

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET ZA FIZIČKU HEMIJU

Maja M. Mićić

**Radijaciona sinteza i karakterizacija
kopolimernih hidrogelova na bazi
2-hidroksietil metakrilata i
funkcionalizovanih oligo(alkilen glikol)
(met)akrilata**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

Maja M. Mićić

**Radiation synthesis and
characterization of copolymeric
hydrogels based on 2-hydroxyethyl
methacrylate and functionalized
oligo(alkylene glycol) (meth)acrylate**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

Mentori:

dr Goran Bačić, redovni profesor

Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu

dr Edin Suljovrujić, naučni savetnik

Institut za nuklearne nauke “Vinča”, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Goran Bačić, redovni profesor

Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu

dr Edin Suljovrujić, naučni savetnik

Institut za nuklearne nauke “Vinča”, Univerzitet u Beogradu

dr Borivoj Adnađević, redovni profesor

Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za radijacionu hemiju i fiziku „Gama“, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ pod rukovodstvom dr Edina Suljovrujića, naučnog savetnika INN „Vinča“, Univerziteta u Beogradu, kome dugujem posebnu zahvalnost za predloženu temu, stručnu pomoć, podršku i strpljenje koje mi je pružio tokom izrade disertacije.

Veliko hvala dr Goranu Bačiću i dr Borivoju Adnađeviću, redovnim profesorima Fakulteta za fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu, na posvećenom vremenu, korisnim savetima, sugestijama i korekcijama tokom pisanja ove disertacije

Zahvalnost dugujem i dr Simonidi Tomić, docentu Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, koja me je uvela u svet hidrogelova, kao i kolegama sa Radijacione jedinice na pomoći prilikom sinteze uzoraka. Posebno hvala mojim dragim kolegama Dejanu i Saši na pomoći i podršci prilikom obrade eksperimentalnih rezultata i izradi disertacije.

I na kraju, veliko hvala mojim roditeljima, Miji i Daci, i sestri Ani, koji su uvek bili tu za mene, pružali mi neizmernu podršku, strpljenje i razumevanje tokom svih ovih godina.

Maja Mičić

Radijaciona sinteza i karakterizacija kopolimernih hidrogelova na bazi 2-hidroksietil metakrilata i funkcionalizovanih oligo(alkilen glikol) (met)akrilata

Rezime

Doktorska disertacija „Radijaciona sinteza i karakterizacija kopolimernih hidrogelova na bazi 2-hidroksietil metakrilata i funkcionalizovanih oligo(alkilen glikol) (met)akrilata“ je posledica rastućeg interesovanja za „pametnim“ polimernim biomaterijalima, među kojima hidrogelovi koji reaguju na stimulanse iz okolne sredine zauzimaju posebno mesto. Hidrogelovi, kao hidrofilne trodimenzionalne mreže polimernih lanaca, pokazuju sposobnost da apsorbuju i zadržavaju velike količine vode pri čemu bubre. „Pametni“ hidrogelovi podnose relativno velike i iznenadne promene u stepenu bubrenja, strukturi mreže i mehaničkoj jačini kao odgovor na male promene uslova u okolnoj sredini, što ih razlikuje od inertnih hidrogelova. Kao izuzetno interesantni i značajni pokazali su se hidrogelovi koji istovremeno reaguju na dva stimulanse, posebno na pH i temperaturu, zbog čega su dobili značajnu ulogu u polju medicine, u sistemima za kontrolisano oslobađanje lekova, kao skafoldi, biosenzori itd.

Cilj istraživanja doktorske disertacije bio je sinteza i karakterizacija nove klase hidrogelova na bazi 2-hidroksietil metakrilata (HEMA) i funkcionalizovanih oligo(alkilen glikol) (met)akrilata (OAG(M)A), sa dodatkom itakonske kiseline (IA), u cilju dobijanja „pametnih“ materijala. Polimerizacija je izvedena u radijacionoj jedinici za industrijsku sterilizaciju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, primenom izotopa ^{60}Co kao izvora visokoenergetskog γ zračenja. Radijaciono procesiranje materijala je komercijalan i relativno jeftin proces čije je izvođenje lako kontrolisati. Istovremeno dolazi i do sterilizacije proizvoda što je važno u slučaju medicinske primene.

Prilikom dobijanja nove klase „pametnih“ hidrogelova osnovna ideja je bila da se u inertni poli(2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA) hidrogel ugradi itakonska kiselina, kao pH reagujuća komponenta, a zatim i različiti OAG(M)A monomeri kao temperaturski reagujuće komponente. Na ovaj način dobijeni su hidrogelovi sa dualnim odzivom, pH i temperaturnim, i visokim stepenom biokompatibilnosti.

Sintetisani hidrogelovi podeljeni su u četiri grupe. Prvu grupu činili su hidrogelovi na bazi HEMA sa različitim udelima itakonske kiseline. Ugradnjom male količine IA u PHEMA matricu, dobijeni su P(HEMA/IA) hidrogelovi sa izraženim

reagovanjem na promenu pH. Ovi hidrogelovi pokazali su se pogodnim i kao nanoreaktori za sintezu nanočestica srebra. Radijaciono dobijeni Ag/P(HEMA/IA) nanokompozitni sistemi dali su dobre rezultate biokompatibilnosti i antimikrobne aktivnosti, što pruža široke mogućnosti njihove primene, posebno kao obloga za brže zarastanje rana i opekotina.

Ugradnjom oligo(etilen glikol) akrilata (OEGA), kao temperaturno reagujuće komponente, u P(HEMA/IA) hidrogel dobijeni su P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelovi, koji pored na pH reaguju i na temperaturu. Visok stepen bubrenja, dobre mehaničke osobine, kao i zadovoljavajuća biokompatibilnost čini ove hidrogelove kandidatima za medicinsku primenu. Iako reaguju na temperaturu, P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelovi ne pokazuju oštre fazne prelaze sa promenom temperature, već dolazi do linearnog pada stepena bubrenja sa porastom temperature.

U cilju detaljnijeg ispitivanja reagovanja na temperaturu OAG(M)A, sintetisani su P(HEMA/OPGMA) hidrogelovi na bazi PHEMA i oligo(propilen glikol) metakrilata (OPGMA), i na ovaj način dobijeni su hidrogelovi sa potpuno novim tipom temperaturne zavisnosti, sa strogo definisanim temperaturama faznih prelaza.

Četvrtu seriju čine P(HEMA/IA/OAG(M)A) hidrogelovi, u čiji sastav ulaze mešani oligo(alkilen glikol) (met)akrilati. Cilj je bio ispitivanje uticaja tipa OAG(M)A na osobine kopolimernih hidrogelova i mogućnost njihove primene kao nosača u sistemima za kontrolisano oslobađanje lekova, preko praćenja procesa oslobađanja gentamicin sulfata kao model leka.

Na ovaj način dobijena je široka paleta „pametnih“ hidrogelova sa pH odzivom i različitim tipovima reagovanja na temperaturu. Ispitan je uticaj različitih tipova oligo(alkilen glikol) (met)akrilata u kopolimernim hidrogelovima na osobine bubrenja, parametre mreže, mehaničke i morfološke osobine, kao i na biokompatibilnost. Predložene su moguće primene sintetisanih sistema u medicini i farmaciji.

Ključne reči: Radijaciona sinteza, γ zračenje, hidrogel, HEMA, IA, OEGA, OPGMA, stepen bubrenja, temperaturno reagujući hidrogel, pH reagujući hidrogel.

Naučna oblast: Fizička hemija

Uža naučna oblast: Fizička hemija materijala

UDK broj: 544.64

**Radiation synthesis and characterization of copolymeric hydrogels based
on 2-hydroxyethyl methacrylate and functionalized oligo(alkylene glycol)
(meth)acrylate**

Summary

PhD thesis “Radiation synthesis and characterization of copolymeric hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate and functionalized oligo(alkylene glycol) (meth)acrylate“ is the result of the growing interest in the “smart” polymeric biomaterials; among them stimuli-responsive hydrogels have a special place. Hydrogels, as hydrophilic three-dimensional polymer networks, show the ability to absorb and retain large amounts of water. “Smart” hydrogels undergo relatively large and sudden changes in the swelling degree, network structure and mechanical strength in response to the small changes in their environment. Particularly interesting and significant are hydrogels with dual responsiveness, pH and temperature, which have an important role in different fields such as drug delivery, scaffolds, biosensors, etc.

The aim of PhD thesis was the synthesis and characterization of a new class of hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), functionalized oligo(alkylene glycol) (meth)acrylate (OAG(M)A) and itaconic acid (IA), in order to obtain “smart” materials. Polymerization was carried out in “Vinca” Institute of Nuclear Sciences, in the radiation unit for industrial sterilization, using the isotope ^{60}Co as a source of high-energy γ radiation. This method offers unique advantages for the synthesis of new materials: it is a simple, additive-free process, reactions such as polymerisation and crosslinking can be easily controlled, and the process is relatively cheap. At the same time, the product is being sterilized, which is of high importance in the biomedical applications.

In the preparation of a new class of “smart” hydrogels, the basic idea was to incorporate IA, as pH responsive component, and the different OAG(M)A monomers as thermoresponsive components, in the inert PHEMA hydrogel. In this way, the obtained hydrogels possess dual responsiveness, both pH and thermo- responsiveness, and a high degree of biocompatibility.

Four groups of hydrogels were prepared. The first group consisted of hydrogels based on HEMA with different mole fraction of itaconic acid. Incorporation of a small amount of IA in the PHEMA, resulted in P(HEMA/IA) hydrogels with pronounced pH

responsiveness. These hydrogels are suitable as nanoreactors for the synthesis of silver nanoparticles. Ag/P(HEMA/IA) nanocomposites, obtained by γ radiation, showed good biocompatibility and antimicrobial activity, which provides a wide range of possibilities for their application, particularly as a coating for the faster healing of wounds and burns.

Incorporation of an oligo(ethylene glycol) acrylate (OEGA), as a thermoresponsive component, in the P(HEMA/IA) hydrogel, resulting in P(HEMA/IA/OEGA) hydrogels, which besides pH show and thermoresponsiveness. The high swelling degree and good mechanical properties, as well as satisfactory biocompatibility, makes these hydrogels suitable candidates for biomedical applications. Although they possess thermoresponsiveness, P(HEMA/IA/OEGA) hydrogels do not show sharp phase transitions with a change in temperature; there is only a linear decrease in swelling degree with the temperature increase.

In order to examine thermoresponsiveness of OAG(M)A in more detail, a third class of hydrogels it was synthesized, P(HEMA/OPGMA), based on PHEMA and oligo(propylene glycol) methacrylate (OPGMA), resulting in hydrogels with a new type of temperature dependence, with strictly defined phase transition temperatures.

The fourth series of P(HEMA/IA/OAG(M)A) hydrogels includes mixed oligo(alkylene glycol) (meth)acrylates. The aim was to investigate the influence of OAG(M)A on the properties of copolymer hydrogels, and the possibility of their use as a carrier in controlled drug delivery system, through the monitoring of the release process of gentamicin sulfate as a model drug.

In this way a wide variety of “smart” hydrogels were obtained, with pH responsiveness and different types of thermoresponsiveness. The influence of different types of oligo(alkylene glycol) (meth)acrylate in hydrogel on the swelling properties, network parameters, mechanical and morphological characteristics, as well as biocompatibility was investigated. Finally, the possible applications of these hydrogels in biomedicine and pharmacy were proposed.

Keywords: Radiation synthesis, γ radiation, hydrogel, HEMA, IA, OEGA, OPGMA, swelling degree, thermoresponsive hydrogel, pH responsive hydrogel.

Scientific field: Physical chemistry

Specialist scientific field: Physical chemistry of materials

UDK number: 544.64

Sadržaj

1. TEORIJSKI DEO	1
1.1 BIOMATERIJALI	1
1.2 HIDROGELOVI	3
1.2.1 Klasifikacija hidrogelova	4
1.2.2 Načini umrežavanja hidrogelova	5
1.2.2.1 Hemijski umreženi hidrogelovi	5
1.2.2.2 Fizički umreženi hidrogelovi	6
1.2.2.3 Umrežavanje zračenjem visoke energije	7
1.2.2.3.1 Radioliza vode	8
1.2.2.3.2 Reakcije makroradikala	9
1.2.3 „Pametni hidrogelovi“	12
1.2.3.1 pH reagujući hidrogelovi	13
1.2.3.2 Temperaturno reagujući polimeri	15
1.2.4 Termodinamika bubrenja hidrogelova	17
1.2.5 Difuzija fluida unutar hidrogela	21
1.2.6 Struktura mreže hidrogela	23
1.2.6.1 Zapreminski udeo polimera u nabubrelom stanju	24
1.2.6.2 Srednja molekulaska masa između čvorova mreže	24
1.2.6.3 Veličina pora	24
1.2.6.4 Gustina umreženja	25
1.2.6.5 Parametar interakcije polimer-rastvarač	26
1.2.7 Bubrenje hidrogelova	26
1.2.8 Mehanička svojstva hidrogelova	28
1.2.9 Biološke karakteristike hidrogelova	29
1.2.9.1 Biokompatibilnost	29
1.2.9.1.1 Proba citotoksičnosti	30
1.2.9.1.2 Hemolitička aktivnost	30
1.2.9.2 Test bakterijske penetracije	30
1.2.9.3 Antimikrobna aktivnost hidrogelova	31
1.2.10 Primena hidrogelova	31
1.2.10.1 Kontrolisano oslobađanje lekova	33
1.2.10.1.1 Proces oslobađanja leka kontrolisan difuzijom	35
1.2.10.1.2 Kinetika in vitro oslobađanja aktivnih supstanci	38
1.2.10.1.3 Proces oslobađanja leka kontrolisan bubrenjem	39
1.2.10.2 Hidrogelovi kao nosači za sintezu nanočestica	39
2. EKSPERIMENTALNI DEO	41
2.1 MONOMERI KORIŠĆENI ZA SINTEZU HIDROGELOVA	41
2.2 SINTEZA HIDROGELOVA	45

2.2.1 Sinteza hidrogelova na bazi 2-hidroksietil metakrilata, oligo(alkilen glikol) (met)akrilata i itakonske kiseline.....	45
2.2.2 Uticaj ukupne apsorbovane doze zračenja tokom procesa sinteze na sadržaj gel faze u hidrogelu	47
2.2.3 Sinteza nanočestica srebra u P(HEMA/IA) hidrogelovima.....	47
2.2.4 Priprema uzoraka za analizu kontrolisanog oslobađanja leka u in vitro uslovima.....	48
2.3 METODE KARAKTERIZACIJE HIDROGELOVA	49
2.3.1. Gravimetrijske metode	49
2.3.2 Difrakcija rendgenskih zraka (XRD).....	50
2.3.3 Skanirajuća elektronska mikroskopija (SEM).....	50
2.3.4 Spektroskopske metode	51
2.3.5 Dinamičko mehanička analiza (DMA).....	52
2.3.6 Termalne metode	52
2.3.7 Ispitivanje biokompatibilnosti hidrogelova	53
2.3.8 Test mikrobne penetracije	54
2.3.9 Određivanje antimikrobne aktivnosti hidrogelova	54
3. REZULTATI I DISKUSIJA.....	55
3.1 UTICAJ UKUPNE APSORBOVANE DOZE GAMA ZRAČENJA TOKOM PROCESA SINTEZE NA SADRŽAJ GEL FAZE U HIDROGELU	55
3.2 HIDROGELOVI NA BAZI 2-HIDROKSJETIL METAKRILATA I ITAKONSKE KISELINE P(HEMA/IA)	57
3.2.1. P(HEMA/IA) hidrogelovi kao nosača za sintezu nanočestica srebra.....	63
3.3 HIDROGELOVI NA BAZI 2-HIDROKSJETIL METAKRILATA, ITAKONSKE KISELINE I OLIGO(ETILEN GLIKOL) AKRILATA P(HEMA/IA/OEGA)	70
3.4 HIDROGELOVI NA BAZI 2-HIDROKSJETIL METAKRILATA I OLIGO(PROPILEN) GLIKOL METAKRILATA P(HEMA/OPGMA)	80
3.5 HIDROGELOVI NA BAZI 2-HIDROKSJETIL METAKRILATA, ITAKONSKE KISELINE I OLIGO(ALKILEN GLIKOL) (MET)AKRILATA P(HEMA/IA/OAG(M)A)	91
3.5.1 In vitro kontrolisano oslobađanje antibiotika iz polimerne matrice	93
3.5.2 Ispitivanje antibakterijske aktivnosti P(HEMA/IA/OAG(M)A) hidrogelova sa apsorbovanim lekom.....	96
4. ZAKLJUČAK	98
LITERATURA.....	102
BIOGRAFIJA	115
BIBLIOGRAFIJA	116

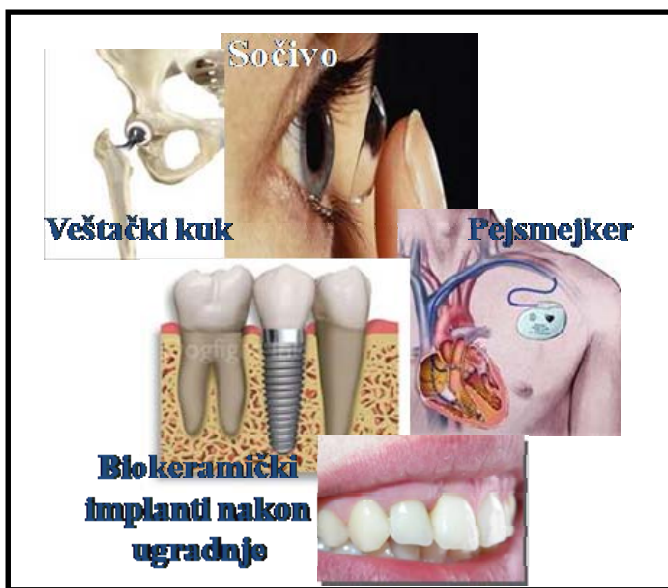
1. Teorijski deo

1.1 Biomaterijali

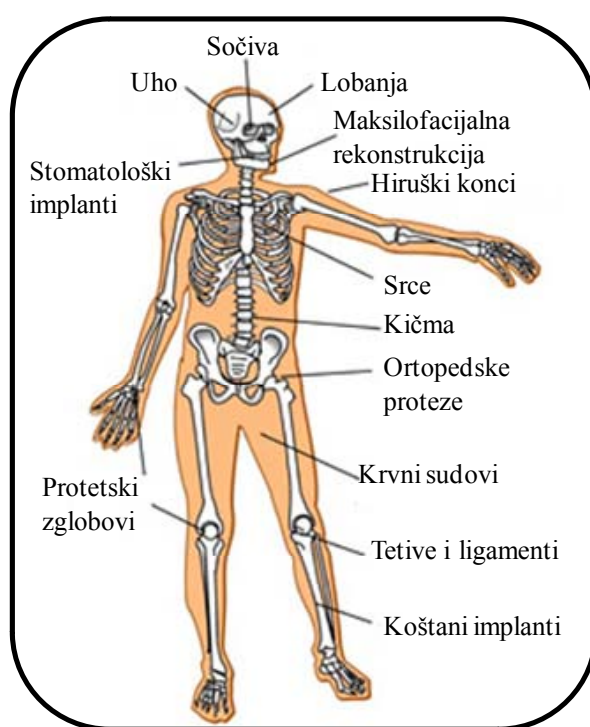
Biomaterijali obuhvataju široku klasu materijala za primenu u medicini, stomatologiji i farmaciji. Definišu se kao

materijali prirodnog ili veštačkog porekla koji nakon implantacije u ljudski organizam služe da dopune ili zamene funkciju živih tkiva kroz određeni vremenski period u direktnom kontaktu sa tkivom i telesnim fluidima. Njihova uloga je da oponašaju sastav, strukturu, osobine i funkcije prirodnih biomaterijala. Mera u kojoj je ova sličnost postignuta određuje način na koji organizam prihvata materijal, kao i primenljivost sintetisanog materijala.

Nauka o biomaterijalima je tokom prošlog veka doživela pravi procvat, a biomaterijali su postali nerazdvojni deo kliničke prakse. Da bi se materijal koristio kao biomaterijal mora da ispuni standarde u pogledu mehaničkih, optičkih, fizičkih, hemijskih i bioloških karakteristika [1]. Reakcije pacijenata na ove materijale mogu biti različite. Proteklih tridesetak godina načinjen je znatan napredak u razumevanju interakcije između tkiva i materijala. Otuda, još jedna karakteristika koju biomaterijal mora da ispuni je biokompatibilnost. Ona predstavlja kompatibilnost biomaterijala i živih sistema, što podrazumeva da ne dolazi do imunološkog odgovora organizma nakon primene biomaterijala.



Biomaterijal i njegovi produkti pri degradaciji moraju da ispune i zahtev netoksičnosti. Interakcija biomaterijala sa zdravim ćelijama mora biti isključivo farmakološka i ne sme da prouzrokuje oštećenja, mutacije ili smrt zdravih ćelija. Takođe mora da postoji mogućnost sterilizacije ovakvih materijala. Još jedna važna karakteristika je niska cena, kao i zakonska regulativa za primenu ovih materijala na tržištu. Uprkos široko rasprostranjenoj upotrebi biomaterijala u medicini, većina ne ispunjava sve željene zahteve u interakciji sa biološkim sistemima, zbog čega se radi na redizajniranju postojećih i razvoju novih u cilju prevazilaženja ograničenja [2].



Slika 1.1 Prikaz organa i tkiva koji mogu biti zamenjeni biomaterijalima [3]

Danas se u medicini uspešno primenjuje veliki broj biomaterijala u različitim oblastima, kao što su: reparacija i rekonstrukcija kostiju, zglobova, izrada dentalnih implanata, rekonstrukcija krvnih sudova, ligamenata i srčanog mišića, kontaktne sočiva, implantati u estetskoj hirurgiji, nosači za kontrolisano oslobađanje lekova itd, kao što je prikazano na slici 1.1 [1, 3].

Biomaterijali se danas izrađuju od polimera, metala, keramike, kao i kompozitnih materijala. Osim na osnovu materijala od koga su napravljeni, mogu se podeliti i na bioinertne i bioaktivne, biostabilne i biorazgradive itd. Obzirom na

strukturnu i mehaničku kompatibilnost sa tkivima, metali i keramike su izabrani za primenu kod čvrstih tkiva (kosti, zubi), a polimeri za primenu kod mekih tkiva (koža, krvni sudovi, hrskavica i ligamenti). Prednost polimernih biomaterijala je njihova dostupnost u raznovrsnom sastavu, osobinama i oblicima (čvrsti, vlaknasti, filmovi i gelovi), a mogu se brzo proizvesti u složene oblike i strukture. Uspešno se koriste i kao membrane, za hiruške konce ili bioadhezive, kao i u sistemima za kontrolisano oslobađanje lekova. Kao vlaknasto ojačani polimeri tj. polimerni kompozitni materijali, koji pokazuju istovremeno niski modul elastičnosti i visoku jačinu, predloženi su za nekoliko primena u ortopediji. Ovi biomaterijali pokazuju i odsustvo korozije i oštećenja koja se javljaju kod metalnih legura usled zamora i oslobađanja metalnih jona, koji mogu izazvati neugodnost kod pacijenta i alergijske reakcije kože [4].

Dizajn biomaterijala podrazumeva analizu željene funkcije, kao i njegovu lokalizaciju na ciljano mesto u samom organizmu; fiziologiju tkiva i telesnih tečnosti, koje će biti u direktnom kontaktu sa materijalom; izbor konstituenta materijala i tehnologije dobijanja; proizvodnju prototipa i ispitivanje njegovih hemijskih, fizičkih i mehaničkih svojstava; analizu biokompatibilnosti, pretklinička i klinička ispitivanja. Polimerni biomaterijali, zbog izražene biokompatibilnosti i sličnosti sa tkivima, predstavljaju grupu biomaterijala koja puno obećava i u širokoj su upotrebi [2].

1.2 Hidrogelovi

Hidrogelovi, kao polimerni biomaterijali, zbog svojih interesantnih svojstava privlače veliku pažnju poslednjih 50-ak godina. Njihovo izučavanje započinje 1960. godine pionirskim radom Wichterle-a i Lim-a, umrežavanjem poli(2-hidrokietil metakrilata) (PHEMA), koji postaje često proučavani hidrogelni sistem [5].

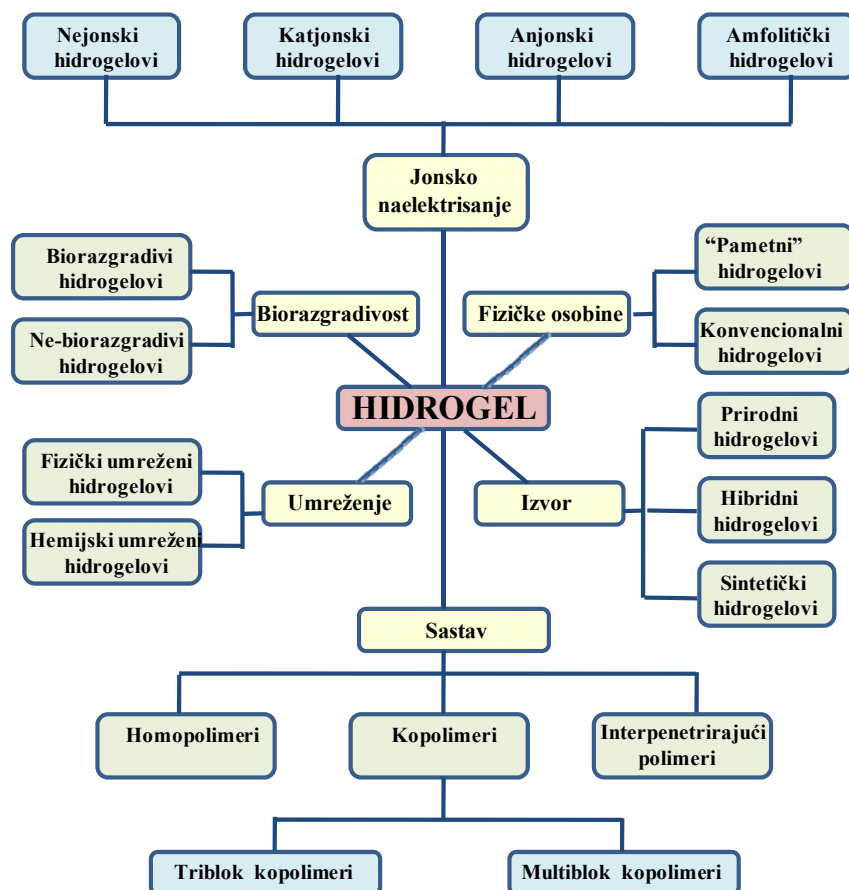
Hidrogelovi su hidrofilne trodimenzionalne mreže polimernih lanaca. Pokazuju sposobnost apsorpcije i zadržavanja velike količine vode, tj. bubrenja, što im obezbeđuje vlažnost i elastične osobine [6-8]. U zavisnosti od osobina polimernih lanaca koji čine mrežu i prisustva hidrofilnih grupa, kao i od prirode i gustine umreženja, hidrogelovi u ravnoteži mogu da sadrže različite količine vode; u nabubrelom stanju maseni udeo fluida u hidrogelu može da bude i do više hiljada puta veći od masenog udela suvog gela [9-11]. Sadržaj vode i stepen bubrenja hidrogela raste

sa porastom broja hidrofilnih grupa u mreži, a opada sa porastom stepena umreženja [9, 12].

U suvom stanju (kserogel) gelovi su tvrdi i kruti, dok su u nabubrelo stanju vlažni, mekani i elastični, sposobni da pretrpe velike deformacije, zbog čega su vrlo slični tkivima [11]. Hidrofilna površina hidrogela ima nisku međupovršinsku slobodnu energiju u kontaktu sa telesnim fluidima, što rezultuje niskom težnjom za prijanjanjem proteina i ćelija na ove površine, dok elastičnost i gumolika priroda hidrogelova obezbeđuju minimalnu iritaciju okružujućeg tkiva nakon implantacije izazvanu trenjem unutar okolnog tkiva i slično živom tkivu dozvoljava difuziju proizvoda metabolizma [12]. Zbog ovih specifičnih osobina hidrogelovi su predmet naučnih istraživanja, ali su zaživeli i u praksi, i njihova upotreba do danas drastično je porasla, posebno u oblasti medicine, farmacije i zaštite životne sredine [2, 8, 13-16]. Kod primene je važno da hidrogel tokom bubrenja ostaje mehanički dovoljno jak, tj. da ne menja geometriju, da je fleksibilan, kao i da može kontrolisanom brzinom da oslobađa molekule koji su uneti u mrežu. Za bioinženjersku primenu važna svojstva su biokompatibilnost, reagovanje na spoljašnje faktore i tkivu slične fizičke osobine. Hidrogelovi sa znatno poboljšanim mehaničkim karakteristikama, superporoznošću, brzim vremenom odziva, su samo neki od primera hidrogelnih biomaterijala koji dosta obećavaju [17].

1.2.1 Klasifikacija hidrogelova

U zavisnosti od vrste monomera koji ulaze u njihov sastav, hidrogelovi pokazuju različito ponašanje, a samim tim i primenu u različite svrhe. Možemo ih klasifikovati na nekoliko načina u zavisnosti od sastava, jonskog naelektrisanja, izvora, prirode bubrenja sa promenama u okruženju, stepena biorazgradivosti ili prirode umreženja, kao što je predstavljeno na slici 1.2 [2]. U zavisnosti od vrste monomera i polarnosti bočnih grupa hidrogelovi mogu biti jonski ili neutralni. Po sastavu hidrogelovi mogu biti homopolimeri ili kopolimeri. Kopolimeri se koriste da bi se poboljšala mehanička svojstva hidrogela ili ugradila komponenta koja reaguje na spoljašnje stimulanse [6].



Slika 1.2 Klasifikacija hidrogelova [2]

1.2.2 Načini umrežavanja hidrogelova

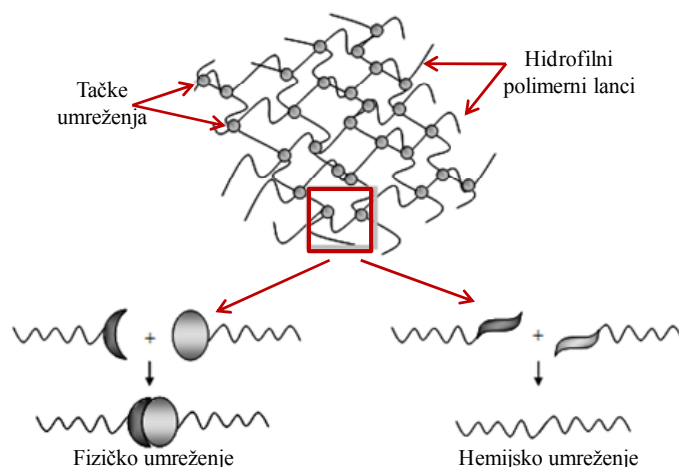
Jedna od važnijih podela hidrogelova zasniva se na prirodi umrežavanja. Trodimenzionalna struktura mreže hidrogela može se dobiti hemijskim i fizičkim procesima, a konačna struktura hidrogela i njegove osobine zavisice od metode dobijanja [2].

1.2.2.1 Hemijski umreženi hidrogelovi

Kod hemijski umreženih hidrogelova, koji su poznati još i kao permanentni ili pravi hidrogelovi, polimerni lanci su međusobno povezani kovalentnim vezama. Mogu se sintetisati radikalnom polimerizacijom hidrofilnih monomera u prisustvu umreživača, radikalnom polimerizacijom vodorastvornih polimera derivatizacijom dvo- i/ili više-funkcionalnim grupama koje mogu da polimerizuju, umrežavanjem hemijskim

reakcijama komplementarnih grupa i to: aldehydima, reakcijama adicije, reakcijama kondenzacije, enzimima i umrežavanje zračenjem (UV, mikrotalasno, γ -zračenje ili snop elektrona) [12]. Hemijski umreženi hidrogelovi ne rastvaraju se ni u jednom rastvaraču ukoliko se kovalentne tačke umreženja ne raskinu. Dobijeni hidrogel ne može se modifikovati nakon dobijanja, jer polimer više nije rastvoran. Zbog toga se oblikovanje izvodi istovremeno sa procesom polimerizacije.

Na slici 1.3 dat je shematski prikaz hemijskog i fizičkog umrežavanja hidrogelova. Hemijski umreženi hidrogelovi, kao i fizički, su nehomogeni i obično sadrže oblasti niskog bubrenja i visoke gustine umreženja dispergovane unutar regiona visokog bubrenja i niske gustine umreženja. Osim toga, umreživači koji se koriste u procesima sinteze su visoko toksični, pa se njegovi neproreagovali ostaci moraju kompletno ukloniti iz hidrogelova pre njihove konačne primene kao biomaterijala, zbog čega je njihova upotreba ograničena [2, 10, 11].



Slika 1.3 Shematski prikaz fizičkog i hemijskog umrežavanja hidrogelova

1.2.2.2 Fizički umreženi hidrogelovi

Umrežavanje ne mora da bude proizvod hemijske reakcije. Bilo koji fizički proces koji dovodi do povezivanja polimernih lanaca može takođe dovesti do formiranja hidrogela. Proces fizičkohemijskog umrežavanja su obično reverzibilni i podrazumevaju formiranje slabih, sekundarnih sila kao što su: vodonične veze, elektrostatičke interakcije, Van der Valsove i Kulonove sile, hidrofobne interakcije,

preplitanje lanaca. Fizički umreženi hidrogelovi su poznati i kao termoplastični, reverzibilni ili privremeni hidrogelovi, jer su nepostojani i promenom spoljašnjih faktora mogu se prevesti u neumrežene sisteme. Mogu degradirati ili se rastvarati. Nehomogeni su usled nastalih zapetljanosti molekulskih lanaca ili hidrofobnih područja. Slobodni krajevi lanaca takođe predstavljaju prolazne defekte mreže. Prisustvo reverzibilnih tačaka umreženja omogućava njihovu termalnu obradu, tj. prevođenje u polimerni rastvor zagrevanjem. Odsustvo umreživača i mogućnost modifikovanja nakon sinteze predstavljaju njihove prednosti, dok slabe mehaničke osobine u nabubrelom stanju predstavljaju nedostatak [2, 10, 11].

1.2.2.3 Umrežavanje zračenjem visoke energije

Jedan od načina umrežavanja hidrogelova je i upotreba visokoenergetskog zračenja, posebno γ zračenja dobijenog iz izvora ^{60}Co i snopova elektrona dobijenih pomoću elektronskih akceleratora. Ovaj metod se već nekoliko decenija uspešno koristi za sintezu, modifikaciju i sterilizaciju polimernih materijala.

Dejstvo zračenja na polimer može prouzrokovati njegovo umrežavanje ili degradaciju. U većini polimera pod normalnim uslovima odvijaju se istovremeno oba procesa. Prilikom umrežavanja polimera dolazi do povezivanja polimernih molekula poprečnim kovalentnim vezama koje nastaju reakcijom dva radikala na susednim lancima, što dovodi do povećanja molekulske mase polimera. Degradacija se odvija nasumičnim kidanjem glavnog polimernog lanca uzrokujući smanjenje molekulske mase. Hemijska struktura dobijenog polimera određuje da li će pod uticajem jonizujućeg zračenja preovladati umrežavanje ili degradacija. Kako je svaki polimerni sistem jedinstven potrebno je eksperimentalno odrediti optimalne uslove zračenja, kako bi se reakcija degradacije minimizirala i postiglo maksimalno umrežavanje [18, 19].

Tokom zračenja vodenog rastvora polimera dolazi do formiranja reaktivnih mesta duž polimernog lanca. Radioliza molekula vode dovodi do formiranja hidroksil radikala, jedne od glavnih reaktivnih vrsta, koji može da napadne polimerni lanac dovodeći do formiranja makroradikala. Rekombinacija makroradikala na različitim lancima rezultuje formiranjem kovalentnih veza i na kraju umreženom strukturom [20-22]. Nagrađeni makroradikali mogu preko ugljenika reagovati sa kiseonikom,

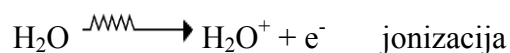
formirajući odgovarajuće peroksid radikale koji nepovoljno utiču na reakcije umrežavanja. Za smanjenje uticaja kiseonika, zračenje se obično izvodi u dejonizovanoj vodi i inertnoj (azot, argon) atmosferi [10].

1.2.2.3.1 Radioliza vode

Proces polimerizacije najčešće se izvodi zračenjem vodenih rastvora monomera. Jonizujuće zračenje u vodenoj sredini izaziva niz fizičkih i hemijskih procesa koji se mogu podeliti u tri stadijuma: fizički, fizičko-hemijski i hemijski [23-26].

1. Fizički stadijum

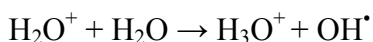
U fizičkom stadijumu jonizujuće zračenje predaje energiju molekulima vode, pri čemu dolazi do njihove jonizacije (10^{-18} - 10^{-16} s) i ekscitacije (10^{-15} s):



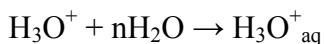
Elektroni nastali u procesu jonizacije imaju dovoljno energije da ekscituju i jonizuju još nekoliko molekula vode.

2. Fizičko-hemijski stadijum

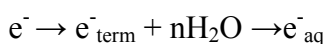
Fizičko-hemijski stadijum obuhvata procese u kojima dolazi do pregrupisanja unutar molekula, prenosa energije na druge čestice i uspostavljanja termalne ravnoteže u sistemu. Slobodni radikali se masovno javljaju. U reakciji prenosa protona sa H_2O^+ jona na okolne molekule vode (10^{-14} s) stvaraju se:



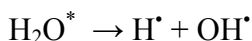
Nastali H_3O^+ joni zatim podležu procesu hidratacije (10^{-11} s):



Elektroni nastali u procesu jonizacije se termalizuju (10^{-13} s), a zatim hidratišu (10^{-11} s):



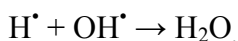
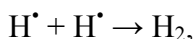
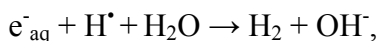
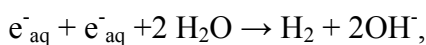
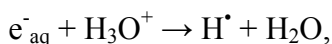
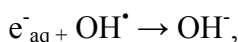
Ekscitovani molekuli vode disosuju na radikale:



Udeo ekscitacije u formiranju primarnih radikala je mali u poređenju sa udelom jonizacije.

3. *Hemijski stadijum*

U hemijskom stadijumu intermedijeri koji su nastali u prethodna dva stadijuma reaguju međusobno ili sa molekulima. Dolazi do difundovanja primarnih vrsta (e^-_{aq} , H_3O^+ , $OH^\bullet$, $H^\bullet$) kroz sistem, hemijskih reakcija vrsta tipa jon-jon, jon-radikal, radikal-radikal, radikal-molekul itd., i na kraju do uspostavljanja hemijske ravnoteže u sistemu i stvaranjem stabilnih proizvoda. Ovi procesi na vremenskoj skali obuhvataju period od 10^{-11} do 10^{-10} s po prolasku zračenja.



Hidratirani elektroni (e^-_{aq}), H_3O^+ joni, $OH^\bullet$ i $H^\bullet$ radikali su tzv. „radikalni“ produkti, dok su vodonik (H_2) i vodonik peroksid (H_2O_2) „molekulski“ produkti. Nastali produkti mogu biti snažne oksidujuće ($OH^\bullet$ i H_2O_2) ili redukujuće (e^-_{aq} i H_2) vrste.

1.2.2.3.2 *Reakcije makroradikala*

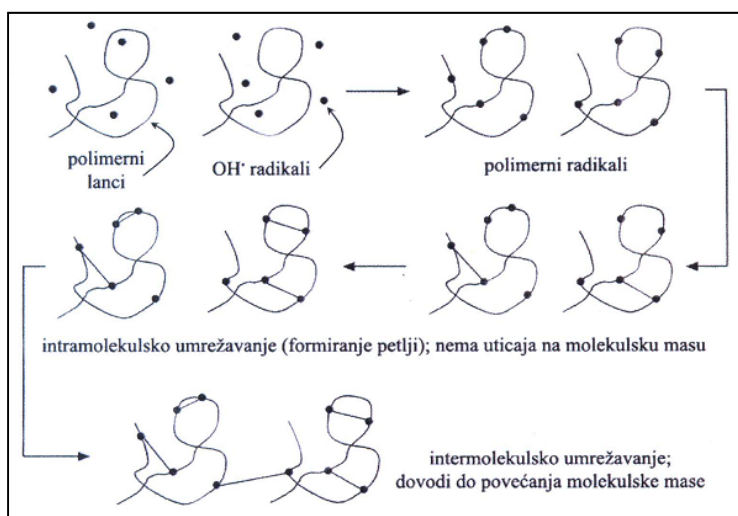
Kada se vodeni rastvor polimera izloži jonizujućem zračenju, dolazi do formiranja reaktivnih intermedijera na maktomolekulima. Ovo može da bude rezultat direktne interakcije zračenja i polimernog lanca, ili indirektnih efekata kao što su reakcije intermedijera nastalih u vodi sa molekulima polimera. Prilikom izlaganja razblaženih vodenih rastvora monomera ili polimera γ zracima dominantan je indirektan efekat, jer je prinos radikala u vodi veći nego u čistom polimeru. Tri glavne reaktivne vrste su: hidratirani elektron (e^-_{aq}), hidroksil radikal ($OH^\bullet$) i atom vodonika (H_2). Dolazi do adicije produkata radiolize na organske molekule na pojedinim vezama, pri čemu neke veza, kao što su nezasićene, ugljenik-halogen, nitril tiol, disulfidne i pirimidin veze, imaju izraženiji afinitet za radikale vode od drugih. Adicijom radikala nastaju nova jedinjenja, složenija od reaktanata pre zračenja [10].

Ispitivanja su pokazala da je hidroksil radikal glavna vrsta odgovorna za prenos reaktivnosti sa vode na polimerni lanac [10]. Nastali radikali mogu učestvovati u procesu prenosa radikalske aktivnosti na dva načina:

1. izdvajanjem vodonikovog atoma sa pozicije makromolekula gde je vodonikov atom mnogo slabije vezan, pri čemu dolazi do formiranja makroradikala;
2. dodavanjem na dvostruku C=C vezu, ako su takve veze prisutne u polimernoj strukturi.

Hidroksil radikal izdvaja atome vodonika sa različitih pozicija tako da se formiraju dve ili više vrsta radikala različite strukture, i ovi makroradikali su uglavnom lokalizovani na atomima ugljenika. Ovo je vrlo važno za proces umrežavanja i formiranja hidrogela [10].

Nastali polimerni radikali reaguju sa radikalima smeštenim na istom ili različitom polimernom lancu, formirajući tako intra- i inter-molekulske veze, kao što je prikazano na slici 1.4.



Slika 1.4 Shematski prikaz procesa umrežavanja polimera. Stvaranje intra- i inter-molekulskih veza [24]

Za formiranje hidrogela najvažnije je intermolekularno umrežavanje, tj. rekombinacija radikala lokalizovanih na dva različita makromolekula. Ovo dovodi do porasta srednje molekulske mase, tj. do polimerizacije. Intramolekularno umrežavanje koje nastaje usled interakcije dva radikala sa istog polimernog lanca dovodi do umrežavanja unutar istog lanca i formiranja petlji, ali ne vodi do formiranja hidrogela.

Postoji konkurentnost između inter- i intra-molekulskog umrežavanja, a parametri koji na nju utiču su koncentracija monomera i doza zračenja [10]. Doza koja odgovara pojavi prve nerastvorne frakcije gela u sistemu naziva se doza geliranja [D_g]. Distribucija mesta umreženja duž polimernog lanca je slučajna, tako da pri D_g ima lanaca sa velikim brojem mesta umreženja, kao i nepovezanih lanaca. Tačka geliranja predstavlja drastičnu promenu u svojstvima polimera. Dalje zračenje uzorka iznad D_g dovodi do porasta frakcije gela, iako neki makromolekuli i dalje mogu ostati neumreženi, tj. u sol frakciji. Procenat geliranja je procenat konverzije monomera u nerastvornu polimernu mrežu [12]. Pri visokim koncentracijama monomera i nižim brzinama zračenja, kada polimerni lanci interpenetriraju, verovatnoća rekombinacije dva radikala lokalizovana na različitim lancima je relativno visoka. Favorizovano je intermolekulsko umrežavanje, odnosno formiranje hidrogela. U slučaju nižih koncentracija monomera, kada su makromolekuli obično u konformaciji klupka i razdvojeni, favorizovano je intramolekulsko umrežavanje [10].

