četiri merenja. Prosečna vrednost IRI tkiva sa implantatom bila je statistički značajno veća ( $p < 0,001$ ) u trećem (21. dana) nego u prvom merenju (7. dana). Između ostalih merenja nije dobijena statistički značajna razlika. Vrednost IRI zdravog tkiva bez implantata nije se statistički značajno menjala tokom eksperimentalnog perioda prilikom svakog merenja (tabele 5.9, 5.10 i 5.11. i grafikon 5.2).

Tabela 5.10. Međugrupna poređenja Sidakovim testom iritacionog indeksa kod implantacije standardnih vlakana u potkožno tkivo, u četiri merenja tokom eksperimentalnog perioda.

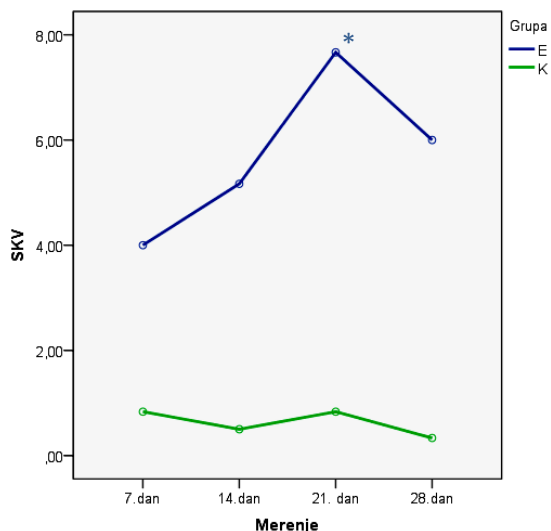
Merenje	(I) Grupa	(J) Grupa	Prosečna razlika (I-J)	p
1	E	K	<b>3,167</b>	<b>&lt; 0,001</b>
2	E	K	<b>4,667</b>	<b>&lt; 0,001</b>
3	E	K	<b>6,833</b>	<b>&lt; 0,001</b>
4	E	K	<b>5,667</b>	<b>&lt; 0,001</b>

\*E grupa-eksperimentalni uzorci sa implantatom; K grupa-kontrolni uzorci zdravog tkiva bez implantata

Tabela 5.11. Međugrupna poređenja iritacionog indeksa kod implantacije standardnih vlakana u potkožno tkivo Sidakovim testom unutar grupa, u četiri merenja tokom eksperimentalnog perioda.

Grupa	(I) Merenje	(J) Merenje	Prosečna razlika (I-J)	p
E	1	2	-1,167	0,409
		<b>3</b>	<b>-3,667</b>	<b>0,000</b>
		4	-2,000	0,132
	2	3	-2,500	0,083
		4	-0,833	0,899
	3	4	1,667	0,281
K	1	2	0,333	0,996
		3	0,000	1,000
		4	0,500	0,988
	2	3	-0,333	0,999
		4	0,167	1,000
	3	4	0,500	0,989

\*E grupa-eksperimentalni uzorci sa implantatom; K grupa-kontrolni uzorci zdravog tkiva bez implantata



Grafikon 5.2.

Prosečna vrednost IrI potkožnog tkiva kod implantacije standardnih vlakana tokom trajanja eksperimenta, u zoni implantacije i kontrolnoj zoni zdravog tkiva bez implantata (K-zona).

\*E grupa – eeksperimentalni uzorci sa implanta-  
tom; K grupa – kontrolni uzorci zdravog tkiva bez  
implantata.



Vrednosti iritacionog indeksa kod implantacije **kiselih karbonskih vlakana u potkožno tkivo** eksperimentalnih životinja tokom trajanja eksperimenta prikazane su u tabeli 5.12. U statističkoj analizi IrI tkiva primenjena je, u okviru generalnog linearnog modela, analiza varijanse za ponovljena merenja (7,14, 21. i 28. dan). Faktor „merenje“ imao je 4 gradacije: 1 – 7. dan, 2 – 14. dan, 3 – 21. dan i 4 – 28. dan. Faktor „grupa“ imao je dve gradacije E – eksperimentalni uzorci sa implantatom i K – kontrolni uzorci zdravog tkiva bez implantata.

Tabela 5.12. Prosečne vrednosti iritacionih indeksa potkožnog tkiva kod implantacije karbonskih vlakana tretiranih kiselinom tokom trajanja eksperimenta, u eksperimentalnim i kontrolnim tkivnim uzorcima.

	Grupa	$\bar{x}$	SD	N
Kisela KV 7. dan	E	5,17	2,04	6
	K	1,17	1,47	6
	Ukupno	3,17	2,69	12
Kisela KV 14. dan	E	3,83	0,98	6
	K	,50	0,84	6
	Ukupno	2,17	1,95	12
Kisela KV 21. dan	E	9,67	2,25	6
	K	,33	0,52	6
	Ukupno	5,00	5,12	12
Kisela KV 28. dan	E	6,00	1,26	6
	K	,50	0,55	6
	Ukupno	3,25	3,02	12

\*E-eksperimentalni uzorci tkiva sa implantatom; K-kontrolni uzorci zdravog tkiva bez implantata.

Tabela 5.13. Međugrupna poređenja Sidakovim testom iritacionog indeksa potkožnog tkiva kod implantacije karbonskih vlakana tretiranih kiselinom unutar grupa, u četiri merenja tokom eksperimentalnog perioda.

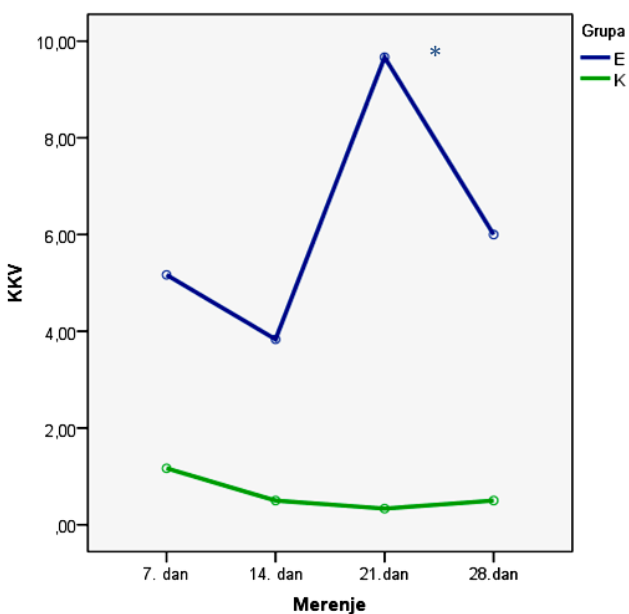
Merenje	(I) Grupa	(J) Grupa	Prosečna razlika (I-J)	p
1	E	K	<b>4,000</b>	<b>0,003</b>
2	E	K	<b>3,333</b>	<b>0,000</b>
3	E	K	<b>9,333</b>	<b>0,000</b>
4	E	K	<b>5,500</b>	<b>0,000</b>

\*E-eksperimentalni uzorci tkiva sa implantatom; K-kontrolni uzorci zdravog tkiva bez implantata.

Tabela 5.14. Međugrupna poređenja Sidakovim testom iritacionog indeksa potkožnog tkiva kod implantacije karbonskih vlakana tretiranih kiselinom unutar grupa, u četiri merenja tokom eksperimenta.

Grupa	(I) Merenje	(J) Merenje	Prosečna razlika (I-J)	P
E	1	2	1,333	0,609
		<b>3</b>	<b>-4,500</b>	<b>&lt;0,001</b>
		4	-0,833	0,699
	2	<b>3</b>	<b>-5,833</b>	<b>&lt;0,001</b>
		<b>4</b>	<b>-2,167</b>	<b>0,042</b>
	3	<b>4</b>	<b>3,667</b>	<b>0,001</b>
K	1	2	0,667	0,972
		3	0,833	0,702
		4	0,667	0,857
	2	3	0,167	1,000
		4	0,000	1,000
	3	4	-0,167	1,000

\*E-eksperimentalni uzorci tkiva sa implantatom; K-kontrolni uzorci zdravog tkiva bez implantata



Grafikon 5.3.

Prosečna vrednost iritacionog indeksa potkožnog tkiva kod implantacije karbonskih vlakana tretiranih kiselinom tokom trajanja eksperimenta.

\*E grupa-eksperimentalni uzorci tkiva sa implantatom; K grupa-kontrolni uzorci zdravog tkiva bez implantata.

Analizom varijanse za ponovljena merenja dobijena je visoko statistički značajna razlika u vrednostima Irl kod primene KV tretiranih kiselinom po faktoru „merenje“ ( $F_{\text{merenje}} = 12,807$ ;  $p < 0,001$ ), po faktoru „grupa“ ( $F_{\text{grupa}} = 90,043$ ;  $p < 0,001$ ) i u interakciji oba faktora ( $F_{\text{merenje+grupa}} = 16,658$ ;  $p < 0,001$ ). Prosečne vrednosti Irl bile su veće u eksperimentalnim uzorcima potkožnog tkiva sa implantiranim kiselim vlaknima nego u kontrolnim uzorcima zdravog tkiva bez vlakana, tokom sva četiri merenja (tabele 5.12 i 5.13 i grafikon 5.3).

Najveća vrednost iritacionog indeksa potkožnog tkiva kod implantacije kiselih karbonskih vlakana bila je 21. dana nakon implantacije i ona je statistički značajno veća nego 7, 14. i 28. postimplantacionog dana. U 28. danu nakon implantacije kiselih KV dolazi do pada vrednosti iritacionog indeksa, tako da nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na 7. dan (tabele 5.13 i 5.14 i grafikon 5.3). U kontrolnim uzorcima zdravog tkiva bez implantata nije bilo statistički značajne razlike između merenja tokom eksperimentalnog perioda.

Vrednosti iritacionog indeksa kod implantacije **baznih karbonskih vlakana** u potkožno tkivo eksperimentalnih životinja tokom trajanja eksperimenta prikazani su u tabeli 5.15. U statističkoj analizi iritacionog indeksa tkiva primenjena je, u okviru generalnog linearnog modela, analiza varijanse za ponovljena merenja (7,14, 21. i 28. dan). Faktor merenje imao je 4 gradacije: 1 – 7. dan, 2 – 14. dan, 3 – 21. dan i 4 – 28. dan. Faktor „grupa“ imao je dve gradacije- E – eksperimentalni uzorci tkiva sa implantatom i K – kontrolni uzorci zdravog tkiva bez implantata.

Tabela 5.15. Prosečne vrednosti iritacionih indeksa potkožnog tkiva sa implantiranim karbonskim vlaknima tretiranim bazom tokom trajanja eksperimenta, u eksperimentalnim i kontrolnim tkivnim uzorcima.

	Grupa	$\bar{x}$	SD	N
Bazna KV 7, dan	E	3,50	1,52	6
	K	0,67	1,03	6
	Ukupno	2,08	1,93	12
Bazna KV 14, dan	E	3,33	0,52	6
	K	0,50	0,55	6
	Ukupno	1,92	1,56	12
Bazna KV 21, dan	E	5,67	1,03	6
	K	0,83	0,98	6
	Ukupno	3,25	2,70	12
Bazna KV 28, dan	E	6,33	1,97	6
	K	0,33	0,52	6
	Ukupno	3,33	3,42	12

\*E-eksperimentalni uzorci tkiva sa implantatom; K-kontrolni uzorci zdravog tkiva bez implantata.

Analizom varijanse za ponovljena merenja dobijena je visoko statistički značajna razlika u vrednostima iritacionog indeksa potkožnog tkiva kod implantacije karbonskih vlakana tretiranih bazom po faktoru „merenje“ ( $F_{\text{merenje}} = 4,709$ ;  $p = 0,008$ ), po faktoru „grupa“ ( $F_{\text{grupa}} = 270,476$ ; ( $p < 0,001$ ) i u interakciji oba faktora ( $F_{\text{merenje+grupa}} = 5,136$ ;  $p = 0,006$ ). Prosečne vrednosti IRI potkožnog tkiva sa implantiranim baznim karbonskim vlaknima bile su veće u poređenju sa vrednostima za kontrolna zdrava tkiva bez implantata, u sva četiri merenja (tabele 5.15 i 5.16 i grafikon 5.4).

Tabela 5.16. Međugrupna poređenja Sidakovim testom iritacionog indeksa potkožnog tkiva sa implantiranim karbonskim vlaknima u odnosu na grupu zdravih netretiranih tkiva, u četiri merenja tokom eksperimentalnog perioda.

Merenje	(I) Grupa	(J) Grupa	Prosečna razlika (I-J)	p
1	E	K	<b>2,833</b>	<b>0,004</b>
2	E	K	<b>2,833</b>	<b>0,000</b>
3	E	K	<b>4,833</b>	<b>0,000</b>
4	E	K	<b>6,000</b>	<b>0,000</b>

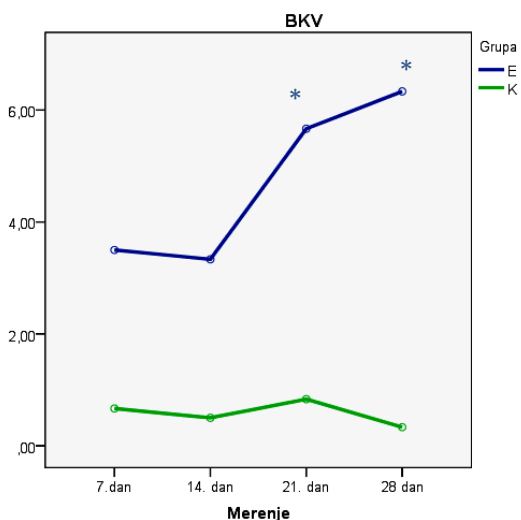
\*E-eksperimentalni uzorci tkiva s implantatom; K-kontrolni uzorci zdravog tkiva bez implantata.

Tabela 5-17. Međugrupna poređenja Sidakovim testom iritacionog indeksa potkožnog tkiva kod implantacije karbonskih vlakana tretiranih bazom, unutar uzoraka tkiva sa implantatima i zdravih kontrolnih uzoraka tkiva bez implantata, u četiri merenja tokom eksperimentalnog perioda.

Grupa	(I) Merenje	(J) Merenje	Prosečna razlika (I-J)	p
E	1	2	0,167	1,000
		3	-2,167	0,068
		4	-2,833	0,053
	2	<b>3</b>	<b>-2,333</b>	<b>0,011</b>
		<b>4</b>	<b>-3,000</b>	<b>0,009</b>
	3	4	-0,667	0,954
K	1	2	0,167	1,000
		3	-0,167	1,000
		4	0,333	0,999
	2	3	-0,333	0,993
		4	0,167	1,000
	3	4	0,500	0,989

\*E-eksperimentalni uzorci tkiva sa implantatom; K-kontrolni uzorci zdravog tkiva bez implantata.

Vrednosti iritacionog indeksa karbonskih vlakana tretiranih bazom, u eksperimentalnoj grupi, bile su statistički značajno veće u četvrtom (28. dana nakon implantacije) nego u drugom (14. dana nakon implantacije) i trećem merenju (21. dana nakon implantacije). Između ostalih merenja nije bilo statistički značajne razlike. U kontrolnoj grupi tkivnih uzoraka nije bilo statistički značajne razlike između merenja (tabele 5.15 i 5.17 i grafikon 5.4).



Grafikon 5.4.

Prosečna vrednosti iritacionog indeksa potkožnog tkiva kod implantacije karbonskih vlakana tretiranih bazom tokom trajanja eksperimenta, u eksperimentalnim uzorcima tkiva sa implantiranim vlaknima i kontrolnim zdravim uzorcima tkiva bez implantata.

\*E grupa-eksperimentalni uzorci tkiva sa implanta-  
tom; K grupa-kontrolni uzorci zdravog tkiva bez  
implantata.

#### 5.4.2. Iritacioni indeks kod implantacije karbonskih vlakana u mišićno tkivo

Rezultati vrednosti IrI mišićnog tkiva prilikom intramuskularne aplikacije **standardnih karbonskih vlakana** prikazani su u tabelama 5.18, 5.19 i 5.20 i grafikonu 5.5.

Analizom varijanse za ponovljena merenja nije dobijena statistički značajna razlika u vrednostima IrI mišićnog tkiva sa implantiranim standardnim vlaknima po faktoru „merenje“ ( $F_{\text{merenje}} = 1,716$ ;  $p = 0,185$ ). Po faktoru „grupa“ (uzorci tkiva sa implantatom: zdravim kontrolnim uzorcima tkiva bez implantata) dobijena je visoko statistički značajna razlika ( $F_{\text{grupa}} = 433,166$ ;  $p < 0,001$ ), kao i statistički značajna razlika u interakciji oba faktora ( $F_{\text{merenje+grupa}} = 3,568$ ;  $p = 0,026$ ). Prosečne vrednosti iritacionog indeksa bile su veće u eksperimentalnim uzorcima nego u kontrolnim zdravim uzorcima tkiva tokom sva četiri merenja (tabele 5.17 i 5.18. i grafikon 5.5).

U eksperimentalnoj grupi tkivnih uzoraka, vrednost iritacionog indeksa mišićnog tkiva bila je najveća u drugom merenju (14. dan nakon implantacije) i statistički značajno veća nego u prvom (7. dan nakon implantacije) i četvrtom merenju (28. dan nakon implantacije) (tabela 5. 18 i 5.20. i grafikon 5.5).

Tabela 5.18. Prosečne vrednosti iritacionog indeksa mišićnog tkiva nakon intramuskularne implantacije standardnih karbonskih vlakana, tokom trajanja eksperimenta.

	Grupa	$\bar{x}$	SD	N
Standardna KV 7. dan	E	5,17	0,75	6
	K	0,17	0,41	6
	Ukupno	2,67	2,67	12
Standardna KV 14. dan	E	6,17	0,75	6
	K	0,00	0,00	6
	Ukupno	3,08	3,26	12
Standardna KV 21. dan	E	5,17	1,72	6
	K	0,17	0,41	6
	Ukupno	2,67	2,87	12
Standardna KV 28. dan	E	4,33	0,82	6
	K	0,33	0,52	6
	Ukupno	2,33	2,19	12

\*E-eksperimentalni uzorci tkiva sa implantatom; K-kontrolni uzorci zdravog tkiva bez implantata.

Tabela 5.19. Međugrupna poređenja Sidakovim testom iritacionog indeksa mišićnog tkiva sa implantiranim standardnim karbonskim vlakanima u poređenju sa zdravim kontrolnim uzorcima tkiva bez implantata, u četiri merenja tokom eksperimentalnog perida

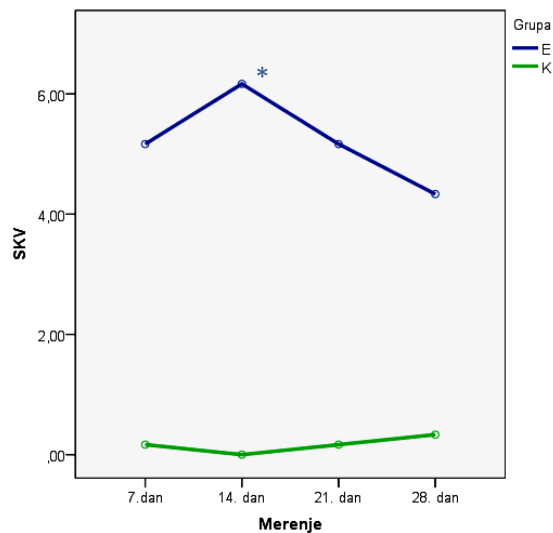
Merenje	(I) Grupa	(J) Grupa	Prosečna razlika (I-J)	P
1	E	K	<b>5,000</b>	<b>0,000</b>
2	E	K	<b>6,167</b>	<b>0,000</b>
3	E	K	<b>5,000</b>	<b>0,000</b>
4	E	K	<b>4,000</b>	<b>0,000</b>

\*E-eksperimentalni uzorci tkiva sa implantatom; K-kontrolni uzorci zdravog tkiva bez implantata.

Tabela 5.20. Međugrupna poređenja Sidakovim testom iritacionog indeksa mišićnog tkiva sa implantacijom standardnih karbonskih vlakana i grupe zdravih netretiranih tkiva, u četiri merenja tokom eksperimentalnog perioda

Grupa	(I) Merenje	(J) Merenje	Prosečna razlika (I-J)	P
E	1	2	<b>-1,000</b>	<b>0,006</b>
		3	0,000	1,000
		4	0,833	0,508
	2	3	1,000	0,426
		4	<b>1,833</b>	<b>0,013</b>
		3	0,833	0,764
K	1	2	0,167	0,975
		3	0,000	1,000
		4	-0,167	1,000
	2	3	-0,167	1,000
		4	-0,333	0,979
		3	-0,167	1,000

\*E-eksperimentalni uzorci tkiva sa implantatom; K-kontrolni uzorci zdravog tkiva bez implantata.



Grafikon 5.5.

Prosečna vrednost iritacionog indeksa kod implantacije standardnih karbonskih vlakana u mišićno tkivo tokom trajanja eksperimenta u eksperimentalnim i kontrolnim uzorcima tkiva.

\*E grupa-eksperimentalni uzorci tkiva sa implanta-  
tom; K grupa-kontrolni uzorci zdravog tkiva bez  
implantata.

Rezultati vrednosti iritacionog indeksa mišićnog tkiva prilikom intramuskularne aplikacije **kiselih karbonskih vlakana** prikazani su u tabelama 5.21, 5.22 i 5.23 i grafikonu 5.6.

Tabela 5.21. Prosečne vrednosti iritacionog indeksa mišićnog tkiva kod implantacije karbonskih vlakana tretiranih kiselinom tokom trajanja eksperimenta u uzorcima tkiva sa implantatom i kontrolnim uzorcima zdravog tkiva bez implantiranih vlakana.

	Grupa	$\bar{x}$	SD	N
Kisela KV 7. dan	E	11,50	2,35	6
	K	0,00	0,00	6
	Ukupno	5,75	6,21	12
Kisela KV 14. dan	E	4,33	1,03	6
	K	0,00	0,00	6
	Ukupno	2,17	2,37	12
Kisela KV 21. dan	E	8,00	2,37	6
	K	0,00	0,00	6
	Ukupno	4,00	4,47	12
Kisela KV 28. dan	E	7,33	2,16	6
	K	0,00	0,00	6
	Ukupno	3,67	4,10	12

\*E-eksperimentalni uzorci tkiva sa implantatom; K-kontrolni uzorci zdravog tkiva bez implantata.

Tabela 5.22. Međugrupna poređenja Sidakovim testom iritacionog indeksa mišićnog tkiva kod implantacije karbonskih vlakana tretiranih kiselinom, između uzoraka tkiva sa implantiranim vlaknima i zdravih kontrolnih uzoraka tkiva bez implantata, u četiri merenja tokom eksperimentalnog perioda.

Merenje	(I) Grupa	(J) Grupa	Prosečna razlika (I-J)	p
1	E	K	<b>11,500</b>	<b>0,000</b>
2	E	K	<b>4,333</b>	<b>0,000</b>
3	E	K	<b>8,000</b>	<b>0,000</b>
4	E	K	<b>7,333</b>	<b>0,000</b>

\*E-eksperimentalni uzorci tkiva sa implantatom; K-kontrolni uzorci zdravog tkiva bez implantata.

Analizom varijanse za ponovljena merenja dobijena je statistički značajna razlika u vrednostima iritacionog indeksa mišićnog tkiva kod implantacije karbonskih vlakana tretiranih kiselinom po faktoru „merenje“ ( $F_{\text{merenje}} = 10,604$ ;  $p < 0,001$ ) i po faktoru „grupa“ ( $F_{\text{grupa}} = 680,331$ ;  $p < 0,001$ ), kao i u interakciji oba faktora ( $F_{\text{merenje+grupa}} = 10,604$ ;  $p < 0,001$ ). Prosečne vrednosti iritacionog indeksa bile su veće u eksperimentalnoj grupi tkivnih uzoraka sa implantiranim karbonskim vlaknima nego u kontrolnoj zdravoj grupi uzoraka bez implantiranih vlakana, tokom sva četiri merenja (tabele 5.21 i 5.22 i grafikon 5.6).

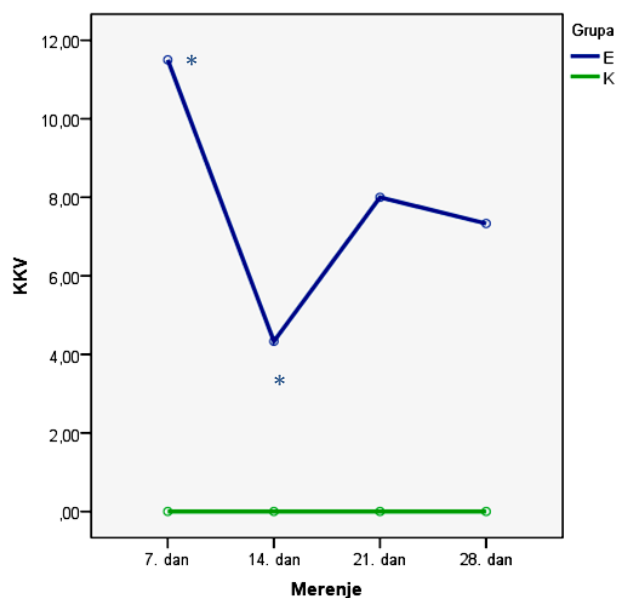


Najveće vrednosti iritacionog indeksa mišićnog tkiva kod implantacije karbonskih vlakana tretiranih kiselinom bile su u prvom merenju, nakon 7. dana od implantacije, i bile su statistički značajno veće nego u drugom (14. dana nakon implantacije) i četvrtom merenju (28. dana nakon implantacije). Vrednosti IrI u trećem i četvrtom merenju bile su statistički značajno veće nego u drugom merenju.

Tabela 5.23. Međugrupna poređenja Sidakovim testom iritacionog indeksa mišićnog tkiva kod implantacije karbonskih vlakana tretiranih kiselinom unutar uzoraka tkiva sa implantatom i kontrolnih zdravih uzoraka tkiva bez implantata, u četiri merenja tokom eksperimenta

Grupa	(I) Merenje	(J) Merenje	Prosečna razlika (I-J)	P
E	1	2	7,167	0,000
		3	3,500	0,107
		4	4,167	0,001
	2	3	-3,667	0,000
		4	-3,000	0,034
	3	4	0,667	0,986
K	1	2	0,000	1,000
		3	0,000	1,000
		4	0,000	1,000
	2	3	0,000	1,000
		4	0,000	1,000
	3	4	0,000	1,000

\*E-eksperimentalni uzorci tkiva sa implantatom; K-kontrolni uzorci zdravog tkiva bez implantata.



Grafikon 5.6.

Prosečne vrednosti iritacionog indeksa kod implantacije karbonskih vlakana tretiranih kiselinom u mišićno tkivo tokom trajanja eksperimenta u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi.

\*E-eksperimentalni uzorci tkiva sa implantatom; K-kontrolni uzorci zdravog tkiva bez implantata.

Rezultati vrednosti IrI mišićnog tkiva prilikom intramuskularne aplikacije **baznih karbonskih vlakana** prikazani su u tabelama 5.24, 5.25 i 5.26 i grafikonu 5.7. Analizom varijanse za ponovljena merenja nije dobijena statistički značajna razlika u vrednostima IrI mišićnog tkiva kod implantacije karbonskih vlakana tretiranih bazom po faktoru „merenje“ ( $F_{\text{merenje}} = 0,399$ ;  $p = 0,755$ ). Po faktoru „grupa“ dobijena je visoko statistički značajna razlika ( $F_{\text{grupa}} = 222,252$ ;  $p < 0,001$ ). U interakciji oba faktora nije dobijena statistički značajna razlika ( $F_{\text{merenje+grupa}} = 0,399$ ;  $p = 0,755$ ). Prosečne vrednosti IrI bile su veće u eksperimentalnoj grupi uzoraka sa implantiranim vlaknima u poređenju sa kontrolnim zdravim tkivima bez implantata, tokom sva četiri merenja.

Tabela 5.24. Prosečne vrednosti iritacionog indeksa mišićnog tkiva kod implantacije karbonskih vlakana tretiranih bazom tokom trajanja eksperimenta u eksperimentalnim uzorcima tkiva sa implantiranim vlaknima i kontrolnim zdravim uzorcima tkiva bez implantata.

	Grupa	$\bar{x}$	SD	N
Bazna KV 7. dan	E	6,17	0,98	6
	K	0,00	0,00	6
	Ukupno	3,08	3,29	12
Bazna KV 14. dan	E	5,67	1,86	6
	K	0,00	0,00	6
	Ukupno	2,83	3,21	12
Bazna KV 21. dan	E	5,83	1,17	6
	K	0,00	0,00	6
	Ukupno	2,92	3,15	12
Bazna KV 28. dan	E	6,50	2,07	6
	K	0,00	0,00	6
	Ukupno	3,25	3,67	12

\*E-eksperimentalni uzorci tkiva sa implantatom; K-kontrolni uzorci zdravog tkiva bez implantata.

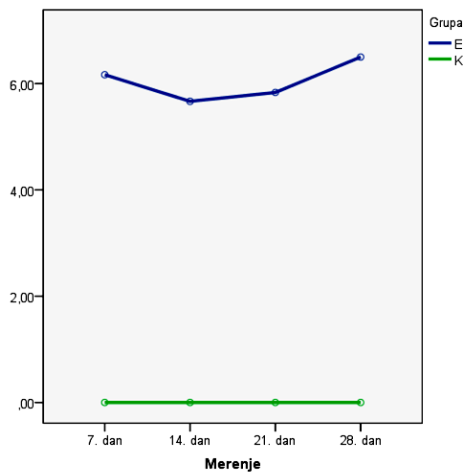
Tabela 5.25. Međugrupna poređenja Sidakovim testom iritacionog indeksa mišićnog tkiva sa implantiranim karbonskim vlaknima tretiranih bazom i kontrolnih zdravih uzoraka tkiva bez implantata, u četiri merenja tokom eksperimentalnog perioda.

Merenje	(I) Grupa	(J) Grupa	Prosečna razlika (I-J)	p
1	E	K	<b>6,167</b>	<b>0,000</b>
2	E	K	<b>5,667</b>	<b>0,000</b>
3	E	K	<b>5,833</b>	<b>0,000</b>
4	E	K	<b>6,500</b>	<b>0,000</b>

\*E-eksperimentalni uzorci tkiva sa implantatom; K-kontrolni uzorci zdravog tkiva bez implantata.

Tabela 5. 26. Međugrupna poređenja Sidakovim testom iritacionog indeksa mišićnog tkiva kod implantacije karbonskih vlakana tretiranih bazom u poređenju sa kontrolnim zdravim uzorcima tkiva bez implantata, u četiri merenja tokom eksperimentalnog perioda.

Grupa	(I) Merenje	(J) Merenje	Prosečna razlika (I-J)	p
E	1	2	0,500	0,983
		3	0,333	0,961
		4	-0,333	0,995
	2	3	-0,167	1,000
		4	-0,833	0,713
	3	4	-0,667	0,922
K	1	2	0,000	1,000
		3	0,000	1,000
		4	0,000	1,000
	2	3	0,000	1,000
		4	0,000	1,000
	3	4	0,000	1,000



Grafikon 5.7.

Prosečne vrednosti iritacionog indeksa mišićnog tkiva sa implantiranim karbonskim vlaknima tretiranim bazom, u poređenju sa uzorcima kontrolnih zdravih tkiva bez implantata, tokom eksperimentalnog perioda.

\*E-eksperimentalni uzorci tkiva sa implantatom; K-kontrolni uzorci zdravog tkiva bez implantata.

### 5.4.3. Poređenje rezultata implantata karbonskih vlakana u potkožnom i mišićnom tkivu

U analizi iritacionog indeksa tkiva primenjena je, u okviru generalnog linearnog modela, analiza varijanse za ponovljena merenja. Faktor „merenje“ imao je 4 gradacije: 1 – 7. dan, 2 – 14. dan, 3 – 21. dan i 4 – 28. dan. Faktor „mesto implantacije“ imao je dve gradacije 1 – subkutano i 2 – intramuskularno.

Analizom varijanse za ponovljena merenja dobijena je statistički značajna razlika u vrednostima iritacionog indeksa između subkutane i intramuskularne aplikacije **standardnih**

**karbonskih vlakana** po faktoru „merenje“ ( $F_{\text{merenje}} = 3,713$ ;  $p = 0,022$ ). Po faktoru „mesto implantacije“ nije dobijena statistički značajna razlika ( $F_{\text{mesto impl}} = 2,628$ ;  $p = 0,136$ ). U interakciji oba faktora dobijena je visoko statistički značajna razlika ( $F_{\text{merenje+mesto impl}} = 5,320$ ;  $p = 0,005$ ).

