

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ФАКУЛТЕТ ЗА ФИЗИЧКУ ХЕМИЈУ

Зорана З. Рогич Миладиновић

**ИСПИТИВАЊЕ ТЕМПЕРАТУРНЕ  
ОСЕТЉИВОСТИ РАДИЈАЦИОНО  
СИНТЕТИСНИХ КОПОЛИМЕРНИХ  
ХИДРОГЕЛОВА ОЛИГО(ПРОПИЛЕН-  
ГЛИКОЛ)-МЕТАКРИЛАТ**

Докторска дисертација

Београд, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

Zorana Z. Rogić Miladinović

**TEMPERATURE SENSITIVITY TESTING OF  
RADIATION SYNTHESIZED COPOLYMER  
HYDROGELS OLIGO(PROPYLENE-  
GLYCOL)-METHACRYLATE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

**Ментори:**

**др Марко Даковић**, ванредни професор

Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду

**др Маја Крстић**, научни сарадник

Институт за нуклеарне науке „Винча“, Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду

**Чланови комисије:**

**др Никола Цвјетићанин**, редовни професор

Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду

**др Милош Мојовић**, редовни професор

Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду

**др Един Суљоврујић**, научни саветник

Институт за нуклеарне науке „Винча“, Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду

Датум одбране:

## Захвалница

*Експериментални део ове докторске дисертације урађен је у Лабораторији за радијациону хемију и физику „Гама“, Института за нуклеарне науке „Винча“, Института од националног значаја за Републику Србију под руководством др Маје Крстић, научног сарадника Института за нуклеарне науке „Винча“, Универзитета у Београду, којој дугујем посебну захвалност за залагање, бројне савете и сугестије на које ми је указала током израде ове дисертације.*

*Ментору са Факултета за физичку хемију, Универзитета у Београду, ванредном професору др Марку Даковићу, се захваљујем на разумевању, стрпљењу и подршци током израде докторске дисертације.*

*Велико хвала др Николи Цвјетићанину и др Милошу Мојовићу, редовним професорима Факултета за физичку хемију, Универзитета у Београду, на посвећеном времену, корисним саветима, сугестијама и корекцијама током писања ове дисертације.*

*Посебно се захваљујем др Едину Суљоврујићу, научном саветнику Института за нуклеарне науке „Винча“, Универзитета у Београду, најпре на указаној прилици да постанем део групе која се бави хидрогеловима, на предложеној теми, подстреку да напредујем и на бројним стручним саветима.*

*Захвалност дугујем и др Катарини Ђорђевић, научном сараднику Института за нуклеарне науке „Винча“, Универзитета у Београду, на свесрдној помоћи приликом обраде слика, као и саветима и подршци при изради дисертације.*

*Рођаци, Марији Вушовић дугујем посебну захвалност на издвојеном времену, труду и помоћи при изради слика за ову дисертацију.*

*Колегама Меселџија Слађани, Грце Ани, Трпков Ђорђу, Савић-Бисерчић Марјетки, Миловић Милошу, Младеновић Анити и Рајчић Борису се захваљујем на доступности у сваком тренутку и неизмерној подршци.*

*И на крају, бескрајно хвала мојим родитељима, Зорану и Наташи, мом супругу Небојши и ћеркици Ирени, који су веровали у мене и пружали ми подршку, разумевање и стрпљење током протеклих година.*

*Зорана Розић Миладиновић*

## Испитивање температурне осетљивости радијационо синтетисаних кополимерних хидрогелова олиго(пропилен-гликол)-метакрилат

### Резиме

Докторска дисертација под називом „Испитивање температурне осетљивости радијационо синтетисаних кополимерних хидрогелова олиго(пропилен-гликол)-метакрилат“ настала је као одговор вишегодишњег интересовања истраживача усмереним ка тражењу нових биоматеријала испитивањем „паметне“ класе хидрогелова, а који би својом синтетичком формом могли да задовоље потребе примене у биомедицини.

Циљ истраживања био је да се испита температурна осетљивост нове класе хидрогелова и функционализованих кополимера на бази олиго(пропилен гликол) метакрилата (OPGMA). Сви хидрогелови су добијени радикалном кополимеризацијом мономера или смеше мономера индукованим високоенергентским гама зрачењем у присуству умреживача у Радијационој јединици за индустријску стерилизацију Института за нуклеарне науке „Винча“ и могу се сврстати у три серије.

Прву серију чине кополимерни хидрогелови поли(олиго(пропилен гликол) метакрилата) (POPGMA) функционализовани додатком инертног мономера, 2-хидроксиетил метакрилата (HEMA) и мале количине рН осетљиве, итаконске киселине (IA), односно добијени су „паметни“ хидрогелови осетљиви и на промену температуре и рН средине. Мењањем удела кополимерних компоненти уочено је да кополимерни хидрогел са уделом итаконске киселине од 4 wt% показује температурски прелаз на температури у опсегу физиолошких вредности температура што пружа могућност примене овог хидрогела у биомедицини.

Другу серију чине метакрилатни кополимерни хидрогелови са олиго(пропилен гликол) (OPG) и олиго(етилен гликол) (OEG) висећим ланцима, поли(пропилен гликол<sub>6</sub>-етилен гликол<sub>3</sub>) метакрилат (PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA) и поли(пропилен гликол<sub>3</sub>-етилен гликол<sub>6</sub>) метакрилат (PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA). Њиховим испитивањем уочена је температурна осетљивост и добијене су високе вредности ћелијске одрживости и ниске хемолитичке активности, односно добијени хидрогелови задовољавају *in vitro* биокомпатибилност при чему ови хидрогелови имају могућност примене у магнетној и/или фототермалној хипертермијској терапији за лечење рака.

Трећу серију хидрогелова чине кополимерни хидрогелови са различитим уделима олиго(пропилен гликол) метакрилата (OPGMA) и олиго(етилен гликол) метакрилата (OEGMA), P(OPGMA/OEGMA) хидрогелови са иницијално различитим уделима PG и EG јединица. Резултати испитивања температурске осетљивости ове серије хидрогелова открили су линеарну зависност између удела EG јединица и температуре запреминског прелаза, као и то да хидрогелови у рН 7.4 условима средине са уделом од 42 mol% OEGMA мономера показују највећи потенцијал отпуштања лека.

Карактеризација хидрогелова је вршена применом сканирајуће електронске микроскопије (СЕМ), инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом (ФТИЦ), спектроскопијом у ултраљубичастој и видљивој области спектра (Уљ-Вид), диференцијалном сканирајућом калориметријом (ДСК), и одређивањем степена бубрења у растворима пуфера у широком опсегу температурама и рН вредности. Такође, коришћене су и методе за испитивање биокомпатибилности хидрогелова – тест цитотоксичности и тест хемолитичке активности, а за анализу контролисаног отпуштања лека у *in vitro* условима коришћен је натријум диклофенак као модел-лек.

Синтетисани хидрогелови на бази OPGMA показали су добру биокомпатибилност и потенцијал за примену у биомедицини као носачи у системима за контролисано отпуштање лекова.

**Кључне речи:** радијациона синтеза,  $\gamma$  зрачење, хидрогел, OPGMA, степен бубрења, температурно осетљив хидрогел, паметни хидрогел.

**Научна област:** Физичка хемија

**Ужа научна област:** Физичка хемија материјала

**УДК број:** 544.64

## Temperature sensitivity testing of radiation synthesized copolymer hydrogels oligo(propylene-glycol)-methacrylate

### **Abstract**

The doctoral dissertation, "*Temperature Sensitivity Testing of Radiation-Synthesized Copolymer Hydrogels oligo(propylene-glycol)-methacrylate*", arose from researchers' long-standing interest in discovering new biomaterials by testing a "smart" class of hydrogels that could meet their needs in biomedical applications.

The aim of the study was to examine the temperature sensitivity of a new class of hydrogels and functionalized copolymers based on oligo(propylene glycol) methacrylate (OPGMA). All hydrogels were obtained by radical copolymerization of monomers or mixtures of monomers induced by high-energy gamma radiation in the presence of a crosslinker in the Radiation Unit for Industrial Sterilization of the Vinča Institute of Nuclear Sciences and can be classified into three series.

The first series consists of copolymer hydrogels poly(oligo(propylene glycol) methacrylate) (POPGMA) functionalized by the addition of inert monomer, 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), and small amounts of pH-sensitive, itaconic acid (IA), i.e., "smart" hydrogels with dual responsiveness, temperature, and pH of the medium. By varying the proportion of copolymer components, it was discovered that a copolymer hydrogel with a 4 wt% itaconic acid concentration exhibits a temperature transition in the range of physiological temperature values, implying that this hydrogel has the potential to be employed in biomedicine.

The second series consists of methacrylate copolymer hydrogels with oligo(propylene glycol) (OPG) and oligo(ethylene glycol) (OEG) pendant chains, poly(propylene glycol<sub>6</sub>-ethylene glycol<sub>3</sub>) methacrylate (PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA) and poly(propylene glycol<sub>3</sub>-ethylene glycol<sub>6</sub>) methacrylate (PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA). Obtained results showed temperature sensitivity, as well as high values for cell viability and low hemolytic activity, i.e., the obtained hydrogels, meet in vitro biocompatibility and these hydrogels could be used in cancer treatment using magnetic and/or photothermal hyperthermic therapy.

The third series of hydrogels consist of copolymer hydrogels with different proportions of oligo(propylene glycol) methacrylate (OPGMA) and oligo(ethylene glycol) methacrylate (OEGMA), P(OPGMA/OEGMA) hydrogels with initially different proportions of PG and EG units. Temperature sensitivity testing of this series of hydrogels revealed a linear relationship between the share of EG units and the temperature of the volume transition, and that hydrogels in pH 7.4 environmental conditions with a share of 42 mol% OEGMA monomers have the highest drug release potential.

Characterization of hydrogels was performed using scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy with Fourier transform (ATR-FTIR), ultraviolet and visible spectroscopy (UV-Vis), differential scanning calorimetry (DSC), and by determining the degree of swelling in buffer solutions in a wide range of temperatures and pH values. Methods for testing the biocompatibility of hydrogels, cytotoxicity tests, and hemolytic activity tests were also used, and diclofenac sodium was used as a model drug for the analysis of controlled drug release in vitro.

Synthesized hydrogels based on OPGMA have demonstrated good biocompatibility and the potential for use as carriers in controlled drug release systems in biomedicine.

**Key words:** radiation synthesis,  $\gamma$  radiation, hydrogel, OPGMA, swelling rate, temperature-sensitive hydrogel, smart hydrogel.

**Scientific field:** Physical chemistry

**Scientific subfield:** Physical chemistry of materials

**UDK number:** 544.64



# САДРЖАЈ

---

1. ОПШТИ ДЕО .....	1
1.1. Биоматеријали.....	1
1.2. Хидрогелови .....	2
1.2.1. Добијање хидрогелова.....	4
1.2.2. Механизам бубрења хидрогелова .....	9
1.2.3. Хидрогелови осетљиви на спољне стимулансе .....	11
1.2.4. Примена хидрогелова.....	16
1.3. Преглед литературе.....	22
2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО .....	24
2.1. Материјали коришћени за синтезу хидрогелова на бази олиго(пропилен гликол) метакрилата.....	24
2.2. Физичкохемијске методе карактеризације хидрогелова .....	28
2.2.1. Гравиметријске методе.....	28
2.2.2. Скенирајућа електронска микроскопија.....	28
2.2.3. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом.....	30
2.2.4. Спектроскопија у ултраљубичастој и видљивој области спектра .....	32
2.2.5. Диференцијална скенирајућа калориметрија.....	34
3. ПРЕДМЕТ И ЦИЉ РАДА.....	36
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	37
4.1. Синтеза хидрогелова на бази олиго(пропилен гликол) метакрилата.....	37
4.2. Температурно и рН осетљиви кополимерни хидрогелови на бази олиго(пропилен гликол) метакрилата, 2-хидроксиетил метакрилата и итаконске киселине .....	39
4.2.1. Одређивање садржаја гел фазе .....	39
4.2.2. Структурна анализа хидрогелова .....	41
4.2.3. Морфологија хидрогелова .....	42
4.2.4. Термичка својства хидрогелова .....	44
4.2.5. Бубрење хидрогелова .....	46
4.3. Температурно осетљиви хидрогелови са олиго(етилен гликол) и олиго(пропилен гликол) висећим ланцима .....	52
4.3.1. Термичка својства хидрогелова .....	52
4.3.2. Бубрење хидрогелова .....	53
4.3.3. Морфологија хидрогелова .....	56
4.3.4. Биокompatibilност хидрогелова.....	57
4.3.5. Контролисано отпуштање натријум диклофенака из PPG <sub>6</sub> EG <sub>3</sub> МА и PPG <sub>3</sub> EG <sub>6</sub> МА хидрогелова.....	59

4.4. Температурно осетљиви кополимерни хидрогелови са различитим уделима олиго(пропилен гликол) метакрилата и олиго(етилен гликол) метакрилата .....	61
4.4.1. Анализа бубрења и одређивање VPTT хидрогелова .....	61
4.4.2. Морфолошка испитивања .....	64
4.4.3. Контролисано отпуштање натријум диклофенака из P(OPGMA/OEGMA) хидрогелова .....	65
5. ЗАКЉУЧАК .....	68
РЕФЕРЕНЦЕ .....	70
БИОГРАФИЈА.....	82
БИБЛИОГРАФИЈА.....	83

# 1. ОПШТИ ДЕО

---

## 1.1. БИОМАТЕРИЈАЛИ

Биоматеријали су материјали који се користе у медицини и намењени су интеракцији са биолошким системима [1]. Користе се као допуна или замена живим ткивима за одређени временски период и могу бити и природног и вештачког порекла. Њихова улога је да опонашају састав, структуру, особине и функцију ткива или органа.

Узимајући у обзир историју развоја биоматеријала, важно је напоменути да до тридесетих година 20. века они нису постојали, нити је тај термин коришћен. Нису постојали произвођачи медицинских уређаја (осим протетике за спољашњу употребу као што су вештачки удови, уређаји за фиксирање прелома, стаклене очи и зубне пломбе), није се разматрало о биокомпатибилности и процесу стерилизације, нити су постојали академски курсеви о биоматеријалима. Стога, почетак њихове примене је имао мало изгледа за успех [2].

Данас, да би неки биоматеријал био применљив, мора да поседује тачно одређена механичка, оптичка, физичка, хемијска и биолошка својства [3], да је биокомпатибилан, односно, да у контакту са живим ткивом не изазива имунолошки одговор организма. Такође, сам материјал као и његови продукти при деградацији морају бити нетоксични, без изазивања оштећења, индуковања мутација или апоптозе здравих ћелија. Отуд, стерилизација представља неизоставан корак пре употребе ових материјала.

Један од разлога за широко и вишедеценијско истраживање биоматеријала је и чињеница да већина доступних материјала не задовољава све захтеве, па је акценат истраживања усмерен ка дизајнирању актуелних и развоју нових биоматеријала како би се превазишла постојећа ограничења [4].

Биоматеријали се данас користе за различите примене: медицинске импланте (срчане залиске, стентове, вештачке зглобове, лигаменте и тетиве, зубне импланте, и уређаје који стимулишу нерве), за убрзање зарастања ткива (шавови, копче и спајалице за затварање рана и растворљиве облоге), регенерацију ткива (користећи комбинацију носача биоматеријала, ћелија и биоактивних молекула као што су хидрогелови за регенерацију костију и органе узгајане у лабораторијским условима), молекуларне сонде и наночестице које пробијају биолошке баријере и помажу у дијагностици и терапији канцера на молекуларном нивоу, биосензоре за откривање присуства и количине одређених супстанци и за пренос тих података (уређаји за надзор глукозе у крви и сензори мождане активности), системе за испоруку лекова који носе и/или циљано испоручују лекове на оболело место (васкуларни стентови обложени леком и имплантабилне плочице за хемотерапију код пацијената оболелих од канцера), итд.

Полимери, стакло, метали, керамика, живе ћелије и ткива, у облику премаза, влакана, филмова, пене, тканине, су само неки од материјала и облика у којима се могу наћи биомедицински производи и уређаји. Дизајн зависи од жељене примене у организму, физиологије ткива и од телесних течности са којима би материјал био у контакту. Па су тако полимерни биоматеријали део срчаних вентила, замена за зглобове, зубних импланата, контактних сочива и могу бити биоразградиви, биостабилни, биоинертни, биоактивни или биоапсорбенти који се морају уклонити из организма након испуњавања функције.

Једна од бројних предности полимерних биоматеријала је у флексибилности њиховог дизајна која даје широк спектар најразличитих карактеристика. Такође, *in situ* формирање гела је једна од битнијих предности полимерних биоматеријала. Полимеризација *in vivo* (нпр. метил метакрилата) на месту дефекта потенцијално решава низ недостатака у оквиру типичних

хируршких третмана скелетних оштећења у смислу техника и материјала које се користе, попут: одбацивања импланата, изазивања ћелијског морбидитета, бола на месту имплантације, неразградивости материјала које захтева додатне инвазивне методе уклањања или замене, потенцијалног кородирања импланта, цене, итд. [5, 6].

## 1.2. ХИДРОГЕЛОВИ

Хидрогелови су полимерни биоматеријали, који бележе брз развој и налазе се у живи интересовања истраживача већ дуги низ година. Њихова хидрофилна полимерна мрежа која има способност да бубри, задржи велику количину течности, а да се притом не раствори, већ одржи првобитну структуру нашла је примену у многим пољима као што су медицина, фармација, пољопривреда и заштита животне средине.

Слично другим биоматеријалима, хидрогелови се могу наћи у различитим физичким облицима, попут: чврстих укалупљених облика (нпр. мека контактна сочива), пресованих прашкастих матрица (нпр. пилуле или капсуле за оралну употребу), микрочестица (нпр. биоадхезивни носачи), превлака (нпр. на имплантима или катетерима), мембрана или „листова“ (нпр. као резервоар у трансдермалном фластеру за отпуштање лекова). Поред тога што се могу наћи у различитим облицима, хидрогелови се могу класификовати на основу бројних чинилаца: састава, поларности бочних група, одговора на спољне стимулансе, начина добијања, итд. (слика 1.1).

Класификација хидрогелова зависи од њихове природе бубрења, начина синтезе, порекла, јонског наелектрисања, степена биоразградивости, физичких особина и примењене методе умрежавања [7].

Хидрогелови могу бити физички или хемијски умрежени, у зависности од примењене методе умрежења. Физички гелови се добијају процесима као што су хидрофобне асоцијације, агрегација ланаца, кристализација, комплексација полимера и водонично везивање, док се хемијски добијају ковалентним умрежавањем неком од следећих метода: излагањем јонизујућем зрачењу високих енергија, хемијским реакцијама комплементарних група (нпр. реакцијама адиције), слободно-радикалском полимеризацијом, коришћењем ензима, и др. [8].

На основу порекла, разликујемо природне, синтетичке и хибридне хидрогелове. Иако добра механичка својства нису карактеристика природних хидрогелова и могу садржати патогене или изазвати имуно-инфламаторне реакције, њихова предност у односу на синтетичке је у биокомпатибилности, биоразградивости и биолошки препознатљивим целинама које подржавају рад ћелије. Са друге стране, синтетички хидрогелови не показују поменута инхерентна биолошка својства, али могу бити различитог састава и испуњавати потребе за системима најразличитијих својстава [9]. Комбиновањем ових полимера могу се добити хибридни полимерни материјали који поседују и биоразградивост и биокомпатибилност природних полимера и задовољавајућа механичка својства синтетичких полимера.

Разликујемо и конвенционалне и „паметне“ хидрогелове на основу понашања хидрогелова услед промена у њиховом непосредном окружењу. Конвенционални хидрогелови показују инертност или незнатне физичке, хемијске и/или биохемијске промене са насталим променама попут промена температуре, притиска, електричног или магнетног поља, рН, итд. у непосредној околини хидрогела, док су „паметни“ хидрогелови изразито осетљиви на промене у свом окружењу и показују знатне промене које по престанку деловања стимуланса из средине враћају хидрогел у првобитно стање. Тако „паметни“ хидрогелови могу бити температурно осетљиви, рН осетљиви, осетљиви на светлост, електрично или магнетно поље, и др.

У зависности од састава, разликују се хомополимерни и кополимерни хидрогелови, полу-интерпенетрирајуће полимерне мреже (енг. *semi-interpenetrating polymer networks*, semi-IPN) и интерпенетрирајуће полимерне мреже (енг. *interpenetrating polymer networks*, semi-IPN) [10]. Хомополимерни хидрогелови су полимерне мреже састављене од једне врсте мономерне јединице, док се кополимерни хидрогелови састоје из две или више различитих мономерних јединица од којих једна мора бити хидрофилне природе [7]. Мрежа полимера испреплетана са другим линеарним полимером без умрежења представља semi-IPN хидрогел [11], док IPN хидрогел представља комбинацију две полимерне мреже од којих се једна синтетише или умрежава у непосредном присуству друге.



**Слика 1.1:** Класификација хидрогелова.

Хидрогелови на основу наелектрисања полимерне мреже могу бити јонски (анјонски, катјонски и амфифилни) и нејонски (неутрални). Бубрење нејонских хидрогелова у воденој средини је последица полимер-вода интеракција, док је бубрење јонских хидрогелова условљено променом рН вредности средине, односно степена дисоцијације јонских ланаца. Тачније, бубрење код јонских хидрогелова је последица електростатичког одбијања између јонизованих група полимера. Амфифилни хидрогелови се састоје и из киселих и из базних група, па им бубрење зависи од рН вредности средине. Тако, у киселој средини бубрење амфифилних хидрогелова има својство катјонских хидрогелова, а анјонских у базној средини [10].

Поред набројаних подела хидрогелова, постоје и поделе на основу способности разградње у организму (биоразградиви и не-биоразградиви), на основу порозности (непорозни, микропорозни, макропорозни и суперпорозни) и на основу количине воде коју

могу да упију (хидрогелови са малим, средњим и високим степеном бубрења, као и суперапсорбујући хидрогелови).

### **1.2.1. Добијање хидрогелова**

У зависности од врсте умрежења које се жели постићи зависиће и која метода ће бити примењена за добијање хидрогелова. Умрежење може бити физичко или хемијско.

Физички умрежени хидрогелови се могу добити формирањем слабих сила попут водоничних веза, електростатичких интеракција, *van der Waals*-ове и *Coulomb*-ове силе, хидрофобних интеракција, преплитања ланаца. Овако добијени хидрогелови су познати као псеудогелови, али се називају још и реверзибилни, термопластични и привремени, због својства да се под дејством спољашњих фактора могу превести у неумрежене системе. За разлику од хидрогелова добијених хемијским умрежавањем, физички хидрогелови се могу деградирати или растворити. Њихова предност је у могућности модификовања након синтезе и одсуству умреживача, док је недостатак углавном ограничен на слабе механичке особине у набубрелом стању [12].

Хемијски умрежени хидрогелови настају кроз ковалентно везивање и не могу бити растворени, осим уколико су формиране ковалентне везе у процесу умрежавања раскинуте, због чега се називају перманентним или правим хидрогеловима. Могу се добити високоенергетским озрачивањем, хемијским реакцијама комплементарних група (нпр. реакцијама адиције), слободно-радикалском полимеризацијом, коришћењем ензима, итд. [8].

Недостатак хемијског умрежавања чине евентуално присутне токсичне супстанце (иницијатори, умреживачи, адитиви и сл.) у добијеним продуктима синтезе. Иако су често неизоставни у хемијским процедурама, компликују поступак синтезе јер је неопходно њихово уклањање након добијања хидрогела.

#### ***1.2.1.1. Умрежавање мономера/полимера јонизујућим зрачењем високе енергије***

Јонизујуће зрачење је деценијама коришћена метода за синтезу хидрогелова. Само неке од предности су лака контрола процеса, могућност истовремене синтезе и стерилизације узорка, као и економичност процеса. Не захтева додавање агенаса као што су умреживач или иницијатор, а који су потенцијално штетни и тешки за уклањање. Све набројане предности чине зрачење правим избором за синтезу хидрогелова првенствено у медицинске сврхе.

Хидрогелови се могу добити радијационим техникама на неколико различитих начина: зрачењем мономера/полимера у чврстом стању или њихових водених раствора. При томе, синтеза зрачењем хидрофилних полимера у чврстом стању [13] захтева доста веће дозе зрачења (у односу на дозе за добијање гела зрачењем у раствору) и посебну припрему узорка, при чему добијање хомогених макроскопских хидрогелова и потпуно уклањање кисеоника који доводи до нежељених споредних реакција могу представљати проблем [14]. Такође, ограничено кретање ланаца полимера, у чврстом стању, који носе радикале ограничава ефикасност умрежавања.

Метод зрачења мономера/полимера је најзаступљенији [15]. У оквиру ове методе, честа је пракса додавање неких бифункционалних мономера, попут етилен гликол диметакрилата (EGDMA) [16] у смешу мономера/полимера и растварача како би дошло до умрежавања или се повећала његова ефикасност. Полимеризација се при оваквим условима одиграва у првом

степену и у већини случајева готово истовремено је праћена умрежавањем формираних ланаца.