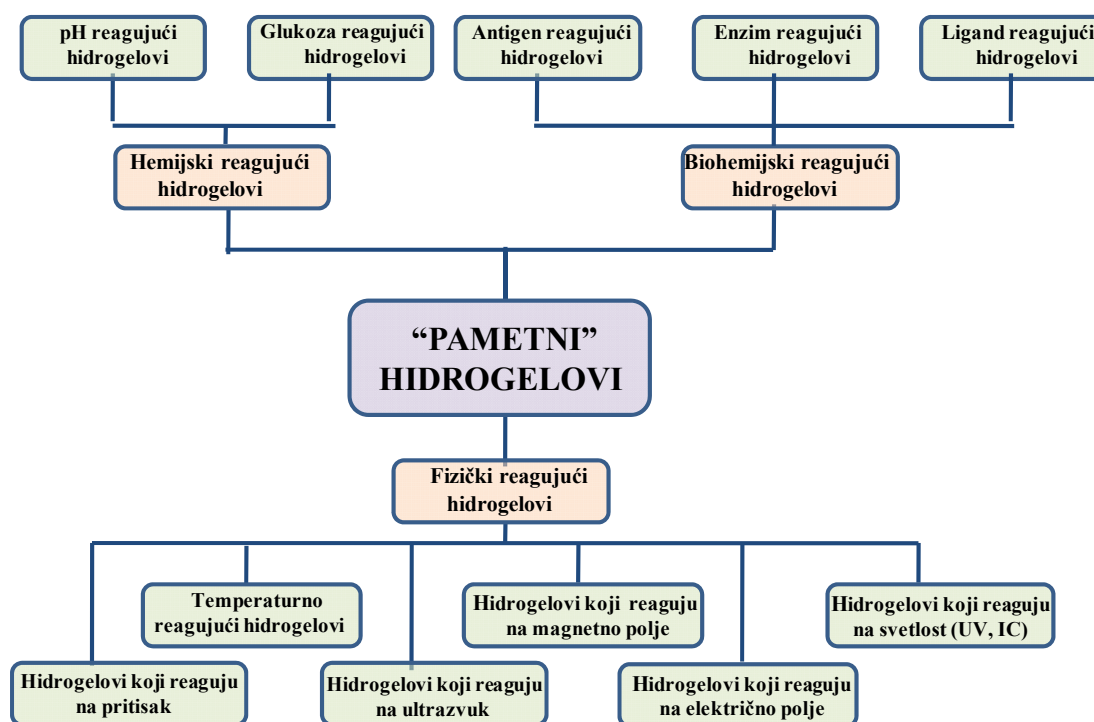
Poli(vinil alkohol), poli(etilen glikol), poli(akrilna kiselina) i poli(2-hidroksietil metakrilat) su dobro poznati primeri polimera koji se mogu umrežiti primenom visokoenergetskog zračenja. Hidrogelovi se mogu dobiti zračenjem monomera u masi i vodenim rastvorima, kao i polimera u čvrstom stanju i u vodenim rastvorima. Zračenje vodenih rastvora monomera se češće izvodi jer je efikasnije. Zahteva niže doze zračenja, a prinos radikala koji se formiraju i doprinose umrežavanju je veliki [27]. Osobine dobijenog hidrogela, posebno stepen bubrenja, zavise od koncentracije polimera i doze zračenja: gustina umreženja raste sa porastom koncentracije polimera i doze zračenja, dok stepen bubrenja opada sa porastom ovih parametara [12].

Primena zračenja za sintezu i modifikaciju hidrogelova ima nekoliko prednosti. Izvođenje sinteze je jednostavnije i kompaktnije u odnosu na „konvencionalni“ hemijski ili fotohemijski metod. U poređenju sa hemijskim umrežavanjem, gelovi imaju bolju mehaničku jačinu i veću vrednost efektivnog umreženja. Stepem umreženja se lako kontroliše menjanjem uslova zračenja. Proces umrežavanja može se izvesti u vodi pod normalnim uslovima, sobnoj temperaturi i fiziološkoj pH. Takođe, često nema potrebe za korišćenjem hemijskih umreživača, niti pomoćnih agenasa kao što su inicijatori i aktivatori. Shodno tome, nema ni zaostajanja neproreagovalih dodataka koji mogu biti toksični, što omogućava dobijanje čistih proizvoda [12, 20, 28, 29]. Ovakav metod

sinteze je relativno jeftin proces čije je izvođenje lako kontrolisati. Prilikom zračenja dolazi do neselektivne i uniformne raspodele energije u sistemu, što dovodi do homogenije umreženosti i boljih karakteristika umreženog polimera. Radijaciono procesiranje takođe rešava problem sterilizacije proizvoda, koja se vrši istovremeno sa umrežavanjem, što je vrlo važno u slučaju potencijalne medicinske primene.

1.2.3 „Pametni hidrogelovi“

„Pametni“ hidrogelovi predstavljaju posebnu grupu hidrogelova, jer podnose relativno velike i iznenadne promene u stepenu bubrenja, zapremini, strukturi mreže, propustljivosti i/ili mehaničkoj jačini kao odgovor na male promene uslova u okružujućoj sredini, što ih razlikuje od inertnih hidrogelova. Predstavljaju izuzetno interesantne materijale za farmaceutsku, biotehnološku i medicinsku primenu. Dele se na fizički i hemijski reagujuće hidrogelove, kao što je prikazano na slici 1.5 [2].



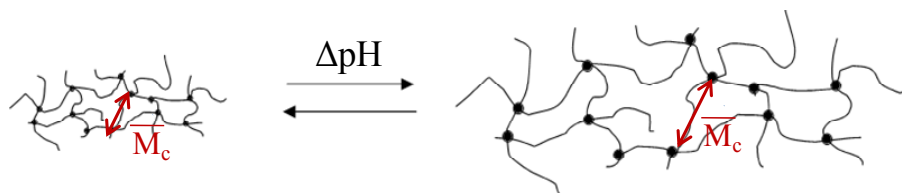
Slika 1.5 Klasifikacija „pametnih hidrogelova“ [2]

Hemijski stimulansi, kao što su pH okolne sredine, sastav rastvarača i jonska jačina fluida uključuju kiselinsko-bazne reakcije, kompleksiranje, raskidanje veza ili stvaranje redoks i elektrohemijjskih reakcija, dovode do promene interakcije između polimernih lanaca ili između polimernih lanaca i rastvarača na molekulskom nivou. Biohemijjski stimulansi uključuju odzive na antigene, enzime, ligande i druge biohemijjske agense. Fizički stimulansi, kao što su temperatura, jačina električnog ili magnetnog polja, intenzitet svetlosti, mehaničko opterećenje izmieniće molekulske interakcije. Sistemi koji kombinuju dva različita mehanizma odziva unutar jednog polimernog sistema nazivaju se dualno reagujući polimerni sistemi.

Stepen bubrenja „pametnih“ hidrogelova se može kontrolisati promenom parametra na koji hidrogel reaguje. Sastav i struktura hidrogela određuje sposobnost reagovanja na spoljašnje stimulanse, a značaj uticaja pojedinačnih faktora iz spoljašnje sredine zavisi od toga u koje svrhe će se hidrogel koristiti. Za primenu u sistemima za kontrolisano oslobađanje lekova najvažnija je promena u bubrenju izazvana promenom pH vrednosti bioloških fluida i temperature [2].

1.2.3.1 pH reagujući hidrogelovi

Kod nejonskog hidrogela stepen bubrenja ne zavisi od pH vrednosti i jonske jačine okolnog rastvora. Kada se u hidrogel ugrade jonske komponente, stepen bubrenja postaje zavisn od pH vrednosti okolnog fluida. pH reagujuće hidrogelove čini polimerni lanac sa jonskim bočnim grupama koje mogu primiti i/ili donirati protone kao odgovor na promenu pH vrednosti okolne sredine. Promena pH vrednosti sredine dovodi do promene stepena jonizacije jonskih grupa u ovakvom hidrogelu na pH vrednostima poznatim kao pK_a ili pK_b , i zavisno od bočnih grupa hidrogel postaje pozitivno ili negativno naelektrisan.

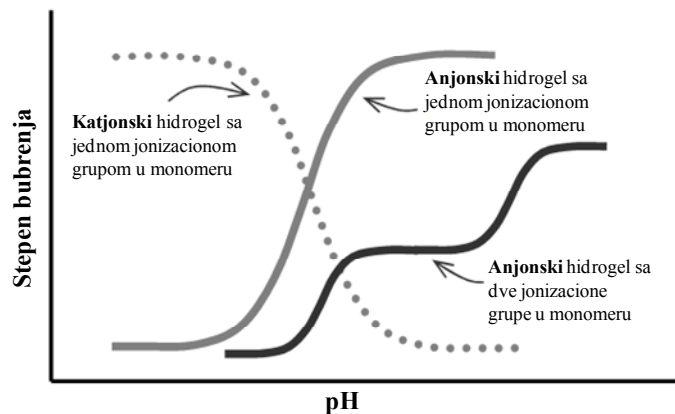


Slika 1.6 Uticaj promene pH vrednosti okolnog fluida na strukturu pH reagujućeg hidrogela [30]

Ove promene u ukupnom naelektrisanju jonizovanih bočnih grupa dovode do naglih promena zapremine hidrogela usled nastanka odbojnih elektrostatičkih sila između istoimeno naelektrisanih jonizovanih grupa. To dovodi do povećanja broja apsorbovanih molekula fluida i samim tim do povećanja zapremine, odn. ravnotežnog stepena bubrenja hidrogela [6, 31].

Sastav i struktura hidrogela određuje njegovo reagovanje na spoljašnje stimulanse. U zavisnosti od prirode jonske grupe koju hidrogel sadrži postoje dva tipa pH odziva: anjonski i katjonski. Anjonski hidrogel najčešće sadrži bočne grupe kao što su karboksilna ili sulfonska; deprotonizacija se javlja kada je pH vrednost okolne sredine iznad pK_a . Sa druge strane, katjonski hidrogel obično ima amino grupe na mestu bočnih grupa, jonizacija se javlja kad pH padne ispod pK_b što dovodi do porasta hidrofilnosti i stepena bubrenja.

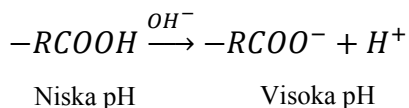
U zavisnosti od jonskog monomera koji je korišćen za dobijanje hidrogela, kriva zavisnosti stepena bubrenja od pH vrednosti sredine pokazuje jednu ili više prevojnih tačaka u blizini pK_a/pK_b jonizujućih grupa, kao što je pokazano na slici 1.7 [31].



Slika 1.7 Stepen bubrenja jonskog hidrogela kao funkcija pH vrednosti okolnog fluida [31, 32]

Postoje dva glavna faktora koja kontrolišu stepen bubrenja jonskih hidrogelova. Prvi uključuje osobine polimera, takve kao jonsko naelektrisanje, koncentracija jonizujućih grupa, stepen jonizacije, gustina umreženja, kao i hidrofilnost ili hidrofobnost. Drugi faktor čine osobine sredine u kome hidrogel bubri, kao što su pH, jonska jačina i koncentracija [2].

Kod anjonskih hidrogelova koji sadrže karboksilne grupe stepen disocijacije se predstavlja na sledeći način:



$$K_a = \frac{[H^+][RCOO^-]}{[RCOOH]}$$

gde je K_a konstanta disocijacije kiseline, $[RCOOH]$ -koncentracija nedisosovanih polimernih lanaca, $[RCOO^-]$ -koncentracija disosovanih polimernih lanaca, $[H^+]$ -koncentracija vodonikovih jona.

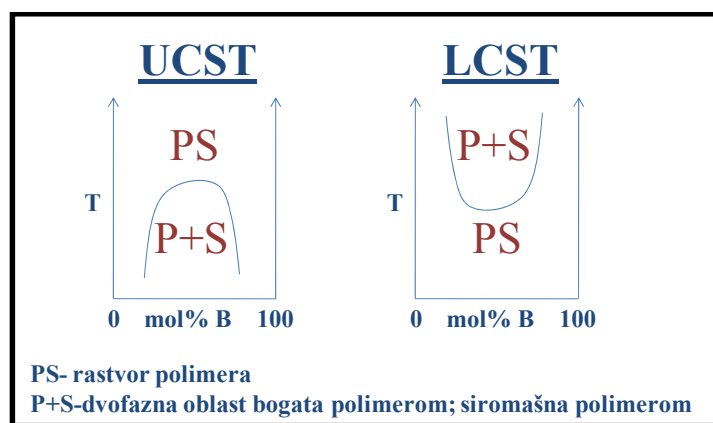
Jonizacija karboksilnih grupa dešava se kada pH vrednost sredine poraste iznad njihove pK_a , pri čemu stepen jonizacije utiče na ponašanje hidrogela prilikom bubrenja. Sa porastom pH sredine dolazi do porasta stepena jonizacije i gustine naelektrisanja u mreži hidrogela, što dovodi do povećanja elektrostatičkog odbijanja između polimernih lanaca. Zbog veće hidrofilnosti karboksilatne u odnosu na karboksilnu grupu hidrofilnost mreže raste, a samim tim i stepen bubrenja.

1.2.3.2 Temperaturno reagujući polimeri

Temperatura predstavlja drugi značajan stimulans iz okolne sredine koji može da utiče na ponašanje „pametnih“ hidrogelova. Temperaturno reagujući hidrogelovi kao odgovor na promenu temperature pokazuju fazni prelaz, koji se ogleda u velikoj promeni zapremine i stepena bubrenja, zbog čega su dobili značajnu ulogu u polju medicine, u sistemima za kontrolisano oslobađanje lekova, kao skafoldi i biosenzori [33]. Mogu se podeliti na polimere sa pozitivnim i negativnim temperaturnim odzivom. Promena ravnoteže hidrofilno/hidrofobnih interakcija igra značajnu ulogu u naglim promenama rastvorljivosti ovih polimera na temperaturi poznatoj kao kritična temperatura rastvaranja (CST). Molekuli vode obrazuju vodonične veze sa polarnim grupama polimernog lanca. Na CST, vodonične veze između polimera i vode, u poređenju sa polimer-polimer i voda-voda interakcijama, postaju slabije. Ovo dovodi do brze dehidratacije sistema i skupljanja polimerne strukture. Polimeri sa pozitivnim

temperaturnim odzivom pokazuju fazni prelaz na kritičnoj temperaturi nazvanoj gornja kritična temperatura rastvaranja (UCST). Ovakvi sistemi se rastvaraju na višim temperaturama, a postaju nerastvorni kada se hlade ispod njihove UCST [6, 34].

Ako polimeri trpe prelaz iz rastvorne u nerastvornu fazu usled grejanja, fenomen se naziva donja kritična temperatura rastvaranja (LCST). Na temperaturama ispod LCST vodeni rastvor polimera je transparentan, polimer je rastvoran jer su vodonične veze između hidrofilnih segmenata polimernog lanca i molekula vode dominantne, što vodi do povećanog rastvaranja u vodi. Nasuprot ovome, sa porastom temperature iznad LCST hidrofobne interakcije postaju jače, vodonične veze se raskidaju i polimerni lanci se skupljaju kao rezultat dehidratacije, dovodeći do opadanja rastvorljivosti i odvajanja faza [35]. Ovaj tip ponašanja je poznat kao negativna temperaturna zavisnost. Javlja se kod polimera koga čine polimerni lanci sa umerenim sadržajem hidrofobnih grupa ili sa mešanim hidrofilnim i hidrofobnim segmentima. Kod polimernog lanca sa više hidrofobnih konstituenata LCST će biti niža [2, 6, 8, 31, 34, 36-38], dok sa dodatkom hidrofilnih jedinica LCST raste, i može se menjati podešavanjem odnosa hidrofilnih i hidrofobnih segmenata. Na slici 1.8 shematski je prikazana pojava razdvajanja faza na UCST i LCST vrednostima.



Slika 1.8 Fazno razdvajanje polimernih rastvora na UCST i LCST kao funkcija temperature i koncentracije polimera [30]

Poli(N-izopropil akrilamid) (PNIPAM) je naćećše ispitivan temperaturno reagujući polimer koji pokazuje fazni prelaz oko 32°C, što je blisko fiziološkoj temperaturi. Pored PNIPAM LCST pokazuju i poli(2-alkil-2-oksazoline), poli(2-oksazine), polivinil etar, poli(dimetilaminoetil metakrilat), poli(alkil oksid) itd. [35, 37,

39], a njihove LCST mogu se podešavati kopolimerizacijom sa drugim hidrofilnim ili hidrofobnim monomerima. Poli(alkil glikoli), poli(etilen glikol) (PEG), poli(propilen glikol) (PPG) i njihovi kopolimeri su takođe dobro poznati temperaturno reagujući materijali [40-43].

Prilikom karakterizacije temperaturno reagujućih polimera važno je napraviti razliku između LCST linearnog polimera i temperature zapreminskog faznog prelaza (VPTT) umreženog hidrogela [44]. Polimeri mogu da pretrpe prelaz iz rastvorne u nerastvornu fazu tokom grejanja, dok hidrogelovi, kao trodimenzionalne polimerne mreže, koji imaju sposobnost da apsorbuju velike količine vode [45], mogu da pretrpe promene zapremine kao odgovor na promenu temperature. Kritična temperatura na kojoj dolazi do promene zapremine hidrogela naziva se VPTT i često se meša sa LCST [46-49]. Ako polimerni lanci u hidrogelu nisu kovalentno umreženi, temperaturno reagujući hidrogelovi mogu proći kroz sol-gel faznu transformaciju umesto prelaza bubrenje-skupljanje. Kod hemijski umreženih temperaturno reagujućih hidrogelova dolazi do promene zapremine umesto sol-gel prelaza. Za određivanje LCST linearnih temperaturno reagujućih polimera koristi se metod tačke zamućenja (CP) određivanjem temperature zamućenja rastvora [50], dok se VPTT vrednosti temperaturno reagujućih hidrogelova obično određuju metodom ravnotežnog stepena bubrenja [51-53] i metodom diferencijalne skanirajuće kalorimetrijske analize (DSC) [44, 54-56].

Poslednjih godina pažnja se posvećuje sintezi i karakterizaciji hidrogelova koji istovremeno reaguju na dva stimulanisa, posebno na pH i temperaturu. Ovo se postiže kopolimerizacijom temperaturno reagujućih monomera sa pH reagujućim, kao što su akrilna, metakrilna i itakonska kiselina. Ovakvi kopolimeri koji reaguju na promene u okruženju u fiziološkom opsegu pokazali su se korisnim u sistemima za kontrolisano oslobađanje lekova [31], jer se brzina oslobađanja leka apsorbovanog u ove hidrogelove može regulisati podešavanjem lokalne temperature i pH.

1.2.4 Termodinamika bubrenja hidrogelova

Hidrofilne polimerne mreže pokazuju visok afinitet ka vodenim rastvorima, interakcija između polimernih lanaca i vode verovatnija je od interakcija između samih polimernih lancima, usled čega mreža apsorbuje veliku količinu vode, tj. bubri. Zbog

visoke neidealnosti termodinamičkog ponašnja polimernih mreža u elektrolitičkim rastvorima, ni jedna teorija ne predviđa ponašanje polimera potpuno tačno. Međutim, Flory-Rehner-ova analiza i njene modifikacije se koriste sa prihvatljivim uspehom [57]. Flory i Rehner su prvi razvili teoriju ravnotežnog bubrenja, polazeći od pretpostavke da su hidrogelovi neutralne mreže, sa polimernim lancima koji imaju Gauss-ovu raspodelu [8]. Ova teorija je primenljiva u slučaju umrežavanja hidrogela u odsustvu rastvarača. U kontaktu sa rastvorom hidrogel počinje da bubri. Na bubrenje neutralnih hidrogelova utiču dve međusobno suprotstavljene sile: termodinamička sila mešanja polimernih lanaca i molekula fluida koja dovodi do širenja mreže gela i elastična sila povlačenja polimernih lanaca, koja se opire njihovom istezanju pri bubrenju. Ova elastična sila opisana je Flory-jevom teorijom gumolike elastičnosti. U stanju ravnoteže ove dve sile su izjednačene i brojno određuju količinu vode apsorbovane u hidrogel, tj. ravnotežni stepen bubrenja. Imajući u vidu izotropno umreženu strukturu hidrogela, ukupna Gibbs-ova slobodna energija sistema nakon bubrenja može se prikazati kao [8, 57-59]:

$$\Delta G_{ukupno} = \Delta G_{mešanja} + \Delta G_{elastično} \quad (1.2.4.1)$$

gde je: $\Delta G_{mešanja}$ promena Gibbs-ove slobodne energije mešanja molekula fluida i hidrofilnih polimernih lanaca, $\Delta G_{elastično}$ promena Gibbs-ove slobodne energije kao rezultat širenja mreže i predstavlja meru kompatibilnosti polimera sa molekulima okolnog fluida koja se izražava preko parametra interakcije polimer-rastvarač (χ) [6].

Diferenciranjem jednačine (1.2.4.1) po broju molova fluida, pri konstantnoj temperaturi i pritisku, dobija se promena hemijskog potencijala penetrirajućeg fluida ($\Delta\mu$) [2, 57]:

$$\Delta\mu = \mu_f - \mu_{f,0} = \Delta\mu_{mešanja} + \Delta\mu_{elastično} \quad (1.2.4.2)$$

gde je: μ_f hemijski potencijal fluida unutar hidrogela, $\mu_{f,0}$ hemijski potencijal čistog fluida, $\Delta\mu_{mešanja}$ promena hemijskog potencijala usled mešanja, $\Delta\mu_{elastično}$ promena hemijskog potencijala kao rezultat širenja mreže hidrogela.

U ravnoteži, razlika između hemijskog potencijala fluida van i unutar hidrogela jednaka je nuli. Stoga, $\Delta\mu_{mešanja}$ i $\Delta\mu_{elastično}$ moraju biti međusobno uravnotežene.

$\Delta\mu_{\text{mešanja}}$ se dobija iz promene entropije pri mešanju i toplote mešanja. $\Delta\mu_{\text{elastično}}$ se može odrediti iz teorije gumolike elastičnosti [2, 58]:

$$\Delta\mu_{\text{mešanja}} = RT[\ln(1 - v_{2m}) + v_{2m} + \chi v_{2m}^2] \quad (1.2.4.3)$$

$$\Delta\mu_{\text{elastično}} = \frac{RTV_1}{\bar{v}\bar{M}_c} \left(1 - \frac{2\bar{M}_c}{\bar{M}_n}\right) \left(v_{2m}^{1/3} - \frac{v_{2m}}{2}\right) \quad (1.2.4.4)$$

gde je $\bar{v}$ specifična zapremina polimera, v_{2m} zapreminski udeo polimera u stanju ravnotežnog bubrenja, V_1 molarna zapremina fluida u kome se bubrenje dešava, $\bar{M}_c$ srednja molekulska masa između čvorova mreže, $\bar{M}_n$ srednja molekulska masa linearnog polimernog lanca pripremljenog pod istim uslovima bez umrežavanja, χ parametar interakcije između polimera i fluida, a R i T su gasna konstanta i temperatura. Jednačina 1.2.4.4 važi za hidrogel umrežavan u odsustvu rastvarača.

Izjednačavanjem ovih doprinosa, dobija se izraz za srednju molekulsku masu između susednih čvorova mreže ($\bar{M}_c$) za nejoničane hidrogelove sintetisane u odsustvu rastvarača [6, 57]:

$$\frac{1}{\bar{M}_c} = \frac{2}{\bar{M}_n} - \frac{(\bar{v}/V_1)[\ln(1-v_{2m})+v_{2m}+\chi v_{2m}^2]}{v_{2m}^{1/3} - \left(\frac{2}{\varphi}\right)v_{2m}} \quad (1.2.4.5)$$

Peppas i Merrill su modifikovali originalnu Flory-Rehner-ovu teoriju za slučaj kada je u toku umrežavanja hidrogela prisutan rastvarač [60]. Prisustvo rastvarača utiče na $\Delta\mu_{\text{elastično}}$. Stoga se u član $\Delta\mu_{\text{elastično}}$ unosi korekcija u vidu zapreminskog udela polimera u relaksiranom stanju (v_{2r}) i izraz (1.2.4.5) prelazi u [57, 61]:

$$\frac{1}{\bar{M}_c} = \frac{2}{\bar{M}_n} - \frac{(\bar{v}/V_1)[\ln(1-v_{2m})+v_{2m}+\chi v_{2m}^2]}{v_{2r} \left(\left(\frac{v_{2m}}{v_{2r}} \right)^{1/3} - \left(\frac{2}{\varphi} \right) \frac{v_{2m}}{v_{2r}} \right)} \quad (1.2.4.6)$$

gde je v_{2r} zapreminski udeo polimera u relaksiranom stanju, tj. odmah nakon sinteze, ali pre bubrenja, a φ funkcionalnost umreživača (broj grananja na mestu umreženja).

Kako većina hidrogelova koji se koriste u medicini sadrži jonizujuće bočne grupe, termodinamička analiza bubrenja jonskih hidrogelova mora uzeti u obzir i

prirodu jona, stepen jonizacije, tj. doprinos jonskih vrsta ukupnoj promeni Gibbs-ove slobodne energije [8]. Ove grupe mogu delimično ili potpuno da disosuju u rastvoru, pa se zbog prisustva jonskih interakcija jednačini (1.2.4.1) dodaje član koji predstavlja promenu Gibbs-ove slobodne energije usled jonske prirode polimerne mreže, $\Delta G_{jonskih\ interakcija}$, i jednačina (1.2.4.1) postaje:

$$\Delta G_{ukupno} = \Delta G_{mešanja} + \Delta G_{elastično} + \Delta G_{jonskih\ interakcija} \quad (1.2.4.7)$$

Diferenciranjem jednačine (1.2.4.7) po broju molova fluida, dobija se promena hemijskog potencijala pri bubrenju u prisustvu jonskih vrsta:

$$\Delta\mu = \Delta\mu_{mešanja} + \Delta\mu_{elastično} + \Delta\mu_{jonskih\ interakcija} \quad (1.2.4.8)$$

gde je $\Delta\mu_{jonskih\ interakcija}$ promena hemijskog potencijala usled jonskog karaktera hidrogela, koja zavisi od jonske jačine fluida i od vrste jona prisutnih u rastvaraču [6].

Uzimajući u obzir jonski doprinos, jednačina bubrenja za anjonski (1.2.4.9) i katjonski (1.2.4.10) hidrogel glasi [57, 61, 62]:

$$\frac{V_1}{4IM_r} \left(\frac{v_{2m}^2}{\bar{v}} \right) \left(\frac{K_a}{10^{-pH} - K_a} \right)^2 = [\ln(1 - v_{2m}) + v_{2m} + \chi v_{2m}^2] + \left(\frac{V_1}{\bar{v}M_c} \right) \left(1 - \frac{2\bar{M}_c}{\bar{M}_n} \right) v_{2r} \left[\left(\frac{v_{2m}}{v_{2r}} \right)^{\frac{1}{3}} - \left(\frac{v_{2m}}{2v_{2r}} \right) \right] \quad (1.2.4.9)$$

$$\frac{V_1}{4IM_r} \left(\frac{v_{2m}^2}{\bar{v}} \right) \left(\frac{K_b}{10^{pH-14} - K_b} \right)^2 = [\ln(1 - v_{2m}) + v_{2m} + \chi v_{2m}^2] + \left(\frac{V_1}{\bar{v}M_c} \right) \left(1 - \frac{2\bar{M}_c}{\bar{M}_n} \right) v_{2r} \left[\left(\frac{v_{2m}}{v_{2r}} \right)^{\frac{1}{3}} - \left(\frac{v_{2m}}{2v_{2r}} \right) \right] \quad (1.2.4.10)$$

gde je I jonska jačina, M_r molekulaska masa ponavljajuće jedinice, a K_a i K_b su konstante disocijacije kiseline i baze.

1.2.5 Difuzija fluida unutar hidrogela

Kada se suvi gel dovede u kontakt sa vodom, počinje da apsorbuje vodu i da bubri, sve do uspostavljanja ravnoteže. Proces bubrenja je posledica difuzije i kapilarnog prodiranja vode u mrežu gela. Difuzija molekula fluida ili rastvorene aktivne supstance je jedna od osnovnih karakteristika hidrogela za medicinsku primenu, pa je stoga i mogućnost njenog kontrolisanja od izuzetnog značaja. Difuzija predstavlja prenos mase i može se izraziti promenom hemijskog potencijala; u hidrogelu to je složen fenomen koji zavisi od koncentracije fluida i stepena bubrenja hidrogela [57].

Matematičko predstavljanje procesa difuzije u jednoj dimenziji dato je prvim Fick-ovim zakonom difuzije koji kaže da je fluks (J), tj. brzina difuzije, difuzionog supstrata kroz jedinicu površine proporcionalan gradijentu koncentracije [2, 6, 63]:

$$J = -D \left(\frac{\partial C}{\partial x} \right) \quad (1.2.5.1)$$

gde je $\left(\frac{\partial C}{\partial x} \right)$ gradijent koncentracije koji predstavlja pokretačku silu difuzije, a D koeficijent difuzije fluida ili rastvorene aktivne supstance u polimernoj matrici. Negativni predznak pokazuje da je pravac kretanja molekula suprotan porastu koncentracije. Pretpostavljeno je da koeficijent difuzije (D) ne zavisi od rastojanja (x), koncentracije fluida ili rastvorene aktivne supstance (C) i vremena (t) i konstanta je za dati sistem. Druga pretpostavka je da fluks (J) odgovara prosečnoj masenoj brzini.

Kada se gradijent koncentracije menja sa vremenom, brzina promene koncentracije u jednoj dimenziji data je drugim Fick-ovim zakonom [2, 6, 63]:

$$\left(\frac{\partial C}{\partial t} \right) = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right) \quad (1.2.5.2)$$

Rešenja jednačina sadrže početne i granične uslove i odgovaraju opisu eksperimentalnih uslova. Rešenje Fick-ovog zakona, koje je dao Crank [64], važi za uzorke male debljine (l) i određene geometrije i dato je jednačinom:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2 \pi^2} \cdot \exp \left[\frac{-(2n+1)^2 \pi^2 D}{l^2} t \right] \quad (1.2.5.3)$$

gde je M_t masa fluida koju je gel apsorbovao u vremenu t , M_∞ masa fluida u ravnoteži ($t \rightarrow \infty$).

Za kratak vremenski period, kada $t \rightarrow 0$, jednačina (1.2.5.3) se pojednostavljuje u jednačinu (1.2.5.4), i koristeći planarnu geometriju može se iskoristiti za izračunavanje difuzionog koeficijenta fluida (D) [2]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{4}{\sqrt{\pi}} \left[\frac{Dt}{l^2} \right]^{1/2} \quad (1.2.5.4)$$

Nagib krive $\frac{M_t}{M_\infty}$ u funkciji od $t^{1/2}$ daje difuzioni koeficijent fluida za dati hidrogel. U početnoj fazi bubrenja, kada hidrogel još nije ušao u stanje ravnoteže, $\frac{M_t}{M_\infty}$ je linearno sa kvadratnim korenom vremena, omogućavajući određivanje difuzionog koeficijenta [2].

Prethodna analiza se odnosi na sisteme na koje se može primeniti Fick-ov zakon difuzije. Transport tečnosti ili malih molekula u polimernu mrežu ili iz nje često ne sledi ovaj model, već je kontrolisan procesom difuzije, usled gradijenta koncentracije, i procesom relaksacije polimernih lanaca. Relaksacija polimera je kontrolisana odgovorom polimerne mreže na naprezanje usled bubrenja, zavisi od vremena i doprinosi brzini i obimu penetracije molekula u polimernu mrežu.

Kako bi se odredila priroda difuzije fluida u mrežu hidrogela i iz nje, koristi se semi-empirijska jednačina [6, 65]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (1.2.5.5)$$

koja važi za uslove $0 < \frac{M_t}{M_\infty} < 0.60$. Karakteristični parametri bubrenja za dati sistem su: kinetička konstanta bubrenja (k), koja zavisi od strukture/geomerije hidrogela i difuzioni eksponent (n), koji pokazuje da li je proces bubrenja kontrolisan difuzijom i/ili relaksacijom mreže; M_t i M_∞ su mase hidrogela u vremenu t i u trenutku dostizanja ravnotežnog stepena bubrenja.

Iz pravolinijske zavisnosti $\ln \frac{M_t}{M_\infty}$ od $\ln t$ (1.2.5.6), koja važi za početnu fazu bubrenja hidrogela, a dobija se logaritmovanjem jednačine (1.2.5.5), vrednost k se izračunava iz odsečka na ordinati, a n iz nagiba prave [2, 66].

$$\ln \frac{M_t}{M_\infty} = \ln k + n \ln t \quad (1.2.5.6)$$

Na osnovu vrednosti difuzionog eksponenta može se odrediti tip transporta fluida u hidrogel. Za jednodimenzionalnu pločastu geometriju, bubrenje je kontrolisano difuzijom za $n \leq 0.5$. Slučaj je poznat kao Fick-ova difuzija, gde je brzina relaksacije mreže veća od brzine difuzije, a difuzioni koeficijent opisuje brzinu bubrenja. Za $n=1$, transport je kontrolisan brzinom relaksacije polimerne mreže, brzina difuzije veća je od brzine relaksacije mreže i to je slučaj ne-Fick-ove difuzije. Za vrednosti $0.5 < n < 1$, oba efekta značajno utiču na brzinu bubrenja i ni jedan se ne sme zanemariti. Takav transport odstupa od Fick-ovog zakona i naziva se anomalna difuzija [2, 63, 66].

1.2.6 Struktura mreže hidrogela

Struktura hidrogela je izuzetno značajna za razumevanje njegovog ponašanja u različitim uslovima, kao i za njegovu primenu. Hidrogel nema homogenu strukturu. On poseduje gušće umrežena područja koja upijaju manje količine fluida, dispergovana unutar područja manje gustine umreženja i velikog stepena bubrenja [2, 67]. Strukturu i svojstva hidrogela značajno određuje vrsta monomera koji se koristi za njegovu sintezu. Pogodnim izborom monomera dobija se željena hemijska struktura u pogledu broja i vrste bočnih grupa i manje ili veće hidrofilnosti.

Tri najvažnija parametra koji karakterišu strukturu mreže hidrogela su: zapreminski udeo polimera u nabubrelom stanju (v_{2m}), srednja molekulska masa između susednih čvorova mreže ($\bar{M}_c$) i srednja veličina pora (ζ) [6]. Parametri mreže zavise od mnogo faktora, kao što su rastvarač, temperatura, brzina i doza zračenja, i mogu se izračunati na osnovu eksperimentalno dobijenih vrednosti modula smicanja korišćenjem dinamičko mehaničke analize i rezultata bubrenja.

1.2.6.1 Zapreminski udeo polimera u nabubrelom stanju

Zapreminski udeo polimera u nabubrelom stanju hidrogela, v_{2m} , predstavlja odnos zapremine polimera, V_p , i zapremine hidrogela u nabubrelom stanju, V_{gel} , odnosno predstavlja recipročnu vrednost ravnotežnog stepena bubrenja hidrogela, q_e . Može se odrediti iz eksperimentalnih rezultata ravnotežnog bubrenja [6, 7, 31, 57, 68]:

$$v_{2m} = \frac{V_p}{V_{gel}} = \frac{1}{q_e} \quad (1.2.6.1)$$

1.2.6.2 Srednja molekulska masa između čvorova mreže

Zbog statističke prirode procesa polimerizacije jedino se srednja molekulska masa između tačaka umreženja ($\bar{M}_c$) može izračunati [6]. $\bar{M}_c$ predstavlja pravi nivo umreženja i određuje se iz eksperimentalnih rezultata bubrenja [57], i za neutralan, divinilni hidrogel data je jednačinom 1.2.4.5.

$$\frac{1}{\bar{M}_c} = \frac{2}{\bar{M}_n} - \frac{\left(\frac{\bar{v}}{v_1}\right)[\ln(1-v_{2m}) + v_{2m} + \chi v_{2m}^2]}{v_{2m}^{\frac{1}{3}} - \left(\frac{2}{\phi}\right)v_{2m}} \quad (1.2.4.5)$$

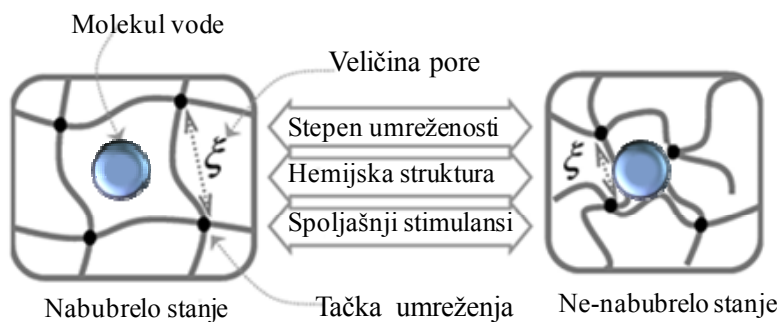
1.2.6.3 Veličina pora

Poroznost kao jedna od najvažnijih karakteristika hidrogela opisuje se veličinom pora. Veličina pora (ξ) hidrogela definisana je kao linearno rastojanje između dva susedna čvora mreže koje daje meru slobodnog prostora između makromolekulskih lanaca. Izračunava se korišćenjem jednačine [6, 7, 61, 69]

$$\xi = v_{2m}^{-1/3} \left(\frac{2C_n \bar{M}_c}{M_r} \right)^{1/2} l \quad (1.2.6.2)$$

gde je C_n faktor krutosti polimera, Flory-jev karakteristični odnos, l dužina C-C jednostruke veze u glavnom polimernom lancu (za vinilne polimere iznosi 0.154 nm), a M_r molarna masa ponavljajućih jedinica koje čine polimerni lanac [6, 31, 62, 70].

Na osnovu veličine pora hidrogelovi se dele na: neporozne (1-10 nm), mikroporozne (10-100 nm), makroporozne (100-1000 nm) [6]. Veličina pora hidrogela predstavlja srednju vrednost na koju utiču stepen umreženja hidrogela, hemijska struktura monomera koji ulaze u njihov sastav i spoljašnji stimulansi, kao što su temperatura, pH, pritisak i jonska jačina [7].



Slika 1.9 Shematski prikaz veličine pora u nabubrelom i suvom hidrogelu [31, 71]

Kada se odgovarajuće sintetiše, struktura i veličina pora nabubrela hidrogela, kao i molekulska masa između čvorova mreže mogu se dizajnirati tako da se dobije željena brzina difuzije fluida, željene mehaničke osobine i stepen bubrenja hidrogela [31, 70]. Srednja veličina i raspodela pora, kao i njihova međusobna povezanost su važni parametri strukture hidrogela, koje je često teško kvantitativno odrediti; određuju se primenom teorije deformacije mreže ili korišćenjem različitih eksperimentalnih tehnika [6]. Veličine pora kod hidrogelova koji se koriste u medicini su u opsegu od 5 do 100 nm u njihovom nabubrelom stanju, što je mnogo veće od većine malih molekula lekova, usled čega njihova difuzija u hidrogelovima nije ograničena.

1.2.6.4 Gustina umreženja

Ako je poznata srednja molekulska masa između tačaka umreženja ($\bar{M}_c$), efektivna gustina umreženja (v_e) može se dobiti kao:

$$v_e = \frac{\rho}{\bar{M}_c} \quad (1.2.6.3)$$

gde je ρ gustina kserogela.

Sa porastom gustine umreženja stepen bubrenja hidrogelova opada, kao i difuzija molekula rastvarača i apsorbovanih aktivnih supstanci kroz hidrogel [9].

1.2.6.5 Parametar interakcije polimer-rastvarač

U hidrogelovima, termodinamička interakcija se ogleda u parametru interakcije polimer-rastvarač (χ), koji ukazuje na promene energije interakcije pri mešanju polimera i rastvarača. Ukoliko je poznata srednja molekulaska masa između čvorova mreže ($\bar{M}_c$), parametar interakcije se može dobiti iz Flory-Rehner-ove jednačine [72-74]:

$$\bar{M}_c = - \frac{\rho(1-\frac{2}{\phi})V_1 v_{2r}^{2/3} v_{2m}^{1/3}}{(\ln(1-v_{2m})+v_{2m}+\chi v_{2m}^2)} \quad (1.2.6.4)$$

Jednostavnija relacija za određivanje parametra interakcija je:

$$\chi \approx \frac{1}{2} + \frac{v_{2m}}{3} \quad (1.2.6.5)$$

koja je rezultat pretpostavke da $\bar{M}_c$ teži beskonačnosti, pri čemu imenilac u jednačini (1.2.6.4) postaje jednak nuli [74].

U sistemu polimer-voda viša vrednost χ ukazuje na njihovu slabiju interakciju, dok je interakcija između hidrofobnih grupa ili polimernih lanaca jača [75]. Razumevanje interakcija polimer-fluid vrlo je važno, posebno kad je reč o biološkim fluidima i mogućnostima razvoja ovakvih materijala za medicinsku primenu.

1.2.7 Bubrenje hidrogelova

Kada dođe u kontakt sa fluidom suvi gel, kserogel, počinje da upija fluid u svoju mrežu usled difuzije fluida. Molekuli fluida se smeštaju između nasumično sklupčanih lanaca polimera, što dovodi do njihovog istezanja, širenja i povećanja zapremine sistema. Ovaj proces nazvan bubrenje hidrogela, izražava se stepenom bubrenja i predstavlja važnu karakteristiku hidrogela. Veći stepen bubrenja odgovara većem sadržaju fluida unutar mreže hidrogela. Stepem bubrenja (q) se definiše kao [8, 9, 59]:

$$q = \frac{M_t - M_0}{M_0} \quad (1.2.7.1)$$

gde su M_0 i M_t mase kserogela i nabubrelog gela u vremenu t . Stepen bubrenja hidrogela sa vremenom raste i nakon izvesnog vremena ulazi u ravnotežu, dostižući konstantnu vrednost nazvanu ravnotežni stepen bubrenja (q_e), koji je definisan kao:

$$q_e = \frac{M_e - M_0}{M_0} \quad (1.2.7.2)$$

gde je M_e masa nabubrelog hidrogela u stanju ravnoteže. Stepen bubrenja najčešće se prati gravimetrijski [76, 77].

Unutrašnja površina hidrogela sa fluidom je kompleksna i jedinstvena celina. Kada se kserogel nađe u vodi počinje da bubri. Prvi molekuli fluida hidriraju najpolarnije, hidrofilne grupe. Fluid koji na ovaj način dospe u hidrogel naziva se „primarno vezan“ fluid. Usled toga dolazi do širenja polimernih lanaca pri čemu i hidrofobne grupe započinju interakciju sa fluidom preko hidrofobnih interakcija, a fluid vezan na ovaj način naziva se „sekundarno vezan“ fluid. Zajedno, primarno i sekundarno vezan fluid naziva se „ukupno vezan“ fluid [2, 67]. Nakon interakcije fluida sa hidrofilnim i hidrofobnim mestima, osmotska pokretačka sila lanaca mreže dozvoljava da mreža apsorbuje još fluida. Ovo dodatno bubrenje je ograničeno prisustvom kovalentnih ili fizičkih umreženja duž elastične mreže, nakon čega hidrogel dostiže ravnotežni stepen bubrenja. Dodatno apsorbovan fluid naziva se „slobodan“ fluid i popunjava prostor između lanaca mreže [2, 67]. Količina „slobodnog“, „slabo vezanog“ i „vezanog“ fluida varira kroz unutrašnju površinu hidrogela. Kada je sadržaj fluida u hidrogelu iznad 90%, hidrogel se naziva superapsorbujućim.

Stepen bubrenja hidrogela u najvećoj meri zavisi od hemijske strukture i stepena umreženja. Sa porastom udela hidrofilnih grupa u mreži hidrogela sadržaj fluida i stepen bubrenja raste, dok sa porastom stepena umreženja, odn. broja poprečnih veza u mreži, smanjuje se fleksibilnost polimernih lanaca povećavajući otpor sklupčanih lanaca ka izduživanju, što dovodi do smanjenja stepena bubrenja [12].

Karakteristike bubrenja hidrogela su ključ za njegovu primenu, posebno u farmaciji, oftalmologiji i tkivnom inženjerstvu. Prisustvo fluida na površini hidrogela

redukuje međupovršinsku slobodnu energiju u fiziološkom okruženju i tako poboljšava njegove biološke osobine. Ravnotežni stepen bubrenja utiče na difuzioni koeficijent rastvorene supstance, stepen nakvašenosti površine, kao i na njegove optičke i mehaničke osobine [59].

1.2.8 Mehanička svojstva hidrogelova

Mehanička svojstva hidrogela su od izuzetne važnosti za njegovu primenu. Hidrogelovi se u velikoj meri koriste kao nosači za kontrolisano oslobađanje lekova i od njih se zahteva da zaštite osetljiva terapijska sredstva do trenutka njihovog oslobađanja sa nosača. Da bi se to postiglo, potrebno je odabrati odgovarajući odnos monomera i način sinteze koji omogućava da dobijeni hidrogel tokom primene zadrži dobra mehanička svojstva i preciznu geometriju [6].