Tabela 5.27. Prosečne vrednosti iritacionog indeksa mišićnog i potkožnog tkiva prilikom aplikacije standardnih karbonskih vlakana, tokom trajanja eksperimenta.

	Mesto implantacije	$\bar{x}$	SD	N
Standardna KV 7. dan	subkutano	4,00	0,89	6
	intramuskularno	5,17	0,75	6
	Ukupno	4,58	1,00	12
Standardna KV 14. dan	subkutano	5,17	1,94	6
	intramuskularno	6,17	0,75	6
	Ukupno	5,67	1,50	12
Standardna KV 21. dan	subkutano	7,67	1,37	6
	intramuskularno	5,17	1,72	6
	Ukupno	6,42	1,98	12
Standardna KV 28. dan	subkutano	6,00	1,67	6
	intramuskularno	4,33	0,82	6
	Ukupno	5,17	1,53	12

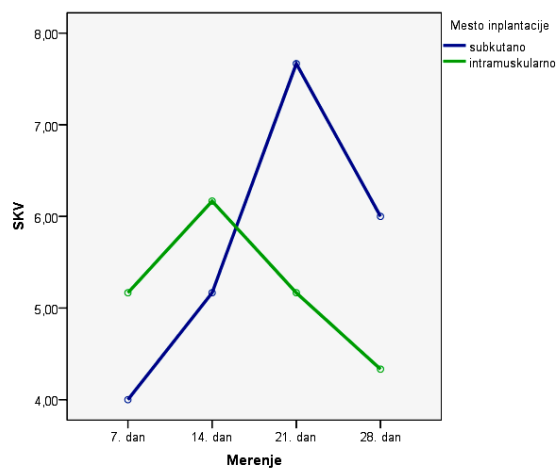
Tabela 5.28. Međugrupna poređenja Sidakovim testom iritacionog indeksa subkutanog i mišićnog tkiva prilikom aplikacije standardnih karbonskih vlakana, u četiri merenja tokom eksperimenta.

Merenje	(I) Mesto implantacije	(J) Mesto implantacije	Prosečna razlika (I-J)	p
1	subkutano	intramuskularno	<b>-1,167</b>	<b>0,035</b>
2	subkutano	intramuskularno	-1,000	0,267
3	subkutano	intramuskularno	<b>2,500</b>	<b>0,019</b>
4	subkutano	intramuskularno	1,667	0,053

U 7. danu nakon implantacije (prvo merenje) iritacioni indeks bio je statistički značajno veći u grupi uzoraka sa intramuskularno aplikovanim standardnim vlaknima u poređenju sa subkutanom aplikacijom istog tipa vlakana, dok je 21. danu nakon implantacije (treće merenje) iritacioni indeks bio statistički značajno veći u grupi uzoraka sa subkutanom aplikacijom u odnosu na intramuskularnu (tabela 5.27 i 5.28 i grafikon 5.8).

Tabela 5.29. Višestruka poređenja Sidakovim testom iritacionog indeksa tkiva prilikom subkutane i intramuskularne aplikacije standardnih karbonskih vlakana (po mestu implantacije), tokom trajanje eksperimenta.

Mesto implantacije	(I) Merenje	(J) Merenje	Prosečna razlika (I-J)	p
subkutano	1	2	-1,167	0,275
		<b>3</b>	<b>-3,667</b>	<b>0,001</b>
		4	-2,000	0,178
	2	3	-2,500	0,149
		4	-0,833	0,933
	3	4	1,667	0,503
intramuskularno	1	2	-1,000	0,426
		3	0,000	1,000
		4	0,833	0,905
	2	3	1,000	0,904
		4	1,833	0,319
	3	4	0,833	0,954



Grafikon 5.8.

Prosečne vrednosti iritacionog indeksa potkožnog i mišićnog tkiva kod aplikacije standardnih karbonskih vlakana, tokom trajanja eksperimentalnog perioda.

U 21. danu nakon subkutane implantacije standardnih karbonskih vlakana, iritacioni indeks potkožnog tkiva bio je statistički značajno veći nego 7. dana nakon implantacije. Između ostalih merenja nije bilo statistički značajne razlike u obe ispitivane grupe (tabela 5.27 i 5.29 i grafikon 5.8).

Analizom varijanse za ponovljena merenja dobijena je visoko statistički značajna razlika u vrednostima iritacionog indeksa tkiva prilikom implantacije **kiselih karbonskih vlakana** po

faktoru „merenje“ ( $F_{\text{merenje}} = 16,084$ ;  $p < 0,001$ ) i statistički značajna razlika po faktoru „mesto implantacije“ ( $F_{\text{mesto impl}} = 7,816$ ;  $p = 0,019$ ). U interakciji oba faktora dobijena je visoko statistički značajna razlika ( $F_{\text{merenje+mesto impl}} = 10,043$ ;  $p < 0,001$ ) (tabele 5.30, 5.31 i 5.32 i grafikon 5.9

Tabela 5.30. Prosečne vrednosti iritacionog indeksa potkožnog i mišićnog tkiva prilikom implantacije karbonskih vlakana tretiranih kiselinom, tokom trajanja eksperimenta.

	Mesto implantacije	$\bar{x}$	SD	N
Kisela KV 7. dan	subkutano	5,17	2,04	6
	intramuskularno	11,50	2,35	6
	Ukupno	8,33	3,92	12
Kisela KV 14. dan	subkutano	3,83	0,98	6
	intramuskularno	4,33	1,03	6
	Ukupno	4,08	1,00	12
Kisela KV 21. dan	subkutano	9,67	2,25	6
	intramuskularno	8,00	2,37	6
	Ukupno	8,83	2,37	12
Kisela KV 28. dan	subkutano	6,00	1,26	6
	intramuskularno	7,33	2,16	6
	Ukupno	6,67	1,83	12

Tabela 5.31. Međugrupna poređenja Sidakovim testom iritacionog indeksa prilikom implantacije karbonskih vlakana tretiranih kiselinom, prema mestu implantacije, u četiri merenja tokom eksperimentalnog perioda.

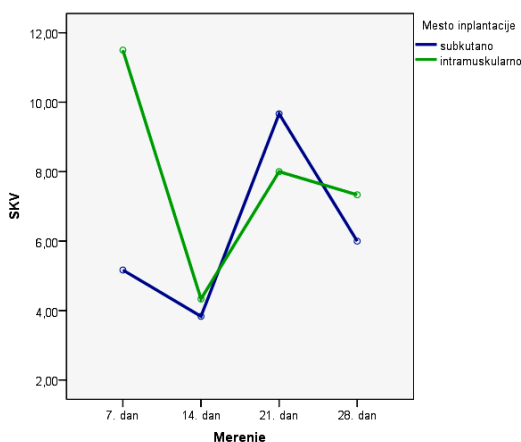
Merenje	(I) Mesto implantacije	(J) Mesto implantacije	Prosečna razlika (I-J)	P
1	subkutano	intramuskularno	-6,333	0,001
2	subkutano	intramuskularno	-0,500	0,411
3	subkutano	intramuskularno	1,667	0,240
4	subkutano	intramuskularno	-1,333	0,221

Nakon 7. dana od implantacije kiselih karbonskih vlakana, iritacioni indeks mišićnog tkiva bio je statistički značajno veći u poređenju sa potkožnim tkivom (intramuskularna: subkutanoj aplikaciji). U ostalim merenjima nije bilo statistički značajne razlike između upoređenih grupa (tabele 5.30 i 5.31 i grafikon 5.9).

Tabela 5.32. Višestruka poređenja Sidakovim testom iritacionog indeksa subkutanog i mišićnog tkiva prilikom aplikacije karbonskih vlakana tretiranih kiselinom, unutar grupa (subkutana aplikacija i intramuskularna aplikacija), u zavisnosti od vremena posmatranja.

Mesto implantacije	(I) Merenje	(J) Merenje	Prosečna razlika (I-J)	p	
subkutano	1	2	1,333	0,862	
		<b>3</b>	<b>-4,500</b>	<b>0,040</b>	
		4	-0,833	0,899	
	2	<b>3</b>	<b>-5,833</b>	<b>0,000</b>	
		4	-2,167	0,326	
	3				
		<b>4</b>	<b>3,667</b>	<b>0,048</b>	
	intramuskularno	1	<b>2</b>	<b>7,167</b>	<b>0,001</b>
			3	3,500	0,138
			<b>4</b>	<b>4,167</b>	<b>0,002</b>
2		<b>3</b>	<b>-3,667</b>	<b>0,011</b>	
		4	-3,000	0,093	
3					
		4	0,667	0,993	

U grupi uzoraka tkiva sa subkutanom implantacijom karbonskih vlakana tretiranih kiselinom, iritacioni indeks imao je najveću vrednost u 21. danu nakon implantacije (treće merenje) i bio je statistički značajno veći nego u ostalim merenjima. U grupi uzoraka tkiva sa intramuskularnom aplikacijom kiselih vlakana najveća vrednost iritacionog indeksa bila je u 7. dana nakon implantacije (u prvom merenju) i bila je statistički značajno veća nego 14. i 28. dana nakon implantacije (u drugom i četvrtom merenju) (tabela 5.30 i 5.32 i grafikon 5.9).



Grafikon 5.9.

Prosečne vrednosti iritacionog indeksa potkožnog i mišićnog tkiva kod subkutane i intramuskularne implantacije karbonskih vlakana tretiranih kiselinom, tokom trajanja eksperimenta.

Analizom varijanse za ponovljena merenja dobijena je značajna razlika u vrednostima iritacionog indeksa **karbonskih vlakana tretiranih bazom** po faktoru „merenje“ ( $F_{\text{merenje}} = 4,245$ ;  $p = 0,013$ ) i statistički značajna razlika po faktoru „mesto implantacije“ ( $F_{\text{mesto impl}} = 9,110$ ;  $p = 0,013$ ). U interakciji oba faktora nije dobijena statistički značajna razlika ( $F_{\text{merenje+mesto impl}} = 2,555$ ;  $p = 0,074$ ).

Tabela 5.33. Prosečne vrednosti iritacionog indeksa potkožnog i mišićnog tkiva prilikom aplikacije karbonskih vlakana tretiranih bazom u različitim periodima tokom trajanja eksperimenta.

	Mesto implantacije	$\bar{x}$	SD	N
Bazna KV 7, dan	subkutano	3,50	1,52	6
	intramuskularno	6,17	0,98	6
	Ukupno	4,83	1,85	12
Bazna KV 14, dan	subkutano	3,33	0,52	6
	intramuskularno	5,67	1,86	6
	Ukupno	4,50	1,78	12
Bazna KV 21, dan	subkutano	5,67	1,03	6
	intramuskularno	5,83	1,17	6
	Ukupno	5,75	1,06	12
Bazna KV 28, dan	subkutano	6,33	1,97	6
	intramuskularno	6,50	2,07	6
	Ukupno	6,42	1,93	12



Tabela 5.34. Međugrupna poređenja Sidakovim testom iritacionog indeksa karbonskih vlakana tretiranih bazom, prema mestu implantacije, u četiri različita merenja tokom eksperimenta.

Merenje	(I) Mesto implantacije	(J) Mesto implantacije	Prosečna razlika (I-J)	p
<b>1</b>	<b>subkutano</b>	<b>intramuskularno</b>	<b>-2,667</b>	<b>0,005</b>
<b>2</b>	<b>subkutano</b>	<b>intramuskularno</b>	<b>-2,333</b>	<b>0,014</b>
3	subkutano	intramuskularno	-0,167	0,799
4	subkutano	intramuskularno	-0,167	0,889

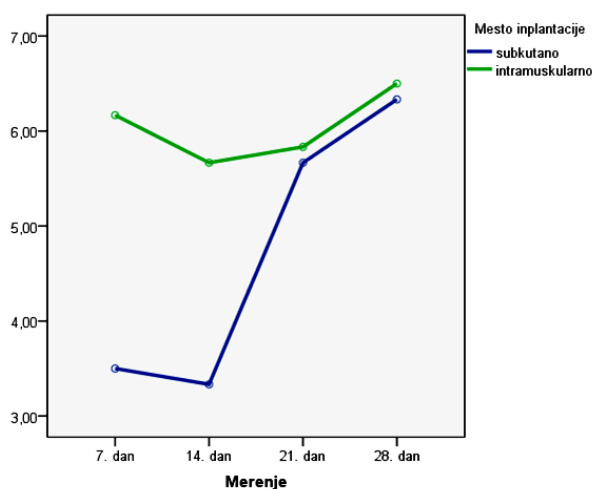
Vrednosti iritacionog indeksa bile su statistički značajno veće 7. i 14. dana nakon intramuskularne implantacije baznih karbonskih vlakana u poređenju sa subkutanom aplikacijom istog tipa vlakana. U trećem i četvrtom merenju (21. i 28. dan nakon implantacije) nije bilo statistički značajne razlike u vrednosti iritacionog indeksa između grupa u zavisnosti od mesta implantacije baznih karbonskih vlakana (tabela 5.34).

Tabela 5.35. Višestruka poređenja Sidakovim testom iritacionog indeksa potkožnog i mišićnog tkiva kod aplikacije karbonskih vlakana tretiranih bazom unutar grupa, po mestu implantacije, u zavisnosti od vremena merenja, tokom eksperimentalnog perioda.

Mesto implantacije	(I) Merenje	(J) Merenje	Prosečna razlika (I-J)	p
subkutano	1	2	0,167	1,000
		3	-2,167	0,071
		4	-2,833	0,111
	2	<b>3</b>	<b>-2,333</b>	<b>0,025</b>
		<b>4</b>	<b>-3,000</b>	<b>0,036</b>
	3	4	-0,667	0,988
intramuskularno	1	2	0,500	0,990
		3	0,333	0,998
		4	-0,333	1,000
	2	3	-0,167	1,000
		4	-0,833	0,930
	3	4	-0,667	0,988

U grupi tkiva sa subkutanom implantacijom baznih karbonskih vlakana dobijena je statistički značajna razlika u vrednostima indeksa iritacije potkožnog tkiva između 14. i 21.

(drugog i trećeg) i i 14. i 28. dana nakon implantacije (drugog i četvrtog merenja). Između ostalih merenja nije bilo statistički značajne razlike. Za razliku od toga, u grupi tkiva sa intramuskularnom aplikacijom baznih karbonskih vlakana, nije dobijena statistički značajna razlika u vrednostima iritacionog indeksa mišićnog tkiva u različitim periodima posmatranja nakon implantacije (tabela 5.33 i 5.35 i grafikon 5.10).



Grafikon 5.10.

Prosečne vrednosti iritacionog indeksa potkožnog i mišićnog tkiva prilikom aplikacije karbonskih vlakana tretiranih bazom, tokom trajanja eksperimenta.

#### 5.4.4. Poređenje rezultata istraživanja standardnih, kiselih i baznih karbonskih vlakana u pogledu vrednosti iritacionog indeksa tkiva prilikom njihove subkutane ili intramuskularne aplikacije

U analizi iritacionog indeksa tkiva primenjena je, u okviru generalnog linearnog modela, analiza varijanse za ponovljena merenja. Faktor „merenje“ imao je 4 gradacije: 1 - 7. dan, 2 - 14. dan, 3 - 21. dan i 4 - 28. dan. Faktor „vrsta karbonskih vlakana“ imao je tri gradacije 1 - standardna KV i 2 - kisela KV i 3 - bazna KV.

Analizom varijanse za ponovljena merenja dobijena je visoko statistički značajna razlika u vrednostima iritacionog indeksa subkutane tkiva kod implantacije karbonskih vlakana po faktoru merenje ( $F_{\text{merenje}} = 23,306$ ;  $p < 0,001$ ), tj. u zavisnosti od posmatranog perioda nakon implantacije, i statistički značajna razlika po faktoru „vrsta karbonskih vlakana“ ( $F_{\text{KV}} = 5,234$ ;  $p = 0,019$ ) i u interakciji oba faktora ( $F_{\text{merenje+KV}} = 2,967$ ;  $p = 0,016$ ).

Tabela 5.36. Prosečne vrednosti iritacionog indeksa potkožnog tkiva pri aplikaciji različitih karbonskih vlakana, tokom trajanja eksperimenta.

	Vrsta KV	$\bar{x}$	SD	N
Tktivni IrI 7. dana	Standardna KV	4,00	0,89	6
	Kisela KV	5,17	2,04	6
	Bazna KV	3,50	1,52	6
	Ukupno	4,22	1,63	18
Tktivni IrI 14. dana	Standardna KV	5,17	1,94	6
	Kisela KV	3,83	0,98	6
	Bazna KV	3,33	0,52	6
	Ukupno	4,11	1,45	18
Tktivni IrI 21. dana	Standardna KV	7,67	1,37	6
	Kisela KV	9,67	2,25	6
	Bazna KV	5,67	1,03	6
	Ukupno	7,67	2,28	18
Tktivni IrI 28. dana	Standardna KV	6,00	1,67	6
	Kisela KV	6,00	1,26	6
	Bazna KV	6,33	1,97	6
	Ukupno	6,11	1,57	18

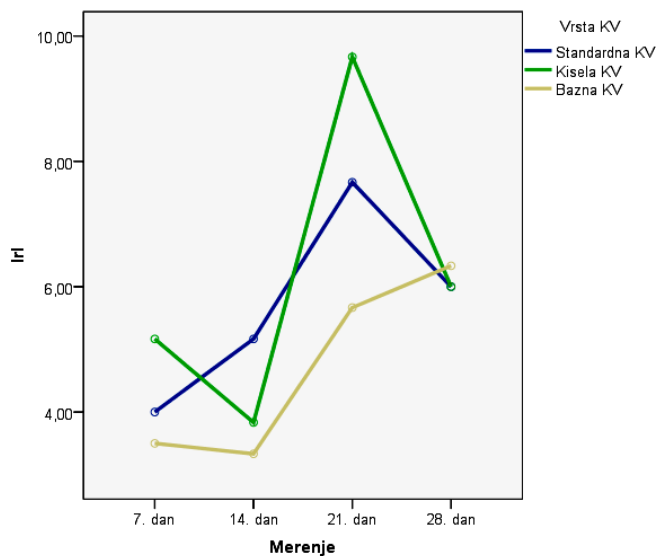
Tabela 5.37. Međugrupna poređenja Sidakovim testom iritacionog indeksa potkožnog tkiva kod implantacije različitih karbonskih vlakana, u četiri merenja tokom eksperimenta.

Merenje	(I) Vrsta KV	(J) Vrsta KV	Prosečna razlika (I-J)	Sig.
1	Standardna KV	Kisela KV	-1,167	0,514
		Bazna KV	0,500	0,929
	Kisela KV	Bazna KV	1,667	0,230
2	Standardna KV	Kisela KV	1,333	0,256
		Bazna KV	1,833	0,078
	Kisela KV	Bazna KV	0,500	0,884
3	Standardna KV	Kisela KV	-2,000	0,145
		Bazna KV	2,000	0,145
	<b>Kisela KV</b>	<b>Bazna KV</b>	<b>4,000</b>	<b>0,002</b>
4	Standardna KV	Kisela KV	0,000	1,000
		Bazna KV	-0,333	0,981
	Kisela KV	Bazna KV	-0,333	0,981

Iritacioni indeks potkožnog tkiva kod subkutane aplikacije kiselih karbonskih vlakana bio je visoko statistički značajno veći 21. dana nakon implantacije (slika 5.26) u poređenju sa istim indeksom kod subkutane aplikacije baznih vlakana. U ostalim merenjima nije bilo statistički značajne razlike (tabela 5.36 ui 5.37 i grafikon 5.11).

Tabela 5.38. Višestruka poređenja Sidakovim testom iritacionog indeksa potkožnog tkiva prilikom implantacije karbonskih vlakana tokom vremena, unutar grupa, u zavisnosti od vrste implantiranih vlakana.

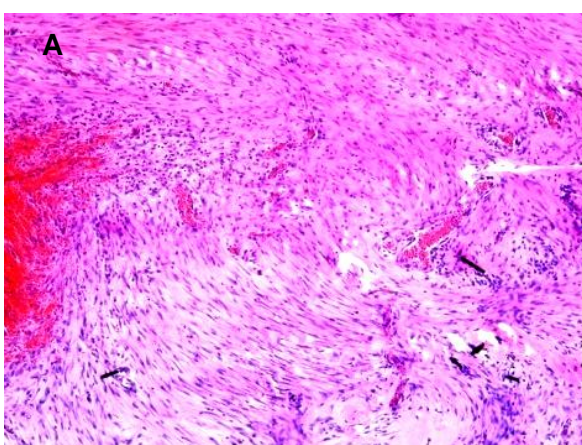
Vrsta KV	(I) Merenje	(J) Merenje	Prosečna razlika (I-J)	p
Standardna KV	1	2	-1,167	0,621
		<b>3</b>	<b>-3,667</b>	<b>0,001</b>
		4	-2,000	0,256
	2	3	-2,500	0,090
		4	-0,833	0,948
	3	4	1,667	0,486
Kisela KV	1	2	1,333	0,478
		<b>3</b>	<b>-4,500</b>	<b>0,000</b>
		4	-0,833	0,945
	2	<b>3</b>	<b>-5,833</b>	<b>0,000</b>
		4	-2,167	0,198
	3	<b>4</b>	<b>3,667</b>	<b>0,011</b>
Bazna KV	1	2	0,167	1,000
		3	-2,167	0,055
		<b>4</b>	<b>-2,833</b>	<b>0,048</b>
	2	3	-2,333	0,127
		<b>4</b>	<b>-3,000</b>	<b>0,036</b>
	3	4	-0,667	0,985



Grafikon 5.11.

Prosečne vrednosti iritacionor indeksa potkožnog tkiva pri aplikaciji različitih karbonskih vlakana tokom trajanja eksperimentalnog perioda.

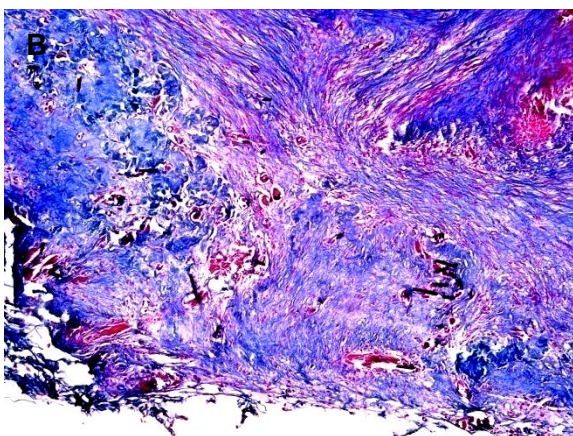
Vrednosti iritacionog indeksa potkožnog tkiva bile su statistički značajno veće kod subkutane aplikacije standardnih karbonskih vlakana 21. dana nakon implantacije (u trećem merenju) nego 7. dana nakon implantacije (u prvom merenju). Prilikom subkutane implantacije kiselih karbonskih vlakana vrednosti iritacionog indeksa bile su statistički značajno veće 21. dana nego u ostalim posmatranim eksperimentalnim periodima (slika 5.26). Vrednosti iritacionog indeksa bile su statistički značajno veće kod subkutane implantacije baznih karbonskih vlakana 28. dana nakon implantacije u poređenju sa 7. i 14. postimplantacionim danom (tabele 3.36 i 3.38, grafikon 5.11 i slike 5.27 – 5.29).



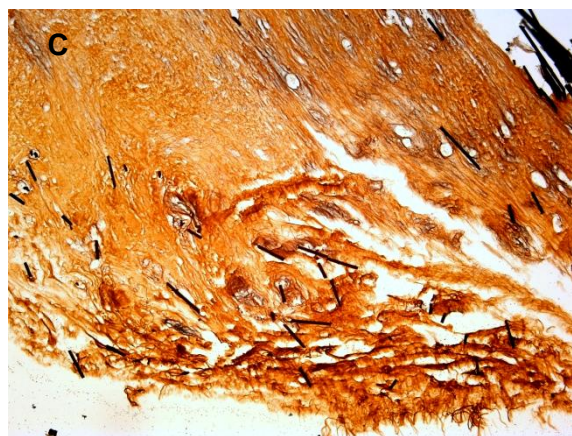
Hematoksilin-eozin (H&E), x10

Slika 5.26. Histološka slika tkiva kod subkutane aplikacije kiselih karbonskih vlakana, 21. postoperativnog dana.

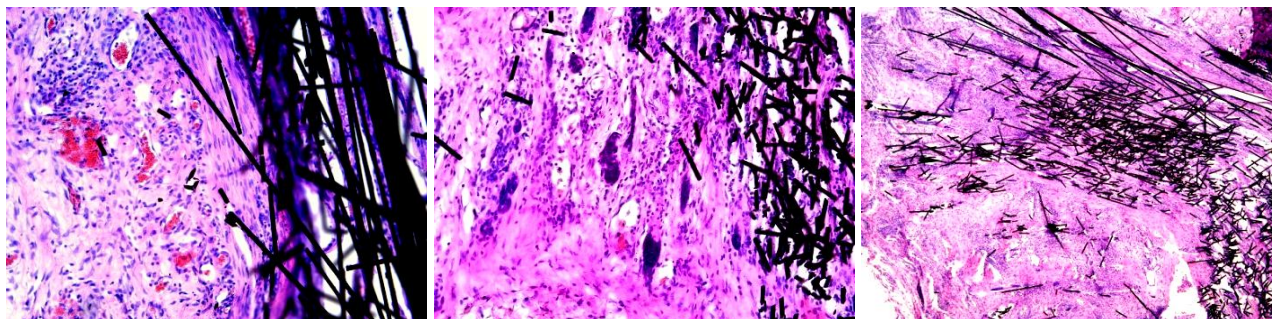
Na slici su prikazani tkivni preseči sa kiselim karbonskim vlaknima u potkožnom tkivu kod iste životinje, 21. postoperativnog dana. Najvećoj vrednosti tkivnog IrI kod primene ovog tipa vlakana u navedenom terminu, doprineli su izrazita hiperemija i inflamacija (A), praćeni fibroplazijom i sintezom kolagenih vlakana (B). Retikularna vlakna bila su malobrojna (C).



AZAN, x10



Gordon-Sweet (retikularna vlakna), x10



Slike 5.27–5.29. Izgled potkožnog tkiva kod supkutane implantacije standardnih (levo), baznih (u sredini) i kiselih karbonskih vlakana (desno), 28. postoperativnog dana.

Održavanju relativno visokih vrednosti tkivnog iritacionog indeksa u sve tri grupe implantiranih karbonskih vlakana 28. postoperativnog dana, znatno su doprineli hiperemija, debela fibrozna kapsula (slika levo), prisustvo džinovskih ćelija tipa oko stranog tela (slika u sredini), kao i održavanje inflamatornog infiltrata (slika desno). H&E, x10 (slika levo), x20 (slika u sredini), x5 (slika desno).

Analizom varijanse za ponovljena merenja dobijena je visoko statistički značajna razlika u vrednostima **iritacionog indeksa mišićnog tkiva** kod primene karbonskih vlakana kako u zavisnosti od posmatranog perioda nakon implantacije (po faktoru „merenje“) ( $F_{\text{merenje}} = 5,786$ ;  $p = 0,002$ ), tako i u zavisnosti od vrste karbonskih vlakana (faktor „vrsta karbonskih vlakana“) ( $F_{\text{KV}} = 16,857$ ;  $p < 0,001$ ) i u interakciji oba faktora ( $F_{\text{merenje+KV}} = 7,511$ ;  $p < 0,001$ ).

Tabela 5.39. Prosečne vrednosti iritacionog indeksa mišićnog tkiva kod implantacije različitih vrsta karbonskih vlakana tokom trajanja eksperimenta.

	Vrsta KV	$\bar{x}$	SD	N
Tktivni Iri 7. dana	Standardna KV	5,17	,75	6
	Kisela KV	11,50	2,35	6
	Bazna KV	6,17	,98	6
	Ukupno	7,61	3,20	18
Tktivni Iri 14. dana	Standardna KV	6,17	,75	6
	Kisela KV	4,33	1,03	6
	Bazna KV	5,67	1,86	6
	Ukupno	5,39	1,46	18
Tktivni Iri 21. dana	Standardna KV	5,17	1,72	6
	Kisela KV	8,00	2,37	6
	Bazna KV	5,83	1,17	6
	Ukupno	6,33	2,11	18
Tktivni Iri 28. dana	Standardna KV	4,33	,82	6
	Kisela KV	7,33	2,16	6
	Bazna KV	6,50	2,07	6
	Ukupno	6,06	2,13	18

U 7. danu nakon intramuskularne implantacije, vrednosti iritacionog indeksa mišićnog tkiva bile su statistički značajno veće u grupi sa implantiranim kiselim karbonskim vlaknima u odnosu na grupe sa implantiranim standardim i baznim karbonskim vlaknima.

Tabela 5.40. Međugrupna poređenja Sidakovim testom iritacionog indeksa mišićnog tkiva pri intramuskularnoj aplikaciji karbonskih vlakana, u četiri merenja tokom eksperimenta.

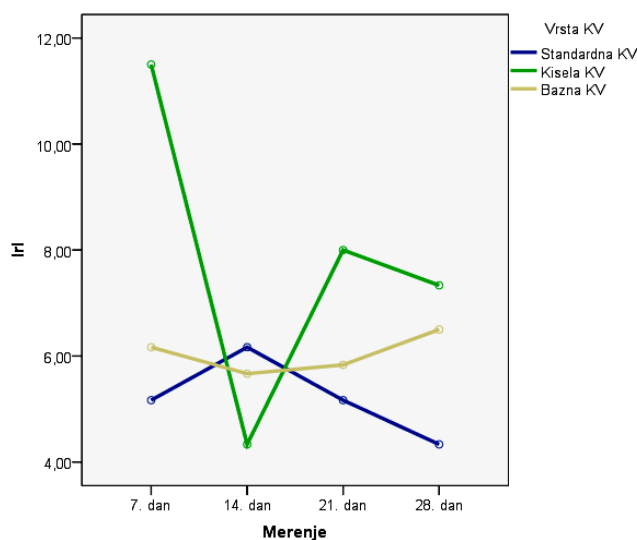
Merenje	(I) Vrsta KV	(J) Vrsta KV	Prosečna razlika (I-J)	Sig.
1	<b>Standardna KV</b>	<b>Kisela KV</b>	<b>-6,333</b>	<b>0,000</b>
		Bazna KV	-1,000	0,620
	<b>Kisela KV</b>	<b>Bazna KV</b>	<b>5,333</b>	<b>0,000</b>
2	Standardna KV	Kisela KV	1,833	0,081
		Bazna KV	0,500	0,887
	Kisela KV	Bazna KV	-1,333	0,263
3	<b>Standardna KV</b>	<b>Kisela KV</b>	<b>-2,833</b>	<b>0,049</b>
		<b>Bazna KV</b>	<b>-0,667</b>	<b>0,900</b>
	Kisela KV	Bazna KV	2,167	0,161
4	<b>Standardna KV</b>	<b>Kisela KV</b>	<b>-3,000</b>	<b>0,033</b>
		Bazna KV	-2,167	0,152
	Kisela KV	Bazna KV	0,833	0,818

Tabela 5.41. Višestruka poređenja Sidakovim testom iritacionog indeksa mišićnog tkiva kod untramuskularne aplikacije različitig karbonskih vlakana tokom vremena, unutar grupa razvrstanih po vrsti implantiranih karbonskih vlakana.

Vrsta KV	(I) Merenje	(J) Merenje	Prosečna razlika (I-J)	P
Standardna KV	1	2	-1,000	0,894
		3	0,000	1,000
		4	0,833	0,907
	2	3	1,000	0,739
		4	1,833	0,328
	3	4	0,833	0,973
Kisela KV	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>7,167</b>	<b>0,000</b>
		<b>3</b>	<b>3,500</b>	<b>0,039</b>
		<b>4</b>	<b>4,167</b>	<b>0,001</b>
	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>-3,667</b>	<b>0,001</b>
		<b>4</b>	<b>-3,000</b>	<b>0,030</b>
	3	4	0,667	0,991
Bazna KV	1	2	0,500	0,996
		3	0,333	1,000
		4	-0,333	0,999
	2	3	-0,167	1,000
		4	-0,833	0,942
	3	4	-0,667	0,991

U drugom merenju, 14. dana nakon intramuskularne implantacije, nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima iritacionih indeksa mišićnog tkiva u zavisnosti od vrste implantiranih karbonskih vlakana. U trećem i četvrtom merenju, 21. dana i 28 dana nakon intramuskularne implantacije različitih karbonskih vlakana, statistički značajno veće vrednosti iritacionog indeksa bile su u grupi sa implantiranim kiselim vlaknima nego u grupi sa aplikovanim standardnim karbonskim vlaknima.