### *Механизам умрежавања мономера/полимера у воденом раствору зрачењем*

Током озрачивања мономера/полимера у воденом раствору долази до формирања реактивних тачака дуж полимерног ланца и радиоллизе воде. Хидроксил радикали, настали у процесу радиоллизе воде, једни су од најзначајнијих реактивних врста чијим дејством на полимерни ланац могу настати макрорадикали. Њиховом рекомбинацијом на различитим ланцима долази до формирања ковалентних веза и умрежења [17, 18]. Награђени макрорадикали могу формирати пероксил радикале, који неповољно утичу на процес умрежавања, преко реакције угљеника са кисеоником. Стога, ради смањења неповољног утицаја кисеоника, зрачење се изводи у дејонизованој води и инертној атмосфери азота или аргона [12].

### *Радиолиза воде*

Јонизујуће зрачење у воденој средини доводи до бројних физичких и хемијских процеса међу којима се разликују: физички, физичкохемијски и хемијски стадијум [19-21].

#### **1. Физички стадијум**

У првом стадијуму јонизујуће зрачење предаје енергију молекулима воде, при чему долази до њихове јонизације ( $10^{-18}$ - $10^{-16}$  s) и побуђивања ( $10^{-15}$  s):



Електрони настали у процесу јонизације имају довољно енергије да јонизују и побуде још неколико молекула воде.

#### **2. Физичкохемијски стадијум**

Други стадијум обухвата процесе у којима долази до прегруписавања унутар молекула, преноса енергије на друге честице и успостављања термалне равнотеже у систему. Слободни радикали се масовно јављају. У реакцији преноса протона са  $\text{H}_2\text{O}^+$  јона на околне молекуле воде ( $10^{-14}$  s) настају:



Настали  $\text{H}_3\text{O}^+$  јони затим подлежу процесу хидратације ( $10^{-11}$  s):



Електрони настали у процесу јонизације се најпре термализују ( $10^{-13}$  s), а потом хидратишу ( $10^{-11}$  s):



Побуђени молекули воде дисосују на радикале:



Удео примарних радикала формираних побуђивањем је мали у односу на удео радикала насталих јонизацијом.

### 3. Хемијски стадијум

У трећем стадијуму, интермедијери који су настали у претходна два стадијума реагују међусобно или са молекулима. Долази до дифундовања примарних врста ( $e^-_{aq}$ ,  $H_3O^+$ ,  $OH^\bullet$ ,  $H^\bullet$ ) кроз систем, хемијских реакција врста типа јон-јон, јон-радикал, радикал-радикал, радикал-молекул, и на крају до успостављања хемијске равнотеже у систему и стварања стабилних производа. Ови процеси на временској скали обухватају период од  $10^{-11}$  до  $10^{-10}$  s по проласку зрачења [21].



Настали продукти могу бити снажне оксидујуће ( $OH^\bullet$  и  $H_2O_2$ ) или редукујуће ( $e^-_{aq}$  и  $H_2$ ) врсте, при чему хидратисани електрони ( $e^-_{aq}$ ), хидронијум јони ( $H_3O^+$ ), хидроксил радикал ( $OH^\bullet$ ) и водоников радикал ( $H^\bullet$ ) представљају радикалске продукте, а водоник ( $H_2$ ) и водоник пероксид ( $H_2O_2$ ) молекулске продукте [21].

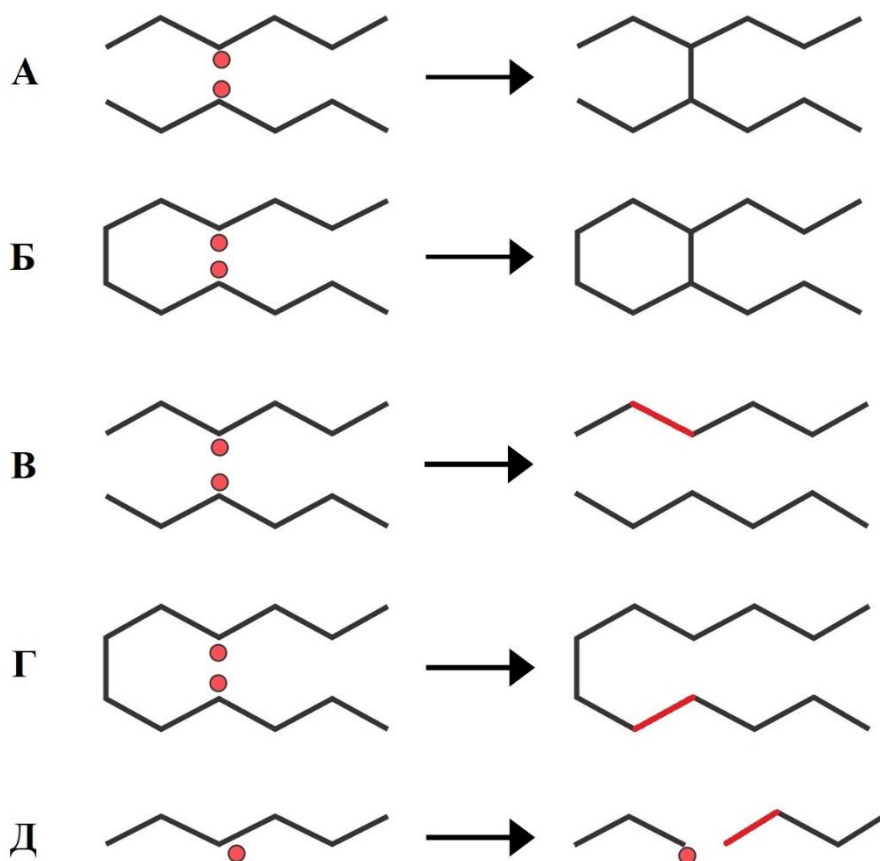
#### Реакције макрорадикала

Када се раствор полимера изложи јонизујућем зрачењу настају реактивни интермедијери. Њихов настанак може бити последица директне интеракције зрачења са полимерним ланцем и индиректног утицаја, односно реакције интермедијера насталог у води са полимерним молекулима [22]. Како је део енергије апсорбован од сваке компоненте система полимер-вода пропорционалан тежинском уделу фракција, у разблаженим и благо концентрованим полимерним растворима индиректан утицај доминира. Такође, принос радикала је већи у води него у чистом полимеру.

Услед дејства зрачења формирају се три главне реактивне врсте у води: хидратисани електрони ( $e^-_{aq}$ ), хидроксил радикали ( $OH^\bullet$ ) и водоникови молекули ( $H_2$ ). Електрони показују ниску реактивност према хидрофилним полимерима који формирају хидрогел. Хидроксил радикали се издвајају као главне врсте одговорне за пренос реактивности са воде на полимерне ланце. Они издвајају атоме водоника из макромолекула, формирајући тако полимерне радикале. Хидроксил радикали најчешће издвајају атоме водоника из различитих, нееквивалентних положаја, при чему настају две или више врста радикала различитих структура. Макрорадикали су локализовани на атомима угљеника у оваквим полимерима и њихова структура може бити од важности за процес умрежавања и формирање хидрогела.

Макрорадикали су углавном укључени у реакције терминације (интер и/или интрамолекулско умрежавање и диспропорцинацију), или реакције пропагације (пренос водоника и кидање ланца). **Слика 1.2** представља схематски приказ могућих реакција макрорадикала (изузев реакције преноса водоника) [23].





**Слика 1.2:** Схематски приказ могућих реакција у којима настају макрорадикали:  
 А – интермолекуларна рекомбинација; Б – интрамолекуларна рекомбинација;  
 В – интермолекуларна диспропорционација; Г – интрамолекуларна диспропорционација;  
 Д – кидане ланца. Плави сегменти представљају засићене везе, а црвени незасићене,  
 преузето и прилагођено из [23].

Интермолекуларно умрежавање доводи до тродимензионалне молекуларне структуре и повећања молекуларне масе, док интрамолекуларно умрежавање доводи до промена у конформацији полимера и смањује покретљивост сегмената. Реакције диспропорционације не утичу на молекуларну тежину полимера, али мењају хемијску структуру полимера увођењем незасићених веза које даље могу реаговати са радикалима насталим приликом озрачивања. Кидане ланца доводи до смањења молекуларне масе полимера и деградације [23].

Однос између реакција рекомбинације и диспропорционације је одређена структуром радикала и могућност контроле овог параметра је најчешће веома ограничена, док је са друге стране, утицај на конкурентност између интер- и интрамолекуларног умрежавања могућ. Параметри који на њу утичу су концентрација мономера/полимера и доза зрачења. Доза гелирања ( $D_g$ ) представља дозу којој одговара појава прве нерастворне фракције гела у систему. Ако се узме у обзир да је расподела места умрежења дуж полимерног ланца случајна, на  $D_g$  ће коегзистирати и ланци са великим бројем умрежења и неповезани ланци. Зрачењем узорка изнад тачке гелирања која представља драстичну промену у својствима полимера, доћи ће до пораста фракције гела, иако неки молекули могу и даље остати неумрежени, тј. у сол фракцији. С тим у вези, проценат гелирања представља проценат конверзије мономера у нерастворну полимерну мрежу [24]. За високе концентрације полимера када полимерни ланац интерпенетрира, вероватноћа да два рекомбинујућа радикала буду локализована на различитим ланцима је релативно висока, фаворизовано је формирање хидрогела, односно интермолекуларно умрежавање. Са смањењем концентрације полимера до односа при којем су

макромолекули (који најчешће имају конформацију клупка) раздвојени, вероватноћа интермолекулске рекомбинације опада. Уколико услови зрачења омогућавају истовремено постојање више од једног радикала на ланцу, онда, под условом да је ланац флексибилан, сусрет два радикала на истом ланцу може бити бржи него интермолекулска рекомбинација захтевајући два велика хемијска ентитета попут полимерних завојница да дифундују један према другом. За високе дозе зрачења у комбинацији са ниским концентрацијама полимера може доћи до ситуације да истовремено настану неколико десетина или више стотина радикала на сваком ланцу. У оваквим условима, вероватноћа и принос интермолекулских рекомбинација је значајно смањења. Укратко, високе концентрације полимера и ниске дозе зрачења поспешују формирање гела, док се у случају разблажених раствора озрачених високим дозама зрачења може очекивати доминација интрамолекулске рекомбинације.

Да ли ће макрорадикали довести до умрежавања или кидања у основи зависи од хемијске структуре полимера. Кидање ланца преовладава код полимера који формирају релативно дугоживуће радикале и имају ограничену флексибилност ланца у раствору, као што је то неретко случај код полисахарида [12, 23].

Реакције преноса водоника доводе до промене позиције радикала, али не и до промене укупног броја радикала на полимерним ланцима, при чему број радикала доступних за умрежавање остаје исти.

Кидање ланца, које је у одређеном смислу супротан процес интермолекулском умрежавању је такође од значаја. У полимерним растворима који не садрже кисеоник, радикали су лоцирани на атому угљеника позиционираног на главном ланцу (или његовој непосредној близини) чинећи реакције кидања ланца веома спорим. Дакле, у већини случајева (полиелектролити су изузетак), радикали се рекомбинују пре него што се кидање ланца настави у значајној мери. Свакако, повећање молекулске тежине полимера, или стварање гела, не доказују одсуство разградње полимерног ланца. За већину нејонских полимера, попут полиакриламида, поли(винил пиролидона) и поли(винил алкохола), утврђено је да су ови приноси, под стандардним условима озрачивања, близу нуле. Међутим, ово не важи за јонске полимере и у случају присуства кисеоника у систему.

#### *Утицај присуства кисеоника*

Стварање гела је ефикасније у системима без кисеоника. У раствору полимера који садржи кисеоник, првобитно настали макрорадикали који имају неспарене електроне на атому угљеника реагују са кисеоником, при чему настају одговарајући пероксилни ( $RO_2^{\bullet}$ ) радикали који, као ни оксил ( $O^{\bullet-}$ ) радикали, не могу да формирају стабилне везе (умрежавања) услед рекомбинације. Највероватнија реакција је реакција кидања ланца. Када су ове реакције споре, пероксидни радикали могу изазвати ланчану реакцију уклањања водоника праћену реакцијом насталог алкил радикала са кисеоником. На овај начин продукти распадања, терминални пероксидни радикали, могу да се регрупишу у средини ланца пероксид радикала, који могу изазвати даље кидање ланца [25].

Приликом озрачивања у херметички затвореним судовима, након почетног периода када преовладава деградација, кисеоник бива потрошен и даље зрачење доводи до умрежавања и формирања гела. Структура полимерних ланаца се у извесној мери разликује од почетног материјала због реакција са кисеоником у првој фази зрачења. Слично зрачењем раствора у отвореном суду, али је пренос кисеоника са површине у раствор спорији него потенцијална брзина потрошње кисеоника. Присуство кисеоника у узорку приликом озрачивања не омета настајање гела, али због неједнаке изложености материјала кисеонику често долази до појаве нехомогености унутар формираног хидрогела.

## Предности умрежавања зрачењем

Умрежавање зрачењем са циљем да се синтетишу и модификују хидрогелови, има неколико предности. У односу на конвенционалне методе, процес синтезе је једноставнији и компактнији, а добијени гелови имају бољу механичку јачину и већу вредност ефективног умрежења. Степен умрежења се може лако контролисати променом услова зрачења. Умрежавање се може извести у води под нормалним условима, собној температури и физиолошкој рН. Такође, често нема потребе за коришћењем хемијских умреживача и помоћних агенаса као што су иницијатори и активатори. Захваљујући томе, не долази до заостајања неизреагованих материја које могу бити токсичне, и добијају се чисти производи [26-29]. Овакав метод синтезе је и релативно јефтин процес чије је извођење лако контролисати. Коришћењем јонизујућег зрачења (гама и зрачења снопом електрона) долази до неселективне и униформне расподеле енергије у систему, што за последицу има хомогенију умреженост и боље карактеристике умреженог полимера. Радијационо процесирање такође решава проблем стерилизације производа, која се врши истовремено са умрежавањем, што је од посебног значаја у случају потенцијалне медицинске примене.

### 1.2.2. Механизам бубрења хидрогелова

Дифузија флуида кроз ксерогел доводи до размештања молекула флуида између ланаца полимера што доводи до њиховог истезања, ширења и промене запремине система, односно, долази до бубрења хидрогела. Бубрење се изражава степеном бубрења ( $q$ ) и важна је карактеристика хидрогела. Што је већи степен бубрења, већи је и садржај флуида унутар хидрогела. Степен бубрења се дефинише као:

$$q = \frac{m_t - m_0}{m_0} \quad (1.14)$$

где је  $m_0$  маса ксерогела, а  $m_t$  маса набубрелог гела у времену  $t$  [30, 31]. Степен бубрења хидрогела се повећава извесно време, након чега достиже константну вредност која се назива равнотежни степен бубрења ( $q_e$ ):

$$q_e = \frac{m_e - m_0}{m_0} \quad (1.15)$$

где је  $m_e$  маса набубрелог хидрогела у стању равнотеже. Степен бубрења најчешће се одређује гравиметријски [32, 33], и представља бездимензиону величину.

Унутрашња запремина хидрогела са флуидом је сложена и јединствена целина. Када се ксерогел нађе у додиру са флуидом, и када почне да бубри, први молекули флуида хидрирају најполарније, хидрофилне групе. То је „примарно везан“ флуид. Након тога долази до ширења полимерних ланаца при чему и хидрофобне групе започињу интеракцију са флуидом путем хидрофобних интеракција. Флуид везан на овај начин назива се „секундарно везаним“. Заједно, примарно и секундарно везан флуид чине „укупно везан“ флуид [34, 35]. Након интеракције флуида са хидрофилним и хидрофобним местима полимерног ланца, осмотска сила мреже омогућава да мрежа апсорбује још флуида. Ово додатно бубрење ограничава присуство ковалентних или физичких умрежења дуж еластичне мреже, што доводи до равнотежног степена бубрења хидрогела. Додатно апсорбован флуид или „слободан“ флуид попуњава простор између ланаца мреже [34, 35]. Количина „слободног“, „слабо везаног“ и „везаног“ флуида варира унутар хидрогела. Када је садржај флуида у хидрогелу изнад 90%, хидрогел се назива суперапсорбујућим.

Степен бубрења хидрогела зависи од хемијске структуре и степена умрежења. Повећање удела хидрофилних група у мрежи хидрогела доводи до повећања садржаја флуида и пораста степена бубрења, док повећање степена умрежења, односно броја попречних веза у мрежи, доводи до смањења флексибилности полимерних ланаца, повећања отпора склупчаних ланаца ка издуживању, што за последицу има смањење степена бубрења [27]. Карактеристике бубрења хидрогела су значајне за његову примену.

### Дифузија флуида унутар хидрогела

Ксерогел у контакту са флуидом апсорбује флуид и бубри до успостављања равнотеже. Дифузија и капиларно продирање флуида у мрежу гела су процеси који доводе до бубрења и представљају једну од важнијих карактеристика хидрогелова који налазе примену у медицини. Стога, могућност контролисања дифузије флуида или раствора активне супстанце је од изузетног значаја.

У случају хидрогелова, дифузија представља сложен феномен који зависи од концентрације флуида и степена бубрења хидрогела [36].

Математички, дифузија се описује *Fick*-овим законом на основу кога је брзина дифузије, или флукс ( $J$ ), дифузионог супстрата кроз јединицу површине пропорционална градијенту концентрације [35, 37]:

$$J = -D \left( \frac{\partial C}{\partial x} \right) \quad (1.16)$$

где је  $(\partial C / \partial x)$  градијент концентрације, односно, покретачка сила дифузије, а  $D$  коефицијент дифузије флуида или растворене активне супстанце у полимерној матрици. Негативни предзнак указује на то да је правац кретања молекула супротан порасту концентрације. Претпостављено је да је коефицијент дифузије ( $D$ ) константа за дати систем, да не зависи од растојања ( $x$ ), концентрације флуида или растворене активне супстанце ( $C$ ) и времена ( $t$ ).

У случају када се градијент концентрације мења са временом, брзина промене концентрације у једној димензији дата је II *Fick*-овим законом [35, 37]:

$$\left( \frac{\partial C}{\partial t} \right) = D \left( \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right) \quad (1.17)$$

Решења једначина садрже почетне и граничне услове и одговарају опису експерименталних услова. Решење *Fick*-овог закона према *Crank*-у [38] може се применити за узорке малих дебљина ( $l$ ) и одређене геометрије, и дато је једначином:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2 \pi^2} \cdot \exp \left[ \frac{-(2n+1)^2 \pi^2 D}{l^2} t \right] \quad (1.18)$$

где је  $M_t$  маса флуида коју гел апсорбовао у времену  $t$ ,  $M_\infty$  маса флуида у равнотежи ( $t \rightarrow \infty$ ).

Узимајући у обзир кратак временски период ( $t \rightarrow 0$ ), једначина (1.18) се поједностављује у једначину (1.19) која се даље може искористити за израчунавање дифузионог коефицијента флуида ( $D$ ) [35]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \left( \frac{D \cdot t}{\pi l^2} \right)^{1/2} \quad (1.19)$$

који описује брзину бубрења. Дифузиони коефицијент представља нагиб криве из праволинијске зависности  $M_t / M_\infty$  од квадратног корена времена у почетној фази бубрења када хидрогел још није ушао у стање равнотеже [35].

Транспорт флуида или малих молекула у полимерну мрежу, или из ње, често не следи овај модел, већ је контролисан процесом дифузије, због градијента концентрације и процеса релаксације полимерних ланаца. Релаксација полимера зависи од времена и доприноси брзини и обиму пенетрације молекула у полимерну мрежу.

Како би се одредила природа дифузије флуида у мрежу хидрогела и из ње, користи се полу-емпиријска једначина [37, 39]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad 0 < \frac{M_t}{M_\infty} < 0.6 \quad (1.20)$$

где је  $k$  кинетичка константа бубрења која зависи од геометрије хидрогела, а  $n$  дифузиони експонент који показује да ли је процес бубрења контролисан дифузијом и/или релаксацијом мреже,  $M_t$  и  $M_\infty$  су масе хидрогела у времену  $t$  и у тренутку достизања равнотежног степена бубрења.

Из праволинијске зависности  $\ln M_t/M_\infty$  од  $\ln t$  (1.21) која одговара почетној фази бубрења хидрогела, а добија се логаритмовањем једначине (1.20), вредност  $\ln k$  представља одсечак на ординати, а  $n$  нагиб праве [35, 40].

$$\ln \frac{M_t}{M_\infty} = \ln k + n \ln t \quad (1.21)$$

Вредност дифузионог експонента ( $n$ ) дефинише тип транспорта флуида у хидрогел. Бубрење је контролисано дифузијом за  $n \leq 0.5$  у случају једнодимензионе плочасте геометрије и тај тип транспорта је познат као *Fick*-ова дифузија, за коју је карактеристично да је брзина релаксације мреже већа од брзине дифузије. За  $n = 1$ , транспорт је контролисан брзином релаксације полимерне мреже, брзина дифузије већа је од брзине релаксације мреже и представља не-*Fick*-ову дифузију. За вредности  $0.5 < n < 1$ , оба ефекта значајно утичу на брзину бубрења. Такав транспорт одступа од *Fick*-овог закона и назива се аномална дифузија [35, 40].

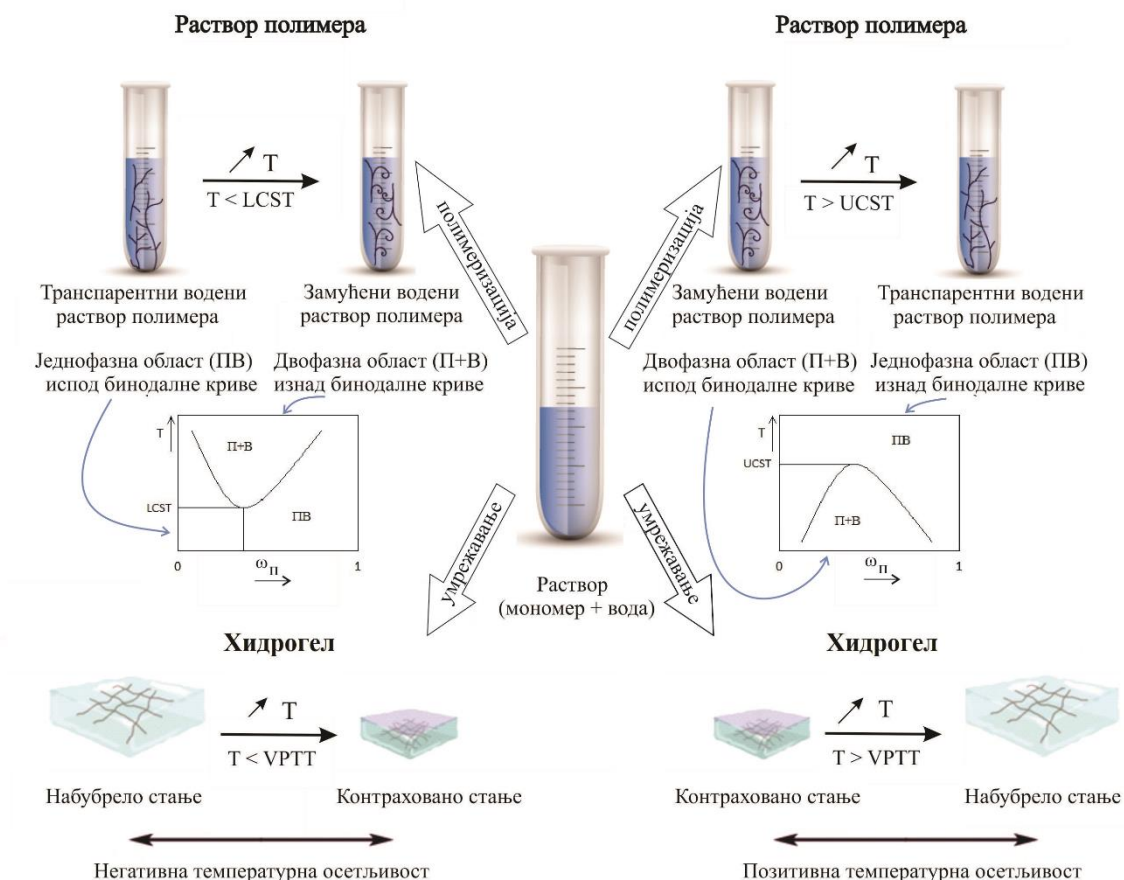
### 1.2.3. Хидрогелови осетљиви на спољне стимулансе

Хидрогелови који трпе релативно велике и нагле промене својстава као одговор на мале промене у условима средине у којој се налазе називају се осетљивим на спољне стимулансе, и у литератури се називају још и „паметни“ хидрогелови. У ову групу хидрогелова спадају хидрогелови осетљиви на светлост, магнетно поље, притисак, глукозу, присуство одређених јона, антигена, док су због хидрогелова на бази олиго(пропилен гликол) метакрилата (OPGMA) који су предмет дисертације, најинтересантнији температурно и рН осетљиви хидрогелови, па ће ове групе хидрогелова бити детаљније описане.