Mehaničke osobine hidrogela zavise od vrste monomera, sadržaja fluida i stepena umreženja. Hidrogelovi sa većim sadržajem fluida pokazuju bolju permeabilnost i biokompatibilnost. Međutim, obično je veliki stepen bubrenja praćen opadanjem mehaničke jačine [78]. Povećanjem stepena umreženja dobija se čvršći gel, ali krtije strukture i nižeg stepena bubrenja. Optimalni stepen umreženja je onaj pri kome hidrogel ima dobra mehanička svojstva i željeni stepen bubrenja za datu primenu. U cilju dobijanja hidrogelova odgovarajućih mehaničkih karakteristika vrši se kopolimerizacija hidrofilnih monomera sa hidrofobnim, povećanje gustine umreženja ili variranje uslova polimerizacije [6, 9, 59, 79-83].

Parametri mreže hidrogela mogu se izračunati na osnovu eksperimentalno dobijenih vrednosti kompresionih modula, korišćenjem dinamičko mehaničke analize. Za homogenu mrežu, kompresioni modul ravnotežno nabubrelog hidrogela (G) povezan je sa srednjom molekulskom masom između čvorova mreže jednačinom [74]:

$$G = A \frac{\rho}{M_c} RT v_{2r}^{2/3} v_{2m}^{1/3} \quad (1.2.8.1)$$

Faktor A jednak je 1 za afine mrežu i $1 - \frac{2}{\phi}$ za fantom mrežu, gde je ϕ broj grananja na mestu umreženja i kreće se od 3 pa naviše. Kako postoje četiri grane na mestu umreženja, mnogi autori uzimaju $\phi = 4$, pa je $A = 0.5$ za fantom mrežu [84].

1.2.9 Biološke karakteristike hidrogelova

1.2.9.1 Biokompatibilnost

Kod upotrebe sintetičkih biomaterijala vrlo je važan odgovor organizma pri njihovoj implantaciji. Biokompatibilnost je jedan od najvažnijih faktora o kom se mora voditi računa prilikom sinteze biomaterijala. Podrazumeva biološku kompatibilnost u kontaktu sa organizmom, što zahteva da materijal nije toksičan, alergen, kancerogen i mutagen, da ne izaziva povređivanje ili imunološki odgovor biološkog sistema ili njegovo odbacivanje. Biološki odgovor će zavisi od sastava i strukture materijala, kao i karakteristika mesta gde se primenjuje [85]. Biokompatibilnost hidrogelova u vezi je sa njihovom prirodom. Prisustvo vode u njima čini ih mekanim i elastičnim, tkivima sličnim, što maksimalno smanjuje iritaciju trenjem u kontaktu sa fiziološkim sistemom nakon implantacije.

Za ispitivanje biokompatibilnosti hidrogelova primenjuju se različite metode, u *in vitro* i *in vivo* režimu, mada ni jedan test ne daje kompletne informacije. *In vitro* analiza citotoksičnosti je prvi test ispitivanja biokompatibilnosti bilo kog materijala za primenu u medicini [86]. Značajne informacije mogu se dobiti i ispitivanjem hemolitičke aktivnosti [9]. Čelije i proteini pokazuju nisku sklonost za atheziju na površini hidrogelova zbog njihove niske međupovršinske slobodne energije u kontaktu sa telesnim fluidima [87]. Generalno, hidrogelovi pokazuju dobru biokompatibilnost [88-90], što je potvrđeno njihovom širokom upotrebom za oftalmološke i vaskularne proteze, u sistemima za oslobađanje lekova, kao skafolda, prevlaka za opekotine i zamenu mekih tkiva [91-97].

1.2.9.1.1 Proba citotoksičnosti

Citotoksičnost predstavlja meru toksičnosti materijala u interakciji sa tkivima i ćelijama domaćina. Prati se preko procenta preživljavanja ćelijskih kolonija u interakciji sa biomaterijalom i izražava indeksom citotoksičnosti ($IC_{50\%}$), koji je definisan kao koncentracija ekstrakta, dobijena pri interakciji biomaterijala sa ćelijama, koja prouzrokuje oštećenje ili smrt 50% ispitivane ćelijske populacije. Test citotoksičnosti se izvodi jednom od sledećih metoda: metod ekstrakcije razblaženjem, metod direktnog kontakta i difuzijom agara [98, 99].

Većina problema vezanih za toksičnost hidrogelova potiče od neporeagovalih monomera i umreživača koji se izdvajaju prilikom primene ovih materijala. Zato je važno poznavanje toksičnosti monomera koji ulaze u sastav hidrogela, izvođenje procesa polimerizacije u uslovima koji obezbeđuju njihovu maksimalnu konverziju, a zaostale monomere pre upotrebe hidrogela potrebno je ukloniti intenzivnim ispiranjem u vodi [6].

1.2.9.1.2 Hemolitička aktivnost

Hemolitička aktivnost predstavlja meru oštećenja ili destrukcije crvenih krvnih zrnaca u interakciji sa biomaterijalom, što dovodi do oslobađanja hemoglobina u okolni fluid. Može se meriti na direktan ili indirektan način. Stepem destrukcije predstavlja se procentom hemolize i ukoliko je taj procenat ispod 5% materijal ispunjava uslov biokompatibilnosti [9].

1.2.9.2 Test bakterijske penetracije

Hidrogelovi dosta slične ćelijama i tkivima po sadržaju vode. Njihova primena u medicini podrazumeva interakciju sa okolnom sredinom ili biološkim fluidima u kojima egzistiraju mnogobrojni mikroorganizmi i bakterije. Test penetracije bakterija kroz hidrogel izvodi se u cilju provere ponašanja hidrogela u kontaktu sa bakterijama i mogućnost da odigraju ulogu barijere u odnosu na njih. Sprečavanje pojave

mikroorganizama je važno kako za medicinske primene, kao što su zavoji za opekotine i prevlake za rane, kontaktna sočiva, tako i za primenu u kozmetici i farmaciji [20, 100].

1.2.9.3 Antimikrobna aktivnost hidrogelova

Hidrogel sa apsorbovanom lekovitom supstancom može da ima ulogu barijere pri prodiranju bakterija i da na takav način spreči razvoj infekcija i daljih štetnih efekata u razvoju bolesti. Da bi se odredio stepen efikasnosti delovanja antibiotika oslobođenog iz hidrogela u predviđenom vremenskom intervalu i na ciljano mesto u organizmu, izvodi se test antibakterijske aktivnosti hidrogela sa lekom.

1.2.10 Primena hidrogelova

Kako hidrogelovi poseduju visoku vlažnost, poroznu strukturu, dobru propustljivost za kiseonik, nisku apsorpciju proteina i adheziju ćelija, mogućnost površinske modifikacije specifičnim biomolekulima itd., predstavljaju pogodne biomaterijale za izradu mekih kontaktnih sočiva i unutarokularnih sočiva u oftalmologiji, prevlaka za opekotine i rane u dermatologiji, veštačkih hrskavica i tetiva, veštačkih glasnih žica, mišića, nerava, zamenu mekih tkiva. Koriste se i kao separatori proteina, matrice za inkapsulaciju ćelija, skafoldi za tkivno inženjerstvo, biosenzori i substrati za pametne ćelijske kulture [2, 16, 40, 59, 101-106]. Superapsorbujući hidrogelovi koriste se za kontrolisano čišćenje zemljišta od hemikalija i pesticida u poljoprivredi.

Kontaktna sočiva

Jedna od prvih oblasti komercijalne primene hidrogelova bila su kontaktna sočiva. Sa otkrićem hidrogela poli(2-hidroksetil metakrilata) (HEMA) od strane Wichterle-a i Lim-a 1960. godine i jednostavnog procesa proizvodnje kontaktnih sočiva, industrija kontaktnih sočiva je procvetala, a oblast istraživanja hidrogelova je naglo proširena. PHEMA je postao vodeći materijal za proizvodnju hidrogelnih kontaktnih sočiva, pored P(HEMA/etilen glikol dimetakrilata), koji u ravnotežnom hidratisanom stanju sadrži oko 40% vode i kao rezultat toga vrlo je udoban za nošenje. Da bi se

koristio za proizvodnju kontaktnih sočiva materijal mora da je optički transparentan, hemijski i termički stabilan, biokompatibilan, da je moguće kvašenje suzama, kao i da je propusan za kiseonik. Mora da poseduje odgovarajuće mehaničke osobine, što podrazumeva nizak koeficijent trenja u cilju udobnijeg nošenja za pacijenta i visoku jačinu na cepanje u cilju dugotrajnosti [9, 59, 107].

Obloge za opekotine i rane

Primena hidrogelova kao prevlaka za lečenje rana, opekotina ili povreda otpočela je ranih 80-ih godina prošlog veka. Zbog svoje hidrofilnosti i visokog sadržaja vode hidrogel omogućava održavanje vlažnosti povređenog mesta, sprečava prekomerni gubitak telesnih tečnosti, dozvoljava difuziju kiseonika do oštećenog tkiva, a istovremeno predstavlja barijeru za bakterije i umiruje bol [59]. Hidrogelne prevlake su meke, elastične i poseduju dobru mehaničku jačinu. U zavisnosti od vrste polimera, mogu biti transparentne, što predstavlja prednost koja omogućava praćenje zarastanja rane bez uklanjanja obloge [9, 108, 109]. Cilj terapije rana hidrogelnim prevlakama je očuvati kontakt rane i mikroorganizama na što je moguće nižem nivou kako bi se sprečila infekcija i ubrzao proces zarastanja i regeneracije tkiva. Ugradnja leka ili antimikrobnog agensa u hidrogel i njegovo kontrolisano oslobađanje tokom vremena, bez ispiranja protokom telesnih fluida, dovodi do bržeg zarastanja rana [110].

Tehnologija dobijanja hidrogelnih prevlaka se sastoji od pripremanja vodenih rastvora prirodnih ili sintetičkih polimera, pakovanja u finalne kutije koje su nepropusne za vazduh i mikroorganizme i na kraju ozračivanja elektronskim snopom iz akceleratora ili γ zracima iz izvora ^{60}Co , do obrazovanja hidrogela. Nakon zračenja gel je spreman za upotrebu, jer istovremeno dolazi i do njegove sterilizacije. Doza od 25 kGy se pokazala efikasnom kako za sterilizaciju biomaterijala, tako i za formiranje postojane mreže hidrogela [27].

Primena hidrogelova u tkivnom inženjerstvu

Tkivno inženjerstvo predstavlja multidisciplinarnu oblast koja uključuje poznavanje nauke o materijalima, medicine i biologije u cilju razvoja bioloških supstituenata, tkiva i organa. Predstavlja nezamenljivu oblast regenerativne medicine, koja uključuje ćelije/tkiva, skafolde i implantaciju. Hidrogelovi su se pokazali kao

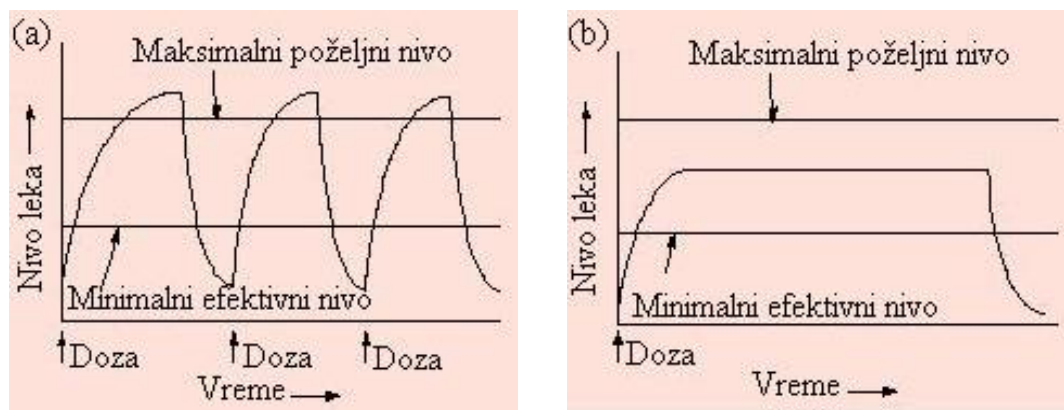
pogodni materijali zbog svoje visoke biokompatibilnosti, mogućnosti dobijanja u različitim oblicima, kao i mogućnosti resorpcije onih na bazi polilaktidne (PLA) i poliglikolne (PGA) kiseline i njihovih kopolimera (PLA/PGA, PLGA). I sintetički i prirodni hidrogelovi koriste se kao skafoldi u tkivnom inženjerstvu u cilju reparacije hrskavice, tetiva, ligamenata, kože, krvnih sudova i srčanih zalizaka [9].

1.2.10.1 Kontrolisano oslobađanje lekova

Koncept sistema za kontrolisano oslobađanje lekova je da se u matricu od prirodnog ili sintetičkog polimernog materijala inkorporira aktivni agens na takav način da se njegovo oslobađanje iz matrice tokom vremena odvija na željeni, unapred definisan način. Pod aktivnim agensom se podrazumevaju antibiotici, vitamini, hormoni i makromolekuli kao što su nukleinske kiseline, proteini, peptidi, antitela itd. [111]. Polimerna matrica najčešće podrazumeva sintetičke polimere, koji imaju prednost nad prirodnim materijalima jer se mogu sintetisati tako da imaju bolje osobine i veću uniformnost. Polimeri koji se koriste kao nosači za lekove mogu biti nedegradabilni i biodegradabilni, koji degradiraju u organizmu dajući netoksične ostatke. Idealni sistem za oslobađanje lekova treba da je inertan, biokompatibilan, mehanički jak, elastičan, udoban za pacijenta, dovoljno hidrofilan i sposoban da dostigne visoko skladištenje leka za zahtevani nivo u krvi, imun na neočekivano oslobađanje, jednostavan za ugradnju i disperziju leka u matrici, kao i jednostavan za sintezu i sterilizaciju [4, 112-115].

Hidrogelovi su našli značajnu primenu kao nosači u sistemima za kontrolisano oslobađanje lekova, zbog čega se ova oblast intenzivno izučava poslednjih dvadesetak godina, a njihova prednost u odnosu na klasične metode oralnog ili injektivnog doziranja je višestruka. Oni omogućavaju održavanje koncentracije leka na željenom nivou za duži vremenski period. Lek može lako da difunduje kroz hidrogel, a brzina difuzije može se kontrolisati promenom gustine umreženja, sintezom hidrogelova kontrolisane hidrofilnosti i/ili kontrolisanog odnosa udela hidrofilnih/hidrofobnih monomera. U poređenju sa hidrofobnim materijalima, hidrogelovi mogu interagovati manje snažno sa lekom, što za posledicu ima veću frakciju leka oslobođenu kroz hidrogelne nosače. Kao nedostatak javlja se veća cena koštanja sistema za kontrolisano oslobađanje u poređenju sa tradicionalnim farmaceutskim načinima doziranja leka.

Cilj sistema za kontrolisano oslobađanje leka je da dostavi lek specifičnom brzinom koja obezbeđuje efikasan nivo leka u krvi tokom dužeg vremenskog perioda. Kod tradicionalnog doziranja leka, oralno ili injektivno, nivo leka u krvi sledi profil kao na slici 1.10a, raste nakon administracije dostižući maksimalni efektivni nivo (koji u određenim slučajevima može biti i toksičan), a zatim njegova koncentracija opada do ispod minimalnog efektivnog nivoa, ispod kojeg lek više ne deluje [112, 116-118].



Slika 1.10 Profil oslobađanja leka koji se ostvaruje doziranjem (a) na tradicionalan način i (b) sistemom za kontrolisano oslobađanje leka [118]

Kontrolisanim oslobađanjem leka iz hidrogela, nivo leka u krvi sledi profil kao na slici 1.10b, postiže se konstantna koncentracija leka na željenom nivou u organizmu, između minimalne i maksimalne vrednosti, tokom dužeg vremenskog perioda, koji se kreće od jednog dana, preko nekoliko dana, meseci, pa čak i do nekoliko godina [118]. Na ovaj način smanjuje se pojava neželjenih efekata, eliminiše potencijalna predoziranost ili umanjenje aktivne količine leka tokom lečenja, a omogućava oslobađanje leka na željenom mestu i u željenom trenutku.

Oslobađanje leka može da se odigrava konstantno tokom dužeg vremenskog perioda, ciklično tokom dužeg vremenskog perioda ili je inicirano dejstvom nekog stimulansa iz okolne sredine. Održavanjem koncentracije leka na određenom nivou izbegava se njegovo često doziranje u kratkim vremenskim intervalima i time se povećava komfor pacijenta. Poslednjih godina, formulacije sistema za kontrolisano oslobađanje lekova i polimeri koji se koriste u ovim sistemima postaju sve sofisticiraniji, mogu da odgovore na promene u biološkoj okolini i da oslobode ili zaustave oslobađanje u zavisnosti od ovih promena. Takođe, materijal se može

sintetisati tako da ima svojstva da prepozna mesto (ćeliju, tkivo) u organizmu do kog treba da dođe i bude oslobođen [119, 120].

Lek se može inkorporirati u procesu sinteze hidrogela (*in situ*) ili nakon sinteze hidrogela, kao fizički ili hemijski apsorbovan u pore hidrogela. Kod hemisorpcije, dolazi do značajne modifikacije elektronske strukture molekula apsorbata. Kod fizičke apsorpcije lek je slabo vezan sekundarnim Van der Waals-ovim silama.

U sistemima za kontrolisano oslobađanje lekova hidrogelovi se mogu koristiti za oralnu, rektalnu, okularnu, transdermalnu i potkožnu primenu. Oralni način primene je najčešće korišćen, pri kom hidrogel može osloboditi lek na četiri specifična mesta: u ustima, stomaku, tankim crevima i debelom crevu. Kod transdermalnog sistema, do oslobađanja iz polimerne matrice dolazi samo sa jedne strane, ka koži. U tu svrhu najčešće se koriste posebni flastri natopljeni lekom i pričvršćeni na kožu [6, 9].

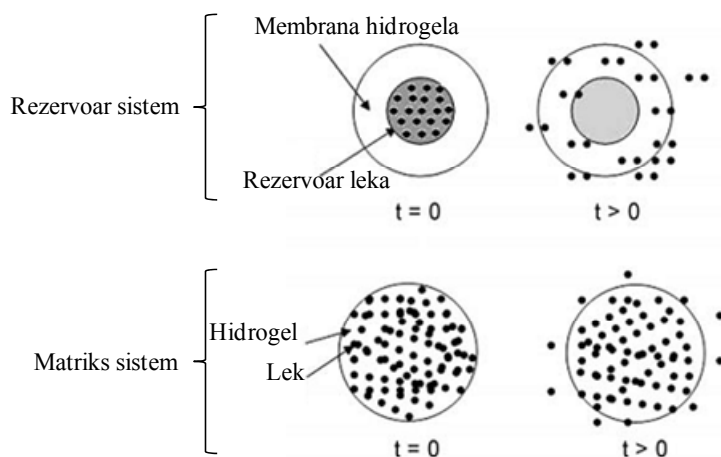
Sistemi za kontrolisano oslobađanje lekovitih agenasa se klasifikuju prema mehanizmu koji kontroliše oslobađanje iz matrice na: sisteme kontrolisane difuzijom, sisteme kontrolisane bubrenjem, hemijski kontrolisane sisteme. Kod biodegradabilnih hidrogelova oslobađanje leka dešava se usled erozije materijala hidrogela [7, 32, 63].

1.2.10.1.1 Proces oslobađanja leka kontrolisan difuzijom

Najčešće korišćen mehanizam oslobađanja lekova iz hidrogelova u okružujućem medijumu je mehanizam kontrolisan difuzijom. Odigrava se kada gradijent koncentracije predstavlja pokretačku silu i može se podeliti na sistem rezervoara i matriks sistem, kao što je shematski prikazano na slici 1.11.

Fenomen difuzije je usko povezan sa strukturom materijala kroz koji se difuzija odvija, tako da je morfologija polimernih materijala važna za postavljanje uspešnog modela. Difuzija se može odvijati na makroskopskoj skali, kroz pore polimerne matrice ili na molekulskom nivou, prolazom između polimernih lanaca. Kada se difuzija dešava kroz pore polimerne matrice, lek je uniformno raspoređen unutar hidrogela, i tada govorimo o matriks sistemu oslobađanja leka kontrolisanog difuzijom. Kod poroznih hidrogelova, sa veličinom pora mnogo većom od dimenzija molekula leka, koeficijent difuzije može se povezati sa poroznošću hidrogela. Kod neporoznih i hidrogelova sa veličinom pora uporedivom sa veličinom molekula leka, koeficijent difuzije leka opada

tokom oslobađanja usled prostornih smetnji polimernih lanaca unutar umrežene strukture. U ovom slučaju srednja slobodna zapremina po molekulu raspoloživa leku opada vodeći do porasta dužine puta difuzije leka i dužeg vremena oslobađanja, tj. brzina oslobađanja tokom vremena opada što predstavlja nedostatak ovakvog sistema [7, 32, 121].



Slika 1.11 Shematski prikaz sistema kontrolisanih difuzijom: sistem rezervoara i matriks sistem [32]

Ukoliko se difuzija odvija prolazom između polimernih lanaca, brzina oslobađanja uglavnom ostaje konstantna. Tada je reč o rezervoar sistemu. Rezervoar u kome se nalazi lek, razblaženi ili koncentrovani rastvor leka unutar polimerne matrice, okružen je membranom hidrogela koji kontroliše brzinu oslobađanja. Kako je polimerna prevlaka uniformna i nepromenljive debljine, brzina difuzije leka će biti vremenski nezavisna i uglavnom stabilna tokom životnog ciklusa sistema za oslobađanje [32]. Kada sistem dođe u kontakt sa vodom, voda difunduje unutar sistema, rastvara lek i obezbeđuje koncentraciju jednaku maksimalnoj rastvorljivosti leka. Lek difunduje kroz membranu hidrogela u okolnu stedinu, pri čemu koncentracija leka pada. Nerastvoren lek u hidrogelu nastavlja da se rastvara u cilju ponovnog dostizanja maksimalne koncentracije. Na ovaj način oslobađanje leka iz rezervoar sistema ostaje konstantna tokom vremena sve dok postoji čvrst nerastvoren lek u hidrogelu [9].

Teorijski modeli koji razmatraju kinetiku oslobađanja lekova se u osnovi zasnivaju na difuzionim jednačinama. Detaljno o difuziji je dato u poglavlju 1.2.5, a

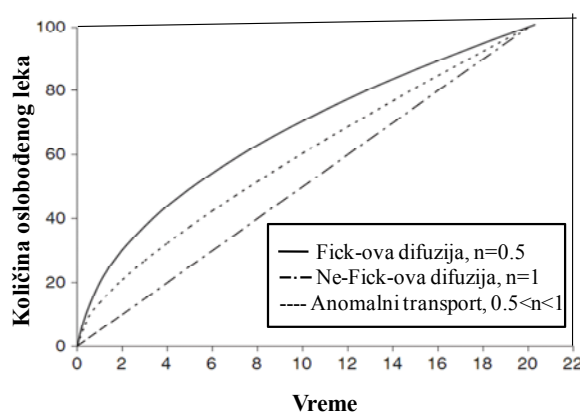
odnosi se kako na transport fluida tako i na oslobađanje lekova. Da bi se za svaki sistem pojedinačno odredilo da li je difuzija dominantan proces, podaci oslobađanja se fituju za početni vremenski period oslobađanja, u opštu jednačinu:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k t^n \quad (1.2.5.5)$$

gde su konstante k i n karakteristični parametri za sistem polimer-lek. Difuzioni eksponent (n) zavisi od geometrije uzorka, kao i od mehanizma oslobađanja.

Informacija o mehanizmu koji kontroliše oslobađanje leka iz uzorka dobija se određivanjem difuzionog eksponenta. Transport leka iz uzoraka geometrije diska deli se na: Fick-ovu difuziju za $n \leq 0.5$, ne Fick-ovu difuziju za $n=1$ i anomalni transport za $0.50 < n < 1$. Za ne Fick-ovu difuziju, dominantan mehanizam transporta leka je usled relaksacije polimera, koja je posledica bubrenja gela. Ovi slučajevi su poznati kao sistemi oslobađanja kontrolisani bubrenjem. Kod anomalnog transporta se kombinuju fenomeni Fick-ove difuzije i relaksacije polimernih lanaca [9, 63, 66].

Jednačina (1.2.5.5) je laka za upotrebu i može se primeniti na mnoge sisteme oslobađanja kontrolisane difuzijom. U sistemima gde je $n=0.5$, ova zavisnost važi samo za prvih 60% profila oslobađanja [63]. Reprezentativne krive oslobađanja leka u zavisnosti od vrednosti difuzionog eksponenta date su na slici 1.12.



Slika 1.12 Tri karakteristična profila oslobađanja leka iz hidrofилne matrice: Fick-ov, ne-Fick-ov i anomalni transport [63]

1.2.10.1.2 Kinetika in vitro oslobađanja aktivnih supstanci

Kinetika oslobađanja aktivnih supstanci iz hidrogelova zavisi od veličine i geometrije uzorka iz koga se oslobađanje dešava (tanki film, disk, sfera, cilindar), hemijskog sastava i strukture hidrogela, načina njegovog dobijanja, spoljašnjih uslova tokom procesa oslobađanja, tipa, hemijske strukture i veličine leka koji se oslobađa. Oslobađanje se dešava preko jednog ili više fizičkih i hemijskih fenomena kao što su: prodiranje rastvora u kome se oslobađanje dešava unutar hidrogela kroz pore mreže, degradacija leka i/ili polimera, difuzija leka u okolni fluid, bubrenje hidrogela, fizičke interakcije između leka i proizvoda degradacije polimera koje se značajno menjaju tokom vremena usled promena u okruženju, hemijske reakcije između leka i proizvoda degradacije polimera i vode, promene u dimenzijama sistema za oslobađanje usled bubrenja. Nije moguće uzeti u obzir sve pomenute fenomene, već se razmatraju samo dominantni fizički i hemijski procesi [7]. Relativno laka tehnika određivanja koeficijenta difuzije je merenje količine oslobođenog leka iz tankih gelova; disk sa dispergovanim lekom se postavlja u rastvor bez leka i prati se koncentracija leka koji se oslobađa u vremenu.

Postoje različiti profili oslobađanja aktivnih supstanci. Kod hidrogelova je zastupljen profil kod kog se mogu razlikovati dve faze oslobađanja: prva je spoljašnja difuzija, tj. brzo oslobađanje leka, kada se javlja efekat pucanja, tzv. „rana“ faza; sledi „kasna“ faza sporijeg oslobađanja leka, tj. unutrašnja difuzija. Na početku dolazi do oslobađanja molekula leka koji se nalaze vezani na površini i slojevima bližim površini diska hidrogela i ova aproksimacija važi za prvih 60% procesa oslobađanja. Aproksimacija „kasne“ faze važi za preostalih 40% procesa i odvija se po mehanizmu difuzije u porama hidrogela [7, 64].

Za „ranu“ fazu procesa oslobađanja koristi se ranije navedena jednačina [32, 122, 123]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{4}{\sqrt{\pi}} \left[\frac{D_E t}{l^2} \right]^{1/2} \quad 0 \leq \frac{M_t}{M_\infty} \leq 0.6 \quad (1.2.5.4)$$

koja daje odnos količine oslobođenog leka u vremenu t (M_t) prema krajnjoj količini oslobođenog leka (M_∞) za kraći vremenski period. D_E je difuzioni koeficijent fluida u

„ranoj“ fazi, t je vreme oslobađanja, a l debljina uzorka. Nagib krive $\frac{M_t}{M_\infty}$ u funkciji od $t^{1/2}$ daje difuzioni koeficijent u „ranoj“ fazi oslobađanja leka za dati hidrogel [64, 66, 124, 125].

Za „kasnu“ fazu oslobađanja leka koristi se relacija [123]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \exp\left(\frac{-\pi^2 D_l t}{l^2}\right) \quad 0.6 \leq \frac{M_t}{M_\infty} \leq 1 \quad (1.2.10.1)$$

odakle se izračunava difuzioni koeficijent za kasnu fazu, D_l , kao nagib krive $\ln(1 - \frac{M_t}{M_\infty})$ u funkciji od t [66, 122, 124, 125]. Ovo daje dobre rezultate samo u sistemima gde difuzija predstavlja dominantan mehanizam oslobađanja leka.

1.2.10.1.3 Proces oslobađanja leka kontrolisan bubrenjem

Kod ovog mehanizma oslobađanja leka hidrogel trpi fazni prelaz iz staklastog u gumoliko stanje. U nehidratisanom, staklastom stanju molekuli leka ostaju zaštićeni i nepokretni u mreži hidrogela, dok u gumolikom stanju rastvoreni molekuli leka brzo difunduju kroz nabubreli hidrogel. Formiranje nabubrele faze hidrogela je praćeno naglim smanjenjem mehaničke jačine, povećanjem propustljivosti u nabubrelom delu gela, što omogućava molekulima leka da difunduju van gumolike faze hidrogela. Tako brzina oslobađanja leka zavisi od brzine bubrenja hidrogela, a vreme relaksacije polimera je faktor koji kontroliše oslobađanje [6, 7].

1.2.10.2 Hidrogelovi kao nosači za sintezu nanočestica

Nanočestice metala poslednjih godina privlače veliku pažnju zbog njihovih optičkih, električnih i magnetnih osobina, koje su potpuno različite od onih koje pokazuje metal u masi, zbog čega su našli primenu u katalizi, elektronici, fotonici, optici i medicini [126]. Antimikrobna aktivnost srebra poznata je od davnina, a potvrđene su antimikrobne osobine i nanočestica nekih drugih metala (Cu, Au, Pt). Tako se materijali koji sadrže srebro mogu koristiti u medicini za redukovanje infekcije pri tretmanu opekotina, za prevenciju kolonizacije bakterija na protezama, kateterima,

dentalnom materijalu i koži, za eliminaciju mikroorganizama na tekstilu ili za tretiranje vode [127-133].

Razvijene su brojne metode za sintezu metalnih nanočestica kao što su hemijska redukcija soli metala korišćenjem citratne kiseline, borhidrida i drugih organskih jedinjenja, fotohemijska redukcija, UV i mikrotalasno zračenje, primena lasera, metod γ radiolize, upotreba mikroorganizama itd. [126, 134-142].

Sinteza nanočestica primenom γ zračenja izvodi se izlaganjem rastvora soli metala γ zracima. Hidratizani elektroni i atomi vodonika nastali radiolizom vode su jaka redukciona sredstva koja redukuju metalne jone do nulte valentnosti [140]. Umereni uslovi i relativno brza sinteza, bez dodavanja drugih hemikalija, predstavljaju prednosti ove nad ostalim metodama [143-145]. Jedna od najznačajnijih karakteristika ove vrste sinteze nanočestica je njihova stabilnost i odsustvo aglomeracije. Za stabilizaciju nanočestica mogu se koristiti različite vrste matrica, kao što su polimeri, organski molekuli, mezoporozni neorganski materijali, koloidni sistemi [146-149]. Hidrogelovi, kao trodimenzionalne mreže, u određenim slučajevima su pogodniji kao matrice za proizvodnju nanočestica od gore pomenutih sistema [150-152]. U nabubrelom stanju, slobodan prostor unutar mreže može poslužiti kao nanoreaktor za nukleaciju i rast nanočestica [150, 151]. Tako se veličina, morfologija i distribucija nanočestica može kontrolisati modifikacijom hidrogela. Pored toga, nanokompozitni hidrogelovi su pogodniji za medicinsku primenu i zbog izražene kompatibilnosti sa biološkim molekulima, ćelijama i tkivima.

2. Eksperimentalni deo

2.1 Monomeri korišćeni za sintezu hidrogelova

Karakteristike monomera korišćenih za sintezu hidrogelova na bazi 2-hidroksietil metakrilata i četiri oligo(alkilen glikol) (met)akrilata sa malim udelima itakonske kiseline, koji su bili predmet interesovanja ovog rada date su niže. Sve korišćene supstance su komercijalni proizvodi visoke čistoće, upotrebljavani bez daljeg prečišćavanja.

2-hidroksietil metakrilat (HEMA) proizvođača Aldrich, Nemačka, bruto molekulske formule $C_6H_{10}O_3$, molarne mase 130.14 g/mol, gustine 1.07 g/cm³, temperature ključanja 213°C, temperature paljenja 101°C i čistoće 99% korišćen je za sintezu.

Hidrogelovi na bazi HEMA su dosta proučavani i često korišćeni sistemi zbog široke mogućnosti primene u medicini i farmaciji, visoke biokompatibilnosti, dobrih fizičkohemijjskih osobina i sadržaja vode sličnom onom u tkivima [153, 154]. PHEMA homopolimerni hidrogel je inertan kada su u pitanju normalni biološki procesi, propustljiv je za metabolite, ne apsorbuje se u organizmu, podnosi toplotnu sterilizaciju bez oštećenja i može se dobiti u različitim oblicima. Pokazuje dobru hemijsku stabilnost, mehaničke osobine i toleranciju na ugrađenje ćelije [155]. Kako je homopolimer PHEMA u osnovi nejoski gel [156], tj. ne pokazuje zavisnost stepena

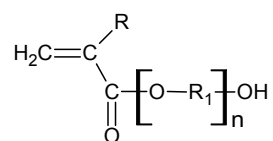
bubrenja od pH, dobijanje pH reagujućih hidrogelova podrazumeva modifikaciju kopolimerizacijom sa pH reagujućim komponentama [157, 158].

Itakonska kiselina (IA) je nezasićena dikarbonska kiselina vinilnog tipa. Nezasićena dvostruka veza omogućava izvođenje reakcije polimerizacije, a dve karboksilne grupe reakcije esterifikacije. Konstante jonizacije karboksilnih grupa na 25°C su: $K_1 = 1.40 \times 10^{-4}$ i $K_2 = 3.56 \times 10^{-6}$ ($pK_1 = 3.85$ i $pK_2 = 5.45$) [159, 160]. Zbog prisustva karboksilnih grupa čak i mali udeo IA obezbeđuje dobar pH odziv i porast stepena bubrenja hidrogela [73, 161-166]. U industriji se dobija procesom fermentacije skroba ili melase, pa zbog prirodnog porekla pokazuje visok stepen biokompatibilnosti.

Bruto molekulska formula itakonske kiseline je $C_5H_6O_4$, a strukturna je data u tabeli 2.1. Za sinteze je korišćena IA proizvođača Aldrich, Nemačka, molarne mase 130.10 g/mol, gustine 1.57 g/cm³, temperature topljenje 166°C i čistoće 99+%.

Oligo(alkilen glikol) (met)akrilati pripadaju grupi hidroksi funkcionalizovanih monoakrilata i monometakrilata, čija rasvorljivost u vodi varira, zavisno od strukture. Svi oligo(alkilen glikoli) sadrže primarne hidroksilne grupe na krajevima lanaca zahvaljujući kojima učestvuju u reakcijama karakterističnim za alifatične hidroksilne grupe kao što su esterifikacija, cijanoetilovanje i dr. Što su molekulski lanci veći, veći je i uticaj etarskih veza na osobine oligo(alkilen glikola) u celini.

Njihova opšta strukturna formula je:



gde je R- H ili CH₃, R₁- etilenske ili propilenske grupe, n- broj grupa.

Mogu da reaguju sa alkilen oksidima, koji se ugrađuju u lance polietilen glikola ili polipropilen glikola. Time se postiže povećanje njihove molarne mase i menja njihova rastvorljivost u vodi. Sa porastom dužine etilen glikolnih lanca u ovim polimerima njihova hidrofilnost raste.

U eksperimentima su korišćeni oligo(alkilen glikol) (met)akrilati kompanije Cognis, UK. Strukturne formule, skraćeni nazivi i molarne mase korišćenih oligomera dati su u tabeli 2.1.

Tabela 2.1 Hemijske strukture i molarne mase monomera korišćenih u sintezi hidrogelova

Hemijska struktura monomera	Skraćen naziv	Molarna masa (g/mol)
2-Hidroksietil metakrilat	HEMA	130
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_2\text{C}=\text{C} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} \end{array}$		
Itakonska kiselina	IA	130
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{CH}_2 \end{array}$		
Oligo(etilen glikol)₆ akrilat	O(EG) ₆ A	336
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_2\text{C}=\text{C} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{O}-\left[\text{CH}_2-\text{CH}_2\right]_6-\text{OH} \end{array}$	OEGA	
Oligo(etilen glikol₆-propilen glikol₃)metakrilat	O(EG ₆ -PG ₃)MA	524
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_2\text{C}=\text{C} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{O}-\left[\text{CH}_2-\text{CH}_2\right]_6-\left[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)\right]_3-\text{OH} \end{array}$	OEGPGMA	
Oligo(etilen glikol₃-propilen glikol₆)metakrilat	O(EG ₃ -PG ₆)MA	566
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_2\text{C}=\text{C} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{O}-\left[\text{CH}_2-\text{CH}_2\right]_3-\left[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)\right]_6-\text{OH} \end{array}$	OPGEGMA	
Oligo(propilen glikol)₅metakrilat	O(PG) ₅ MA	375
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_2\text{C}=\text{C} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{O}-\left[\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)\right]_5-\text{OH} \end{array}$	OPGMA	

Oligo(etilen glikol) akrilat O(EG)₆A (OEGA) sadrži etilen glikolne jedinice, zbog čega je vodorastvoran. Polietilen glikoli (PEG) i oligoetilen glikoli (OEG) su široko ispitivani u cilju različitih primena zbog dobre biokompatibilnosti, netoksičnosti, dobre rastvorljivosti u vodi, niskog stepena apsorpcije proteina i adhezije ćelija, doprinosa stvaranju vodoničnih veza i mogućnosti ugradnje u različite delove polimera u cilju poboljšanja njihove funkcionalnosti [167-174]. Polimeri sa kratkim bočnim OEG lancima teže faznim prelazima prilikom grejanja njihovih vodenih rastvora do donje

kritične temperature rastvaranja (LCST), što ih čini interesantnim temperaturno reagujućim polimerima [175, 176]. Termalno indukovani fazni prelaz ovih polimera normalno pokazuje mali histerezis, a LCST se može lako podešavati modifikacijom krajnjih grupa [55, 177], dužinom OEG lanaca [178, 179] ili sastavom kopolimera [175, 180-183].

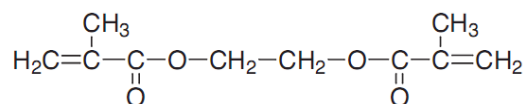
Oligo(etilen-propilen glikol) metakrilat $O(EG_6-PG_3)MA$ (OEGPGMA) je metakrilni oligomer sa šest etilen glikolnih i tri propilen glikolne jedinice u glavnom lancu.

Oligo(etilen-propilen glikol) metakrilat $O(EG_3-PG_6)MA$ (OPGEGMA) je metakrilni oligomer sa tri etilen glikolne i šest propilen glikolnih jedinica u glavnom lancu.

Oligo(propilen glikol) metakrilat $O(PG)_5MA$ (OPGMA) sadrži propilen glikolne jedinice, zbog čega je nerastvoran u vodi. Doprinosi hidrofobnosti polimera i daje čvrstoću. Prisustvo terminalne hidroksilne grupe, kao i kod ostalih oligo(alkilen glikol) (met)akrilata, omogućava mu odličnu adheziju na celulozne materijale.

Viša hidrofobnost oligo(propilen glikola) (OPG) vodi do mnogo niže LCST nego u slučaju OEG; porast relativne molekulske mase OPG od 400 do 1000 dovodi do opadanja LCST vodenog rastvora OPG od 50 do blizu 0°C [41]. Porastom temperature iznad LCST, dolazi do skupljanja polimernih lanaca OPGMA i izdvajanja faza usled njegove hidrofobnosti. Podešavanje LCST u fiziološkom temperaturnom intervalu nije lako realizovati, a jedan od načina je radikalna kopolimerizacija OPGMA sa hidrofilnijim ili hidrofobnijim komonomerima [184].

Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) je difunkcionalizovani metakrilatni monomer, korišćen kao umreživač. Njegova bruto formula je $C_{10}H_{14}O_4$, a strukturna je:



Za sintezu je korišćen EGDMA proizvođača Aldrich, Nemačka, molarne mase 198.2 g/mol, gustine 1.05 g/cm³, temperature ključanja 98-100 °C/5 mmHg, temperature paljenja 101°C i čistoće 98%.

Puferski rastvori

Praćenje procesa bubrenja hidrogelova je izvedeno u puferskim rastvorima, pH vrednosti sličnih biološkim fluidima, u opsegu pH 2.2-9.0. Korišćeni su: acetatni puferi pH 3.85, 4.5, 5.45, fosfatni pH 2.2, 3.0, 6.25, 6.8, 7.1, 7.4 i 8.0, i amonijačni pH 9.0. Za pripremu puferskih rastvora korišćeni su: hlorovodonična kiselina (HCl), Lach Ner, Češka republika, kalijum dihidrogen fosfat (KH_2PO_4), Merck, Nemačka, dikalijum hidrogen fosfat (K_2HPO_4), Merck, Nemačka, fosforna kiselina (H_3PO_4), Merck-Alkaloid, Makedonija, glacialna sirćetna kiselina (CH_3COOH), Zorka Pharma, Srbija, natrijum acetat (CH_3COONa), Zorka Pharma, Srbija, amonijum hidroksid (NH_4OH), Zorka Pharma, Srbija, amonijum hlorid (NH_4Cl), Zorka Pharma, Srbija, natrijum hidroksid (NaOH), MosLab, Srbija.

Jonska jačina rastvora bila je konstantna i iznosila je 0.1 mol/dm^3 . U svim sintezama hidrogelova, kao i za pripremu puferskih rastvora korišćena je demineralizovana voda dobijena prečišćavanjem destilovane vode pomoću Milli-Q Water sistema (Milipore Corporations).

2.2 Sinteza hidrogelova

2.2.1 Sinteza hidrogelova na bazi 2-hidroksietil metakrilata, oligo(alkilen glikol) (met)akrilata i itakonske kiseline

U radu je izvedena sinteza niza kopolimernih hidrogelova 2-hidroksietil metakrilata (HEMA) sa malim udelima itakonske kiseline (IA), koja obezbeđuje reagovanje uzorka na promenu pH, kao i sa četiri monofunkcionalizovana oligo(alkilen glikol) (met)akrilata (OAG(M)A), koji doprinose temperaturnom odzivu i boljoj biokompatibilnosti. U cilju ispitivanja uticaja različitih monomera na osobine kopolimernih hidrogelova, pod istim uslovima sintetisan je i homopolimerni PHEMA hidrogel.

Prvu seriju čine P(HEMA/IA) hidrogelovi na bazi HEMA sa udelima IA od 2, 2.5, 3.5 i 5 mol%, prema čemu su obeleženi kao: P(HEMA/IA2), P(HEMA/IA2.5), P(HEMA/IA3.5) i P(HEMA/IA5).

Drugu seriju čine P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelovi u čiji sastav ulaze HEMA, IA, sa molarnim udelom od 2.5 i 5 mol%, i oligo(etilen glikol) akrilat (OEGA), sa molarnim udelima 12.5, 27.5, 47.5 i 67.5 mol%.

Treću seriju čine P(HEMA/OPGMA) hidrogelovi u čiji sastav ulazi HEMA i oligo(propilen glikol) metakrilat (OPGMA) sa udelima 6, 12.5, 27.5, 50 i 100 mol%.

Poslednju, četvrtu seriju čine hidrogelovi u čiji sastav ulaze HEMA, IA sa udelom od 2.5 mol% i četiri monofunkcionalizovana oligo(alkilen glikol) (met)akrilata: oligo(etilen glikol) akrilat (OEGA), oligo(etilen glikol₆-propilen glikol₃) metakrilat (OEGPGMA), oligo(etilen glikol₃-propilen glikol₆) metakrilat (OPGEGMA) i oligo(propilen glikol) metakrilat (OPGMA). Molarni udeo oligo(alkilen glikol) (met)akrilatnih monomera iznosio je 27.5 mol%.