U grupi sa intramuskularno aplikovanim standardnim karbonskim vlaknima nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima iritacionog indeksa između merenja tokom eksperimentalnog perioda. U grupi sa intramuskularno aplikovanim kiselim karbonskim vlaknima, vrednosti iritacionog indeksa bile su statistički značajno veće u prvom (7. dana) nego u ostalim merenjima i statistički značajno manje u drugom (14. dan) nego u trećem i četvrtom merenju. U grupi sa intramuskularno implantiranim baznim karbonskim vlaknima, nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima iritacionog indeksa mišićnog tkiva između merenja tokom eksperimenta.

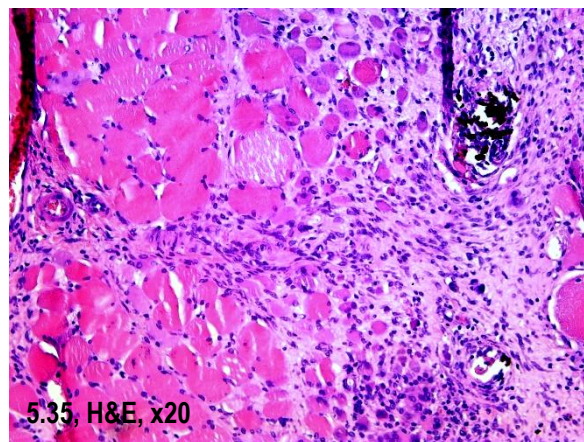
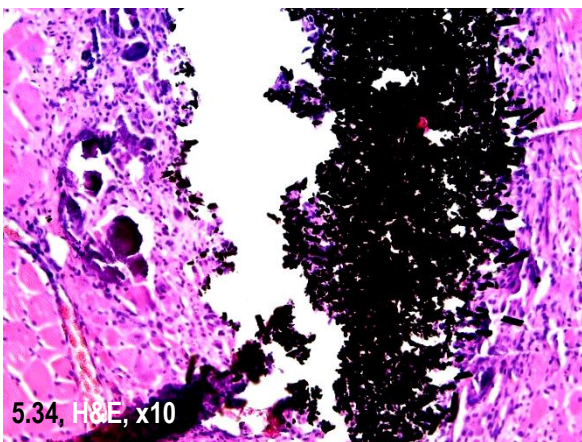
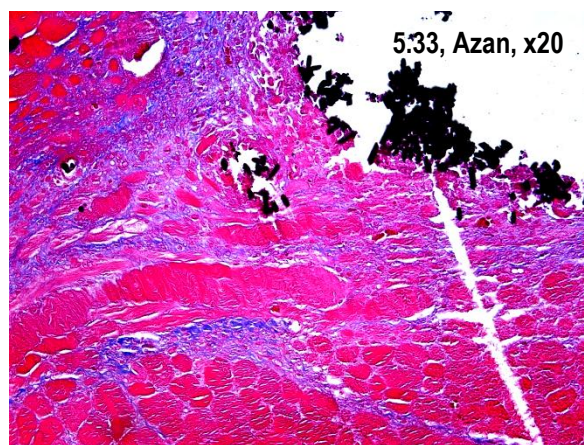
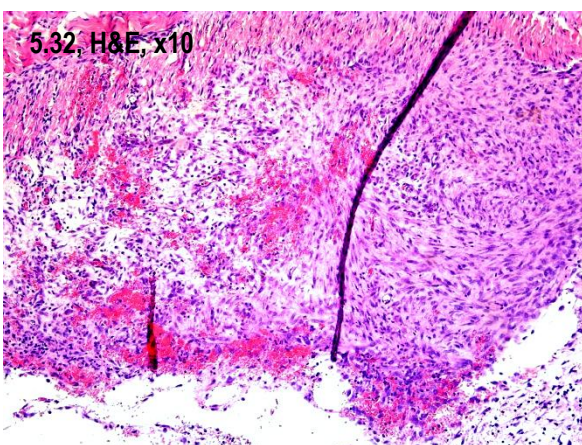
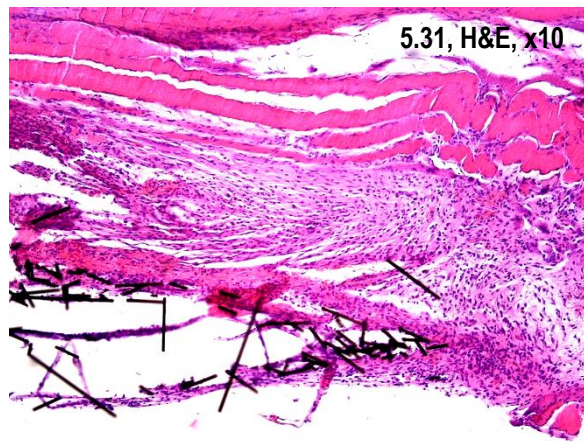
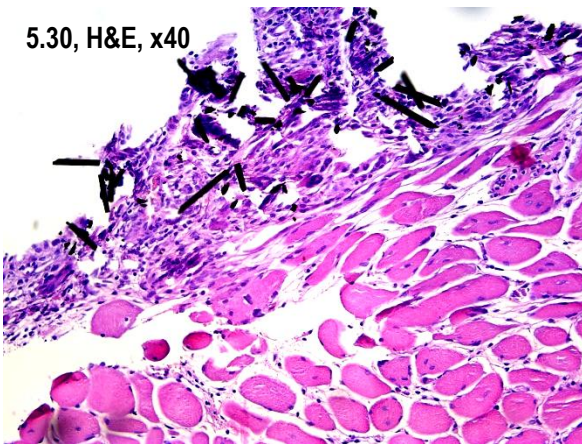


Grafikon 5.12.

Prosečne vrednosti iritacionog indeksa mišićnog tkiva kod intramuskularne aplikacije različitih karbonskih vlakana tokom trajanja eksperimenta.

Međugrupna poređenja Sidakovim testom IrI mišićnog tkiva pri intramuskularnoj (i.m.) aplikaciji karbonskih vlakana, u četiri merenja tokom eksperimenta, pokazala su da postoji znatno viši tkivni IrI kod i.m. aplikovanih kiselih KV u odnosu na i.m. aplikovana standardna KV 7, 21. i 28. postoperativnog dana, kao i statistički značajna razlika u visini ovog indeksa između kiselih i baznih KV u 7. postoperativnom danu u korist kiselih vlakana (tabela 5.41, grafikon 5.12 i slike 5.30-5.35).



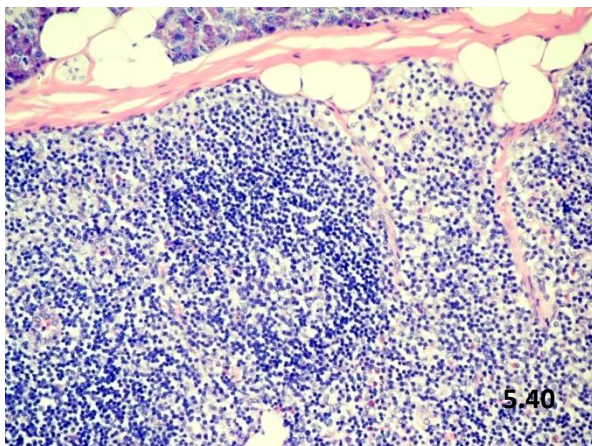
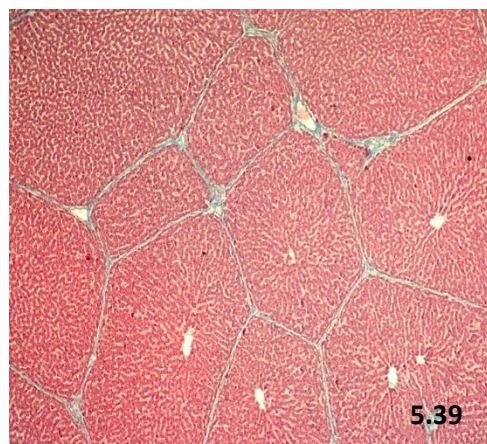
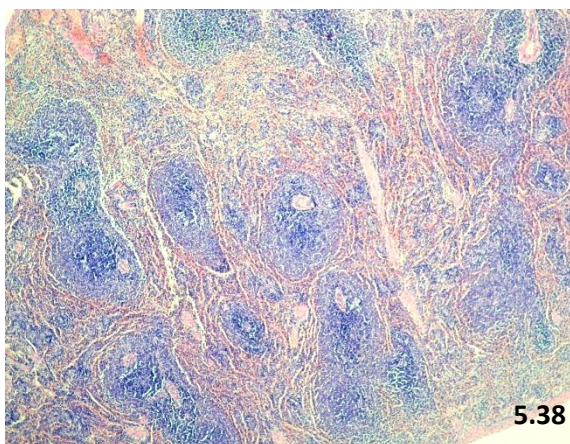
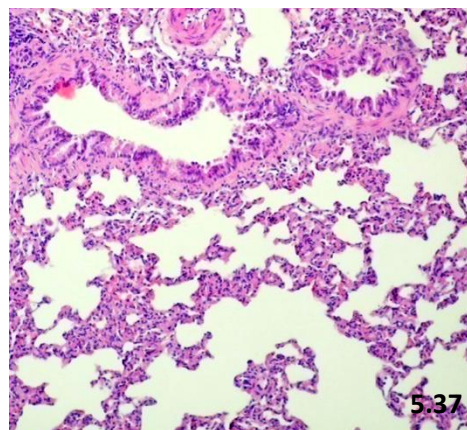
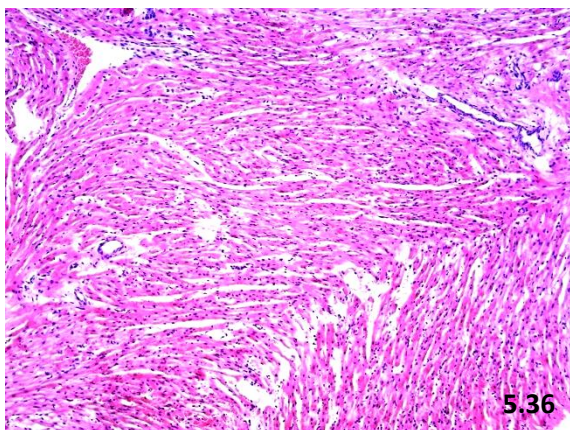


Slike 5.30–5.35. Histološki izgled tkiva nakon 7 dana od intramuskularno aplikovanih standardnih (slika 5.30), baznih (slika 5.31) i kiselih (slika 5.32 – 5.35) karbonskih vlakana.

Za razliku od standardnih (sl. 5.30) i baznih (sl. 5.31) karbonskih vlakana, koja su nakon 7 dana od intramuskularne (i.m.) aplikacije dovela do blage iritacije tkiva, uzrokovane edemom, kongestijom, inflamacijom, fibroplazijom i ranom indukcijom formiranja vezivnog tkiva oko implantata, i.m. aplikacija kiselih karbonskih vlakana dovela je do jake iritacije tkiva uzrokovane krvarenjem i edemom (sl. 5.32), inflamacijom i nekrozom mišićnih vlakana, uz izrazitu fragmentaciju aplikovanih karbonskih vlakana (sl. 5.33 i 5-34), praćenu uočljivom fagocitozom fragmenata od strane makrofaga (sl. 5.34 i 5.35). Na mestu aplikacije kiselih vlakana često se registrovao jak miozitis (sl. 5.35).

#### 5.4.5. Histološki izgled parenhimskih organa životinja sa implantiranim KV

Patohistološkim pregledom uzoraka srca, pluća, slezine, jetre i regionalnih limfnih čvorova kod životinja sa implantiranim standardnim i funkcionalizovanim karbonskim vlaknima u različitim vremenima praćenja posle implantacije, nisu nađene patološke promene (slike 5.36 – 5.40).



Slike 5.36 – 5.40.

Histološki izgled srčanog tkiva (5.36), pluća (5.37), slezine (5.38), jetre (5.39) i limfnog čvora (5.40) kod zamoraca sa implantiranim standardnim karbonskim vlaknima.

H&E: 5.36, 5.37, 5.38 i 5.40.

Azan trihromsko bojenje: 5.39.

Takođe, treba istaći da nije primećena fagocitoza fragmenata vlakana od strane makrofagnog retikuloendotelnog sistema slezine, jetre i limfnog čvora, što znači da nije bilo sistemske diseminacije vlakana.

#### 5.4.6. Fragmentacija vlakana – rezultati morfometrijskih ispitivanja

Dužina fragmenata KV, određivana je na čitavoj površini tkivnog preseka, na mikroskopskom uveličanju 20 x, kod tri do četiri životinje iz svake grupe, u 21. i 28. danu nakon operacije. Ovi termini su za svaku grupu KV implantiranih potkožno prikazivani zbirno (za 6-8 životinja), a isti postupak primenjen je i kod KV implantiranih intramuskularno.

Tabela 5.42. Statistički podaci merenja dužine fragmenata standardnih, kiselih i baznih karbonskih vlakana implantiranih subkutano ili intramuskularno, prikazani zbirno za 21. i 28. postoperativni dan.

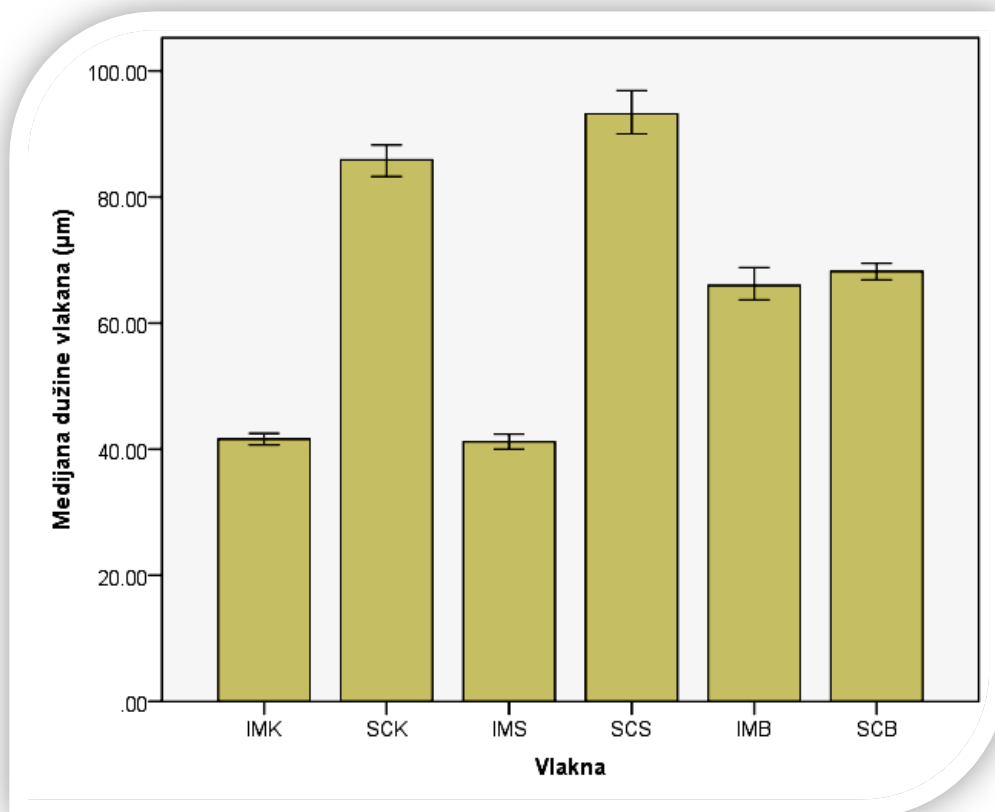
Vlakna	N	Mean, $\mu\text{m}$	SD, $\mu\text{m}$	Med, $\mu\text{m}$	Min, $\mu\text{m}$	Maks, $\mu\text{m}$
IMK	8475	363.19	3575.07	<b>41.61</b>	.00	136363.00
SCK	3754	235.19	621.40	85.90	.00	6734.12
IMS	4341	95.90	240.53	41.17	.00	2874.70
SCS	2121	287.83	872.52	<b>93.19</b>	2.84	7035.15
IMB	2867	160.89	534.91	65.97	.00	5949.23
SCB	5870	193.66	652.57	68.20	1.42	7539.73
ukupno	27428	240.11	2049.40	58.88	.00	136363.00

IMK, SCK – intramuskularna i subkutana kisela karbonska vlakna; IMS i SCS – intramuskularna i subkutana standardna karbonska vlakna, IMB i SCB – intramuskularna i subkutana bazna karbonska vlakna.

Kao što je prikazano u tabeli 5.42, izmerena je dužina svih fragmenata karbonskih vlakana prisutnih na tkivnim presecima posmatranih životinja iz odgovarajuće grupe, a taj broj kretao se prosečno od 2121 vlakna (grupa standardnih vlakana aplikovanih subkutano, SCS) do 8475 vlakana (grupa kiselih vlakana implantiranih intramuskularno, IMK). Ukupno je premerena dužina enormnog broja fragmenata karbonskih vlakana – 27428 (tabela 5.42).

Statistička obrada rezultata pokazala je da su najviše bila fragmentisana intramuskularno aplikovana kisela (medijana dužine fragmenata 41,61  $\mu\text{m}$ ; slika 5.41) i standardna KV (medijana 41,17  $\mu\text{m}$ ), a najmanje subkutano aplikovana standardna KV (medijana 93,19  $\mu\text{m}$ , slika 5.42) (tabela 5.42 i grafikon 5.13).

Generalno, intramuskularna aplikacija karbonskih vlakana, bez obzira na tip, uslovila je jaču fragmentaciju (manja medijana dužine fragmenata) u odnosu na subkutanu (grafikon 5.13). To znači i da je u okviru svake od ispitivanih grupa vlakana (standardna, kisela i bazna) intramuskularna aplikacija uslovila kidanje vlakana na manje fragmente u odnosu na potkožnu aplikaciju (grafikon 5.13 i slike 5.43 – 5.48).



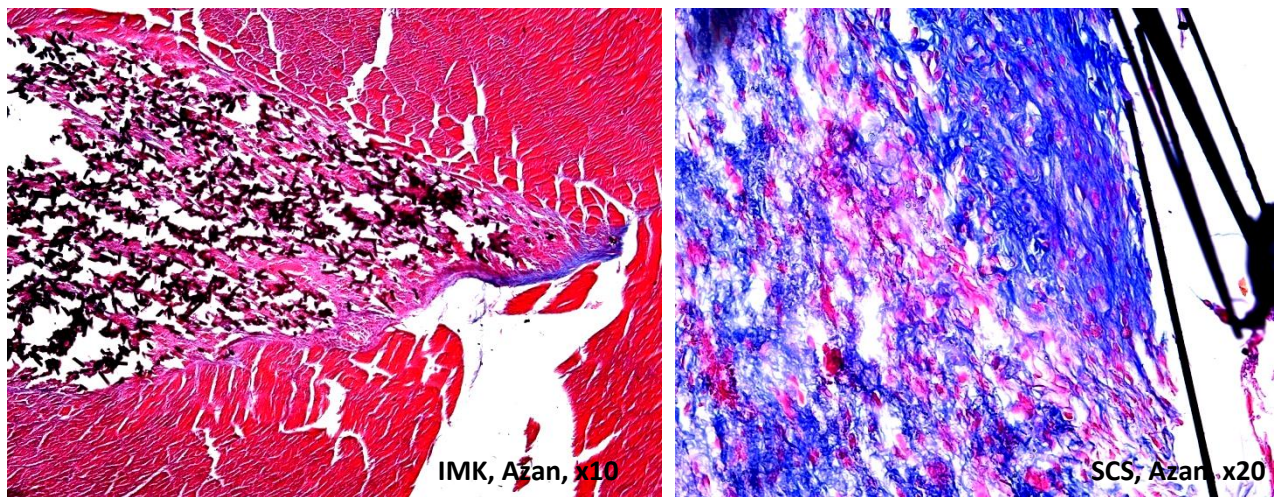
Grafikon 5.13. Dužina fragmenata karbonskih vlakana nakon 21. i 28. postoperativnog dana (zbirno) u potkožnom i mišićnom tkivu eksperimentalnih životinja.

IMK, SCK – intramuskularna i supkutana kisela karbonska vlakna; IMS i SCS – intramuskularna i supkutana standardna karbonska vlakna, IMB i SCB – intramuskularna i subkutana bazna karbonska vlakna; vrednosti su prikazane kao medijane i njihove standardne devijacije.

Kraskal-Volisovim testom dobijena je visoko statistički značajna razlika u dužini vlakana između upoređenih grupa ( $H = 3413,009$ ;  $p < 0,001$ ). Između svih 6 upoređenih grupa postoji visoko statistički značajna razlika u dužini vlakana, izuzev između kiselih i standardnih KV implantiranih i.m. (testiranje međugrupnih razlika Man-Vitni U testom) (tabela 5.43).

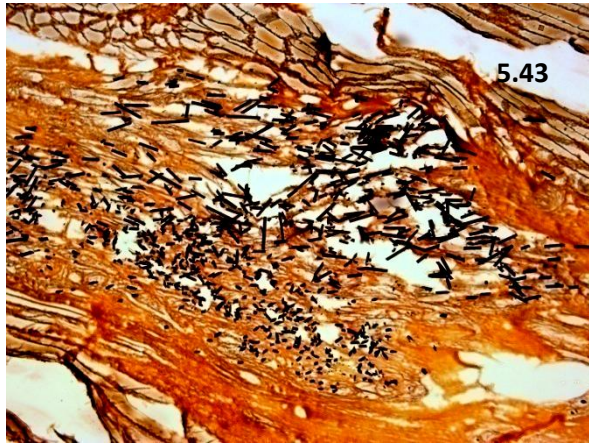
Tabela 5.43. Međugrupne razlike u dužini fragmenata karbonskih vlakana implantiranih u potkožno ili mišićno tkivo eksperimentalnih životinja.

Grupa 1	Grupa 2	P
IMK	SCK	< 0,001
IMK	IMS	0,238
IMK	SCS	< 0,001
IMK	IMB	< 0,001
IMK	SCB	< 0,001
SCK	IMS	< 0,001
SCK	SCS	0,003
SCK	IMB	< 0,001
SCK	SCB	< 0,001
IMS	SCS	< 0,001
IMS	IMB	< 0,001
IMS	SCB	< 0,001
SCS	IMB	< 0,001
SCS	SCB	< 0,001
IMB	SCB	< 0,001

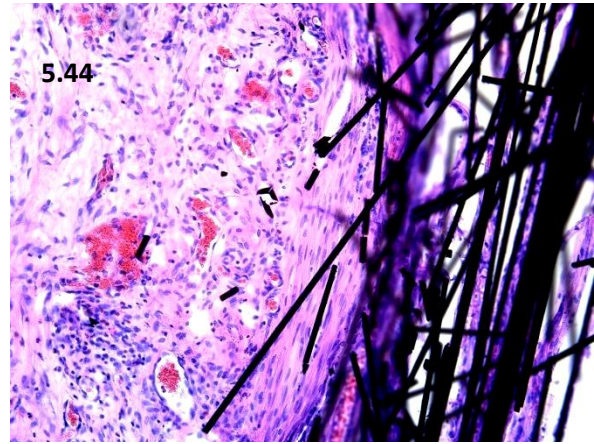


Slike 5.41 i 5.42. Fragmentacija intramuskularno implantiranih kiselih karbonskih vlakana (IMK, levo) i subkutano implantiranih standardnih karbonskih vlakana (SCS, desno) u periodu između 21. i 28. dana nakon hirurške intervencije.

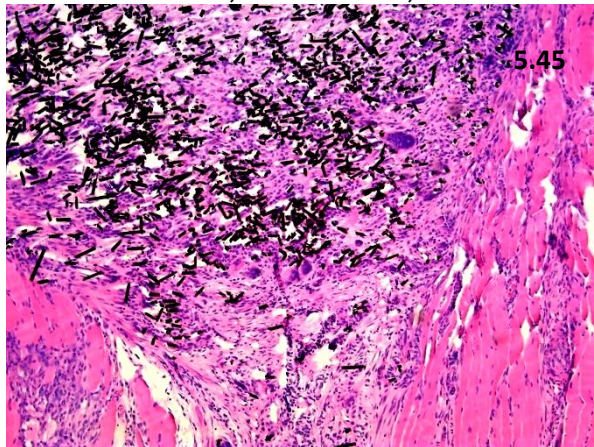
Uočava se izrazita razlika u dužini fragmenata kiselih karbonskih vlakana aplikovanih intramuskularno i standardnih karbonskih vlakana aplikovanih subkutano.



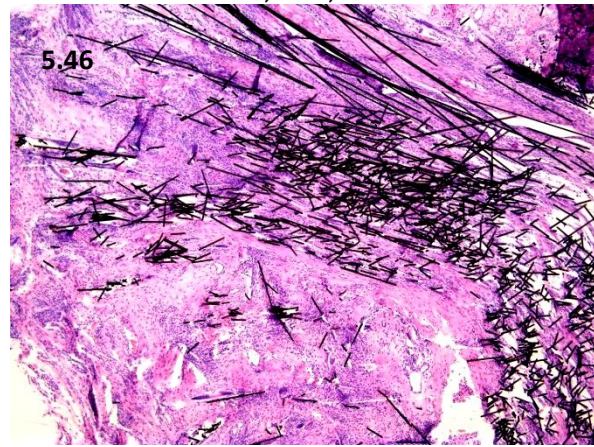
IMS, Gordon-Sweet,x20



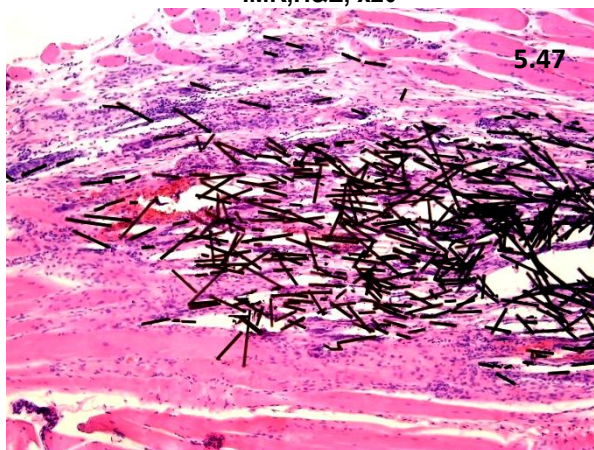
SCS, H&E, x20



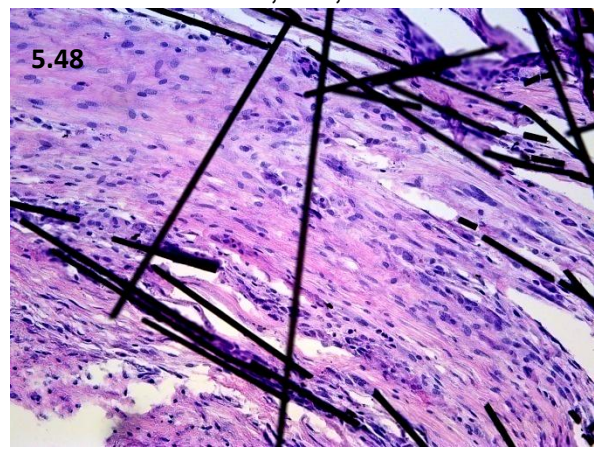
IMK,H&E, x20



SCK, H&E, x5



IMB, H&E, x 10



SCB, H&E, x20

Slike 5.43–5.48. Fragmentacija standardnih (sl. 5.43 i 5.44), kiselih (sl. 5.45 i 5.46) i baznih (sl. 5.47 i 5.48) karbonskih vlakana, u periodu od 21-28. dana nakon hirurške intervencije intramuskularne (leva strana) ili subkutane (desna strana) implantacije.

Uočiti da je fragmentacija, bez obzira na tip implantiranog karbonskog vlakna (KV), uvek intenzivnija kod intramuskularne aplikacije (levo) nego kod subkutane (desno).

IMS i SCS – intramuskularna i supkutana standardna karbonska vlakna, IMK, SCK – intramuskularna i supkutana kisela KV; IMB i SCB – intramuskularna i subkutana bazna KV.

Subkutano, najviše su bila fragmentisana bazna KV, a medijana dužine fragmenata bila je statistički značajno manja u odnosu na iste vrednosti kod kiselih i standardnih vlakana. Intramuskularno, najviše su bila fragmentisana kisela KV, i ta fragmentacija (procenjena na osnovu dužine fragmenata i upoređena preko medijane), bila je statistički značajno veća u odnosu na fragmentaciju baznih KV aplikovanih na isti način.

#### **5.4.7. Komparacija rezultata patohistoloških nalaza i nalaza dobijenih na nuklearnoj magnetnoj rezonanci**

Rezultati ispitivanja NMR poređeni su sa rezultatima histopatološke analize uzoraka tkiva dobijenih nakon žrtvovanja životinja.

Pažljivom komparacijom deskriptivne analize zone implantacije KV na NMR, sa vrednostima iritacionog indeksa tkiva u kojima su implantirana KV (dobijenim semi-kvantitativnom patohistološkom analizom promena u tkivu po preporukama ISO standarda), konstatovano je da su se rezultati delimično slagali u pogledu procene reakcije peri-implatne zone prilikom intramuskularne ili subkutane aplikacije. Generalno, postojala je intenzivnija reakciju tkiva kod primene kiselih KV u odnosu na bazna i standardna, pri obe vrste implantacije, a naročito kod intramuskularne. Međutim, dok je NMR konstastovano generalno smanjivanje inflamatorne reakcije protokom vremena nakon implantacije, naročito u pogledu baznih KV, patohistološkom procenom IrI, konstatovan je niz već opisanih promena u kretanju odgovora tkiva na implantirani materijal u zavisnosti od načina implantacije i vremena posmatranja, koji je bio daleko složeniji od nalaza dobijenih NMR, a ponekad i drugačiji: 1) kod subkutane aplikacije baznih KV, indeks iritacije tkiva rastao je sa protokom vremena i bio daleko veći 21. i 28. dana u odnosu na početne termine praćenja, 2) kod aplikacije standardnih i kiselih KV, indeks iritacije tkiva bio je veći kod subkutane aplikacije u odnosu na intramuskularnu 21. dana nakon implantacije.

## 6. DISKUSIJA

Konačni cilj kod primene biomaterijala kao implantata je ponovno uspostavljanje strukturnog integriteta oštećenog tkiva i organa. Dostizanje ovog cilja zavisi od niza faktora, a prvenstveno: od vrste tkiva/organa koje implantat zamenjuje (privremeno ili stalno), složenosti tehnike implantacije, svojstava samog materijala od kojeg je implantat izgrađen, fizioloških i tehnoloških zahteva implantata i niza kompleksnih međusobnih odnosa implantata i tkiva domaćima u koji se implantat postavlja. Ono što se mora uzeti u obzir, je poželjan i izvodljiv program postoperativne nege. Materijal takođe mora zadovoljiti praktične zahteve proizvodnje i tržišta, uključujući razumnu cenu, mogućnost serijske proizvodnje, kao i lakoću hirurške aplikacije [Balać *et al.*, 2010].

Odgovornost hirurga je da razume ograničenja materijala i principe aplikacije, kako bi eventualnu mogućnost neuspeha implantacije, sveo na minimum. Od naučnika koji se bave biomaterijalima, očekuje se da razviju implantate optimalnog dizajna koji će u najvećoj meri iskoristiti prednosti dostupnog materijala.

Neuspeh implantacije u veterinarskoj medicini, slično kao i u humanoj, može se predstaviti kao:

1. hirurški (posledica neadekvatne hirurške procene mogućnosti implantacije, primenjene tehnike implantacije, infekcije);
2. neuspeh povezan sa samim materijalom (vezan za strukturu materijala, tehnologiju i finoću izrade implantata);
3. idiosinkrazični (odnosi se na odbacivanje implantata koji je posledica hipersenzibilizacije, hronične inflamacije, izolovanja implantata pomoću debele fibrozne kapsule od okolnog tkiva i sl, u čijoj osnovi leže kompleksni imunološki procesi) i
4. propusti u postoperativnom periodu praćenja pacijenta (izostajanje kontrole i nepridržavanja uputstva o čuvanju pacijenta od strane vlasnika, reakcija same životinje na implantat-hirurški zahvat u vidu nekontrolisanog i dopuštenog samopovređivanje i sl.).

Ovi neuspesi se mogu izbeći dobrom procenom ishoda svih faza hirurškog zahvata implantacije, počev od dijagnostičkih procedura koje vode hirurga ka odluci o primeni određenog implantata u cilju rešavanja zdravstvenog problema životinje, pa do stalne edukacije hirurga o novim materijalima i njihovim osobinama, kao i o novim hirurškim tehnikama implantacije.



Neuspeh se može izbeći i edukacijom vlasnika životinje o načinu kontrole pacijenta u postoperativnom periodu.