#### 1.2.3.1. Температурно осетљиви хидрогелови

При испитивању полимера и хидрогелова у води или воденим растворима, утицај промене температуре је најобимније експлоатисан. Температура је параметар који има значајну улогу у природи и може се применити неинвазивно и тако контролисати својства температурно осетљивих полимера. Постоје три величине којима се описује температурна осетљивост: критична температура растварања (енг. *critical solution temperature* – CST), тачка замућења (енг. *cloud point temperature* –  $T_{CP}$ ) и температура запреминског фазног прелаза (енг. *volume phase transition temperature* – VPTT) (слика 1.3). Температурна осетљивост је

карактеристика полимера са кратким висећим ланцима, односно, полимера мањих молекулских маса.



Слика 1.3: Температурно-осетљиво понашање хидрогелова.

Температурно осетљиви полимери се таложе из раствора са повећањем или са снижењем температуре што је последица вишефазног подручја (енг. *miscibility gap*) у бинарној смеси полимер/растварач, где долази до раздвајања фаза. Уколико повећање температуре доводи до стварања две немешљиве течне фазе са различитом концентрацијом полимера, смеша показује нижу критичну температуру раствора (енг. *lower critical solution temperature* – LCST). Међутим, уколико настану две течне фазе услед снижења температуре, бинарна смеша показује горњу критичну температуру растварања (енг. *upper critical solution temperature* – UCST) [41].

Фазна сепарација услед хлађења која се описује горњом критичном температуром растварања (UCST) је далеко мање заступљена у води и позната је само за неколико врста (ко)мономера [41]. Ови полимери су најчешће изразито хидрофилне врсте које су нерастворне испод критичне температуре због јаке привлачне полимер-полимер интеракције које се раскидају у води. Само неки примери полимера са UCST су поли(сулфон бетани), поли(N-акрилоилглицинамид) и поли(етилен алкил фосфонати) [42].

Карактеризација фазног прелаза температурно осетљивих полимера са LCS температуром се може извршити помоћу неколико метода. Различите физикохемијске особине раствора полимера, нпр. конформација полимерног ланца, водонично везивање, покретљивост ланца и оптичка својства подлежу значајним променама приликом преласка преко температуре фазног прелаза услед грејања или хлађења. Такве промене се могу

испратити одговарајућим техникама као што су динамичко расејање светлости, калориметрија, нуклеарна магнетно-резонантна спектроскопија и турбидиметрија, како би се одредила температура фазног прелаза, углавном  $T_{CP}$ . Такође, за испитивање фазног прелаза температурно осетљивих раствора полимера примењују се и флуоресцентна спектроскопија [43] и инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (ФТИЦ) [44] али у далеко мањој мери.

Математичко-теоријско одређивање LCST у води подразумева конструисање бинодалне криве фазног дијаграма што се постиже растварањем мономера/полимера у води на ниској температури и загревањем смеше на температурама изнад температуре раздвајања фаза. Концентрације обе формиране фазе на датој температури представљају тачке на левој и десној страни бинодалне криве и могу се проценити експериментално, нпр. ултраљубичасто-видљивом спектрометријом апсорпцијом великих и малих концентрација полимерних фаза коришћењем калибрационе криве. Експеримент се изводи у ширем опсегу температура како би се добио одговарајући број тачака бинодалне криве и олакшало налажење минимума криве, односно LCST [45].

Полимери који показују LCST у води су од значаја због могућности промене хидрофилности услед промене температуре. Тренутна промена стања из хидрофилног у хидрофобно стање за исти полимер заснива се на водоничним везама између полимера и околних молекула воде на ниским температурама, где су полимерни ланци хидратисани и растворени чинећи једнофазни систем. Са повећањем температуре водоничне везе слабе, полимерни ланци постају делимично дехидрирани и нерастворни.

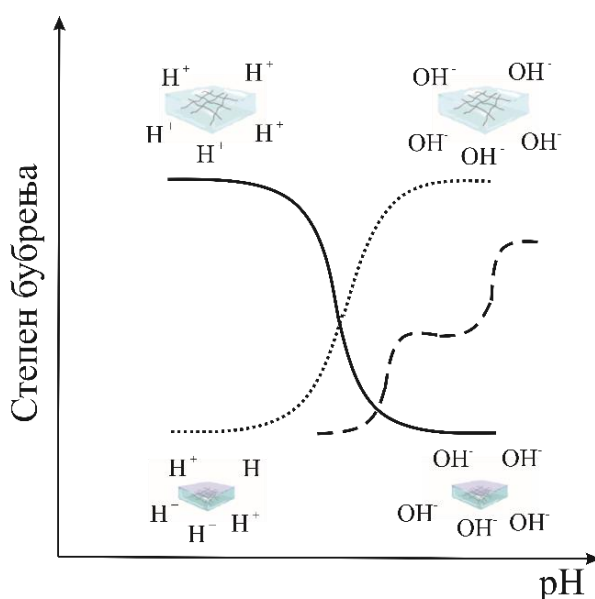
Недостатак брзог развоја истраживања у области хидрогелова је у неадекватној употреби термина за величине којима се описује температурска осетљивост. Поред LCST, температура замућења,  $T_{CP}$ , представља подједнако важан параметар температурно осетљивих полимера посматраних у раствору и односи се на температуру на којој раствор полимера за одређену концентрацију прелази из растворне у нерастворну фазу што је праћено замућењем раствора [46].  $T_{CP}$  се може наћи на било ком месту бинодалне криве за наведену концентрацију полимера. Дакле, LCST представља најнижу вредност температуре на бинодалној криви. Односно, LCST је најнижа вредност  $T_{CP}$  на фазном дијаграму. Неретко се крива тачке замућења не поклапа са бинодалном кривом у читавом фазном дијаграму [47]. Разлика је приписана кинетичком аспекту одређивања  $T_{CP}$  насупрот термодинамици бинодалне криве као и ограничењу турбидиметрије која се базира на полимерним агломератима који су довољно велики и довољно дехидрирани да расејавају упадни зрак светлости. На вредност  $T_{CP}$  се може лако утицати хемијским стратегијама као што су кополимеризација [48-51] и модификација терминалних група [52] за подешавање хидрофилне-хидрофобне равнотеже полимерних ланаца, или физичким стратегијама, као што је мешање различитих полимера [53], концентрација и јонске јачине [54] како би се контролисале полимер-полимер, полимер-растварач и растварач-растварач интеракције. Међутим, одређивање  $T_{CP}$  техникама, као што су турбидиметрија [50], НМР спектроскопија [55] и динамичко расејање светлости [56, 57] такође уносе девијације у вредност  $T_{CP}$  у зависности од методе која је примењена. На пример, турбидиметрија одређује  $T_{CP}$  као прелаз из хомогеног раствора у хетерогену „млечну“ фазу са концентрованом полимерном фазом. Супротно, због велике осетљивости методе динамичког расејања светлости, могуће је одредити почетак фазног прелаза већ са појавом првих агрегата, много пре него што изазову замућење раствора.

За умрежене температурно осетљиве полимере уочава се феномен запреминског фазног прелаза (енг. *volume phase transition* - VPT) [58]. За разлику од малих органских молекула и линеарних полимера који могу бити растворени, хидрогелови су тродимензионални умрежени полимери који могу да апсорбују велике количине воде без растварања [59]. Тако, апсорпција воде од стране хидрогела представља један од најважнијих фактора који одређује његове

особине и примену, а критична температура на којој хидрогел прелази из набубрелог у контраховани (скупљени) облик представља температуру запреминског фазног прелаза, VPTT [60-63]. LCST линеарних полимера се често изједначава са VPTT одговарајућег хидрогела. Један од деликатнијих проблема у карактеризацији температурно осетљивих полимерних структура је процена везе између LCST линеарног полимера и VPTT одговарајућег хидрогела [64]. Одређивање VPTT или опсега температура у којима долази до промене у запремини је од значаја за њихову практичну примену [62]. Поред најзаступљеније методе, методе равнотежног степена бубрења [11, 65, 66], вредности температуре запреминског фазног прелаза могу се одредити и методом диференцијалне скенирајуће калориметрије (ДСК) [64, 67-69].

### 1.2.3.2. Хидрогелови осетљиви на промене рН средине

Осетљивост хидрогелова на промену рН средине последица је присуства јонских група у саставу полимера. Одговор се јавља у виду физичке промене хидрогела; средина одређене рН вредности и јонске јачине доводи до јонизације или неутрализације присутних група, јавља се електростатичко одбијање између истоимених наелектрисања, полимерна мрежа се шири и долази до значајније пенетрације флуида – бубрења хидрогела. Степен бубрења, односно степен јонизације киселих или базних група у полимерној мрежи рН осетљивих хидрогелова, драстично се мења на рК вредностима одговарајућих јонских група.



Слика 1.4: рН-осетљиво понашање хидрогелова.

Понашање хидрогелова при промени рН вредности се разликује у зависности од тога да ли је хидрогел анјонски или катјонски (слика 1.4). Анјонски хидрогелови садрже „киселе јонске групе“ попут карбоксилне или сулфонске и у ту групу спадају поли(акрилна киселина) [70-72] поли(метакрилатна киселина) [72, 73], поли(итаконска киселина) [74] и натријум алгинат [72, 75]. До њихове јонизације долази отпуштањем протона у базној средини, одакле следи да хидрогел бубри на  $pH > pK_a$ , док за  $pH < pK_a$  долази до његове контракције. Карактеристика бубрења на високим рН вредностима средине чини их погодним за отпуштање лековитих супстанци у доњем делу гастроинтестиналног тракта где је вредност рН око 8. Код катјонских хидрогелова (нпр. хидрогелови који садрже аминок групу) у киселој средини при



$pH < pK_b$  долази до јонизације услед везивања протона и услед одбијања истоимених наелектрисања хидрогел бубри, док у базној средини на  $pH > pK_b$  долази до отпуштања протона и хидрогел се контрахује [37]. Катјонски хидрогелови су погодни за контролисано отпуштање лековитих супстанци у желуцу где рН вредности варирају у опсегу од 1 до 3. Групи катјонских хидрогелова припадају поли(лизин), хитозан, поли(амидо амин), поли(L-аргинин) [76].

На бубрење рН осетљивих хидрогелова утичу: степен јонизације и рК вредности јонских група у полимеру, однос удела мономера у хидрогелу, густина умрежења и хидрофобност, односно, хидрофилност хидрогела. Такође, важни фактори су и средина у којој хидрогел бубри, њена рН вредност, јонска јачина и температура. Када је хидрогел изграђен од полимера са амфифилним групама, као што су протеини, на степен бубрења ће утицати однос катјонских и анјонских група у полимерном ланцу, који су углавном негативно наелектрисани при неутралним рН вредностима. За полиелектролите је карактеристично да бубре или на врло ниским или на врло високим рН вредностима средине.

Хидрогелови који поседују рН осетљивост имају значајан удео у изради система за контролисано отпуштање лекова који се користе у лечењу тумора. Микросредина тумора која је сачињена из ћелија тумора, стромалних ћелија (ћелија везивног ткива), цитокина, и матрикса брзо расте што доводи до велике промене у запремини ткива тумора услед ширења. Таква, новонастала, абнормална микросредина ткива је одређена ниским садржајем кисеоника [77, 78] и благо киселим вредностима рН (6.5-6.9) [79] што захтева посебан дизајн биоматеријала за онколошку терапију [80, 81]. Осмишљено је доста рН осетљивих формулација чији се рад заснива управо на киселом окружењу тумора [82], међутим ограничења у домену њихове примене као импланта, која су често везана за биоразградивост, усмерила су истраживања на развој биоразградивих рН осетљивих хидрогелова сачињених од природних полимера попут протеина, полисахарида и полипептида.

### ***1.2.3.3. Хидрогелови осетљиви на промене у температури и рН средине***

Температурно и рН осетљиви хидрогелови добијају се увођењем киселих или базних група у температурно осетљив хидрогел. Способност хидрогелова да реагују на промене рН и температуре средине уједно пружа и могућност контроле бубрења хидрогелова. Наиме, носачи за отпуштање лекова се могу синтетисати тако да реагују у уском интервалу физиолошких температура и у опсегу физиолошких рН које се крећу од око 1 до 7.4, где поједини делови тела могу имати и специфично рН окружење, као што је наведено у делу 1.2.3.2.

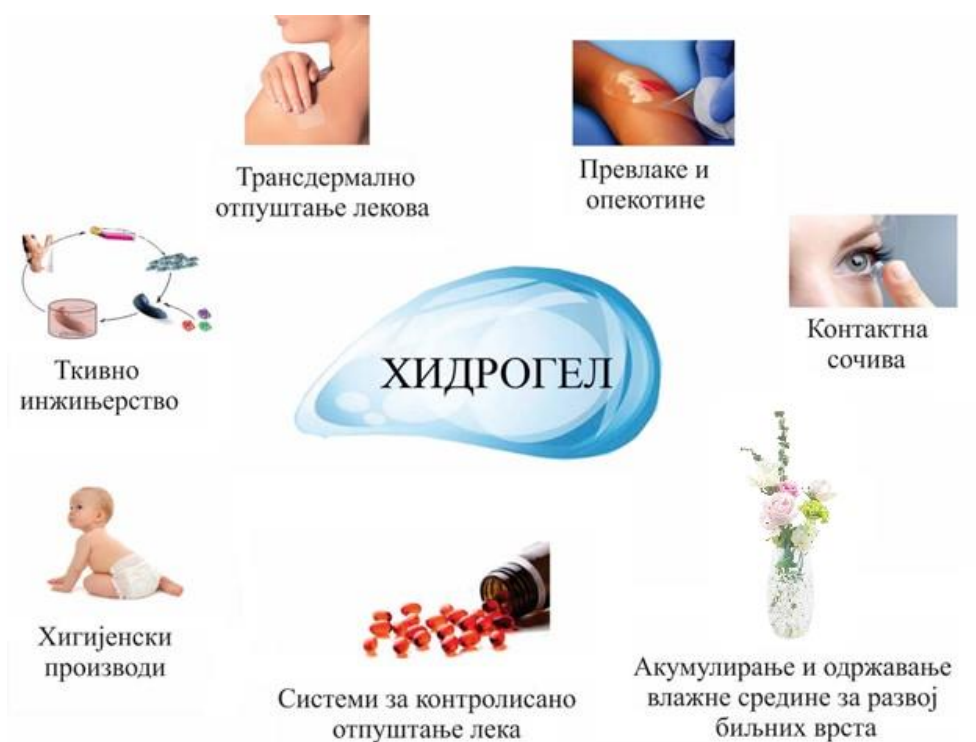
Пожељне карактеристике хидрогелова могу се постићи варирањем састава кополимера. Увођењем јонских група, додатком киселине, мења се однос хидрофилних и хидрофобних сегмената, чиме се повећава укупна хидрофилност услед чега долази до померања VPTT, углавном ка вишим температурама.

Померање VPTT услед прелаза из нејонизованог у јонизовани облик постиже се одговарајућом променом рН средине и тај феномен се назива рН индукована температурна осетљивост хидрогелова [83]. Формирање водоничних веза има значајну улогу у случају рН индуковане температурне осетљивости. Како у киселини све карбоксилне групе нису истовремено јонизоване, са повећањем рН средине изнад рК<sub>а</sub> вредности, постојаће и стања са делимично јонизованим групама. Електростатичко одбијање међу њима биће умањено због привлачног дејства водоничних веза са нејонизованим карбоксилним групама киселине услед чега се може јавити рН прелаз у којима ће вредности VPTT зависити и од температуре и од удела јонизованих група.

Од температурно и рН осетљивих хидрогелова највише су проучавани хидрогелови на бази поли(*N*-изопропил акриламида) (PNIPAM) и хитозана [84-86]. Такође, ова класа хидрогелова се показала интересантном за отпуштање инсулина, цитотоксичних лекова и цитостатика [84, 87, 88].

#### 1.2.4. Примена хидрогелова

Хидрогелови су класа синтетичких биоматеријала јединствених особина као што су висок садржај воде, порозност, мека конзистенција, флексибилност и биокомпатибилност. Симулирајући природна ткива, хидрогелови пружају могућност примене у различитим областима биомедицине (слика 1.5). Хидрогелови су комерцијално доступни као компоненте за прављење контактних сочива, хигијенских продуката, облога за опекотине и ране, као компоненте у системима за контролисано отпуштање лекова, матрикса у ткивном инжењерству, и др.



Слика 1.5: Примена хидрогелова у биомедицини.

#### Контактна сочива

Убрзо након објављеног истраживачког рада *Wichterle*-а и *Lim*-а 1960. године у коме су по први пут описани хидрогелови на бази поли(2-хидроксиетил) метакрилата (РНЕМА) као синтетички, биокомпатибилни материјали погодни за примену у производњи контактних сочива, почела је и њихова комерцијализација.

Показало се да су одређене физичке карактеристике (нпр. велика оптичка транспарентност, коефицијент преламања у задатом опсегу, задовољавајућа пропустљивост за кисеоник и воду, влажност (угао квашења), стабилност, одличне механичке особине и биокомпатибилност) полимерних хидрогелова неопходне за производњу контактних сочива [89]. Мека контактна сочива на бази РНЕМА садрже око 38-40% воде у потпуно хидратисаном

стању и та вредност не показује веће промене при утицају спољних фактора [89] што је такође пожељна карактеристика. Ипак, недостатак меких контактних сочива је у њиховој релативно слабој пропустљивости гаса што доприноси лишавању корнее (рожњаче) кисеоника. У циљу превазилажења тог недостатка, осмишљени су силиконски хидрогелови који су уједно данас и најзаступљенији. Имају добру пропустљивост за кисеоник, удобни су и показују добар угао квашења, али су подложни већој депозицији протеина од конвенционалних сочива што доводи до проблема са кварењем сочива.

Контактна сочива се могу користити, осим за корекцију вида, и као носачи за отпуштање лека. Ипак, конвенционална сочива на бази хидрогелова имају релативно мали капацитет упијања лека и често показују јако брзо отпуштање услед окуларне администрације [90].

Системи за испоруку лекова који реагују на спољне стимулансе предају средства која опонашају физиолошке хомеостатске повратне механизме који су од суштинског значаја за здравље [91]. У испоруци офталмолошких лекова, углавном су коришћени хидрогелови осетљиви на промене температуре и хидрогелови осетљиви на промене рН средине [92].

У офталмолошким студијама, температурно осетљиви хидрогелови имају температуру гелирања блиску температури рожњаче. На пример, истраживачи су синтетисали температурно осетљив хидрогел на бази хитозана и желатина са температуром гелирања на 34 °C за отпуштање лека латанопроста [93]. Испитивани хидрогел је у *in vivo* студији рађеној на очима зеца показао значајно смањење очног притиска за период од седам дана након локалне примене лека.

Хидрогелови са рН осетљивим компонентама су такође испитивани за офталмолошко отпуштање лекова. Они се најчешће састоје из полимерног материјала који је у облику течности на рН вредностима нижим од физиолошких рН (тј. 7.4) и који прелази у чврсто стање када рН средине достигне физиолошку вредност рН [94]. Тако су осмишљени и рН осетљиви кополимерни хидрогелови на бази РНМА и 2-(диизопропиламино) етил метакрилата (DPA) за *in vitro* отпуштање дексаметазона [95].

### *Облоге за опекотине и ране*

Хидрогелови представљају класу материјала који се широко користе у инжењерству меких ткива коже, крвних судова, мишића и масти [96]. Нерастворљива хидрофилна структура хидрогела изузетно опонаша особине природног екстрацелуларног матрикса које обезбеђују влажно окружење са изванредним потенцијалом за апсорпцију и лако уклањање ексудата ране омогућавајући притом дифузију кисеоника што доводи до бржег зарастања рана [97-99]. Од важности је да хидрогелови поседују високо хидрирану 3Д полимерну мрежу и да могу везати неколико пута више воде у поређењу са њиховом тежином у сувом стању и тако одрже висок ниво влаге у околини ране.

Због ових јединствених физичких својстава, хидрогелне мреже се могу направити у различитим величинама и облицима [100, 101]. Стога материјали на бази хидрогелова чине најприкладније облоге за збрињавање рана на кожи [102]. Ти материјали морају да задовоље основне захтеве биокомпатибилности у клиничкој употреби, као и да поседују јединствена физичка и механичка својства погодна за примену на оболелој кожи [103]. Штавише, хидрогел мора да обезбеди одговарајућу микрооколину за урастање судова и ћелијску пролиферацију.

Карактеристике идеалне облоге за ране су: одсуство токсичних компонента које могу да оштете ткиво или доведу до нежељених последица, онемогућавање бактеријске инфекције које би могле да наруше зарастање ране и да продуже лечење, оптимална адхезивност, одржавање влаге ради омогућавања ћелијске миграције и пролиферације, одржавање

оптималне температуре на месту повреде како би се смањила бол, апсорбовање вишка ексудата, пропустљивост за кисеоник како би се убрзала ћелијска активност, механичка и физичка својства таква да структуром сличе кожи, обезбеђивање минималне иритације ткива приликом апликације или уклањања, приступачност цене и доступност.

Данас постоје „паметни“ хидрогелови који се формирају прскањем *in situ*, који се примењују у лечењу рана. Међу бројним предностима облога сачињених од „паметних“ хидрогелова јесте и то што се може повећати продор наноконтролног хидрогела у подручје ране доприносећи тако побољшаној испоруци активних састојака или терапијских средстава за рану [104, 105]. Само неки од њих су хидрогелови на бази желатин метакрилата, капа-карагенан метакрилата и хитозана.

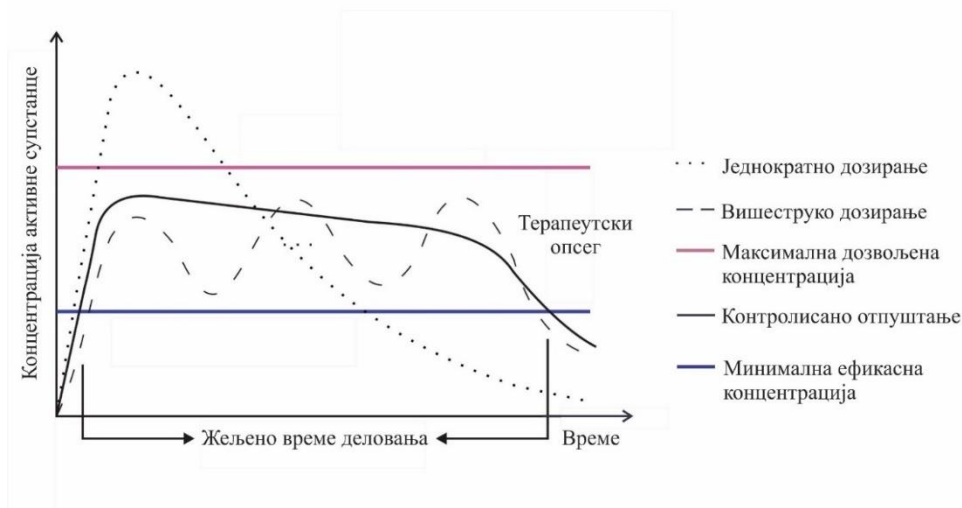
### *Хигијенски производи*

Суперапсорбујући хидрогелови (САХ) су први пут произведени у Јапану 1978. године као материјали за хигијенске улошке и то као умрежени кополимер скроба и полиакрилата [106]. САХ, посебно материјали на бази акрилата, имају широку употребу у хигијенским производима за апсорбовање флуида. Њихова предност је способност да држе влагу далеко од коже, притом унапређујући здравље коже и спречавајући осипе у пеленској регији [107]. Такође, САХ може да спречи колонизацију клицама, смањујући ризик од фекалних контаминација и потенцијално ширење гастроинтестиналне инфекције. Развој материјала који садржи ензиме и друге адитиве како би се спречила појава инфекција и непријатних мириса, као и биоразградивих материјала је од значаја.

Крајем 90. година двадесетог века, почели су да се производе и суперпорозни хидрогелови (СПХ). Прва генерација СПХ је направљена од изузетно хидрофилних акриламида, соли акрилне киселине и сулфопропил акрилата. Касније генерације СПХ су представљене као „хибридне“ јер су настале додавањем „хибридног агента“ (природног или водорастворљивог синтетичког или дисперзибилног полимера способног за хемијско или физичко умрежавање) претходно направљеном СПХ. Овом методом се добијају интерпенетрирајуће полимерне мреже. Најновији СПХ показује боље карактеристике, као што су механичка јачина и еластичност чак и у набубрелом стању [108].

### *Хидрогелови као носачи за контролисано отпуштање активних супстанци*

Примена хидрогелова као носача у системима за контролисано отпуштање активних супстанци биће детаљније описана, јер представља предмет ове дисертације. Систем за контролисано отпуштање лека чине активна супстанца (нпр. антибиотик, протеин, нуклеинска киселина, хормон, витамин, итд.) и носач од природног или синтетичког полимерног материјала. Како традиционално дозирање лека подразумева брзо достизање максималног ефективног нивоа концентрације активне супстанце у плазми, који може бити токсичан, а потом пад испод минимално ефективног нивоа где лек више не делује, замисао система је да се претходно инкорпорирана активна супстанца у полимерној матрици ослобађа на унапред дефинисан начин. Контролисано отпуштање подразумева одржавање нивоа концентрације активне супстанце у плазми у „терапијском опсегу“, између токсичне и неефикасне концентрације током дужег временског периода (слика 1.6) [109-111].