Svi hidrogelovi su sintetisani radikalnom kopolimerizacijom, odgovarajuće smeše monomera, indukovanom γ zračenjem. Kao rastvarač monomera korišćena je smeša voda/etanol (1:1), dok je odnos monomer:rastvarač bio 1:9. Rastvaranje je izvedeno na sobnoj temperaturi uz konstantno mešanje. Pokazalo se da je radijaciono umrežavanje metakrilnih monomera efikasnije i ravnomernije uz dodatak malog udela umreživača [164, 185]. Iz tog razloga u reakcionu smešu kao umreživač dodat je EGDMA u količini od 0.5 mol% u odnosu na ukupan broj molova monomera. Kako EGDMA poseduje dve vinilne grupe, polimerizacija i umrežavanje dešavaju se istovremeno. Reakciona smeša je pre polimerizacije izlivena u kalup, koji se sastojao od dve staklene ploče oivičene PVC crevom, i oslobođena prisustva kiseonika produvavanjem argonom u trajanju od 20 minuta, neposredno pre zračenja. Monomerni rastvor je zračen u radijacionoj jedinici za industrijsku sterilizaciju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, korišćenjem izotopa ^{60}Co kao izvora zračenja. Radionuklid ^{60}Co se najčešće koristi za snažne izvore elektromagnetnog zračenja zbog emitovanja γ zraka pogodnih energija (1.33 i 1.17 MeV) i vremena poluraspada (5.27 godina; oko 1% ^{60}Co se raspadne mesečno) [186]. Kada nije u radnom položaju izvor zračenja se odlaze u bazen sa vodom na dubinu od 6.5 m, a kada je u radnom položaju nalazi se u sredini ćelije za ozračivanje, na visini od 1.2 m od poda. Ovaj metod sinteze spada u hladne postupke kojom se temperatura uzorka za vreme zračenja podiže svega za 1 do 2°C. Ozračivanje rastvora monomera vršeno je na sobnoj temperaturi, pri brzini zračenja od 0.5 kGy/h do ukupne apsorbovane doze od 5, 10, 25 i 40 kGy. Nakon zračenja, ploče sa

dobijenim hidrogelovima su smeštane u sušnicu na temperaturu od 50°C u trajanju od 24 h, kako bi se dovršilo svako naknadno umrežavanje i ubrzala rekombinacija zaostalih slobodnih radikala.

Na ovaj način dobijeni su hidrogelovi u obliku listova debljine 2 mm, koji su zatim sečeni u obliku diskova i sušeni u vakuum sušnici na 40°C, do konstantne mase. Suvi uzorci, kserogelovi, su bili prečnika oko 5 mm i debljine 1.3 mm. Kako bi se uklonile neprореagovale materije, hidrogelovi su podvrgnuti Soxhlet ekstrakciji vodom, i ponovo sušeni do konstantne mase. Količina neprореagovanih monomera HEMA i OAG(M)A određivana je spektrofotometrijski korišćenjem UV-Vis spektrofotometra. Količina neprореagovale IA određivana je titracijom ekstrakta 0.05 M NaOH do fenolftaleidne završne tačke. Svi sintetisani hidrogelovi bili su transparentni nakon sinteze, kao i u stanju kserogela. Ovako dobijeni hidrogelovi korišćeni su za sve metode karakterizacije.

2.2.2 Uticaj ukupne apsorbovane doze zračenja tokom procesa sinteze na sadržaj gel faze u hidrogelu

Kako bi se ispitao uticaj ukupne apsorbovane doze zračenja na sadržaj gel faze i osobine hidrogelova u toku sinteze indukovane γ zracima, polimerizacija je izvedena pri četiri različite ukupne apsorbovane doze: 5, 10, 25 i 40 kGy i brzini zračenja 0.5 kGy/h, korišćenjem izotopa ^{60}Co kao izvora zračenja.

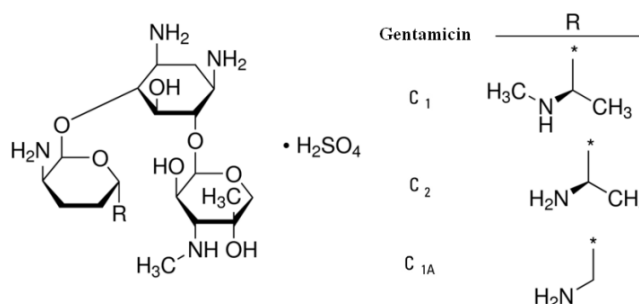
2.2.3 Sinteza nanočestica srebra u P(HEMA/IA) hidrogelovima

Inkorporacija nanočestica srebra u P(HEMA/IA) hidrogelove vršena je *in situ* metodom redukcije metalnih jona u polimernoj mreži. Porozne P(HEMA/IA) hidrogelne matrice, sa sadržajem IA 0, 2, 3.5 i 5 mol%, su korišćene kao stabilizujući agent i inhibitor rasta metalnih nanočestica u procesu sinteze. Proces stabilizacije zasnovan je na uspostavljanju fizičkih i/ili hemijskih interakcija između nanočestica i polimernih lanaca. Rastvori voda/etanol bez AgNO_3 ($c_0 = 0$ M) i sa četiri različite koncentracije AgNO_3 ($c_1 = 5 \times 10^{-4}$ M, $c_2 = 1 \times 10^{-3}$ M, $c_3 = 5 \times 10^{-3}$ M i $c_4 = 1 \times 10^{-2}$ M) korišćeni su kao medijumi za bubrenje P(HEMA/IA) kserogelova, koje je izvedeno u zatvorenim

bočicama, u inertnoj atmosferi argona i na sobnoj temperaturi, u mraku, do dostizanja ravnoteže. Etanol ima ulogu „hvatača“ oksidujućih vrsta. U postupku *in situ* radijacione sinteze nanočestica srebra, tj. redukcije Ag^+ jona do Ag^0 , hidrogelovi nabubrela u rastvorima AgNO_3 različitih koncentracija su izloženi γ zračenju u radijacionom izvoru ^{60}Co , pri brzini zračenja od 6 kGy/h do ukupne apsorbovane doze od 12 kGy. Na ovaj način izvršeno je generisanje nanočestica srebra u hidrogelnoj matrici. Ag/P(HEMA/IA) nanokompoziti su nakon zračenja sušeni u vakuum sušnici na 40°C, nakon čega su dobijeni homogeni, obojeni kserogelovi. Ovako dobijeni nanokompoziti korišćeni su za dalju analizu.

2.2.4 Priprema uzoraka za analizu kontrolisanog oslobađanja leka u *in vitro* uslovima

U cilju testiranja radijaciono sintetisanih P(HEMA/IA/OAG(M)A) hidrogelova kao potencijalnih materijala za kontrolisano oslobađanje antibiotika, kao model lek korišćen je prah gentamicin sulfata (GS), Sigma-Aldrich, strukturne formule:



Kako bi se lek apsorbovao u hidrogelove, diskovi kserogelova, približno iste mase (0.02 g) i debljine (1.3 mm), potapani su u vodeni rastvor gentamicin sulfata (GS) koncentracije 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ i ostavljeni 48 h da, na sobnoj temperaturi i u odsustvu svetlosti, nabubre do ravnoteže. Ovako nabubrela hidrogelovi su zatim sušeni na sobnoj temperaturi do konstantne mase i dalje korišćeni u eksperimentima kontrolisanog oslobađanja. Svi kserogelovi sa apsorbovanim lekom bili su transparentni. Analiza kontrolisanog oslobađanja GS iz hidrogelova izvedena je u *in vitro* uslovima, smeštanjem kserogela sa apsorbovanim lekom u 10 ml rastvora pufera pH 7.4, koji

simulira fiziološki fluid, u termostatisranom vodenom kupatilu na 37°C, pri čemu su rastvori konstantno mešani. Količina oslobođenog leka praćena je spektrofotometrijski, na UV-Vis spektrofotometru, merenjem apsorbancije alikvota rastvora u određenim intervalima vremena, koji je nakon merenja vraćan u puferski rastvor, kako bi se zapremina rastvora očuvala konstantnom. Oslobođanje je praćeno u periodu od šest dana. Međutim, kako GS ne apsorbuje u UV i vidljivoj oblasti spektra, neophodna je njegova derivatizacija sa o-ftaldialdehidom (OPA). OPA reaguje sa amino grupama iz GS u baznoj sredini u prisustvu redukcionog agensa kao što je 2-merkaptotanol, dajući hromoforu koja omogućava UV-Vis spektrofotometrijsko merenje rastvora GS na talasnoj dužini 332 nm. Reagens o-ftaldialdehida je pripreman rastvaranjem 0.2 g OPA u 1.5 ml metanola uz dodatak 15 ml boratnog pufera pH 10.4 i 0.5 ml 2-merkaptotanola. Reagens je skladišten u tamnu bocu i čuvan u tami najmanje 24 h pre upotrebe. Reakcija derivatizacije je izvedena na sobnoj temperaturi mešanjem po 2 ml rastvora gentamicin sulfata, isopropanola (koji sprečava taloženje) i OPA reagensa, u trajanju od 45 minuta [187, 188].

2.3 Metode karakterizacije hidrogelova

2.3.1. Gravimetrijske metode

- ***Određivanje gustine kserogela***

Gustina kserogelova određena je piknometrom. Zapremina piknometra predstavlja odnos mase piknometra sa vodom i poznate vrednosti gustine vode na konstantnoj temperaturi. Razlika mase piknometra sa gelom potopljenim u heksan, u kome ne dolazi do bubrenja gela, i mase piknometra napunjenog heksanom odgovara masi kserogela. Odnos mase kserogela i zapremine piknometra, na konstantnoj temperaturi, odgovara gustini kserogela [189].

- ***Određivanje sadržaja gel faze***

Kako bi se uklonile neprereagovale materije i odredio sadržaj gel faze, hidrogelovi prethodno osušeni do konstantne mase, podvrgnuti su Soxhlet ekstrakciji vodom i ponovo sušeni u vakuum sušnici na 40°C do konstantne mase [185, 190]. Iz

odnosa masa kserogela pre i posle ekstrakcije, računat je maseni udeo gela u datoj mreži, tj. sadržaj gel faze prema jednačini:

$$\text{Sadržaj gel faze (\%)} = \frac{W_g}{W_0} \times 100 \quad (2.3.1)$$

gde je W_g masa kserogela nakon ekstrakcije, a W_0 masa kserogela pre ekstrakcije.

- **Kinetika i ravnotežno bubrenje**

Hidrogelovi su karakterisani kinetičkim i ravnotežnim bubrenjem u puferkim rastvorima širokog opsega pH vrednosti (2.2-9.0) i temperature (5-70°C). Analiza bubrenja praćena je gravimetrijski. Izvedena je potapanjem diska kserogela, mase oko 0.02 g i debljine 1.3 mm, u puferki rastvor određene pH na određenoj temperaturi. U zadatim vremenskim intervalima gel je vađen iz rastvora i nakon brisanja viška tečnosti sa površine gela filter papirom, merena je promena mase i gel ponovo vraćan u medijum u kom bubri. Merenje je izvođeno do dostizanja konstantne mase za svaki uzorak, tj. do dostizanja ravnotežnog stepena bubrenja [8]. Stepen bubrenja u bilo kom trenutku (q) i ravnotežni stepen bubrenja (q_e) su računati prema jednačinama (1.2.7.1) i (1.2.7.2) datim u poglavlju 1.2.7. Svi eksperimenti bubrenja rađeni su u triplikatu.

2.3.2 Difrakcija rendgenskih zraka (XRD)

Mikrostrukturna analiza dobijenih Ag/P(HEMA/IA) nanokompozita ispitana je difrakcijom rendgenskih zraka korišćenjem *Bruker D8 Advance Diffractometer* (u normalnom modu sa Cu $K_{\alpha 1}$ emisijom). Snimanje difraktograma je vršeno u 2θ opsegu od 30-90°, sa korakom od 0.05° i vremenom ekspozicije od 10 s.

2.3.3 Skanirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Morfološka karakterizacija kserogelova vršena je *JEOL JSM-6460 LV* skanirajućim elektronskim mikroskopom (SEM). Kserogelovi su dobijeni sušenjem hidrogelova u vakuum sušnici na 40°C u toku 48 h. Za snimanje su korišćeni

neliofilizovani i liofilizovani kserogelovi. Uzorci hidrogelova su liofilizovani korišćenjem *Modulyo Freeze Dryer System Edwards*, u liofilizatoru koji se sastoji iz jedinice za liofilizaciju i visoko vakuumske pumpe (*High Vacuum Pump E2M8 Edwards*). Gelovi su bubreni do ravnoteže na sobnoj temperaturi u puferu pH 7.4, zatim zamrznuti na -80°C u periodu od 24 h, i nakon toga liofilizovani. Vakuum tokom 20 h liofilizacije iznosio je ≤ 4 mbar. Uzorci su pre posmatranja na SEM napareni tankim slojem zlata u vakuumu, a zatim snimani pri različitim uvećanjima.

2.3.4 Spektroskopske metode

- ***Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)***

FTIR spektroskopija izvedena je na diskovima kserogelova na sobnoj temperaturi u refleksionom modu korišćenjem *Nicolet 380 FTIR Spectrophotometer Thermo Scientific*, sa *ATR* dodatkom (*Attenuated Total Reflection Mode*), u spektralnom intervalu od $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, sa rezolucijom od 4 cm^{-1} .

- ***Spektroskopija u ultraljubičastoj i vidljivoj oblasti spektra (UV-Vis)***

Snimanje UV-Vis apsorpcionih spektara suvih Ag/P(HEMA/IA) nanokompozita izvedeno je na *Shimadzu 1800 UV-Vis* spektrofotometru, u opsegu talasnih dužina 1100–190 nm. UV-Vis spektroskopija korišćena je i prilikom određivanja LCST vrednosti rastvora OPGMA monomera, u koncentraciji od 1 i 3 mas%, u puferima pH 2.2 i 7.4. Apsorpcioni spektri rastvora snimani su na svaka 2°C u opsegu temperature od 5 do 50°C , sa brzinom grejanja $0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, a LCST su određivane iz vrednosti apsorbancija na talasnoj dužini 650 nm [191]. UV-Vis spektrofotometrijski praćen je i proces oslobađanja GS iz P(HEMA/IA/OAG(M)A) hidrogelova, na talasnoj dužini 332 nm.

- ***Energetski disperzivna rentgenska spektroskopija (EDS)***

Hemijski sastav Ag/P(HEMA/IA) nanokompozita analiziran je korišćenjem energetski disperzivnog rentgenskog spektrometra (EDS) *Isis 3.2*, sa SiLi detektorom X zračenja (*Oxford Instruments*), u kombinaciji sa SEM i višekanalnim analizatorom.

2.3.5 Dinamičko mehanička analiza (DMA)

Perkin Elmer DMA-7 dinamičko mehanički analizator sa geometrijom paralelnih ploča korišćen je za ispitivanje mehaničkih osobina hidrogelova u nabubrelom stanju. Modul elastičnosti (E) i kompresioni modul (G) hidrogelova određivani su u kompresionom modu na pH 7.0 i na temperaturi 25°C. Komplet paralelnih ploča od nerđajućeg čelika dijametra 20 mm kao dodatak sadrži posudu sa odgovarajućim puferskim rastvorom koji se koristi tokom merenja kako bi se minimizirao gubitak vlažnosti uzoraka.

2.3.6 Termalne metode

- ***Termogravimetrijska analiza (TGA)***

Ispitivanje termalnih svojstava kserogelova rađeno je termogravimetrijskom analizom (TGA). Merenja su izvedena na *Perkin Elmer TGA-2* instrumentu. Uzorci mase oko 5 mg su grejani u intervalu temperature od 20 do 550°C, pri brzini grejanja od 10 °C/min, u atmosferi azota, pri zapreminskom protoku gasa od 26 cm³/min.

- ***Diferencijalna skanirajuća kalorimetrija (DSC)***

Diferencijalna skanirajuća kalorimetrija (DSC) je korišćena za određivanje temperatura zapreminskih faznih prelaza (VPTT) temperaturno reagujućih hidrogelova. Merenja su izvedena na *Setaram 151R (SETSOFT 2000)* instrumentu na hidrogelovima nabubrelim do ravnoteže u puferu pH 7.4 i na temperaturi 5°C. Uzorci mase oko 5 mg su smeštani u specijalne aluminijumske čančice koji su hermetički zatvarani i proces je praćen u temperaturskom intervalu od 5 do 75°C, pri brzini grejanja od 1 °C/min u struji azota. Kao referentni uzorak korišćen je puferski rastvor pH 7.4. Temperatura pojave endoternog DSC pika definisana je kao VPTT vrednost [52, 54].

2.3.7 Ispitivanje biokompatibilnosti hidrogelova

- **Test citotoksičnosti**

Citotoksičnost hidrogelova ispitivana je preko *in vitro* analize preživljavanja ćelija [86, 192]. Test je rađen u razblaženom ekstraktu hidrogelova, na ćelijama subvezivnog tkiva miša, iz NCTC Clone 929 linije (ATCC-CCL1). Inkubacija je izvedena u vodenom kupatilu u trajanju od 2 h na 37°C. Rastvor fenola (0.02 mas%) i ekstrakt polietilena visoke gustine (HDPE) korišćeni su kao pozitivna i negativna kontrola. Procenat preživljavanja ćelija je računat u odnosu na kontrolu i prikazan kao indeks citotoksičnosti IC_{50%} [6].

- **Test hemolitičke aktivnosti**

Hemolitička aktivnost hidrogelova određena je metodom direktnog i indirektnog kontakta, prema ISO 10 993-4 [87]. U metodi direktnog kontakta, diskovi hidrogelova potapani su u 5 ml fiziološkog rastvora u koji je dodato 0.25 ml čiste krvi pacova. Destilovana voda i fiziološki rastvor korišćeni su kao pozitivna i negativna kontrola. Sadržaj epruveta je pažljivo mešan i inkubiran u vodenom kupatilu na 37°C u toku 1h, nakon čega je merena apsorbancija bistre tečnosti iznad taloga na 545 nm, korišćenjem Pharmacia LKB Ultrospec Plus UV-VIS spektrofotometra i računat je procenat hemolize. U metodi indirektnog kontakta, 5 ml izotoničnog vodenog rastvora ekstrahovanog iz diskova hidrogelova korišćeno je sa 0.25 ml 10% suspenzije eritrocita pacova. Za pripremanje izotoničnog vodenog ekstrakta, diskovi hidrogelova čuvani su 72 h na 37°C u 100 ml sterilisane demineralizovane vode uz dodatak 0.9 g NaCl. Destilovana voda i fiziološki rastvor korišćeni su kao pozitivna i negativna kontrola. Nakon inkubacije na 37°C u toku 24 h, merena je apsorbancija bistre tečnosti iznad taloga na 545 nm i računat indeks hemolize kao:

$$\text{Indeks hemolize (\%)} = \frac{(sh_u - sh_{np})}{sh_{pp} - sh_{np}} \times 100\% \quad (2.3.2)$$

gde je sh_u stepen hemolize uzorka, sh_{np} stepen hemolize negativne probe, sh_{pp} stepen hemolize pozitivne probe. Za svaki tip uzorka računata je srednja vrednost tri merenja.

2.3.8 Test mikrobne penetracije

Za test penetracije mikroba kroz hidrogelove korišćene su Gram-pozitivna bakterija *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) i Gram-negativna bakterija *Escherichia coli* (ATCC 25922) i prevlake hidrogelova u obliku pločica, površine $5 \times 10 \text{ cm}^2$ i debljine 1.3 mm. Gornja površina hidrogela kontaminirana je sa 100 μl suspenzije kulture, koja je sadržala 10^7 bakterijskih ćelija/ml. Kontaminirani hidrogelovi smeštani su na površinu sterilnih ploča agara (TSA-Trypton soj agara, Torlak) u Petri šolje, a zatim inkubirani na 37°C u toku 12, 24 i 48 h. U ovim intervalima praćeno je prodiranje bakterijskih kolonija kroz hidrogelove na podlogu agara, nakon čega su hidrogelovi vađeni iz agara i ispitivane kolonije formirane na površini [165, 193].

2.3.9 Određivanje antimikrobne aktivnosti hidrogelova

Prilikom testiranja antimikrobnih osobina hidrogelova sa sintetisanim nanočesticama srebra ili hidrogelova sa apsorbovanim lekom-GS korišćene su indikatorske kulture bakterija *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* i gljive *Candida albicans* (ATCC 2433). Ispitivanje rasta mikroorganizama vršeno je u Trypton soju agara (TSA), uz dodatak 0.6% v/v ekstrakta kvasca (TSYA). Kinetika rasta mikroba u prisustvu nanočestica srebra ili antibiotika GS praćena je prebrojavanjem formiranih kolona (CFU). Sveža kultura koncentracije 10^9 CFU/ml razblažena je do koncentracije od 10^6 - 10^7 CFU/ml. Diskovi hidrogelova sa nanočestičnim srebrom ili lekom smeštani su u epruvete u koje je prethodno uneta suspenzija indikatorske kulture. Epruvete su centrifugirane, kako bi se ostvario bolji kontakt sa uzorkom, a zatim inkubirane 72 h na 37°C . U određenim intervalima, u periodu od šest dana, uzimani su alikvoti suspenzija iz epruveta i smeštani u TSYA Petri šolje. Nakon očvršćavanja agara Petri šolje su inkubirane 24 h na 37°C , a broj nastalih kolonija prebrojavan je vizuelno i vršeno je poređenje sa kontrolnim uzorcima, tj. čistim hidrogelovima bez prisustva nanočestica srebra i leka. Merenja su rađena u triplicatu i računata je srednja vrednost.

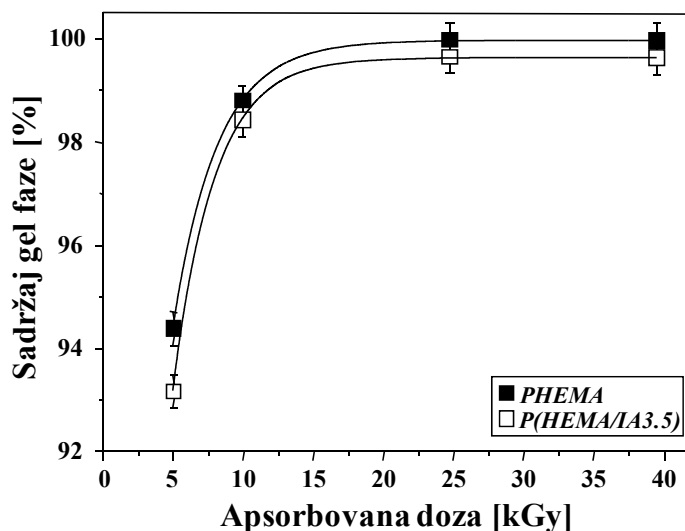
3. Rezultati i diskusija

3.1 Uticaj ukupne apsorbovane doze gama zračenja tokom procesa sinteze na sadržaj gel faze u hidrogelu

Kako bi se ispitaio uticaj ukupne apsorbovane doze zračenja na osobine hidrogelova u toku sinteze indukovane γ zračenjem, polimerizacija je izvedena pri brzini zračenja od 0.5 kGy/h i četiri ukupne apsorbovane doze: 5, 10, 25 i 40 kGy.

Prvi korak nakon sinteze hidrogelova bio je analiza konverzije monomera (HEMA, OAG(M)A i IA) u hidrogel, tj. određivanje sadržaja gel faze na način opisan u eksperimentalnom delu 2.3.1. Udeo gela predstavlja kvantitativnu meru efikasnosti formiranja mreže. Na osnovu dobijenih rezultata uočena je visoka konverzija monomera za sve sintetisane hidrogelove. Na slici 3.1 predstavljena je zavisnost sadržaja gel faze od ukupne apsorbovane doze zračenja za PHEMA i P(HEMA/IA3.5) hidrogelove. Može se videti da sadržaj gel faze raste sa porastom ukupne apsorbovane doze. Dobijena je visoka konverzija monomera u umreženi polimer i pri nižim dozama (5 i 10 kGy), ali do saturacije dolazi pri dozi od 25 kGy, za koju je sadržaj gel faze bio viši od 99% za oba hidrogela, pa se konverzija monomera u mrežu hidrogela pri ovoj dozi može smatrati kompletnom, a radijaciono indukovana sinteza dobar metod za dobijanje ovih hidrogelova. Daljim porastom apsorbovane doze do 40 kGy stepen geliranja se ne menja značajno u odnosu na onaj dobijen pri dozi od 25 kGy. Na osnovu dobijenih

rezultata apsorbovana doza od 25 kGy pokazala se kao optimalna vrednost, što se slaže sa rezultatima drugih autora [42]. Takođe, ovo je standardna doza na kojoj se vrši sterilizacija biomaterijala [194, 195].



Slika 3.1 Uticaj apsorbovane doze zračenja na sadržaj gel faze radijaciono sintetisanih hidrogelova pri brzini zračenja od 0.5 kGy/h

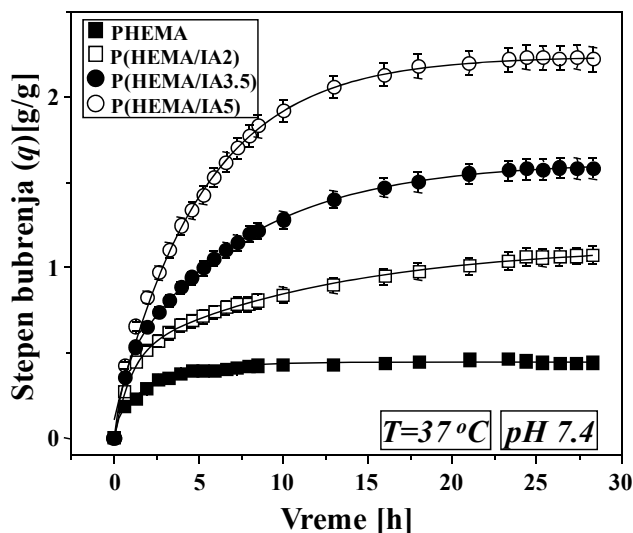
Iako je sadržaj gel faze za sve sintetisane hidrogelove pri apsorbovanoj dozi od 25 kGy viši od 90%, uočen je uticaj hemijskog sastava hidrogela na sadržaj gela. Kod PHEMA homopolimera sadržaj gel faze je $(99.8 \pm 0.5)\%$, dok je u slučaju kopolimernih hidrogelova ova vrednost niža. Što je sadržaj HEMA u kopolimernom hidrogelu veći veći je i sadržaj gel faze. Kod uzoraka koji sadrže alkilen glikolne jedinice, odstupanje je veće kod hidrogelova sa etilen glikolnim jedinicama, nego u slučaju onih sa propilen glikolnim. Najniže vrednosti dobijene su za P(HEMA/IA/OEGA) terpolimerne hidrogele, ali kako je sadržaj gel faze i kod ovih uzoraka viši od 90% sol-gel konverzija se može smatrati kompletnom.

Na osnovu dobijenih rezultata kao optimalna apsorbovana doza radijacionog umrežavanja ove klase hidrogelova, pri brzini zračenja od 0.5 kGy/h, pokazala se apsorbovana doza od 25 kGy. Ovako dobijeni hidrogelovi su dovoljno jaki za lako rukovanje i korišćeni su za sva dalja ispitivanja.

3.2 Hidrogelovi na bazi 2-hidroksietil metakrilata i itakonske kiseline $P(HEMA/IA)$

Polazeći od inertnog homopolimernog hidrogela 2-hidroksietil metakrilata (HEMA), a u cilju dobijanja pH reagujućih „pametnih“ hidrogelova, radijaciono indukovanom polimerizacijom sintetisana je serija kopolimernih $P(HEMA/IA)$ hidrogelova, sa različitim molarnim udelima (2, 2.5, 3.5 i 5 mol%) itakonske kiseline (IA) ugrađene u homopolimer PHEMA.

Pretpostavljeno je da će ovako dobijeni hidrogelovi, pored pH odziva pokazati i veću hidrofilnost, a samom tim i veće stepene bubrenja od homopolimernog PHEMA hidrogela. Kako bi se ispitao uticaj molarnog udela IA i promene pH vrednosti sredine u kojoj hidrogel bubri na osobine dobijenih hidrogelova, gravimetrijskom metodom opisanom u eksperimentalnom delu 2.3.1. izvedena je analiza bubrenja u širokom opsegu pH (2.2-9.0). Kinetičke krive bubrenja PHEMA i $P(HEMA/IA)$ hidrogelova na temperaturi 37°C i pH 7.4 date su na slici 3.2.



Slika 3.2 Kinetičke krive bubrenja dobijene gravimetrijskim merenjem promene stepena bubrenja sa vremenom radijaciono umreženih PHEMA i $P(HEMA/IA)$ hidrogelova u puferskom rastvoru pH 7.4 na 37 °C

Stanje ravnoteže hidrogelovi dostižu nakon 24 h. Kao što je i očekivano najniži stepen bubrenja (q) pokazuje homopolimerni PHEMA hidrogel. Sa porastom udela IA u

hidrogelu q raste, tako da P(HEMA/IA5) hidrogel koji sadrži najveći udeo IA, pokazuje najveći q . Vrednosti ravnotežnog stepena bubrenja (q_e) pri ovim uslovim se kreću od ≈ 0.5 za homopolimer PHEMA do ≈ 2.2 za kopolimerni P(HEMA/IA5) hidrogel, tj. sa porastom udela IA od 0 do 5 mol% ravnotežni stepen bubrenja raste za više od 4 puta.

Kinetičke krive bubrenja hidrogelova iskorišćene su, osim za dobijanje q_e i za određivanje prirode difuzije fluida u mrežu hidrogela, preko kinetičkih parametara bubrenja: kinetičke konstante bubrenja (k) i difuzionog eksponenta (n). Vrednosti k i n su određene iz jednačine 1.2.5.6, kao odsečak i nagib prave, pri čemu je korišćena početna faza bubrenja kada je zavisnost q od vremena pravolinijska. Koeficijenti difuzije fluida (D) računati su primenom jednačine 1.2.5.4. Svi pomenuti parametri prikazani su u tabeli 3.1 za temperature 25 i 37°C u puferima pH 2.2 i 7.4.

Vrednosti difuzionog eksponenta bubrenja (n) PHEMA i kopolimernih P(HEMA/IA) hidrogelova se kreću od 0.37 do 0.40 u puferu pH 2.2 i od 0.38 do 0.50 u puferu pH 7.4, odakle se može zaključiti da se mehanizam transporta fluida u hidrogel odvija prema Fick-ovoj difuziji.

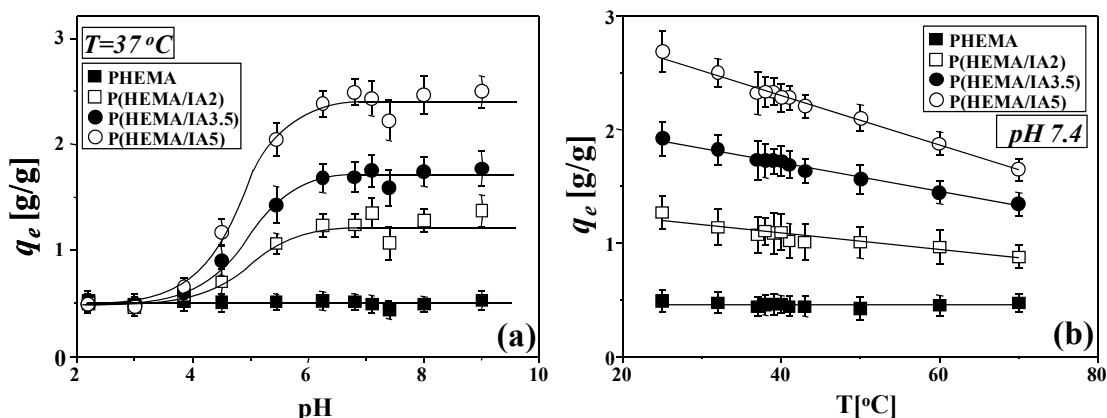
Tabela 3.1 Ravnotežni stepen bubrenja (q_e), kinetički parametri (k) i (n) i koeficijent difuzije fluida (D) za PHEMA i P(HEMA/IA) hidrogelove u puferima pH 2.2 i 7.4 na temperaturama 25 i 37 °C

HIDROGEL	pH	q_e [g/g]		n		k [h ⁻ⁿ]		$D \times 10^7$ [cm ² /s]	
		T [°C]		T [°C]		T [°C]		T [°C]	
		25	37	25	37	25	37	25	37
PHEMA	2.2	0.5±0.1	0.5±0.1	0.37	0.37	0.25	0.24	1.54	1.33
	7.4	0.5±0.1	0.5±0.1	0.39	0.38	0.26	0.24	1.62	1.46
P(HEMA/IA2)	2.2	0.5±0.1	0.5±0.1	0.38	0.37	0.26	0.25	1.78	1.37
	7.4	1.3±0.1	1.1±0.2	0.45	0.40	0.31	0.29	3.49	2.63
P(HEMA/IA3.5)	2.2	0.5±0.1	0.5±0.1	0.38	0.38	0.26	0.25	1.97	1.59
	7.4	1.9±0.1	1.6±0.2	0.47	0.44	0.38	0.34	4.15	3.30
P(HEMA/IA5)	2.2	0.5±0.1	0.5±0.1	0.40	0.39	0.28	0.27	2.05	1.74
	7.4	2.7±0.2	2.2±0.2	0.50	0.48	0.44	0.41	4.71	4.14

Vrednosti koeficijenta difuzije P(HEMA/IA) hidrogelova pokazuju porast sa porastom pH vrednosti sredine u kojoj bubre i nalaze se u opsegu $1.4\text{--}2.0 \times 10^{-7}$ cm²/s za rastvor pH 2.2 i između $2.6\text{--}4.7 \times 10^{-7}$ cm²/s za pufer pH 7.4, dok D homopolimernog PHEMA hidrogela pokazuje neznatan porast sa povećanjem pH. Takođe je uočeno da

koeficijent difuzije P(HEMA/IA) hidrogela raste sa porastom udela IA i najvišu vrednost dostiže za hidrogel sa 5 mol% IA.

Zavisnost ravnotežnog stepena bubrenja PHEMA i P(HEMA/IA) hidrogelova od pH vrednosti i temperature sredine u kojoj bubre prikazana je na slici 3.3.



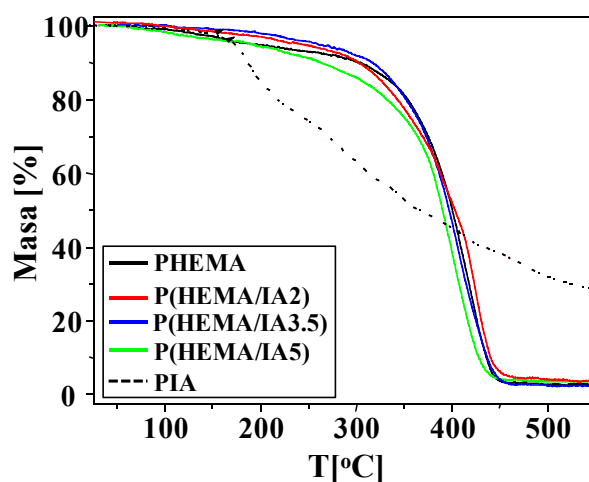
Slika 3.3 Zavisnost ravnotežnog stepena bubrenja (q_e) dobijenog gravimetrijskom metodom PHEMA i P(HEMA/IA) hidrogelova od (a) pH vrednosti sredine u kojoj bubre, na temperaturi 37°C i (b) temperature sredine u kojoj bubre, u puferu pH 7.4

Rezultati potvrđuju da PHEMA homopolimer, kao nejonski hidrogel, praktično ne reaguje na promenu pH [5, 164] nasupot P(HEMA/IA) hidrogelovima koji pokazuju pH odziv karakterističnu za anjonske hidrogelove, tj. sa porastom pH vrednosti sredine iznad konstante disocijacije karboksilnih grupa iz itakonske kiseline dolazi do povećanja stepena bubrenja (teorijski deo 1.2.3.1). Na pH vrednostima ispod prve konstante disocijacije IA ($pK_a = 3.85$), q_e kopolimernih hidrogelova je nizak i odgovara stepenu bubrenja PHEMA homopolimera ($q_e \approx 0.5$). Sa porastom pH sredine iznad ove vrednosti dolazi do porasta stepena jonizacije i gustine naelektrisanja u mreži hidrogela, što dovodi do povećanja elektrostatičkog odbijanja između istoimeno naelektrisanih jonizovanih grupa. Zbog veće hidrofilnosti karboksilatne u odnosu na karboksilnu grupu hidrofilnost mreže raste, dovodeći do skoka u stepenu bubrenja usled jonizacije prve karboksilne grupe IA. Kako IA ima dve karboksilne grupe sa vrednostima $pK_{a1} = 3.85$ i $pK_{a2} = 5.45$ [196], zbog njihove jonske prirode, čak i mali udeo IA obezbeđuje visoki odziv na promenu pH i porast q na pH vrednostima iznad njihovih konstanti disocijacije. Porastom pH iznad 5.45 primećen je samo neznatan rast u q . Maksimalan

stepen bubrenja svih kopolimernih hidrogelova dostignut je na pH 6, nakon kompletne disocijacije karboksilnih grupa u IA [197]. Sa porastom sadržaja IA u P(HEMA/IA) hidrogelovima raste i broj hidrofilnih grupa, usled čega dolazi do porasta q_e hidrogelova. Najveći stepen bubrenja i najizraženije reagovanje na promenu pH pokazao je hidrogel sa 5 mol% IA.

PHEMA ne pokazuje promenu q_e sa temperaturom, dok P(HEMA/IA) hidrogelovi pokazuju izvesne promene sa promenom temperature, koja se ogleda u linearnom padu q_e sa porastom temperature. Nagib postaje izraženiji sa porastom udela IA u hidrogelu. Ove razlike u temperaturnom odzivu se mogu objasniti prisustvom polarnih karboksilnih grupa iz IA u P(HEMA/IA) kopolimernim hidrogelovima koje povećavaju njihovu ukupnu hidrofilnost. Na višim temperaturama sila vodonične veze je redukovana, vezani fluid postaje slobodan, dovodeći do opadanja q_e .

Termalna stabilnost hidrogelova ispitivana je termogravimetrijskom analizom (TGA) u intervalu temperature od 20 do 550°C, a TG krive kopolimernih P(HEMA/IA) hidrogelova i homopolimera PHEMA i poli(itakonske kiseline) (PIA), radi poredenja, prikazane su na slici 3.4.

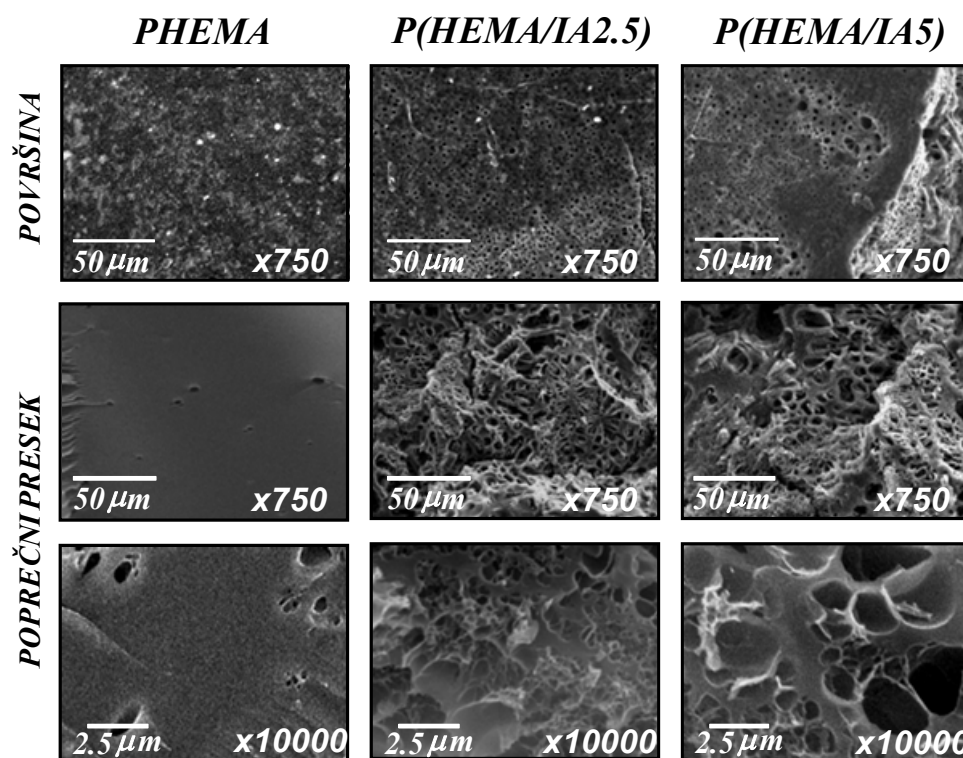


Slika 3.4 TG krive PHEMA i P(HEMA/IA) hidrogelova i PIA

TG krive kopolimernih hidrogelova pokazuju sličnost sa krivom PHEMA homopolimera i mnogo bolju termalnu stabilnost od PIA. Temperature na kojima dolazi do gubitka mase od 10% u hidrogelovima su 297, 317, 324 i 287°C za PHEMA, P(HEMA/IA2), P(HEMA/IA3.5) i P(HEMA/IA5). Hidrogelovi P(HEMA/IA2) i

P(HEMA/IA3.5) su nešto termalno stabilniji od homopolimernog PHEMA hidrogela u opsegu temperature od 20 do 320°C. Može se zaključiti da kopolimerni P(HEMA/IA) hidrogelovi sa malim sadržajem IA pokazuju neznatno bolju termalnu stabilnost u odnosu na PHEMA homopolimerni hidrogel. Kako su ovi hidrogelovi sintetisani u cilju potencijalne primene kao polimernih biomaterijala, za tretiranje kože, rana i u sistemima za kontrolisano oslobađanje aktivnih supstanci, tj. za procese koji se odvijaju u okolini fiziološke temperature (37°C), dok se proces sterilizacija odvija na temperaturama do 100°C, važno je da svi hidrogelovi pokazuju dobru termalnu stabilnost u ovom temperaturnom intervalu.

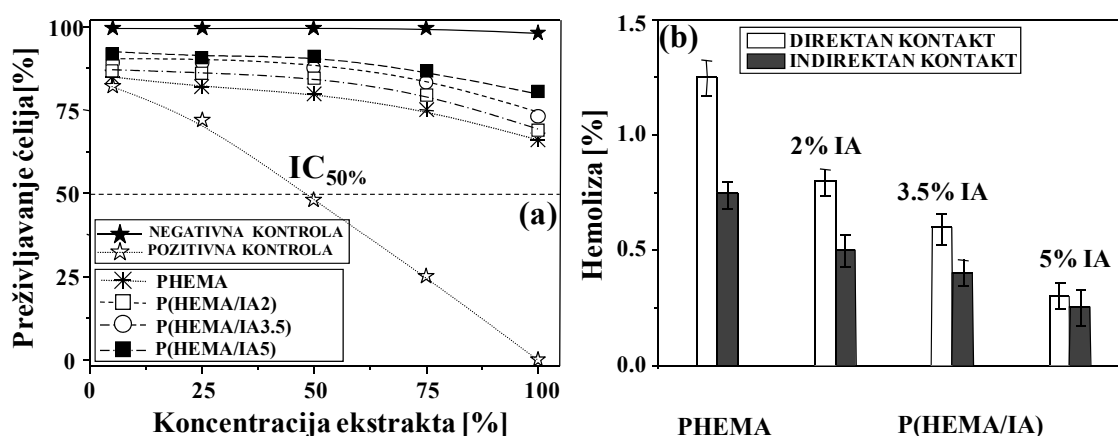
Analiza mikrostrukture omogućava ispitivanje povezanosti morfologije i osobina bubrenja, ukazujući da se promenom hemijskog sastava P(HEMA/IA) hidrogela mogu kontrolisati njegove morfološke osobine i poroznost. Primenom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) izvedena je morfološka analiza liofilizovanih P(HEMA/IA) hidrogelova sa različitim udelima IA.



Slika 3.5 SEM mikrostrukturni snimci liofilizovanih PHEMA, P(HEMA/IA2.5) i P(HEMA/IA5) hidrogelova

Na slici 3.5 su prikazani SEM snimci površine i poprečnih preseka PHEMA, P(HEMA/IA2.5) i P(HEMA/IA5) hidrogelova, pri dva uvećanja. Uprkos liofilizaciji snimci poprečnog preseka PHEMA hidrogela pokazuju kompaktnu i skoro ravnu strukturu, sa malim brojem neravnomerno formiranih pora, za razliku od kopolimernih P(HEMA/IA) hidrogelova koji pokazuju izraženu poroznu, sunderastu strukturu. Sa porastom sadržaja IA u hidrogelu dolazi do porasta poroznosti, a usled toga i do porasta stepena bubrenja P(HEMA/IA) hidrogela. Mikrostrukturni snimci poprečnih preseka pokazuju da su pore formirane kako na površini, tako i unutar mreže hidrogela, kao i da je distribucija pora relativno uniformna za sve P(HEMA/IA) hidrogelove, dok srednja veličina pora raste sa porastom udela IA.

Ispitivanje uticaja hemijskog sastava P(HEMA/IA) hidrogelova na njihovu biokompatibilnost praćeno je *in vitro* analizom citokompatibilnosti i hemolitičke aktivnosti (slika 3.6). U testu citotoksičnosti računat je relativni procent broja vidljivih kolonija pri različitim koncentracijama ekstrakta, kao rezultat interakcije ćelija i hidrogela. Koncentracija ekstrakta koja izaziva smrt ili oštećenje 50% ćelijske populacije poznata je kao indeks citotoksičnosti ($IC_{50\%}$). Kako rezultati, prikazani na slici 3.6a, pokazuju da je preživljavanje ćelija za sve uzorke mnogo više od 50%, ni jedan hidrogel se ne smatra citotoksičnim.