Pre nego što se hirurrg – hirurški tim odluči za primenu implantata u cilju rešavanja nekog patološkog stanja, potrebno je poznavati sve karakteristike materijala koji se upotrebljava kao implantat. Dijagnostičke procedure zdravstvenog stanja pacijenta moraju biti potpune i kompletne, kako bi se dobro isplanirao ceo tok operativnog zahvata. Kontrola postoperativnog toka obuhvata: hiruršku kontrolu stabilnosti i funkcionisanja implantata, kliničku kontrolu pacijenta, hematoloških i biohemijskih parametara krvi, edukaciju vlasnika i kontrolu ponašanja životinja u određenom vremenskom periodu. Veterinar-hirurrg mora proceniti i sa tim upoznati vlasnika životinje, o konačnom efektu i dužini trajanja primenjenog implantata, kvalitetu života pacijenta, kao i svim mogućim komplikacijama koje se mogu očekivati.

Neki implantati mogu da izazovu neželjene reakcije. Komplikacije mogu da nastanu kao rezultat interakcije tkivo-biomaterijal i najčešće se javljaju u vidu infekcije, alergije, toksičnih reakcija. Nije isključena mogućnost da organizam odbacuje implantat. Neželjena reakcija može biti lokalnog karaktera, kada se javlja na mestu ugradnje implantata, ali može biti i sistemska koja u najgorem slučaju rezultira letalnim ishodom. Materijal ne sme da se degradirati tokom određenog vremenskog perioda u biološkom okruženju i tom prilikom da oslobađa potencijalno štetne nusproizvode lokalno i sistemski i da narušava mehaničke karakteristike tkiva u kojem je implantiran. U humano i veterinarskoj medicini koristi se širok spektar različitih biomaterijala za izradu implantata, najčešće u cilju sanacije ili zamene defekata koštanog tkiva, sanacije oštećenih ligamenata i tetiva, zglobova, sanacije defekata mekih tkiva, izradu endoproteza i ortoza (ortopedske endoproteze, proteze u kardiovaskularnoj hirurgiji, oftalmologiji, neurohirurgiji i slično), lečenju u stomatologiji itd. Da bi neki materijal ušao u komercijalnu upotrebu, neophodno je da bude biokompatibilan i da ima zadovoljavajuće fizičko-mehaničke karakteristike. Što se tiče zahteva u pogledu biokompatibilnosti, kao što je definisano standardima ISO 10993, biomaterijal treba da bude netoksičan, netrombogen, nekancerogen, neantigen i nemutagen [Čolic, 2007; Helmus et al., 2008; Balać et al., 2010].

Uvažavajući sve što je napred izneto, može da se istakne da su u planiranju, pripremi i samom sprovođenju eksperimenta na životinjama u cilju ispitivanja biokompatibilnosti materijala *in vivo* u ovoj doktorskoj disertaciji, poštovani svi etički uzusi i uzusi dobre lekarske prakse, a da je pravilni monitoring životinja u postoperativnom toku rezultirao ishodom eksperimenta bez

povećanja morbiditeta životinja i bez letaliteta. Postupak funkcionalizacije karbonskih vlakana izveden je na karbonskim vlaknima poznatog svetskog proizvođača, što je garantovalo detaljnu i pouzdanu karakterizaciju vlakana u pogledu njihovog hemiskog sastava i mehaničkih karakteristika.

Poslednjih četrdeset godina, ispituje se primena različitih ugljeničnih materijala u više medicinskih oblasti, uključujući i eksperimentalnu i veterinarsku medicinu [*Haubold and Norman, 1977; Foster et al., 1978; Kinzl et al., 1983; Neugebauer and Claes, 1983; Veth et al., 1983; Amis et al., 1984; 1988; Stein, 1984; Mendes et al., 1985; Blayney et al., 1986; Brantigan and Steffee, 1993; Becker et al., 1996; Ciappetta et al., 1997; Glazer, 2000; Blazewich et al., 2001a,b; Zou et al., 2003; Blazewich, 2010; Bougherara et al., 2011; Devine et al., 2013; Hak et al., 2014; Atik et al., 2016; Bolla et al., 2016; Chou et al., 2016; Mauffrey et al., 2016; Behrendt et al., 2017; Mnatsakanian et al., 2017; Pera et al., 2017*].

Iako je najznačajnija oblast primene ugljeničnih materijala njihova primena u vidu implantata u cilju nadoknade oštećenog ili izdubljenog tkiva, svedoci smo napretka i u drugim oblastima, koje značajno unapređuju medicinske nauke, kako bazične, tako i primenjene. Tako su npr. dobijene visoko kvalitetne elektrode za dugotrajno višemesečno praćenje moždane aktivnosti iz pojedinačnih neurona koje minimalno oštećuju moždano tkivo, izrađene od karbonskih materijala. To su integrisane, kompozitne elektrode koje imaju jezgro od karbonskih vlakana i prevlaku od trankog filma koga čini *poly(p-xylylene)*. One su daleko manje od klasičnih elektroda koje se koriste za ispitivanje moždane aktivnosti, a u mehaničkom smislu su više usaglašene sa moždanim tkivom. Za sada se ove elektrode koriste kod pacova za snimanje aktivnosti pojedinačnih neurona, kao i u hroničnim eksperimentima [*Kozai et al., 2012*]. Isto tako, karbonski mikrovlaknasti substrati modifikovani bakarnim nanožicama u vidu SERS- senzora mogu pronaći dodatnu primenu u biomedicinskim i ekološkim sensorima. Merenjem promene u volumenu, koncentraciji, rasporedu, gravitacionim, električnim i magnetnim silama, pritisku ili temperaturi ćelija u telu, ovi senzori mogli bi da razlikuju i prepoznaju određene ćelije, pre svega ćelije karcinoma, na molekularnom nivou [*Halouzka et al., 2017*]. Da spomenemo na ovom mestu i značaj aktiviranih tkanina od karbonskih vlakana za pročišćavanje vode, naročito za uklanjanje organskih mikropolutana i farmaceutskih jedinjenja (npr. diklofenak, kofein, acetaminofen itd.) [*Falou et al., 2016*]. Kratka vlakna konoplje, dobijena kao otpad iz proizvodnje tekstila, mogu da se koriste kao jeftini prekursor za proizvodnju ugljeničnih

materijala kao sorbenta u ekstrakciji čvrste faze, za analizu pesticida i teških metala u uzorcima vode [Vukčević *et al.*, 2012; 2013; 2014; 2015].

Ogroman broj radova u naučnoj literaturi posvećen je afirmaciji veoma dobrih hemijskih i fizičkih karakteristika ugljeničnih vlakana, u kojima se posebno ističe njihova sličnost sa čelikom i prednost što su daleko lakša od njega, a čvršća, stišljivija i elastičnija. Tako je npr. čvrstoća na istezanje čelika 2,39 GPa a karbonskih vlakana 1,5–5.65 GPa, modul elastičnosti čelika je 210 GPa a KV 228–790 GPa, specifična čvrstoća čelika je 26,6 GPa a KV 106–407 GPa, dok je gustoća daleko manja u odnosu na čelik ( $1,6\text{--}2,2\text{ g/cm}^3$ :  $7,9\text{ g/cm}^3$ ) i slična je gustoći kompaktne kosti ( $2,0\text{ g/cm}^3$ ) [Petersen, 2016]. Kao što je već ranije istaknuto, KV imaju grafitnu strukturu sa snažno kovalentno vezanim kristalima koji su veoma anizotropni, što određuje jake mehaničke osobine duž uzdužne osovine vlakana, ali sa istovremeno slabim *Van der Waalsovima* silama između slojeva, što određuje minimalne mehaničke osobine u transverzalnom i perpendikularnom smeru. Stroga se u svrhu dobijanja visokomodulnih KV, orijentacija grafitnih kristala popravljaju različitim termalnim i mehaničkim tretmanima. Na primer, KV dobijena iz PAN imaju čvrstoću od 2,4–5,65 GPa, modul od 230–436 GPa, pa se upotrebljavaju u kompozitima visokih performansi, uglavnom u avionskoj industriji. Dalje, KV kada su neopterećena imaju elastična svojstva, pa su otporna na zamaranje. Inertna priroda KV određuje njihovu perfektnu vlažnost i hemijsku rezistentnost na sobnoj temperaturi, ali oksidacija započinje na višim temperaturama počev od 350–450°C. Karbonska vlakna imaju dobru električnu sprovodljivost sa električnom rezistentnošću koja se nalazi u opsegu od  $9,5\times 10^{-6}\ \Omega\text{m}$  do  $18\times 10^{-6}\ \Omega\text{m}$ . Povećanjem čvrstoće KV povećava se njihova električna i termalna sprovodljivost i modul. Tipični kompoziti KV sa polimernim matriksom za električnu izolaciju, obezbeđuju usmerenu električnu sprovodljivost koja je najveća duž toka vlakana. Zbog polimera za izolaciju, perpendikularna i transferzalna kondukcija u karbonskim polimerima je mala, ali ipak postoji zbog toga što između male frakcije vlakana postoji međusobni kontakt. Kod ojačavanja karbonskim vlaknima različitih polimera, ističe se da ona, zahvaljujući opisanoj osobini električne sprovodljivosti, u matriksu kompozita stvaraju električna mikrokola koja stimulišu rast tkiva tako što odstranjuju višak elektrona nastalih tokom respiratornog stresa iz elektronskog transportnog lanca u mitohondrijama, u toku perioda hipoksije. Preciznije, kiseonik kao akceptor elektrona neophodan je u toku efikasne sinteze energije, a ukoliko ga nema nastali slobodni kiseonični radikali i kiselina sredina dovode do oštećenja ćelija. Stoga je električna sprovodljivost koju poseduju KV

biokompatibilno svojstvo ovih materijala, jer se zahvaljujući njemu odstranjuje višak štetnih elektrona u pravcu manjeg elektrohemijskog gradijenta, tj. prema zonama sa manjim negativnim naelektrisanjem i manjom koncentracijom jona. Zahvaljujući električnoj sprovodljivosti, karbonska vlakna se koriste i u voltometrijskoj identifikaciji bioloških molekula, za ispitivanje aktivnosti mozga. Karbonska nanovlakna obezbeđuju elektronsku sprovodljivost za stimulaciju kardiomiocita i nezavisno od toga podstiču proliferaciju kardiomiocita [Kozai et al., 2012; Petersen, 2016].

Prva medicinska primena KV vezana je za zamenu ili reparaciju ligamenata i tetiva [Foster et al., 1978], što je detaljno razmatrano u uvodnom delu ove doktorske disertacije. Naime, osamdesetih godina prošlog veka počela je klinička primena KV, kao matrice za indukciju proliferacije vezivnog tkiva u cilju reparaciju tetiva i ligamenata. Pokazano je da KV imaju uglavnom dobra biokompatibilna svojstva u smislu zamene ligamenata u kolenom zglobu kod ljudi, kao i na drugim lokalizacijama, s obzirom da implantacija ovih vlakana dovodi do deponovanja koncentričnih slojeva fibroznog vezivnog tkiva oko vlakana i tako pruža potporu „novonastalim ligamentima“ [Jenkins and Foster, 1977; Foster et al., 1978]. Međutim, kako KV imaju malu transferzalnu čvrstoću, dolazi do njihove stalne fragmentacije i stvaraju se partikule debris, pa iz tog razloga Američka agencija za hranu i lekove (*Food and Drug Administration*) nije dala odobrenje da se ova procedura primenjuje kod zamene *lig. cruciale anterior*. Ranije su se KV dodavala u koštani cement u cilju regeneracije koštanog tkiva, zbog mogućnosti da u koštanom cementu pojačaju snagu na istezanje, modul, jačinu savijanja, otpornost na smicanje, otpornost na zamor i sl. Kasnije, ona su postala sastavni deo kompozita (kompoziti ojačani KV), koji su našli primenu u lečenju koštanih preloma pomoću interne fiksacije. Primećeno je da interni fiksatori sačinjeni od kompozita ojačanih karbonskim vlaknima stimulišu zarastanje preloma bolje nego metalni fiksatori jer, između ostalog, omogućavaju uniformnu distribuciju stresnih sila. Pored primene kao intrernih fiksatora za kosti u formi kompozita, karbonska vlakna su postala sastavni deo biomaterijala za protezu kuka, keratoproteze, reparaciju zglobnih površina, a sastavni deo su i skafolda za terapiju koštanih defekata [Petersen, 2011; Deng et al., 2015; Najeb et al., 2015].

Najveći broj istraživanja *in vivo* potvrđuje odlična biokompatibilna svojstva KV kao koštanih implantata. Različiti mehanizmi leže u osnovi koštane regeneracije indukovane KV. Prvo, karbonska vlakna se u zoni preloma, tj. koštanog defekta, oksidišu oko 20%, pri čemu stižu

površinske grupe R–COOH i R–COH koje mogu da privuku razne biološke molekule, slično kao što kiseonik privlači hidrokarbone putem *van der Waalsovih* sila. Drugo, reakcija kondenzacije omogućava jako kovalentno vezivanje koštanih fosfata i određene količine organskog dela koštanog matriksa preko terminalnih grupa membranskih masnih kiselina/ fosfata/ amino kiselina. Treće, zbog slabije čvrstoće u transferzalnom smeru, KV se fragmentišu [Callister, 1997; Chawla, 1998], i ta fragmentacija dužinom implantata dovodi do snažne osteointegracije. Ne samo da KV stimulišu sintezu osteoida, već dalje pojačavaju pripajanje mekih tkiva za kost. Četvrto, zahvaljujući hipoksiji u koštanoj srži, u toku sinteze energije u mitohondrijama dolazi do stvaranja kiselina pa se polimeri smole razmekšavaju i puluju, što dovodi do povezivanja kosti sa karbonskim vlaknima. U osteointegraciji, centralnu ulogu ima kovalentno vezivanje koštanog matriksa za KV, dok je u slučaju primene titanijumskog implantata glavni mehanizam osteoindukcije jonsko povezivanje elektrona titanijuma i kosti, sa mineralizacijom prostora između kosti i površine oksidisanog sloja TiO<sub>2</sub> [Blazewicz, 2001; Rajzer et al., 2010; Petersen, 2011; 2014; 2016].

Iako većina istraživača procenjuje primenu KV *in vivo* kao uspešnu (naročito u regeneraciji tvrdih tkiva), pa samim tim KV karakteriše kao biokompatibilni materijal, ne mali broj autora je skeptičan u pogledu superiornosti KV nad drugim biomaterijalima, naročito prilikom njihove aplikacije u meka tkiva, s obzirom da je primećeno da imaju slabija bioaktivna svojstva. Različiti rezultati dobijeni prilikom evaluacije KV kao biomaterijala najverovatnije su posledica upotrebe različitih tipova vlakana, tj. KV koja imaju različite fizičke, strukturne i hemijske karakteristike, koje su rezultat više tehnoloških parametara. Osim toga u većini radova nedostaju precizni podaci o tipu vlakana i njihovim fundamentalnim karakteristikama koje mogu da odrede njihovo ponašanje u biološkom okruženju [Blazewicz, 2001; Rajzer et al., 2010]. To je bio razlog zašto je za temu ove doktorske disertacije odabrano ispitivanje biokompatibilnosti KV i funkcionalizovanih KV u potkožnom i mišićnom tkivu, sa idejom da se ispita da li funkcionalizovana vlakna koja imaju na svojoj površini više baznih, tj. kiselih grupa menjaju biokompatibilna svojstva.

Karbonska vlakna, naročito visokomodulna, imaju „glatku“ površinu, sa veoma malo nesparenih veza i stoga se vrlo teško vezuju sa polimerima. To važi i za epoksidne smole koje predstavljaju najvažniju osnovu kompozita KV-polimer. Ako je veza vlakno-osnova, pa prema tome i adhezija, slaba, mehaničko naprezanje se neće prenositi sa osnove na vlakno. Takav

kompozit je vrlo slab. Dakle, da bi se iskoristile velike mehaničke osobine vlakana, neophodno je povećati adheziju vlakno-osnova. To se ostvaruje promenom površinskog stanja vlakana, bilo uvođenjem funkcionalnih površinskih grupa, koje bi omogućile vezu sa atomima ugljenika iz smole, ili „ogrubljivanjem“ površine koje bi pomoglo da se ostvari mehanička veza sa smolom. Ukoliko se radi o vrsti biokompatibilnih KV, ona nisu biološki aktivna u onoj meri u kojoj su to biostaklo ili biokeramika, tako da modifikacija površine KV stiže sve veću primenu. Načini modifikacije su različiti, od oblaganja keramičkim česticama hidroksiapatita i pirolitičkog karbona radi boljeg prijanjanja za okolnu kost, do modifikacije aktivnih hemijskih grupa na površini KV. Da bi se postigla maksimalna iskoristljivost biokompatibilnih osobina ugljenika, potrebno je razviti nove hemijske metode u cilju funkcionalizacije poroznih površina ugljeničnih implantata. Pažljiva oksidacija poboljšava efekat vlaženja pora i povećava broj mikropora i površinu ugljenika. Za oksidaciju ugljeničnih materijala najčešće se upotrebljava koncentrisana ili razblažena azotna kiselina. Oksidacija površine ugljenika azotnom kiselinom je vrlo efikasan proces koji se koristi za stvaranje površinskih funkcionalnih, odnosno karboksilnih grupa. Suprotno tome je tretiranje površine KV bazama, kao što je KOH [Marinković, 1999].

Među mnogim metodama tretiranja površine vlakana, najvažnije su metode oksidacije koje se vrše kiseonikom iz vazduha sa ili bez dodataka ( $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{O}_3$ ), vodenim rastvorima oksidanasa ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{HClO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{Cr}_2\text{O}_4$ ), ili elektrohemijom (anodnom) oksidacijom koja je posebno pogodna za kontinualne industrijske procese. Današnje metode tretiranja površine vlakana, kakve se koriste u industrijskoj proizvodnji, omogućuju povećanje adhezije, koja čini da se čvrstoća kompozita na smicanje poveća 2-4 puta, što povećava zateznu čvrstoću kompozita do visokih vrednosti [Marinković, 1999]. Pri apsorpciji neorganskih i organskih polarnih materijala, pored struktura pore, od izuzetnog je značaja i hemijska priroda površine aktivnih karbona/karbonskih materijala. Zbog delimično uređene aromatične strukture, defekti u strukturi predstavljaju aktivna mesta na površini materijala na kojima atomi ugljenika stupaju u reakciju sa različitim atomima prisutnim u okolini, najčešće sa kiseonikom i vodonikom. Kao rezultat nepotpune karbonizacije polaznog materijala, ili zato što se hemijski vezuju za površinu za vreme aktivacije ili naknadnog hemijskog tretiranja, na površini karbonskih vlakana prisutni su heteroatomi O, H, Cl, N, S [Polovina, 1999]. U reakciji sa  $\text{NH}_3$  formiraju se stabilna površinska jedinjenja ugljenik-azot; reakcija sa  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{CS}_2$ , ili S daje strukturu ugljenik-sumpor; reakcija sa  $\text{Cl}_2$  uslovljava površinske karakteristike i površinsko ponašanje aktivnih karbona. Reakcija sa

koncentrovanom  $\text{H}_2\text{SO}_4$  i  $\text{H}_3\text{PO}_4$  daje karbonska vlakna sa sulfatnim i fosfatnim grupama, koja imaju jonoizmenjivačke karakteristike i pogodna su za selektivnu adsorpciju polarnih jedinjenja kako u gasovitoj, tako i u tečnoj fazi [Polovina, 1999]. Površinske strukture ugljenik-kiseonik su najbrojnije i od najvećeg značaja jer utiču kako na adsorpcione karakteristike, tako i na sposobnost vlaženja, katalitička i električna svojstva. Priroda i količina ovih grupa zavise od prirode karbona, njegove površine i načina formiranja (temperatura, aktivator), ali se one mogu formirati i naknadnim hemijskim tretiranjem materijala, najčešće različitim oksidacionim agensima kao što su vazduh, kiseonik, kiselina (azotna, sumporna, fosforna), vodonik-perosid, rastop nitrata gvožđa itd. Vezani kiseonik može se sa površine karbona ukloniti samo kao oksid ( $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$ ) i to na visokim temperaturama u vakumu ili u inertnoj sredini [Polovina, 1999]. Što se tiče mogućih kiseoničnih grupa na površini karbona, grupe mogu biti jako kisele karboksilne grupe, slobodne (a) ili u obliku anhidrida (b), srednje kisele laktanske (c) i laktanske (d) grupe, slabo kisele hidroksilne grupe fenolnog tipa (e), karbonilne grupe, izolovane (f), ili kombinovane u hinonski tip strukture (g) i etarski ili ksantenski tip kiseoničnih grupa (h) koje spadaju u bazne. Bazne grupe koje, za razliku od kiselih, nastaju na višim temperaturama aktivacije ( $800\text{-}1000^\circ\text{C}$ ), pripadaju pretežno hromenskim i pironskim strukturama [Polovina, 1999].

U literaturi su poznati mnogi načini tretiranja površine karbona, i oni se sprovode sa različitom namenom [Bacic-Vukevic et al., 2006; Deng et al., 2015; Miyazaki et al., 2017], koja će na ovom mestu biti ukratko razmotrena.

Ukoliko se, npr. iz prirodnih vlakana Kenafa proizvedu aktivirana karbonska vlakna karbonizacijom na temperaturi od  $300^\circ\text{C}$ , impregnacijom sa rastvorom 30% w/v  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  i aktivacijom na  $700^\circ\text{C}$  u trajanju od 2 sata, ova vlakna sadržaće na svojoj površini u najvećoj meri mikropore i biće vrlo efikasna u adsorpciji fenola i p-nitrofenola iz vodenog rastvora [Aber et al., 2009]. Dokazano je da gustina površinskih funkcionalizovanih grupa na aktivnim tkaninama od karbonskih vlakana i aktiviranim zrnastim karbonima, korelira sa kapacitetom apsorpcije formaldehida iz gasne faze [Carter et al., 2011]. Hemijske površinske grupe na aktiviranim karbonskim vlaknima važne su u otklanjanju herbicida diurana i amitrola iz vode [Fontecha-Cámara et al., 2007]. Aktivirani karboni i aktivirana karbonska vlakna koja apsorbuju aromatična jedinjenja mogu da se regenerišu pomoću etanola, a na tu regeneraciju uticaj imaju njihovi površinski kiseli oksidi. Međutim, iako se efikasnost regeneracije površinskim kiselim oksidima održava čak i nakon 16. regeneracije na visokom nivou, oksidacija nema praktičnu upotrebu, jer

se kapacitet adsorpcije smanjuje oksidacijom [Tamon and Okazaki, 1997]. Aktivirani karboni dobijeni iz kokosove ljuske ili PAN i funkcionalizovani azotom i kiseonikom, efikasni su u apsorpciji jona metala iz vode [Xiao and Thomas, 2005].

Karbonski materijali visokih performansi za skladištenje energije mogu da se dobiju korišćenjem poli(*m*-fenilen izoftalamida), PMIA, kao prekursora za hemijsku aktivaciju karbonizacije vlakana aramida korišćenjem KOH; ona vlakna su se pokazala kao dobar kandidat za adsorpciju H<sub>2</sub> pri visokom pritisku i temperaturi, tj. za primenu u vidu elektroda za elektrohemijske superkapacitore [Castro-Muñiz et al., 2013]. Obrada karbonskih vlakana prevlačenjem azotom predstavlja alternativano dobro rešenje za mikrotalasnu obnovu materijala koji se koristi u grejnoj tehnologiji i apsorpciju radara [Zhu et al., 2016].

U kompozitima ojačanim karbonskim vlaknima moguće je poboljšati mehaničke osobine kompozita, graftovanjem dendrimera poli(amidoamina) (PAMAM) na ugljeničnim vlaknima Michaelovim reakcijama i reakcijama amidacije. Promene u mikrostrukturi površine i hemijskom sastavu površine KV nastale ovakvim postupkom, povećaju hrapavost površine i uvode polarne grupe na površinu ugljeničnih vlakana, što povećava površinski efekat kvašenja vlakana. Izlomljena površina kompozitnih materijala ojačanih ovako izmenjenim KV pokazala je odlično poboljšanje adhezije između dva materijala, a sile interlaminarnog smicanja i međusobnog smicanja povećale su se od 55,49% na 110,94% [Gao et al., 2016]. Takođe, postojanje grafen-oksida povećava sadržaj reaktivnih funkcionalnih grupa na površini ugljeničnih vlakana i poboljšava sile vezivanja u kompozitu između karbonskih vlakana i smole [Zhang et al., 2015]. Brzo zagrevanje polimernih kompozita pojačanih ugljeničnim vlaknima dovodi do složenih termo-fizičkih interakcija koje ne samo da zavise od termičkih osobina sastojaka i mikrostrukture, već takođe zavise od toplotnog transporta između dodirne površine vlakna i smole. Modifikacije u mnogim parametrima, među kojima su i površinske funkcionalne grupe, mogu da moduliraju toplotnu sprovodljivost preko dodirne površine ovih kompozita [Varshney et al., 2015]. Računskim procesima za dizajniranje, testiranje i brzo identifikovanje održivih površinskih modifikacija, moguća je optimizacija odgovarajuće obrade ugljeničnih vlakana putem površinskog graftovanja molekula, u cilju poboljšanja interakcije vlakno-polimer u kompozitima ojačanim karbonskim vlaknima [Demir et al., 2017].

Metodom lake oksidacije u vodenom rastvoru azotne kiseline (HNO<sub>3</sub>) moguće je dobiti niz hemijski modifikovanih mezoporoznih karbonskih materijala sa promenjenim



elektrohemijskim karakteristikama. Nakon oksidacije očuvane su određene mezoporne strukture, a kako vreme oksidacije protiče, specifične pore na površini prvo se povećavaju a zatim smanjuju, dok nastale funkcionalne grupe proizvode pseudo-kapacitativnost, što dovodi do povećanja specifičnog kapaciteta [Li et al., 2006]. Mezoporozni aktivni karboni koji sadrže kisele grupe, pripremljeni od pamuka i tretirani sa  $H_3PO_4$  kao aktivacionim sredstvom, metodom karbonizacije jednim korakom, imaju važnu ulogu u apsorpciji Pb i p-nitroanilina [Li et al., 2013]. Prevučeni porozni karboni, modifikovani sa  $H_3PO_4$ , imaju važnu ulogu u apsorpciji  $CO_2$ . Pri tome, kiseonikove i fosforne grupe kao kisele grupe presudne su u toj apsorpciji; među funkcionalnim grupama azota, pirolske grupe su pokazale najveći uticaj na apsorpciju  $CO_2$ , dok je pozitivan efekat piridinskih i kvaternernih grupa bio manji [Sánchez-Sánchez et al., 2014]. Povećanje baznosti površine aktiviranog ugljenika ima bitnog uticaja na apsorpciju perfluorooktan-sulfonskih (PFOS) i karboksilnih kiselina (PFOA) [Zhi et al., 2016].

Jedan od najnovijih načina promene površine karbonskih vlakana je njihovo prekrivanje nanodijamantom. Nanodijamanti su odskoro privukli veliku pažnju zbog izuzetne tvrdoće u kombinaciji sa odličnom otpornošću na habanje. Nanodijamanti funkcionalizovani hidroksilnim i amino grupama putem hemijske modifikacije uspešno su uvedeni u funkcionalizovanu površinu ugljeničnih vlakana pomoću kovalentnih veza [Zhao et al., 2015].

U ovoj doktorskoj disertaciji upotrebljena su dobro okarakterisana komercijalna visokočvrsta KV marke *Torayca* (T300B, 6000-50B, No 2610622), debljine 4-6  $\mu m$ . Ova vlakna funkcionalizovana su tretiranjem  $HNO_3$  i  $KOH$ , što je značajno izmenilo sadržaj površinskih grupa: „kisel“ vlakna imala su na svojoj površini 0,5135 mmol/g kiselih grupa, a baznih 0,3040 mmol/g; „bazna“ vlakna imala su na svojoj površini 0,1011 mmol/g kiselih grupa, a baznih 0,3843 mmol/g. Odnos kiselih prema baznim površinskim grupama je kod kiselih vlakana bio 1,7, a kod baznih 0,3, dok je tačka nultog naelektrisanja za ove dve grupe funkcionalizovanih vlakana bila 5,3 i 8,5. Biokompatibilnost tako funkcionalizovanih karbonskih vlakana ispitivana je na eksperimentalnim životinjama (kunići, varijetet činčila), a procenjivana je *in vitro*, na ćelijskim kulturama (fibroblastvoj i makrofagnoj), *in vivo* aplikacijom vlakana u potkožno tkivo i *m. latissimus dorsi* i primenom nuklearne magnetne rezonance. Diskusija rezultata u okviru svakog od ovih istraživanja biće izneta navedenim redosledom.

Na početku da se osvrnemo da podatke koji u literaturi postoje o ispitivanju biokompatibilnosti funkcionalizovanih karbonskih vlakana sa kiselim odnosno baznim

površinskim grupama. Takvi podaci su veoma oskudni. Svakako da je funkcionalizacija vlakana promenom njihovih baznih i kiselih površinskih grupa bila motivisana željom istraživača za popravkom njihove biokativnosti, s obzirom da je glatka površina KV nepovoljna za njihova svojstva privlačenje i interakcije sa ćelijama iz okruženja, uključujući fibroblaste, osteoblaste, hondroblaste, i, naročito, makrofage [Czajkowska and Blazewicz, 1997; Rostam et al., 2015]. Više podataka ima o tretiranju bazama ili kiselinama kompozita ojačanih KV, nego samih čistih KV. Danas su sve više u upotrebi kompoziti ojačani karbonskim vlaknima, kao što je CFR/PEEK, ali bioinertnost i slabe osteogene osobine CFR/PEEK-a ograničavaju njegovu kliničku primenu u ortopediji i implantologiji. Pokazano je da PEEK ojačan ugljeničnim vlaknima, ukoliko se hemijski tretira sa  $H_2SO_4$  ili  $CaCl_2$ , ima bolja biokativna svojstva od netretiranih materijala. Bioaktivnost je procenjena formiranjem *in vitro* apatita u simuliranoj telesnoj tečnosti (SBF). Čisti PEEK i kompozit ugljenik-PEEK imali su veću sposobnost da formiraju apatit u SBF, kada su tretirani sa  $H_2SO_4$  i  $CaCl_2$  u odnosu na netretirane materijale. Pretpostavlja se da se mnoge funkcionalne grupe nastale ovakvim tretmanom, kao što su sulfo- i karboksilne grupe, sposobne da indukuju nukleaciju apatita, inkorporiraju u dispergovanu ugljeničku fazu u kompozitima ugljenik-PEEK [Miyazaki et al., 2017]. Drugi način za popravku bioaktivnosti ovog kompozita je proizvodnja trojnog kompleksa sastavljenog od CFR/PEEK-nanohidroksiapatita (PEEK/n-HA/CF) sa umerenom površinskom hrapavošću. Rezultati su pokazali da su se hidrofilitnost i količina jona  $Ca^{++}$  na površini znatno poboljšani sa povećanjem površinske hrapavosti kompozita. U testovima na ćelijskim kulturama pokazano je da je brzina proliferacije i stepen osteogene diferencijacije ćelija takođe povezan sa hrapavošću površine. Kompozit sa umerenom površinskom hrapavošću značajno povećava vezivanje ćelija / proliferaciju ćelija i promoviše aktivnost alkalne fosfataze (ALP) i formiranje nodula kalcijuma u poređenju sa ostalim grupama. Što je još važnije, implantat PEEK/n-HA/CF sa odgovarajućom hrapavošću površine pokazuje izuzetno poboljšanu bioaktivnost i oseointegraciju *in vivo* u eksperimentu sa životinjama, pa ovakav trojni kompozit može biti adekvatan materijal za primenu u formi koštanog grafta [Deng et al., 2015].