**Слика 1.6:** Профили отпуштања лека који се остварују конвенционалним методама (испрекидане линије) и у системима за контролисано ослобађање (пуна линија) лека, преузето и прилагођено из [112].

Носач за отпуштање активних супстанци мора поседовати одређена својства која би систем чинила погодним за *in vivo* примену као што су: велика сличност живим ткивима, бубрење, „интелигентна“ својства, нецитотоксичност, биокомпатибилност и биоразградивост [113]. Па тако, погодан систем за отпуштање активних супстанци требало би да буде инертан, биокомпатибилан, еластичан, хидрофилан у мери да се може постићи потребно складиштење лека, да је једноставан за уградњу активне супстанце, синтезу и стерилизацију [114, 115]. Такође, неопходно је да систем изврши отпуштање активне супстанце на месту њеног апсорбовања или деловања, у одређено време и у одређеној концентрацији, и само када је то потребно. Такву контролу је могуће постићи израдом система који се заснива на „паметним“ хидрогеловима [116].

- *Начини уградње активне супстанце у хидрогел*

Својства полимерних система за контролисано отпуштање лекова зависе од физичкохемијских особина и хидрогела и активне супстанце. Одабир хидрогела и механизма уградње активне супстанце мора бити усаглашен са својствима активне супстанце (хидрофилност, наелектрисање, величина молекула, пермеабилност и др.) и жељеним профилем отпуштања (тренутно, продужено или циљано отпуштање). Пожељно је да активна супстанца и хидрогел имају сличну хидрофилност и супротно наелектрисање.

Постоје три механизма уградње активне супстанце у хидрогел: (1) уградња дифузијом, (2) током синтезе хидрогела и (3) формирањем ковалентних веза између активне супстанце и функционалних група полимера [117].

Метода уградње дифузијом подразумева урањање хидрогела у раствор активне супстанце и представља најједноставнију методу [118, 119]. Она зависи од порозности хидрогела, величине молекула активне супстанце и хемијских својстава хидрогела и активне супстанце. Уградња у овакве системе је погодна само за мале молекуле, јер већи молекули (пептиди и протеини) не могу лако да дифундују кроз поре хидрогела. Очекивано трајање отпуштања из оваквог система је од неколико сати до неколико дана.

Уградња активних супстанци већих молекула се постиже тако што се активна супстанца меша са раствором мономера уз присуство умреживача и иницијатора при чему се

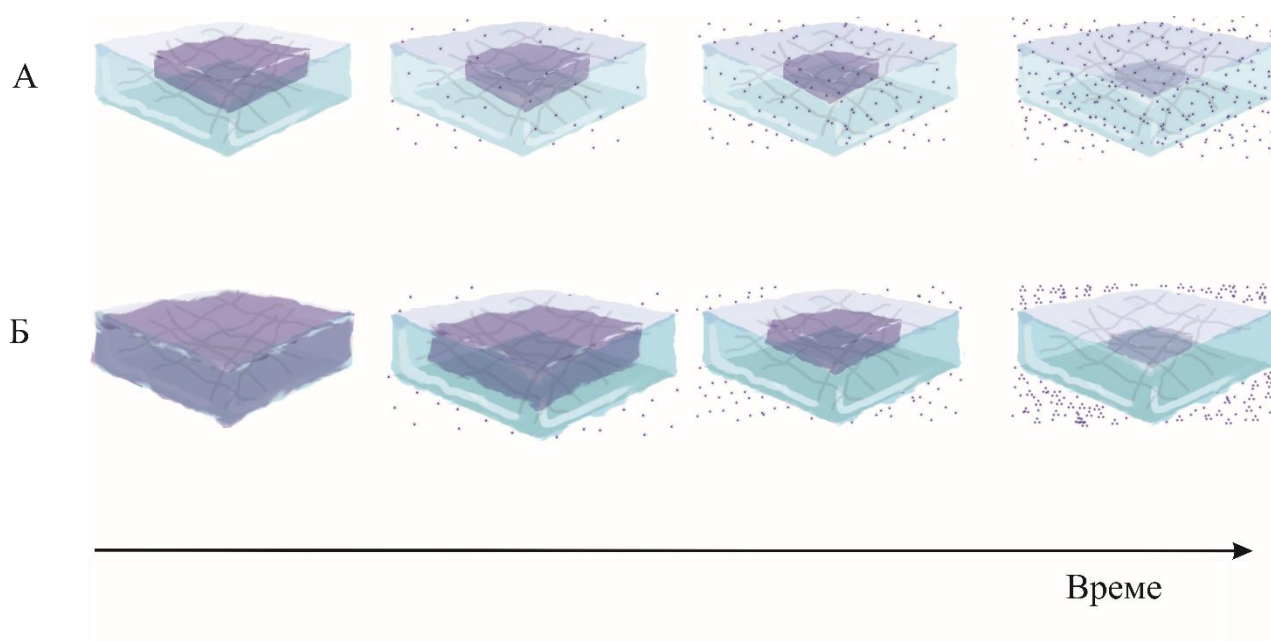
синтетише систем: хидрогел–активна супстанца. Очекивано трајање отпуштања активне супстанце из оваквог система је од неколико дана до неколико недеља.

Оба механизма уградње активне супстанце омогућавају слободно кретање активне супстанце из хидрогела што неретко може да доведе до пуцања хидрогела услед градијента концентрације између хидрогела и околине након *in vivo* примене [120].

Спречавање могуће изложености организма токсичним концентрацијама активне супстанце услед пуцања хидрогела је могуће задржавањем активне супстанце физичким и хемијским везама у полимеру [121]. Такви системи, у којима су формиране ковалентне везе активне супстанце са функционалним групама полимера, обезбеђују продужено отпуштање активне супстанце од неколико дана до неколико месеци.

- *Отпуштање активне супстанце контролисано дифузијом*

Механизам дифузијом контролисаног отпуштања активних супстанци из хидрогелова у окружујући медијум је најчешће коришћен. Погонску силу механизма чини градијент концентрације. Разликују се мембрански/резервоар системи и системи матрице (слика 1.7 а и б).



Слика 1.7: Системи код којих је отпуштање активне супстанце контролисано дифузијом: а) полимерна матрица и б) мембрански/резервоар системи.

Морфологија полимерних материјала кроз који се одиграва дифузија је од изузетног значаја за отпуштање активних супстанци. Систем полимерних матрица чини полимер - носач и активна супстанца хомогено распоређена у полимеру (диспергована или растворена) [111]. Разликују се два крајња случаја, када су димензије молекула активне супстанце много мање од величина пора хидрогела, па се коефицијент дифузије може повезати са порозношћу хидрогела, и када је величина пора реда величине молекула активне супстанце. У другом случају долази до пада коефицијента дифузије током отпуштања активне супстанце због просторних сметњи у виду полимерних ланаца унутар умрежене структуре. Дужина пута дифузије лека расте, па је потребно и дуже време за отпуштање доводећи до опадања брзине отпуштања активне супстанце што чини главни недостатак оваквог система [122-124]. За

систем полимерних матрица пресудна је геометрија система која условљава профил отпуштања активне супстанце.

Мембрански/резервоар систем чини језгро сачињено од активне супстанце обложено полимерном мембраном која представља инертну дифузиону баријеру. Карактеристика ових система је да се дифузија одвија пролазом између полимерних ланаца, па је брзина отпуштања углавном константна. Како је полимерна мембрана униформна и непроменљиве дебљине, брзина дифузије лека ће бити временски независна и углавном стабилна током периода предвиђеног за отпуштање [122]. Када овакав систем дође у контакт са водом, вода дифундује унутар система, раствара активну супстанцу и обезбеђује концентрацију једнаку максималној растворљивости активне супстанце. Активна супстанца даље дифундује кроз мембрану хидрогела у околну средину доводећи до пада концентрације активне супстанце. Нерастворна активна супстанца у хидрогелу наставља да се раствара како би поново достигла максималну концентрацију. Овако отпуштање активне супстанце из мембранског/резервоар система остаје непромењено током времена све док постоји нерастворена активна супстанца у хидрогелу [31]. Механичка својства полимерне мембране су веома важна за мембрански/резервоар систем јер отпуштања активне супстанце могу довести до настанка шупљина у полимерној мембрани што доводи до нежељеног и неуједначеног отпуштања. Такође, од значаја су и параметри попут дебљине полимерне мембране, градијента концентрације активне супстанце и хемијске структуре полимера који заједно утичу на количину активне супстанце која се отпушта.

Поред система за отпуштање контролисаних дифузијом, постоје још и системи код којих је отпуштање контролисано ерозијом полимерног система, бубрењем или дејством одређених стимуланса из околине [125].

Кинетика отпуштања активних супстанци у основи се заснива на једначинама дифузије које су детаљно описане у поглављу 1.2.2, а односе се и на транспорт флуида и на отпуштање активних супстанци. Како би се одредило да ли је дифузија доминантан процес, подаци добијени за отпуштање за почетни временски период отпуштања уносе се у једначину (1.20). [31, 40, 126].

- *Кинетика in vitro отпуштања активних супстанци*

Кинетика отпуштања активних супстанци из хидрогелова зависи од хемијског састава, структуре и начина добијања хидрогела, њихове геометрије и облика, спољашњих услова за време процеса отпуштања, као и хемијске структуре и величине молекула активне супстанце која се отпушта. Постоје различити профили отпуштања активних супстанци. У случају хидрогелова заступљен је профил код кога се могу разликовати две фазе отпуштања: спољашња дифузија или брзо отпуштање активне супстанце, када се јавља „ефекат пуцања“ или ткзв. рана фаза и унутрашња дифузија или спорије отпуштање активне супстанце, ткзв. касна фаза. Рану фазу одликује отпуштање активне супстанце везане на површини и слојевима близу површине диска хидрогела и ова апроксимација важи за првих 60% процеса ослобађања, док касна фаза важи за преосталих 40% процеса и описује механизам дифузије у порама хидрогела [38, 124]. За рану фазу процеса отпуштања користи се једначина:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \cdot \left( \frac{D_e t}{\pi \cdot l^2} \right)^{1/2} \quad 0 < \frac{M_t}{M_\infty} < 0.6 \quad (1.22)$$

која представља однос количине отпуштеног лека у времену  $t$  ( $M_t$ ) према крајњој количини отпуштеног лека ( $M_\infty$ ) за краћи временски период [122, 127, 128].  $D_e$  је дифузиони коефицијент флуида у раној фази, а  $l$  је дебљина узорка. Нагиб криве  $M_t/M_\infty$  у функцији од  $t^{1/2}$  даје

дифузиони коефицијент у раној фази отпуштања активне супстанце за дати хидрогел [38, 40, 129, 130].

За касну фазу отпуштања лека користи се релација [128]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \cdot \exp\left(\frac{-\pi^2 D_l t}{l^2}\right) \quad 0.6 \leq \frac{M_t}{M_\infty} \leq 1 \quad (1.23)$$

Одакле се израчунава дифузиони коефицијент за касну фазу,  $D_l$ , као нагиб криве  $\ln(1 - M_t/M_\infty)$  у функцији од  $t$  [40, 127, 129, 130]. Ово даје добре резултате само у системима где је дифузија доминантан процес отпуштања лека.

### 1.3. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

Међу многим полимерима који су истраживани и даље коришћени за синтезу температурно осетљивих хидрогелова, поли(*N*-изопропил акриламид) (PNIPAM), је најобимније испитиван. Поседује LCST чија је вредност блиска физиолошким температурама (око 32 °C), док на сам температурни прелаз не утиче промена концентрације или јонске јачине раствора [131-134]. PNIPAM је прво коришћен као компонента за припрему температурно осетљивих ињектибилних хидрогелова. Ипак, оспособљавање PNIPAM за примену у биомедицини подразумева померање LCST ка вишим температурама (углавном између 38 и 42 °C) [135]. Стога су хомополимери и кополимери на бази PNIPAM изазвали велику пажњу и уложен је велики напор истраживачке заједнице како би се постигло померање LCST кроз кополимеризацију са хидрофилнијим компонентама [136].

Упркос очигледним предностима, PNIPAM поседује и озбиљне недостатке: упитну биокомпатибилност, хистерезис фазног прелаза и значајни утицај терминалне групе на температурну осетљивост [134, 137-139]. Проблем акутне токсичности PNIPAM мономера као и хронична токсичност продуката деградације PNIPAM *in vivo* ограничавају његову клиничку примену [140, 141]. Полимери на бази олиго(алкилен гликол) метакрилата (OAGMA) представљају потенцијалну алтернативу PNIPAM за дизајнирање хидрогелова за биомедицинску примену због подесиве LCST и добре биокомпатибилности [142-145].

Посматрано са становишта температурно осетљивих материјала, постоји велико интересовање за ко(полимерне) структуре са кратким олиго(алкилен гликол) (OAG) бочним ланцима, тј. нелинеарним PEG/PPG аналозима [137, 144, 146-149]. Последњих неколико деценија, различити температурно осетљиви полимери попут поли(*N*-алкил акриламида), поли(2-алкил-2-оксозолина), поли(2-оксозина), полиетера, поливинил етера, поли(алкилен гликола), полипептида и одговарајући синтетичких поли(амино киселина) су такође препоручени за примену у биомедицини, али је само поли(етилен гликол) (PEG) постигао сличан ниво популарности као PNIPAM [137]. За разлику од токсичности која се приписује биоматеријалима на бази PNIPAM, PEG структуре су не-имуногене и не-цитотоксичне, одобрене од стране *US Food and Drug Administration* за многе клиничке примене [142]. Успех њихове примене је углавном приписан способности да смање адсорпцију протеина и ћелија, па самим тим и инфламаторне одговоре у односу на већину других тестираних материјала [150]. Такође, хидрогелови и продукти разградње биоматеријала на бази PEG се добро толеришу *in vivo* чинећи их тиме погодним за будућа клиничка испитивања [143].

Поли(пропилен гликол) (PPG) је такође из групе поли(алкилен гликола) (PAG). Присуство додатне хидрофобне  $\text{CH}_3$  групе, у односу на структуру PEG, има за последицу повећану хидрофобност што се одражава у значајном смањењу температуре прелаза за одговарајуће PG структуре [151, 152]. Ипак, повећавањем односа у корист хидрофилног PEG,



температура прелаза кополимерних структура може бити подешена у опсег физиолошких температура [151]. Тако, разнолики PEG и PPG кополимери са LCST вредностима од 20 до 85 °C су комерцијално доступни под именима попут плуроника, флоксамера и тетроникса [137].

Са друге стране, поли(етилен гликоли) су приметно заступљенији у научним радовима [137, 144, 149, 153-158] за разлику од поли(пропилен гликола) чије одсуство интересовања научне заједнице је највероватније последица њиховог слабог амфибилног карактера [159-161]. Тако, постоје свега неколико истраживачких радова који се озбиљно баве хомополимерним и кополимерним хидрогеловима на бази OPGMA [137, 162]. Температурно осетљив кополимер PEGMEMA-PPGMA-EGDMA је познат случај хидрогела на бази OPGMA [163]. Показало се да има потенцијал као фотополимеризациони материјал за *in situ* инжењеринг ткива и носач за отпуштање лекова [161, 164]. Такође, препознат је као потенцијално ињектибилан хидрогел, чији је основни недостатак биоразградивост при физиолошким условима приписан мономеру етилен гликол диметакрилату (EGDMA) [165].

Синтеза и особине хомополимерног POPGMA са OPG висећим ланцима, као нелинеарним PPGMA-аналогом, публикован је недавно први пут [152]. Уочена је висока сол-гел конверзија, чак и за мале дозе, што је указало на ефикасност радијационо индуковане радикалне полимеризације чинећи је пожељном, брзом и јефтиним методологијом за умрежавање хидрогелова на бази OPGMA. Такође, POPGMA хидрогел је показао задовољавајућу биокompatibilност, али температурна осетљивост и промене у капацитету бубрења су уочене углавном испод собне температуре (око 15 °C), ограничавајући тако његову потенцијалну примену за биомедицинска истраживања. Дакле, примена хидрогелова на бази OPGMA у биомедицинске сврхе условљена је померањем њихове температуре прелаза ка вишим температурама што се може постићи кополимеризацијом са неким хидрофилнијим мономером који поседује температурну осетљивост.

У најновијем раду *Wanka и сарадника* [166] чија је тема потрага за техничким решењима који се тичу адхезије нечистоћа, зооспора, и бактерија у морској средини, поли(етилен гликол) метакрилат је препознат као добро решење због своје инертности и способности да задржи воду у форми хидрогела. Ипак, истовремено је показао и велики афинитет ка привлачењу нечистоћа, што има за последицу смањење биорепулсивних карактеристика. У истој студији, PPGMA се истакао мањим степеном бубрења и скоро никаквом адхезијом нечистоћа на основу чега је предложено његово укључивање у даље испитивање амфибилних превлака које би имале особину одбијања нечистоћа са површине материјала.

## 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

### 2.1. МАТЕРИЈАЛИ КОРИШЋЕНИ ЗА СИНТЕЗУ ХИДРОГЕЛОВА НА БАЗИ ОЛИГО(ПРОПИЛЕН ГЛИКОЛ) МЕТАКРИЛАТА

За синтезу кополимерних хидрогелова на бази олиго(пропилен гликол) метакрилата употребљени су следећи реактанти:

- Мономери: олиго(пропилен гликол) метакрилат, олиго(пропилен гликол<sub>6</sub>-етилен гликол<sub>3</sub>) метакрилат, олиго(пропилен гликол<sub>3</sub>-етилен гликол<sub>6</sub>) метакрилат, олиго(етилен гликол) метакрилат, 2-хидроксиетил метакрилат и итаконска киселина.
- Умрежавач: етилен гликол диметакрилат.

За испитивање контролисаног отпуштања лека као модел-лек коришћен је натријум диклофенак, док су за праћење отпуштања лека и праћење процеса бубрења коришћени ацетатни, фосфатни и амонијачни пуферски раствори.

Све коришћене супстанце су комерцијални производи високе чистоће и употребљиване су без даљег пречишћавања.

#### Олиго(пропилен гликол) метакрилат (OPGMA, PG<sub>5</sub>MA)

Олиго(пропилен гликол) метакрилат је мономер нерастворан у води услед присуства хидрофобних пропилен гликолних јединица због чега доприноси укупној хидрофобности полимера и даје му чврстоћу.

За синтезу хидрогелова је коришћен OPGMA који садржи пет пропилен гликолних (PG) јединица у главном ланцу молекулске масе,  $M_w=375 \text{ g/mol}$  и густине  $1.01 \text{ g/cm}^3$  на температури  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , произвођача *Cognis*, Велика Британија.

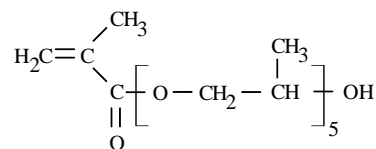


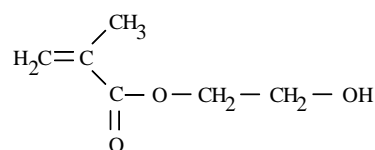
Схема 2.1: Структурна формула пропилен гликол метакрилата.

#### 2-хидроксиетил метакрилат (HEMA)

Као мономер HEMA је често коришћен у синтезама „паметних“ хидрогелова. Хидрогелови на бази HEMA су хидролитички стабилни, показују добру *in vitro* и *in vivo* биокомпатибилност и могу се дизајнирати тако да им садржај воде и еластичност буде сличан телесним ткивима [167]. Као последица тога, ови полимерни хидрогелови су међу најчешће истраживаним, патентираним, и успешно комерцијализованим биомедицинским полимерима. PHEMA хидрогел показује добру компатибилност према крви [168] и користи се за добијање контактних сочива, вештачких тетива, коже и јетре, вештачке хрскавице, у максифацијаној реконструкцији, и др [36]. Међутим, слабије механичке особине или низак капацитет отпуштања инкорпориране супстанце у неким случајевима ограничавају њихову примену.

Развијене су бројне методе модификовања РНЕМА са циљем да се побољшају његове механичке особине и добије бољи физиолошки одзив [169]. Неке од тих модификација подразумевају промену умреживача или његову концентрацију, оптимизацију услова полимеризације или примену радијационог умрежавања [170, 171]. Са друге стране, како је РНЕМА нејонски гел максималног степена бубрења до око 40% [172], добијање рН осетљивих хидрогелова и хидрогелова са већим степеном бубрења подразумева његову кополимеризацију са рН осетљивим компонентама као што су акрилатна [173], метакрилатна [174] или итаконска киселина [175].

У овој докторској дисертацији за синтезу хидрогелова коришћен је 2-хидроксиетил метакрилат молекулске масе,  $M_w=130.14 \text{ g/mol}$  и густине  $1.07 \text{ g/cm}^3$  произвођача *Sigma Aldrich*, Немачка.

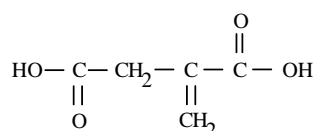


**Схема 2.2:** Структурна формула 2-хидроксиетил метакрилата.

#### *Итаконска киселина (IA)*

Итаконска киселина је дикарбоксилна киселина природног порекла. Комерцијално се производи ферментацијом угљених хидрата, првенствено глукозе, деловањем гљивица *Aspergillus terreus*. IA се често користи за кополимеризацију са другим мономерима како би се произвели материјали који показују добар рН одзив и пораст степена бубрења за рН вредности изнад константи дисоцијације за IA [176]. У случају кополимеризације са НЕМА, уочено је да IA побољшава не само степен бубрења, већ и антимикробну активност и биокомпатибилност НЕМА хидрогела [177].

За синтезу хидрогелова је коришћена итаконска киселина молекулске масе,  $M_w=130.1 \text{ g/mol}$  и густине  $1.57 \text{ g/cm}^3$  произвођача *Sigma Aldrich*, Немачка.



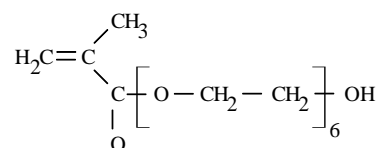
**Схема 2.3:** Структурна формула итаконске киселине.

#### *Олиго(етилен гликол) метакрилат (OEGMA, EG<sub>6</sub>MA)*

Олиго(етилен гликол) метакрилат припада групи температурно осетљивих полимера са вредностима критичне температуре растварања у опсегу од 60 до 90 °C у зависности од дужине EG ланца [178]. LCST полимера на бази OEGMA се може прецизно подесити у опсег физиолошких температура насумичном полимеризацијом OEGMA мономера са различитим дужинама OEG бочног ланца [147, 179]. Како је линеарни поли(етилен гликол) (PEG) нетоксичан и анти-имуноген, температурно осетљиви POEGMA припремљен полимеризацијом метакрилатног ланца је постао атрактиван композитни полимер у биомединоској примени захваљујући управо поменутиим карактеристикама PEG [179]. Микрогелови на бази OEGMA мономера са одређеним тополошким структурама су

синтетисани и њихова примена као биомедицинских материјала је широко проучавана [180-182].

За синтезу хидрогелова је коришћен EG<sub>6</sub>MA молекулске масе, M<sub>w</sub>=350 g/mol произвођача *Cognis*, Велика Британија.

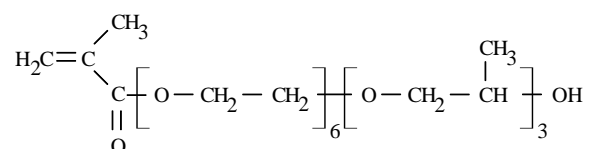


**Схема 2.4:** Структурна формула етилен гликол метакрилата.

(Пропилен гликол<sub>3</sub>-етилен гликол<sub>6</sub>) метакрилат (PG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA)

PG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA је олигомер са три пропилен гликолне (PG) и шест етилен гликолних (EG) јединица у главном метакрилатном ланцу.

За синтезу хидрогелова је коришћен PG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA молекулске масе, M<sub>w</sub>=524 g/mol произвођача *Cognis*, Велика Британија.

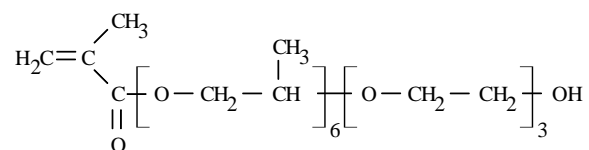


**Схема 2.5:** Структурна формула (пропилен гликол<sub>3</sub>-етилен гликол<sub>6</sub>) метакрилата.

(Пропилен гликол<sub>6</sub>-етилен гликол<sub>3</sub>) метакрилат (PG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA)

PG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA је олигомер који садржи шест пропилен гликолних (PG) и три етилен гликолне (EG) јединице у главном метакрилатном ланцу.

За синтезу хидрогелова је коришћен PG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA молекулске масе, M<sub>w</sub>=566 g/mol произвођача *Cognis*, Велика Британија.