Slika 3.6 (a) Preživljavanje ćelija na PHEMA i P(HEMA/IA) hidrogelovima kao funkcija koncentracije ekstrakta, (b) Hemolitička aktivnost PHEMA i P(HEMA/IA) hidrogelova

Kopolimerni P(HEMA/IA) hidrogelovi pokazuju viši stepen preživljavanja ćelija od homopolimera PHEMA, tako da sa porastom molarnog udela IA u hidrogelu stepen preživljavanja ćelija raste, što ukazuje da ugradnja IA poboljšava citokompatibilnost, tj. biokompatibilnost hidrogela. Najbolji rezultati dobijeni su u slučaju P(HEMA/IA5) hidrogela sa najvećim udelom IA.

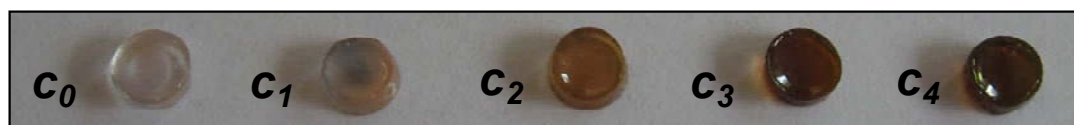
U *in vitro* analizi hemolitičke aktivnosti, P(HEMA/IA) hidrogelovi u kontaktu sa krvlju pacova pokazuju srednju vrednost hemolize manju od 1.3% u metodi direktnog kontakta i čak manju od 0.7% u metodi indirektnog kontakta (slika 3.6b), tako da se ovi hidrogelovi ne smatraju hemolitičnim. Svi kopolimerni P(HEMA/IA) hidrogelovi pokazuju nižu vrednost hemolize od PHEMA hidrogela, odakle sledi da ugradnja IA u PHEMA hidrogel poboljšava hemokompatibilnost biomaterijala na bazi PHEMA. Sa porastom sadržaja IA u hidrogelu stepen hemolize opada, tj. hidrogel pokazuje bolju hemokompatibilnost, a mogućnost njegove primene kao biomaterijala raste.

U cilju potencijalne primene P(HEMA/IA) hidrogelova kao prevlaka za tretiranje rana i opekotina izveden je i test mikrobne penetracije u prisustvu *S. aureus* kao Gram-pozitivne i *E.coli* kao Gram-negativne bakterije. U tu svrhu, gornja površina P(HEMA/IA) hidrogelne obloge kontaminirana je rastvorom mikroba i nakon inkubacije na 37°C u toku 12, 24, 48 h test je pokazao da nije bilo zone kontaminacije donje površine obloge za sve ispitivane hidrogelove i za sve periode inkubacije, tj. nije došlo do prodiranja ni *S. aureus* niti *E. Coli* kroz hidrogelnu oblogu. Ovo je važna karakteristika hidrogelnih obloga, posebno u zaštiti rana od dalje infekcije. Dobijeni rezultati ukazuju da se P(HEMA/IA) hidrogelne obloge mogu smatrati dobrom zaštitom protiv mikroba.

3.2.1. P(HEMA/IA) hidrogelovi kao nosača za sintezu nanočestica srebra

Sinteza nanočestica srebra u P(HEMA/IA) hidrogelovima vršena je *in situ* metodom redukcije metalnih jona u polimernoj mreži, primenom γ zračenja. Hidrogelovi nabubrela u vodeno/alkoholnom rastvoru AgNO_3 različitih koncentracija pre zračenja bili su transparentni i nebojeni. Kada se ovakav sistem zasiti strujom argona i izloži γ zračenju, u vodenim rastvorima nastaju različite redukujuće vrste odgovorne za redukciju jona srebra kao što su hidratizani elektron (e_{aq}^-), radikali etil

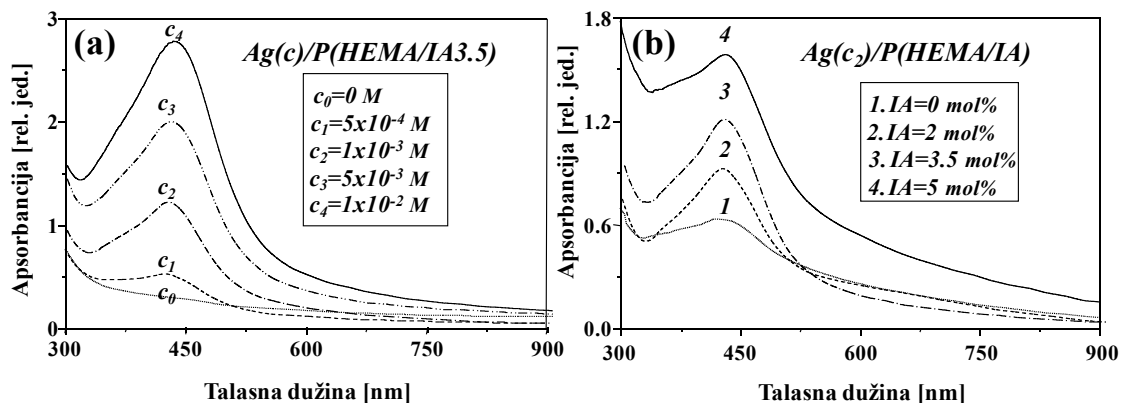
alkohola, HEMA i IA ($\text{CH}_3\text{C}^*\text{HOH}$ i HEMA* i IA*). Po završetku procesa zračenja P(HEMA/IA) hidrogel nabubren u vodeno/alkoholnom rastvoru bez AgNO_3 ($c_0 = 0\text{M}$) ostao je transparentan i nebojen, dok su u slučaju hidrogelova nabubrenih u rastvoru AgNO_3 različitih koncentracija, kao rezultat prenosa naelektrisanja i radiolitičke redukcije Ag^+ jona, dobijeni Ag/P(HEMA/IA) nanokompoziti sa intenzivnim obojenjem, od svetlo žute do tamno braon, zavisno od koncentracije rastvora AgNO_3 (slika 3.7).



Slika 3.7 Fotografija Ag/P(HEMA/IA3.5) nanokompozita dobijenih nakon γ zračenja hidrogelova nabubrenih u rastvorima AgNO_3 različitih koncentracija ($c_0 = 0\text{M}$, $c_1 = 5 \times 10^{-4}\text{M}$, $c_2 = 1 \times 10^{-3}\text{M}$, $c_3 = 5 \times 10^{-3}\text{M}$ i $c_4 = 1 \times 10^{-2}\text{M}$ AgNO_3)

Prva i najjednostavnija metoda karakterizacije metalnih nanočestica jeste snimanje njihovih spektara u UV-Vis oblasti. Pojava maksimuma plazmonske apsorpcije na odgovarajućoj talasnoj dužini, karakterističnoj za svaku metalnu nanočesticu, direktna je potvrda nanometarskih dimenzija sintetisanih čestica. Kako se u ispitivanim sistemima P(HEMA/IA) hidrogel koristi kao matrica i stabilizator rasta nanočestica, prvo su ispitana njegova optička svojstva. Na slici 3.8a su prikazani UV-Vis spektri P(HEMA/IA3.5) hidrogela bez nanočestica, kao i Ag/P(HEMA/IA3.5) nanokompozita sa četiri različite koncentracije nanočestica srebra. Uočeno je da čist hidrogel ne pokazuje apsorpciju u oblasti spektra od interesa (vidljiva oblast od 350 do 550 nm). Ovako transparentna polimerna matrica ne utiče na apsorpciju nanočestica srebra i omogućava njihovu neometanu detekciju.

UV-Vis spektri Ag/P(HEMA/IA) nanokompozita, predstavljeni na slici 3.8, pokazuju jasan plazmonski apsorpcioni pik, karakteristična za nanočestice srebra, u opsegu talasnih dužina od 420 do 435 nm [198, 199]. Inicijalno veća koncentracija soli srebra u rastvoru u kome gel bubri rezultuje formiranjem više/većih nanočestica srebra u strukturi hidrogela, što za posledicu ima porast intenziteta apsorpcije Uv-Vis spektra (slika 3.8a).

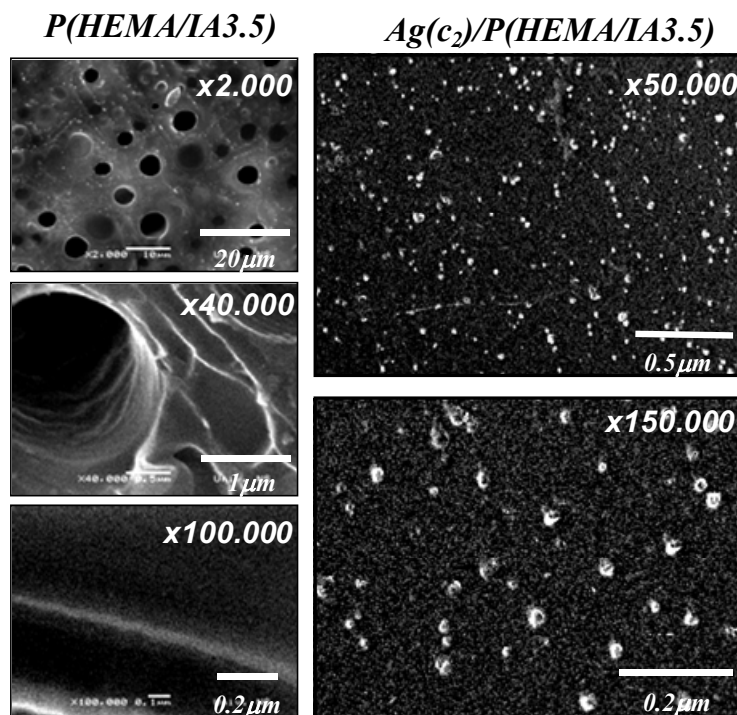


Slika 3.8 UV-Vis spektri (a) nanokompozita $Ag/P(HEMA/IA3.5)$ dobijeni nakon γ zračenja $P(HEMA/IA3.5)$ hidrogelova nabubrela u rastvoru $AgNO_3$ različitih koncentracija i (b) $Ag(c_2)/P(HEMA/IA)$ nanokompozita sa različitim udelom IA nakon zračenja $P(HEMA/IA)$ hidrogelova nabubrela u rastvoru $AgNO_3$ koncentracije $c_2=1 \times 10^{-3}\text{ M}$

Pored uticaja koncentracije rastvora soli srebra na formiranje nanočestica u hidrogelu, ispitivan je i uticaj molarnog udela IA, za rastvor $AgNO_3$ koncentracije $1 \times 10^{-3}\text{ mol/dm}^3$. Karakteristike matrice imaju značajan uticaj na položaj, širinu i oblik apsorpcione trake. Sa porastom sadržaja IA u $P(HEMA/IA)$ hidrogelu, ravnotežni stepen bubrenja hidrogela raste, tj. količina apsorbovanog rastvora $AgNO_3$ raste, što nakon zračenja rezultuje formiranjem više nanočestica srebra u strukturi gela, a to dovodi do porasta apsorpcije UV-Vis spektra (slika 3.8b). Na ovaj način mreža hidrogela igra ulogu nanoreaktora za sintezu i rast nanočestica srebra, a karakteristike mreže određuju njihovu veličinu i distribuciju. Poznato je da optička svojstva nanočestica metala, položaj maksimuma i intenzitet apsorpcije zavise od veličine čestice, ali i moguće aglomeracije. Kod sfernih nanočestica, vrednosti navedenih veličina opadaju sa smanjenjem njihovog dijametra [200].

Skansirajućom elektronskom mikroskopijom analizirana je morfoligija $Ag/P(HEMA/IA)$ nanokompozita. SEM mikrografi liofilizovanog $P(HEMA/IA3.5)$ hidrogela pokazuju „sunderastu“, poroznu strukturu, karakterističnu za umrežene sisteme (slika 3.9 levo), dok mikrografi $Ag/P(HEMA/IA3.5)$ nanokompozita jasno pokazuju prisustvo nanočestica srebra (slika 3.9 desno). Uzorci nanokompozita nisu

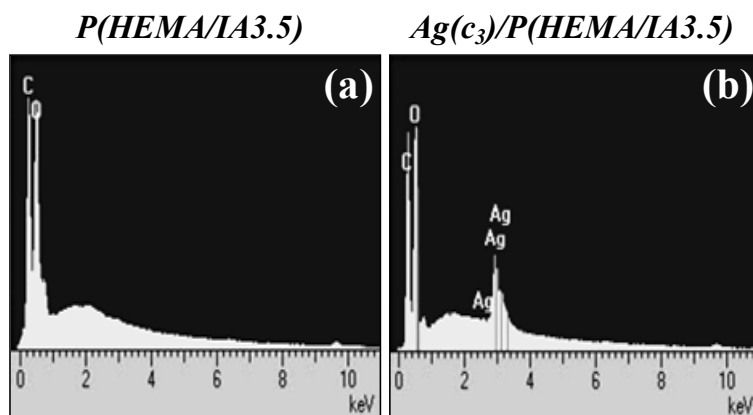
liofilizovani kako bi se izbeglo eventualno oslobađanje nanočestica srebra iz hidrogelova u toku bubrenja i liofilizacije.



Slika 3.9 SEM mikrografi površine liofilizovanog P(HEMA/IA3.5) hidrogela (levo) i neliofilizovanog Ag(c₂)/P(HEMA/IA3.5) nanokompozita (desno) pri različitim uvećanjima

Inkorporacijom nanočestica srebra ne narušava se struktura matrice, što ukazuje da se P(HEMA/IA) hidrogelovi mogu koristiti kao stabilni nosači nanostruktura. Nanočestice srebra veličine manje od 30 nm, sa relativno dobrom distribucijom uočene su za sve dobijene nanokompozitne hidrogelove. Neke nanočestice mogu da aglomerišu unutar klastera zbog privlačnih interakcionih sila među njima, ali iz SEM analize vidimo da do toga nije došlo. Ovo je takođe potvrđeno UV-Vis spektroskopijom, tj. odsustvom pojave pika oko 335 i 560 nm koji ukazuju na aglomeraciju nanočestica i pojavu klastera [198].

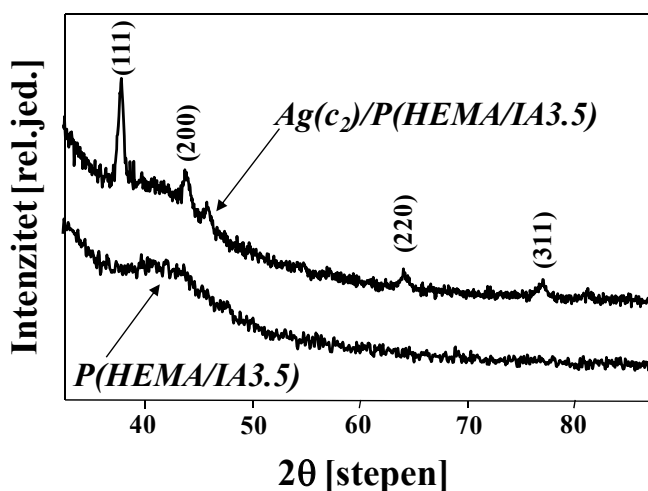
Strukturna analiza nanokompozita izvedena je energetski disperzivnom rentgenskom spektroskopijom (EDS), a EDS spektri P(HEMA/IA3.5) hidrogela i nanokompozita Ag(c₃)/P(HEMA/IA3.5) prikazani su na slici 3.10.



Slika 3.10 EDS spektar (a) $P(\text{HEMA}/\text{IA}3.5)$ hidrogela i (b) $\text{Ag}(c_3)/P(\text{HEMA}/\text{IA}3.5)$ nanokompozita

Za razliku od EDS spektra $P(\text{HEMA}/\text{IA}3.5)$ hidrogela, spektar nanokompozita $\text{Ag}(c_3)/P(\text{HEMA}/\text{IA}3.5)$ pokazuje pikove koji su jasan indikator prisustva srebra. EDS kvantitativna analiza potvrdila je da uzorak $\text{Ag}(c_1)/P(\text{HEMA}/\text{IA}3.5)$ sadrži 0.68 mas% srebra, $\text{Ag}(c_2)/P(\text{HEMA}/\text{IA}3.5)$ 1.27 mas%, dok uzorak $\text{Ag}(c_3)/P(\text{HEMA}/\text{IA}3.5)$ sadrži čak 6.3 mas% srebra. Ovim je dodatno potvrđeno da porast koncentracije rastvora AgNO_3 u kome je hidrogel bubren pre zračenja dovodi do formiranja više nanočestičnog srebra u strukturi hidrogela.

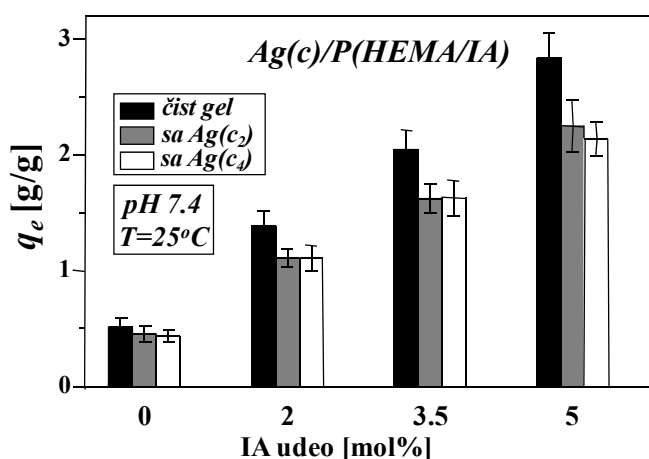
Potvrda prisustva nanočestičnog srebra dobijena je i metodom difrakcije X zračenja ispitivanih sistema, a rezultati su prikazani na slici 3.11.



Slika 3.11 Difraktogrami X zračenja $P(\text{HEMA}/\text{IA}3.5)$ hidrogela i $\text{Ag}(c_2)/P(\text{HEMA}/\text{IA}3.5)$ nanokompozita; gornja kriva je vertikalno pomerena zbog preglednosti

Difraktogram X zračenja P(HEMA/IA3.5) hidrogela pokazuje samo jedan, relativno širok, difrakcioni maksimum na oko 40° , dok difraktogram nanokompozita $\text{Ag}(c_2)/\text{P(HEMA/IA3.5)}$ pokazuje dobro definisane difrakcione maksimume karakteristične za nanočestice. Maksimumi difrakcije su pozicionirani na vrednostima 2θ od 38.0° , 44.0° , 64.4° i 77.2° koje odgovaraju Bragg-ovim refleksijama sa kristalnih ravni (111), (200), (220) i (311). Ovako indeksirane kristalne ravni pripisane su površinski centriranoj kubnoj strukturi nanočestica srebra [151, 198, 199, 201].

Analiza bubrenja čistih i nanokompozitnih hidrogelova, pri dve koncentracije srebra ($c_2 = 1 \times 10^{-3}$ M i $c_4 = 1 \times 10^{-2}$ M), izvedena je u puferu pH 7.4 na temperaturi 25°C , a q_e u funkciji molarnog udela IA prikazani su na slici 3.12.

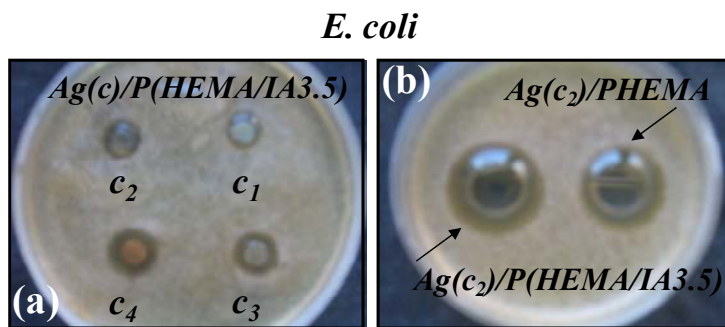


Slika 3.12 Analiza bubrenja P(HEMA/IA) hidrogelova i $\text{Ag}(c)/\text{P(HEMA/IA)}$ nanokompozita na 25°C u puferu pH 7.4 kao funkcija molarnog udela IA

Rezultati pokazuju da q_e hidrogela opada sa ugradnjom nanočestica srebra, pa se može pretpostaviti da je ovakvo ponašanje posledica činjenice da su pore na površini nanokompozita delimično blokirane česticama nanosrebra [202, 203]. Međutim, razlika u sadržaju nanočestica srebra ne utiče značajno na q_e datog nanokompozita.

Dobro je poznato da nanočestice srebra dovode do bakterijske inaktivacije [142, 204]. Indikatorske kulture bakterija *E. coli* i *S. aureus* i gljive *C. albicans* korišćene su u analizi antimikrobnih osobina $\text{Ag}/\text{P(HEMA/IA)}$ nanokompozita.

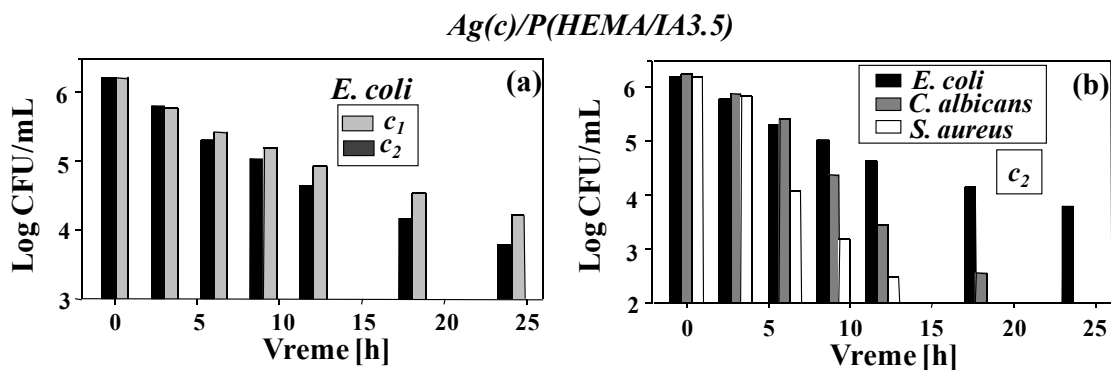
Na Petri šoljama u kojima je izvedena antimikrobna analiza prema *E. Coli*, prikazanim na slici 3.13, mogu se uočiti tamne zone oko diskova $\text{Ag}/\text{P(HEMA/IA)}$ nanokompozita.



Slika 3.13 Antibakterijska aktivnost prema *E. Coli* (a) $Ag/P(HEMA/IA3.5)$ nanokompozita sa različitim koncentracijama nanočestica srebra i (b) $Ag(c_2)/PHEMA$ i $Ag(c_2)/P(HEMA/IA3.5)$ nanokompozita

Primećeno je da ova oblast u kojoj je rast *E. Coli* sprečen, poznata kao zona inhibicije, raste sa porastom koncentracije soli srebra i sadržaja IA u hidrogelu, tj. raste sa porastom stepena bubrenja hidrogela, što za posledicu ima porast koncentracije nanočestica srebra formiranih unutar hidrogela.

Antimikrobna aktivnost $Ag/P(HEMA/IA3.5)$ nanokompozita prema *E. coli*, *S. aureus* i *C. Albicans*, dobijena prebrojavanjem broja formiranih kolonija (CFU) u podlozi agara odgovarajućeg razblaženja, prikazana je na slici 3.14.



Slika 3.14 Zavisnost logCFU (broj formiranih kolonija) od vremena za (a) $Ag(c_1)/P(HEMA/IA3.5)$ i $Ag(c_2)/P(HEMA/IA3.5)$ nanokompozite na *E. Coli* i (b) $Ag(c_2)/P(HEMA/IA3.5)$ nanokompozit na *E. Coli*, *S. aureus* i *C. albicans*

Rezultati antibakterijske aktivnosti $Ag/P(HEMA/IA3.5)$ nanokompozita prema *E. Coli*, prikazani za dve najniže koncentracije srebra, pokazuju da je i u slučaju hidrogela sa najnižom koncentracijom nanočestičnog srebra preživljavanje bakterije *E.*

Coli nakon 24 h manje od 1%. Još bolja antibakterijska i antifungalna aktivnost Ag/P(HEMA/IA3.5) nanokompozita uočena je prema *S. aureus* i *C. Albicans*, što jasno pokazuje da Ag/P(HEMA/IA3.5) nanokompoziti i sa malim udelom nanočestičnog srebra poseduju odličnu antimikrobnu aktivnost i mogućnost primene kao prevlaka za tretiranje rana i opekotina.

3.3 Hidrogelovi na bazi 2-hidroksietil metakrilata, itakonske kiseline i oligo(etilen glikol) akrilata P(HEMA/IA/OEGA)

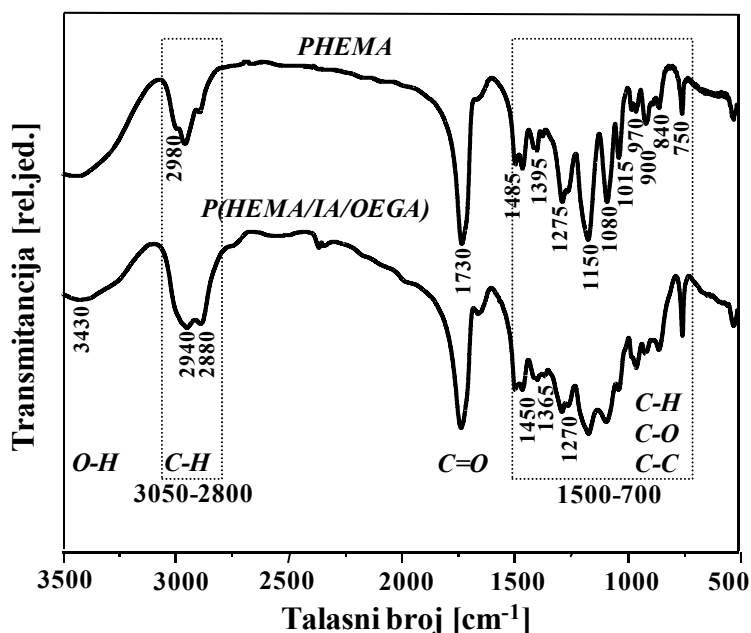
Pretpostavljeno je da kopolimerizacija IA, kao pH reagujuće komponente, i oligo(etilen glikol) akrilata (OEGA), kao temperaturno reagujuće komponente, sa inertnim PHEMA hidrogelom omogućava dobijanje nove klase „pametnih“ P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelova sa kombinovanim pH i temperaturnim odzivom. U tom cilju radijaciono je sintetisana serija kopolimernih P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelova sa različitim molarnim udelima monomera, kako bi se ispitaio uticaj sadržaja IA (0, 2.5 i 5 mol%), a posebno OEGA (12.5, 27.5, 47.5 i 67.5 mol%), na osobine sintetisanih hidrogelova i procenila njihova moguća primena u medicini. Prema sadržaju monomera koji ulaze u njihov sastav P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelovi su obeleženi kao što je dato u tabeli 3.2.

Tabela 3.2 Hemijski sastav polazne smeše monomera prilikom radijacione sinteze P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelova

HIDROGEL	mol% monomera		
	HEMA	IA	OEGA
PHEMA	100	0	0
P(HEMA/IA2.5)	97.5	2.5	0
P(HEMA/OEGA27.5)	72.5	0	27.5
P(HEMA/IA2.5/OEGA12.5)	85	2.5	12.5
P(HEMA/IA2.5/OEGA27.5)	70	2.5	27.5
P(HEMA/IA5/OEGA27.5)	67.5	5	27.5
P(HEMA/IA2.5/OEGA47.5)	50	2.5	47.5
P(HEMA/IA2.5/OEGA67.5)	30	2.5	67.5

Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR) korišćena je za identifikaciji hemijskog sastava hidrogelova. Kako sa promenom molarnog udela

OEGA u kopolimernom P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelu ne dolazi do promena u FTIR spektru, tj. svi spektri kopolimernih hidrogelova pokazuju iste molekulske trake, tako su na slici 3.15 pokazani FTIR spektri homopolimernog PHEMA i kopolimernog P(HEMA/IA/OEGA) hidrogela, korišćeni za identifikaciju karakterističnih pikova relevantnih funkcionalnih grupa. Ugradnja male količine IA uvodi samo teško uočljive kvantitativne promene u FTIR spektru, pošto se glavne apsorpcione trake PIA i PHEMA dosta preklapaju. S druge strane, uočena je značajna kvantitativna razlika između spekara PHEMA i P(HEMA/IA/OEGA) u oblastima između $3050\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ i $1500\text{--}700\text{ cm}^{-1}$, kao posledica prisustva etilen glikolnih jedinica [157].

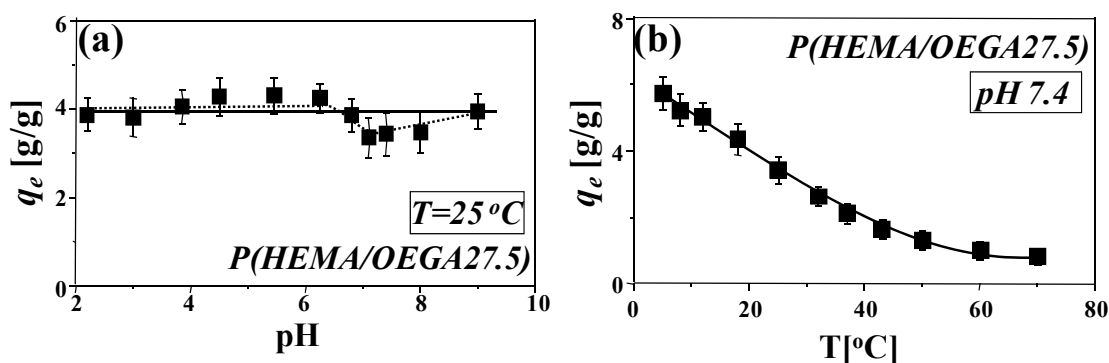


Slika 3.15 FTIR spektri PHEMA i P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelova

Može se zapaziti velika sličnost između dobijenih spektara, ali se takođe mogu videti i neke razlike. Oba spektra pokazuju karakterističan široki apsorpcioni pik oko 3430 cm^{-1} koji odgovara OH vibracijama vodonika u alkoholnoj grupi [$\nu(\text{OH})$], apsorpcione trake između 3050 i 2800 cm^{-1} koje odgovaraju vibracijama alifatičnih CH_2 i CH_3 grupa: 2980 cm^{-1} [$\nu(\text{CH}_3)_{as}$, $\nu(\text{CH}_2)_{as}$], 2940 cm^{-1} [$\nu(\text{CH}_2)_s$, $\nu(\text{CH}_3)_s$], 2880 cm^{-1} [$\delta(\text{CH}_3)$], vibraciju estarske grupe na 1730 cm^{-1} [$\nu(\text{C}=\text{O})$], kao i brojne apsorpcione trake između 1500 i 700 cm^{-1} : 1485 cm^{-1} [$\delta(\text{CH}_2)$], 1450 cm^{-1} [$\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)_{as}$], 1395 cm^{-1} [$\delta(\text{CH}_3)_s$], 1365 cm^{-1} [$\omega(\text{CH}_2)$], 1275 cm^{-1} [$\nu(\text{C}-\text{O})$], 1270 cm^{-1} [$\omega(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH})$], 1150 cm^{-1} [$\gamma(\text{CH}_3)$, $\tau(\text{OH})$] $\gamma(\text{CH}_3)$, $\gamma(\text{CH}_2)$], 1080 cm^{-1} [$\nu(\text{O}-\text{C})_s$, alkohol], 1015 cm^{-1}

$[\nu(\text{C-O})$, ester], $970\text{-}840\text{ cm}^{-1}$ [$\delta(\text{C-C})$, $\gamma(\text{CH}_3)$, $\gamma(\text{CH}_2)$], a intenzivan pik oko 750 cm^{-1} karakterističan za metakrilatne polimere potiče od jake vibracije [$\gamma(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{O=C-O})$] cm^{-1} , pri čemu je ν istežuća vibracija, δ savijajuća, ω mašuća, γ ljuljajuća i τ uvijajuća vibracija [156, 205-208].

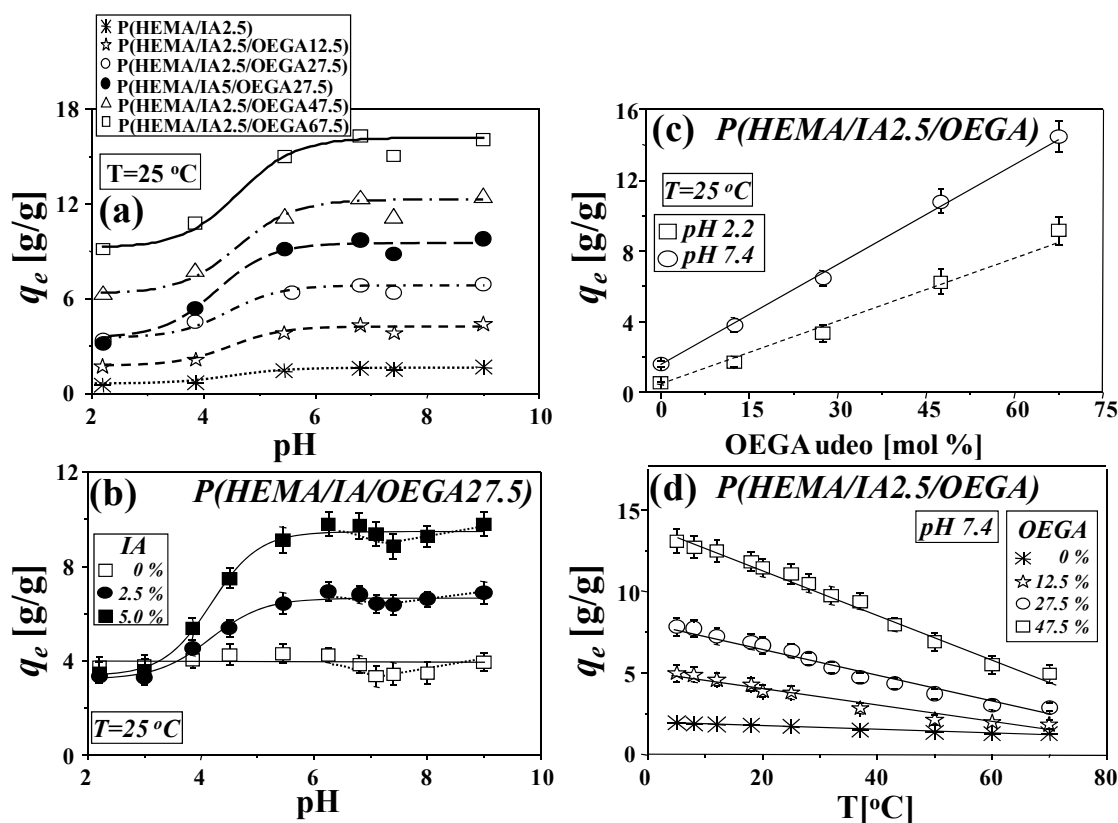
Kako bi se ispitao uticaj molarnog udela monomera, kao i promene spoljašnjih uslova (pH i temperature) na osobine P(HEMA/OEGA) hidrogelova, izvedena je analiza ravnotežnog bubrenja. Bubrenje je praćeno u širokom opsegu pH vrednosti (2.2-9.0) i temperature ($5\text{-}70^\circ\text{C}$), čime je potvrđen veliki opseg ravnotežnog stepena bubrenja ispitivanih hidrogelova i njihovo istovremeno reagovanje na dva stimulansa.



Slika 3.16 Zavisnost ravnotežnog stepena bubrenja, dobijenog gravimetrijskom metodom, P(HEMA/OEGA27.5) hidrogela od (a) pH sredine na sobnoj temperaturi i (b) temperature u puferu pH 7.4

Sa slike 3.16 se može uočiti da dodatak OEGA komponente PHEMA hidrogelu unosi izvesno reagovanje na promenu pH i značajni temperaturni odziv P(HEMA/OEGA27.5) hidrogela. U opsegu pH 6.8-8.0 javlja se mali pad q_e , koji sa daljim porastom pH vrednosti ponovo raste. Međutim, ukupan q_e kopolimernog P(HEMA/OEGA27.5) hidrogela je mnogo viši od q_e PHEMA hidrogela usled veće hidrofilnosti OEGA jedinica prisutnih u kopolimeru. Tako P(HEMA/OEGA27.5) hidrogel na 25°C pokazuje ravnotežni stepen bubrenja oko 4 nasuprot 0.5 koji je dobijen za PHEMA hidrogel. Sa porastom temperature uočen je eksponencijalni pad q_e kopolimernog hidrogela, čime je potvrđen njegov temperaturni odziv koji je posledica prisustva OEGA jedinica, jer PHEMA hidrogel ne pokazuje promenu q_e sa temperaturom (slika 3.3b).

Dodavanje IA, kao pH reagujuće komponente, P(HEMA/OEGA) hidrogelovima rezultuje novim terpolimernim P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelovima, koji pokazuju visoki pH odziv i porast q_e na pH vrednostima iznad konstanti disocijacije karboksilnih grupa iz IA. Zavisnost ravnotežnih stepena bubrenja P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelova od pH vrednosti sredine, na 25°C, prikazani su na slici 3.17 (a i b).



Slici 3.17 Zavisnost ravnotežnih stepena bubrenja, dobijenih gravimetrijskom metodom, P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelova od (a) pH sredine, (b) pH sredine, za hidrogelove sa različitim udelom IA, (c) molarnog udela OEGA u hidrogelu, na dve pH vrednosti i (d) temperature

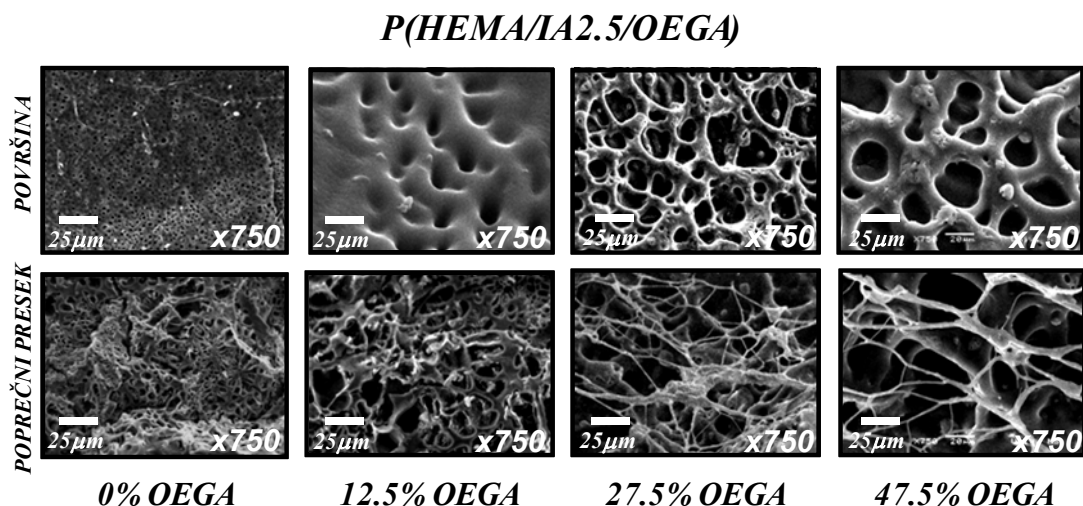
Sa porastom molarnih udela OEGA i IA stepen bubrenja ovih hidrogelova raste. Naime, ugradnjom glikolnih lanaca u hidrogelove koji sadrže jonske komponente sa kiselinskim grupama stvaraju se povoljni uslovi za formiranje vodoničnih veza između etarskog kiseonika iz glikola i vodonika iz karboksilne grupe jonskog monomera, što dovodi do porasta stepena bubrenja [209].

Kod svih hidrogelova, maksimalan q_e dostignut je na pH 6, nakon kompletne disocijacija kiselinskih grupa iz IA. Uočen je mali pad q_e na pH ≈ 7 i ponovni porast na višim pH kao posledica prisustva OEGA jedinica. Naime, za OEG(M)A jedinice tačke zamućenja (CP) su nekoliko stepeni niže u neutralnoj sredini nego u kiseloj i baznoj, što je posledica nešto jačih interakcija OEG lanaca sa hidroksidnim jona ili hidronijum protonom nego sa vodom [210].

Sa porastom udela OEGA od 0 do 67.5 mol% u P(HEMA/IA2.5/OEGA) hidrogelu dolazi do linearnog porasta q_e , bez obzira na pH vrednost sredine (slika 3.17c). Razlike u nagibu linearnih funkcija dobijenih na pH 2.2 i 7.4 javljaju se kao posledica prisustva IA i disocijacije polarnih karboksilnih grupa na višim pH vrednostima.

P(HEMA/IA/OEGA) kopolimerni hidrogelovi pokazuju i temperaturni odziv u ispitivanom intervalu temperature (5-70°C), usled prisustva OEGA jedinica. Uočen je linearni pad ravnotežnog stepena bubrenja sa temperaturom, tj. javlja se negativni temperaturni odziv (slika 3.17d). Sa porastom udela OEGA u hidrogelu nagib krive postaje izraženiji. Temperaturni odziv P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelova u vezi je sa činjenicom da makromolekuli sa kratkim OEG bočnim lancima pokazuju određenu LCST u vodenim rastvorima, koja se javlja kao posledica prelaza iz spiralne u globularnu strukturu. Ovakvo ponašanje je posledica amfifilnog karaktera monomera. Hidrofilni bočni lanci OEG obrazuju vodonične veze sa vodom, dok glavni lanac, koji je obično manje polaran u neutralnoj i baznoj sredini, vodi do konkurentskog, hidrofobnog efekta [180]. Kako je ova hidrofilno/hidrofobna ravnoteža u kopolimerima temperaturno zavisna, to objašnjava i pojavu zavisnosti stepena bubrenja hidrogelova od temperature.

Morfološka analiza P(HEMA/IA2.5/OEGA) hidrogelova sa različitim sadržajem OEGA (0, 12.5, 27.5 i 47.5 mol%) prikazana je na slici 3.18. Iz SEM mikrografa površine i poprečnih preseka liofilizovanih uzoraka uočena je izražena porozna struktura, sa relativno uniformnom distribucijom pora. Prethodno uočen porast q_e sa porastom sadržaja OEGA u hidrogelu, praćen je očekivanim porastom poroznosti. Snimci poprečnog preseka pokazuju da su pore ravnomerno formirane kako na površini, tako i unutar mreže hidrogela.



Slika 3.18 SEM mikrofotografije liofilizovanih *P(HEMA/IA2.5/OEGA)* kserogelova sa različitim udelom OEGA (0, 12.5, 27.5 i 47.5 mol%) monomera

OEGA i IA, kao hidrofilnije komponente u odnosu na HEMA, igraju vrlo važnu ulogu u mehaničkim osobinama *P(HEMA/IA/OEGA)* kopolimernih hidrogelova. Vrednosti elastičnog (E) i kompresionog (G) modula ispitivanih hidrogelova prikazani su u tabeli 3.3 i na slici 3.19.