Jedine studija čije rezultate možemo delimično da uporedimo sa rezultatima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji su studije Blazewitza i sar., koje su objedinile istraživanja sa nekoliko vodećih institucija u Poljskoj i Češkoj (*Faculty of Material and Environmental Science, ATH University of Bielsko-Biala, Biesko-Biala, Poland; Faculty of Material Science and Ceramics,*

AGH University of Science and Technology, Cracow, Poland; Collegium Medicum, Department of Citobiology, UJ Jagiellonian University Cracow, Poland; Academy of Science of the Czech Republic, Prague). Te studija prižile su nam podatke o biokompatibilnosti poroznih karbonskih vlakana u eksperimentima *in vivo* i *in vitro* [Rajzer et al., 2010] i funkcionalizovanih karbonskih vlakana postupkom oksidacije sa HNO<sub>3</sub> [Czajkowska et al., 1997; Zamorska et al., 1998; Blazevicz, 2001]. Porozna karbonska vlakna dobijena su upotrebom PAN-terpolimera, u dvostepenom procesu termalnog tretmana (na vazduhu na 150-280<sup>0</sup>C; potom u atmosferi čistog argona na 1000<sup>0</sup>C) i imala su dijаметar od 10 μm. Ukoliko se porozna karbonska vlakna implantiraju u skeletni mišić pacova, ona stimulišu rast vezivnog tkiva, koji se manifestuje formiranjem fibrozne kapsule oko implantata, koja perzistira do kraja eksperimentalnog praćenja životinja (7 meseci). Iako je primećena fragmentacija vlakana, dekompozicija materijala nije dovela do poremećaja procesa tkivne regeneracije. U uslovima *in vitro*, porozna karbonska vlakna su pružala dobru potporu za adheziju i rast osteoblasta i nisu izazivala citotoksičnost. Direktni kontakt vlakana sa skeletnim mišićnim ćelijama duž kontaktne površine implantata, kao i prisustvo regeneracije mišićnih vlakana, već nakon 7. dana od implantacije, ukazuju na ubrzan proces regeneracije skeletnih mišića u toku *in vivo* implantacije. Međutim, ukoliko se ova vlakna modifikuju sa HAP, stimuliše se stvaranje hidroksiapatita na površini vlakana u toku inkubacije u simuliranoj telesnoj tečnosti, vreme trajanja inflamacije je kraće, fibrozna kapsula oko implantata se redukuje i brže nastupa faza reparacije [Blazevicz, 2001]. Iako su u ovoj doktorskoj tezi aplikovana KV nešto drugačijih fizičko-mehaničkih karakteristika, rezultati dobijeni u vezi većeg tkivnog IrI 7. dana nakon intramuskularne aplikacije standardnih vlakana, kao i tok akutne faze zaceljenja tokom 30 dana trajanja eksperimenta, ukazuju na njihovu bioaktivnost, i u saglasnosti su sa iznetom studijom. U drugoj studiji, ispitan je uticaj stepena i rasporeda kristalita na površini karbonkih vlakana, kao i uticaj procesa njihove oksidacije u HNO<sub>3</sub>, na biokompatibilnost u potkožnom rtkivu kunića i mišićnom tkivu pacova. Bismovom metodom, kao i u našim istraživanjima, određivana je koncentracija kiselih i baznih površinskih grupa koja je iznosila 1,04x10<sup>-3</sup> mH<sup>+</sup>/g KV i 7,51x10<sup>-4</sup>OH<sup>-</sup>/g KV. Na žalost, rezultati istraživanja izneti u naučnoj studiji iznose detaljne podatke o biokompatibilnosti vlakana modifikovanih različitim temperaturnim tretmanom, u smislu dobijanja većih ili manjih kristalita i organizacije grafitne strukture, dok vrlo šturo i nejasno prikazuju rezultate biokompatibilnosti kiselih KB. Podaci se odnose samo na praćenje broja makrofaga i fibroblasta u tkivu koje okružuje implantat tokom

trajanja eksperimenta (210 dana), bez jasne naznake da li se radi o potkožnom ili mišićnom tkivu. U svakom slučaju, rezultati pokazuju da kisela KV regrutuju daleko veći broj makrofaga u peri-implantnoj zoni u odnosu na standardna, kao i da se njihov broj linearno povećava sve do 5. meseca nakon implantacije. Slični podaci dobijeni su i u pogledu broja fibroblasta. Treća studija ovih istraživača pokazala je brži i intenzivniji tkivni odgovor mišića na implantaciju kiselih KV, koji utiče na kasniju regeneraciju i reparaciju ovog tkiva [Zamorska et al., 1998]. Takođe, u uslovima *in vitro*, dokazano je da karbonska vlakna oksidisana uz pomoć HNO<sub>3</sub> imaju pojačanu fagocitnu sposobnost [Czajkowska and Blazewicz, 1997]. Što se tiče biokompatibilnosti baznih vlakana, o njima nema podataka u dostupnoj literaturi.

Rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da ne postoji značajna razlika u stepenu citotoksičnosti između modifikovanih („kiselih“ i „baznih“) i standardnih karbonskih vlakana, koja je u ovom eksperimentu prvo procenjivana na osnovu testa vijabilnosti ćelija (kalorimetrijskog MTT) i testa ćelijske adhezije (trodimenzionalna / 3D kultivacija ćelija u *Matrigelu*) na humanim fibroblastima kontinuirane ćelijske linije MRC-5.

Međutim, ova istraživanja dopunjena su testovima na kulturi humane makrofagne linije U937, u kojoj je procenjivana vijabilnost ćelija, internalizacija vlakana (fagocitoza) i produkcija proinflammatoryh citokina, IL-1 $\alpha$ , IL6, IL-8 i TNF- $\alpha$ . Ćelijska vijabilnost bila je nenarušena u kulturama humane makrofagne linije U937 ukoliko su se dodavala KV u koncentraciji od 125  $\mu$ g/ml, bilo da se radilo o standardnim KV, ili vlaknima tretiranim kiselinom ili bazom. Međutim, dodavanjem vlakana u koncentraciji od 250  $\mu$ g/ml ili 500  $\mu$ g/ml, dolazilo je do značajnog dozno-zavisnog linearnog smanjenja vijabilnosti ćelija kod sve tri primenjene grupe vlakana tokom vremena praćenja; pri tome najveće smanjenje vijabilnosti izazivaju bazna KV i to smanjenje je značajno veće od smanjenja vijabilnosti pod uticajem standardnih karbonskih vlakana. Što se tiče internalizacije vlakana, internalizacija vlakana dodatih u kulture humane makrofagne linije U937 u dozi od 250  $\mu$ g/ml, zavisila je od toga da li su primenjena standardna ili funkcionalizovana KV. Znatno veći broj makrofagnih ćelija fagocitovao je vlakna tretirana bazom, u odnosu na fagocitozu standardnih i kiselih KV. Postojala je povećana koncentracija proinflammatoryh citokina TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  u supernatantima kulture humanih makrofaga linije U937 nakon dodavanja standardnih ili kiselih KV u koncentraciji od 125  $\mu$ g/ml u odnosu na kontrolne vrednosti, dok je dodavanje baznih KV u istoj koncentraciji uslovalo smanjenu produkciju ovih citokina u odnosu na vrednosti za kisela i standardna KV. U istoj koncentraciji, standardna KV su uslovala značajno

smanjenja sekrecije IL-8, a kisela i bazna KV izrazito povećanje sekrecije IL-6 i IL-8 u odnosu na kontrolne vrednosti. Pri tome, vlakna tretirana kiselinom bila su snažniji stimulator sekrecije IL-8 iz makrofaga u odnosu na vlakna tretirana bazom, dok u odnosu na produkciju IL-6 nije bilo razlike u stepenu stimulacije sekrecije ovog citokina između kiselih i baznih KV. Standardna KV dodata u kulture humanih makrofaga ćelijske linije U937 u koncentraciji od 250  $\mu\text{g/ml}$  smanjivala su sekreciju IL-1 $\beta$  u odnosu na kontrolne vrednosti, a bazna povećavala. Međutim, produkcija IL-6 i IL-8 snažno je stimulirana pod uticajem standardnih KV, a višestruko inhibirana nakon dodavanja kiselih ili baznih KV u navedenoj koncentraciji. Standardna KV nisu dovela do promene u koncentraciji TNF- $\alpha$ , dok su kisela, a naročito bazna KV dovela do smanjenja koncentracije ovog citokina; pri tome, smanjenje koncentracije TNF- $\alpha$  u prisustvu baznih KV desetostruko je bilo manje u poređenju sa kontrolnim vrednostima.

U literaturi ima vrlo malo podataka o uticaju karbonskih vlakana ili hemijski modifikovane površine karbonskih vlakana na vijabilnost i funkciju makrofaga [Mendes et al., 1985; Peluso et al., 1991a, 1991b, Czajkowska and Blazewicz, 1997]. Već je napred istaknuto da karbonska vlakna oksidizirana sa HNO<sub>3</sub> pojačavaju fagocitozu makrofaga u uslovima *in vitro* [Czajkowska and Blazewicz, 1997], dok u uslovima *in vivo* stimulišu njihovu aktivnost prilikom peritonealne aplikacije eksperimentalnim životinjama [Peluso et al., 1991a, 1991b], kao i u mekim tkivima prilikom implantacije kod ljudi radi zamene ligamenata i tetiva [Mendes et al., 1985]. Značaj ponašanja različitih populacija antigen-prezentujućih ćelija, i mogućnost kontrole njihove polarizacije, privlači danas veliku pažnju istraživača u oblasti biomaterijala. Međutim, zahvaljujući širokoj lepezi različitih materijala koji su u upotrebi, kao i uslovima pod kojima su implantirani ili ispitivani u uslovima *in vitro*, nema jasnih stavova o ovom pitanju, a nedovoljno poznavanje mehanizama dejstva materijala na funkciju makrofaga i modulaciju funkcije, ostaje atraktivno polje za dalja istraživanja [Rostam et al., 2015]. Značaj površinskih hemijskih grupa na fenotip makrofaga i njihovu funkciju ispitivan je od strane različitih istraživača, ali nema ni jednog novijeg podatka, osim navedenih, koji se odnose na karbonska vlakna ili karbonske kompozite [Rostam et al., 2015]. Analogija može da se nađe sa istraživanjem koje govori o uticaju jetkovanja titanijuma kiselinom [Alfarsi et al., 2014]. Pokazano je da mikrohrapavost površine (SMO), jetkovanje kiselinom (SLA) ili hidrofilna modifikacija površine titanijuma koja je jetkovana kiselinom (modSLA), različito regulišu funkciju makrofaga. Na primer mikrohrapavost i jetkovanje kiselinom dovode do povećane

ekspresije 16 proinflammatoryh gena, dok modSLA izaziva smanjenu ekspresiju 10 gena (TNF, IL-1 $\alpha$  i  $\beta$ , CCL1, CCL3, CCL19 i CCL20, CXCL1 i CXCL8, i IL-1R1). To znači da hidrofilna površina titanijuma modulira njegov proinflammatory odgovor. Zahvaljujući velikom broju različitih metoda za dobijanje makrofaga i različitim postupcima za procenu njihovog funkcionalnog fenotipa, ne iznenađuje činjenica da neka istraživanja pokazuju da hemijska modifikacija površine materijala nema uticaja na polarizaciju makrofaga [Jenney *et al.*, 1998; Cejudo-Guille *et al.*, 2012].

Zbog strogog učešća makrofaga u modulaciji inflamacije, pa samom tim i značaja koji ima u određivanju tkivnog iritacionog indeksa, tj. promena koje se u tkivu dešavaju u toku njegove dinamičke interakcije sa implantiranim materijalom, na ovom mestu, pre diskusije rezultata *in vitro* testova, napravićemo osvrt i na rezultate procene tkivnog IrI i fragmentacije vlakana u uslovima *in vitro*. Najveći odgovor tkiva procenjen preko vrednosti IrI *pri subkutanoj aplikaciji* KV, postojao je 21. dana nakon implantacije standardnih i kiselih KV, a 21. i 28. u slučaju implantacije baznih KV, u odnosu na ostale termine merenja. Pri tome, IrI potkožnog tkiva kod subkutane aplikacije kiselih KV bio je značajno veći 21. dana nakon implantacije u poređenju sa istim indeksom kod subkutane aplikacije baznih KV. Kod *intramuskularne aplikacije* kiselih KV, vrednosti IrI bile su značajno veće 7. dana od implantacije u odnosu na ostale termine merenja. Postojao je znatno veći tkivni IrI kod intramuskularno aplikovanih kiselih KV u odnosu standardna KV 7, 21. i 28. postoperativnog dana, a značajna razlika u veličini ovog indeksa registrovana je između kiselih i baznih KV u 7. postoperativnom danu, u korist kiselih vlakana. Poređenjem *subkutane i intramuskularne aplikacije* KV, izvodi se zaključak da je 7. dana nakon implantacije IrI značajno veći prilikom intramuskularne aplikacije *standardnih, kiselih i baznih vlakna* u poređenju sa subkutanom aplikacijom istih tipova vlakana, dok je 21. danu IrI značajno veći kod subkutane aplikacije u odnosu na intramuskularnu. Što se tiče fragmentacije vlakana, najviše su bila fragmentisana intramuskularno aplikovana kiselina i standardna KV, a najmanje subkutano aplikovana standardna KV. Intramuskularna aplikacija uslovlila je kidanje vlakana na manje fragmente u odnosu na potkožnu aplikaciju KV. Subkutano, najviše su bila fragmentisana bazna KV i razlika je bila značajna u odnosu na standardna i kiselina KV, dok su intramuskularno najviše bila fragmentisana kiselina KV, a ta fragmentacija bila je veća u odnosu na fragmentaciju baznih KV aplikovanih na istio način.

Poznato je da se testovi biokompatibilnosti realizuju u *in vitro* i *in vivo* uslovima. Savremeni aspekt ispitivanja biokompatibilnosti materijala podrazumijeva tri, tj. četiri nivoa istraživanja. Prva nivo se odnosi na testiranje materijala u laboratorijskim uslovima na kulturama ćelija, tkiva ili organa. Ovaj nivo podrazumijeva ispitivanje inicijalne citotoksičnosti i ispitivanje krajnjih efekata citotoksičnosti. Sledeći nivo predstavljaju eksperimenti na životinjama, s ciljem da se simuliraju uslovi u organizmu čoveka. Posljednji nivo su različiti testovi primene materijala u kliničkim uslovima, na ograničenom broju pacijenata [Čolić *et al.*, 2007; Helmus *et al.*, 2008; Janus and Rybak, 2013; Ananth *et al.*, 2015]. Testovi biokompatibilnosti *in vitro* obavljaju se izvan živog organizma sa ciljem da simuliraju biološku reakciju tkiva koje dolazi u kontakt s ispitivanim materijalom. Inicijalno sagledavanje biokompatibilnosti materijala najčešće se obavlja kroz ispitivanje citotoksičnosti. Biološki sistemi mogu biti: kulture tkiva i organa, ćelijske kulture i organele. Za ispitivanja citotoksičnosti biomaterijala *in vitro* obično se koriste jednoslojne kulture ćelija i trodimenzionalni (3D) modeli, najčešće dobijeni tkivnim inženjerstvom. Odabir ćelija (permanentne i primarne ćelijske linije) zavisi od biološkog cilja predviđenog u testu citotoksičnosti. Permanentne (kontinuirane, imortalne) ćelijske linije su jasno morfološki i funkcionalno definirane, relativno se lako kultivisu i komercijalno su dostupne. Njihova upotreba omogućava dobru korelaciju rezultata različitih laboratorija. Sa druge strane, one su jednostavniji replikacioni sistemi, bez specifičnog metaboličkog potencijala normalno prisutnog u organizmu. U cilju ispitivanja potencijalne toksičnosti biomaterijala najčešće se koriste fibroblastne linije, što je bio slučaj i u ispitivanjima obuhvaćenim ovom doktorskom disertacijom. Za razliku od toga, primarne ćelijske linije ustanovljene su u samoj laboratoriji i dobijaju se biopsijom tkiva ili iz periferne krvi. Njima se postiže bolja simulacija situacije u uslovima *in vivo* jer poseduju sve osobine tkiva iz koga su uzete. Odabir primarnih ćelijskih linija zavisi od vrste ispitivanog materijala, kao od vrste tkiva s kojim je ispitivani materijal u neposrednom kontaktu. Dostupne su samo u specijalizovanim laboratorijama, te se koriste za specifična istraživanja. Takva primarna nativna ćelijska linija, linija humanih makrofaga U937 korišćena je u ovom istraživanju.

Kontakt između ćelijske kulture i ispitivanog materijala ostvaruje se direktnim i indirektnim putem i postredstvom ekstrakata. U slučaju direktnog kontakta, citotoksičnost se meri stopom ćelijske smrti u funkciji vremena ekspozicije i udaljenosti od uzorka koji je u čvrstom agregatnom stanju. Biološka reakcija ćelija može da se opiše morfološki ili kvantitativnom

analizom. Za jednostavnija istraživanja potencijalne toksičnosti biomaterijala koriste se metode koje se baziraju na oštećenju ćelijske membrane i ispitivanju stepena ćelijske vijabilnosti i proliferacije [agar i filter-difuzioni test, almar-plavo, tripan-plavo, neutralno-crveno, LDH (laktat-dehidrogenaza) i MTT (3 (4,5 dimetil 2 thiazolyl) 2,5 diphenyl 2H tetrazolium bromid / methyl thiazolyl tetrazolium; MTT testa, propidijum-jodid testa, testova inkorporacije radioizotopa, poput 3H-timidin i bromdeoksiuridin (BrdU) i dr. ]. U cilju istraživanja mehanizma toksične aktivnosti ispitivanog materijala potrebna je specifičnija metoda istraživanja, pa se koriste komplikovaniji testovi na temelju ćelijskih funkcija (merenje količine proteina zapaljenja i proteina indikatora ćelijskog stresa (HSPs), testa determinacije glutaciona, određivanje tipa ćelijske smrti, fagocitoze i dr.). Prednost *in vitro* testova je mogućnost ponavljanja pod identičnim uslovima, stroga kontrola po svakom ispitivanom parametru, laka izvodljivost i eklonomičnost. S druge strane, u *in vitro* uslovima, za razliku od uslova *in vivo*, nedostaju odbrambene reakcije tkiva na prisustvo ispitivanog biomaterijala, pa prilikom tumačenja rezultata ta činjenica se mora uvažiti. Naizad, rezultati testova *in vitro*, s obzirom da se prvenstveno odnose na toksični efekat, interpretiraju se obično unutar serija blisko povezanih materijala (relativna analiza toksičnosti) [Čolić *et al.*, 2007; Helmus *et al.*, 2008; Ananth *et al.*, 2015].

Rezultati izneti u ovoj doktorskoj disertaciji u vezi citotoksičnosti i adhezivnosti KV na ćelije u kulturi fibroblasta u skladu su sa rezultatima drugih autora koji su pokazali da karbonska vlakna ne izazivaju citotoksični efekat na fibroblaste, tendocite i osteoblaste, kao i da je adhezivnost ćelija na vlakna adekvatna [Morison *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1997a,1997b; Rajzer *et al.*, 2010]. To znači da karbonska vlakna ne oštećuju fibroblaste direktno, što ima veliki značaj u odgovoru fibroblasta u toku procesa regeneracije i reparacije mekih tkiva na uneti implantat.

Nakon implantacije, implantirani material organizam dozivljava kao strani i dolazi do pojave akutne inflamatorne reakcije posredovane makrofazima –faza inflamacije, koju smenjuje faza zaceljenja u kojoj dolazi do povlačenja inflamacije, proliferacije somatskih ćelija i tkivnog remodelovanja, što rezultira ponovnim uspostavljanjem tkivne homeostaze.

Makrofazi imaju ključnu ulogu u kaskadi imunoloških odgovora na implantirani material. Tkivni makrofazi su među prvim ćelijama koje reaguju na ma koje tkivno oštećenje i unošenje u tkivo stranog materijala, uključujući i implantat. To su ćelije koje su evoluciono programirane da pokreću i kontrolišu inflamaciju i utiču na njeno povlačenje, modulirajući kako sopstveni fenotip, tako i fenotip susednih ćelija. Oni nastaju od monocita i pokazuju visok nivo funkcionalne i



fenotipske plastičnosti. Međutim, s obzirom da sadrže i bogat arsenal molekula usmerenih protiv mikroorganizama i stranih tela, makrofazi predstavljaju istovremeno i rizik za kolateralno oštećenje susednih tkiva [Morais et al., 2010; Kzhyshkowska et al., 2015].

Jedan od stalnih problema koji postoji oko nekih implantata, uključujući metalne i polimerne implantate, nanotube od karbona i dr. je nesposobnost makrofaga da otklone inflamaciju i njihova tendencija da ostanu u stanju tzv. *frustrirane fagocitoze* [Balać et al., 2010; van Berlo et al., 2012; Kzhyshkowska et al., 2015]. U toku inicijalne faze inflamacije, *proinflamatorni makrofazi* indukuju akutnu reakciju na traumu i strani material, dok *tolerogeni anti-inflamatorni makrofazi* kontrolišu povlačenje inflamacije i indukuju sledeću fazu – zaceljenje. Međutim, implantirani materijali mogu da indukuju mešoviti pro- i anti-inflamatorni fenotip i da na taj način potpomažu održavanje hronične inflamacije praćene infekcijom mikroorganizmima i neuspehom implantacije. Da bi se smanjila reakcija na implantat i poboljšala interakcija implantata sa tkivom, proizvedeno je više vrsta materijala na bazi prirodnih polimera koji otpuštaju anti-inflamatorne supstance/ bioaktivne molekule i služe za oblaganje implantata. Međutim, do danas nije uspeo da se pronade ni definitivni ni dugotrajni način da se spreči nepoželjni imunološki odgovor na implantirani materijal. Zato je jedan od načina da se spreči infekcija ili hronična inflamacija povezana sa ugradnjom implantata i na taj način poboljša prihvatanje implantata, mogućnost manipulacije sa fenotipom makrofaga. Stoga imunomodulatorne osobine sada dostupnih materijala za oblaganje implantata moraju biti u budućnosti u službi personalizovane medicine (personalizovane implantne terapije). Humani primarni makrofazi izloženi implantiranom materijalu *ex vivo* mogu da se upotrebe da spreče individualnu reakciju i omoguće selekciju optimalnog materijala za oblaganje implantata. Pored navedenih postupaka, smatra se da lokalno otpuštanje angiogenetskih faktora sa prevlake implantata može da pojača njihovu integraciju sa tkivom. [Kzhyshkowska et al., 2015].

Aktivacija i polarizacija makrofaga su ključni događaj u toku imunološke reakcije na implantirani materijal. Makrofazi, pod stimulatornim uticajem citokina, mogu da se polarizuju u dva različita stanja aktivacije – M1 (klasično) i M2 (alternativno). M1-stanje je prototip za makrofage stimulisane sa  $INF\gamma$ , a M2-stanje za makrofage stimulisane sa IL-4. Neki autori su usvojili dalju podelu M2 makrofaga u tri podgrupe: 1) M2a, u koju spadaju makrofazi indukovani sa IL-4 i IL-13; 2) M2b, u koju spadaju makrofazi indukovani sa  $INF\gamma$  koji vezuju FcR i 3) M2c, u koju spadaju makrofazi deaktivirani pomoću IL-10, TGF- $\beta$  ili pomoću glikokortikoida.

Međutim, M1 i M2-fenotip nije terminalno stanje diferencijacije makrofaga već je više reverzibilno funkcionalno stanje koje odražava sposobnost ovih ćelija da brzo odgovore na štetni spoljašnji uticaj ili promenu u mikrookruženju. Analiza kompleksnosti genske ekspresije i očigledna velika plastičnost, definitivno su doprinele da se danas smatra da su M1- i M2-prototip makrofaga samo *polarizovana stanja aktivacije* ovih ćelija u okviru čitavog spektra mogućih aktivacija. Ukoliko se prihvati takav model, svaki stimulus može potencijalno da indukuje u makrofazima karakterističan transkripcionalni program, koji se delimično preklapa sa takvim programom indukovanim od strane sličnog faktora. Zato se danas u literaturi sve više koriste termini *M1-slični* i *M2-slični* fenotip, kako bi se označili dominantni pro- ili anti-inflamatorni fenotipovi [Kzhyshkowska et al., 2015].

Generalno, M1-prototip makrofaga karakteriše se aktivacijom STAT1 i NF- $\kappa$ B transkripcionih faktora i povećanom produkcijom pro-inflamatornih citokina IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-12. Ovi citokini su sposobni da indukuju brzi inflamatorni i citotoksični odgovor, koji se karakteriše aktivacijom NK-ćelija i CD8<sup>+</sup> citotoksičnih T-limfocita, uz regrutovanje neutrofila. Povećana produkcija ROS i NO iz M1-makrofaga doprinosi povećanju njihovih antimikrobnih sposobnosti. Za razliku od toga, prototip M2-makrofaga se karakterise aktivacijom transkripcionog faktora STAT6, povećanom ekspresijom receptora endocitoze (kao što su stabilin-I manozni receptor) i povećanom produkcijom anti-inflamatornih faktora, kao što su IL-10 i IL-1Ra. M2-makrofazi uključeni su u povlačenje inflamacije, zarastanje rane, ali i u patogenezu alergije i kancera. Iako se smatra da je M2-fenotip predominantan za funkciju implantata, neki faktori oslobođeni iz M2-makrofaga, kao što su CCL18 (CC hemokinski ligand 18), mogu da održe hroničnu inflamaciju i odlože zaceljenje [Kzhyshkowska et al., 2015].

Citokini oslobođeni iz makrofaga, ključni su faktori hronične inflamacije. Hronična inflamacija se uopšteno definiše kao inflamatorni proces koji traje i koji je rezultat nemogućnosti povlačenja akutne inflamacije, ili je pak rezultat neadekvatnog odgovora na delovanje štetnog faktora. Glavne ćelije na mestu hronične inflamacije su makrofazi nastali od monocita i limfociti. Inflamacija u ovom slučaju rezultat je neadekvatnog balansa između pro- i anti-inflamatornih citokina.

Citokini se grubo klasifikuju na osnovu funkcije na pro- (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 itd.) i anti-inflamatorne (IL-1Ra, IL-10 i TGF- $\beta$ ). Makrofazi, zavisno od faktora indukcije, mogu da sekretuju obe grupe citokina. Osim toga, makrofazi sekretuju veliki broj različitih hemokina koji

na mesto inflamacije privlače druge imunološke ćelije – CCXCL1 [*chemokine (C-X-C motif) ligand 1*], CXCL2, CXCL5, IL-8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, ili podstiču fibrozu – CCL2 (*chemokine C-C motif*), CCL2, CCL3, CCL4, CCL11, CCL20, CCL22. Centralna uloga u nastanku inflamatorne zone pripada citokinima TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6. Ovi citokini se uglavnom sekretuju u akutnoj fazi inflamacije i igraju ulogu u odgovoru na patogene, regrutovanju neutrofila i diferencijaciji i aktivaciji B- i T-limfocita. Međutim, brojne studije takođe ukazuju i na njihovu ulogu u hroničnoj inflamaciji, kao što je inflamatorna bolest creva, reumatoidni artritis, psorijaza, atopični dermatitis, hronična obstruktivna oboljenja pluća, Alchajmerova bolest, sistemski lupus eritematosus i karcinom. Nasuprot ovim citokinima, CCL18, koji je naj snažnije ushodno regulisan sa IL-4, može biti uključen u nastanak hronične inflamacije i fibroze. I brojni drugi citokini iz makrofaga mogu biti uključeni u hroničnu inflamaciju; npr. IL-1 $\alpha$ , IL-8, IL-18 i IL-32 povezani su sa reumatoidnim artritismom i atopičnim dermatitisom; IL-3, IL-7 i IL-10 sa alergijskim bolestima i kancerom; IL-7, IL-8, IL-18, IL-19, IL-20 i IL-24 sa psorijazom, IL-1 $\alpha$  i IL-6 sa inflamacijom u toku ortodontskog pomeranja zuba i sl. [Kzhyshkowska et al., 2015; Vujacic et al., 2017].

Fibroza je česta posledica hronične inflamacije i nastaje kao rezultat izostanka procesa zarastanja rane. Neka istraživanja ukazuju da M2-makrofazi (stimulisani putem IL-4 ili IL-13), imaju ključnu ulogu u reparaciji rane. Oni sekretuju TGF- $\beta$ , PDGF, MMPs, CCL7 i CCL8 koji stimulisu proliferaciju, migraciju i aktivaciju i povećavaju sintezu kolagena u miofibroblastima, pa tako podstiču fibrozu [Kzhyshkowska et al., 2015].

U zavusnosti od stimulusa, kao što se iz dosadašnjeg izlaganja može zaključiti, nesumljivo je da makrofazi mogu da razviju različit fenotip sa različitim profilom sekrecije citokina. Međutim, ove različite populacije makrofaga dobijene su *in vitro*, dok je u *in vivo* uslovima prisutna mešovita populacija makrofaga, posto su različiti stimulusi prisutni istovremeno na mestu inflamacije. Pored toga, studije su uglavnom sprovedene na mišjem modelu i rezultati nisu uvek analogni niti se mogu ekstrapolirati na humane makrofage. Stoga, specifični profili inflamatornih medijatora, oslobođenih u odgovoru na implantirane materijale i materijale kojima su implantati obloženi, zahtevaju definisanje individualnog odgovora pacijenta i moguće terapeutsko poboljšanje kompatibilnosti implantata.

Inflamatorne komplikacije izazvane implantatom često dovode do neuspeha implantacije. Pored uobičajenih pre- i postoperativnih komplikacija koje oprate sam hirurški zahvat prilikom

implantacije, često dolazi i do inflamatornih komplikacija izazvanih samim implantatom. To dovodi do dodatnih troškova lečenja, dodatne hirurške intervencije i pogoršanja kvaliteta života obolelog. Totalna proteza kolena ili kuka je danas među najčešćim implantacijama u medicini, i u SAD se izvrši više od million hirurških intervencija u cilju ovakvih implantacija. Neki od ovih pacijenata moraju da se podvrgnu ponovnoj operaciji zbog aseptičkog gubitka kosti povezanog sa periartikularnom osteopenijom, fokalnom osteolizom i infekcijom. U središtu svih navedenih komplikacija je inflamacija. Ona obično počinje s akumulacijom mikroskopskih partikula materijala nastalih frikcijom zglobnih površina, u zoni između implantata i tkiva. Ovo dovodi do celularnog odgovora, putem fagocitoze ili direktnom interakcijom sa površinom ćelija. Ćelije domaćina, primarno rezidentni makrofazi i fibroblasti, nakon prepoznavanja otpadnih čestica implantiranog materijala počinju da proizvode širok spektar različitih citokina i faktora rasta kao što su  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-8$ ,  $IL-11$ ,  $IL-15$ ,  $TGF-\alpha$ , GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, faktor stimulacije kolonija makrofaga), PDGF (*Platelet-derived growth factor*, trombocitni faktor rasta) i EGF (*Epidermal growth factor*, epidermalni faktor rasta). Ovi inflamatorni faktori sposobni su da indukuju stvaranje osteoklasta preko puta RANKL/RANK/osteoprotegerin, koji stimulišu osteolizu i privlačenje inflamatornih makrofaga i limfocita; ove ćelije proizvode dodatne pro-inflamatorne i pro-osteoklastogene faktore pa pojačavaju započetu inflamatornu reakciju. Sa druge strane, otpadne čestice inhibiraju diferencijaciju mezenhimalnih matičnih ćelija u osteoblaste i indukuju apoptozu. Dalje, osteoblasti počinju da sekretuju pro-inflamatorne citokine i hemokine koji regrutuju inflamatorne makrofage i limfocite i sekretuju osteoklastogene faktore pa indukuju osteolizu. Osim toga, brojni molekuli oksidativnog stresa kao što su visokomobilna grupa proteina B1, COX-2 (ciklooksigenaza-2), iNOS (inducibilna azot-oksida sintaza), 4-hidroksinonenal i nitrotirozin, nađeni su u povećanoj koncentraciji oko periprotetskog tkiva povezanog sa osteolizom, što ukazuje na ulogu ROS u osteolizi indukovanoj otpadnim partikulama. Kao odgovor na čestice nastale raspadanjem materijala, fibroblasti povećano ekspimiraju CCL2,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-8$ , MMP1 (matriksna metaloproteinaza 1), COX-1 (ciklooksigenaza 1), COX-2, LIF (*Leukemia inhibitory factor*),  $TGF-\beta 1$  i  $TGF-\beta R1$ , koji podstiču stvaranje osteoklasta iz matičnih ćelija koštane srži [Koreny et al., 2006].

Na ovom mestu, ponovo treba istaći da je u ovoj doktorskoj disertaciji uočeno fragementisanje svih primenjenih KV i da je ono bilo jače u mišićnom tkivu u odnosu na potkožno

tkivo, kao i da su u mišićnom tkivu bila najjače fragmentisana kisela KV, a u potkožnom bazna KV. Ove morfiometrijske rezultate ne možemo da uporedimo sa rezultatima drugih autora, s obzirom da fragmentacija vlakana nije proučavana na morfometrijskom planu, međutim, o samoj fragmentaciji vlakana u literaturi postoje kontradiktorni podaci. Naime, neki autori smatraju da je fragmentacija KV koja se uočava na histološkim preparatima parafinskih uzoraka tkiva sa implantiranim vlaknima posledica artefakta nastalog prilikom sečenja tkiva, s obzirom da KV imaju svojstveni elasticitet, pa se pomeraju prilikom sečenja [Mendes et al., 1985]. Međutim, pokazano je i da određeni broj KV može da se fragmentiše u *in vivo* uslovima, što se uočava u vidu karbonskih debrisa koje fagocituju makrofazi i granulociti [Mendes et al., 1985; Blazewicz, 2001; Rajzer et al., 2010; Paulus et al., 2016].