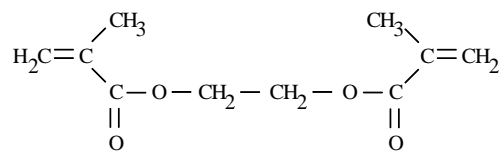


**Схема 2.6:** Структурна формула (пропилен гликол<sub>6</sub> - етилен гликол<sub>3</sub>) метакрилата.

Етилен гликол диметакрилат (EGDMA)

EGDMA је дифункционализованани метакрилатни мономер који услед присуства полимеризујућих група на оба краја ланца омогућава брзу и интензивну динамику умрежавања, па је стога један од најчешће коришћених умреживача [183, 184].

Као умреживач приликом синтезе хидрогелова коришћен је EGDMA молекулске масе, M<sub>w</sub>=198.2 g/mol и густине 1.05 g/cm<sup>3</sup> произвођача *Sigma Aldrich*, Немачка.



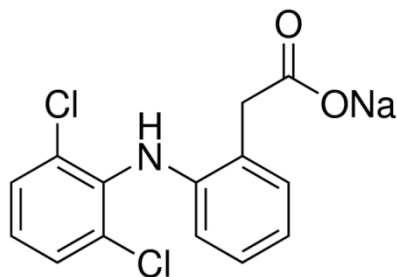
**Схема 2.7:** Структурна формула етилен гликол диметакрилата.

### *Натријум диклофенак*

2-[2-[(2,6-дихлорофенил)амино]фенил] ацетатна киселина (IUPAC) је органски молекул познатији као диклофенак молекулске формуле  $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$

Диклофенак се може класификовати као аналгетик, антиреуматик, инхибитор циклооксигеназе или нестероидни антиинфламаторни лек (НСАИЛ). Инхибиција ензима циклооксигеназе који је одговоран за конверзију арахидоничне киселине у простагландин главни је познати механизам деловања диклофенака [185, 186]. Међутим, постоје индикације да се механизму његовог дејства могу приписати и инхибиција липооксигеназе, чиме се редукује формирање леукотриена, масних молекула имуног система који доприносе инфламацији, и фосфолипазе А2 [187]. Исто тако, уочена је и бактериостатска активност диклофенака којом се инхибира синтеза бактеријске ДНК [188].

За испитивање синтетисаних хидрогелова као носача за контролисано отпуштање лекова коришћен је натријум диклофенак или 2-[(2,6 дихлорофенил)амино] бензоева киселина мононатријумове соли (Галеника, Београд). У питању је бели или незнатно жути кристални прах молекулске бруто формуле  $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$  и молске масе 318.13 g/mol.



**Схема 2.8:** Структурна формула натријум диклофенака.

Натријум диклофенак је со слабе киселине (pKa 4.16) чија растворљивост у различитим растварачима битно зависи од присуства хетероатома (N, O, Cl и Na) који доводе до високе поларизабилности молекула, па тако и до специфичних интеракција са растварачима [189]. На 25 °C растворљивост диклофенака у води варира између 50 g/l [190], 20.4 g/l [189] и 0.003-21 g/l [191] према литератури, и притом спада у групу умерено до слабо водорастворних активних супстанци [192]. Карактеристика ове групе лекова је да само мала количина лека дифундује до места деловања што је често недовољно за постизање терапеутског ефекта [193]. Због кратког биолошког полуживота (око 2 h) [194, 195] и брзе стопе елиминације (1.2-1.8 h) [194-196], честа употреба диклофенака је неретко неопходна како би се одржале терапеутске вредности концентрације што повећава ризик од нежељених дејстава лека. Како би се превазишла ограничења неопходно је да се дизајнира одговарајући носач овог типа лека који ће моћи да заштити лек, транспортује га на жељено место и ослободи жељену количину лека у сваком тренутку током терапије.

## Пуферски раствори

Праћење процеса бубрења хидрогелова је изведено у пуферским растворима рН вредности у опсегу од 2.2 до 9.0. Коришћени су: ацетатни пуфери (рН 3.85, 4.5, 5.45), фосфатни пуфери (рН 2.2, 6.8, 7.4) и амонијачни пуфер (рН 9.0). За припрему пуферских раствора коришћени су: хлороводонична киселина (HCl), *Lach Ner*, Чешка, калијум дихидроген фосфат (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) и дикалијум хидроген фосфат (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), *Merck*, Немачка, фосфорна киселина (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), *Merck-Alkaloid*, Македонија, глацијална сирћетна киселина (CH<sub>3</sub>COOH), натријум ацетат (CH<sub>3</sub>COONa), амонијум хидроксид (NH<sub>4</sub>OH) и амонијум хлорид (NH<sub>4</sub>Cl), *Zorka Pharma*, Србија и натријум хидроксид (NaOH), *MosLab*, Србија.

Јонска јачина раствора је била константна и износила је 0.1 mol/dm<sup>3</sup>. У свим синтезама хидрогелова, као и за припрему пуферских раствора коришћена је деминерализована вода добијена пречишћавањем дестиловане воде помоћу *Milli-Q Water* система са четири јоноизмењивачке колоне (*Millipore Corporations*).

## 2.2. ФИЗИЧКОХЕМИЈСКЕ МЕТОДЕ КАРАКТЕРИЗАЦИЈЕ ХИДРОГЕЛОВА

### 2.2.1. Гравиметријске методе

#### 2.2.1.1. Одређивање садржаја гел фазе

Неопходна процедура за отклањање неизреагованих материја и одређивање садржаја гел фазе подразумева сушење хидрогелова до константне масе, њихово подвргавање Soxhlet екстракцији водом и накнадно сушење у вакуум сушници на 50 °C до константне масе [197]. Из односа маса ксерогела пре ( $m_0$ ) и после ( $m_g$ ) екстракције, рачунат је масени удео гела у датој мрежи, односно садржај гел фазе према једначини:

$$\text{Садржај гел фазе (\%)} = \frac{m_g}{m_0} \cdot 100 \quad (2.1)$$

#### 2.2.1.2. Равнотежно и кинетичко бубрење

Хидрогелови су гравиметријски испитивани равнотежним бубрењем у пуферским растворима рН вредности од 2.2 до 9.0 и у температурном опсегу од 5 до 80 °C. Анализа је рађена потапањем диска ксерогела, масе око 0.02 g и дебљине око 1.3 mm, у пуферски раствор одређене рН на одређеној температури. У задатим временским интервалима гел је вађен из раствора и након брисања вишка течности са површине гела филтер папиром, бележена је маса, након чега је гел поново враћан у пуферски раствор у ком је започета анализа. Мерење је извођено до достизања равнотежног степена бубрења [30]. Равнотежни степен бубрења ( $q_e$ ) рачунат је према једначини (1.15) датој у поглављу 1.2.2 при чему су сви експерименти бубрења рађени у трипликату.

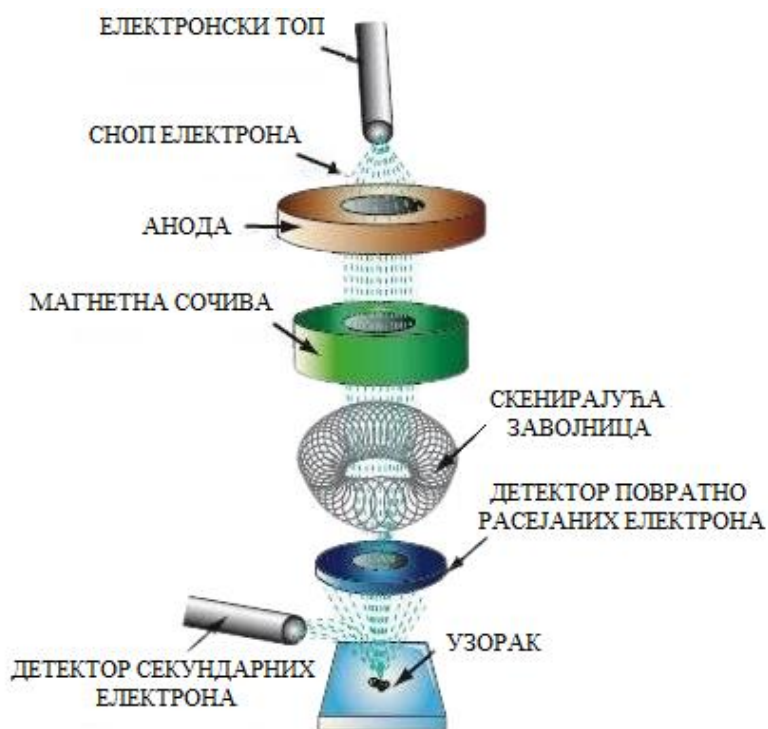
### 2.2.2. Скенирајућа електронска микроскопија

Скенирајући електронски микроскоп (SEM) је уређај који се користи за карактеризацију морфологије, топологије и детаљне површинске структуре чврстих материјала. За разлику од оптичке микроскопије која користи извор светлости и стаклена

сочива за добијање увећаних слика, СЕМ користи високоенергетске снопове електрона и електростатичка или електромагнетна сочива за добијање слика много веће резолуције [198].

Принцип рада се заснива на скенирању површине испитиваног материјала фокусираним снопом високоенергетских електрона при чему електрони ступају у интеракцију са узорком и добијају се сигнали карактеристични за атомски састав и топографске детаље испитиваног узорка [199].

Инструмент се састоји из електронског топа, аноде, магнетних сочива, скенирајуће завојнице и детектора секундарних и повратно расејаних електрона у високом вакууму (слика 2.1). На врху инструмента налази се електронски топ који служи за производњу и убрзавање електрона. Најчешће коришћени извори електрона су волфрамове нити, чврсти кристали ( $\text{CeB}_6$  или  $\text{LaB}_6$ ) или тзв. FEG (енг. *field emission gun*) извори електрона. Позитивно наелектрисана анодна плоча, постављена ниже од електронског топа, привлачи електроне при чему се формира електронски снап. Систем магнетних сочива постављен даље на путу електронског снопа, има улогу да фокусира снап на веома малу тачку на узорку која истовремено одређује и резолуцију инструмента, док скенирајућа завојница омогућава скенирање површине узорка скретањем снопа [200]. На доњем крају инструмента налази се узорак. Сноп емитованих (примарних) електрона може бити пречника неколико  $\mu\text{m}$ , да би на крају био фокусиран на тачку величине 1 или 2  $\text{nm}$  на узорку [201]. Интеракција примарних електрона са узорком доводи до емисије секундарних електрона, повратно расејаних електрона, рендгенских зрака и трансмитованих електрона. За потребе осликавања СЕМ техником, од значаја су само секундарни и повратно расејани електрони, па се тако могу разликовати слике секундарних електрона и слике повратно расејаних електрона [200].



Слика 2.1: Схема СЕМ инструмента, преузето и прилагођено из [202].

Секундарни и повратно расејани електрони настају различитим механизмима и бивају раздвојени на основу енергија. Повратно расејани електрони се рефлектују назад након еластичне интеракције између зрака и узорка и имају енергије веће од 50 eV. Насупрот томе, секундарни електрони потичу од атома узорка; резултат су нееластичних интеракција између снопа електрона и узорка и имају енергију мању од 50 eV.

Повратно расејани електрони настају на већим дубинама испитиваног узорка, док секундарни електрони настају на површини или унутар првих неколико нанометара површине узорка. Из истог разлога, ови електрони носе различите врсте информација, повратно расејани електрони су високо осетљиви на разлике у атомском броју (што је већи атомски број, то је и материјал светлији на слици), док секундарни електрони могу дати детаљне информације о површини узорка.

Пропорционална зависност броја повратно расејаних електрона који стигну до детектора и њиховог атомског броја омогућава разликовање фаза унутар испитиваног узорка, дајући слику о саставу узорка. Сlike повратно расејаних електрона такође могу дати информације о кристалографији, топографији и магнетном пољу узорка. Са друге стране, секундарни електрони су веома корисни за испитивање топографије површине узорка.

Главне одлике СЕМ су висока резолуција (неколико nm) слика [198], постизање увећања до  $2 \cdot 10^6$ , снимање области узорка ширине од 1 до 5  $\mu\text{m}$  и омогућавање површинске карактеризације узорка. Међутим, уколико испитивани узорак није проводан, потребно је нанети проводни материјал што се најчешће ради напаравањем злата теником вакуумске депозиције или спатеровањем. Такође, висок вакуум може изазвати губитак материјала, самим тим и воде, па је потребно фиксирати испитивани узорак за подлогу и контролисано га дехидрирати што усложњава даљу припрему узорка [203].

Морфолошка карактеризација ксерогелова вршена је помоћу *JEOL JSM-6460 LV* скенирајућег електронског микроскопа. Ксерогелови су добијени четрдесетосмочасовним сушењем хидрогелова у вакуум сушници на 50 °C. За снимање су коришћени нелиофилизоване и лиофилизоване узорци. Хидрогелови су бубрени до равнотеже на собној температури у пуферу рН 7.4, а потом остављени 24h на -80 °C након чега су лиофилизоване. Леофилизација је изведена у леофилизатору *Modulyo Freeze Dryer System Edwards*, који се састоји из јединице за леофилизацију и пумпе која обезбеђује високи вакуум (енг. *High Vacuum Pump E2M8 Edwards*), у којој је вакуум износио око 4 mbar током 24h. Узорци су пре посматрања напарени танким слојем злата у вакууму, а затим снимани при различитим увећањима.

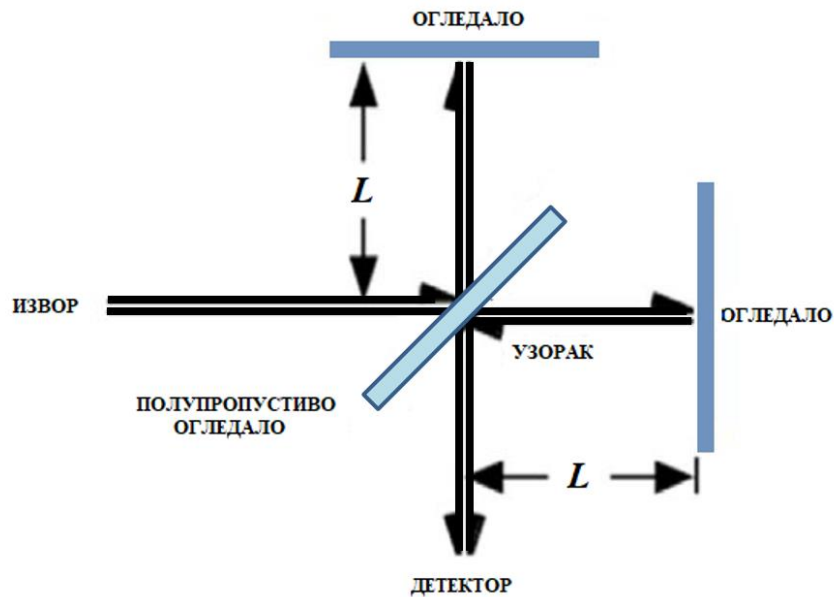
### 2.2.3. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом

Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом је неструктивна техника вибрационе спектроскопије која пружа информације о структури материје на молекулском нивоу. Овом техником се бележе промене у интензитету снопа инфрацрвеног зрачења у функцији од таласне дужине или фреквенције (2.5 - 5  $\mu\text{m}$ , односно 4000 - 200  $\text{cm}^{-1}$ ) након интеракције са узорком. Добијени однос интензитета пре и после интеракције зрачења са узорком у зависности од фреквенције зрачења назива се инфрацрвени спектар. На тај начин, инфрацрвеном спектроскопијом се одређују компоненте или групе атома које апсорбују инфрацрвено зрачење на специфичним вибрационим фреквенцијама и омогућава идентификација молекулске структуре узорка. На слици 2.2 приказана је схема ФТИЦ инструмента.

Принцип рада обухвата дељење светлости из извора на два снопа истог интензитета помоћу полупропустљивог огледала, након чега снопови доспевају на преостала два периферна огледала, бивају рефлектовани полупропустљивим огледалом, рекомбинују се и пролазе кроз узорак до детектора. Систем периферних огледала је такав да је једно огледало причвршћено, док је друго покретно. Када се промени положај покретног огледала, два светлосна зрака пре него што ће доћи до њихове рекомбинације прелазе различита растојања и долази и до конструктивне и до деструктивне интерференције. Померањем огледала

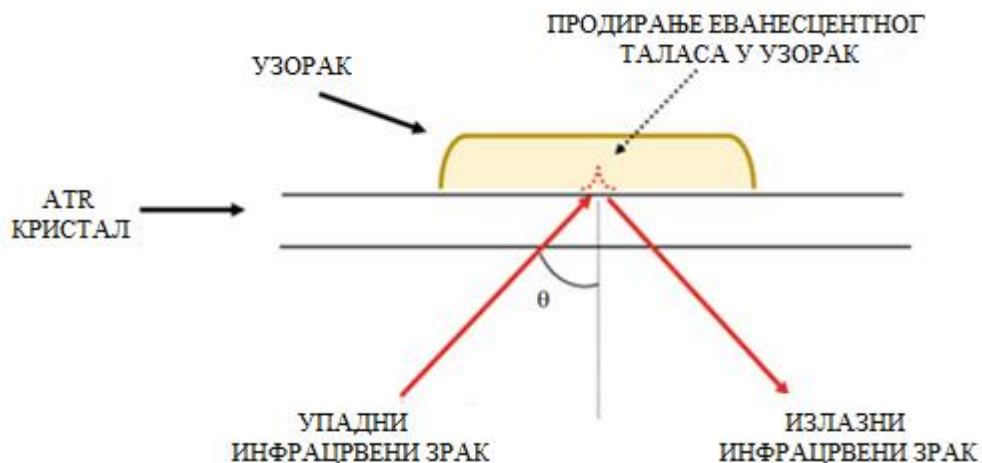


детектује се и промена сигнала [200]. Применом математичке функције Фуријеове трансформације добија се средњи део инфрацрвеног спектра у ком број пикова одражава број компоненти које се могу детектовати у узорку [204].



Слика 2.2: Схема ФТИЦ спектрометра, преузето и прилагођено из [200].

Принцип рада ФТИЦ са додатком за ометену тоталну рефлексију (енг. *attenuated total reflection*) подразумева пролазак инфрацрвеног зрачења кроз унутрашњи рефлексциони елемент и узорак. Унутрашњи рефлексциони елемент је кристал великог индекса преламања који пропушта инфрацрвене зраке. Кристал служи да усмери сноп на узорак и омогући потпуну рефлексију зрака. Како су кристал и узорак у директном контакту, само део инфрацрвеног зрака продире (неколико микрона) у дубину узорка, тзв. површински (еванесцентни) талас, и ступа у интеракцију са узорком. Након одбијања таласа од површине узорка, одбијајући се више пута о горњу и доњу површину кристала губи се део енергије зрачења на таласним дужинама на којима испитивани узорак апсорбује. Техника се базира на мерењу промена које се јављају у укупном унутрашњем рефлектованом таласу након контакта површинског зрака са узорком (слика 2.3).



Слика 2.3: Принцип ометене тоталне рефлексије, преузето и прилагођено из [205].

Употреба ФТИЦ технике са додатком за ометену тоталну рефлексију има бројне предности: већа површина узорковања, лакша припрема узорка, спектрална репродуктивност, већи однос сигнал-шум, применљивост на водене узорке и смањено расејање светлости [205].

Применом инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом анализирана су структурна својства хидрогелова. Испитивања су изведена на дисковима ксерогелова на собној температури у рефлексионом моду коришћењем *Nicolet 380 FTIR Spectrophotometer Thermo Scientific* са додатком за ометену тоталну рефлексију у спектралном интервалу од 4000 до 400  $\text{cm}^{-1}$  и резолуцијом од 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 2.2.4. Спектроскопија у ултраљубичастој и видљивој области спектра

Уљ-Вид спектроскопија је брза аналитичка техника која се заснива на пригушењу мерења електромагнетног зрачења апсорбујућом супстанцом [206]. Слабљење може бити последица рефлексије, расејања, апсорпције или интерференције. Спектроскопска анализа се обично спроводи у растворима, али се могу проучавати и чврсте материје и гасови. Опсег рада спектрофотометра је од 190 до 800 nm. У неким границама, апсорбанција је пропорционална концентрацији анализата и удаљености светлости када прође кроз узорак током озрачивања. Овај однос је дефинисан Ламберт-Беровим (енг. *Beer-Lambert law*) законом:

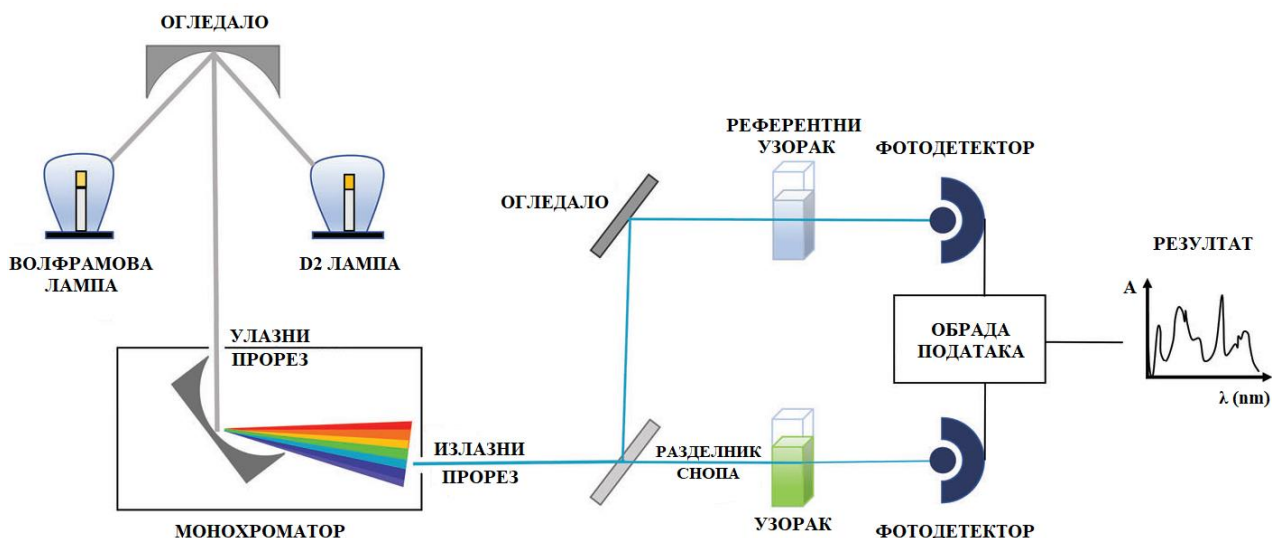
$$A = -\log \frac{I_1}{I_0} = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (2.2)$$

где је  $I_0$  интензитет светлости која излази из референтне кивете се сматра интензитетом упадне светлости, а  $I_1$  интензитет светлости који излази из кивете са раствором узорка представља интензитет пропуштене светлости;  $A$  означава апсорбанцију на одређеној таласној дужини,  $\varepsilon$  је моларни коефицијент апсорпције ( $\varepsilon, \text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (зависан од таласне дужине),  $l$  је дужина пута ( $l, \text{cm}$ ) кроз који светлост пролази, а  $c$  је концентрација апсорбера ( $c, \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) [206, 207]. На овај линеарни однос могу утицати различити фактори као што су карактеристике спектрофотометра, фотодеградација молекула, присуство распршених или апсорбујућих сметњи у узорку, флуоресцентна једињења у узорку, интеракције између анализата и растварача и рН [206, 207].

*Хромофоре* су добро дефинисане атомске структуре у великим молекулама које због своје специфичне апсорпције дају боју молекулама. Промена њиховог окружења било додавањем другог једињења или променом физичког окружења, као што је повећање температуре, може променити нивое њихове енергије, а самим тим и таласну дужину и интензитет апсорпције. Ковалентно засићене групе које не апсорбују Уљ-Вид електромагнетно зрачење, али утичу на апсорпцију хромофорних група називају се *ауксохроме*. Када Уљ-Вид зрачење погоди хромофоре, електрони се побуђују, при чему ауксохроме донирају електроне и утичу на обојеност хромофора док саме не мењају боју. Вода и алкохоли су углавном провидни и не апсорбују у Уљ-Вид опсегу и представљају погодне медијуме за Уљ-Вид спектроскопију [208].

Уљ-Вид спектрофотометар се састоји из извора зрачења, монохроматора или филтера, одељка за кивете и детектора (**слика 2.4**).

Мерна светлост бива диспергована помоћу призме или решеткастог монохроматора. Са деутеријумском лампом за ултраљубичасти део спектра (190-380 nm) и волфрамовом лампом за видљиви део спектра (380-800 nm), ови инструменти омогућавају континуирано варирање таласне дужине у целом спектралном региону. Положај дисперзионог елемента одређује таласну дужину зрака који ће проћи кроз излазни прорез [209].



Слика 2.4: Схема двозрачног Уљ-Вид спектрофотометра, преузето и прилагођено из [208].

Избор кивета за мерење зависи од области у којима се снимање врши. Стаклене и пластичне кивете се могу користити за снимање у видљивој области електромагнетног спектра, док се за потребе снимања у Уљ-области преважно користе кварцне кивете. Концентрација апсорбујуће супстанце мора бити ниска (ред величине  $10^{-3}$  -  $10^{-5}$  M) [209].