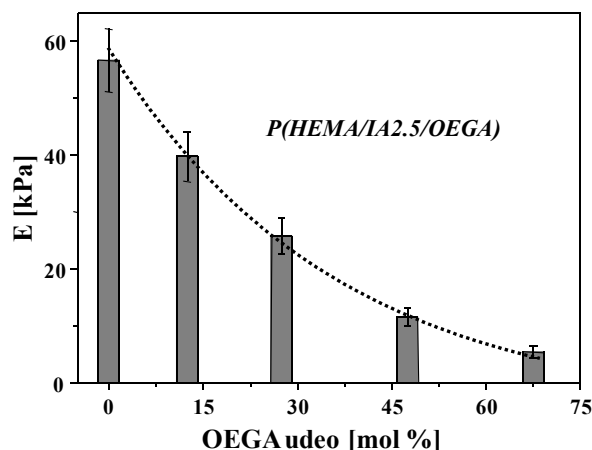
Tabela 3.3 Ravnotežni stepeni bubrenja (q_e), mehaničke osobine (E i G modul) i parametri mreže ($\overline{M}_c$, v_e , χ i ξ) *P(HEMA/IA/OEGA)* hidrogelova na pH 7.0 i $T=25^\circ\text{C}$

HIDROGEL	q_e [g/g] pH 7.0 $T=25^\circ\text{C}$	E [kPa]	G [kPa]	$\overline{M}_c$ [g/mol]	v_e [mol/dm ³]	χ	ξ [nm]
<i>P(HEMA/IA2.5)</i>	1.7±0.1	55.70	18.25	12500	0.082	0.685	34.6
<i>P(HEMA/OEGA27.5)</i>	3.5±0.5	34.50	11.20	15500	0.072	0.580	37.3
<i>P(HEMA/IA2.5/OEGA12.5)</i>	3.9±0.4	39.70	12.81	14000	0.076	0.576	40.7
<i>P(HEMA/IA5.0/OEGA12.5)</i>	5.8±0.4	34.80	11.20	14400	0.076	0.546	46.6
<i>P(HEMA/IA2.5/OEGA27.5)</i>	6.5±0.4	25.80	8.30	18200	0.063	0.540	48.2
<i>P(HEMA/IA5.0/OEGA27.5)</i>	9.2±0.5	23.30	7.50	19000	0.061	0.526	54.2
<i>P(HEMA/IA2.5/OEGA47.5)</i>	11.5±0.7	11.80	3.75	30500	0.038	0.520	63.6
<i>P(HEMA/IA2.5/OEGA67.5)</i>	15.6±0.9	5.60	1.75	58000	0.021	0.514	83.9

Za elastične hidrogelove, odnos E i G trebalo bi da je 3 za mala naprezanja, i za naš set rezultata ne odstupa značajno od ove vrednosti. Sa porastom sadržaja IA od 0 do 5 mol% u *P(HEMA/IA/OEGA27.5)* hidrogelu, G modul opada sa 11 na 7 kPa (≈ 1.5

puta), dok q_e raste sa 3 na 9 (≈ 3 puta). Kako bi povećanje q_e bilo praćeno boljom mehaničkom jačinom, optimizacija P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelova favorizuje sadržaj IA, jer za slične q_e na pH 7.0 P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelovi sa višim sadržajem IA i nižim sadržajem OEGA pokazuju bolju mehaničku jačinu. Tako P(HEMA/IA2.5/OEGA12.5) u poređenju sa P(HEMA/OEGA27.5) na sobnoj temperaturi ima ≈ 1.15 puta veći q_e i u isto vreme ≈ 1.18 puta veći G modul. Porast sadržaja IA i OEGA povećava hidrofilnost i sadržaj vode u hidrogelu, dovodi do slabljenja polimer-polimer interakcija i opadanja E i G modula, što ukazuje na blisku vezu mehaničkih i osobina bubrenja hidrogelova.

Iz tabele 3.3 i slike 3.19 može se videti da sa porastom sadržaja OEGA u hidrogelu, elastični (E) i kompresioni (G) moduli hidrogelova opadaju, pri čemu je pad izraženiji nego u slučaju promene udela IA. E modul P(HEMA/IA2.5/OEGA) hidrogela sa porastom udela OEGA od 0 do 67.5 mol% opada sa 56 na 5.6 kPa (≈ 10 puta), dok q_e u isto vreme raste sa 1.7 na 15 (≈ 9 puta).

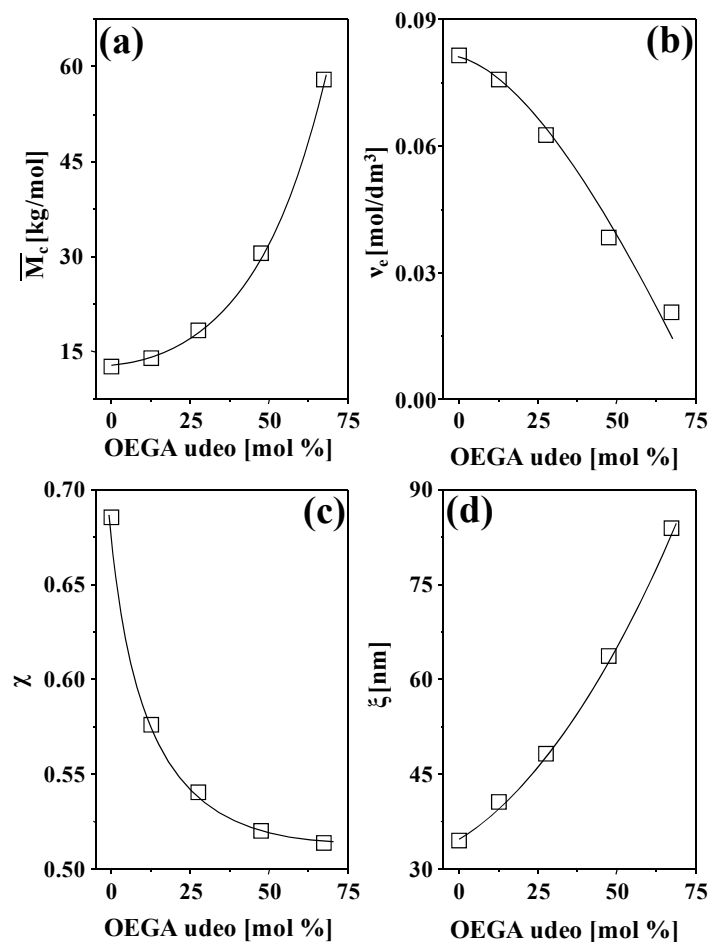


Slika 3.19 Elastični (E) modul P(HEMA/IA2.5/OEGA) hidrogela kao funkcija molarog udela OEGA

Način sinteze, hemijski sastav kopolimera, korišćeni rastvarač i količina umreživača su faktori koji značajno utiču na strukturu mreže sintetisanih hidrogelova. Rezultati analize bubrenja i mehaničkih osobina, dati u tabeli 3.3, iskorišćeni su za izračunavanje parametara mreže P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelova i predstavljeni u tabeli 3.3 i na slici 3.20. Izračunavanje srednje molekulske mase između čvorova mreže

($\overline{M}_c$), efektivne gustine umreženja (v_e), parametra interakcije polimer-rastvarač (χ) i veličine pora (ξ) izvedeno je korišćenjem jednačina datih u uvodnom delu (1.2.6).

P(HEMA/IA2.5/OEGA)



Slika 3.20 Parametri mreže *P(HEMA/IA2.5/OEGA)* hidrogelova u funkciji udela OEGA: (a) srednja molekulska masa između čvorova mreže ($\overline{M}_c$), (b) efektivna gustina umreženja (v_e), (c) parametar interakcije polimer-rastvarač (χ) i (d) veličina pora (ξ)

Uočeno je da sa porastom sadržaja IA i/ili OEGA u P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelovima $\overline{M}_c$ raste (slika 3.20a) i značajno je veća za kopolimere sa udelom OEGA iznad 27.5 mol% u odnosu na ostale hidrogelove. Kako v_e predstavlja odnos gustine kserogela i $\overline{M}_c$ (jednačina 1.2.6.3), a gustina kserogela se ne menja značajno sa promenom sastava hidrogelova, opadanje v_e sa porastom $\overline{M}_c$ je očekivano (slika 3.20b).

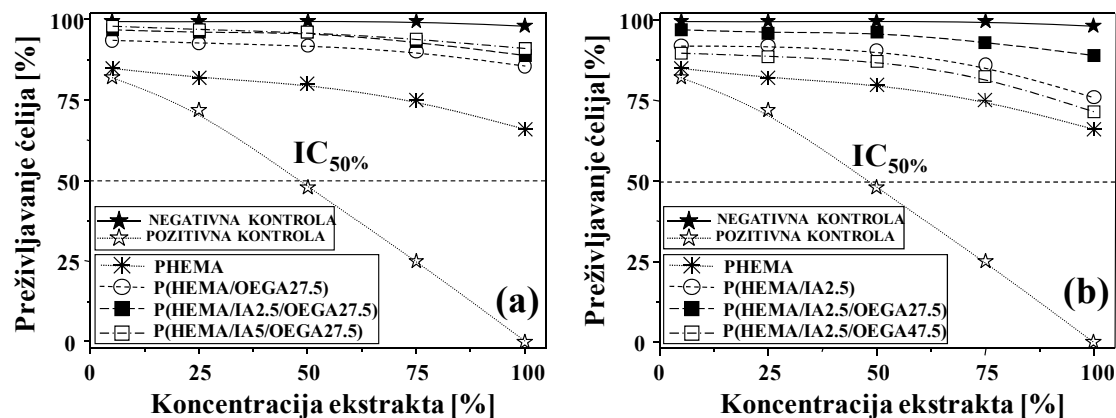
Termodinamička interakcija se u hidrogelovima reflektuje preko parametra interakcije polimer-rastvarač (χ), koji odražava promenu energije interakcije prilikom mešanja polimera i rastvarača. U sistemu polimer-voda viša vrednost χ ukazuje na njihovu slabiju interakciju, dok je interakcija između hidrofobnih grupa ili polimernih lanaca jača [75]. Iz vrednosti parametra χ P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelova (jednačina 1.2.6.4), predstavljenih u tabeli 3.3 i na slici 3.20c, uočeno je da sa porastom sadržaja IA i OEGA u hidrogelu vrednost χ opada. Kod hidrogelova sa 2.5 mol% IA, porast sadržaja OEGA od 0 do 67.5 mol% dovodi do pada χ sa 0.69 na 0.51. Očigledno je da mali porast sadržaja IA i/ili OEGA značajno utiče na χ , što je posledica činjenice da je interakcija između vode i IA ili OEGA jedinica mnogo jača nego između vode i HEMA. Rezultat toga je da P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelove sa većim udelom IA i/ili OEGA karakteriše veća hidrofilnost i ravnotežni stepen bubrenja.

Izračunate vrednosti veličina pora (ζ) (jednačine 1.2.6.2) pokazuju da sa porastom sadržaja IA i/ili OEGA ζ raste na sličan način kao $\overline{M}_c$. Sa slike 3.20d za P(HEMA/IA2.5/OEGA) hidrogel uočen je porast ζ od 35 do 84 nm sa porastom sadržaja OEGA od 0 do 67.5 mol%, što ove hidrogelove svrstava u red mikroporoznih. Uočen porast poroznosti P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelova sa porastom sadržaja OEGA dodatno potvrđuju rezultate SEM analize.

Kopolimerizacija PHEMA sa OEGA rezultuje hidrogelovima sa etilen glikol akrilatnim (EGA) jedinicama u visećim lancima, sa strukturom nalik češlju, koji mogu biti interesantni za mnoge primene u medicini. Zato je kao sledeći korak karakterizacije P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelova usledilo *in vitro* ispitivanje biokompatibilnosti, preko testa citotoksičnosti i hemolitičke aktivnosti.

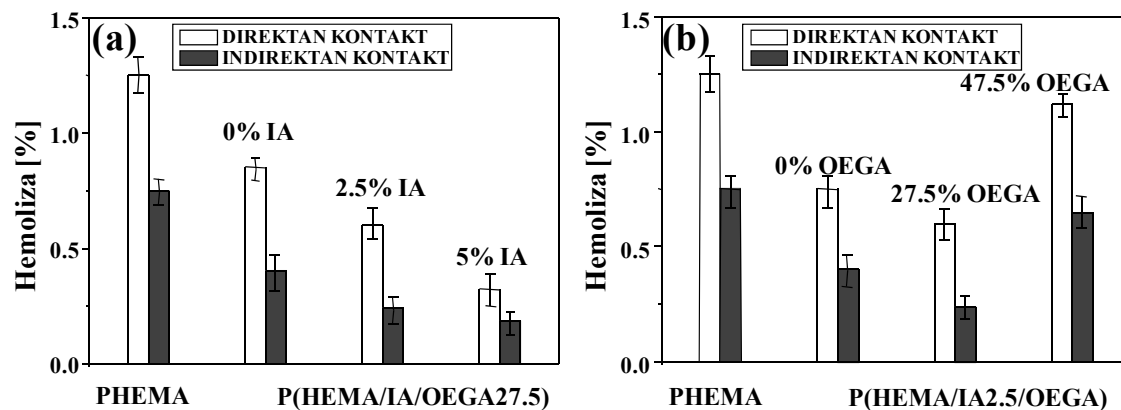
Citotoksičnost kopolimernih P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelova ispitivana je u funkciji sadržaja IA i OEGA i grafički predstavljena na slici 3.21. P(HEMA/OEGA) kopolimerni hidrogel pokazuje bolje rezultate preživljavanja ćelija od homopolimera PHEMA, ukazujući da dodatak OEGA poboljšava citokompatibilnost hidrogela. Na ovaj način potvrđeno je da kopolimerizacija PHEMA sa monomerima koji sadrže linearne i fleksibilne PEG lance doprinosi boljoj biokompatibilnosti hidrogela [211]. Dodatak IA u P(HEMA/OEGA) hidrogel dodatno poboljšava njihovu citotokompatibilnost. Porast preživljavanja ćelija uočen za P(HEMA/IA/OEGA) hidrogel sa malim sadržajem IA (2.5%) i OEGA (27.5%) praćen je padom sa daljim

povećanjem sadržaja OEGA. Međutim, kako je preživljavanje ćelija za sve uzorke veće od 50%, P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelovi se ne smatraju citotoksičnim [98].



Slika 3.21 Preživljavanje ćelija na P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelovima kao funkcija ekstrakta za hidrogelove sa različitim molarnim udelom (a) IA i (b) OEGA

Hemokompatibilnost P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelova praćena je u funkciji udela IA i OEGA u hidrogelu, a dobijeni rezultati prikazani su na slici 3.22.



Slika 3.22 Hemolitička aktivnost P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelova u funkciji molarne udela (a) IA i (b) OEGA

Svi ispitivani hidrogelovi pokazuju nižu vrednost hemolize od PHEMA hidrogela, odakle sledi da kopolimerizacija PHEMA sa IA i OEGA poboljšava hemokompatibilnost kopolimernog hidrogela. Sa porastom udela IA od 0 do 5 mol% stepen hemolize hidrogelova opada. U slučaju porasta sadržaja OEGA u hidrogelu

uočen je pad hemolize za P(HEMA/IA/OEGA) hidrogel sa 27.5 mol% OEGA, dok dalji porast sadržaja OEGA dovodi do porasta u stepenu hemolize i opadanja hemokompatibilnosti. Međutim, kako su srednje vrednosti hemolize za sve ispitivane hidrogelove manje od 1.3% u metodi direktnog kontakta i ispod 0.8% u metodi indirektnog kontakta P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelovi se ne smatraju hemolitičnim.

Još jedan važan korak prilikom ispitivanja biomaterijala je i test penetracije mikroba. U tu svrhu, korišćene su bakterije *S. aureus* i *E. coli*. Rezultati testa pokazuju da nakon praćenog vremena inkubacije (12, 24 i 48 h) nije uočen rast bakterija na ispitivanim hidrogelnim oblogama, tj. nije došlo do kontaminacije donje površine obloge ni *S. Aureus*, niti *E. Coli*. Prema tome, P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelne obloge mogu se smatrati dobrom barijerom protiv bakterijskih kolonija u oštećeno tkivo. Ovo je važna karakteristika prilikom primene hidrogelova kao obloga u oftalmologiji, dermatologiji, a posebno u zaštiti rana od dalje infekcije, kako bi se pospešio i ubrzao proces zarastanja.

3.4 Hidrogelovi na bazi 2-hidroksietil metakrilata i oligo(propilen) glikol metakrilata P(HEMA/OPGMA)

Dok su oligo(etilen glikol) (met)akrilati (OEG(M)A) široko korišćeni u mnogim temperaturno reagujućim materijalima [35, 157, 176, 180, 210, 212-216], oligo(propilen glikol) metakrilat (OPGMA) je manje eksploatisan zbog slabijeg amfifilnog karaktera. Pronašli smo samo nekoliko radova koji se bave ispitivanjem, uglavnom linearnih, kopolimera na bazi OPGMA [191, 217, 218]. Osim našeg [157], postoje još samo dva rada koja se bave hidrogelovima na bazi OPGMA [219, 220], bez ispitivanja POPGMA homopolimernog hidrogela.

Pretpostavljeno je da kopolimerizacija OPGMA, kao temperaturno reagujuće komponente, sa inertnim 2-hidroksietil metakrilatom (HEMA) omogućava dobijanje nove klase „pametnih“ P(HEMA/OPGMA) hidrogelova čija se temperatura zapreminskog faznog prelaza (VPTT) može podešavati promenom udela OPGMA u hidrogelu. Da bi ispitali uticaj sadržaja OPGMA na temperaturu faznog prelaza hidrogela, radikalnom polimerizacijom indukovanom γ zračenjem sintetisan je homopolimerni hidrogel poli(oligo(propilen glikol) metakrilat), POPGMA, kao ne-

linearni analog PPGMA, i četiri kopolimerna P(HEMA/OPGMA) hidrogela sa udelima OPGMA od 6, 12.5, 27.5 i 50 mol%. Prema sadržaju monomera koji ulaze u njihov sastav P(HEMA/OPGMA) hidrogelovi su obeleženi kao u tabeli 3.4.

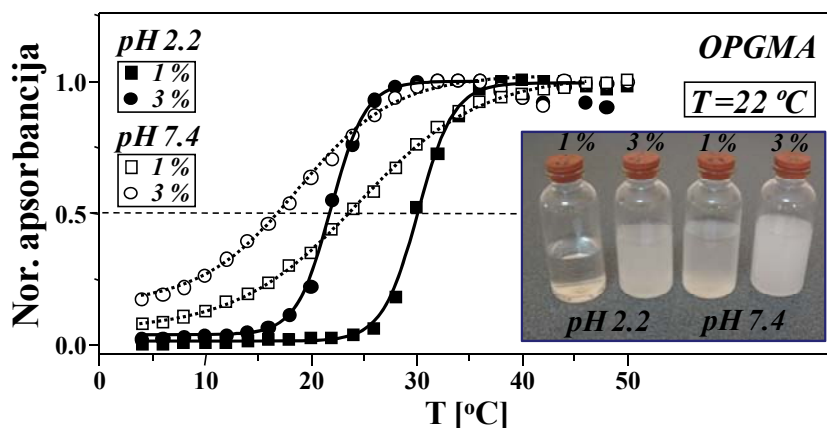
Tabela 3.4 Hemijski sastav polazne smeše monomera radijaciono sintetisanih *P(HEMA/OPGMA)* hidrogelova

HIDROGEL	mol% monomera		mas% monomera	
	HEMA	OPGMA	HEMA	OPGMA
<i>PHEMA</i>	100	0	100	0
<i>P(HEMA/OPGMA6)</i>	94	6	84.5	15.5
<i>P(HEMA/OPGMA12.5)</i>	87.5	12.5	70.8	29.2
<i>P(HEMA/OPGMA27.5)</i>	72.5	27.5	44.7	55.3
<i>P(HEMA/OPGMA50)</i>	50	50	25.8	74.2
<i>POPGMA</i>	0	100	0	100

Pre ispitivanja odziva na temperaturu homopolimernog POPGMA i kopolimernih P(HEMA/OPGMA) hidrogelova, potrebno je poznavati termalne osobine rastvora monomera OPGMA, iz kog su ovi hidrogelovi dobijeni, kao i uticaj koncentracije rastvora monomera na LCST vrednost unutar fizioloških uslova.

Na slici 3.23 prikazana je zavisnost normalizovane apsorpcije rastvora monomera OPGMA za dve koncentracije (1 i 3 mas%) od temperature, u puferskim rastvorima pH 2.2 i 7.4. Na određenoj temperaturi, za sve sastave, rastvor prelazi iz bistrog u zamućen, što je praćeno velikim porastom apsorpcije. Vrednost normalizovane apsorpcije od 0.5 predstavlja tačku zamućenja (CP) i definisana je kao LCST [44, 221]. Dobijene LCST vrednosti za 3 mas% rastvor su 17.3°C i 21.9°C za pH 7.4 i 2.2, a za 1 mas% rastvor 23.6°C i 30.3°C za pH 7.4 i 2.2. Sa fotografije prikazane na slici 3.23 može se uočiti da je u koncentrovanijim rastvorima zamućenost naglašenija nego u razblaženim. Očigledno je da LCST vrednosti rastu sa opadanjem koncentracije OPGMA, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora o LCST polimera [44, 191]. Može se uočiti da LCST vrednosti dobijene za istu koncentraciju rastvora OPGMA pokazuju razlike sa promenom pH. Promena pH od 2.2 do 7.4 rezultuje padom LCST od oko 5°C, nezavisno od koncentracije [222]. Slično ponašanje primećeno je i u slučaju različitih OEGMA, kod kojih je tačka zamućenja nekoliko stepeni niža u

neutralnoj sredini nego u baznoj i kiseljoj, usled jače interakcije OEG lanaca sa hidroksilnim jonima i hidronijum protonima nego sa vodom [210].

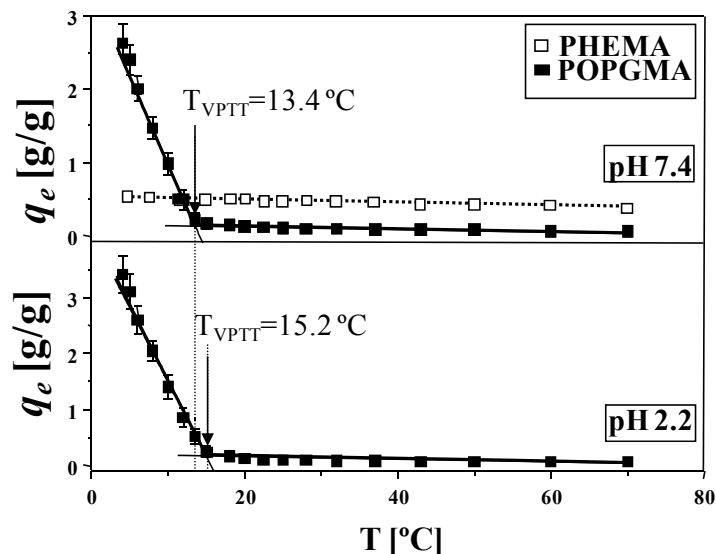


Slika 3.23 LCST profili rastvora OPGMA u puferima pH 2.2 i 7.4, za dve koncentracije monomera (1 i 3 mas%) mereni UV-Vis spektrometrijom. Digitalna fotografija rastvora OPGMA pri dve koncentracije monomera (1 i 3 mas%) u puferskim rastvorima pH 2.2 i 7.4 na 22°C

Nakon određivanja LCST rastvora oligomera, sledeći korak bio je ispitivanje termalnih osobina homopolmernog POPGMA i kopolimernih P(HEMA/OPGMA) hidrogelova metodom bubrenja. Analiza bubrenja izvedena je u širokom intervalu pH (2.2-9.0) i temperature (5-70°C), kako bi se ispitao uticaj molarnog udela monomera u kopolimeru i promene spoljašnjih uslova na osobine ravnotežnog bubrenja i VPTT vrednosti P(HEMA/OPGMA) hidrogelova.

Ravnotežni stepeni bubrenja POPGMA hidrogela u funkciji temperature, u puferima pH 7.4 i 2.2, predstavljeni na slici 3.24, iskorišćeni su za određivanje njegove VPTT koja je definisana kao temperatura na kojoj se javlja nagla promena nagiba krive q_e u funkciji temperature [51-53]. Radi poređenja, data je i zavisnost ravnotežnog stepena bubrenja PHEMA hidrogela na pH 7.4. Za razliku od temperaturno slabo reagujućeg PHEMA, POPGMA hidrogel pokazuje izraženi temperaturni odziv. Usled veće hidrofilnosti OPGMA jedinica na niskim temperaturama, POPGMA hidrogel na temperaturama ispod 10°C pokazuje mnogo veći q_e od PHEMA. U puferu pH 2.2 na 5°C POPGMA pokazuje $q_e \approx 3.5$ nasuprot 0.5 dobijenog za PHEMA. Sa porastom temperature POPGMA podnosi značajne promene u ravnotežnom stepenu bubrenja,

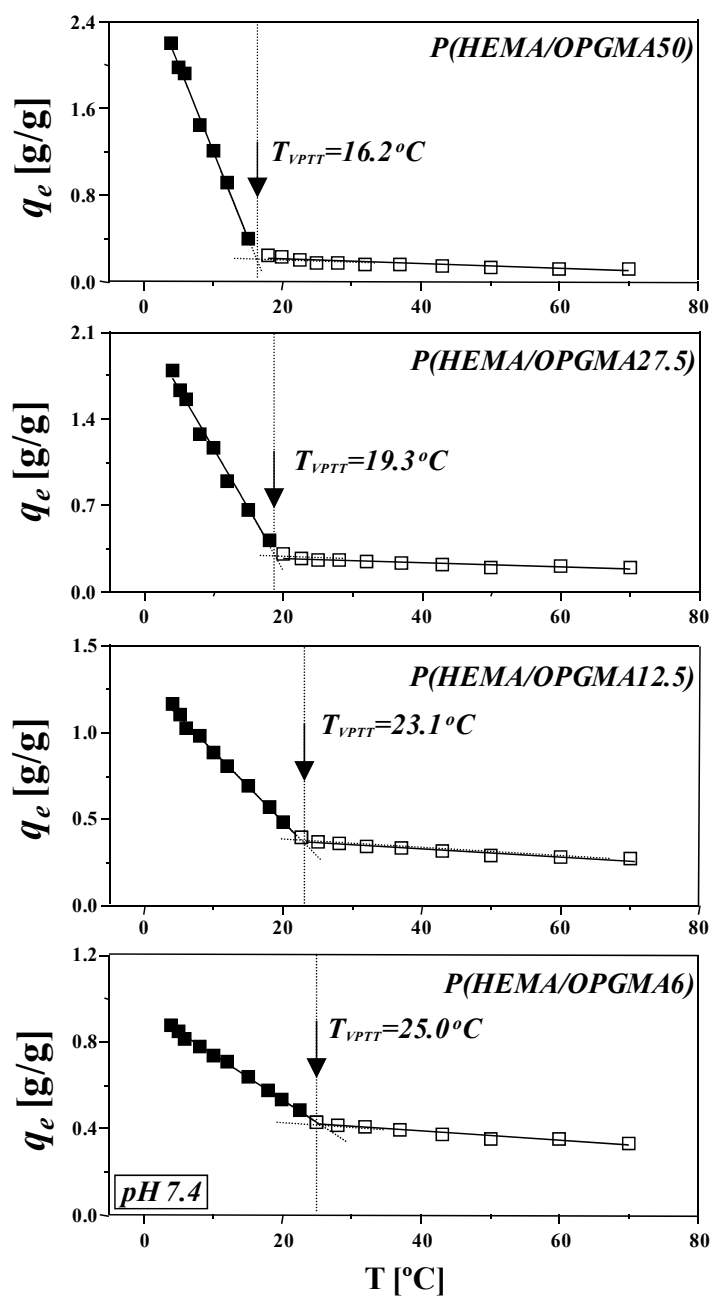
dolazi do naglog pada q_e sa 3.5 do ispod 0.2 porastom temperature sa 5 na 15°C, nakon čega se sa daljim porastom temperature q_e neznatno menja.



Slika 3.24 Zavisnost ravnotežnog stepena bubrenja (q_e) PHEMA i POPGMA homopolimernih hidrogelova od temperature u puferima pH 7.4 i 2.2

Na temperaturama iznad 10°C ravnotežni stepen bubrenja POPGMA postaje niži od PHEMA. Temperature zapreminskog faznog prelaza za homopolimer POPGMA u puferima pH 7.4 i 2.2 iznose 13.4 i 15.2°C. Optičke osobine POPGMA hidrogela takođe zavise od temperature, tako da sa porastom temperature hidrogel gubi transparentnost, poprima beličastu boju i postaje zamućen. Uprkos oštroj promeni ravnotežnog stepena bubrenja POPGMA sa temperaturom, dobijene VPTT vrednosti su ispod sobne temperature, dok se q_e PHEMA ne menja značajno sa temperaturom. Uzimajući ovo u obzir, treba očekivati da se promenom sastava P(HEMA/OPGMA) hidrogela, dobijenog kopolimerizacijom OPGMA i HEMA, može kontrolisati njegovo reagovanje na promenu temperature. Opadanje sadržaja OPGMA, tj. porast udela HEMA u sastavu hidrogela, trebalo bi da prati pomeranje VPTT ka višim temperaturama, kao posledica veće hidrofilnosti HEMA u poređenju sa POPGMA na višim temperaturama.

Ravnotežni stepeni bubrenja u funkciji temperature P(HEMA/OPGMA) kopolimernih hidrogelova različitog sastava, predstavljeni na slici 3.25, iskorišćena su za određivanje njihovih VPTT vrednosti.

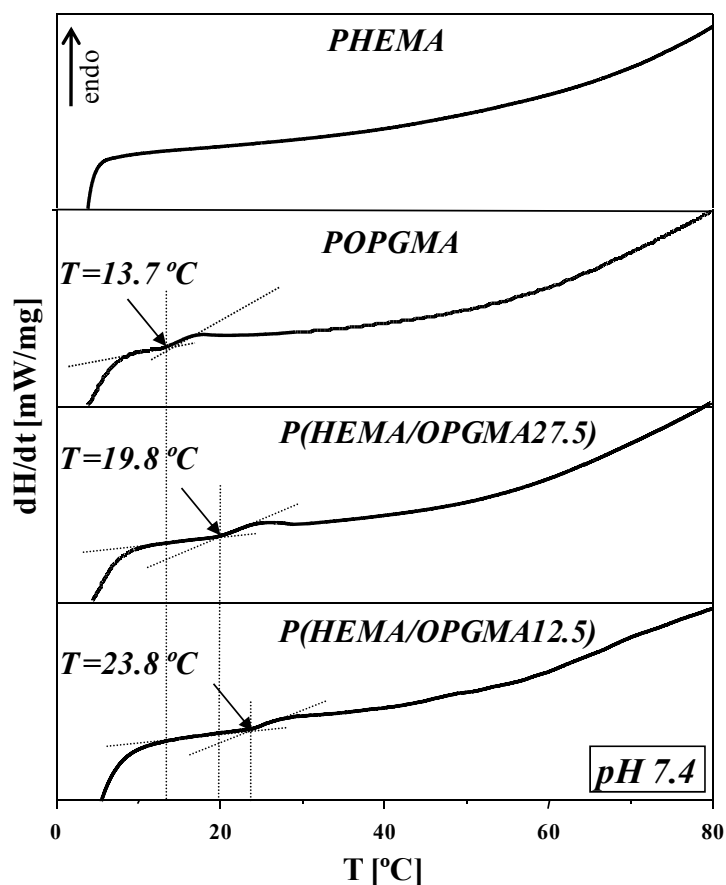


Slika 3.25 Zavisnost ravnotežnog stepena bubrenja (q_e) $P(HEMA/OPGMA)$ hidrogelova od temperature u puferu pH 7.4

Rezultati pokazuju da VPTT vrednosti $P(HEMA/OPGMA)$ hidrogelova jako zavise od njihovog sastava. Očigledno je da opadanje molarnog udela OPGMA tj. porast udela HEMA, u kopolimernom $P(HEMA/OPGMA)$ hidrogelu vodi do postepenog porasta VPTT ka višim temperaturama. Smanjenjem udela OPGMA sa 50 na 6 mol%, VPTT raste sa 16.2 na 25°C. Na ovaj način VPTT vrednosti pomerene su sa

15°C, za POPGMA homopolimer, do sobne temperature za P(HEMA/OPGMA6). Međutim, jasno se uočava opadanje oštrote VPTT prelaza sa opadanjem sadržaja OPGMA, tako da je željeni pomak VPTT ka višim temperaturama praćen opadanjem temperaturnog odziva P(HEMA/OPGMA) kopolimernih hidrogelova.

Promenu VPTT vrednosti P(HEMA/OPGMA) hidrogelova moguće je pratiti i diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC) [52, 54]. DSC termogrami homopolimera PHEMA i POPGMA, kao i P(HEMA/OPGMA) kopolimera sa 27.5 i 12.5 mol% OPGMA, u režimu grejanja, u opsegu temperature od 5 do 80°C, prikazani su na slici 3.26.

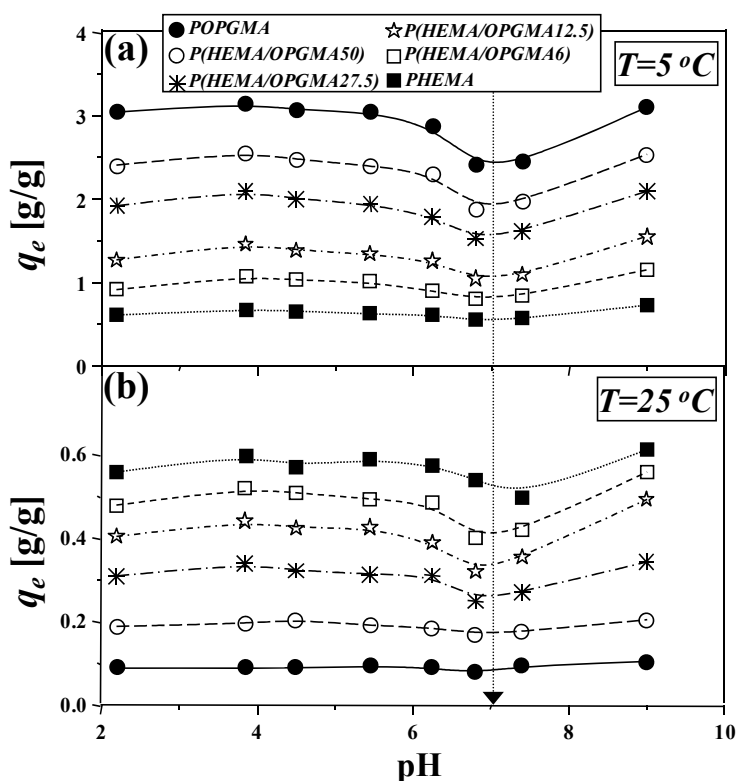


Slika 3.26 DCS krive PHEMA i POPGMA homopolimernih i P(HEMA/OPGMA) kopolimernih hidrogelova

Kod hidrogelova na bazi OPGMA tokom grejanja dolazi do pojave širokog endotermnog „pika“, ukazujući da je hidrogel tokom grejanja pretrpeo kolaps, koji dovodi do njegovog skupljanja i oslobađanja vode. Temperatura pojave endotermnog

„pika“ definisana je kao VPTT. Kao što je i očekivano kod homopolimernog PHEMA hidrogela ne doalzi do pojave „pika“, što dodatno potvrđuje njegovu inertnost na promenu temperature, uočenu u analizi bubrenja. Pojava endotermnog „pika“ za POPGMA hidrogel uočena je na 13.7°C i u dobrom je slaganju sa VPTT od 13.4°C dobijenoj iz rezultata bubrenja. Iz P(HEMA/OPGMA) termograma je potvrđeno da opadanje molarnog udela OPGMA u kopolimernom hidrogelu dovodi do značajnog pomeraja VPTT ka višim temperaturama. Tako dobijene VPTT vrednosti za P(HEMA/OPGMA27.5) i P(HEMA/OPGMA12.5) hidrogel iznose 19.8 i 23.8°C , i u dobrom su slaganju sa vrednostima dobijenim iz rezultata bubrenja.

Uprkos činjenici da OPGMA monomer ne poseduje pH reagujuće grupe, razlike u profilima apsorpcije i LCST vrednostima sa promenom pH su prisutne (slika 3.23). Stoga treba očekivati da i hidrogelovi na bazi OPGMA, pored temperaturnog odziva, pokažu promene u osobinama bubrenja i VPTT vrednostima u različitim puferkim rastvorima.

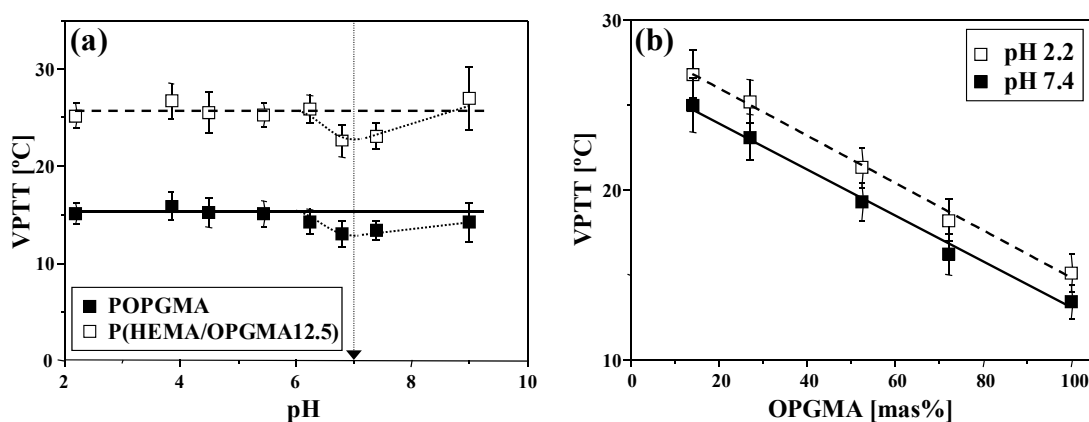


Slika 3.27 Zavisnost ravnotežnih stepena bubrenja (q_e) PHEMA, POPGMA i P(HEMA/OPGMA) hidrogelova od pH okolnog fluida, na 5 i 25°C

Analiza bubrenja POPGMA homopolimernog hidrogela je ovo i potvrdila (slika 3.24). Uočen je porast VPTT sa 13.4 na 15.2°C, pri padu pH sa 7.4 na 2.2. VPTT vrednosti hidrogelova na bazi OPGMA su u kiselim i baznim sredinama 2-3°C više nego u neutralnoj, usled jače interakcije OPGMA bočnih lanaca sa hidroksidnim jonima ili hidronijum protonima nego sa vodom [197, 210].

Zavisnost ravnotežnih stepena bubrenja homopolimernih PHEMA i POPGMA i kopolimernih P(HEMA/OPGMA) hidrogelova od pH okolnog fluida, na 5 i 25°C (ispod i iznad VPTT), prikazana je na slici 3.27. Kod POPGMA i P(HEMA/OPGMA) hidrogelova sa većim udelom OPGMA na temperaturi ispod VPTT (5°C) jasno je uočljiv pad q_e u okolini pH 7 i oporavak na nižim/višim pH. Ista zavisnost uočena je i na 25°C (iznad VPTT), ali su usled izraženije hidrofobnosti OPGMA bočnih lanaca i nižeg ravnotežnog stepena bubrenja na ovoj temperaturi promene manje izražene.

Radi bolje preglednosti uočenih efekata VPTT vrednosti dobijene iz analize bubrenja grafički su predstavljene na slici 3.28 u funkciji pH puferских rastvora i masenog udela OPGMA u kopolimernom P(HEMA/OPGMA) hidrogelu.

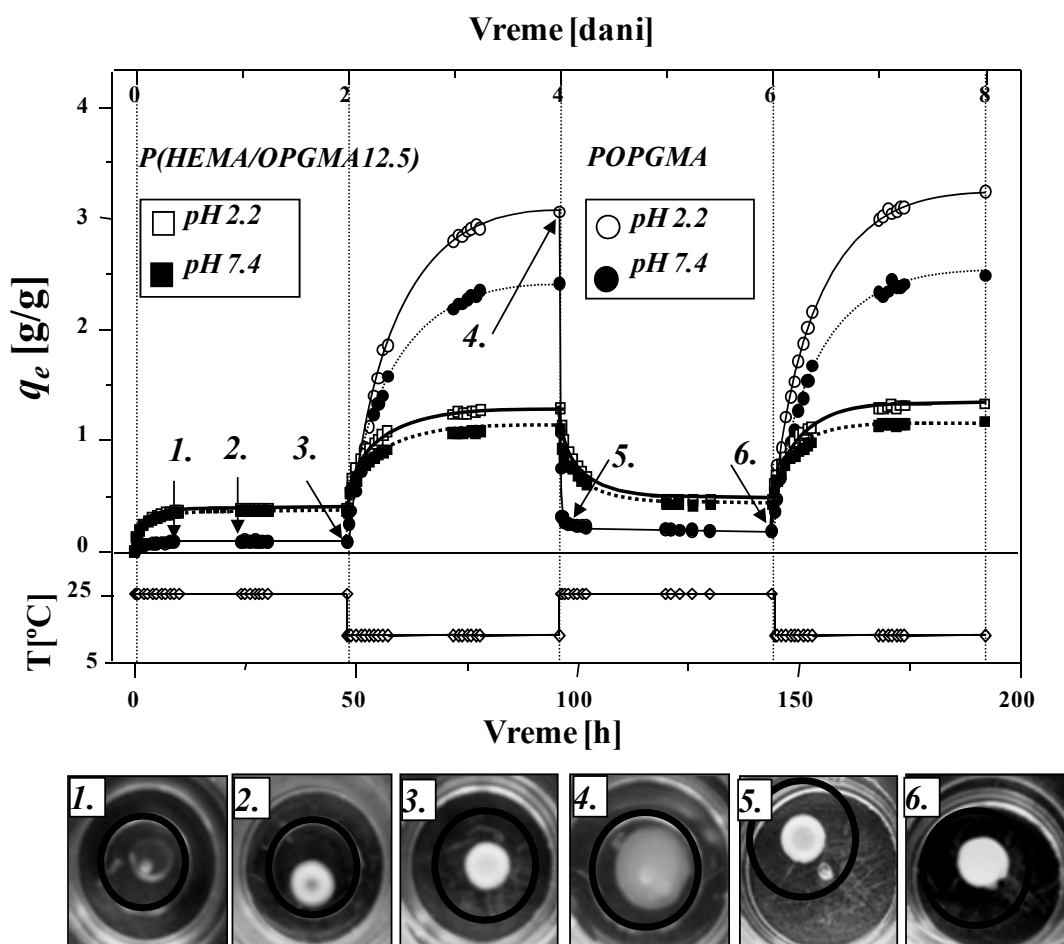


Slika 3.28 Zavisnost temperature zapreminskog faznog prelaza (VPTT) (a) POPGMA i P(HEMA/OPGMA12.5) hidrogelova od pH vrednosti sredine i (b) od masenog udela OPGMA u P(HEMA/OPGMA) hidrogelu na dve pH vrednosti

Očigledno je da P(HEMA/OPGMA) hidrogelovi prate jednostavno pravilo u temperaturnom odzivu pokazujući linearan porast VPTT sa opadanjem masenog udela OPGMA u kopolimernom hidrogelu, što omogućava kontrolisanje VPTT hidrogela kontrolom odnosa sadržaja monomera u njemu (slika 3.28b). Uprkos činjenici da

uočena linearnost nije uslovljena pH vrednošću, primećena je razlika od oko 2°C između vrednosti dobijenih za pH 2.2 i 7.4. Slična linearna zavisnost LCST i udela monomera uočena je i u slučaju nekih linernih kopolimera [35]. Svi rezultati pokazuju da novi P(HEMA/OPGMA) kopolimerni hidrogelovi imaju široku raznovrsnost u osobinama bubrenja koje su znatno uslovljene njihovim sastavom.

Reverzibilnost procesa bubrenje-skupljanje hidrogelova koji reaguju na stimulanse iz okolne sredine od značaja je iz ugla praktične primene. Proces bubrenje-skupljanje praćen je za POPGMA i P(HEMA/OPGMA12.5) hidrogelove, na dve pH vrednosti (2.2 i 7.4) na temperaturama 5 (ispod VPTT) i 25°C (iznad VPTT), u periodu od dva dana po ciklusu, i ukupnom trajanju od osam dana, a dobijeni rezultati predstavljeni su na slici 3.29.



Slika 3.29 Kinetika procesa bubrenje-skupljanje homopolimernog POPGMA i kopolimernog P(HEMA/OPGMA12.5) hidrogela između 5 i 25 °C na pH 2.2 i 7.4.

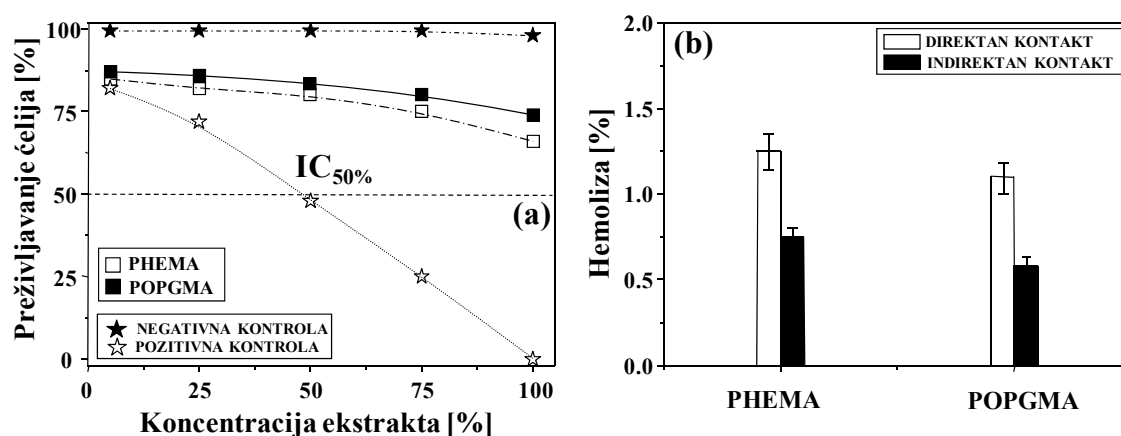
Digitalne fotografije POPGMA hidrogela u različitim fazama procesa

Kserogel je potapan u puferski rastvor (pH 2.2 ili 7.4) na temperaturi 25°C u periodu od dva dana, koja su bila dovoljna za dostizanje ravnotežnog stepena bubrenja. Nakon ovog perioda hidrogel je vađen iz datog puferskog rastvora, brisam filter papirom, kako bi se uklonio zaostali višak pufera na površini, a zatim meren i na osnovu promene mase računat je ravnotežni stepen bubrenja. Nakon toga je prebacivan u rastvor iste pH, ali na temperaturi od 5°C. Postupak određivanja ravnotežnog stepena bubrenja ponovljen je i na ovoj temperaturi. Kako bi se ispitala reverzibilnost procesa bubrenje-skupljanje hidrogelovi su podvrgnuti još po jednom ciklusu bubrenja na temperaturama 25 i 5°C.