Iako su makrofazi glavne ćelije koje posreduju u odgovoru na čestice debrisa, u ovaj odgovor uključene su i neke druge ćelije, kao što su osteoklasti i fibroblasti. Osteoklasti su višejedrne ćelije monocitno-makrofagne linije uključene u resorpciju i osteolizu kosti. Kod pacijenata sa osteolizom, povećan nivo CCL2 i CCL4 u peri-implantnom tkivu oko proteze, može da poveća regrutovanje osteoklasta. Partikule debrisa mogu da inhibišu anti-osteoklastogene signale preko IL-6 i IFN- $\gamma$ , i kao što je već ranije istaknuto, preko proinflammatoryh citokina, koji mogu da aktiviraju osteoklaste preko puta ćelijske signalizacije RANKL/ RANK/ OPG. Znači, partikule debrisa implantiranog materijala podstiču osteolizu preko regrutovanja i aktivacije osteoklasta i putem inhibicije anti-osteoklastogenih signala. Dodatno, fibroblasti su takođe uključeni u osteolizu, jer i oni podstiču osteoklastogenezu. Kao odgovor na partikule debrisa, u fibroblastima se povećava ekspresija CCL2, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, MMP1, COX-1, COX-2, LIF, TGF- $\beta$ 1 i TGF- $\beta$ R1, koji indukuju stvaranje osteoklasta u koštanoj srži. Osteoblasti su takođe uključeni u stvaranje imunološkog odgovora na implantat. U fiziološkim uslovima postoji balans između izgradnje i razgradnje kosti, u kojoj osteoblasti izgrađuju a osteoklasti razgrađuju kost. Međutim, u inflamaciji je ova ravnoteža poremećena. Pod stimulativnim uticajem čestica debrisa, sposobnost osteoblasta da osekretuju steoid je narušena, a sinteza kolagena I smanjena. Osim toga, partikule debrisa indukuju stvaranje IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , CCL2 i MMP1 u osteoblastima, pored osteoklastogenetskih faktora, RANKL i M-CSF (*Monocyte colony stimulating factor*) [Kzhyshkowska et al., 2015].

Limfociti takođe imaju udela u nastajanju imunološke reakcije na čestice debrisa. U peri-implantnom tkivu dominantna ćelijska populacija T-limfocita su Th1-ćelije. Sugerisano je da

limfociti kooperišu sa makrofazima preko interakcije IL-15, IL-15Ra i IL-2Rb i da učestvuju u poznoj hipersenzitivnoj reakciji tipa IV. Nakon aktivacije, oni oslobađaju IL-3, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , limfotoksin-a i faktor inhibicije makrofaga (MIF) u cilju privlačenja i aktivacije makrofaga, koji sa svoje strane sada sekretuju IL-2 i aktiviraju više Th-ćelija. Opisani mehanizam je najverovatnije imunološki mehanizam koji razvijaju pacijenti hipersenzitivni na metalne jone [Kzhyshkowska et al., 2015].

Svaki implantirani materijal sposoban je da izazove *fibroblastnu reakciju* koja je primarno posredovana makrofazima. Jačina reakcije zavisi ne samo od prirode implantiranog materijala, njegove strukture i topografije površine, nego i od individualne reakcije recipijenta. Uopšteno, klasični niz imunoloških zbivanja nakon implantacije podrazumeva apsorpciju proteina na površini implantata, regrutovanje makrofaga i njihovu adheziju za površinu materijala i oslobađanje hemokina, koji dodatno regrutuju nove makrofage i druge imunološke ćelije i indukuju akutnu inflamaciju. Neuspešno povlačenje akutne inflamacije rezultira u hroničnoj inflamaciji, koja je praćena *fuzijom makrofaga, formiranjem gigantskih ćelija tipa oko stranog tela i fibroznom inkapsulacijom implantiranog materijala*. Jačina te reakcije, fenotip i profil citokina koje sekretuju makrofagi u okolini implantata, određuju sudbinu implantata (uspešna : neuspešna implantacija). Infekcija uzrokovana implantacijom snažno pojačava inflamatorni odgovor i dovodi do odbacivanja implantata. Izražena fibroza, koja se manifestuje formiranjem debele fibrozne kapsule oko implantata, kompromituje njegovu funkciju. Stoga kontrola inflamatornog odgovora putem prevencije infekcije i mogućnost manipulacije sa fenotipom makrofaga mogu da poboljšaju prihvatanje implantata. U daljem tekstu diskusija će biti fokusirano na fenotip makrofaga koji se indukuje u njihovoj interakciji sa odeđenim materijalom.

Priroda implantiranog materijala igra ključnu ulogu u jačini i tipu makrofagne reakcije. Na primer, u jednoj studiji *in vitro*, vršena je komparacija 4 različita biomaterijala na ekspresiju fenotipa humanih makrofaga - Permacol™, Parietex™-kompozit, multifilamentni polietilen-tereftalat (PET) i multifilamentni polipropilen. Rezultati su pokazali da Parietex-kompozit i multifilamentni PET indukuju jači pro-iflmatorni odgovor, koji je detektovan preko produkcije TNF-a, MCP-3 (CCL7), IL-1b, IL-6 i MIP-1a (CCL3), i veći indeks pro-/anti-inflamatorni citokini (M1/M2 index) [Grotenhuis et al., 2013]. Osim toga, inflamatorno okruženje koje simulira bakterijsku infekciju, povećava produkciju pro-inflamatornih citokina ukoliko se makrofazi kultivisu sa PET. Suprotno, makrofazi kultivisani sa polipropilenom odgovaraju na

ovaj materijal povećanom produkcijom CCL18 i pokazuju mali M1/M2 indeks [Grotenhuis et al., 2013; 2014]. Ove studije pokazuju da je izbor biomaterijala za implantaciju presudan ukoliko se očekuje prateća infekcija.

Usvojen je generalni stav da titanijum i legure titanijuma imaju visoku biokompatibilnost kao materijali za implantaciju i da nanošenje sloja TiO<sub>2</sub> na površinu implantata povećava njegovu biokompatibilnost. Tako na primer, ako se silikon obloži TiO<sub>2</sub>, dolazi do inhibicije reaktivnih kiseoničnih radikala i sinteze i sekrecije IL-6 u mišjim makrofazima. Međutim, ni titanijumski implantati nisu upotpunosti pošteđeni od inflamatorne reakcije, pa se registruje reakcija odbacivanja čak i na ovaj materijal. Jedna od komplikacija je rezultat nemogućnosti makrofaga da fagocituju partikule debris; to rezultira u aktivaciji pro-inflamatorne reakcije u humanim makrofazima [oslobađanje TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MIP-1a [*Macrophage inflammatory protein 1-alpha*], MCP-1 (CCL2)]. Profil citokinskog odgovora, kao i njihova koncentracija veoma variraju između ispitanika, što upućuje na individualizovani / personalizovani pristup u terapiji. Stoga modulacija fenotipom makrofaga u cilju favorizovanja fenotipa sličnog M2-fenotipu može da bude jedna od terapijskih mogućnosti [Yagil-Kalmer et al., 2004]. Tako je pokazano da se umereni pro-inflamatorni odgovor na partikule titanijuma pojačava ukoliko se sa IFN- $\gamma$  indukuju prediferencirani M1-humani makrofazi, uključujući i povećanu produkciju TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CCL3, CCL4, GM-CSF i and G-CSF, a suprimira ukoliko se sa IL-4 indukuje M2-fenotip [Pajarinen et al., 2013]. Može da se zaključi da stvaranje na površini implanta M1-polarizovanih makrofaga u toku stvaranja bakterijskog biofilma može da pojača reakciju odbacivanja titanijumskog implantata, dok M2-polarizacija može da oslabi ili spreči ovakvu reakciju.

I pored brojnih dokaza da implantirani biomaterijali regrutuju pro-inflamatorne makrofage, u nekim slučajevima fenotip tih makrofaga ne može da se striktno okarakterise kao M1 ili M2, već se radi o prisustvu makrofaga oko implantata koji su kombinovanog fenotipa. To ukazuje da je potrebno primeniti široku lepezu različitih markera da bi se okarakterisao specifični fenotip makrofaga u zoni implantacije. Još je veći problem kod određivanja polarizacije makrofaga na površini poroznih biomaterijala, jer ona u mnogome zavisi od topografske distribucije. Na primer, u jednoj studiji sa mišjim makrofazima pokazano je da su makrofazi lokalizovani u porama hidrogelova na bazi polihidroksi-etil-metakrilata razvili M1-fenotip, dok su oni lokalizovani na površini implantata razvili M2-fenotip [Susman et al., 2014].

Polarizacija makrofaga u toku reakcije na implantirani materijal, podrazumeva prepoznavanje stranog materijala preko površinskih receptora. Međutim, do danas nisu dovoljno okarakterisani ni specifični makrofagni receptori ni intracelularni signali koji učestvuju u prepoznavanju implantiranog biomaterijala. Proteini adsorbovani na površini biomaterijala (fibrinogen, fibronektin, vitronektin, C3b-komponenta komplekta i dr.) igraju važnu ulogu u prepoznavanju implantata i inicijaciji proliferacije fibroblasta [Anderson *et al.*, 2008]. Ove proteine prepoznaju integrini makrofaga [kao što su antigen makrofaga-1 (CD11b/CD18) i integrini avb3, avb5 i a5b1 koji vezuju arginin-glicin-aspartičnu kiselinu. Integrini pored uloge u inicijalnoj adheziji biomaterijala, posreduju i u inflamatornom odgovoru i regulišu stepen fibroplazije, tj. stvaranja fibrozne kapsule oko implantata. Poznato je da u humanim makrofazima, receptor CD11b/CD18 prepoznaje partikule legura titanijuma, a potom se pokreće put prenosa ćelijskih signala koji je posredstvan sa transkripcionim faktorom NF- $\kappa$ B i indukuje se ekspresija TNF- $\alpha$  i IL-6. U odgovoru makrofaga na čestice debrisa moguća je i potencijalna uloga ćelijske signalizacije posredstvom TLRs (*Tollu*-u sličnih receptora). Makrofazi koštane srži kod MyD88-nokaut miševa imaju smanjenu sekreciju TNF- $\alpha$  nakon izlaganja partikulama PMMA; takođe redukovana je i osteoliza izazvana ovim partikulama. Druga studija, u kojoj su korišćeni TLR4-nokaut miševi, pokazala je da je izostala monocitno/makrofagna adhezija za površinu PET u odsustvu TLR4 [Rogers and Babensee, 2010]. TLRs mogu da prepoznaju određene vrste biomaterijala direktno [Love and Jones, 2013], a moguć je i mehanizam prepoznavanja nakupljenih endogenih DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*) na površini biomaterijala nakon inicijalnog tkivnog oštećenja. Sve u svemu, centralni put uključen u oslobađanje brojnih pro-inflamatornih faktora nakon kontakta sa biomaterijalom, podrazumeva aktivaciju puta NF- $\kappa$ B, pokrenutu stimulacijom TLRs i integrina na površini biomaterijala obloženog sa DAMPs. Ovaj mehanizam naročito je dobro okarakterisan kod osteolize uzrokovane partikulama debrisa. Ukoliko je došlo do stvaranja partikula debrisa, u pokretanju aktivacije puta NF- $\kappa$ B učestvuju brojni članovi TLR-signalnog puta: MyD88, IRAK2, IRAK4 i TNFR-faktor 6. Međutim, daleko manje su poznati signali putevi uključeni u direktno prepoznavanje površine implantata, a nije sasvim jasno ni da li različiti biomaterijali mogu da pokrenu nishodni put ćelijske signalizacije. Pored integrina i TLRs, *scavenger* receptori makrofaga (SR-A, makrofagni receptori sa kolagenom strukturom) takođe su uključeni u prepoznavanje partikula biomaterijala, uključujući i TiO<sub>2</sub>. *Scavenger* receptori (*receptori čistači*)



su grupa receptora koji prepoznaju LDL modifikovane oksidacijom ili acetilacijom. Ime su dobili zbog funkcije čišćenja (*scavenging*). Ovi receptori prepoznaju i vezuju makromolekule sa negativnim naelektrisanjem, kojima su slični modifikovani LDL. Oni učestvuju u odstranjivanju mnogih stranih materija i raspadnih produkata u živoj ćeliji zahvaljujući širokoj specifičnosti receptora i različitim receptorskim molekulima [Kzhyshkowska et al., 2015].

Većina studija je pokazala da nepoželjna inflamatorna reakcija posredovana makrofazima u odgovoru na implantirani materijal dovodi do loše funkcije implantata. Do danas je razmatrano nekoliko mogućnosti modulacije inflamatorne reakcije uzrokovane implantiranim materijalom, putem manipulacije fenotipom makrofaga. Ovi postupci podrazumevaju repolarizaciju makrofaga u anti-inflamatorni fenotip, modifikaciju površinske topografije implantata i aplikaciju anti-inflamatornih supstanci u vidu omotača oko aplikovanog implantnog biomaterijala. Tako je npr. lokalna aplikacija IL-4 sprečila inflamatorni odgovor i redukovala osteolizu uzrokovanu polietilenskim partikulama na modelu mišje kalvarije, a aplikacija istog citokina pokazala je supresivni efekat na inflamatorni odgovor humanih makrofaga na titanijum [Kzhyshkowska et al., 2015].

Važna strategija u modulaciji fenotipa makrofaga je modifikacija implantne površine. Pokazano je npr. da su mikrostrukturne topografske modifikacije polivinilidin-fluorida dovele do indukovanja produkcije pro- i anti-inflamatornih faktora iz humanih makrofaga [Paul et al., 2008]. Površinska topografska modifikacija *poly(dimethylsiloxane)* filma na kojem je gajena mišja makrofagna linija RAW 264.7, umereno je modifikovala produkciju TNF- $\alpha$ , MCP-1, MIP-1a, VEGF [Chen et al., 2000]. Uopšteno, smatra se da hrapavost površine, poroznost, kao i oblik i dimenzija modifikatora površine (npr. mikrostrukturne prema nanostrukturnim modifikacijama) mogu da budu važni faktori koji utiču na polarizaciju makrofaga. Međutim, efekat površinske topografije je kompleksan, a fenotip makrofaga koji nastaje u odgovoru na takvu modifikaciju je kombinovani pro- i anti-inflamatorni fenotip [Rostam et al., 2015]. Takođe, još uvek nije jasno koji je topografski obrazac optimalan za indukciju u toku implantacije onog fenotipa makrofaga koji dovodi do zaceljenja. Iako je nesumljivo potpomažući faktor u uspešnom kalemljenju implantata, smatra se da je topografska modifikacija nedovoljna sama po sebi, pa se danas kao najbolja moguća strategija smatra oblaganje površine implantata sa biokompatibilnim, degradabilnim i neimunogenim biomaterijalima.

Čest problem u biomedicinskom inženjerstvu je što sam materijalu predviđen za određenu biomedicinsku aplikaciju ne poseduje najbolja površinska i masena svojstva. Na primer, metal obezbeđuje najbolja mehanička svojstva koda se aplikacije kao nosač, međutim, čak ni kada su potpuno biokompatibilni, kao što je to titanijum, metali ne mogu da se remodeluju niti da se degradiraju aktivnošću imunološkog sistema domaćina, pa je odgovor na njih, u poređenju sa odgovorom na prirodne materijale insuficijentan. U nekim slučajevima, loša integracija implantata ili hronična inflamacija mogu da dovedu do ozbiljnih problema, kao što su peri-implantitis, osteoliza, aseptički gubitak kosti i, konačno, do neuspeha implantacije. Iz tog razloga, takvi materijali se oblažu tankim slojem biomaterijala (prevlakama) koji obezbeđuje bolju biokompatibilnost bez značajne promene ostalih karakteristika materijala. Jedan od glavnih zahteva koji treba da ispuni materijal za oblaganje implantata u kontekstu imunomodulacije je smanjenje inflamacije i imunološkog odgovora. Da bi se to postiglo, potrebno je implantat obložiti materijalom koji će, pre svega, značajno da popravi integraciju implantata, a to su najčešće prirodni polimeri – kolagen, hijaluronan, hitosan i dr. Drugi zahtev je da materijal za oblaganje maksimalno smanji apsorpciju proteina na implantat, pa da na taj način spreči interakciju imunoloških ćelija domaćina sa površinom implantata. Dokazano je da adhezija ćelija za površinu i maturacija ćelija direktno zavise od njihovih adhezivnih karakteristika; u zavisnosti od supstrata na koji se lepe, tj. ECM, imunološke ćelije ekspimiraju različite profile u pogledu sekrecije citokina, i menjaju Th1/Th2 indukciju CD4<sup>+</sup> T-limfocita. U kontroli ove interakcije učestvuju i drugi imunomodulatorni molekuli, npr. CD200 [Owen et al., 2005; Kzhyshkowska et al., 2015].

Materijali kojima se oblažu implantati, a koji sprečavaju neželjenu reakciju organizma i apsorpciju proteina su visoko hidrofилni sintetički polimeri, kao što su PEG, polietilen-oksид, ili PVA (polivinil-alkohol). Ti materijali mogu takođe i da spreče prateću infekciju i formiranje biofilma. Kod prirodnih polimera problem je njihova degradacija i gubitak efekta tokom vremena, kao i varijabilnost u sastavu materijala od serije do serije. Iako sintetički, polimeri koji nisu izdvojeni iz algi, nude veću kontrolu nad fizičko-hemijskim karakteristikama, oni daju uglavnom pasivni efekat (izbegavaju imunološku reakciju organizma, ali ne izazivaju aktivnu interakciju između domaćina i implantata). Metode oblaganja /premaza biraju se s obzirom na: (1) potrebu za oslobađanjem bioaktivne materije, (2) kontrolu debljine premaza i (3) zahteve koji se odnose na topografiju ili površinske hemijske grupe [Kzhyshkowska et al., 2015].

Među najčešće korišćenim materijalima za oblaganje implantata su hidrogelovi, koji stvaraju oko implantata trodimenzionalnu mrežu odgovarajuće debljine i omogućavaju transport nutricijenata, bioaktivnih molekula i gasova. Najnovije studije na miševima pokazuju da su hidrogelovi na bazi *poly(carboxybetaine methacrylate)* rezistentni na inkapsulaciju *in vivo* sa fibroznom kapsulom, u toku zaceljenja favoriozuju M2-fenotip makrofaga sa smanjenom ekspresijom proinflamatornih markera (iNOS, IL-1R1, TNF- $\alpha$ , CCR7, IL-12) i povećanom ekspresijom anti-inflamatornih markera (MMR, arginaza 1, IL-10 i SR-BI/II). Na sličan način, implant obložen hidrogelom na bazi ECM, ima sposobnost da smanji odnos pro-/anti-inflamatorni citokini, u toku *in vivo* odgovora pacova na implantiranu polipropilensku mrežu. Moguće je obložiti hidrogel sa farmaceutskom supstancom i faktorima rasta da bi se ostvarilo kontrolisano otpuštanje ovih supstanci oko implantata; brzina i stepen oslobađanja mogu se prilagoditi promenom fizičkih svojstava gela, kao što su većičina mrežice, jačina povezivanja, ili interakcija sa bioaktivnim agensima koji se oslobađaju. Druga mogućnost je da površina implantata poseduje fosfolipidne supstance kakve se nalaze u ćelijskoj membrani, pa da „liči sama na sebe“, tj. na ćelije domaćina; međutim, i ovde je razgradnja implantata glavni problem, a kontrola međusobnog povezivanja, debljine i hidratacije hidrogelova nije ni malo lak zadatak [Kzhyshkowska et al., 2015]. Umrežavanje omotača prevlake u cilju povećanja njegove stabilnosti morao bi da bude specifičan za svaki implantirani materijal i zahteva: (1) specifične enzime; (2) hemijska sredstva, kao što su glutaraldehid, *1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide/N-hydroxysuccinimide* za oblaganje materijala na bazi proteina itd. ili (3) fizičke metode (dihidrotermalni tretman, krioželatinizacija). Fizičko-hemijska modifikacija površine moguća je tretiranjem plazmom, hemijskim jetkovanjem, ili drugim načinima nanošenja tankog sloja željenog materijala, kao što su fizičko taloženje parama, ili niskoenergetsko prskanje plazmom. Polielektrolitni višeslojni omotači sastoje se od sukcesivno položenih tankih slojeva polianjona i polikatjona i predstavljaju hidratisane strukture sa specifičnim površinskim svojstvima. Ove tanke prevlake dodatno mogu da budu prevučene sa bioaktivnim molekulima kada funkcionišu kao sistemi za otpuštanje lekova. Proizvode se veoma precizno, nanotehnologijama, kao konstrukti debljine do nekoliko desetina mikrona, i mogu odgovarati bilo kakvim topografskim površinama, što ih čini dobrim kandidatom za prevlaku implantata. Na primer, moguće je kovalentno vezivanje melanocitnog stimulirajućeg hormona (MSH) na višeslojni film *PLL/poly(Lglutamic acid)* kojim se oblaže porozna površina titanijuma. Kada se

ovakav materijal sa prevlakom implantira u pacova, nakon tri meseca od implantacije dolazi do povećanja sekrecije IL-10, u odnosu vrednosti koncentracije ovog anti-inflamatornog citokina kod kontrolnih životinja [Kzhyshkowska et al., 2015].

Ranije je pokazano da katjonske površinske prevlake kao što su *poly(b-aminoalcohols)*, mogu da smanje odgovor na ugrađeni materijal kao strano telo. Glavni problemi vezani za tanke premaze su brza enzimatska degradacija ili razgradnja putem erozije pod fiziološkim uslovima, moguće nuspojave od produkata, ograničena kontrola nad izdvajanjem ugrađene bioaktivne materije u dužem periodu i održavanje njihove aktivnosti u dinamičkom okruženju na strani implantata. Trenutni fokus na *pametne prevlake* svakako da će pružiti u bliskoj budućnosti neka rešenja za navedene problema. Osim toga, studiozniji monitoring klirensa biomaterijala od strane makrofaga, može se poboljšati naše razumevanje uloge ovih ključnih ćelija na ugrađeni materijal [Kzhyshkowska et al., 2015].

Pregled nuklearnom magnetnom rezonancom životinja sa potkožnim i intramuskularnim implantatima karbonskih vlakana pokazao je da je hiperintenzivna zona oko intramuskularnih implantata od kiselih KV jača u odnosu na istu oko baznih KV, ali se redukuje progresivno sa protokom vremena posle operacije. Reakcija potkožnog tkiva oko implantata je u suštini slična – izražena reakcija oko kiselih implantata i nešto slabija reakcija oko baznih implantata, sa redukcijom signala tokom progresije postoperativnog perioda. Nalazi na NMR i patohistološka procena odgovora potkožnog i mišićnog tkiva na implantaciju KV, podudarali su se delimično.

U literaturi su se pojavila prva istraživanja koja ističu prednost primene NMR kod ispitivanja i praćenja odgovora tkiva na implantirani materijal od karbona uopšteno, kao i u odnosu na histopatološku analizu tkiva [Fezoulidis et al., 1989; Sim et al., 1989; Ernstberger et al., 2007a, 2007c; 2009; 2015; Prokić et al., 2012; Xin-ye et al., 2012; Korn et al., 2015]. Naime, iako se smatra da je histološki nalaz zlatni standard u ispitivanju biokompatibilnosti materijala [Kostić et al., 2010], on je zahtevan u pogledu vremena potrebnog za dobijanje rezultata, limitiran je zbog mogućih artefakata povezanih sa fiksacijom i pripremom tkiva za analizu [Rastogi et al., 2013], nemoguća je analiza celog peri-implantnog područja zbog malih tkivnih uzoraka i, ono što je najznačajnije, nemoguć je vremenski monitoring odgovora tkiva na biomaterijal kod istog ispitanika [Korn et al., 2015]. To istovremeno znači da se u eksperimentima na životinjama, pri obaveznom ispitivanju biokompatibilnosti u pretkliničkim studijama *in vivo*, u različitim vremenskim intervalima žrtvuju različite životinje.

Kompjuterizovana tomografija (CT), a naročito micro-CT, intenzivno se upotrebljava u ispitivanju biomaterijala, strukture i gustine kosti i proceni osteointegracije biomaterijala [Tremoleda et al., 2011; Berndardt et al., 2012], ali se zbog velikog jonizujućeg zračenja danas prednost daje snimanju NMR [Hovener et al., 2012]. Međutim, detektibilnost NMR nije optimalna u pogledu svih vrsta implantata, s obzirom na moguće artefakte koji se javljaju prilikom snimanja, a koje mogu da zavise od vrste implantata, njihovog oblika i veličine [Ernstberger et al., 2007a,b,c,d; 2012; 2015; Hovener et al., 2012]. Međutim, ugljenični materijali zbog svog niskog atomskog broja poseduju svojstva zračenja slična biološkim tkivima. Prikladniji su kao implantati u ortopediji u odnosu na titanijum za pacijente kojima je potrebna radioterapija [Xin-ye et al., 2012; Zoccali et al., 2015], jer imaju minimalne efekte perturbacije na doziranje radioterapije, a prilikom snimanja NMR stvaraju najmanje artefakte. Za razliku od titanijuma, implantati izrađeni od CFR-PEEG i CFR-PEEG prevučeni titanijumom pokazuju optimalnu detektibilnost na NMR, bez stvaranja artefakata [Ernstberger et al., 2007 a, b, c, d].

Za analizu interakcija implantat-tkivo, Korn i sar. su ispitivali pogodnost primene NMR za procenu formiranja peri-implatnog koštanog tkiva kod zubnih implantata izgrađenih od PEEK prevučenog tankim slojem titanijuma. Integracija kosti je analizirana u različitim regionima oko implantata. Na nivou NMR i histoloških ispitivanja kvantifikovana je gustina i volumen koštanog tkiva, kao i kvalitet mekih tkiva oko implantata. Obe metode dovele su do uporedivih rezultata bez značajnih razlika u odnosu na procenjene parametre [Korn et al., 2015].

Rezultati izneti u ovoj doktorskoj disertaciji bili bi u skladu sa studijom Korna i sar. [Korn et al., 2015], a određena doza neusaglašenosti nalaza na histološkom pregledu tkiva i NMR može se pripisati činjenici da na nivou NMR nisu sprovedena morfometrijska ispitivanja. Rezultati dobijeni na NMR pokazuju da je ta metoda apsolutno pogodna za praćenje pacijenata sa implantatima od KV, kao i da u eksperimentima *in vivo*, može značajno da smanji broj životinja neophodan za monitoring biokompatibilnosti.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Značajno je *izmenjen sadržaj površinskih grupa* kod KV tretiranih  $\text{HNO}_3$  u odnosu na vlakna tretirana KOH: kisela KV imala su na svojoj površini više kiselih grupa, a bazna KV baznih. *Tačka nultog naelektrisanja* bila je manja kod kiselih KV u odnosu na bazna.

2. Dodavanjem u *kulture humanih fibroblasta* kontinuirane ćelijske linije MRC-5 karbonskih vlakana u dozi od 100 i 500  $\mu\text{g/ml}$ , ne dolazi do značajnih razlika u *stepenu citotoksičnosti* (vijabilnosti ćelija i ćelijske adhezije) u zavisnosti da li su primenjena standardna ili funkcionalizovana KV.

3. *Ćelijska vijabilnost* bila je nenarušena u *kulturama humane makrofagne linije U937* ukoliko su se dodavala KV u koncentraciji od 125  $\mu\text{g/ml}$ , bilo da se radilo o standardnim KV, ili vlaknima tretiranim kiselinom ili bazom. Međutim, dodavanjem KV u koncentraciji od 250  $\mu\text{g/ml}$  ili 500  $\mu\text{g/ml}$ , dolazi do značajnog dozno-zavisnog linearnog smanjenja vijabilnosti ćelija kod sve tri primenjene grupe vlakana; pri tome najveće smanjenje vijabilnosti izazivaju bazna KV i to smanjenje je značajno veće od smanjenja vijabilnosti pod uticajem standardnih vlakana.

4. *Internalizacija vlakana* dodatih u kulture humane makrofagne linije U937 u dozi od 250  $\mu\text{g/ml}$ , zavisila je od toga da li su primenjena standardna ili funkcionalizovana KV. Znatno veći broj makrofaga fagocitovao je bazna KV, u odnosu na fagocitozu standardnih i kiselih KV.

5. Postojala je povećana *koncentracija proinflamatornih citokina*  $\text{TNF-}\alpha$  i  $\text{IL-1}\beta$  u supernatantima kulture humanih makrofaga linije U937 nakon dodavanja standardnih ili kiselih KV u koncentraciji od 125  $\mu\text{g/ml}$  u odnosu na kontrolne vrednosti, dok je dodavanje baznih KV u istoj koncentraciji uslovalo smanjenu produkciju ovih citokina u odnosu na vrednosti za kisela i standardna KV. U istoj koncentraciji, standardna KV uslovala su značajno smanjenja sekrecije  $\text{IL-8}$ , a kisela i bazna KV izrazito povećanje sekrecije  $\text{IL-6}$  i  $\text{IL-8}$  u odnosu na kontrolne vrednosti. Pri tome, vlakna tretirana kiselinom bila su snažniji stimulator sekrecije  $\text{IL-8}$  iz makrofaga u odnosu na vlakna tretirana bazom, dok u odnosu na produkciju  $\text{IL-6}$  nije bilo razlike u stepenu stimulacije sekrecije ovog citokina između kiselih i baznih KV.

6. Standardna KV dodata u kulture humanih makrofaga ćelijske linije U937 u *koncentraciji od 250  $\mu\text{g/ml}$*  smanjivala su produkciju  $\text{IL-1}\beta$  u odnosu na kontrolne vrednosti, a bazna povećavala. Međutim, sekrecija  $\text{IL-6}$  i  $\text{IL-8}$  snažno je stimulisana pod uticajem standardnih KV, a višestruko inhibirana nakon dodavanja kiselih ili baznih KV u navedenoj koncentraciji.

Standardna KV nisu dovela do promene u koncentraciji TNF- $\alpha$ , dok su kisela, a naročito bazna KV dovela do smanjenja koncentracije ovog citokina; pri tome, smanjenje koncentracije TNF- $\alpha$  u prisustvu baznih KV desetstruko je bilo manje u poređenju sa kontrolnim vrednostima.

7. Pregled *nuklearnom magnetnom rezonancom* životinja sa potkožnim i intramuskularnim implantatima karbonskih vlakana pokazao je da je hiperintenzivna zona oko intramuskularnih implantata od kiselih KV jača u odnosu na istu oko baznih KV, ali se redukuje progresivno sa protokom vremena posle operacije. Reakcija potkožnog tkiva oko implantata je u suštini slična – izražena reakcija oko kiselih implantata i nešto slabija reakcija oko baznih implantata, sa redukcijom signala tokom progresije postoperativnog perioda.

8. Najveći odgovor tkiva procenjen preko vrednosti *IrI pri subkutanoj aplikaciji* KV postojao je 21. dana nakon implantacije standardnih i kiselih KV, a 21. i 28. dana u slučaju implantirane bazna KV, u odnosu na ostale termine merenja. Pri tome, IrI potkožnog tkiva kod subkutane aplikacije kiselih KV bio je značajno veći 21. dana nakon implantacije u poređenju sa istim indeksom kod subkutane aplikacije baznih KV.

9. Kod *intramuskularne aplikacije* kiselih KV, vrednosti IrI bile su značajno veće 7. dana od implantacije u odnosu na ostale termine merenja. Postojao je znatno veći tkivni IrI kod intramuskularno aplikovanih kiselih KV u odnosu na standardna KV 7, 21. i 28. postoperativnog dana, a značajna razlika u veličini ovog indeksa registrovana je između kiselih i baznih KV u 7. postoperativnom danu, u korist kiselih vlakana.

10. Poređenjem *subkutane i intramuskularne aplikacije* KV, izvodi se zaključak da je 7. dana nakon implantacije IrI značajno veći prilikom intramuskularne aplikacije *standardnih, kiselih i baznih karbonskih vlakna* u poređenju sa subkutanom aplikacijom istih tipova vlakana, dok je 21. danu IrI značajno veći kod subkutane aplikacije u odnosu na intramuskularnu.

12. Najviše su bila *fragmentisana* intramuskularno aplikovana kisela i standardna KV, a najmanje subkutano aplikovana standardna KV. Intramuskularna aplikacija uslovlila je kidanje vlakana na manje fragmente u odnosu na potkožnu aplikaciju KV. Subkutano, najviše su bila fragmentisana bazna KV i razlika je bila značajna u odnosu na standardna i kisela KV, dok su intramuskularno najviše bila fragmentisana kisela KV, a ta fragmentacija bila je veća u odnosu na fragmentaciju baznih KV aplikovanih na istio način.