Као детектори често се користе фотомултипликатори због добре осетљивости у Уљ-Вид области.

Абсорбанција узорка се одређује поређењем абсорбанције раствора у коме се налази узорак и абсорбанције референтног узорка (раствора који не садржи узорак за који се одређује абсорбанција) чиме се елиминише абсорпција других супстанци попут растварача, ваздуха и сл.

Резултати се углавном добијају у виду графика који садрже основну линију на дну са пиковима усмереним нагоре, вредностима таласних дужина у нанометрима (nm) на x-оси и абсорбанције (A) на y-оси (без јединица). Абсорбанца представља колико се светлости абсорбује на свакој таласној дужини и од највећег значаја је таласна дужина на којој се јавља њен максимум.

Уљ-Вид спектроскопија је неструктивна, јефтина и погодна је за широку класу једињења са добром прецизношћу, осетљивошћу и кратким временом анализе. Међутим, спектре је тешко интерпретирати за смеше [210].

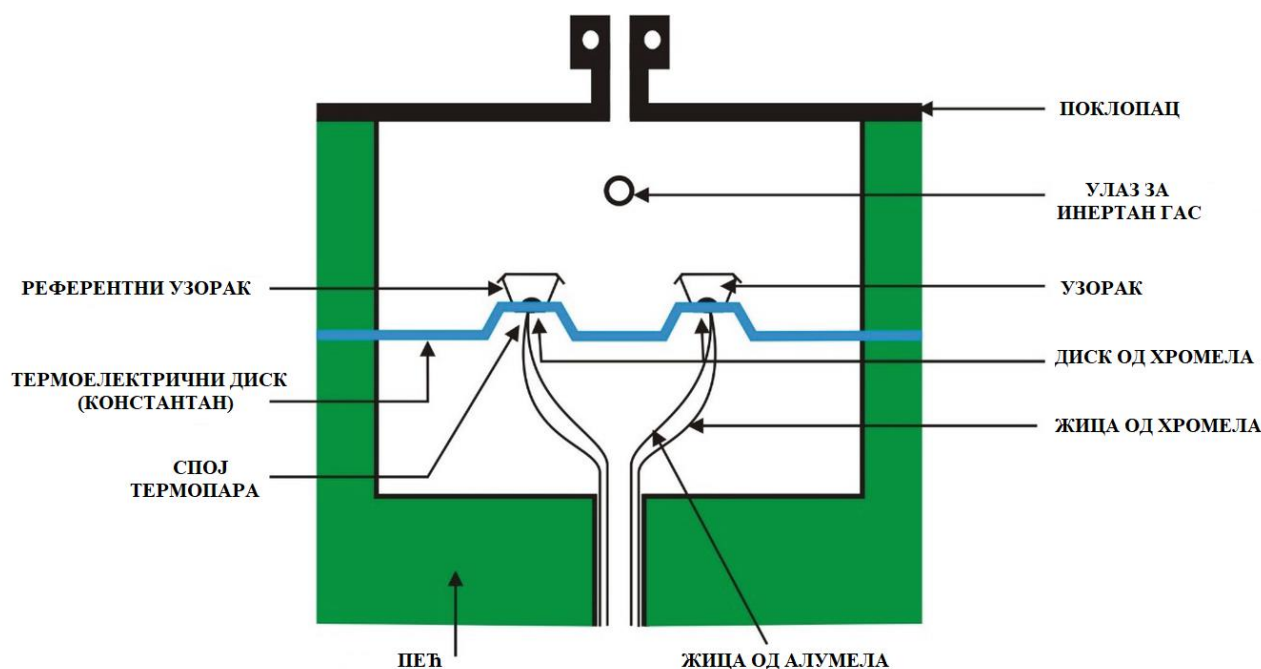
Уљ-Вид мерења су изведена на спектрофотометру *Shimadzu 1800 UV-Vis Spectrophotometer* у опсегу таласних дужина од 1100 до 190 nm. Мерени су спектри за различите концентрације (0.3, 1 и 3 wt%) мономера OPGMA у растворима пуфера pH вредности 2.2 и 7.4. Апсорпциони спектри су снимани на свака 2 °C у опсегу температура од 4 до 80 °C, при брзини грејања од 0.2 °C/min. Мерења су такође урађена и за 2 wt% мономера PG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA и PG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA у растворима пуфера pH 2.2 и 7.4. LCST профили су одређени из вредности абсорбанција на таласној дужини од 650 nm [152, 160].

Уљ-Вид мерења су такође коришћена и за праћење отпуштање диклофенака из PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA, PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA и P(OPGMA/OEGMA) хидрогелова на таласној дужини од 276 nm [211, 212].

## 2.2.5. Диференцијална скенирајућа калориметрија

Диференцијална скенирајућа калориметрија (ДСК) је техника која региструје енергију потребну за одржавање нулте температурске разлике између испитиваног узорка и референтног узорка, при унапред дефинисаној брзини грејања, односно хлађења. Главне примене ДСК технике су у термијској анализи материјала у области полимера и фармације у виду одређивања температура фазних промена и њихових топлотних ефеката [213].

Мерна ћелија ДСК уређаја састоји се из пећи унутар које се налазе позиције за посудице за узорком и референтним узорком са интегрисаним сензором (слика 2.5). Сензори су повезани са термопаром што омогућава снимање температурске разлике између узорка и референтног узорка.



Слика 2.5: Пресек мерне ћелије ДСК уређаја, преузето и прилагођено из [214].

ДСК уређај може радити у два режима: у изотермском или адијабатском (динамичком). Основа *изотермског режима* је у обезбеђивању услова да се температуре испитиваног узорка и температура референтног материјала одржавају једнаким у току загревања варирањем снаге у оба сегмента пећи. Добијена промена енталпије или топлотног капацитета у узорку у односу на референтни узорак, последица су неког физичког процеса у испитиваном узорку, нпр. фазне промене, и могу бити праћени ослобађањем или апсорпцијом топлоте. Површина ендотермног или екзотермног пика пропорционална је укупној промени топлоте датог процеса, па се ДСК метода може користити и као квантитативна метода. У случају *адијабатског режима* рада, диференцијалну скенирајући калориметар обезбеђује константност топлотног флукса између узорка и референтног материјала. Промена енталпије или топлотног капацитета у узорку доводи до разлике температуре у односу на референтни узорак, а која се мери преко разлике напона између узорка и референтног материјала. Мерење се састоји у загревању узорка константном изабраном брзином, а топлота која се при томе ослобађа снима се у функцији температуре или времена [215].

За потребе дисертације, сва мерења су изведена коришћењем *TA Instruments Q2000 Differential Scanning Calorimeter* на хидрогеловима набубрелим до равнотеже у пуферу рН 7.4 и на температури од 5 °С. Узорци масе око 5 mg су смештани у специјалне алуминијумске

посудице које су херметички затваране и процес је праћен у температурском интервалу од 4 до 85 °C, при брзини грејања од 1 °C/min. Мерења су вршена у струји инертног гаса, азота, како би се уређај заштитио од могуће контаминације и оксидације на повишеним температурама. Као референтни узорак коришћен је пуферски раствор рН 7.4. Температура на којој се јавља ендотермни пик дефинисана је као VPTT вредност [11, 216].

### 3. ПРЕДМЕТ И ЦИЉ РАДА

---

Предмет ове докторске дисертације је радијациона синтеза температурно осетљивих хидрогелова на бази олиго(пропилен гликол) метакрилата (OPGMA), евалуација физичко хемијских особина добијених хидрогелова и испитивање њихове биокомпатибилности. Иако је до данас забележен значајан научни допринос у истраживању и производњи ове врсте материјала у различитим истраживачким областима (системима за контролисано отпуштање лекова, репарацији ткива, сензорима, системима за сепарацију, у пољопривреди за чишћење земљишта од пестицида, итд.), у литератури се може наћи тек неколико радова који се баве молекулом OPGMA.

Основни циљ дисертације је да се полазећи од молекула OPGMA као молекула изражене хидрофобности на температурама вишим од 13 °C и нижом критичном температуром растварања (LCST) далеко испод физиолошких температура, радијационом кополимеризацијом са хидрофилнијим компонентама добије нова класа „паметних“ хидрогелова подобних за примену у биомедицини.

У оквиру ове дисертације примењена је метода радикалне кополимеризације мономера и умрежавање мономера индуковано гама зрачењем у циљу добијања температурно осетљивих хидрогелова. Идеја је била да се променом удела кополимерних компоненти познатих карактеристика изврши фино подешавање температуре запреминског фазног прелаза добијеног хидрогела у оквиру физиолошких температура са циљем даље примене хидрогела у биомедицини. У ту сврху је рађена:

- кополимеризација олиго(пропилен гликол) метакрилата са 2-хидроксиетил метакрилатом и итаконском киселином,
- полимеризација функционализованих олиго(алкилен гликол) метакрилатних мономера са различитим бројем етилен гликолних и пропилен гликолних јединица и
- кополимеризација функционализованих метакрилатних мономера са етилен гликолним и пропилен гликолним јединицама у различитим моларним односима.

Синтетисани хидрогелови су даље детаљно карактерисани физичкохемијским методама: гравиметријском, термалном и морфолошком, са циљем да се утврди корелација морфологије и термичких својстава хидрогелова. Такође, узорци су даље испитани биолошким *in vitro* методама како би се добио увид у биокомпатибилност добијених хидрогелова. При том, урађена је и *in vitro* метода отпуштања модел-лека са циљем да се добијени хидрогелови испитају као потенцијални носачи за контролисано отпуштање лека.

## 4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

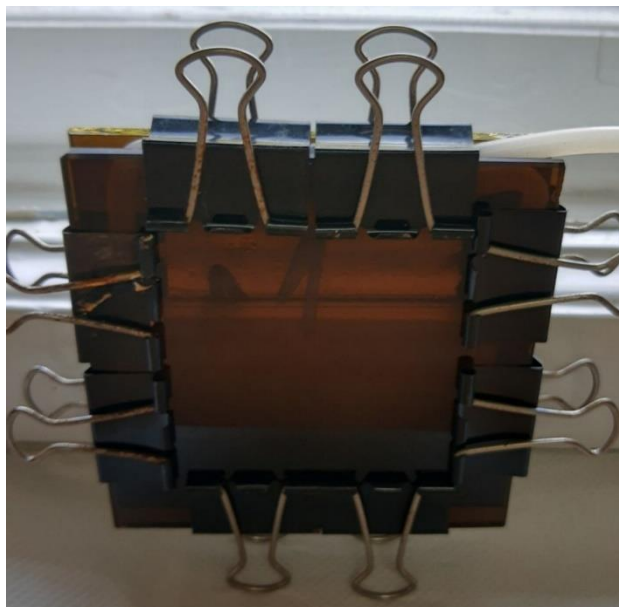
### 4.1. СИНТЕЗА ХИДРОГЕЛОВА НА БАЗИ ОЛИГО(ПРОПИЛЕН ГЛИКОЛ) МЕТАКРИЛАТА

Хидрогелови све три серије су добијени радикалном кополимеризацијом мономера и умрежавањем мономера индукованим гама зрачењем. Почетни однос мономера коришћених у дисертацији за сваку серију хидрогелова сажет је у **табели 4.1**.

**Табела 4.1:** Почетни однос мономера све три серије хидрогелова коришћених за синтезу.

ХИДРОГЕЛ		ОРGМА	НЕМА	IA	PPG <sub>3</sub> EG <sub>6</sub> МА	PPG <sub>6</sub> EG <sub>3</sub> МА	ОEGМА
		ПОЧЕТНИ САСТАВ (mol%)					
ПРВА СЕРИЈА ХИДРОГЕЛОВА	POPGMA	100	0	0	0	0	0
	P(OPGMA/НЕМА)	50.0	50.0	0	0	0	0
		30.0	70.0	0	0	0	0
		12.5	87.5	0	0	0	0
		6.0	94.0	0	0	0	0
	PHEMA	0	100	0	0	0	0
	P(OPGMA/IA)	95.0	0	5.0	0	0	0
	P(OPGMA/НЕМА/IA2)	12.5	85.0	2.5	0	0	0
	P(OPGMA/НЕМА/IA4)	12.5	82.5	5.0	0	0	0
P(НЕМА/IA)	0	95.0	5.0	0	0	0	
ДРУГА СЕРИЈА ХИДРОГЕЛОВА	PPG <sub>3</sub> EG <sub>6</sub> МА	0	0	0	100	0	0
	PPG <sub>6</sub> EG <sub>3</sub> МА	0	0	0	0	100	0
ТРЕЋА СЕРИЈА ХИДРОГЕЛОВА	P(OPGMA/OEGMA)	0	0	0	0	0	100
		25	0	0	0	0	75
		50	0	0	0	0	50
		60	0	0	0	0	40
		70	0	0	0	0	30
		85	0	0	0	0	15
		100	0	0	0	0	0

*Поступак синтезе.* Мономери су растварани у смеси вода/етанол (1:1) на собној температури уз непрестано мешање. У циљу ефикасније полимеризације и умрежавања, у смешу је додат умреживач етилен гликол диметакрилат (EGDMA) у количини од 0.5 mol% у односу на укупан број молова мономера [198]. Смеше су потом краткотрајно третиране аргоном (*Messer Tehnogas*, Србија) како би се ослободиле присуства кисеоника, да би се непосредно пре зрачења смеша излила у посебно припремљене калупе које чине две стаклене плоче међусобно раздвојене силиконском траком (**слика 4.1**).



**Слика 4.1:** Калуп за радијациону синтезу полимерних узорака.

Реакционе смеше су озрачене гама зрацима коришћењем изотопа  $^{60}\text{Co}$  као извора зрачења у Радијационој јединици за индустријску стерилизацију Института за нуклеарне науке „Винча“. Зрачење је изведено на ваздуху и собној температури, при брзини озрачивања од 0.5 kGy/h, до укупне апсорбоване дозе од 25 kGy при којој је уочено постизање максималног степена гел фазе, која уједно представља и препоручену дозу за радијациону стерилизацију биоматеријала [22, 217].

Непосредно након озрачивања, плоче са добијеним хидрогеловима су смештане у сушницу 24 h на температури од 50 °C како би се довршило свако даље умрежавање и убрзала рекомбинација заосталих слободних радикала.

У даљем поступку, хидрогелови су сечени у облик диска и у вакуум сушници сушени до константне масе након чега су подвргнути *Soxhlet* екстракцији водом како би се уклониле неизреаговале материје. После поновног сушења до константне масе, добијени су ксерогелови спремни за испитивање. Формирани ксерогел-дискови су били пречника  $(5.4 \pm 0.5)$  mm и дебљине  $(1.3 \pm 0.5)$  mm.

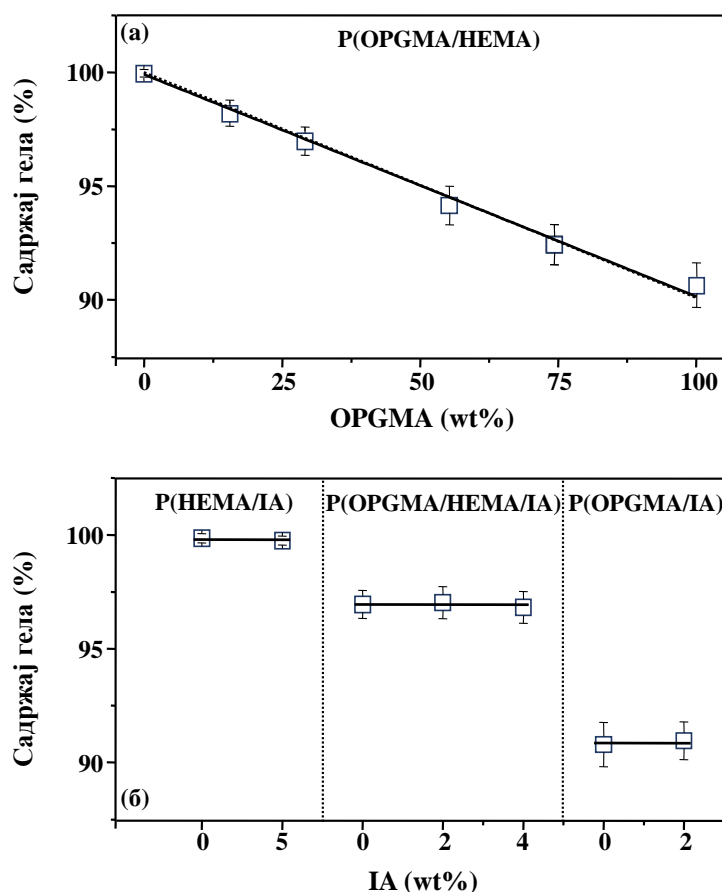
Количина неизреаговалих мономера OPGMA и НЕМА одређена је коришћењем Уљ-Вид спектрофотометра, док је количина неизреаговале IA одређена титрацијом екстракта 0.05M NaOH до фенолфталеинске завршне тачке.



## 4.2. ТЕМПЕРАТУРНО И РН ОСЕТЉИВИ КОПОЛИМЕРНИ ХИДРОГЕЛОВИ НА БАЗИ ОЛИГО(ПРОПИЛЕН ГЛИКОЛ) МЕТАКРИЛАТА, 2-ХИДРОКСИЕТИЛ МЕТАКРИЛАТА И ИТАКОНСКЕ КИСЕЛИНЕ

### 4.2.1. Одређивање садржаја гел фазе

Одређивање садржаја гела и конверзије мономера у гел су урађене одмах након радијационе синтезе. Садржај гела је заправо квантитативни показатељ ефикасности формирања мреже. За све серије хидрогелова добијен је садржај гела већи од 90% (слика 4.2а, б). Испитивањем P(OPGMA/HEMA) кополимерних хидрогелова уочено је да садржај гела опада са повећањем удела OPGMA мономера (слика 4.2а) што уједно указује и на то да сол-гел конверзија OPGMA мономера унутар P(OPGMA/HEMA) кополимерног хидрогела није комплетна, за разлику од HEMA мономера чији је удео гел фракције готово 100%, па се сол-гел конверзија може сматрати потпуном. Са друге стране, за кополимерне хидрогелове P(HEMA/IA), P(OPGMA/IA) и P(OPGMA/HEMA/IA) уочено је да садржај гела остаје непромењен упркос додавању мале количине итаконске киселине (слика 4.2б).



Слика 4.2: (а) Садржај гел фазе унутар P(OPGMA/HEMA) хидрогела у зависности од тежинског удела OPGMA; (б) Садржај гел фазе унутар P(HEMA/IA), P(OPGMA/HEMA/IA) и P(OPGMA/IA) хидрогелова у зависности од удела итаконске киселине у њиховом саставу.

Титрација екстракта није показала присуство неизреаговале итаконске киселине што потврђује комплетну сол-гел конверзију итаконске киселине у испитиваним хидрогеловима.

Почетни однос, садржај гела и израчунат стварни састав P(OPGMA/HEMA/IA) хидрогелова је сажет у **табели 4.2**.

Стварни састав кополимера рачунат је узимајући у обзир уочену линеарну зависност између садржаја гела и OPGMA, односно независност садржаја гела од додатка итаконске киселине, и уз претпоставку да је сол-гел конверзија OPGMA, HEMA и IA мономера у кополимерним хидрогеловима слична онима у хомополимерним хидрогеловима, помоћу једначине:

$$Ac_1(wt\%) = \frac{c_1(\%) \cdot Fc_1(wt\%)}{\text{садржај гела}} \quad (4.1)$$

где је  $Fc_1(wt\%)$  садржај у почетној смеси, а  $c_1(\%)$  сол-гел конверзија прве компоненте.

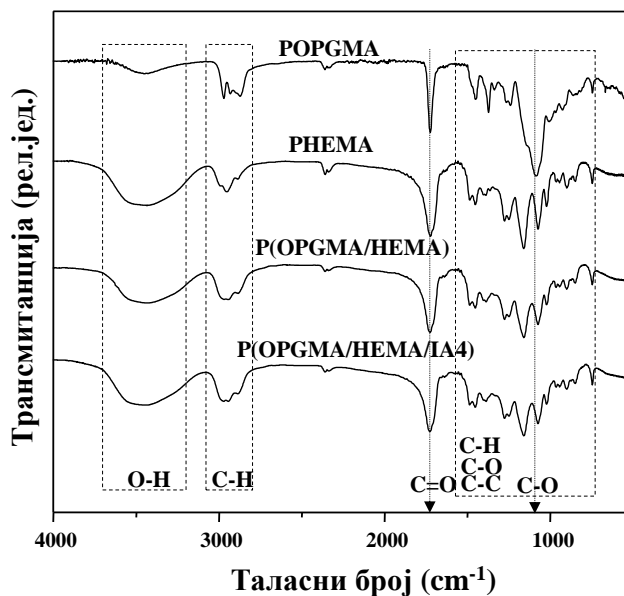
**Табела 4.2:** Почетни удео мономера, састав P(OPGMA/HEMA/IA) хидрогела и садржај гел фазе хидрогелова синтетисаних гама зрачењем.

ХИДРОГЕЛ	OPGMA	HEMA	IA	OPGMA	HEMA	IA		Гел (%)
	Почетни састав			Стварни састав				
POPGMA	100	0	0	100	0	0	wt%	90.8
	100	0	0	100	0	0	mol%	
P(OPGMA/HEMA)	74.2	25.8	0	72.2	27.8	0	wt%	92.5
	50.0	50.0	0	47.3	52.7	0	mol%	
	55.3	44.7	0	52.5	47.5	0	wt%	94.2
	30.0	70.0	0	72.3	27.7	0	mol%	
	29.2	70.8	0	27.0	73.0	0	wt%	97.0
	12.5	87.5	0	11.4	88.6	0	mol%	
PHEMA	15.5	84.5	0	14.0	86.0	0	wt%	98.2
	6.0	94.0	0	5.3	94.7	0	mol%	
PHEMA	0	100	0	0	100	0	wt%	99.9
	0	100	0	0	100	0	mol%	
P(OPGMA/IA)	98.2	0	1.8	98.0	0	2.0	wt%	91.0
	95.0	0	5.0	94.5	0	5.5	mol%	
P(OPGMA/HEMA/IA2)	29.2	68.8	2.0	27.0	70.9	2.1	wt%	97.1
	12.5	85.0	2.5	11.4	86.1	2.5	mol%	
P(OPGMA/HEMA/IA4)	29.2	66.8	4.0	26.9	68.9	4.2	wt%	96.9
	12.5	82.5	5.0	11.3	83.6	5.1	mol%	
P(HEMA/IA)	0	95.0	5.0	0	95.0	5.0	wt%	99.9
	0	95.0	5.0	0	95.0	5.0	mol%	

Добијене разлике између почетних тежинских удела компоненти хидрогелова и стварног састава хидрогелова су релативно мале, што указује на то да је синтеза индукована гама зрачењем добра и поуздана метода.

## 4.2.2. Структурна анализа хидрогелова

Идентификација релевантних функционалних група и потврда структуре радијационо синтетисаних хидрогелова урађена је применом инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом применом ометене тоталне рефлексије. На **слици 4.3** су приказани спектри PORGMA и PHEMA хомополимерних ксерогелова, као и кополимерних ксерогелова P(ORGMA/HEMA) и P(ORGMA/HEMA/IA4).



**Слика 4.3:** ФТИЦ спектар ксерогелова (спектри су померени вертикално због прегледности).

Упркос очигледној сличности између спектра, незнатне разлике се могу приписати присуству структура на бази ORGMA. Хомополимерни ксерогел PORGMA има доминантан пик око 1090 cm<sup>-1</sup> који одговара истежућој вибрацији C-O групе, док су савијајући и истежући вибрациони пикови СН<sub>3</sub> група на око 2970, 2870 и 1380 cm<sup>-1</sup> наглашени и карактеристични за структуре на бази олиго(пропилен гликола) [152, 218]. Приметан је и смањени интензитет трака ОН вибрација PORGMA ксерогела у односу на остале ксерогелове што се највероватније може приписати стерним ефектима насталим као последица разгранате структуре молекула. Артефакти, такође присутни у спектру PORGMA ксерогела, су неретка појава приликом мерења и обично потичу или од лошег пријањања узорка на дисперзиони елемент у уређају или као последица промене околне атмосфере током мерења. На спектрима кополимерних ксерогелова се може приметити да додавање мале количине итаконске киселине доводи до једва приметних разлика у спектру, јер се главне апсорпционе траке PIA и PHEMA значајно преклапају [219]. Вибрације на 2360 cm<sup>-1</sup> се могу приписати асиметричним истежућим вибрацијама CO<sub>2</sub>. У **табели 4.3** се налази списак читаних таласних бројева карактеристичних вибрација функционалних група испитиваних ксерогелова.