Kod oba hidrogela uočena je dobra reverzibilnost procesa bubrenja i skupljanja sa promenom temperatura unutar dva ciklusa. Nema značajne razlike u dinamici bubrenja uprkos činjenici da je stepen bubrenja na pH 2.2 viši u odnosu na pH 7.4. Primećeno je i da optičke osobine hidrogelova zavise od temperature i molarnog odnosa monomera u njima. Sa porastom molarnog udela OPGMA i na višim temperaturama hidrogelovi postaju netransparentni i mlečno beli, dok su na nižim temperaturama blago zamućeni, što se može videti na fotografijama POPGMA hidrogela datim na slici 3.29. Kserogel je staklasto proziran. Šest sati nakon potapanja u pufer pH 2.2, faza 1, disk je još uvek transparentan. Dan nakon početka bubrenja, faza 2, disk poprima mlečno belu boju, karakterističnu za uzorke na temperaturama iznad VPTT [223]. Nakon dodatnog bubrenja na 5°C uočen je veliki porast veličine diska i q_e , što je i očekivano za temperature ispod VPTT (faza 4), uzorak gubi mlečnu belinu, ali je i dalje zamućen. Njegovo ponovno izlaganje temperaturi od 25°C (II ciklus) dovodi do naglog, gotovo trenutnog, opadanja veličine uzorka i q_e , i do ponovnog porasta zamućenja (faza 5). Bez obzira na pH vrednost sredine odziv POPGMA hidrogela bubrenog ispod VPTT (5°C), pa prebačenog na temperaturu iznad VPTT (25°C) bio je vrlo brz. Očigledno je da je za POPGMA proces oslobađanja vode mnogo brži od apsorpcije. Iako POPGMA hidrogel pokazuje gotovo reverzibilan odgovor prilikom procesa bubrenje-skupljanje, sa slike 3.29 se može primetiti da uprkos maloj vrednosti q_e na 25°C postoji razlika između q_e dobijenog bubrenjem kserogela na 25°C ($q_e \approx 0.1$) i q_e nakon bubrenja na 5°C i skupljanja na 25°C ($q_e \approx 0.2$). U prvom slučaju javlja se apsorpcija vode od strane vrlo hidrofobnog kserogela, a u drugom slučaju dolazi do istiskanja vode iz hidrogela sa velikom količinom početno apsorbirane vode. Sprečavanje prodiranja vode u prvom

slučaju i zarobljena voda koju je teško izbaciti iz hidrogela u drugom slučaju, pravi ovu malu, ali uočljivu razliku, koja se smanjuje opadanjem debljine i porastom površine uzorka. Isti trend procesa bubrenje-skupljanje uočen je kod P(HEMA/OPGMA12.5) hidrogela, samo sa manjim razlikama u q_e i sporijem odzivu na promene u okruženju, kao posledica prisustva HEMA jedinica.

U cilju ispitivanja mogućnosti potencijalne primene hidrogelova na bazi OPGMA kao biomaterijala, izvedena je *in vitro* analiza biokompatibilnosti, preko testa citotoksičnosti i hemolitičke aktivnosti, i dato je relativno poređenje rezultata homopolimernog POPGMA sa PHEMA hidrogelom, dobijenim pri istim uslovima sinteze. Rezultati su predstavljeni na slici 3.30.



Slika 3.30 (a) Preživljavanje ćelija kao funkcija ekstrakta i (b) hemolitička aktivnost PHEMA i POPGMA homopolimernih hidrogelova

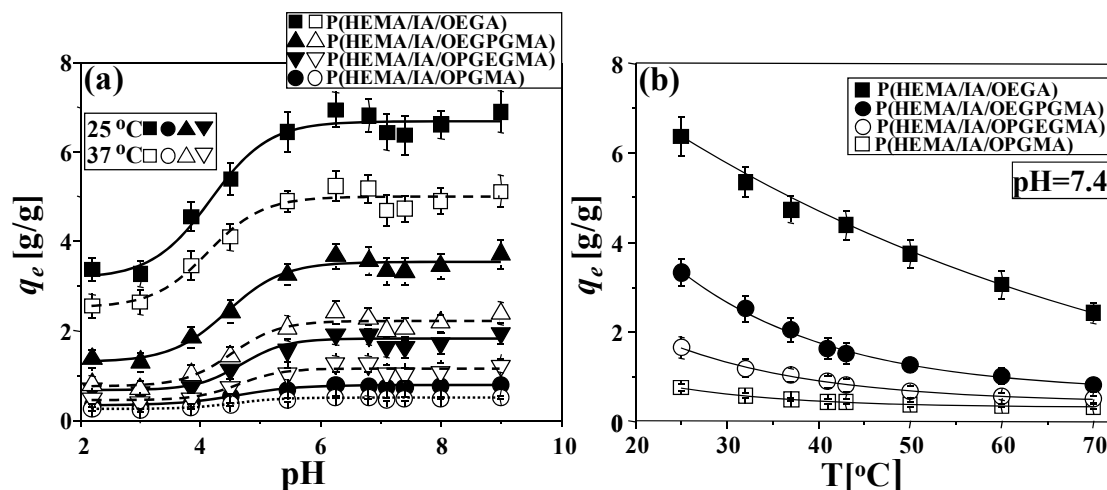
Kako je preživljavanje ćelija na POPGMA hidrogelu veće od 50%, ovaj hidrogel se ne smatra citotoksičnim [98, 191] i u poređenju sa PHEMA hidrogelom pokazuje nešto nižu citotoksičnost. Test hemolitičke aktivnosti POPGMA hidrogela pokazao je srednju vrednost hemolize manju od 1.2% u direktnom kontaktu i manju od 0.7% u indirektnom kontaktu, što POPGMA hidrogel čini nehemolitičnim.

3.5 Hidrogelovi na bazi 2-hidroksietil metakrilata, itakonske kiseline i oligo(alkilen glikol) (met)akrilata P(HEMA/IA/OAG(M)A)

Nova klasa kopolimernih P(HEMA/IA/OAG(M)A) hidrogelova na bazi 2-hidroksietil metakrilata (HEMA), itakonske kiseline (IA) i četiri oligo(alkilen glikol) (met)akrilata (OAG(M)A), i to oligo(etilen glikol) akrilata (OEGA), oligo(etilen glikol₆-propilen glikol₃) metakrilata (OEGPGMA), oligo(etilen glikol₃-propilen glikol₆) metakrilata (OPGEGMA) i oligo(propilen glikol) metakrilata (OPGMA), sintetisane je kako bi se ispitaio uticaj različitih OAG(M)A komponenti, sa etilen glikolnim (EG) i propilen glikolnim (PG) visećim lancima različitih dužina. Udeo IA u hidrogelu iznosio je 2.5 mol%, a OAG(M)A 27.5 mol%.

Izvedena je analiza bubrenja u širokom opsegu pH (2.2-9.0) i temperature (25-70°C), a dobijeni rezultati prikazani su na slici 3.31. Veća hidrofilnost EG lanaca u odnosu na PG, uslovljava veće ravnotežne stepene bubrenja uzoraka sa većim sadržajem EG jedinica. Hidrogel sa čistim EG jedinicama pokazao je za red veličine veći q_e od onog dobijenog za hidrogel sa čistim PG jedinicama. Stepene bubrenja hidrogelova sa mešanim EG i PG jedinicama nalaze se između ovih krajnjih vrednosti. Kod svih hidrogelova prisustvo IA obezbeđuje reagovanje na promenu pH i porast stepena bubrenja na pH vrednostim iznad prve konstante disocijacije IA ($pK_a = 3.85$). Maksimalan q_e dostignut je na pH 6, nakon kompletne disocijacije kiselinskih grupa u IA. Pored IA, pH osetljivosti hidrogelova u okolini pH 7 doprinosi i prisustvo OAG(M)A jedinica. Mali pad i ponovni porast u q_e na pH 7.4 je posledica činjenice da su u neutralnoj sredini, interakcije između alkilen glikolnih lanaca i hidroksidnih jona ili hidronijum protona nešto jače nego sa vodom [210].

Prisustvo OAG(M)A komponenti obezbeđuje i temperaturni odziv stepena bubrenja kopolimernih P(HEMA/IA/OAG(M)A) hidrogelova (slika 3.31b). Uočeno je da sa porastom temperature dolazi do opadanja q_e , tj. pojave negativnog temperaturnog odziva, što se može objasniti na sledeći način. Na nižim temperaturama, u interakciji sa vodom dolazi do formiranja velikog broja vodoničnih veza u hidrogelu. Zbog značajno niže slobodne energije mešanja na nižim temperaturama hidrogelovi više bubre.



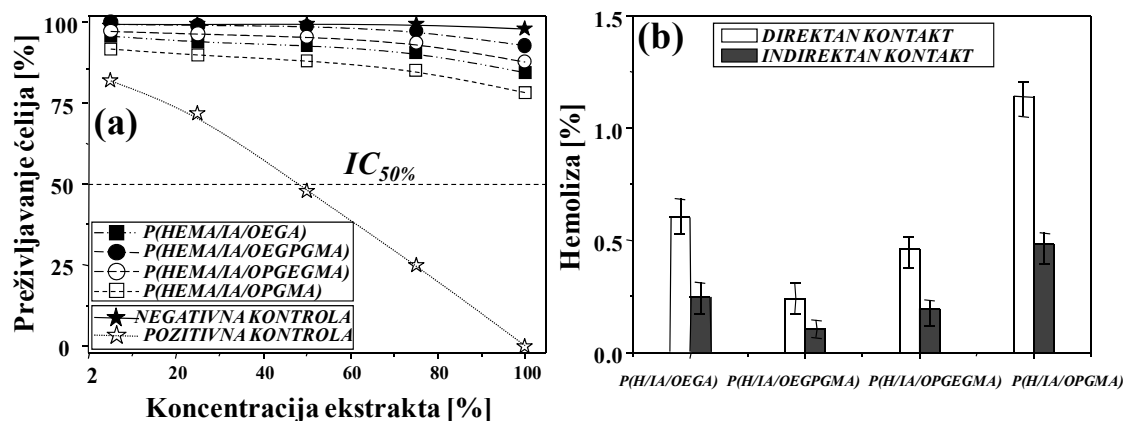
Slika 3.31 Ravnotežni stepeni bubrenja P(HEMA/IA/OAG(M)A) hidrogelova u funkciji (a) pH vrednosti sredine na 25 i 37 °C i (b) temperature u puferu pH 7.4

Na višim temperaturama vodonične veze slabe, sistem teži da minimizira kontakt između vode i hidrofobnih grupa, a interakcije među hidrofobnim grupama rastu. Vezani fluid postaje slobodan, što vodi do opadanja q_e i pojave negativnog temperaturnog odziva [116, 224]. Najveći pad u stepenu bubrenja sa porastom temperature uočen je kod hidrogela sa čistim EG jedinicama, a kako sadržaj EG komponenti u hidrogelu opada i temperaturni odziv postaje manje izražena u ovom intervalu temperature. Prikazani rezultati ukazuju da je bubrenje P(HEMA/IA/OAG(M)A) hidrogelova značajno uslovljeno tipom oligo(alkilen glikolne) komponente prisutne u hidrogelu.

Uticaj tipa OAG(M)A komponente koja ulazi u sastav P(HEMA/IA/OAG(M)A) hidrogelova na njihovu biokompatibilnost praćen je preko *in vitro* testa citotoksičnosti i hemolitičke aktivnosti, a rezultati su predstavljeni na slici 3.32. Preživljavanje ćelija za sve ispitivane hidrogelove mnogo je viša od 50%, tako da se P(HEMA/IA/OAG(M)A) hidrogelovi ne smatraju citotoksičnim, s tim što hidrogelovi sa mešanim EG i PG jedinicama pokazuju nešto bolje rezultate od hidrogelova sa čistom EG ili PG komponentom.

Srednje vrednosti hemolize ispitivanih hidrogelova manje su od 1.2% u metodi direktnog kontakta i 0.6% u metodi indirektnog kontakta, tako da se ne smatraju hemolitičnim. Najniže vrednosti pokazao je hidrogel P(HEMA/IA/OEGPGMA) koji

sadrži šest EG i tri PG jedinice, zatim sledi hidrogel sa šest PG i tri EG jedinica, dok je najlošije rezultate pokazao hidrogel sa čistim PG jedinicama.



Slika 3.32 (a) Preživljavanje ćelija kao funkcija koncentracije ekstrakta i (b) hemolitička aktivnost $P(HEMA/IA/OAG(M)A)$ hidrogelova

Iz svega navedenog sledi da ugradnja mešanih EG i PG lanaca u strukturu hidrogela dovodi do porasta citokompatibilnosti i hemokompatibilnosti hidrogelova, a samim tim i do porasta njihove ukupne biokompatibilnosti.

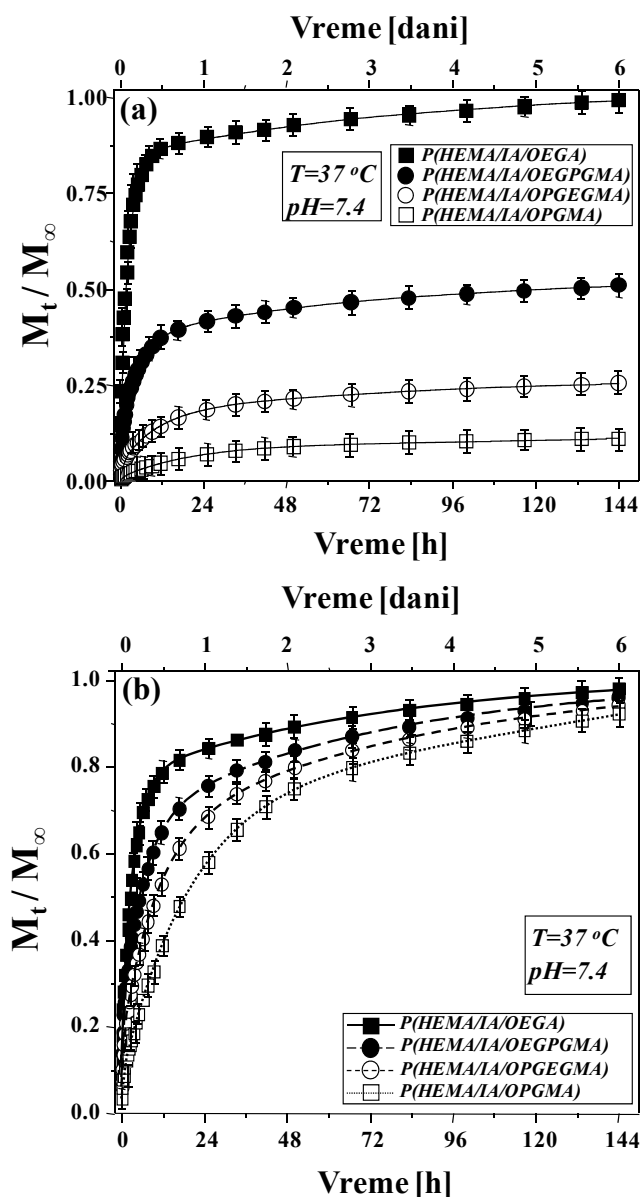
3.5.1 In vitro kontrolisano oslobađanje antibiotika iz polimerne matrice

Kontrolisano oslobađanje antibiotika iz hidrogelova privlači veliku pažnju, jer se na takav način postižu izuzetno dobri efekti u antibakterijskoj terapiji u odnosu na konvencionalne metode primene ove vrste lekova. Klasičan način unošenja ne omogućava postizanje dovoljne i konstantne koncentracije antibiotika na mestu infekcije [225, 226].

Gentamicin sulfat (GS), antibiotik širokog spektra delovanja, je izabran kao model lek za analizu profila oslobađanja iz $P(HEMA/IA/OAG(M)A)$ hidrogelova. Gentamicin, kao aminoglikozidni antibiotik, koristi se u terapiji bakterijskih infekcija izazvanih Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*) i kao i svi aminoglikozidi ne prolazi kroz gastrointestinalni trakt, tako da se primenjuje intravenozno, intramuskularno i transdermalno.

Kinetika *in vitro* procesa oslobađanja GS iz $P(HEMA/IA/OAG(M)A)$ hidrogelova je analizirana preko „rane“ i „kasne“ faze procesa (jednačine (1.2.5.4) i

(1.2.10.1) date u uvodnom delu 1.2.10.1.2). Profili oslobađanja leka u puferu pH 7.4 na temperaturi 37°C, za ceo period oslobađanja predstavljeni su na slici 3.33. Koncentracija GS u rastvoru u kom se odvija oslobađanje u bilo kom trenutku t (c_t) je računata iz odgovarajuće kalibracione krive, iz čega je dalje računata količina leka oslobođena u određenom vremenu (M_t). Oslobađanje leka je praćeno u periodu od šest dana, koji je uobičajen za tretman antibiotikom. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost tri merenja pri istim uslovima.



Slika 3.33 (a) Kumulativni profili *in vitro* oslobađanja gentamicin sulfata (GS) iz $P(\text{HEMA/IA/OAG(M)A})$ hidrogelova i (b) profili oslobađanja gentamicin sulfata (GS) iz $P(\text{HEMA/IA/OAG(M)A})$ hidrogelova normirani na jedinicu

Transport leka i fluida unutar hidrogela tokom procesa oslobađanja predstavlja dinamički i složen proces. Za sve P(HEMA/IA/OAG(M)A) hidrogelove uočen je dugotrajan proces oslobađanja, koji se može podeliti na dve faze. U prvoj, „ranoj“ fazi, dolazi do oslobađanja veće količine leka i pojave „efekta pucanja“. U ovoj fazi brzina migracije je veća, koncentracija leka unutar hidrogela je mnogo veća nego izvan gela i ova razlika u koncentraciji predstavlja pogonska silu za difuziju. U ovoj fazi takođe dolazi do oslobađanja velike količine GS sa površine hidrogela. U „kasnijoj“ fazi javlja se opadanje brzine oslobađanja leka i postepenog dostizanja ravnotežnih vrednosti. Analizom kinetike oslobađanja GS iz P(HEMA/IA/OAG(M)A) hidrogelova određene su vrednosti kinetičke konstante oslobađanja leka (k), difuzionog eksponenta (n), koeficijenta difuzije za „ranu“ (D_e) i „kasnu“ (D_l) fazu procesa oslobađanja leka, kao i vreme za koje se oslobodi polovina apsorbovanog leka ($t_{1/2}$) (tabela 3.5). Vrednosti difuzionog eksponenta, kreću se od 0.38 do 0.41 ukazujući da se proces oslobađanja leka može opisati Fick-ovim mehanizmom transporta i predstavlja sistem oslobađanja kontrolisan difuzijom. Najveća vrednost difuzionog eksponenta dobijena je za P(HEMA/IA/OEGA) hidrogel i kako se broj EG jedinica u hidrogelu smanjuje i vrednost difuzionog eksponenta opada, ukazujući na opadanje pokretljivosti GS u datom hidrogelu.

Table 3.5 Kinetički parametri oslobađanja gentamicin sulfata (GS) iz P(HEMA/IA/OAG(M)A) hidrogelova, u puferu pH 7.4 na temperaturi 37 °C

Hidrogel	k [h ⁻ⁿ]	n	$D_e \times 10^7$ [cm ² /s]	$D_l \times 10^8$ [cm ² /s]	$t_{1/2}$ [h]	$D_e \times 10^7$ [cm ² /s]	GS [%]
P(HEMA/IA/OEGA)	0.34	0.41	2.75±0.15	3.35±0.15	2.6	3.90±0.20	0.99
P(HEMA/IA/OEGPGMA)	0.26	0.40	1.30±0.05	2.80±0.10	5.0	1.50±0.10	0.51
P(HEMA/IA/OPGEGMA)	0.20	0.39	0.60±0.02	2.50±0.10	10.0	0.64±0.02	0.25
P(HEMA/IA/OPGMA)	0.13	0.38	0.32±0.02	2.0±0.10	18.5	0.26±0.02	0.11

Tip oligo(alkilen glikol) (met)akrilatne komponente koja ulazi u sastav P(HEMA/IA/OAG(M)A) hidrogela ima presudnu ulogu na količinu i brzinu oslobađanja leka. Najbrži profil oslobađanja tokom celog intervala pokazuje P(HEMA/IA/OEGA) hidrogel sa čistim EG jedinicama, usled najvišeg stepena bubrenja

i poroznosti. Hidrogelovi koji sadrže mešane EG i PG i čiste PG jedinice u visećim lancima pokazuju postepenije oslobađanje. Vreme potrebno za oslobađanje polovine početne količine leka iz hidrogelova ($t_{1/2}$) kreće se od 2.6 do 18.5 h, dok ukupno vreme oslobađanja od 140 h pruža mogućnost primene ovih hidrogelova za duži terapijski period. Kako je količina oslobođenog GS najniža za P(HEMA/IA/OPGMA) hidrogel, dobijeni relativni odnosi ukupne količine oslobođenog leka, za period od šest dana, među hidrogelovima iznose: P(HEMA/IA/OPGMA)/P(HEMA/IA/OPGEGMA)/P(HEMA/IA/OEGPGMA)/P(HEMA/IA/OEGA) = 1.0/2.3/4.6/9.0.

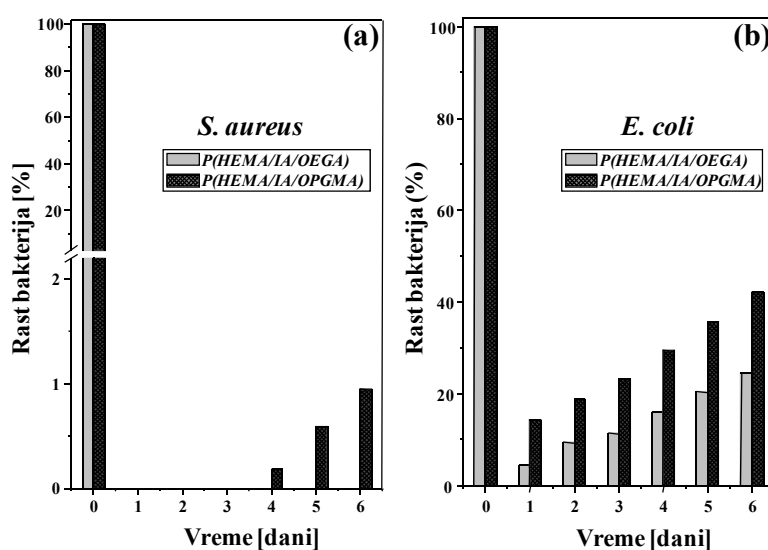
Vrednosti koeficijenta difuzije za „ranu“ i „kasnu“ fazu procesa oslobađanja leka, D_e i D_l , takođe zavise od tipa oligo(alkilen glikol) (met)akrilatne komponente prisutne u kopolimernom hidrogelu. Očigledna je povezanost osobina bubrenja P(HEMA/IA/OAG(M)A) hidrogelova i dinamike oslobađanja leka. Sa opadanjem q_e hidrogela dolazi i do pada u ukupnoj količini oslobođenog leka. Najviše vrednosti D_e i D_l dobijene su za P(HEMA/IA/OEGA), što ukazuje na najveću brzinu oslobađanja leka. Difuzioni koeficijenti ostala tri hidrogela opadaju sa opadanjem udela EG jedinica u strukturi hidrogela (P(HEMA/OEGPGMA), P(HEMA/OPGEGMA) i P(HEMA/OPGMA)).

P(HEMA/IA/OAG(M)A) kopolimerni hidrogelovi su se pokazali kao pogodan sistem za ugradnju aktivnih supstanci i za potencijalnu primenu u sistemima za kontrolisano oslobađanje antibiotika. Ovi hidrogelovi mogu apsorbovati dovoljne količine leka i u isto vreme, usled njihovih dugotrajnih profila oslobađanja, obezbeđuju kontinualno oslobađanje leka na duži period.

3.5.2 Ispitivanje antibakterijske aktivnosti P(HEMA/IA/OAG(M)A) hidrogelova sa apsorbovanim lekom

Kako je gentamicin sulfat antibiotik širokog spektra delovanja na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, ispitivana je i antibakterijska aktivnost P(HEMA/IA/OAG(M)A) hidrogelova sa apsorbovanim GS prema *S.aureus* i *E.coli*, u periodu od šest dana, a rezultati za (P(HEMA/IA/OEGA)) i (P(HEMA/IA/OPGMA)) hidrogelove predstavljeni su na slici 3.34. Poznato je da je minimalna inhibitorska koncentracija (MIC) gentamicina potrebna da uništi *S. aureus* ATCC 25923 0.12-0.50

$\mu\text{g/ml}$, dok za *E. coli* ATCC 25922 iznosi 0.25-1.0 $\mu\text{g/ml}$ [227, 228]. Rezultati pokazuju da je GS izuzetno efikasan u delovanju na *S. aureus*. Porast ćelija *S. aureus* se uočava tek četvrtog dana oslobađanja leka za P(HEMA/IA/OPGMA) hidrogel, dok za P(HEMA/IA/OEGA) ne dolazi do porasta bakterija u periodu od šest dana, tj. P(HEMA/IA/OEGA) hidrogel efikasno sprečava rast kolonija *S. aureus* tokom čitavog perioda oslobađanja. *E. Coli*. je pokazala određeni stepen otpornosti na GS.



Slika 3.34 Antibakterijska aktivnost P(HEMA/IA/OEGA) i P(HEMA/IA/OPGMA) hidrogelova sa apsorbovanim GS kao funkcija rasta bakterija (a) *S. aureus* i (b) *E. Coli* u vremenu

Nakon prvog dana oslobađanja leka dolazi do znatnog pada u populaciji ćelija *E. Coli*, da bi broj kolonija tokom procesa oslobađanja rastao. Kako je koncentracija apsorbovanog GS u oba analizirana hidrogela ista, može se uočiti da je prvog dana rast broja bakterija mnogo sporiji kod P(HEMA/IA/OEGA), nego kod P(HEMA/IA/OPGMA) hidrogela, dok je sledećih dana dinamika rasta slična kod oba hidrogela. Kako je koncentracija GS potrebna da zaustavi rast bakterije *S. aureus* manja nego u slučaju *E. coli*, koncentracija GS koja se oslobađa iz P(HEMA/IA/OAG(M)A) hidrogelova tokom vremena manje efikasno sprečava rast kolonija bakterije *E. Coli*. I u slučaju *S. aureus*., kao i u slučaju *E. Coli* prisustvo EG jedinica u hidrogelu dodatno utiče na efikasnost leka, inhibirajući rast bakterija.

4. Zaključak

.....

Predmet ove doktorske disertacije bio je radijaciona sinteza i karakterizacija kopolimernih hidrogelova na bazi 2-hidroksietil metakrilata (HEMA), itakonske kiseline (IA) i poli(alkilen glikol) (met)akrilata (OAG(M)A), u cilju dobijanja „pametnih“ hidrogelova, koji reaguju na promene pH i temperature u okolnoj sredini. Na osnovu izloženih rezultata ispitivanja ovih sistema izvedeni su zaključci za svaku pojedinačnu grupu sintetisanih hidrogelova.

➤ Kopolimerni hidrogelovi na bazi 2-hidroksietil metakrilata (HEMA), itakonske kiseline (IA) i poli(alkilen glikol) (met)akrilata (OAG(M)A), uspešno su sintetisani radijaciono, primenom gama zračenja iz izvora ^{60}Co . Uočen je visok sadržaj gel faze, iznad 90%, za sve sintetisane hidrogelove, što ukazuje da je radijaciono indukovana polimerizacija efikasan, brz i jeftin način sinteze ovih sistema. Hidrogelovi sintetisani u industrijskom ciklusu, pri brzini zračenja od $\approx 0.5 \text{ kGy/h}$ i ukupnoj apsorbovanoj dozi od 25 kGy, koja ujedno predstavlja i standardnu dozu za sterilizaciju materijala, pokazali su se kao najbolji.

➤ Dodavanjem malog udela itakonske kiseline ($\leq 5 \text{ mol\%}$), kao pH reagujuće komponente, inertnom PHEMA sistemu dobijena je prva grupa P(HEMA/IA) kopolimernih hidrogelova, koja je okarakterisana značajnim odzivom na promenu pH

vrednosti okolne sredine. Na pH vrednostima iznad konstanti disocijacije IA, ravnotežni stepeni bubrenja hidrogelova rastu sa porastom udela IA. Uočene su i dobre morfološke i termalne karakteristike ispitivanih hidrogelova. Visok stepen biokompatibilnosti potvrđen je niskom ćelijskom toksičnošću i hemolitičkom aktivnošću ovih hidrogelova. Prisustvo IA poboljšava biokompatibilnost PHEMA i povećava mogućnosti primene P(HEMA/IA) hidrogelova kao biomaterijala. Test mikrobne penetracije pokazao je da ni *S. aureus*, niti *E. coli* ne prolaze kroz hidrogelnu P(HEMA/IA) oblogu, tako da se mogu smatrati dobrom barijerom protiv mikroba. Rezultati pokazuju da P(HEMA/IA) pH reagujući hidrogelovi imaju veliku mogućnost za medicinsku primenu.

U cilju transdermalne primene, ovi hidrogelovi su iskorišćeni kao matrice za sintezu nanočestica srebra, metodom gama radiolize, pri čemu je dobijena serija Ag/P(HEMA/IA) nanokompozita. UV-Vis spektroskopijom, energijski disperzivnom rentgenskom spektroskopijom i difrakcijom X zraka potvrđeno je prisustvo nanočestica srebra, dok je SEM analizom potvrđeno da su nanočestice relativno uniformno dispergovane unutar P(HEMA/IA) hidrogelova. Visoka antibakterijska (*E.coli* i *S. aureus*) i anitifungalna (*C. albicans*) efikasnost Ag/P(HEMA/IA) nanokompozita dobijena je čak i za niske koncentracije srebra, što pruža odlične mogućnosti primene u polju medicine, posebno kao prevlaka prilikom tretiranja kože, rana i opekotina.

➤ Inkorporacijom temperaturno reagujućeg oligo(etilen glikol) akrilata (OEGA) u P(HEMA/IA) hidrogel dobijeni su terpolimerni P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelovi sa istovremenim reagovanjem na dva stimulansa, pH i temperaturu. Velika hidrofilnost OEGA lanaca diktira veći ravnotežni stepen bubrenja ove klase hidrogelova u odnosu na P(HEMA/IA) hidrogelove. Disocijacija karboksilnih grupa iz IA na višim pH vrednostima obezbeđuje visoki odziv na promenu pH i veliki porast u stepenu bubrenja, dok usled prisustva OEGA lanaca sa porastom temperature stepen bubrenja P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelova opada. Parametri mreže ovih hidrogelova takođe zavise od molarnog udela monomera u njima. Srednja molekulska masa između čvorova mreže i veličina pora rastu, dok efektivna gustina umreženja i parametar interakcije polimer-rastvarač opadaju sa porastom sadržaja IA i OEGA. Veličina pora raste sa sadržajem IA i OEGA na sličan način kao srednja molekulska masa između čvorova mreže i potvrđuje rezultate dobijene iz analize bubrenja i SEM rezultata. Porast ovih

veličina je posledica činjenice da je hidrofilna interakcija između vode i IA i OEGA jedinica mnogo jača nego između vode i HEMA jedinica. P(HEMA/IA/OEGA) hidrogelovi su pokazali zadovoljavajuću biokompatibilnost, favorizujući dodatak IA i/ili OEGA komponenti, a test penetracije mikroba pokazao je da P(HEMA/IA/OEGA) prevlake predstavljaju dobru barijeru za mikrobe. Na osnovu izloženih rezultata, očigledno je da promene u sastavu dobijenih hidrogelova mogu dati široku raznovrsnost njihovih osobina, a sprežanje pH i temperaturnog odziva daje „pametne“ kopolimerne materijale pogodne za mnoge medicinske primene.

➤ Hidrogelovi na bazi oligo(propilen glikol) metakrilata (OPGMA), za razliku od hidrogelova na bazi OEG visećih lanaca, okarakterisani su jasno definisanom temperaturom zapreminskog faznog prelaza (VPTT). Uprkos zadovoljavajućem reagovanju na promenu temperature i promenama u ravnotežnom stepenu bubrenja homopolimernog POPGMA hidrogela, dobijena VPTT je dosta ispod sobne temperature ($\approx 15^{\circ}\text{C}$). Radikalnom kopolimerizacijom OPGMA i HEMA monomera, VPTT vrednosti P(HEMA/OPGMA) hidrogelova podignute su iznad sobne, čime je povećana mogućnost primene ovih hidrogelova kao biomaterijala. Uočeno je da P(HEMA/OPGMA) hidrogelovi prate jednostavno pravilo u temperaturnom ponašanju, pokazujući linearni porast VPTT sa opadanjem masenog udela OPGMA u njima, što je potvrđeno analizom bubrenja i DSC merenjima.

➤ Uticaj različitih tipova oligo(alkilen glikol) (met)akrilata (OAG(M)A), na bazi etilen glikolnih (EG) i/ili propilen glikolnih (PG) visećih lanaca različite dužine, ispitivan je kod P(HEMA/IA/OAG(M)A) kopolimernih hidrogelova na bazi 2-hidroksietil metakrilata, itakonske kiseline i poli(alkilen glikol) (met)akrilata. Analiza bubrenja pokazala je da osobine hidrogelova značajno zavise od tipa OAG(M)A. Hidrogelovi sa EG visećim lancima pokazuju veći stepen bubrenja usled veće hidrofilnosti EG jedinica u odnosu na PG, u ispitivanom opsegu temperature. P(HEMA/IA/OAG(M)A) hidrogelovi su pokazali i zadovoljavajuću citotoksičnost i hemolitičku aktivnost. Hidrogelovi sa mešanim EG i PG jedinicama pokazuju nešto više stepene biokompatibilnosti u odnosu na hidrogelove sa čistim EG i PG lancima. Analiza oslobađanja aktivnih supstanci takođe je uslovljena sastavom P(HEMA/IA/OAG(M)A)

hidrogela. Kao model lek korišćen je gentamicin sulfat (GS). Brzina i količina oslobođenog leka raste/opada sa udelom EG/PG jedinica u P(HEMA/IA/OAG(M)A) hidrogelu. Sposobnost ovih hidrogelova da oslobađaju lek kontrolisanom brzinom, koja se može regulisati izborom tipa OAG(M)A, čini ih pogodnim matricama u sistemima za kontrolisano oslobađanje lekova. P(HEMA/IA/OAG(M)A) hidrogelovi sa apsorbovanim lekom (GS) pokazali su i zadovoljavajuću antibakterijsku aktivnost u periodu od šest dana, koji je karakterističan za tretman antibioticima.

➤ Na osnovu svih izloženih rezultata jasno je uočljivo da se dodavanje pH (IA) i temperaturno (OAG(M)A) reagujućih komponenti u inertan PHEMA sistem može dobiti širok spektar „pametnih“ hidrogelova. Radijaciono indukovana sinteza se pokazala kao dobar način za dobijanje ovih hidrogelova.

Pored odziva anjonskog tipa na promenu pH vrednosti okolne sredine, ispitivani hidrogelovi su okarakterisani velikim rasponom u ravnotežnom stepenu bubrenja i reagovanjem na promenu temperature, koja u najvećoj meri zavisi od tipa OAG(M)A komponente koja ulazi u sastav hidrogela. Veća hidrofilnost EG lanaca uslovljava veće stepene bubrenja hidrogelova sa većim udelom ove komponente. Svi ispitivani hidrogelovi pokazuju visok stepen biokompatibilnosti. Potvrđeno je da se mogu koristiti za sintezu nanočestičnih sistema, a mogućnost oslobađanja aktivnih supstanci iz ovih hidrogelova ukazuje na njihovu potencijalnu primenu kao nosača lekova.

Literatura

- [1] S. Ramakrishna, J. Mayer, E. Wintermantel, K.W. Leong, Biomedical applications of polymer-composite materials: a review, *Compos Sci Technol*, 61 (2001) 1189-1224.
- [2] R. Fazel-Rezai, Biomedical engineering - Frontiers and challenges, in: A. Patel, K. Mequanint (Eds.), *Hydrogel Biomaterials*, InTech, 2011.
- [3] A. Mayes, <http://dspace.mit.edu/handle/1721.1/34966#files-area>, Materials for biomedical applications, 2004.
- [4] D. Raković, D. Uskoković, Biomaterijali, Društvo tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti, Društvo za istraživanje materijala, Beograd, 2010.
- [5] O. Wichterle, D. Lim, Hydrophilic gels for biological use, *Nature*, 185 (1960) 117-118.
- [6] N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa, Hydrogels in pharmaceutical formulations, *Eur J Pharm Biopharm*, 50 (2000) 27-46.
- [7] R. Zarzycki, Z. Modrzejewska, K. Nawrotek, Drug release from hydrogel matrices, *Ecol Chem Eng S*, 17 (2010) 9-28.
- [8] K. Deligkaris, T.S. Tadele, W. Olthuis, A. van den Berg, Hydrogel-based devices for biomedical applications, *Sensor Actuat B-Chem*, 147 (2010) 765-774.
- [9] K. Pal, A.K. Banthia, D.K. Majumdar, Polymeric hydrogels: Characterization and biomedical applications, *Des Monomers Polym*, 12 (2009) 197-220.
- [10] J.M. Rosiak, P. Ulanski, Synthesis of hydrogels by irradiation of polymers in aqueous solution, *Radiat Phys Chem*, 55 (1999) 139-151.
- [11] Y. Osada, J.P. Gong, Y. Tanaka, Polymer gels, *J Macromol Sci-Pol R*, C44 (2004) 87-112.
- [12] W.E. Hennink, C.F. van Nostrum, Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Adv Drug Deliver Rev*, 54 (2002) 13-36.
- [13] T.R. Hoare, D.S. Kohane, Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges, *Polymer*, 49 (2008) 1993-2007.
- [14] Y. Qiu, K. Park, Environment-sensitive hydrogels for drug delivery, *Adv Drug Deliver Rev*, 53 (2001) 321-339.
- [15] P. Gupta, K. Vermani, S. Garg, Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery, *Drug Discov Today*, 7 (2002) 569-579.
- [16] E.S. Gil, S.M. Hudson, Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates, *Prog Polym Sci*, 29 (2004) 1173-1222.
- [17] J. Kopecek, Hydrogel biomaterials: A smart future?, *Biomaterials*, 28 (2007) 5185-5192.
- [18] B.L. Wang, S. Mukataka, E. Kokufuta, M. Kodama, The influence of polymer concentration on the radiation-chemical yield of intermolecular crosslinking of poly(vinyl alcohol) by gamma-rays in deoxygenated aqueous solution, *Radiat Phys Chem*, 59 (2000) 91-95.
- [19] F.M. Herman, *Encyclopedia of polymer science and technology*, John Wiley & Sons, New York, 2004.
- [20] J.M. Rosiak, F. Yoshii, Hydrogels and their medical applications, *Nucl Instrum Meth B*, 151 (1999) 56-64.

- [21] C. Uzun, M. Hassnisaber, M. Sen, O. Guven, Enhancement and control of cross-linking of dimethylaminoethyl methacrylate irradiated at low dose rate in the presence of ethylene glycol dimethacrylate, *Nucl Instrum Meth B*, 208 (2003) 242-246.
- [22] M. Sen, M. Sari, Radiation synthesis and characterization of poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate-co-N-vinyl 2-pyrrolidone) hydrogels, *Eur Polym J*, 41 (2005) 1304-1314.
- [23] J.W.T. Spinks, R.J. Woods, *An introduction to radiation chemistry*, John Wiley & Sons, New York, 1976.
- [24] C. von Sonntag, *Free-radical-induced DNA damage and its repair: A chemical perspective*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2006.
- [25] I.G. Draganić, Z.D. Draganić, *The radiation chemistry of water*, Academic Press, New York, 1971.
- [26] L.T. Bugaenko, M.G. Kuzmin, L.S. Polak, *Chemistry of high energies*, Khimiya, Moscow, 1988.
- [27] J.M. Rosiak, P. Ulanski, L.A. Pajewski, F. Yoshii, K. Makuuchi, Radiation formation of hydrogels for biomedical purposes. Some remarks and comments, *Radiat Phys Chem*, 46 (1995) 161-168.
- [28] T. Schmidt, C. Querner, K.F. Arndt, Characterization methods for radiation crosslinked poly(vinyl methyl ether) hydrogels, *Nucl Instrum Meth B*, 208 (2003) 331-335.
- [29] IAEA-TECDOC-1465, *Radiation synthesis of stimuli-responsive membranes, hydrogels and adsorbents for separation purposes*; Final report of a coordinated research project 2000-2004, Vienna, 2005.
- [30] D. Irvine, <http://www.myoops.org/cocw/mit/NR/rdonlyres/Biological-Engineering/20-462JSpring-2003/9EB CD14A-B84C-4F42-844A-828AD4E7B5C9/0/be462lect01>.
- [31] D. Irvine, *Molecular principles of biomaterials*, 2003.
- [32] C.C. Lin, A.T. Metters, Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling, *Adv Drug Deliver Rev*, 58 (2006) 1379-1408.
- [33] F. Ganji, E. Vasheghani-Farahani, Hydrogels in controlled drug delivery systems, *Iran Polym J*, 18 (2009) 63-88.
- [34] J.S. Park, K. Kataoka, Precise control of lower critical solution temperature of thermosensitive poly(2-isopropyl-2-oxazoline) via gradient copolymerization with 2-ethyl-2-oxazoline as a hydrophilic comonomer, *Macromolecules*, 39 (2006) 6622-6630.
- [35] Y. Qiu, K. Park, Environment-sensitive hydrogels for drug delivery, *Adv Drug Deliver Rev*, 53 (2001) 321-339.
- [36] D. Fournier, R. Hoogenboom, H.M.L. Thijs, R.M. Paulus, U.S. Schubert, Tunable pH- and temperature-sensitive copolymer libraries by reversible addition-fragmentation chain transfer copolymerizations of methacrylates, *Macromolecules*, 40 (2007) 915-920.
- [37] H.G. Schild, Poly (N-isopropylacrylamide) - Experiment, theory and application, *Prog Polym Sci*, 17 (1992) 163-249.
- [38] M.A. Kelland, Tuning the thermoresponsive properties of hyperbranched poly(ester amide)s based on diisopropanolamine and cyclic dicarboxylic anhydrides, *J Appl Polym Sci*, 121 (2011) 2282-2290.
- [39] H.D. Chirra, J.Z. Hilt, Nanoscale characterization of the equilibrium and kinetic response of hydrogel structures, *Langmuir*, 26 (2010) 11249-11257.
- [40] D. Roy, W.L.A. Brooks, B.S. Sumerlin, New directions in thermoresponsive polymers, *Chem Soc Rev*, 42 (2013) 7214-7243.