13. Nalazi na NMR i patohistološka procena odgovora potkožnog i mišićnog tkiva na implantaciju KV, podudarali su se delimično.

14. Sve primenjene analize u cilju procene biokompatibilnosti standarnih i funkcionalizovanih karbonskih vlakana rasvetlile su različite aspekte biokompatibilnosti implantiranih materijala i ni jedna nije bila „superiorna“ u odnosu na druge.

15. S obzirom na različit odgovor makrofaga *in vitro* na KV dodata u ćelijsku kulturu, u smislu ćelijske vijabilnosti, kao i funkcije – internalizacije vlakana (fagocitoze/frustrirane fagocitoze) i produkcije proinflamatornih (ali i antiinflamatornih) citokina, u budućnosti bi mogla da se razmatra mogućnost da se pre implantacije ispita funkcija makrofaga pacijenta kome treba da se ugradi implantat u dodiru sa KV *in vitro*, a da se potom vlakna funkcionalizuju u određenom pravcu, kako bi se sprečila infekcija ili hronična inflamacija, koje su najčešći uzročnici odbacivanja implantata. To bi otvorilo nove perspektive u terapijskoj predikciji i utro put personalizovanoj implantnoj terapiji.



## 8. LITERATURA

1. Adam F, Hammer DS, Pfautsch S, Westermann K. Early failure of a press-fit carbon fiber hip prosthesis with a smooth surface. *J Arthroplasty*. 2002;17(2):217-23.
2. Abduljawad M, Samran A, Kadour J, Al-Afandi M, Ghazal M, Kern M. Effect of fiber posts on the fracture resistance of endodontically treated anterior teeth with cervical cavities: An in vitro study. *J Prosthet Dent*. 2016;116(1):80-84.
3. Abduljawad M, Samran A, Kadour J, Karzoun W, Kern M. Effect of fiber posts on the fracture resistance of maxillary central incisors with class III restorations: An in vitro study. *J Prosthet Dent*. 2016a, Nov 15. pii: S0022-3913(16)30462-0. doi: 10.1016/j.prosdent.2016.09.013.
4. Aber S, Khataee A, Sheydaei M. Optimization of activated carbon fiber preparation from Kenaf using K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> as chemical activator for adsorption of phenolic compounds. *Bioresour Technol*. 2009;100(24):6586-6591.
5. Agrawal CM. Reconstructing the human body using biomaterials. *J Met*. 1998;50(1): 31-35. Agrillo U, Mastronardi L, Puzzilli F. Anterior cervical fusion with carbon fiber cage containing coralline hydroxyapatite: preliminary observations in 45 consecutive cases of soft-disc herniation. *J Neurosurg*. 2002;96(3 Suppl):273-276.
7. Aithal VK, Jenkins DH. Stabilization of a dislocating spastic hip with a carbon fiber ligament. *Acta Orthop Scand*. 1992;63(6):679.
8. Albee F. Fundamentals in bone transplantation: experiences in three thousand bone graft operations. *JAMA*. 1923; 81:1429-1432.
9. Alfarsi MA, Hamlet SM, Ivanovski S. Titanium surface hydrophilicity modulates the human macrophage inflammatory cytokine response. *J Biomed Mater Res A*. 2014; 102(1):60-67.
10. Amaral M, Coppo PP, Rosalem CG, Suaid FF, Guerra SM. A 3-year retrospective evaluation of the clinical performance of fiber posts. *Braz Dent J*. 2015;26(6):619-623.
11. Amis AA, Kempson SA, Campbell JR, Miller JH. Anterior cruciate ligament replacement. Biocompatibility and biomechanics of polyester and carbon fibre in rabbits. *J Bone Joint Surg Br*. 1988;70(4):628-634.

12. Amis AA, Campbell JR, Kempson SA, Miller JH. Comparison of the structure of neotendons induced by implantation of carbon or polyester fibers. *J Bone Joint Surg Br.* 1984;66(1):131-139.
13. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008;20:86-100.
14. Aramal M, Coppo PP, Rosalem CG, Suaid FF, Guerra SM. A 3-year retrospective evaluation of the clinical performance of fiber posts. *Braz Dent J.* 2015; 26(6):619-623.
15. Atik OŞ, Can FI, Şenol MS, Eren TK. Less invasive surgery using external fixator for the treatment of subtrochanteric femur fracture in a high-risk geriatric patient. *Eklemler Hastalıkları Cerrahisi.* 2016;27(2):100-102.
16. Bacic-Vukevic MM, Udovicic A, Lausevic ZV, Peric-Grujic AA, Lausevic MD. Surface characteristics and modification of different carbon materials. *Rec Dev Adv Mater Proc.* 2006; 518:217-222.
17. Bačić G, Poleksić Lj, Lavrnić S, Mirkov Z, Apostolidis G. Artifacts in magnetic resonance imaging: magnetic field inhomogeneity artifacts – how they can be recognized, avoided and utilized. *Radiol Arch Serb.* 2001; 10(1):7-21.
18. Balać I, Bugarski B, Ćosić I, Dramićanin M, Đorđević D, Filipović N, Ignjatović N, Janačković Đ, Kojić M, Manojlović V, Marković Z, Obradović B, Pajić-Lijaković I, Pavlović M, Plavšić M, Raković D, Ranković V, Stojanović B, Trajković V, Uskoković D, Uskoković P, Veljković D, Vlastelica I, Vunjak-Novaković G. *Biomaterijali, urednici Raković D. i Uskoković D, Institut Tehničkih Nauka Srpske Akademije Nauka i Umetnosti i Društvo za istraživanje materijala, Beograd, Draslar Partner, 2010. ISBN 978-86-80321-23-3.*
19. Barker CF, Markmann JF. Historical Overview of Transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a014977.
20. Bartels RH, Donk R, van Azn RD. Height of cervical foramina after anterior discectomy and implantation of a carbon fiber cage. *J Neurosurg.* 2001;95(1 Suppl):40-42.
21. Bartels RH, Donk RD, Feuth T. Subsidence of stand-alone cervical carbon fiber cages. *Neurosurgery.* 2006;58(3):502-508; discussion 502-508.

22. Becker HP, Rosenbaum D, Zeithammel G, Gnann R, Bauer G, Gerngross H, Claes L. Tenodesis versus carbon fiber repair of ankle ligaments: a clinical comparison. *Clin Orthop Relat Res.* 1996;325:194-202.
23. Belangero WD, Köberle G, Hadler WA. Inflammatory reaction of rat striated muscle to particles of carbon fiber reinforced carbon. *Braz J Med Biol Res.* 1993;26(8):819-26.
24. Behrendt P, Kruse E, Klüter T, Fitschen-Oestern S, Weuster M, Menzdorf L, Finn J, Varoga D, Seekamp A, Müller M, Lippross S. Fixed angle carbon fiber reinforced polymer composite plate for treatment of distal radius fractures : Pilot study on clinical applications. *Unfallchirurg.* 2017;120(2):139-146.
25. Bernhardt R, Kuhlisch E, Schulz MC, Eckelt U, Stadlinger B. Comparison of bone-implant contact and bone-implant volume between 2D-histological sections and 3D-SRmCT slices. *Eur Cells Mater* 2012;23:237e48.
26. Blayney AW, Romero Rio JA, Williams KR, Guilhaume A, Bagot D'Arc M, Portmann M. Experimental and clinical aspects of carbon as a middle ear prosthesis. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1986;11(3):189-197.
27. Błazewicz M. Carbon grafts produced from polyacrylonitrile for treatment of soft tissues. *Polim Med.* 2001a;31(1-2):33-38.
28. Blazewicz M. Carbon materials in the treatment of soft and hard tissue injuries. *Eur Cells Mater.* 2001b; 2:21-29.
29. Boehm HP. Surface oxides on carbon. *High Temp.-High Press.* 1990; 22:275-288.
30. Bolla M, Muller-Bolla M, Borg C, Lupi-Pegurier L, Laplanche O, Leforestier E. WITHDRAWN: Root canal posts for the restoration of root filled teeth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;11:CD004623.
31. Boretos JW, Eden M, eds. *Contemporary Biomaterials, Material and Host Response, Clinical Applications, New Technology and Legal Aspects.* Noyes Publications, Park Ridge, NJ, 1984.
32. Boriani S, Biagini R, Bandiera S, Gasbarrini A, De Iure F. Reconstruction of the anterior column of the thoracic and lumbar spine with a carbon fiber stackable cage system. *Orthopedics.* 2002; 25(1): 37-42.

33. Bougherara H, Zdero R, Dubov A, Shah S, Khurshid S, Schemitsch EH. A preliminary biomechanical study of a novel carbon-fibre hip implant versus standard metallic hip implants. *Med Eng Phys.* 2011;33(1):121-128.
34. Bourne NK, Parry S, Townsend D, Withers PJ, Soutis C, Frias C. Dynamic damage in carbon-fibre composites. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 2016;374(2071):20160018.
35. Brantigan JW, Steffee AD. A carbon fiber implant to aid interbody lumbar fusion. Two-year clinical results in the first 26 patients. *Spine (Phila Pa 1976).* 1993;18(14):2106-2107.
36. Brittberg M, Faxén E, Peterson L. Carbon fiber scaffolds in the treatment of early knee osteoarthritis. A prospective 4-year followup of 37 patients. *Clin Orthop Relat Res.* 1994;(307):155-164.
37. Brooke NS, Rorke AW, King AT, Gullan RW. Preliminary experience of carbon fibre cage prostheses for treatment of cervical spine disorders. *Br J Neurosurg.* 1997;11(3):221-227.
38. Buckley JD, Edie DD. Carbon-carbon materials and composites. (Vol. 1254). William Andrew, 1993.
39. Bunsell, A. R. Fibre Reinforcements for Composite Materials. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, 1988, p. 120.
40. Burri C, Claes L, Mutschler W, Wörsdörfer O. Carbon fiber reinforced polysulfone implants for tumor surgery of the spine. *Aktuelle Traumatol.* 1989;19(6):297-301.
41. Callister, WD. *Materials Science and Engineering.* 4. John Wiley & Sons; New York, NY, USA: 1997. Chapters 17 Composites, 19 Electrical Properties and Appendix C Properties of Selected Materials; p. 510-531.p. 593-624.p. 774-800.
42. *Carbon Fibers and Their Composites*, ed. E. Fitzer. Springer-Verlag, Berlin, 1985.
43. Carranza-Bencano A, Armas-Padrón JR, Gili-Miner M, Lozano MA. Carbon fiber implants in osteochondral defects of the rabbit patella. *Biomaterials.* 2000;21(21):2171-2176.
44. Carter EM, Katz LE, Speitel GE Jr, Ramirez D. Gas-phase formaldehyde adsorption isotherm studies on activated carbon: correlations of adsorption capacity to surface functional group density. *Environ Sci Technol.* 2011;45(15):6498-6503.

45. Castro-Muñiz A, Suárez-García F, Martínez-Alonso A, Tascón JM, Kyotani T. Energy storage on ultrahigh surface area activated carbon fibers derived from PMIA. *ChemSusChem*. 2013; 6(8):1406-1413.
46. Cejudo-Guillen M, Ramiro-Gutierrez ML, Labrador-Garrido A, Diaz-Cuenca A, Pozo D. Nanoporous silica microparticle interaction with toll-like receptor agonists in macrophages. *Acta Biomater*. 2012; 8(12):4295-4303.
47. Ciappetta P, Boriani S, Fava GP. A carbon fiber reinforced polymer cage for vertebral body replacement: technical note. *Neurosurgery*. 1997;41(5):1203-1206.
48. Chawla, KK. *Composite Materials*. 2. Springer; New York, NY, USA: 1998. Chapter 2 Reinforcements, 8 Carbon Fiber Composites, 10.2 Micromechanics-Mechanical Properties; p. 6-71.p. 252-262.p. 308-317.
49. Chen S, Jones JA, Xu Y, Low HY, Anderson JM, Leong K W. Characterization of topographical effects on macrophage behavior in a foreign body response model. *Biomaterials*. 2010; 31:3479-3491.
50. Chitnavis B, Barbagallo G, Selway R, Dardis R, Hussain A, Gullan R. Posterior lumbar interbody fusion for revision disc surgery: review of 50 cases in which carbon fiber cages were implanted. *J Neurosurg*. 2001;95(2 Suppl):190-195.
51. Chong E, Mobbs RJ, Pelletier MH, Walsh WR. Titanium/polyetheretherketone cages for cervical arthrodesis with degenerative and traumatic pathologies: early clinical outcomes and fusion rates. *Orthop Surg*. 2016;8(1):19-26.
52. Chou TM, Ke YY, Tsao YH, Li YC, Lin ZH. Fabrication of Te and Te-Au nanowires-based carbon fiber fabrics for antibacterial applications. *Int J Environ Res Public Health*. 2016;13(2):202.
53. Claes L. Carbon fiber reinforced polysulfone-a new implant material. *Biomed Tech (Berl)*. 1989;34(12):315-319.
54. Čolić M. Testovi za ispitivanje biokompatibilnosti stomatoloških materijala. U: Stamenković D i sar. *Grativni stomatološki materijali (dostignuća i perspektive)*, Stomatološki fakultet, Beograd 2007; 37-62.
55. Collazos-Castro JE, García-Rama C, Alves-Sampaio A. Glial progenitor cell migration promotes CNS axon growth on functionalized electroconducting microfibers. *Acta Biomater*. 2016;35:42-56.

56. Curtin W, Reville W, Heapes M, Lyons J, Muckle D. The chondrogenic potential of carbon fiber and carbon fiber periosteum implants: an ultrastructural study in the rabbit. *Osteoarthritis Cartilage*. 1994;2(4):253-258.
57. Czajkowska B, Blazewicz M. Phagocytosis of chemically modified carbon materials. *Biomaterials*, 1997;18(1):69-74.
58. Dasar U, Gursoy S, Akkaya M, Algin O, Isik C, Bozkurt M. Microfracture technique versus carbon fibre rod implantation for treatment of knee articular cartilage lesions. *J Orthop Surg (Hong Kong)*. 2016;24(2):188-193.
59. Debnath UK, Fairclough JA, Williams RL. Long-term local effects of carbon fibre in the knee. *Knee*. 2004;11(4):259-264.
60. Demir B, Henderson LC, Walsh TR. Design rules for enhanced interfacial shear response in functionalized carbon fiber epoxy composites. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017 Mar 20. doi: 10.1021/acsami.6b16041. [Epub ahead of print]
61. Deng Y, Liu X, Xu A, Wang L, Luo Z, Zheng Y, Deng F, Wei J, Tang Z, Wei S. Effect of surface roughness on osteogenesis in vitro and osseointegration in vivo of carbon fiber-reinforced polyetheretherketone-nanohydroxyapatite composite. *Int J Nanomed*. 2015;10:1425-1447.
62. Deng Y, Zhou P, Liu X, Wang L, Xiong X, Tang Z, Wei J, Wei S. Preparation, characterization, cellular response and in vivo osseointegration of polyetheretherketone/nano-hydroxyapatite/ carbon fiber ternary biocomposite. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015;136:64-73.
63. Deshmukh NV, Hui A. Persistent synovial fistula after arthroscopy in carbon synovitis. *ANZ J Surg*. 2001;71(2):128-129.
64. Devine DM, Hahn J, Richards RG, Gruner H, Wieling R, Pearce SG. Coating of carbon fiber-reinforced polyetheretherketone implants with titanium to improve bone apposition. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013;101(4):591-598.
65. Dworak M, Błażewicz S. Mechanical assessment of a hip joint stem model made of a PEEK/carbon fibre composite under compression loading. *Acta Bioeng Biomech*. 2016;18(2):71-79.
66. Edwards GB, Vaughan LC. Use of carbon fibre implants in the treatment of fetlock joint dislocation in two horses. *Vet Rec*. 1984;114(4):87-88.

67. Elias KL, Price RL, Webster TJ. Enhanced functions of osteoblasts on nanometer diameter carbon fibers. *Biomaterials*. 2002;23(15):3279-3287.
68. Ermolenko IN, Lyubliner IP, Gulko NV. *Chemically Modified Carbon Fibers and Their Applications*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, FR Germany, 1990.
69. Ernstberger T, Buchhorn G, Baums MH, Heidrich G. In-vitro MRI detectability of interbody test spacers made of carbon fibre-reinforced polymers, titanium and titanium-coated carbon fibre-reinforced polymers. *Acta Orthop Belg*. 2007a;73(2):244-249.
70. Ernstberger T, Heidrich G, Buchhorn G. Postimplantation MRI with cylindric and cubic intervertebral test implants: evaluation of implant shape, material, and volume in MRI artifacting-an in vitro study. *Spine J*. 2007b;7(3):353-359.
71. Ernstberger T, Heidrich G. Postfusion magnetic resonance imaging artifacts caused by a titanium, cobalt-chromium-molybdenum, and carbon intervertebral disc spacer. *J Spinal Disord Tech*. 2007c;20(2):154-159.
72. Ernstberger T, Heidrich G, Bruening T, Krefft S, Buchhorn G, Klinger HM. The interobserver-validated relevance of intervertebral spacer materials in MRI artifacting. *Eur Spine J*. 2007d;16(2):179-185.
73. Ernstberger T, Buchhorn G, Heidrich G. Artifacts in spine magnetic resonance imaging due to different intervertebral test spacers: an in vitro evaluation of magnesium versus titanium and carbon-fiber-reinforced polymers as biomaterials. *Neuroradiology*. 2009;51(8):525-529.
74. Ernstberger T, Buchhorn G, Heidrich G. Magnetic resonance imaging evaluation of intervertebral test spacers: an experimental comparison of magnesium versus titanium and carbon fiber reinforced polymers as biomaterials. *Ir J Med Sci*. 2010;179(1):107-11. Retraction in: *Ir J Med Sci*. 2015;184(1):263.
75. Fallou H, Cimetière N, Giraudet S, Wolbert D, Le Cloirec P. Adsorption of pharmaceuticals onto activated carbon fiber cloths - Modeling and extrapolation of adsorption isotherms at very low concentrations. *J Environ Manage*. 2016;166:544-55.
76. Ferrari M, Cagidiaco MC, Goracci C, Vichi A, Mason PN, Radovic I, Tay F. Long-term retrospective study of the clinical performance of fiber posts. *Am J Dent* 2007;20(5):287-291.

77. Fezoulidis I, Neuhold A, Wicke L, Sim T, Dimopoulos I. MRT of the status following augmentation plasty of the anterior cruciate ligament using carbon fibers. *Radiologe*. 1989;29(11):550-553.
78. Filatova IA, Khoroshilova-Maslova IP, Kataev MG, Ilatovskaia LV, Zakharova GP. Histological studies of carbon felt (carbotextim M) in late periods after its orbital implantation. *Vestn Oftalmol*. 2006;122(3):14-17.
79. Fontecha-Cámara MA, López-Ramón MV, Alvarez-Merino MA, Moreno-Castilla C. Effect of surface chemistry, solution pH, and ionic strength on the removal of herbicides diuron and amitrole from water by an activated carbon fiber. *Langmuir*. 2007;23(3):1242-1247.
80. Foster IW, Rális ZA, McKibbin B, Jenkins DH. Biological reaction to carbon fiber implants: the formation and structure of a carbon-induced "neotendon". *Clin Orthop Relat Res*. 1978;131:299-307.
81. Früh HJ, Liebetrau A, Bertagnoli R. Fusion implants of carbon fiber reinforced plastic. *Orthopade*. 2002;31(5):454-458.
82. Gao B, Zhang R, Gao F, He M, Wang C, Liu L, Zhao L, Cui H. Interfacial microstructure and enhanced mechanical properties of carbon fiber composites caused by growing generation 1-4 dendritic poly(amidoamine) on a fiber surface. *Langmuir*. 2016;32(33):8339-8349.
83. Gavin P, Bagley R. *Practical Small Animal MRI*, Wiley-Blackwell, Ames, 2009.
84. Gerosa RM, Berría MI, Lascano EF. Experimental study of the fibroblastic reaction induced by carbon fiber. *Medicina (B Aires)*. 1987;47(4):355-359.
85. Glazer B. Restoration of endodontically treated teeth with carbon fibre posts-a prospective study. *J Can Dent Assoc* 2000;66(11):613-618.
86. Gleason TF, Barmada R, Ghosh L. Can carbon fiber implants substitute for collateral ligament? *Clin Orthop Relat Res*. 1984;(191):274-280.
87. Grabinski C, Husain S, Lafdi K, Bradydich-Stolle L, Schlager J. Effect of dimension on biocompatibility of carbon nanomaterials. *Carbon* 2007;45:2828-2835.
88. Grotenhuis N, Bayon Y, Lange JF, Van Osch GJ, Bastiaansen-Jenniskens YM. A culture model to analyze the acute biomaterial-dependent reaction of human primary macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 433:115-120.



89. Grotenhuis N, Vd Toom HF, Kops N, Bayon Y, Deerenberg EB, Mulder IM, van Osch GJ, Lange JF, Bastiaansen-Jenniskens YM. In vitro model to study the biomaterial-dependent reaction of macrophages in an inflammatory environment. *Br J Surg*. 2014; 101;983-992.
90. Hak DJ, Mauffrey C, Seligson D, Lindeque B. Use of carbon-fiber-reinforced composite implants in orthopedic surgery. *Orthopedics*. 2014;37(12):825-830.
91. Halouzka V, Halouzкова B, Jirovsky D, Hemzal D, Ondra P, Siranidi E, Kontos AG, Falaras P, Hrbac J. Copper nanowire coated carbon fibers as efficient substrates for detecting designer drugs using SERS. *Talanta*. 2017;165:384-390.
92. Handbook of Materials for Medical Devices (#06974G). Chapter 1: Overview of Biomaterials and Their Use in Medical Devices/7. ASM International. 2003. [www.asminternational.org](http://www.asminternational.org). Haubold AD, Norman JC. Ultra low temperature isotropically (U.L.T.I.) deposited carbon (biolyte): a promising new flexible blood interfacing biomaterial. *Cardiovasc Dis*. 1977; 4(4):369-370.
94. Heary RF, Parvathreddy NK, Qayumi ZS, Ali NS, Agarwal N. Suitability of carbon fiber-reinforced polyetheretherketone cages for use as anterior struts following corpectomy. *J Neurosurg Spine*. 2016;25(2):248-55.
95. Hehl G, Kinzl L, Reichel R. Carbon-fiber implants for knee ligament reconstruction. 10-year results. *Chirurg*. 1997;68(11):1119-1125.
96. Helmus MN, Gibbson DF, Cebon D. Biocompatibility: Meeting a key functional requirement of next-generation medical devices. *Toxicol Pathol*. 2008; 36(1):70-80.
97. Hovener J, Zwick S, Leupold J, Eisenbeib A, Scheifele C, Schellenberger F, Henning J, Elverfeldt DV, Ludwig U. Dental MRI: imaging of soft and solid components without ionizing radiation. *J Magn Reson Imaging*. 2012;36(4):841e6.
98. Howard CB, Winston I, Bell W, Mackie I, Jenkins DH. Late repair of the calcaneal tendon with carbon fibre. *J Bone Joint Surg Br*. 1984;66(2):206-208.
99. Huang WY, Yeh CL, Lin JH, Yang JS, Ko TH, Lin YH. Development of fibroblast culture in three-dimensional activated carbon fiber-based scaffold for wound healing. *J Mater Sci Mater Med*. 2012;23(6):1465-1478.
100. Huebsch N, Mooney DJ. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature*. 2009; 462(7272): 426-432.

101. <http://www.carbonfiber.gr.jp/english/tech/faq/#1>.
102. <http://www.torayca.com/en/techref/index.html>.
103. ISO 10993. Biological evaluation of dental devices. International Standards Organization. 1992.
104. Jackson J. Father of the modern hip replacement: Professor Sir John Charnley (1911-82). *J Med. Biography*. 2012; 19(4):151-156. Jacobs JP, Jones CM, Baille JP. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* 1970; 227 (5254): 168-170.
106. Jafar MM, Reeves J, Ruthven MA, Dean CJ, MacDougall ND, Tucker AT, Miquel ME. Assessment of a carbon fibre MRI flatbed insert for radiotherapy treatment planning. *Br J Radiol*. 2016;89(1062):20160108.
107. Janus A, Rybak Z. The place of laboratory medicine in the study of biomaterials biocompatibility. *Polim Med*. 2013;43:205-211.
108. Jenkins DHR, Foster IW, McKibbin B, Ralis ZA. Induction of tendon and ligament formation by carbon implantation. *J Bone Joint Surg*. 1977;59B:53-57.
109. Jenney CR, DeFife KM, Colton E, Anderson JM. Human monocyte/macrophage adhesion, macrophage motility, and IL-4-induced foreign body giant cell formation on silane-modified surfaces in vitro. Student Research Award in the Master's Degree Candidate Category, 24th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, San Diego, CA, April 22-26, 1998. *J Biomed Mater Res*. 1998;41(2):171-184.
110. Kalijadis A, Vukčević M, Jovanović Z, Laušević Z, Laušević M. Characterisation of surface oxygen groups on different carbon materials by the Boehm method and temperature-programmed desorption. *J Serb Chem Soc*. 2011;76(5):757-768.
111. Kang HJ, Han CD, Kang ES, Kim NH, Yang WI. An experimental intraarticular implantation of woven carbon fiber pad into osteochondral defect of the femoral condyle in rabbit. *Yonsei Med J*. 1991;32(2):108-116.
112. Katthagen JC, Ellwein A, Lutz O, Voigt C, Lill H. Outcomes of proximal humeral fracture fixation with locked CFR-PEEK plating. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2016, Dec 3. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27915444.
113. Kawasaki N, Tominaga H, Ogata F, Inoue K, Kankawa M. Development of novel carbon fiber produced from waste fiber by carbonization. *J Oleo Sci*. 2012;61(10):593-600.

114. Kinzl L, Burri C, Neugebauer R. Carbon fiber ligament replacement in the treatment of chronic instability of the external ankle joint ligament. *Zentralbl Chir.* 1983;108(19):1192-1197.
115. Koreny T, Tunyogi-Csapo M, Gal I, Vermes C, Jacobs JJ, Glant TT. The role of fibroblasts and fibroblast-derived factors in periprosthetic osteolysis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54(10):3221-3232.
116. Korn P, Elschner C, Schulz MC, Range U, Mai R, Scheler U. MRI and dental implantology: two which do not exclude each other. *Biomaterials.* 2015;53:634-45.
117. Kostić M, Krunić N, Najman S. Savremeni aspekti ispitivanja biokompatibilnosti materijala u stomatologiji. *Acta Stom Naiisi.* 2010; 26(62):1007-1016.
118. Kozai TD, Langhals NB, Patel PR, Deng X, Zhang H, Smith KL, Lahann J, Kotov NA, Kipke DR. Ultrasmall implantable composite microelectrodes with bioactive surfaces for chronic neural interfaces. *Nat Mater.* 2012; 11(12):1065-1073.
119. Kzhyshkowska J, Gudima A, Riabov V, Dollinger C, Lavallo P, Vrana NE. Macrophage responses to implants: prospects for personalized medicine. *J Leukoc Biol.* 2015;98(6):953-962.
120. Laberge-Malo M, Hamdy RC, Ballaz L, Parent A, Pouliot A. Articulated vs. fixed carbon-fiber prosthesis in individual with partial foot amputation: Study case. *Ann Phys Rehabil Med.* 2016;59S:e30.
121. Langston T. The tensile behavior of high-strength carbon fibers. *Microsc Microanal.* 2016;22(4):841-844.
122. Lapčević R. Čvrstoća, deformabilnost i prirodna napregnutost čvrstih stenskih masa, monografija. Beograd: Rudarsko-geološki fakultet, 2004.
123. Lesić A, Durdević D, Tatić V, Ukropina D. Histopathological evaluation of the carbon fibers application for the substitution of the anterior cruciate ligament-an experimental study on dogs. *Vojnosanit Pregl.* 1995;52(3):215-220.
124. Lesić A, Tatić V, Ukropina D, Durdević D. The use of autografts and synthetic carbon fibers in reconstruction of the anterior cruciate ligament-an experimental study on dogs. *Vojnosanit Pregl.* 1994;51(6):479-487.

125. Li BB, Lin Y, Cui HY, Hao Q, Xu JB, Di P. Clinical evaluation of „All-on-Four” provisional prostheses reinforced with carbon fibers. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2016;48(1):133-137.
126. Li CS, Vannabouathong C, Sprague S, Bhandari M. The use of carbon-fiber-reinforced (CFR) PEEK material in orthopedic implants: A systematic review. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*. 2015;8:33-45.
127. Li H, Xi HA, Zhu S, Wen Z, Wang R. Preparation, structural characterization, and electrochemical properties of chemically modified mesoporous carbon. *Micropor Mesopor Mater*. 2006; 96 (13):357-362.
128. Li H, Zou X, Woo C, Ding M, Lind M, Bünger C. Experimental lumbar spine fusion with novel tantalum-coated carbon fiber implant. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007; 81(1):194-200.
129. Li KQ, Li Y, Zheng Z, Zhang YX. Preparation, characterization and adsorption performance of mesoporous activated carbon with acidic groups. *Huan Jing Ke Xue*. 2013;34(6):2479-2485.
130. Li W, Zhou J, Xu Y. Study of the *in vitro* cytotoxicity testing of medical devices (Review). *Biomed Rep*. 2015; 3;617-620.
131. Lin TH, Tamaki Y, Pajarinen J, Waters HA, Woo DK, Yao Z, Goodman SB. Chronic inflammation in biomaterial-induced periprosthetic osteolysis: NF- $\kappa$ B as a therapeutic target. *Acta Biomater*. 2014; 10:1-10.
132. Liu X, Jiang ZY, Qin Y. Carbon-carbon materials and composites for experimental tracheal reconstruction. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2010; 45(8):669-73.
133. Love RJ, Jones KS. The recognition of biomaterials: pattern recognition of medical polymers and their adsorbed biomolecules. *J Biomed Mater Res. A* 2013;101:2740-2752.
134. Macewan W. Observations concerning transplants of bone. *Proc R Soc Lond*. 1881; 32: 232.
135. Maistrelli GL, Mahomed N, Garbuz D, Fornasier V, Harrington IJ, Binnington A. Hydroxyapatite coating on carbon composite hip implants in dogs. *J Bone Joint Surg Br*. 1992; 74(3): 452-456.

136. Marinković S. Novi ugljenični materijali (pregled). Glasnik Hemijskog društva, Beograd. 1978; 43:795-815.
137. Marinković S. Karbonska vlakna. U: Marinković S, Laušević Z, Polovina M. Savremeni karbonski materijali, monografija. Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Beograd, 1999.
138. Marinković S, Laušević Z, Polovina M. Savremeni karbonski materijali, monografija. Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Beograd, 1999.
139. Marotta N, Landi A, Tarantino R, Mancarella C, Ruggeri A, Delfini R. Five-year outcome of stand-alone fusion using carbon cages in cervical disc arthrosis. *Eur Spine J.* 2011;20 (Suppl 1):S8-12.
140. Maté Sánchez de Val JE, Gómez-Moreno G, Pérez-Albacete Martínez C, Ramírez-Fernández MP, Granero-Marín JM, Gehrke SA, Calvo-Guirado JL. Peri-implant tissue behavior around non-titanium material: Experimental study in dogs. *Ann Anat.* 2016 Jul;206:104-9.
141. Mauffrey C, Butler N, Hake ME. Fabrication of an interlocked antibiotic/cement-coated carbon fiber nail for the treatment of long bone osteomyelitis. *J Orthop Trauma.* 2016; Suppl 2:S23-24.
142. Mäkisalo SE, Visuri T, Viljanen A, Jokio P. Reconstruction of the anterior cruciate ligament with carbon fibres: unsatisfactory results after 8 years. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 1996;4(3):132-136.
143. Menaszek F, Zamorska L, Zolnierek M, Blazewicz M. Soft tissue response to degradation products of carbon biomaterials – a histochemical study. *Eng Biomater.* 2003;6(29):23-26.
144. Mendes DG, Angel D, Grishkan A, Boss J. Histological response to carbon fibre. *J Bone Joint Surg Br.* 1985a;67(4):645-659.
145. Mendes DG, Iusim M, Angel D, Rotem A, Roffman M, Grishkan A, Mordohovich D, Boss J. Histologic pattern of biomechanic properties of the carbon fiber-augmented ligament tendon. A laboratory and clinical study. *Clin Orthop Relat Res.* 1985b;196:51-60.
146. Mendes DG, Iusim M, Angel D, Rotem A, Mordehovich D, Roffman M, Lieberson S, Boss J. Ligament and tendon substitution with composite carbon fiber strands. *J Biomed Mater Res.* 1986;20(6):699-708.