**Табела 4.3:** Карактеристичне вибрације функционалних група ксерогелова на бази олиго(пропилен гликол) метакрилата

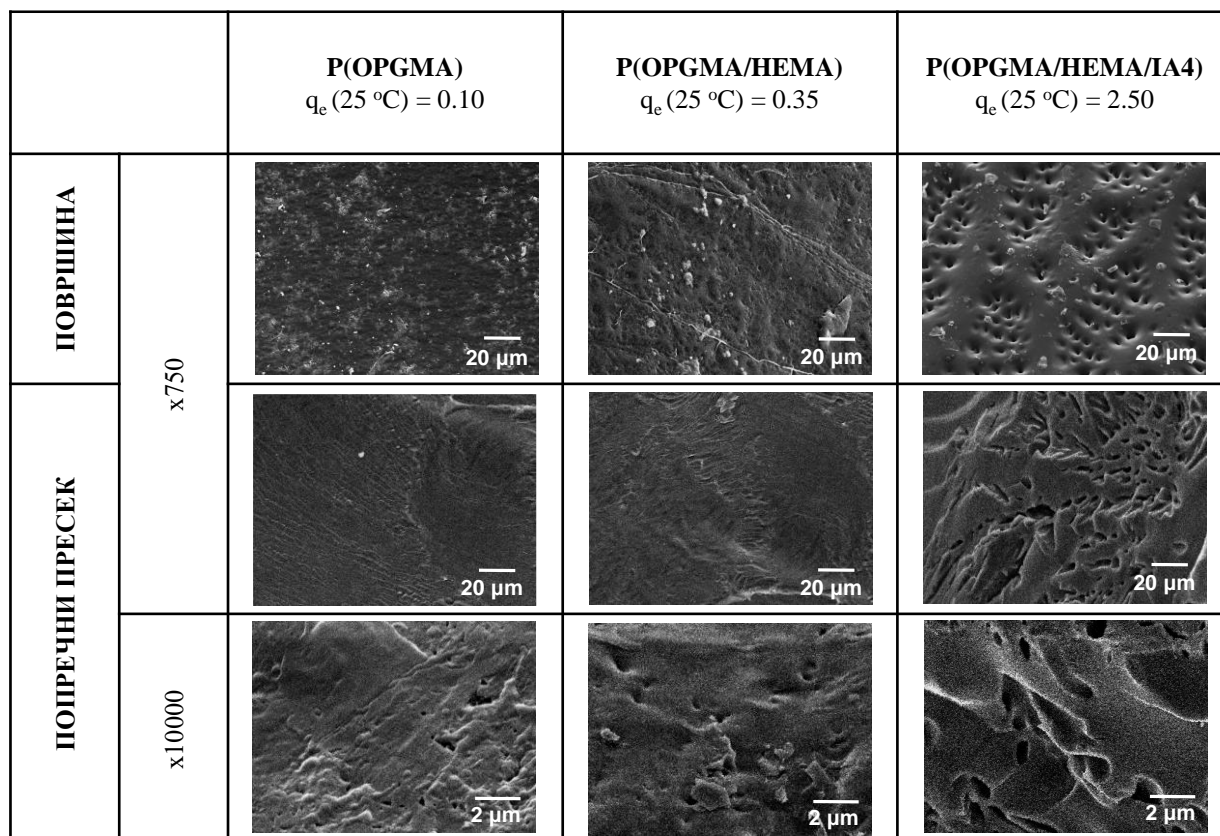
Функционална група	Таласни број (cm <sup>-1</sup> )
$\nu(\text{OH})$	3450
$\nu(\text{CH}_3)_{\text{as}}, \nu(\text{CH}_2)_{\text{as}}$	2970
$\nu(\text{CH}_2)_{\text{s}}, \nu(\text{CH}_3)_{\text{s}}$	2930
$\delta(\text{CH}_3)$	2870
$\nu(\text{C}=\text{O})$	1725
$\delta(\text{CH}_2)$	1480
$\delta(\text{CH}_2), \delta(\text{CH}_3)_{\text{as}}$	1450
$\delta(\text{CH}_3)_{\text{s}}$	1380
$\omega(\text{CH}_2), \delta(\text{CH})$	1270
$\nu(\text{C}-\text{O})$	1250
$\gamma(\text{CH}_3), \tau(\text{OH})$	1150
$\nu(\text{O}-\text{C})$	1085
$\nu(\text{C}-\text{O})$	1010
$\delta(\text{C}-\text{C}), \gamma(\text{CH}_3), \gamma(\text{CH}_2)$	970-800
$\delta(\text{O}=\text{C}-\text{O})$	750

где је:  $\nu$  истежућа вибрација,  $\delta$  савијајућа,  $\omega$  машућа,  $\gamma$  љуљајућа и  $\tau$  увијајућа вибрација [220, 221].

Како у спектру није уочена апсорпциона трака у области 1680 – 1620 cm<sup>-1</sup> карактеристична за вибрацију C=C групе, сматра се да је хидрогел успешно умрежен.

#### 4.2.3. Морфологија хидрогелова

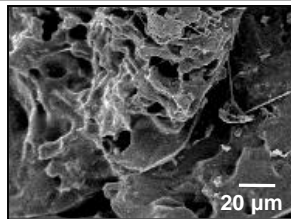
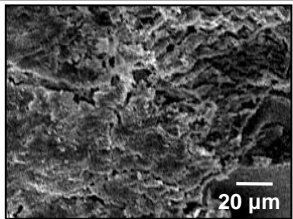
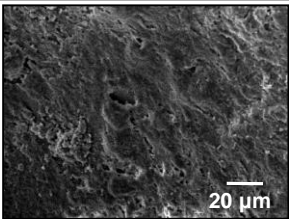
Морфолошка анализа је рађена на лиофилизованом узорцима хидрогелова. Површине и попречни пресеци микроструктура P(ОPGМА), P(ОPGМА/НЕМА) и P(ОPGМА/НЕМА/IA4) хидрогелова, набубрених у раствору пуфера рН 7.4 на 25 °C пре лиофилизације, представљени су на слици 4.4.



**Слика 4.4:** СЕМ микрографи лиофилизованих хидрогелова на бази OPGMA: површине и попречни пресеци микроструктура узорка P(OPGMA), P(OPGMA/HEMA) и P(OPGMA/HEMA/IA4) набубрелих до равнотеже на 25 °C у раствору пуфера pH 7.4 пре лиофилизације. Попречни пресеци микроструктура су представљени за два различита увећања (750 и 10000 пута).

Порозност узорка значајно варира са саставом и повећава се са порастом степена бубрења. СЕМ микрографи за P(OPGMA/HEMA) и P(OPGMA/HEMA/IA4) показују велико повећање броја и величине пора. Приметна разлика је у површини P(OPGMA/HEMA) хидрогела који изгледа компактно и глатко, посебно за мала увећања (x750), док површина P(OPGMA/HEMA/IA4) показује значајно повећање микро пора средњих величина са релативно униформном дистрибуцијом. Ово запажање потврђује наша очекивања да релативно мале количине итаконске киселине у саставу доводе не само до великог повећања у степену бубрења већ и до повећања порозности.

Микроструктуре узорка P(OPGMA/HEMA/IA4) добијених бубрењем до равнотеже у пуферу pH 7.4 на три различите температуре (5, 37 и 70 °C) пре лиофилизације, представљене су на **слици 4.5**.

	P(OPGMA/HEMA/IA4)		
	$q_c(5\text{ }^\circ\text{C}) = 4.2$	$q_c(37\text{ }^\circ\text{C}) = 1.8$	$q_c(70\text{ }^\circ\text{C}) = 1.1$
ПОПРЕЧНИ ПРЕСЕК (x750)			

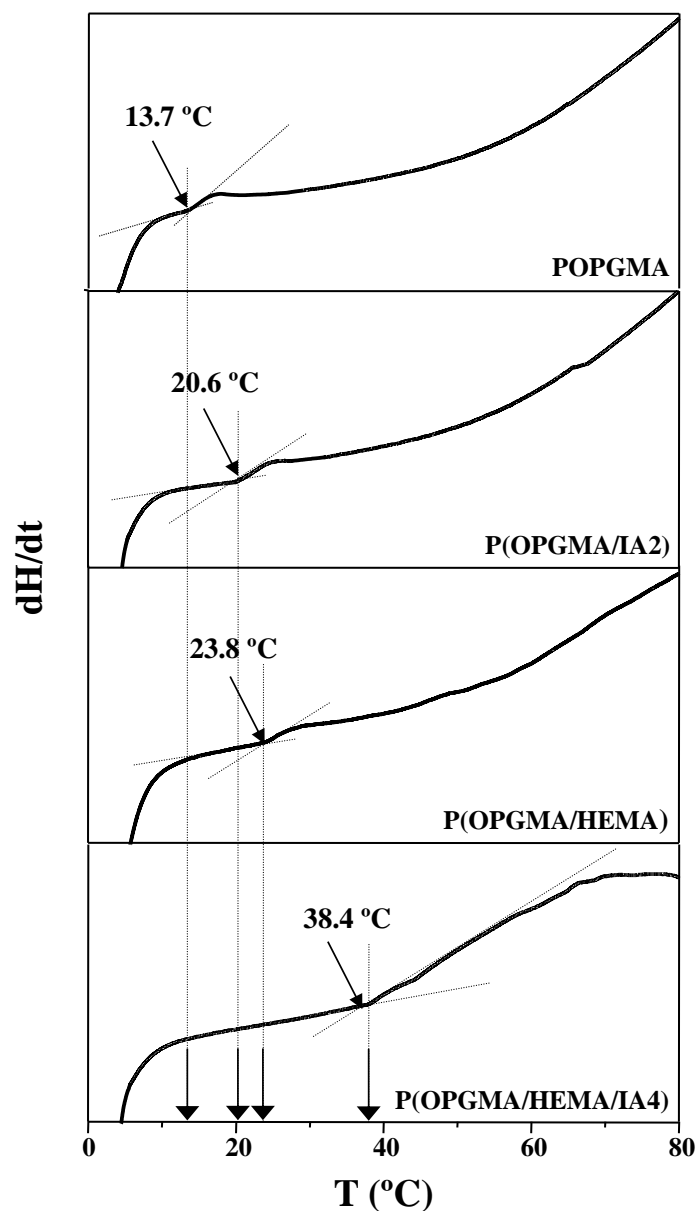
**Слика 4.5:** СЕМ микрографи попречних пресека P(OPGMA/HEMA/IA4) хидрогелова различитих степена бубрења, добијених бубрењем до равнотеже у раствору пуфера рН 7.4 на три различите температуре (5, 37 и 70 °C) пре лиофилизације.

Може се уочити како смањење равнотежног степена бубрења са порастом температуре прати прогресивно смањење укупне порозности узорка и величине пора, као што је и очекивано. Добијена микроструктура подржава чињеницу да порозност хидрогелова на бази OPGMA може бити контролисана не само саставом хидрогела, већ и спољним утицајима попут температуре и рН средине.

#### 4.2.4. Термичка својства хидрогелова

Са циљем испитивања термичких својстава хидрогелова, као и одређивање температуре запреминског фазног прелаза коришћена је метода термалне анализе - диференцијална скенирајућа калориметрија (ДСК).

Термограми хидрогелова на бази OPGMA набубрених до равнотеже у раствору пуфера рН 7.4 снимљени су у широком опсегу температура од 4 до 85 °C. Као што се може видети на **слици 4.6**, сви хидрогелови су показали једну температуру прелаза што може бити показатељ успешне кополимеризације мономера OPGMA како само са IA, или само са HEMA у кополимерним хидрогеловима, тако и са IA и HEMA у терполимерним хидрогеловима. Такође, прелаз се јавља у облику широког ендотермног пика који указује на то да је хидрогел током грејања претрпео колапс, који доводи до његовог скупљања и ослобађања воде. Температура појаве ендотермног пика дефинисана је као VPTT.



**Слика 4.6:** ДСК криве POPGMA, P(OPGMA/IA2), P(OPGMA/HEMA) и P(OPGMA/HEMA/IA4) хидрогелова.

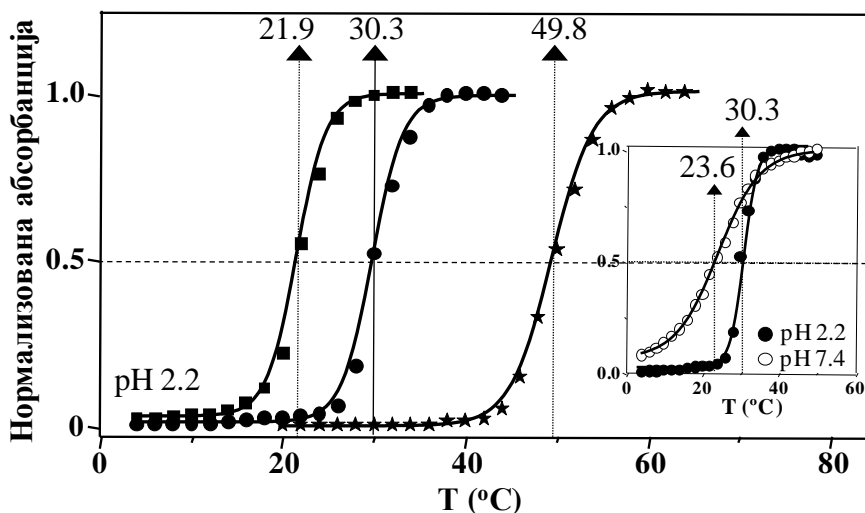
Добијене вредности VPTT за калориметријска мерења су 13.7 °C, 20.6 °C, 23.8 °C и 38.4 °C за POPGMA, P(OPGMA/IA2), P(OPGMA/HEMA) и P(OPGMA/HEMA/IA4). Уочено је да са додавањем хидрофилнијих компоненти, и IA и HEMA, долази до померања температуре запреминског фазног прелаза ка вишим вредностима.

Са аспекта термичке анализе може се закључити да додавање итаконске киселине и HEMA има значајан утицај на термичка својства испитиваних хидрогелова.

## 4.2.5. Бубрење хидрогелова

### 4.2.5.1. Утицај температуре на бубрење хидрогелова

Са становишта примене температурно осетљивих хидрогелова, кључно је прецизно одређивање опсега температура у коме долази до значајне промене у њиховој запремини [62].

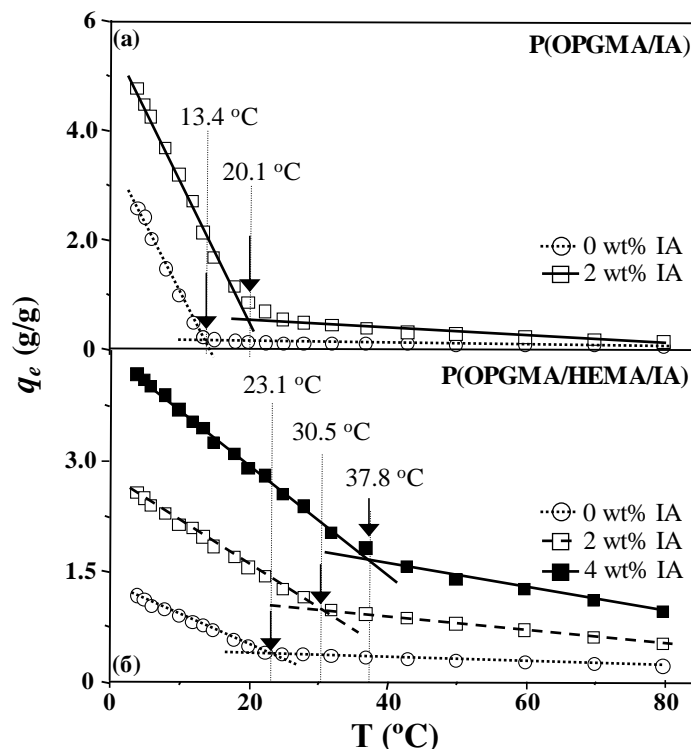


**Слика 4.7:** Уљ-Вид профил OPGMA за различите концентрације мономера (0.3 wt%, звезде; 1 wt%, кружићи; 3 wt%, квадратићи) у раствору пуфера pH 2.2; десно на слици је Уљ-Вид профил OPGMA (1 wt% концентрације мономера) у раствору пуфера на pH 2.2 и 7.4, мерен на таласној дужини од 286 nm.

На **слици 4.7** је представљена зависност нормализоване абсорбанције раствора OPGMA мономера различитих концентрација од температуре. Узимајући у обзир да је LCST температура за коју је вредност нормализоване абсорбанције 0.5 [222], добијене су следеће вредности LCST у раствору пуфера pH 2.2: 21.9 °C (3 wt%), 30.3 °C (1 wt%) и 49.8 °C (0.3 wt%). Уочено је да се да LCST вредности одређене методом појаве тачке замућења повећавају са смањењем концентрације OPGMA, што је у сагласности са другим студијама које се тичу LCST понашања [64, 160]. У концентрованијим растворима, замућење је наглашеније у односу на разблажене растворе, па тако водени раствори OPGMA много већих концентрација (>5 wt%), остају замућени и на ниским температурама. Све што је претходно поменуто указује на то да корелација између LCST полимерних компоненти и VPTT одговарајућих хидрогелова треба пажљиво да се испита. Један од најсуптилнијих проблема у карактеризацији температурно осетљивих полимерних структура је процена везе између LCST линеарног полимера и VPTT одговарајућег хидрогела, као што је истакнуто у поглављу 1.2.3 [64]. Међутим, како релативно мало смањење концентрације OPGMA доводи до значајног пораста вредности LCST, очекивано је да удео OPGMA у кополимерним хидрогеловима има значајан утицај на њихове термалне особине и VPTT. Десно на **слици 4.7** се може уочити да pH такође има извесни утицај на LCST, упркос чињеници да OPGMA не поседује pH осетљиве групе. Тако, за концентрацију од 1 wt% OPGMA, LCST измерен на pH 2.2 је за неколико степена већи него у случају pH 7.4. Уочене разлике у LCST су највероватније последица јачих интеракција OPGMA са хидроксилним јонима или протонима него са водом. Слична ситуација је такође уочена за случај OEGMA различитих молекулских маса [149].



Утицај итаконске киселине у P(OPGMA/IA) и P(OPGMA/HEMA/IA) хидрогеловима на температурни одзив и VPTT приказан је на **слици 4.8**.



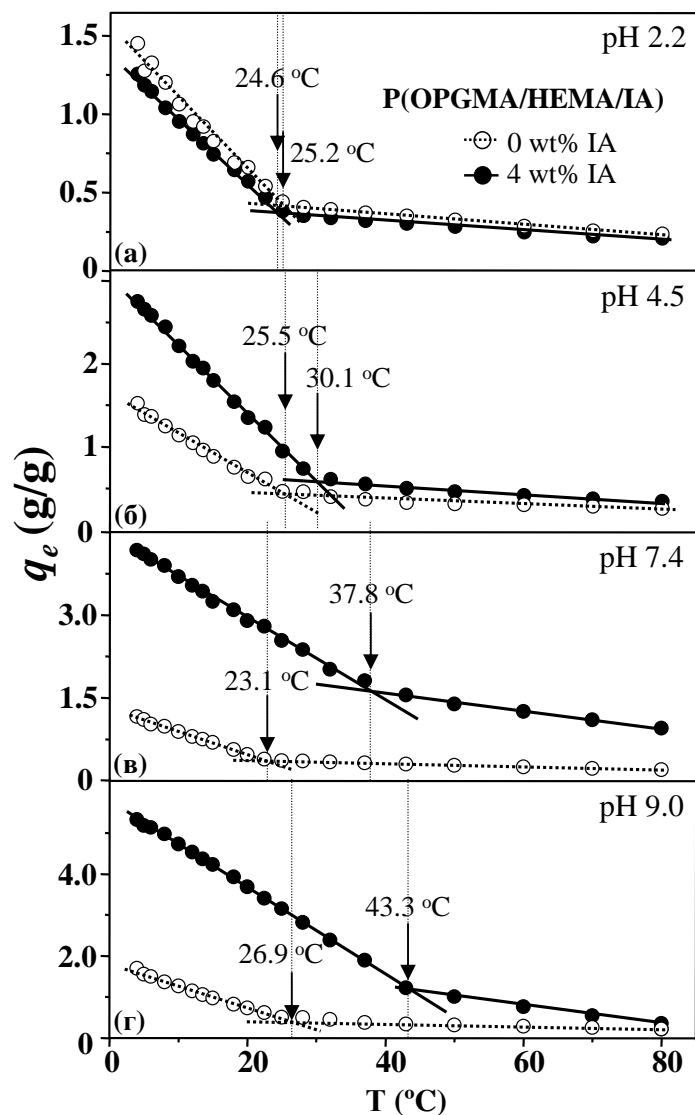
**Слика 4.8:** (а) Утицај температуре на равнотежни степен бубрења P(OPGMA хомополимерног (празни кружићи) и P(OPGMA/IA) кополимерног (празни квадратићи) хидрогела на рН 7.4; (б) Утицај температуре на равнотежни степен бубрења P(OPGMA/HEMA/IA) кополимерних хидрогелова (са различитим садржајем итаконске киселине: 0 (празни кружићи), 2 (празни квадратићи) и 4 (пуни квадратићи) wt%) на рН 7.4.

Као што се на **слици 4.8a** може уочити, са додатком итаконске киселине у структуру хидрогела долази до значајног помераја VPTT ка вишим температурама и до пораста вредности равнотежног степена бубрења,  $q_e$ . Дакле, бубрење хидрогелова веома зависи од присуства итаконске киселине, која представља слабу киселину изражене хидрофилности са две  $pK_a$  константе ( $pK_{a1} = 3,85$  и  $pK_{a2} = 5,45$ ) и дефинише карактер испитиваних хидрогелова као ањонски.

Са **слике 4.8b** се може видети да највише  $q_e$  вредности, при испитиваним условима достижу хидрогелови са највећим уделом итаконске киселине (4 wt%), као и да повећање удела итаконске киселине доводи до значајног померања VPTT према физиолошким температурама, чинећи тако P(OPGMA) кополимерне хидрогелове релевантним за примену у биомедицини.

Добијене VPTT вредности за све синтетисане хидрогелове у добром су слагању са вредностима добијеним из резултата ДСК мерења.

Такође, испитан је утицај промене рН вредности средине на VPTT за P(OPGMA/HEMA) и P(OPGMA/HEMA/IA), тј. кополимерне хидрогелове са или без итаконске киселине, и представљен на **слици 4.9**.

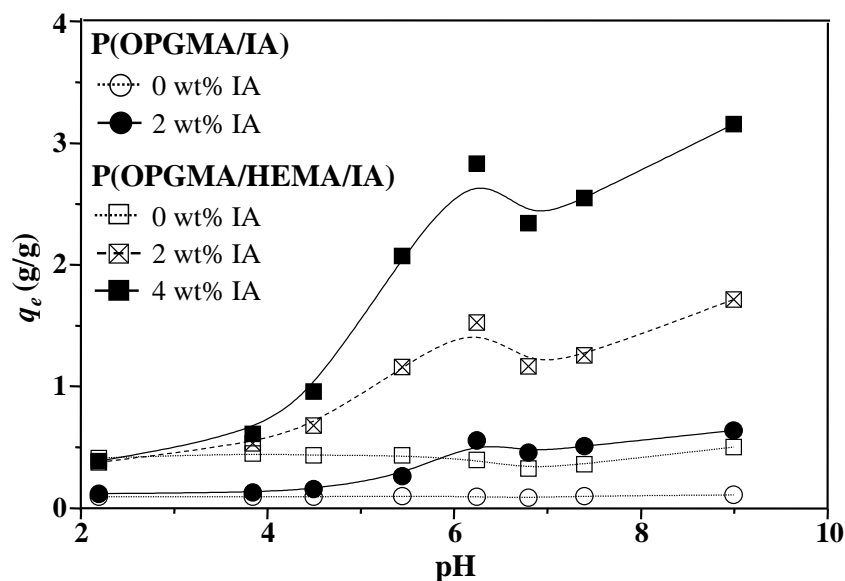


**Слика 4.9:** Утицај температуре на равнотежни степен бубрења P(OPGMA/HEMA/IA) кополимерних хидрогелова (са 0 wt% IA, празни кружићи и 4 wt% IA, пуни кружићи) на различитим pH: **(а)** pH 2.2, **(б)** pH 4.5, **(в)** pH 7.4 и **(г)** pH 9.0.

У случају хидрогелова који садрже итаконску киселину уочава се да су термалне особине и VPTT строго повезане са вредношћу pH раствора. Значајно повећање VPTT уочено за више pH вредности последица је повећања свеукупне хидрофилности средине кополимерног хидрогела услед дисоцијације поларних карбоксилних група итаконске киселине на pH вредностима изнад константи дисоцијације карбоксилних група-

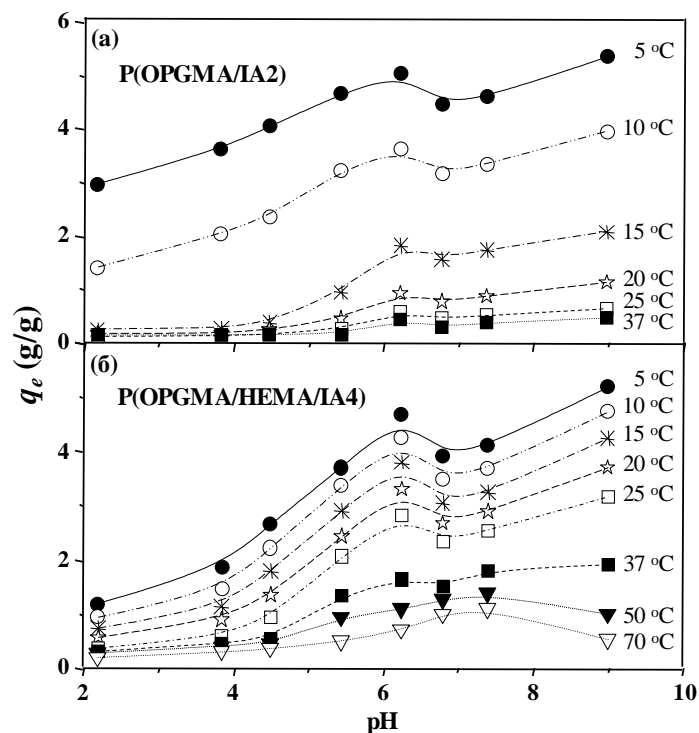
#### 4.2.5.2. Утицај pH на бубрење хидрогелова

У циљу утврђивања pH осетљивог понашања P(OPGMA/HEMA/IA) кополимерних хидрогелова, испитиван је утицај промене pH вредности пуфера на равнотежни степен бубрења на собној температури, као и утицај промене pH вредности пуфера на равнотежне степене бубрења хидрогелова на температурама испод и изнад собне.