- [40] C.D.H. Alarcon, S. Pennadam, C. Alexander, Stimuli responsive polymers for biomedical applications, *Chem Soc Rev*, 34 (2005) 276-285.
- [41] A.C. Colin, S.M. Cancho, R.G. Rubio, A. Compostizo, Equation of state of aqueous polymer systems: poly(propylene glycol) plus water, *Phys Chem Chem Phys*, 1 (1999) 319-322.
- [42] S. Fusco, A. Borzacchiello, P.A. Netti, Perspectives on: PEO-PPO-PEO triblock copolymers and their biomedical applications, *J Bioact Compat Pol*, 21 (2006) 149-164.
- [43] R. Kjellander, E. Florin, Water structure and changes in thermal stability of the system poly(ethylene oxide)-water, *J Chem Soc, Faraday Trans*, 77 (1981) 2053-2077.
- [44] M. Constantin, M. Cristea, P. Ascenzi, G. Fundueanu, Lower critical solution temperature versus volume phase transition temperature in thermoresponsive drug delivery systems, *Express Polym Lett*, 5 (2011) 839-848.
- [45] J.E. Almeida, P. Ferreira, P. Alves, A. Lopes, M.H. Gil, Synthesis of a dextran based thermo-sensitive drug delivery system by gamma irradiation, *Int J Biol Macromol*, 61 (2013) 150-155.
- [46] R.X. Zhuo, W. Li, Preparation and characterization of macroporous poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels for the controlled release of proteins, *J Polym Sci Pol Chem*, 41 (2003) 152-159.
- [47] Z.X. Zhao, Z. Li, Q.B. Xia, H.X. Xi, Y.S. Lin, Fast synthesis of temperature-sensitive PNIPAAm hydrogels by microwave irradiation, *Eur Polym J*, 44 (2008) 1217-1224.
- [48] G. Fundueanu, M. Constantin, I. Asmarandei, S. Bucatariu, V. Harabagiu, P. Ascenzi, B.C. Simionescu, Poly(N-isopropylacrylamide-co-hydroxyethylacrylamide) thermosensitive microspheres: The size of microgels dictates the pulsatile release mechanism, *Eur J Pharm Biopharm*, 85 (2013) 614-623.
- [49] J.J. Chen, A.L. Ahmad, B.S. Ooi, Poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) hydrogels for copper ion adsorption: Equilibrium isotherms, kinetic and thermodynamic studies, *J Environ Chem Eng*, 1 (2013) 339-348.
- [50] Y.X. Cao, C. Zhang, W.B. Shen, Z.H. Cheng, L.L. Yu, Q.N. Ping, Poly(N-isopropylacrylamide)-chitosan as thermosensitive in situ gel-forming system for ocular drug delivery, *J Control Release*, 120 (2007) 186-194.
- [51] Z.Y. Qiao, R. Zhang, F.S. Du, D.H. Liang, Z.C. Li, Multi-responsive nanogels containing motifs of ortho ester, oligo(ethylene glycol) and disulfide linkage as carriers of hydrophobic anti-cancer drugs, *J Control Release*, 152 (2011) 57-66.
- [52] J.T. Zhang, R. Bhat, K.D. Jandt, Temperature-sensitive PVA/PNIPAAm semi-IPN hydrogels with enhanced responsive properties, *Acta Biomater*, 5 (2009) 488-497.
- [53] A. Nemethy, K. Solti, L. Kiss, B. Gyarmati, M.A. Deli, E. Csanyi, A. Szilagyi, pH- and temperature-responsive poly(aspartic acid)-l-poly (N-isopropylacrylamide) conetwork hydrogel, *Eur Polym J*, 49 (2013) 2392-2403.
- [54] X.Z. Zhang, Y.Y. Yang, T.S. Chung, K.X. Ma, Preparation and characterization of fast response macroporous poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels, *Langmuir*, 17 (2001) 6094-6099.
- [55] W. Li, A. Zhang, A.D. Schluter, Thermoresponsive dendronized polymers with tunable lower critical solution temperatures, *Chem Commun*, (2008) 5523-5525.
- [56] L.M. Geever, D.M. Devine, M.J.D. Nugent, J.E. Kennedy, J.G. Lyons, A. Hanley, C.L. Higginbotham, Lower critical solution temperature control and swelling behaviour of physically crosslinked thermosensitive copolymers based on N-isopropylacrylamide, *Eur Polym J*, 42 (2006) 2540-2548.

- [57] N.A. Peppas, Y. Huang, M. Torres-Lugo, J.H. Ward, J. Zhang, Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology, *Annu Rev Biomed Eng*, 2 (2000) 9-29.
- [58] P.J. Flory, Principles of polymer chemistry (chapter 11), Cornell University Press, New York 1953.
- [59] S. Dumitriu, Polymeric biomaterials, Second ed., Marcel Dekker, Inc., New York, Basel 2002.
- [60] N.A. Peppas, E.W. Merrill, Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels as swollen elastic networks, *J Appl Polym Sci*, 21 (1977) 1763-1770.
- [61] B.V. Slaughter, S.S. Khurshid, O.Z. Fisher, A. Khademhosseini, N.A. Peppas, Hydrogels in regenerative medicine, *Adv Mater*, 21 (2009) 3307-3329.
- [62] N.A. Peppas, J.Z. Hilt, A. Khademhosseini, R. Langer, Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology, *Adv Mater*, 18 (2006) 1345-1360.
- [63] X. Li, R.B. Jasti, Design of controlled realise drug delivery systems, in: P. Liu, Y. Qiu, T.R. Ju (Eds.), Diffusion-controlled drug delivery systems, McGraw-Hill Companies, Inc., New York, 2006.
- [64] M.P. Mullarney, T.A.P. Seery, R.A. Weiss, Drug diffusion in hydrophobically modified N,N-dimethylacrylamide hydrogels, *Polymer*, 47 (2006) 3845-3855.
- [65] J. Siepmann, N.A. Peppas, Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), *Adv Drug Deliver Rev*, 48 (2001) 139-157.
- [66] B. Singh, R. Bala, N. Chauhan, In vitro release dynamics of model drugs from psyllium and acrylic acid based hydrogels for the use in colon specific drug delivery, *J Mater Sci-Mater M*, 19 (2008) 2771-2780.
- [67] A.S. Hoffman, Hydrogels for biomedical applications, *Adv Drug Deliver Rev*, 54 (2002) 3-12.
- [68] T. Caykara, M. Dogmus, O. Kantoglu, Network structure and swelling-shrinking behaviors of pH-sensitive poly(acrylamide-co-itaconic acid) hydrogels, *J Polym Sci Pol Phys*, 42 (2004) 2586-2594.
- [69] M. Sen, O. Agus, A. Safrany, Controlling of pore size and distribution of PDMAEMA hydrogels prepared by gamma rays, *Radiat Phys Chem*, 76 (2007) 1342-1346.
- [70] C. Rivest, D.W.G. Morrison, B. Ni, J. Rubin, V. Yadav, A. Mahdavi, J.M. Karp, A. Khademhosseini, Microscale hydrogels for medicine and biology: Synthesis, characteristics and applications, *J Mech Mater Struct*, 2 (2007) 1103-1119.
- [71] N.A. Peppas, K.B. Keys, M. Torres-Lugo, A.M. Lowman, Poly(ethylene glycol)-containing hydrogels in drug delivery, *J Control Release*, 62 (1999) 81-87.
- [72] M. Sen, A. Yakar, O. Guven, Determination of average molecular weight between cross-links ($\overline{M_c}$) from swelling behaviours of diprotic acid-containing hydrogels, *Polymer*, 40 (1999) 2969-2974.
- [73] M. Sen, O. Guven, Radiation synthesis of poly(N-vinyl 2-pyrrolidone/itaconic acid) hydrogels and their controlled release behaviours, *Radiat Phys Chem*, 55 (1999) 113-120.
- [74] N. Mahmudi, M. Sen, S. Rendevski, G. Gueven, Radiation synthesis of low swelling acrylamide based hydrogels and determination of average molecular weight between cross-links, *Nucl Instrum Meth B*, 265 (2007) 375-378.

- [75] Z. Lin, W. Wu, J. Wang, X. Jin, Swelling behaviors, tensile properties and thermodynamic interactions in APS/HEMA copolymeric hydrogels, *Frontiers Mater Sci China*, 1(2007) 427-431.
- [76] C.L. Bell, N.A. Peppas, Measurement of the swelling force in ionic polymer networks.3. Swelling force of interpolymer complexes, *J Control Release*, 37 (1995) 277-280.
- [77] N.A. Peppas, Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymer, *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 60 (1985) 110-111.
- [78] I.O. Barcellos, A.T.N. Pires, I. Katime, Physical properties of hydrogels of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and copolymers with mono-methyl itaconate synthesized by bulk and solution polymerization, *Polym Int*, 49 (2000) 825-830.
- [79] E. Rodriguez, I. Katime, Some mechanical properties of poly[(acrylic acid)-co-(itaconic acid)] hydrogels, *Macromol Mater Eng*, 288 (2003) 607-612.
- [80] S. Nagaoka, Mechanical properties of composite hydrogels, *Polym J*, 21 (1989) 847-850.
- [81] J.M. Wood, D. Attwood, J.H. Collett, The influence of gel formation on the diffusion of salicylic acid in polyHEMA hydrogels, *J Pharm Pharmacol*, 34 (1982) 1-4.
- [82] N.B. Graham, M.E. McNeill, Morphology of poly(ethylene oxide)-based hydrogels in relation to controlled drug delivery, *Makromol Chem, Macromol Symp*, 19 (1988) 255-273.
- [83] H. Yasuda, M.F. Refojo, Graft copolymerization of vinylpyrrolidone onto polydimethylsiloxane, *J Polym Sci Pol Chem*, 2 (1964) 5093-5098.
- [84] T. Caykara, R. Inam, Determination of average molecular weight between crosslinks and polymer-solvent interaction parameters of poly(acrylamide-g-ethylene diamine tetraacetic acid) polyelectrolyte hydrogels, *J Appl Polym Sci*, 91 (2004) 2168-2175.
- [85] D.F. Williams, Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European society for biomaterials, Elsevier Science Ltd., Chester, England, 1987.
- [86] ISO Document 10 993-5, Biological evaluation of medical devices, Part 5, Tests for cytotoxicity: in vitro methods, (1992).
- [87] ISO Document 10 993-4, Biological evaluation of medical devices, Part 4, Selection of tests for interactions with blood, (1992).
- [88] D.L. Coleman, D.E. Gregonis, J.D. Andrade, Blood-materials interactions: The minimum interfacial free energy and the optimum polar/apolar ratio hypotheses, *J Biomed Mater Res A*, 16 (1982) 381-398.
- [89] J.-P. Montheard, M. Chatzopoulos, D. Chappard, 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA): chemical properties and applications in biomedical fields, *J Macromol Sci-Pol R*, 32 (1992) 1-34.
- [90] H. Park, K. Park, Biocompatibility issues of implantable drug delivery systems, *Pharm Res*, 13 (1996) 1770-1776.
- [91] R. Arora, S. Jain, S. Monga, R. Narayanan, U.K. Raina, D.K. Mehta, Efficacy of continuous wear PureVision contact lenses for therapeutic use, *Contact Lens and Anterior Eye*, 27 (2004) 39-43.
- [92] J.L. West, J.A. Hubbell, Separation of the arterial wall from blood contact using hydrogel barriers reduces intimal thickening after balloon injury in the rat: The roles of medial and luminal factors in arterial healing, *P Natl Acad Sci USA*, 93 (1996) 13188-13193.

- [93] G.W. Bos, J.J.L. Jacobs, J.W. Kolen, S. van Tomme, T. Veldhuis, C.F. van Nostrum, W. Den Otter, W.E. Hennink, In situ crosslinked biodegradable hydrogels loaded with IL-2 are effective tools for local IL-2 therapy, *Eur J Pharm Sci*, 21 (2004) 561-567.
- [94] K. Nam, J. Watanabe, K. Ishihara, Modeling of swelling and drug release behavior of spontaneously forming hydrogels composed of phospholipid polymers, *Int J Pharm*, 275 (2004) 259-269.
- [95] S. Woerly, G.W. Plant, A.R. Harvey, Cultured rat neuronal and glial cells entrapped within hydrogel polymer matrices: A potential tool for neural tissue replacement, *Neurosci Lett*, 205 (1996) 197-201.
- [96] A. Jones, D. Vaughan, Hydrogel dressings in the management of a variety of wound types: A review, *J Orthopaedic Nursing*, 9 (2005) S1-S11.
- [97] K.T. Nguyen, J.L. West, Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications, *Biomaterials*, 23 (2002) 4307-4314.
- [98] A.B. Lugao, S.O. Rogero, S.M. Malmonge, Rheological behaviour of irradiated wound dressing poly(vinyl pyrrolidone) hydrogels, *Radiat Phys Chem*, 63 (2002) 543-546.
- [99] S.O. Rogero, O.Z. Higa, M. Saiki, O.V. Correa, I. Costa, Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs, *Toxicol in Vitro*, 14 (2000) 497-504.
- [100] J. Rosiak, R. Rucinska, W. Pekala, U.S. Patent No. 4 871 490, 1989.
- [101] L. Dong, A.K. Agarwal, D.J. Beebe, H.R. Jiang, Adaptive liquid microlenses activated by stimuli-responsive hydrogels, *Nature*, 442 (2006) 551-554.
- [102] A. Richter, G. Paschew, S. Klatt, J. Lienig, K.F. Arndt, H.J.P. Adler, Review on hydrogel-based pH sensors and microsensors, *Sensors-Basel*, 8 (2008) 561-581.
- [103] E.A. Moschou, S.F. Peteu, L.G. Bachas, M.J. Madou, S. Daunert, Artificial muscle material with fast electroactuation under neutral pH conditions, *Chem Mater*, 16 (2004) 2499-2502.
- [104] I.Y. Galaev, B. Mattiasson, 'Smart' polymers and what they could do in biotechnology and medicine, *Trends Biotechnol*, 17 (1999) 335-340.
- [105] B. Jeong, A. Gutowska, Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications, *Trends Biotechnol*, 20 (2002) 305-311.
- [106] S. Sharma, P. Kaur, A. Jain, M.R. Rajeswari, M.N. Gupta, A smart bioconjugate of chymotrypsin, *Biomacromolecules*, 4 (2003) 330-336.
- [107] J.F. Künzler, Hydrogels, in: *Encyclopedia of polymer science and technology*, John Wiley & Sons, Inc., 2002.
- [108] Y.C. Nho, K.R. Park, Preparation and properties of PVA/PVP hydrogels containing chitosan by radiation, *J Appl Polym Sci*, 85 (2002) 1787-1794.
- [109] H. Yu, X. Xu, X. Chen, T. Lu, P. Zhang, X. Jing, Preparation and antibacterial effects of PVA-PVP hydrogels containing silver nanoparticles, *J Appl Polym Sci*, 103 (2007) 125-133.
- [110] L.G. Ovington, Advances in wound dressings, *Clin Dermatol*, 25 (2007) 33-38.
- [111] I. Katime, R. Novoa, F. Zuluaga, Swelling kinetics and release studies of theophylline and aminophylline from acrylic acid/n-alkyl methacrylate hydrogels, *Eur Polym J*, 37 (2001) 1465-1471.
- [112] A. Kishida, Hydrogels for biomedical and pharmaceutical applications, in: S. Dumitriu (Ed.), *Polymeric biomaterials*, Marcel Dekker, New York, Basel, 2002, pp. 133-147.

- [113] Y. Dai, P. Li, A.Q. Wang, Intelligent drug delivery system of intelligent high polymer materials, *Prog Chem*, 19 (2007) 362-369.
- [114] R. Mohapatra, D. Ray, A.K. Swain, T.K. Pal, P.K. Sahoo, Release study of alfuzosin hydrochloride loaded to novel hydrogel P(HEMA-co-AA), *J Appl Polym Sci*, 108 (2008) 380-386.
- [115] A. Das, A.R. Ray, Synthesis and characterization of poly(acrylic acid-co-N-[3-(dimethylamino)propyl]-methacrylamide) hydrogel membranes for biomedical applications, *J Appl Polym Sci*, 108 (2008) 1273-1280.
- [116] M.M. Ozmen, O. Okay, Swelling behavior of strong polyelectrolyte poly(N-t-butylacrylamide-co-acrylamide) hydrogels, *Eur Polym J*, 39 (2003) 877-886.
- [117] A.K. Bajpai, S.K. Shukla, S. Bhanu, S. Kankane, Responsive polymers in controlled drug delivery, *Prog Polym Sci*, 33 (2008) 1088-1118.
- [118] L. Brannon-Peppas, Polymers in controlled drug delivery, *Medical Plastics Biomaterials*, 4 (1997) 34-44.
- [119] L. Brannon-Peppas, N.A. Peppas, Equilibrium swelling behavior of pH sensitive hydrogels, *Chem Eng Sci*, 46 (1991) 715-722.
- [120] A.R. Khare, N.A. Peppas, Swelling/deswelling of anionic copolymer gels, *Biomaterials*, 16 (1995) 559-567.
- [121] L. Masaro, X.X. Zhu, Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids, *Prog Polym Sci*, 24 (1999) 731-775.
- [122] A.J. Cadotte, T.B. DeMarse, Poly-HEMA as a drug delivery device for in vitro neural networks on micro-electrode arrays, *J Neural Engin*, 2 (2005) 114-122.
- [123] P.L. Ritger, N.A. Peppas, A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs, *J Control Release*, 5 (1987) 23-36.
- [124] J. Liu, L. Li, Diffusion of camptothecin immobilized with cationic surfactant into agarose hydrogel containing anionic carrageenan, *J Biomed Mater Res A*, 83A (2007) 1103-1109.
- [125] Y. Fu, W.J. Kao, Drug release kinetics and transport mechanisms from semi-interpenetrating networks of gelatin and poly(ethylene glycol) diacrylate, *Pharm Res*, 26 (2009) 2115-2124.
- [126] D.L. Fedlheim, C.A. Foss, Metal nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications Marcel Dekker, Inc, New York, 2002.
- [127] M. Ip, S.L. Lui, V.K.M. Poon, I. Lung, A. Burd, Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison, *J Med Microbiol*, 55 (2006) 59-63.
- [128] U. Klueh, V. Wagner, S. Kelly, A. Johnson, J.D. Bryers, Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation, *J Biomed Mater Res*, 53 (2000) 621-631.
- [129] J.B. Wright, K. Lam, D. Hansen, R.E. Burrell, Efficacy of topical silver against fungal burn wound pathogens, *Am J Infect Control*, 27 (1999) 344-350.
- [130] H.J. Lee, S.Y. Yeo, S.H. Jeong, Antibacterial effect of nanosized silver colloidal solution on textile fabrics, *J Mater Sci*, 38 (2003) 2199-2204.
- [131] T. Yuranova, A.G. Rincon, A. Bozzi, S. Parra, C. Pulgarin, P. Albers, J. Kiwi, Antibacterial textiles prepared by RF-plasma and vacuum-UV mediated deposition of silver, *J Photoch Photobio A*, 161 (2003) 27-34.
- [132] G. Yury, *Nanomaterials Handbook*, CRC/Taylor & Francis, New York, 2006.
- [133] C.S.S.R. Kumar, *Metallic nanomaterials*, Wiley-VCH, Strauss GmbH, Morlenbach, Germany, 2009.

- [134] K. Szczepanowicz, J. Stefanska, R.P. Socha, P. Warszynski, Preparation of silver nanoparticles via chemical reduction and their antimicrobial activity, *Physicochem Probl Mi*, 45 (2010) 85-98.
- [135] N. Leopold, B. Lendl, A new method for fast preparation of highly surface-enhanced Raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride, *J Phys Chem B*, 107 (2003) 5723-5727.
- [136] H.S. Wang, X.L. Qiao, J.G. Chen, S.Y. Ding, Preparation of silver nanoparticles by chemical reduction method, *Colloid Surface A*, 256 (2005) 111-115.
- [137] S. Kapoor, Preparation, characterization, and surface modification of silver particles, *Langmuir*, 14 (1998) 1021-1025.
- [138] K. Shao, J.N. Yao, Preparation of silver nanoparticles via a non-template method, *Mater Lett*, 60 (2006) 3826-3829.
- [139] I. Pastoriza-Santos, L.M. Liz-Marzan, Formation of PVP-protected metal nanoparticles in DMF, *Langmuir*, 18 (2002) 2888-2894.
- [140] M.K. Temgire, S.S. Joshi, Optical and structural studies of silver nanoparticles, *Radiat Phys Chem*, 71 (2004) 1039-1044.
- [141] P. Chen, L.Y. Song, Y.K. Liu, Y.E. Fang, Synthesis of silver nanoparticles by gamma-ray irradiation in acetic water solution containing chitosan, *Radiat Phys Chem*, 76 (2007) 1165-1168.
- [142] R. Singh, D. Singh, Radiation synthesis of PVP/alginate hydrogel containing nanosilver as wound dressing, *J Mater Sci-Mater M*, 23 (2012) 2649-2658.
- [143] B.D. Du, D. Van Phu, N.N. Duy, N.T.K. Lan, V.T.K. Lang, N.V.K. Thanh, N.T.P. Phong, N.Q. Hien, Preparation of colloidal silver nanoparticles in poly(N-vinylpyrrolidone) by gamma-irradiation, *J Exp Nanosci*, 3 (2008) 207-213.
- [144] Z. Kacarevic-Popovic, S. Tomic, A. Krkljes, M. Micic, E. Suljovrujic, Radiolytic synthesis of Ag-poly(BIS-co-HEMA-co-IA) nanocomposites, *Radiat Phys Chem*, 76 (2007) 1333-1336.
- [145] V.P. Dang, T.K.L. Vo, T.K.L. Nguyen, N.D. Nguyen, D.C. Nguyen, D.D. Bui, D.C. Bui, Q.H. Nguyen, Synthesis and antimicrobial effects of colloidal silver nanoparticles in chitosan by irradiation, *J Exp Nanosci*, 5 (2010) 169-179.
- [146] J. Zhang, X.D. Wang, B.H. Zhao, C.X. Li, Facile synthesis of narrowly dispersed silver nanoparticles in hydrogel, *Chem Lett*, 35 (2006) 40-41.
- [147] J.R. Morones, W. Frey, Environmentally sensitive silver nanoparticles of controlled size synthesized with PNIPAM as a nucleating and capping agent, *Langmuir*, 23 (2007) 8180-8186.
- [148] D. Radziuk, A. Skirtach, G. Sukhorukov, D. Shchukin, H. Mohwald, Stabilization of silver nanoparticles by polyelectrolytes and poly(ethylene glycol), *Macromol Rapid Comm*, 28 (2007) 848-855.
- [149] A. Panacek, L. Kvitek, R. Prucek, M. Kolar, R. Vecerova, N. Pizurova, V.K. Sharma, T. Nevecna, R. Zboril, Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity, *J Phys Chem B*, 110 (2006) 16248-16253.
- [150] Y.M. Mohan, K. Lee, T. Premkumar, K.E. Geckeler, Hydrogel networks as nanoreactors: A novel approach to silver nanoparticles for antibacterial applications, *Polymer*, 48 (2007) 158-164.
- [151] Y.M. Mohan, T. Premkumar, K. Lee, K.E. Geckeler, Fabrication of silver nanoparticles in hydrogel networks, *Macromol Rapid Comm*, 27 (2006) 1346-1354.

- [152] Y.Q. Xiang, D.J. Chen, Preparation of a novel pH-responsive silver nanoparticle/poly (HEMA-PEGMA-MAA) composite hydrogel, *Eur Polym J*, 43 (2007) 4178-4187.
- [153] S. Brahim, D. Narinesingh, A. Guiseppi-Elie, Synthesis and hydration properties of pH-sensitive p(HEMA)-based hydrogels containing 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate, *Biomacromolecules*, 4 (2003) 497-503.
- [154] S. Lahooti, M.V. Sefton, Microencapsulation of normal and transfected L929 fibroblasts in a HEMA-MMA copolymer, *Tissue Eng*, 6 (2000) 139-149.
- [155] R.M. Ottenbrite, K. Park, T. Okano, *Biomedical applications of hydrogels handbook*, Springer, New York, 2010.
- [156] L. Ferreira, M.M. Vidal, M.H. Gil, Evaluation of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) gels as drug delivery systems at different pH values, *Int J Pharm*, 194 (2000) 169-180.
- [157] S.L.J. Tomic, M.M. Micic, J.M. Filipovic, E.H. Suljovrujic, Synthesis, characterization and controlled release of cephalexin drug from smart poly(2-hydroxyethyl methacrylate/poly(alkylene glycol)(meth)acrylates hydrogels, *Chem Eng J*, 160 (2010) 801-809.
- [158] M. Micic, D. Stamenic, E. Suljovrujic, Radiation-induced synthesis and swelling properties of p(2-hydroxyethyl methacrylate/itaconic acid/oligo (ethylene glycol) acrylate) terpolymeric hydrogels, *Radiat Phys Chem*, 81 (2012) 1451-1455.
- [159] T. Willke, K. Welter, K.D. Vorlop, Biotechnological production of itaconic acid from sugar, *Zuckerindustrie*, 126 (2001) 444-447.
- [160] D. Muralidhara Rao, S.M.D.J. Hussain, V.P. Rangadu, K. Subramanyam, G.S. Krishna, A.V.N. Swamy, Fermentative production of itaconic acid by *Aspergillus terreus* using *Jatropha* seed cake, *Afr J Biotechnol*, 6 (2007) 2140-2142.
- [161] M. Sen, A. Yakar, Controlled release of antifungal drug terbinafine hydrochloride from poly(N-vinyl 2-pyrrolidone/itaconic acid) hydrogels, *Int J Pharm*, 228 (2001) 33-41.
- [162] B. Tasdelen, N. Kayaman-Apohan, O. Guven, B.M. Baysal, Preparation of poly (N-isopropylacrylamide/itaconic acid) copolymeric hydrogels and their drug release behavior, *Int J Pharm*, 278 (2004) 343-351.
- [163] S.L. Tomic, M.M. Micic, J.M. Filipovic, E. Suljovrujic, Hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate obtained by gamma irradiation, *Current Research in Advanced Materials and Processes*, 494 (2005) 199-203.
- [164] S.L. Tomic, M.M. Micic, J.M. Filipovic, E.H. Suljovrujic, Swelling and drug release behavior of poly(2-hydroxyethyl methacrylate/itaconic acid) copolymeric hydrogels obtained by gamma irradiation, *Radiat Phys Chem*, 76 (2007) 801-810.
- [165] S.L. Tomic, M.M. Micic, S.N. Dobic, J.M. Filipovic, E.H. Suljovrujic, Smart poly(2-hydroxyethyl methacrylate/itaconic acid) hydrogels for biomedical application, *Radiat Phys Chem*, 79 (2010) 643-649.
- [166] E. Rodriguez, I. Katime, Behavior of acrylic acid-itaconic acid hydrogels in swelling, shrinking, and uptakes of some metal ions from aqueous solution, *J Appl Polym Sci*, 90 (2003) 530-536.
- [167] P. Gasteier, A. Reska, P. Schulte, J. Salber, A. Offenhausser, M. Moeller, J. Groll, Surface grafting of PEO-based star-shaped molecules for bioanalytical and biomedical applications, *Macromol Biosci*, 7 (2007) 1010-1023.
- [168] A.P. Rokhade, S.A. Patil, A.A. Belhekar, S.B. Halligudi, T.M. Aminabhavi, Preparation and evaluation of cellulose acetate butyrate and poly(ethylene oxide) blend

- microspheres for gastroretentive floating delivery of repaglinide, *J Appl Polym Sci*, 105 (2007) 2764-2771.
- [169] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U.S. Schubert, Poly(ethylene glycol) in drug delivery: Pros and cons as well as potential alternatives, *Angew Chem Int Edit*, 49 (2010) 6288-6308.
- [170] M.S. Thompson, T.P. Vadala, M.L. Vadala, Y. Lin, J.S. Riffle, Synthesis and applications of heterobifunctional poly(ethylene oxide) oligomers, *Polymer*, 49 (2008) 345-373.
- [171] J.M. Harris, Introduction to biotechnical and biomedical applications of poly(ethylene glycol), in: J.M. Harris (Ed.), *Poly(ethylene glycol) chemistry: Biotechnical and biomedical applications*, P. Press (Ed.), New York, 1992, pp. 1-12.
- [172] G. Lapienis, Star-shaped polymers having PEO arms, *Prog Polym Sci*, 34 (2009) 852-892.
- [173] K. Osada, K. Kataoka, Drug and gene delivery based on supramolecular assembly of PEG-polypeptide hybrid block copolymers, *Peptide Hybrid Polymers*, 202 (2006) 113-153.
- [174] M.J. Joralemon, S. Mcrae, T. Emrick, PEGylated polymers for medicine: from conjugation to self-assembled systems, *Chem Commun*, 46 (2010) 1377-1393.
- [175] L.X. Liu, W. Li, K. Liu, J.T. Yan, G.X. Hu, A.F. Zhang, Comb like thermoresponsive polymers with sharp transitions: Synthesis, characterization, and their use as sensitive colorimetric sensors, *Macromolecules*, 44 (2011) 8614-8621.
- [176] J.F. Lutz, Polymerization of oligo(ethylene glycol) (meth)acrylates: Toward new generations of smart biocompatible materials, *J Polym Sci Pol Chem*, 46 (2008) 3459-3470.
- [177] T. Ishizone, A. Seki, M. Hagiwara, S. Han, H. Yokoyama, A. Oyane, A. Deffieux, S. Carloti, Anionic polymerizations of oligo(ethylene glycol) alkyl ether methacrylates: Effect of side chain length and omega-alkyl group of side chain on cloud point in water, *Macromolecules*, 41 (2008) 2963-2967.
- [178] S. Han, M. Hagiwara, T. Ishizone, Synthesis of thermally sensitive water-soluble polymethacrylates by living anionic polymerizations of oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylates, *Macromolecules*, 36 (2003) 8312-8319.
- [179] F.J. Hua, X.G. Jiang, D.J. Li, B. Zhao, Well-defined thermosensitive, water-soluble polyacrylates and polystyrenics with short pendant oligo (ethylene glycol) groups synthesized by nitroxide-mediated radical polymerization, *J Polym Sci Pol Chem*, 44 (2006) 2454-2467.
- [180] J.F. Lutz, K. Weichenhan, O. Akdemir, A. Hoth, About the phase transitions in aqueous solutions of thermoresponsive copolymers and hydrogels based on 2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate and oligo(ethylene glycol) methacrylate, *Macromolecules*, 40 (2007) 2503-2508.
- [181] J.A. Jones, N. Novo, K. Flagler, C.D. Pagnucco, S. Carew, C. Cheong, X.Z. Kong, N.A.D. Burke, H.D.H. Stover, Thermoresponsive copolymers of methacrylic acid and poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate, *J Polym Sci Pol Chem*, 43 (2005) 6095-6104.
- [182] J.F. Lutz, A. Hoth, Preparation of ideal PEG analogues with a tunable thermosensitivity by controlled radical copolymerization of 2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate and oligo(ethylene glycol) methacrylate, *Macromolecules*, 39 (2006) 893-896.

- [183] Z.Y. Qiao, F.S. Du, R. Zhang, D.H. Liang, Z.C. Li, Biocompatible thermoresponsive polymers with pendent oligo(ethylene glycol) chains and cyclic ortho ester groups, *Macromolecules*, 43 (2010) 6485-6494.
- [184] L. Feng, Y. Liu, J.Y. Hao, C.D. Xiong, X.M. Deng, Alternating copolymers with degradability and quantitatively controlled thermosensitivity, *J Polym Sci Pol Chem*, 50 (2012) 1812-1818.
- [185] M. Sen, A. Yakar, Enhancement of copolymerization of itaconic acid with N-vinyl 2-pyrrolidone by radiation in the presence of cross-linking agent, *Nucl Instrum Meth B*, 234 (2005) 226-234.
- [186] A. Singh, J. Silverman, Radiation processing of polymers, Hanser Publishers, Munich, Viena, New York, 1991.
- [187] P. Frutos, E. Diez-Pena, G. Frutos, J.M. Barrales-Rienda, Release of gentamicin sulphate from a modified commercial bone cement. Effect of (2-hydroxyethyl methacrylate) comonomer and poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) additive on release mechanism and kinetics, *Biomaterials*, 23 (2002) 3787-3797.
- [188] G. Ginalska, D. Kowalczyk, M. Osinska, A chemical method of gentamicin bonding to gelatine-sealed prosthetic vascular grafts, *Int J Pharm*, 288 (2005) 131-140.
- [189] S.L. Tomic, E.H. Suljovrujic, J.M. Filipovic, Biocompatible and bioadhesive hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate, monofunctional poly(alkylene glycol)s and itaconic acid, *Polymer Bulletin*, 57 (2006) 691-702.
- [190] A. Safrany, B. Beiler, A. Vincze, Radiation polymerization and crosslinking: A viable alternative for synthesis of porous functional polymers, *Radiat Phys Chem*, 79 (2010) 462-466.
- [191] X.J. Loh, Poly(DMAEMA-co-PPGMA): Dual-responsive "reversible" micelles, *J Appl Polym Sci*, 127 (2013) 992-1000.
- [192] G. Ciapetti, D. Granchi, E. Verri, L. Savarino, D. Cavedagna, A. Pizzoferrato, Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials, *Biomaterials*, 17 (1996) 1259-1264.
- [193] J. Dutta, Synthesis and characterization of γ -irradiated PVA/PEG/CaCl₂ hydrogel for wound dressing, *American J Chem*, 2 (2012) 6-11.
- [194] K.A.d.S. Aquino, Sterilization by gamma irradiation, Federal University of Pernambuco-Department of nuclear energy Brazil, 2012.
- [195] J.M. Rosiak, Radiation formation of hydrogels for biomedical applications, in: International atomic agency report, 2002.
- [196] R.C. Weast, CRC Handbook of chemistry and physics, CRC Press Cleveland, 1974.
- [197] M. Micic, E. Suljovrujic, Network parameters and biocompatibility of p(2-hydroxyethyl methacrylate/itaconic acid/oligo(ethylene glycol) acrylate) dual-responsive hydrogels, *Eur Polym J*, 49 (2013) 3223-3233.
- [198] P.S.K. Murthy, Y.M. Mohan, K. Varaprasad, B. Sreedhar, K.M. Raju, First successful design of semi-IPN hydrogel-silver nanocomposites: A facile approach for antibacterial application, *J Colloid Interf Sci*, 318 (2008) 217-224.
- [199] P.K. Khanna, N. Singh, S. Charan, V.V.V.S. Subbarao, R. Gokhale, U.P. Mulik, Synthesis and characterization of Ag/PVA nanocomposite by chemical reduction method, *Mater Chem Phys*, 93 (2005) 117-121.
- [200] A. Henglein, Physicochemical properties of small metal particles in solution: "Microelectrode" reactions, chemisorption, composite metal particles, and the atom-to-metal transition, *J Phys Chem C*, 97 (1993) 5457.

- [201] K.A. Bogle, S.D. Dhole, V.N. Bhoraskar, Silver nanoparticles: synthesis and size control by electron irradiation, *Nanotechnology*, 17 (2006) 3204-3208.
- [202] W.F. Lee, K.T. Tsao, Effect of silver nanoparticles content on the various properties of nanocomposite hydrogels by in situ polymerization, *J Mater Sci*, 45 (2010) 89-97.
- [203] W.F. Lee, K.T. Tsao, Preparation and properties of nanocomposite hydrogels containing silver nanoparticles by ex situ polymerization, *J Appl Polym Sci*, 100 (2006) 3653-3661.
- [204] K. Varaprasad, Y.M. Mohan, S. Ravindra, N.N. Reddy, K. Vimala, K. Monika, B. Sreedhar, K.M. Raju, Hydrogel-silver nanoparticle composites: A new generation of antimicrobials, *J Appl Polym Sci*, 115 (2010) 1199-1207.
- [205] Л.И. Тарутина, Ф.О. Позднякова, Спектральный Анализ Полимеров, Химияб, Ленинградское Отделение, Ленинград, 1986.
- [206] J.T.S. Kashi, M. Erfan, D.C. Watts, Effect of water on HEMA conversion by FT-IR spectroscopy, *J Dentistry*, Tehran University of Medical Sciences, 4 (2007) 123-129.
- [207] R.M. Silverstein, G.C. Bassler, J.C. Morrill, Spectrometric identification of organic compounds, John Wiley and Sons Inc., New York, 1991.
- [208] M.H. Casimiro, M.L. Botelho, J.P. Leal, M.H. Gil, Study on chemical, UV and gamma radiation-induced grafting of 2-hydroxyethyl methacrylate onto chitosan, *Radiat Phys Chem*, 72 (2005) 731-735.
- [209] A. De Ascentiis, J.L. deGrazia, C.N. Bowman, P. Colombo, N.A. Peppas, Mucoadhesion of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) is improved when linear poly(ethylene oxide) chains are added to the polymer network, *J Control Release*, 33 (1995) 197-201.
- [210] C.R. Becer, S. Hahn, M.W.M. Fijten, H.M.L. Thijs, R. Hoogenboom, U.S. Schubert, Libraries of methacrylic acid and oligo(ethylene glycol) methacrylate copolymers with LCST behavior, *J Polym Sci Pol Chem*, 46 (2008) 7138-7147.
- [211] J.H. Ward, K. Furman, N.A. Peppas, Effect of monomer type and dangling end size on polymer network synthesis, *J Appl Polym Sci*, 89 (2003) 3506-3519.
- [212] B.H. Lee, Y.M. Lee, Y.S. Sohn, S.C. Song, A thermosensitive poly(organophosphazene) gel, *Macromolecules*, 35 (2002) 3876-3879.
- [213] K. Yang, X.Q. Wei, F. Wu, C.W. Cao, J.J. Deng, Y.L. Cai, Sequence control over thermo-triggered micellization and smart nanogels of copolymers based on PEGMA and aldehyde-functionalized monomer, *Soft Matter*, 7 (2011) 5861-5872.
- [214] A. Prior-Cabanillas, J.M. Barrales-Rienda, G. Frutos, I. Quijada-Garrido, Swelling behaviour of hydrogels from methacrylic acid and poly(ethylene glycol) side chains by magnetic resonance imaging, *Polym Int*, 56 (2007) 506-511.
- [215] M.Y. Arica, D. Tuglu, M.M. Basar, D. Kilic, G. Bayramoglu, E. Batislam, Preparation and characterization of infection-resistant antibiotics-releasing hydrogels rods of poly[hydroxyethyl methacrylate-co-(poly(ethylene glycol)-methacrylate]: Biomedical application in a novel rabbit penile prosthesis model, *J Biomed Mater Res B*, 86B (2008) 18-28.
- [216] P.M. Pfister, M. Wendlandt, P. Neuenschwander, U.W. Suter, Surface-textured PEG-based hydrogels with adjustable elasticity: Synthesis and characterization, *Biomaterials*, 28 (2007) 567-575.
- [217] R. Paris, I. Quijada-Garrido, Synthesis and aggregation properties in water solution of comblike methacrylic polymers with oligo(propylene glycol)-block-oligo(ethylene glycol) as side chains, *J Polym Sci Pol Chem*, 49 (2011) 1928-1932.

- [218] H.Y. Tai, W.X. Wang, T. Vermonden, F. Heath, W.E. Hennink, C. Alexander, K.M. Shakesheff, S.M. Howdle, Thermoresponsive and photocrosslinkable PEGMEMA-PPGMA-EGDMA copolymers from a one-Step ATRP synthesis, *Biomacromolecules*, 10 (2009) 822-828.
- [219] H.Y. Tai, D. Howard, S. Takae, W.X. Wang, T. Vermonden, W.E. Hennink, P.S. Stayton, A.S. Hoffman, A. Endruweit, C. Alexander, S.M. Howdle, K.M. Shakesheff, Photo-cross-linked hydrogels from thermoresponsive PEGMEMA-PPGMA-EGDMA copolymers containing multiple methacrylate groups: Mechanical property, swelling, protein release, and cytotoxicity, *Biomacromolecules*, 10 (2009) 2895-2903.
- [220] C. Cha, E.S. Kim, I.W. Kim, H. Kong, Integrative design of a poly(ethylene glycol)-poly(propylene glycol)-alginate hydrogel to control three dimensional biomineralization, *Biomaterials*, 32 (2011) 2695-2703.
- [221] K. Bebis, M.W. Jones, D.M. Haddleton, M.I. Gibson, Thermoresponsive behaviour of poly[(oligo(ethyleneglycol methacrylate)]s and their protein conjugates: importance of concentration and solvent system, *Polym Chem-Uk*, 2 (2011) 975-982.
- [222] E. Suljovrujic, M. Micic, Smart poly(oligo(propylene glycol) methacrylate) hydrogel prepared by gamma radiation, *Nucl Instrum Meth B*, 342 (2015) 206-214.
- [223] R. Paris, I. Quijada-Garrido, Swelling behaviour of thermo-sensitive hydrogels based on oligo(ethylene glycol) methacrylates, *Eur Polym J*, 45 (2009) 3418-3425.
- [224] T. Baltes, F. Garret-Flaudy, R. Freitag, Investigation of the LCST of polyacrylamides as a function of molecular parameters and the solvent composition, *J Polym Sci Pol Chem*, 37 (1999) 2977-2989.
- [225] B. Narasimhan, N.A. Peppas, Controlled drug delivery, in: K. Park (Ed.), ACS symposium series, American chemical society, Washington, DC 1997, pp. 529-557.
- [226] B. Amsden, Solute diffusion within hydrogels. Mechanisms and models, *Macromolecules*, 31 (1998) 8382-8395.
- [227] V.V. Varagić, M.P. Milošević, Farmakologija, Medicinski fakultet, Beogradski univerzitet, Elit-Medika, Beograd, 2001.
- [228] Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100 S21 Vol. 31 No.1, 2011.

Biografija

Maja Mičić rođena je 12. decembra 1975. godine u Kruševcu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Diplomirala je na Fakultetu za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu 2004. godine, odbranivši diplomski rad pod nazivom: „Kvantitativna određivanja peroksidaze metodom perturbacije Bray-Liebhafsky oscilatora u oblasti oscilatorne katalize“ pod rukovodstvom prof. dr Slobodana Anića. Na istom fakultetu upisala je doktorske studije školske 2007/2008. godine.

Od 2004. godine zaposlena je u Institutu za nuklearne nauke „Vinča“, u Laboratoriji za radijacionu hemiju i fiziku „Gama“.

Kandidat se u svom dosadašnjem naučno istraživačkom radu bavio radijacionom sintezom i karakterizacijom hidrogelova na bazi 2-hidroksietil metakrilata, uz dodatak drugih vinilnih monomera, variranjem vrsta i odnosa monomera. Istraživanja uključuju ispitivanje mogućnosti primene ovih sistema kao nosača za kontrolisano oslobađanje različitih lekova i praćenje kinetike njihovog oslobađanja. Takođe, ovi sistemi iskorišćeni su i kao nanoreaktori za sintezu nanočestica srebra.

U periodu 2004-2005. godina učestvovala je u radu na projektu Ministarstva za nauku i zaštitu životne sredine (broj 1996) pod nazivom „Magnetne, optičke i dielektrične osobine kristalnih i amorfni sistema“. Od 2006. godine bila je angažovana na projektu Ministarstva za nauku Republike Srbije (broj 141013) „Modifikacija, sinteza i analiza nanostrukturnih materijala jonskim snopovima, gama zračenjem i vakuumskim deponovanjem“. Od 2011. godine radi na projektu Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (broj 172026) „Hemijsko i strukturno dizajniranje biomaterijala za primenu u inženjerstvu tkiva“.

Učestvovala je u radu više domaćih i međunarodnih konferencija. Objavila je 20 radova u međunarodnim časopisima koji su citirani 136 puta.

Bibliografija

Publikacije iz oblasti disertacije

Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21):

1. **M. Micic**, E. Suljovrujic, Network parameters and biocompatibility of p(2-hydroxyethyl methacrylate/itaconic acid/oligo(ethylene glycol) acrylate) dual-responsive hydrogels, Eur Polym J, 49 (2013) 3223-3233.
2. **M. Micic**, D. Stamenic, E. Suljovrujic, Radiation-induced synthesis and swelling properties of p(2-hydroxyethyl methacrylate/itaconic acid/oligo(ethylene glycol) acrylate) terpolymeric hydrogels, Radiat Phys Chem, 81 (2012) 1451-1455.
3. E. Suljovrujic, **M. Micic**, Smart poly(oligo(propylene glycol) methacrylate) hydrogel prepared by gamma radiation, Nucl Instrum Meth B, 342 (2015) 206-214.

Rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22):

1. **M. Micic**, T. V. Milic, M. Mitric, B. Jokic, E. Suljovrujic, Radiation synthesis, characterisation and antimicrobial application of novel copolymeric silver/poly(2-hydroxyethyl methacrylate/itaconic acid) nanocomposite hydrogels, Polym Bull, 70 (2013) 3347-3357.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а: Маја Мићић

број индекса: 2007/317

Изјављујем

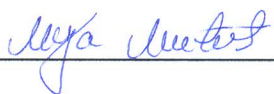
да је докторска дисертација под насловом

„Радијациона синтеза и карактеризација кополимерних хидрогелова на бази 2-хидроксиетил метакрилата и функционализованих олиго(алкилен гликол) (мет)акрилата“

- 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, 10.12.2014.



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора: Маја Мићић

Број индекса: 2007/317

Студијски програм: Физичка хемија материјала

Наслов рада: „**Радијациона синтеза и карактеризација кополимерних хидрогелова на бази 2-хидроксиетил метакрилата и функционализованих олиго(алкилен гликол) (мет)акрилата**“

Ментор: 1. проф. др Горан Бачић

2. др Един Суљоврујић

Потписани/а: Маја Мићић

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, 10.12.2014.

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:

„Радијациона синтеза и карактеризација кополимерних хидрогелова на бази 2-хидроксиетил метакрилата и функционализованих олиго(алкилен гликол) (мет)акрилата“

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).

Потпис докторанда

У Београду, 10.12.2014.