147. Menini M, Pesce P, Pera F, Barberis F, Lagazzo A, Bertola L, Pera P. Biological and mechanical characterization of carbon fiber frameworks for dental implant applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;70(Pt1):646-655.
148. Merolli A, Rocchi L, De Spirito M, Federico F, Morini A, Mingarelli L, Fanfani F. Debris of carbon-fibers originated from a CFRP (pEEK) wrist-plate triggered a destruent synovitis in human. *J Mater Sci Mater Med.* 2016;27(3):50.
149. Merolli A, Mao Y, Kohn J. A suspended carbon fiber culture to model myelination by human Schwann cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2017;28(4):57.
150. Milka S, Wójcik B, Nowak R. [Early results of coracoclavicular ligament reconstruction with carbon fiber prosthesis in patients with acromioclavicular dislocation]. *Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol.* 1994;59(6):491-496.
151. Minns RJ, Muckle DS. Mechanical and histological response of carbon fibre pads implanted in the rabbit patella. *Biomaterials.* 1989;10(4):273-276.
152. Minns RJ, Sutton RA. Carbon fibre pad insertion as a method of achieving soft tissue augmentation in order to reduce the liability to pressure sore development in the spinal injury patient. *Br J Plast Surg.* 1991;44(8):615-618.
153. Miyazaki T, Matsunami C, Shirosaki Y. Bioactive carbon-PEEK composites prepared by chemical surface treatment. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;70(Pt 1):71-75.
154. Mnatsakanian A, Kissel JT, Terry P, King WM. One clinic's experience with carbon fiber orthoses in neuromuscular disease. *Muscle Nerve.* 2017;55(2):202-205.
155. Mobini S, Walker DF, Crawley RR. An experimental evaluation of the response of the bull penis to carbon fiber implants. *Cornell Vet.* 1982;72(4):350-360.
156. Morais JM, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ. Biomaterials/tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response. *AAPS J.* 2010;12(2):188-196.
157. Morrison C, Macnair R, MacDonald C, Wykman A, Goldie I, Grant MH. In vitro biocompatibility testing of polymers for prthopaedic implants using cultured fibroblasts and osteoblasts. *Biomaterials.* 1995; 16(13):987-992.
158. Morrow T. Material gain: CarboFix's carbon fiber hardware better than metal implants. *Manag Care.* 2016;25(10):34-35.

159. Mortier J, Engelhardt M. Foreign body reaction in carbon fiber prosthesis implantation in the knee joint –case report and review of the literature. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 2000; 138:390-394.
160. Muckle DS, Minns RJ. Biological response to woven carbon fibre pads in the knee. A clinical and experimental study. *J Bone Joint Surg Br.* 1990;72(1):60-62.
161. Murray PE, Godoy CG, Godoy FG. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007; 12:E258-E260.
162. Najeeb S, Khurshid Z, Matinlinna JP, Siddiqui F, Nassani MZ, Baroudi K. Nanomodified PEEK Dental Implants: Bioactive Composites and Surface Modification-A Review. *Int J Dent.* 2015;2015:381759.
163. Nakahara I, Takao M, Goto T, Ohtsuki C, Hibino S, Sugano N. Interfacial shear strength of bioactive-coated carbon fiber reinforced polyetheretherketone after in vivo implantation. *J Orthop Res.* 2012;30(10):1618-25.
164. Nakahara I, Takao M, Bandoh S, Bertollo N, Walsh WR, Sugano N. In vivo implant fixation of carbon fiber-reinforced PEEK hip prostheses in an ovine model. *J Orthop Res.* 2013;31(3):485-492.
165. Nakashima Y, Sun DH, Trindade MC, Chun LE, Song Y, Goodman SB, Schurman DJ, Maloney WJ, Smith RL. Induction of macrophage C-C chemokine expression by titanium alloy and bone cement particles. *J. Bone Joint Surg. Br.* 1999;81:155-162.
166. Naumann M, Sterzenbach G, Alexandra F, Dietrich T. Randomized controlled clinical pilot trial of titanium vs. glass fiber prefabricated posts: preliminary results after up to 3 years. *Int J Prosthodont* 2007;20(5):499-503.
167. Neugebauer R, Claes L. The biological reaction of the tissues to carbon fibre ligament prosthesis in sheep-knees. *Aktuelle Probl Chir Orthop.* 1983;26:96-100.
168. Neumann EA, Villar CC, França FM. Fracture resistance of abutment screws made of titanium, polyetheretherketone, and carbon fiber-reinforced polyetheretherketone. *Braz Oral Res.* 2014;28. pii: S1806-83242014000100239.
169. O'Connor J, McCaughan D, McDaid C, Booth A, Fayter D, Rodriguez-Lopez R, Bowers R, Dyson L, Iglesias CP, Lalor S, O'Connor RJ, Phillips M, Ramdharry G. Orthotic management of instability of the knee related to neuromuscular and central nervous

- system disorders: systematic review, qualitative study, survey and costing analysis. *Health Technol Assess.* 2016;20(55):1-262.
170. Olesen HP, Levander B, Kofoed H. Strength of implanted carbon fibers. *Studies of the lumbar spine in goats. Acta Orthop Scand.* 1988;59(1):53-55.
171. Oven GHR, Meredith DO, ap Gwynn I, Richards RG. Focal adhesion quantification – a new assay of material biocompatibility? *Review. Eur Cells Mat.* 2015; 9:85-96.
172. Pajarinen J, Kouri VP, Jamsen E, Li TF, Mandelin J, Konttinen YT. The response of macrophages to titanium particles is determined by macrophage polarization. *Acta Biomater.* 2013; 9:9229-9240.
173. Parsons JR, Weiss AB, Schenk RS, Alexander H, Pavlisko F. Long-term follow-up of achilles tendon repair with an absorbable polymer carbon fiber composite. *Foot Ankle.* 1989;9(4):179-184.
174. Patel A, Mukundan S, Wang W, Karumuri A, Sant V, Mukhopadhyay SM, Sant S. Carbon-based hierarchical scaffolds for myoblast differentiation: Synergy between nano-functionalization and alignment. *Acta Biomater.* 2016;32:77-88.
175. Patel PR, Zhang H, Robbins MT, Nofar JB, Marshall SP, Kobylarek MJ, Kozai TD, Kotov NA, Chestek CA. Chronic in vivo stability assessment of carbon fiber microelectrode arrays. *J Neural Eng.* 2016;13(6):066002.
176. Paul NE, Skazik C, Harwardt M, Bartneck M, Denecke B, Klee D, Salbe, J, Zwadlo-Klarwasser G. Topographical control of human macrophages by a regularly microstructured polyvinylidene fluoride surface. *Biomaterials.* 2008; 29: 4056-4064.
177. Paulus AC, Haßelt S, Jansson V, Giurea A, Neuhaus H, Grupp TM, Utzschneider S. Histopathological analysis of PEEK wear particle effects on the synovial tissue of patients. *Biomed Res Int.* 2016;2016:2198914 (5 pages).
178. Pellisé F, Puig O, Rivas A, Bagó J, Villanueva C. Low fusion rate after L5-S1 laparoscopic anterior lumbar interbody fusion using twin stand-alone carbon fiber cages. *Spine (Phila Pa 1976).* 2002;27(15):1665-1669.
179. Peluso G, Ambrosio L, Cinquegrani M, Nicolais L, Tajana G. Macrophage activation induced by different carbon fiber-epoxy resin composites. *J Biomed Mater Res.* 1991;25(5):637-649.



180. Peluso G, Ambrosio L, Cinquegrani M, Nicolais L, Saiello S, Tajana G. Rat peritoneal immune response to carbon fibre reinforced epoxy composite implants. *Biomaterials*. 1991;12(2):231-235.
181. Pera F, Pesce P, Solimano F, Tealdo T, Pera P, Menini M. Carbon fiber vs. metal framework in full-arch immediate loading rehabilitations of the maxilla – a cohort clinical study. *J Oral Rehabil*. 2017 Feb 14. doi: 10.1111/joor.12493.
182. Petersen RC. Bisphenyl-polymer/carbon-fiber-reinforced composite compared to titanium alloy bone implant. *Int J Polym Sci*. 2011;2011. pii: 168924.
183. Petersen RC. Titanium implant osseointegration problems with alternate solutions using epoxy/carbon-fiber-reinforced composite. *Metals (Basel)*. 2014;4(4):549-569.
184. Petersen R. Carbon fiber biocompatibility for implants. *Fibers (Basel)*. 2016;4(1):pii:1.
185. Phemister DB. The fate of transplanted bone and regenerative power of its various constituents. *Surg Gynecol Obstet*. 1914; 19:303.
186. Piovesan EM, Demarco FF, Cenci MS, Pereira-Cenci T. Survival rates of endodontically treated teeth restored with fiber-reinforced custom posts and cores: a 97-month study. *Int J Prosthodont* 2007;20(6):633-639.
187. Polovina M. Aktivni karbonski vlaknasti materijali. U: Marinković S, Laušević Z, Polovina M. Savremeni karbonski materijali, Institut za nuklearne nauke “Vinča”, Beograd, 1999, str. 101-126.
188. Price RL, Waid MC, Haberstroh KM, Webster TJ. Selective bone cell adhesion on formulations containing carbon nanofibers. *Biomaterials*. 2003; 24(11):1877-1887.
189. Price RL, Ellison K, Haberstroh KM, Webster TJ. Nanometer surface roughness increases select osteoblast adhesion on carbon nanofiber compacts. *J Biomed Mater Res A*. 2004; 70(1):129-138.
190. Prokic BB, Bacic GG, Prokic BB, Kalijadis AM, Todorovic VN, Puskas NS, Vidojevic D, Lausevic MD, Lausevic ZV. In vivo MRI biocompatibility evaluation of functionalized carbon fibers in reaction with soft tissues. *Acta Vet-Beograd*. 2012; 62(5-6):683-696. Qi L, Liu D, Han Z, Wang F. Design and study of carbon fiber tracheal prosthesis. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 1998;15(4):328-334.

192. Queipo-de-Llano A, Lombardo-Torre M, Leiva-Gea A, Delgado-Rufino FB, Luna-González F. Anterior pre-tensioned external fixator for pelvic fractures and dislocations. Initial clinical series. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2016;102(8):1103-1108.
193. Quigley KJ, Alander DH, Bledsoe JG. An in vitro biomechanical investigation: variable positioning of leopard carbon fiber interbody cages. *J Spinal Disord Tech.* 2008;21(6):442-447.
194. Rajzer I, Menaszek E, Bacakova L, Rom M, Blazewicz M. In vitro and in vivo studies on biocompatibility of carbon fibres. *J Mater Sci Mater Med.* 2010; 21(9):2611–2622.
195. Rastogi V, Puri N, Arora S, Kaur G, Yadav L, Sharma R. Artefacts: a diagnostic dilemma e a review. *J Clin Diagn Res.* 2013;7:2408e13.
196. Rathore RS, Srivastava DK, Agarwal AK, Verma N. Development of surface functionalized activated carbon fiber for control of NO and particulate matter. *J Hazard Mater.* 2010;173(1-3): 211-222.
197. Ratner BD, Bryant SJ. Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annu Rev Biomed Eng* 2004;6:41-75. Rawlins R. The role of carbon fibre as a flexor tendon substitute. *Hand.* 1983;15(2):145-148.
199. Robertson D, Zhao Z, Wang X, Yang J. SU-F-T-515: Increased skin dose in supine craniospinal irradiation due to carbon fiber couch and vacuum bag immobilization device. *Med Phys.* 2016;43(6):3581-3582.
200. Rogers TH, Babensee JE. Altered adherent leukocyte profile on biomaterials in Toll-like receptor 4 deficient mice. *Biomaterials* 2010; 31:594-601.
201. Rohe K, Braun A, Cotta H. Carbon band implants in animal experiments. Light and transmission electron microscopy studies of biocompatibility. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 1986;124(5):569-577.
202. Rostam H. M., Singh, S., Vrana, N. E., Alexander, M. R., Ghaemmaghami, A. M. (2015) Impact of surface chemistry and topography on the function of antigen presenting cells. *Biomater. Sci.* 3, 424–441.
203. Salame K, Ouaknine GE, Razon N, Rochkind S. The use of carbon fiber cages in anterior cervical interbody fusion: report of 100 cases. *Neurosurg Focus.* 2002;12(1):E1.

204. Samiezadeh S, Fawaz Z, Bougherara H. Biomechanical properties of a structurally optimized carbon-fibre/epoxy intramedullary nail for femoral shaft fracture fixation. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016;56:87-97.
205. Sánchez-Sánchez A, Suárez-García F, Martínez-Alonso A, Tascón JM. Influence of porous texture and surface chemistry on the CO<sub>2</sub> adsorption capacity of porous carbons: acidic and basic site interactions. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014;6(23):21237-21247.
206. Sardar Z, Jarzem P. Failure of a carbon fiber-reinforced polymer implant used for transforaminal lumbar interbody fusion. *Global Spine J*. 2013;3(4):253-256.
207. Saringer W, Nöbauer-Huhmann I, Knosp E. Cranioplasty with individual carbon fibre reinforced polymere (CFRP) medical grade implants based on CAD/CAM technique. *Acta Neurochir (Wien)*. 2002;144(11):1193-11203.
208. Savage G. *Carbon-Carbon Composites*. Chapman and Hall, London, 1993.
209. Schierjott RA, Giurea A, Neuhaus HJ, Schwiesau J, Pfaff AM, Utzschneider S, Tozzi G, Grupp TM. Analysis of carbon fiber reinforced PEEK hinge mechanism articulation components in a rotating hinge knee design: a comparison of in vitro and retrieval findings. *Biomed Res Int*. 2016;2016:7032830.
210. Schliemann B, Seifert R, Theisen C, Gehweiler D, Wähnert D, Schulze M, Raschke MJ, Weimann A. PEEK versus titanium locking plates for proximal humerus fracture fixation: a comparative biomechanical study in two- and three-part fractures. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2017;137(1):63-71.
211. Schwitalla AD, Abou-Emara M, Spintig T, Lackmann J, Müller WD. Finite element analysis of the biomechanical effects of PEEK dental implants on the peri-implant bone. *J Biomech*. 2015;48(1):1-7.
212. Schwitalla AD, Spintig T, Kallage I, Müller WD. Flexural behavior of PEEK materials for dental application. *Dent Mater*. 2015a;31(11):1377-1384.
213. Schwitalla AD, Zimmermann T, Spintig T, Kallage I, Müller WD. Fatigue limits of different PEEK materials for dental implants. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016; 23;69:163-168.
214. Sebők B, Kiss G, Szabó PJ, Rigler D, Molnár LM, Dobos G, Réti F, Szócs H, Joób FÁ, Körmöczi K, Szabó G. Carbon/carbon implants in oral and maxillofacial surgery-Part 2. *Orv Hetil*. 2012;153(19):744-750.

215. Shanbhag AS, JaconsJJ, Black J, Galante JO, Glant TT. Macrophage/particle interactions: effect of size, composition and surface area. *J Biomed Mat Res.* 1994; 28(1):81-90.
216. Sheehan C, Figgins E. A comparison of mechanical properties between different percentage layups of a single-style carbon fibre ankle foot orthosis. *Prosthet Orthot Int.* 2016 Jun 30. pii: 0309364616652015.
217. Shono Y, McAfee PC, Cunningham BW, Brantigan JW. A biomechanical analysis of decompression and reconstruction methods in the cervical spine. Emphasis on a carbon-fiber-composite cage. *J Bone Joint Surg Am.* 1993;75(11):1674-84.
218. Sim E, Wicke L, Neuhold A, Fezoulidis I. Comparison of the value of magnetic resonance tomography and computerized tomography in the follow-up of augmentation-plasties with carbon fiber ligaments of the anterior cruciate ligament. *Unfallchirurgie.* 1989;15(3):152-161.
219. Sitharaman B, Shi X, Walboomers F, Liao H, Cuijpers V, Wilson LJ, Mikos AG, Jansen JA. In vivo biocompatibility of ultra-short single-walled carbon nanotube /biodegradable polymer nanocomposites for bone tissue engineering. *Bone* 2008; 43 (2):362–370.
220. Stankevich KS, Gudima A, Filimonov VD, Klüter H, Mamontova EM, Tverdokhlebov SI, Kzhyshkowska J. Surface modification of biomaterials based on high-molecular polylactic acid and their effect on inflammatory reactions of primary human monocyte-derived macrophages: perspective for personalized therapy. *Mater. Sci. Eng. C* 2015;51: 117-126.
221. Steinberg EL, Rath E, Shlaifer A, Chechik O, Maman E, Salai M. Carbon fiber reinforced PEEK Optima – a composite material biomechanical properties and wear/debris characteristics of CF-PEEK composites for orthopedic trauma implants. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2013;17:221-228.
222. Steyn DG. The use of carbon fibre to replace the torn cranial cruciate ligament in the dog – a clinical procedure. *J S Afr Vet Assoc.* 1984;55(1):29-32.
223. Stromberg L, Toohey JS, Neidre A, Ramsey M, Brantigan JW. Complications and surgical considerations in posterior lumbar interbody fusion with carbon fiber interbody cages and Steffee pedicle screws and plates. *Orthopedics.* 2003;26(10):1039-1043.
224. Stübinger S, Drechsler A, Bürki A, Klein K, Kronen P, von Rechenberg B. Titanium and hydroxyapatite coating of polyetheretherketone and carbon fiber-reinforced

- polyetheretherketone: A pilot study in sheep. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2016;104(6):1182-1191.
225. Sussman EM, Halpin MC, Muster J, Moon RT, Ratner BD. Porous implants modulate healing and induce shifts in local macrophage polarization in the foreign body reaction. *Ann Biomed Eng.* 2014;42:1508-1516.
226. Takahama T, Onishi K, Kanai F, Hiraishi M, Yamazaki Z, Furuse A, Yoshitake T. A new improved biodegradable tracheal prosthesis using hydroxy apatite and carbon fiber. *ASAIO Trans.* 1989;35(3):291-293.
227. Tamon H, Okazaki M. Influence of surface oxides on ethanol regeneration of spent carbonaceous adsorbents. *J Colloid Interface Sci.* 1997;196(1):120-122.
228. Tancredi A, Agrillo A, Delfini R, Fiume D, Frati A, Rinaldi A. Use of carbon fiber cages for treatment of cervical myeloradiculopathies. *Surg Neurol.* 2004;61(3):221-226; discussion 226.
229. Tang SF, Chen CP, Chen MJ, Chen WP, Leong CP, Chu NK. Transmetatarsal amputation prosthesis with carbon-fiber plate: enhanced gait function. *Am J Phys Med Rehabil.* 2004; 83(2): 124-130.
230. Tarallo L, Mugnai R, Adani R, Zambianchi F, Catani F. A new volar plate made of carbon-fiber-reinforced polyetheretherketon for distal radius fracture: analysis of 40 cases. *J Orthop Traumatol.* 2014;15(4):277-283.
231. Teichgraeber JF, Spector M, Per-Lee JH, Jackson RT. Tissue response to Plasti-Pore and Proplast otologic implants in the middle ears of cats. *Am J Otol.* 1983;5(2):127-136.
232. Thomas NP, Turner IG, Jones CB. Prosthetic anterior cruciate ligaments in the rabbit. A comparison of four types of replacement. *J Bone Joint Surg Br.* 1987;69(2):312-316.
233. Timothy J, Wilson J, Rice E, Hall R. Nanocrystalline hydroxyapatite intervertebral cages induce fusion after anterior cervical discectomy and may be a safe alternative to PEEK or carbon fiber intervertebral cages. *Br J Neurosurg.* 2016;30(6):654-657.
234. Tremoleda JL, Khalil M, Gompels LL, Wylezinska-Arridge M, Vincent T, Gsell W. Imaging technologies for preclinical models of bone and joint disorders. *EJNMMI Res* 2011;1:1e14.

235. Valdez H, Coy CH, Swanson T. Flexible carbon fiber for repair of gastrocnemius and superficial digital flexor tendons in a heifer and gastrocnemius tendon in a foal. *J Am Vet Med Assoc.* 1982;181(2):154-157.
236. van Berlo D, Clift MJ, Albrecht C, Schins RP. Carbon nanotubes: an insight into the mechanisms of their potential genotoxicity. *Swiss Med Wkly.* 2012;142:w13698.
237. Varshney V, Roy AK, Baur JW. Modeling the role of bulk and surface characteristics of carbon fiber on thermal conductance across the carbon-fiber/matrix interface. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7(48):26674-26683.
238. Vaughan LC, Edwards GB, Gerring EL. Tendon injuries in horses treated with carbon fibre implants. *Equine Vet J.* 1985;17(1):45-50.
239. Vavruch L, Hedlund R, Javid D, Leszniewski W, Shalabi A. A prospective randomized comparison between the cloward procedure and a carbon fiber cage in the cervical spine: a clinical and radiologic study. *Spine (Phila Pa 1976).* 2002;27(16):1694-1701.
240. Veth RP, den Heeten GJ, Jansen HW, Nielsen HK. An experimental study of reconstructive procedures in lesions of the meniscus. Use of synovial flaps and carbon fiber implants for artificially made lesions in the meniscus of the rabbit. *Clin Orthop Relat Res.* 1983;(181):250-254.
241. Veth RP, Jansen HW, Leenslag JW, Pennings AJ, Hartel RM, Nielsen HK. Experimental meniscal lesions reconstructed with a carbon fiber-polyurethane-poly(L-lactide) graft. *Clin Orthop Relat Res.* 1986;(202):286-193.
242. Vujačić A, Konić A, Pavlović J, Todorović V, Vukićević V, Jevremović D, Milošević-Jovčić N. Differences in IL-1 $\beta$  and IL-6 levels in the gingival crevicular fluid during acute phase of orthodontic tooth movement: juveniles versus young adults. *Vojnosan Pregl.* 2017; 74(3):219-226.
243. Vukčević M. Uticaj morfologije i površinskih grupa nanoporoznih ugljeničnih materijala na adsorpciju pesticida iz vode. Doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu, 2013.
244. Vukcevic MM, Kalijadis AM, Radisic MM, Pejic BM, Kostic MM, Lausevic ZV, Lausevic MD. Application of carbonized hemp fibers as a new solid-phase extraction sorbent for analysis of pesticides in water samples. *Chem Eng J.* 2012; 211:224-232.

245. Vukcevic MM, Kalijadis AM, Babic BM, Lausevic ZV, Lausevic MD. Influence of different carbon monolith preparation parameters on pesticide adsorption. *J Serb Chem Soc.* 2013; 78(10): 1617-1632.
246. Vukcevic MM, Pejic BM, Kalijadis AM, Pajic-Lijakovic IS, Kostic MM, Lausevic ZV, Lausevic MD. Carbon materials from waste short hemp fibers as a sorbent for heavy metal ions - Mathematical modeling of sorbent structure and ions transport. *Chem Eng J.* 2014; 235:284-292.
247. Vukcevic MM, Kalijadis AM, Vasiljevic TM, Babic BM, Lausevic ZV, Lausevic MD. Production of activated carbon derived from waste hemp (*Cannabis sativa*) fibers and its performance in pesticide adsorption. *Micropor Mesopor Mater.* 2015; 214:156-165.
248. Wang X, Lu T, Wen J, Xu L, Zeng D, Wu Q, Cao L, Lin S, Liu X, Jiang X. Selective responses of human gingival fibroblasts and bacteria on carbon fiber reinforced polyetheretherketone with multilevel nanostructured TiO<sub>2</sub>. *Biomaterials.* 2016;83:207-218.
249. Weiss AB, Blazina ME, Goldstein AR, Alexander H. Ligament replacement with an absorbable copolymer carbon fiber scaffold-early clinical experience. *Clin Orthop Relat Res.* 1985;196:77-85.
250. Williams A, Szabo RM. Bone transplantation. *Orthopedics.* 2004; 27;5:488-495.
251. Williams DF. *Definitions in biomaterials.* Elsevier: Oxford, UK, 1987.
252. Wilson WK, Morris RP, Ward AJ, Carayannopoulos NL, Panchbhavi VK. Torsional failure of carbon fiber composite plates versus stainless steel plates for comminuted distal fibula fractures. *Foot Ankle Int.* 2016;37(5):548-553.
253. Wolter D. Biocompatibility of carbon fibre and carbon fibre microparticles. *Aktuelle Probl Chir Orthop.* 1983;26:28-36.
254. Wood DJ, Minns RJ, Strover A. Replacement of the rabbit medial meniscus with a polyester-carbon fibre bioprosthesis. *Biomaterials.* 1990;11(1):13-16.
255. Wurm G, Tomancok B, Holl K, Trenkler J. Prospective study on cranioplasty with individual carbon fiber reinforced polymer (CFRP) implants produced by means of stereolithography. *Surg Neurol.* 2004;62(6):510-521.
256. [http://www.torayca.com/en/lineup/product/pro\\_001\\_01.html](http://www.torayca.com/en/lineup/product/pro_001_01.html)

257. Xiao B, Thomas KM. Adsorption of aqueous metal ions on oxygen and nitrogen functionalized nanoporous activated carbons. *Langmuir*. 2005;21(9):3892-3902.
258. Xin-ye N, Xiao-bin T, Chang-ran G, Da C. The prospect of carbon fiber implants in radiotherapy. *J Appl Clin Med Phys*. 2012;13(4):3821.
259. Xu A, Liu X, Gao X, Deng F, Deng Y, Wei S. Enhancement of osteogenesis on micro/nano-topographical carbon fiber-reinforced polyetheretherketone-nanohydroxyapatite biocomposite. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015;48:592-528.
260. Yagil-Kelmel E, Kazmier P, Rahaman MN, Bal BS, Tessman RK, Estes DM. Comparison of the response of primary human blood monocytes and the U937 human monocytes cell line to two different sizes of alumina ceramic particles. *J Orthop Res*. 2004; 22:832-838.
261. Yang C, Jacobs CB, Nguyen MD, Ganesana M, Zestos AG, Ivanov IN, Poretzky AA, Rouleau CM, Geohegan DB, Venton BJ. Carbon nanotubes grown on metal microelectrodes for the detection of dopamine. *Anal Chem*. 2016;88(1):645-652.
262. Ying RQ. Reconstruction of maxillofacial defects and malformations with a carbon and titanium alloy. *Zhonghua Kou Qiang Ke Za Zhi*. 1985;20(6):351-353, 383.
263. Zamorska L, Blazewicz M, Papiez M, Zolnierek M, Nowak B. The regeneration and tissue response to carbon implants in rat skeletal muscle. In: *Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Process of the Organism, Proceedings of 7th International Symposium of the Polish Network of Molecular and Cellular Biology UNESCO/PAS*. Lach H (ed.). Pedagogical Univ, Cracow, Poland. 1998; p. 134.
264. Zeilhofer HF, Sader R, Früh HJ, Neff A, Horch HH. Possibilities and indications for carbon fiber reinforced synthetic materials for designing individual implants for reconstruction of the facial bones and skull. *Biomed Tech (Berl)*. 1997;42 (Suppl):361-362.
265. Zelle B, König F, Enderle A, Bertagnoli R, Dorner J. Circumferential fusion of the lumbar and lumbosacral spine using a carbon fiber ALIF cage implant versus autogenous bone graft: a comparative study. *J Spinal Disord Tech*. 2002;15(5):369-376.
266. Zhang Q, Yang Z, Peng W. Morphological observation of combined-culture of tendon cell or fibroblast of rabbit with artificial materials in vitro. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 1997a;11(2):103-105.



267. Zhang Q, Yang Z, Peng W. Experimental study in vivo on implantation of autogenous tendon cells after combining culture with carbon fibers. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 1997b;11(3):168-171.
268. Zhang Q, Jiang D, Liu L, Huang Y, Long J, Wu G, Wu Z, Umar A, Guo J, Zhang X, Guo Z. Effects of graphene oxide modified sizing agents on interfacial properties of carbon fibers/epoxy composites. *J Nanosci Nanotechnol*. 2015;15(12):9807-9811.
269. Zhao F, Liu R, Yu X, Ding H, Qu X, Zhang Q. Carbon fiber grafted with nanodiamond: Preparation and characterization. *J Nanosci Nanotechnol*. 2015;15(8):5807-5815.
270. Zhao Z, Gou J. Improved fire retardancy of thermoset composites modified with carbon nanofibers. *Sci. Technol. Adv. Mater*. 2009; 10(1):015005. eCollection 2009.
271. Zheng J, Xiao Y, Gong T, Zhou S, Troczynski T, Yang Q, Bao C, Xu X. Fabrication and characterization of a novel carbon fiber-reinforced calcium phosphate silicate bone cement with potential osteo-inductivity. *Biomed Mater*. 2015;11(1):015003.
272. Zhi Y, Liu J. Surface modification of activated carbon for enhanced adsorption of perfluoroalkyl acids from aqueous solutions. *Chemosphere*. 2016;144:1224-1232.
273. Zhu N, Ma S, Sun X. Nitrogen-doped carbon fiber paper by active screen plasma nitriding and its microwave heating properties. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(51): 35606-35613.
274. Zoccali C, Soriani A, Rossi B, Salducca N, Biagini R. The Carbofix™ “Piccolo Proximal femur nail”: A new perspective for treating proximal femur lesion. A technique report. *J Orthop*. 2016;13(4):343-346.
275. Zou X, Xue Q, Li H, Büniger M, Lind M, Bünge C. Effect of alendronate on bone ingrowth into porous tantalum and carbon fiber interbody devices: an experimental study on spinal fusion in pigs. *Acta Orthop Scand*. 2003;74(5):596-603.

## BIOGRAFIJA

Bogomir Bolka Prokić rođen je 21. 5. 1982. u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju u Beogradu završio je sa odličnim uspehom. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu (FVMUB) upisao je šk. 2001/2002, a diplomirao je 2009. godine sa prosečnom ocenom 8,22. U toku redovnih studija, u okviru TEMPUS programa međufakultetske razmene studenata, boravio je šk. 2005/2006. jedan semestar na Veterinarskom fakultetu u Solunu, gde je stekao dodatno stručno i praktično znanje u radu sa malim i velikim životinjama.

Na doktorske studije na FVMUB upisao se šk. 2010/2011. godine, a sve propisane ispite položio je sa prosečnom ocenom 9,41.

Od 2011. godine dipl. vet. Bogomir Bolka Prokić angažovan je kao istraživač-pripravnik u okviru projekta „Fizika i hemija sa jonskim snopovima” (evid. br. III45006, rukovodilac dr Srđan Petrović, naučni savetnik Instituta za nuklearne nauke „Vinča” u Beogradu), a doktorska disertacija realizovana je u okviru podprojekta „Nanomodifikacija i analiza materijala sa jonskim snopovima”, kojim rukovodi dr Zoran Laušević, naučni savetnik Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, a koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, za istraživački period 2011-2017. godina.

U periodu 2011–2014. godina bio je zaposlen na određeno vreme na FVMUB, kao stipendista doktorant Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja RS, a za asistenta za užu naučnu oblast *Veterinarska hirurgija* izabran je 17. 9. 2014. godine i od tada je uključen u izvođenje praktične nastave iz predmeta *Opšta hirurgija*, *Specijalna hirurgija* i *Anesteziologija*.

Član je Etičkog komiteta Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu i Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Koautor ili autor je 30 objavljenih ili saopštenih radova, među kojima se ističe jedan rad u vrhunskom međunarodnom časopisu i pet radova u međunarodnim časopisima. Takođe, koautor je dva poglavlja u udžbeniku *Veterinarska anesteziologija*, za studente FVMUB. Bio je član Organizacionog odbora XI srpskog kongresa i balkanskog simpozijuma anesteziologa i intenzivista, održanog u Beogradu 2010. godine.

Diplomirani vet. Bogomir Bolka Prokić obučen je za kompletan rad sa eksperimentalnim životinjama, uključujući i anesteziju (Certificate, RSPCA 2012).

Aktivno govori engleski jezik, a služi se nemačkim.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани Богомир Болка Прокић

број уписа: 15/6

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање биокомпатибилности функционализованих карбонских влакана у поткожном и мишићном ткиву кунића

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

Потпис докторанда

У Београду, 27.06.2017.



---

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Богомир Болка Прокић

Број уписа: 15/6

Студијски програм: Докторске академске студије

Наслов рада : Испитивање биокompatибилности функционализованих карбонских  
влакана у поткожном и мишићном ткиву кунића

Ментор: Проф. др Никола Крстић

Коментор: Проф. др Вера Тодоровић

Потписани: Богомир Болка Прокић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској  
верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног  
репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања  
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.

У Београду, 27.06.2017.

Потпис докторанда



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Испитивање биокompatибилности функционализованих карбонских влакана у поткожном и мишићном ткиву кунџа

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 27.06.2017.

Потпис докторанда