Слика 4.10: Утицај рН на равнотежни степен бубрења кополимерних хидрогелова на собној температури ( $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Равнотежни степен бубрења хидрогелова на бази OPGMA са и без итаконске киселине, у зависности од рН вредности, на температури од  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  представљен је на слици 4.10. P(OPGMA) и P(OPGMA/HEMA) су практично рН неосетљиви, за разлику од кополимерних хидрогелова са итаконском киселином у саставу. Итаконска киселина има две поларне COOH групе са различитим вредностима  $pK_a$  константе. Стога, додатак веома мале количине итаконске киселине доводи до повећања степена бубрења хидрогелова за рН вредности пуфера изнад константи дисоцијације карбоксилних група итаконске киселине ( $pKa1 = 3,85$  и  $pKa2 = 5,45$ ). Због комплетне дисоцијације анјонских поларних група, сатурација у равнотежном степену бубрења се може уочити за  $pH \geq 6$ . На овим рН вредностима прогресивно увећање у степену бубрења је уочљиво за узорке са већим садржајем итаконске киселине, као последица повећаног броја дисосованих поларних група. Хидрогелови на бази OPGMA такође показују значајно смањење у равнотежном степену бубрења око неутралне вредности рН и „опоравак“ на рН 9.0 који се не може повезати са групама итаконске киселине већ је вероватно у вези са природом OPGMA. Наиме, упркос чињеници да OPGMA не поседује рН осетљиве групе, уочене промене у равнотежном степену бубрења су највероватније последица јачих интеракција висећих ланаца OPGMA са хидроксилним јонима или водониковим протонима него са водом [149, 223]. Према досадашњим сазнањима, у случају кополимерних хидрогелова на бази OEG(M)A, равнотежни степени бубрења добијени за киселе и базне растворе пуфера су незнатно већих вредности од вредности у околини рН 7 [219, 223], што указује на то да је ово заправо карактеристика свих хидрогелова на бази OAG(M)A.



**Слика 4.11:** (а) Утицај рН на равнотежни степен бубрења P(OPGMA/IA2) кополимерног хидрогела у опсегу температура од 5 до 37 °C и (б) P(OPGMA/HEMA/IA4) терполимерног хидрогела у опсегу температура од 5 до 70 °C.

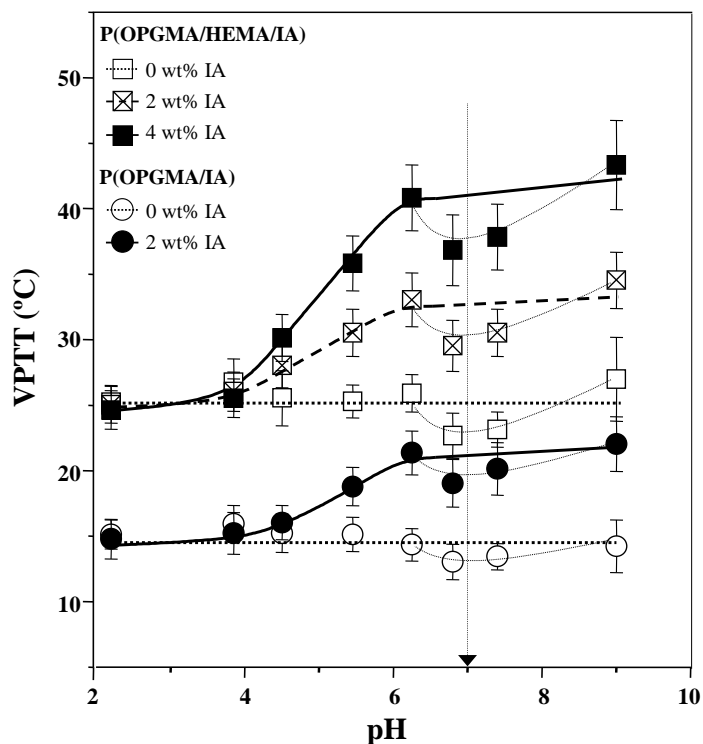
Равнотежни степени бубрења P(OPGMA/IA2) и P(OPGMA/HEMA/IA4) у функцији рН, на различитим температурама, презентовани су на **слици 4.11а и б**. Може се уочити да је рН успешно комбинована са температурном осетљивошћу у случају кополимерних хидрогела на бази P(OPGMA/IA), као резултат додатка температурно осетљивих OPGMA јединица са нижом критичном температуром растварања и јединица итаконске киселине са рН осетљивим групама. Поређење слика 4.10а и б показује велике разлике у корелисаном рН/температурном понашању индукованом кополимерним саставом, потврђујући да је неопходан пажљив инжењеринг кополимерних структура за комбиновање и добијање жељене осетљивости.

#### 4.2.5.3. Утицај рН средине на VPTT хидрогелова

Вредности VPTT добијене из анализе бубрења су приказане у функцији рН раствора пуфера како би се добио бољи увид у уочена понашања (**слика 4.12**).

Требало би нагласити да прецизно одређивање VPTT вредности из анализе бубрења није био једноставан задатак и да неретко уводи веће стандардне девијације. Ипак, на **слици 4.12** је демонстрација везе својство-структура. За разлику од P(OPGMA) хомополимерног хидрогела који има VPTT око 15 °C, јасно је да у случају P(OPGMA/HEMA) кополимера са већим садржајем HEMA, VPTT може бити померен до собних температура без значајног утицаја рН вредности. Са друге стране, VPTT јако зависи од рН раствора пуфера због инкорпорације итаконске киселине у структуру хидрогела. Тако, у случају P(OPGMA/HEMA/IA) на  $pH \geq 5$ , добијене VPTT вредности су блиске телесним температурама. Ово повећање VPTT за P(OPGMA/IA) и P(OPGMA/HEMA/IA) кополимерне хидрогелове, у поређењу са њима одговарајућим хидрогеловима без итаконске киселине, може бити повезано

са дисоцијацијом поларних група итаконске киселине. На нижим рН вредностима ( $pH < pK_{a1}$  (IA)), дисоцијација карбоксилних група се не дешава и не постоји промена у VPTT. Супротно овоме, у случају хидрогелова са итаконском киселином, повећање VPTT уочено за  $pH \geq 4$  је праћено сатурацијом за  $pH \geq 6$  на којима се одиграва комплетна дисоцијација карбоксилних група. Тако, повећање свеукупне хидрофилности кроз дисоцијацију поларних карбоксилних група доводи до значајног пораста VPTT на већим рН. Даље, сви хидрогелови на бази OPGMA су показали мање или више запажено смањење VPTT у околини неутралне рН и „опоравак“ за  $pH 9.0$ , које је највероватније повезан са природом OPGMA.



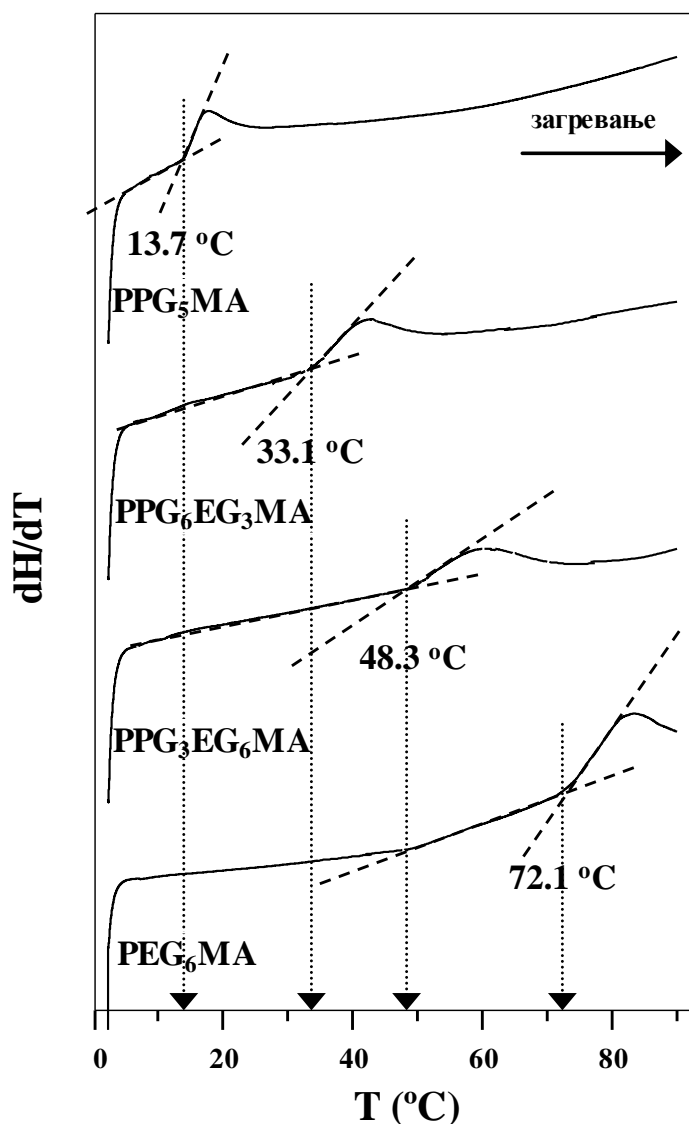
Слика 4.12: Утицај промене рН на VPTT презентоване за различите хидрогелове: P(OPGMA), P(OPGMA/IA2) и P(OPGMA/HEMA/IA) са различитим садржајем итаконске киселине (0, 2, 4 wt%).

Како је свеукупна хидрофилност јако повезана са садржајем итаконске киселине, треба очекивати да ће повећање VPTT бити више наглашено за кополимерне хидрогелове са већим садржајем итаконске киселине, што резултати представљени на слици 4.12 за P(OPGMA/HEMA/IA) кополимерне хидрогелове и потврђују. Евидентно је да мала количина итаконске киселине доводи до озбиљних померања VPTT ка вишим вредностима. У случају неких кополимерних састава уочене VPTT вредности су блиске или у опсегу телесних температура, што уврштава P(OPGMA/HEMA/IA) кополимерне хидрогелове као P(OPGMA) аналоге за биомедицинске примене. Добијене VPTT вредности кополимерних хидрогелова P(OPGMA/HEMA/IA) са 2 и 4 wt% IA су у опсегу од 25 до 45 °C у зависности од pH средине, што указује на то да додатно fino подешавање температурне осетљивости терполимерних хидрогелова може бити постигнуто мењањем удела итаконске киселине у опсегу поменутих вредности. У случају неких кополимерних састава уочене VPTT вредности су блиске или у опсегу телесних температура, што уврштава P(OPGMA/HEMA/IA) кополимерне хидрогелове као P(OPGMA) аналоге за биомедицинске примене.

### 4.3. ТЕМПЕРАТУРНО ОСЕТЉИВИ ХИДРОГЕЛОВИ СА ОЛИГО(ЕТИЛЕН ГЛИКОЛ) И ОЛИГО(ПРОПИЛЕН ГЛИКОЛ) ВИСЕЋИМ ЛАНЦИМА

#### 4.3.1. Термичка својства хидрогелова

На слици 4.13 представљене су ДСК криве PPG<sub>5</sub>MA, PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA, PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA и PEG<sub>6</sub>MA хидрогелова набубрених до равнотеже у раствору пуфера рН 7.4 и сниманих у температурском опсегу од 5 до 85 °С. Температура појаве ендотермне криве се узима као VPTT хидрогела. Добијене вредности су 48.3 и 33.1 °С за PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA и PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA хидрогел и као што је очекивано, добијене вредности за хидрогел са већим бројем пропилен гликолних јединица, односно етилен гликола, се налазе између вредности за хидрогелове са чистим пропилен гликолним јединицама (13.7 °С) и етилен гликолним јединицама (72.1 °С).



Слика 4.13: ДСК криве PPG<sub>5</sub>MA, PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA, PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA и PEG<sub>6</sub>MA хидрогелова.

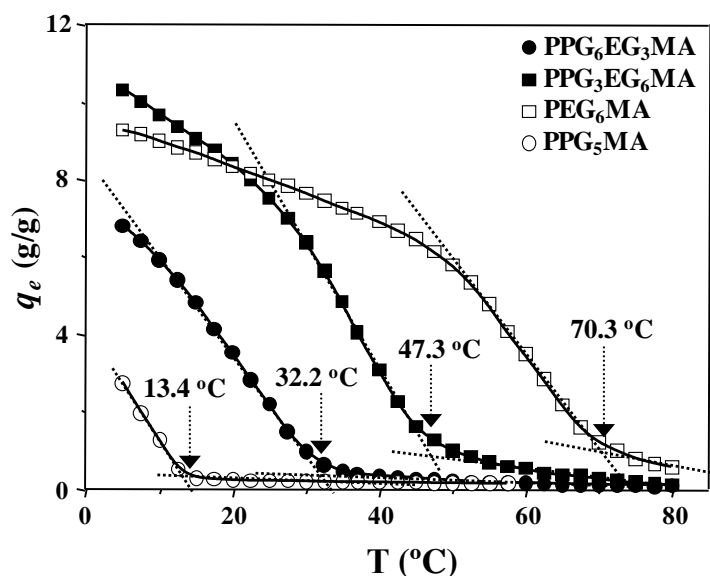
Сличност вредности VPTT одређених статичком (гравиметријским мерењима) и динамичком (ДСК) методом је очекивана због веома брзе, готово тренутне, кинетике скупљања (у поређењу са кинетиком бубрења) хидрогелова на бази олиго(алкилен) гликола,

посебно на температурама блиским или у околини температуре запреминског фазног прелаза [152].

### 4.3.2. Бубрење хидрогелова

#### 4.3.2.1. Утицај температуре на бубрење хидрогелова

Испитивањем бубрења хидрогелова, може се уочити јасна разлика у динамици бубрења за хидрогелове који садрже чисте етилен гликолне јединице и чисте пропилен гликолне јединице (слика 4.14). Заправо, за хидрогелове PPG<sub>5</sub>MA (са чистим PG јединицама) и PEG<sub>6</sub>MA (са чистим EG јединицама) VPTT вредности се добијају далеко изван опсега физиолошких температура (на 13.4 °C и изнад 70 °C) при чему се температурна осетљивост PEG<sub>6</sub>MA уочава тек на температурама већим од 50 °C. Такође, присуство EG јединица није праћено само померањем фазног прелаза ка већим температурама, већ је уочен и отклон у степену бубрења што је последица веће хидрофилности EG јединица у поређењу са PG јединицама. Свакако, добијене VPTT вредности су изван физиолошких температура што чини ове хидрогелове неинтересантним за примену у биомедицини.



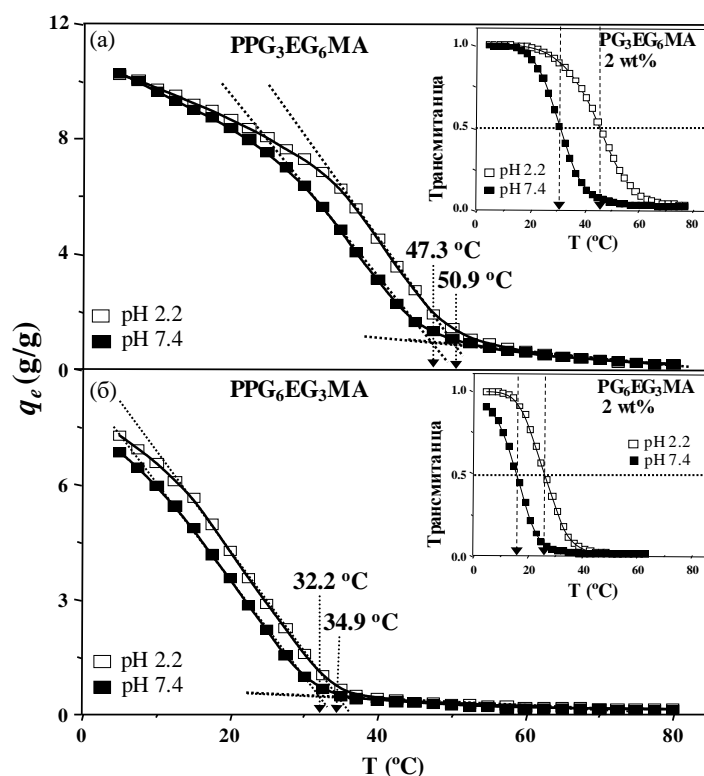
Слика 4.14: Утицај температуре на равнотежни степен бубрења PPG<sub>5</sub>MA, PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA, PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA и PEG<sub>6</sub>MA хомополимерних хидрогелова у раствору пуфера pH 7.4.

#### 4.3.2.2. Утицај pH на бубрење хидрогелова

Температурно осетљиво понашање PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA које поред 6 EG има и 3 PG јединице у viseћем ланцу представљено је на слици 4.15а. Приказане су криве бубрења хидрогела за две pH вредности, 7.4 и 2.2. Добијене вредности за температуре запреминског фазног прелаза су 47.3 и 50.9 °C за хидрогел у раствору физиолошке вредности, pH 7.4, и pH 2.2. Ипак, у поређењу са PEG<sub>6</sub>MA очигледно је да додатком хидрофобних PG јединица у viseћем ланцу доводи до померања VPTT ка нижим температурама. Утицај хидрофобних PG јединица се јасније уочава на слици 4.15б. Заправо, за PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA хидрогел који има 6 PG и 3 EG јединице у оквиру свог EPGG viseћег ланца, добијене вредности VPTT су ниже и незнатно испод телесних температура (32.2 и 34.9 °C у раствору пуфера pH 7.4 и 2.2). Из претходно

поменутог, може се закључити да број EG и PG јединица, као и њихов однос у EPGG висећем ланцу, најпре одређује вредност VPTT PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA и PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA хидрогелова и да се одабиром састава висећих ланаца могу добити вредности VPTT у широком опсегу температура (од 15 до 70 °C).

Температурно осетљиво понашање хидрогелова заправо лежи у природи PG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA и PG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA мономера. Како би се утврдила LCST мономера, праћена је појава тачке замућења (CP). Метода се заснива на (емпиријској) чињеници да транспарентан раствор постаје замућен приликом грејања као последица температурно-реверзибилног прелаза из растворне у нерастворну фазу услед загревања што се одражава у великом смањењу трансмитанце, где се заправо вредност 0.5 оптичке трансмитанце узима за вредност LCST, односно за T<sub>CP</sub> раствора [224, 225].

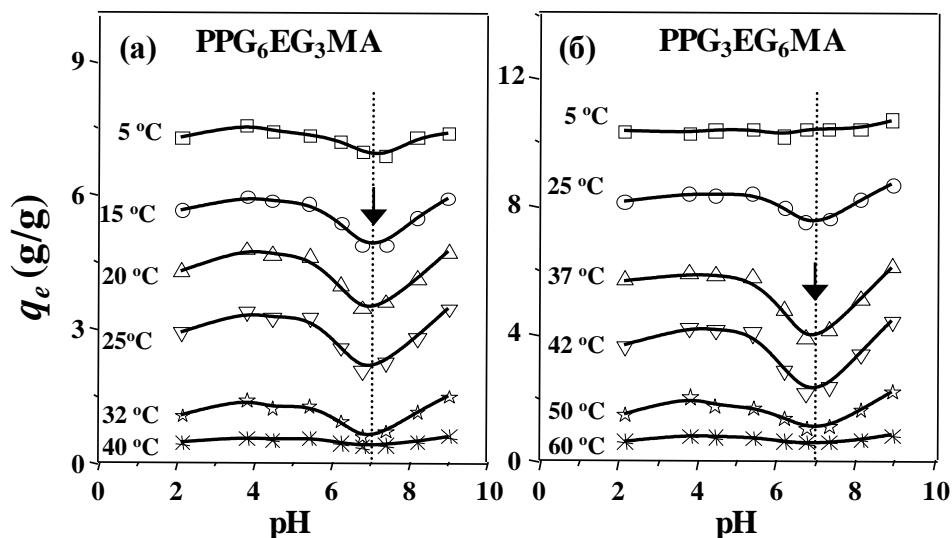


**Слика 4.15:** Утицај температуре и промене рН на равнотежни степен бубрења (а) PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA и (б) PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA хидрогелова; додаток на сликама у горњем десном углу су Уљ-Вид профили PG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA, односно PG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA (2 wt% концентрације) мономера у раствору пуфера рН 2.2 и рН 7.4.

Поређењем додатака са **слике 4.15** јасно се уочава да се за исту концентрацију раствора мономера (2 wt%) добијају ниже вредности T<sub>CP</sub> за PG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA у односу на PG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA због већег садржаја PG јединица. Даље, на собној температури замућеност раствора мономера PG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA је далеко већа у раствору рН 7.4 него у рН 2.2 што указује да промена рН има утицаја на температурну осетљивост PG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA и PG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA мономера иако сам мономер не поседује рН-осетљиве групе. На основу температурског профила тачке замућења, уочава се да су LCST вредности у раствору пуфера рН 7.4 за неколико степени ниже у односу на вредности добијене у раствору рН 2.2. Ово не важи само за LCST вредности PG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA и PG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA мономера већ и за VPTT вредности одговарајућих хидрогелова. Упркос чињеници да су динамике бубрења у различитим рН веома сличне, може се уочити да је за киселе растворе пуфера опадање q<sub>e</sub> померено ка вишим температурама и да овај померај има утицаја на



вредност VPTT. Како би се добио бољи увид у утицај рН, урађена су мерења бубрења у опсегу температура од 5 до 60 °C за PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>МА и PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>МА и представљена у функцији рН раствора пуфера (слика 4.16).

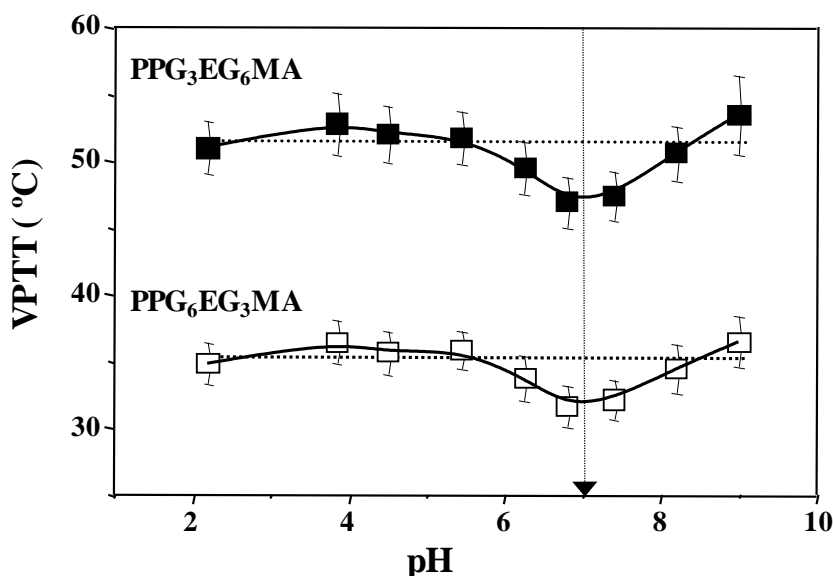


Слика 4.16: Утицај рН на равнотежни степен бубрења (а) PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>МА и (б) PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>МА хидрогела на различитим температурама у опсегу од 5 до 60 °C.

Може се уочити да су PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>МА и PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>МА хидрогелови практично рН неосетљиви на нижим температурама, тј. температурама које су много ниже од VPTT, док рН осетљивост постаје наглашенија приближавањем VPTT. Тако, са слика се може уочити да је утицај рН најизраженији на температурама блиским, али испод VPTT. Стога, највероватније због незнатно јачих интеракција EG и PG група са хидроксилним јонима или протонима него са водом, јасно је да рН има значајну улогу у бубрењу и померају VPTT. На температурама вишим од VPTT, доминира хидрофобно понашање хидрогелова и бубрење постаје занемарљиво.

#### 4.3.2.3. Утицај рН раствора на температуре запреминских фазних прелаза хидрогелова

Разлике у VPTT добијених из мерења бубрења представљеним у зависности од рН вредности раствора пуфера приказане су на слици 4.17. Јасно се уочава да су добијене VPTT вредности за киселе и базне растворе пуфера неколико степени изнад VPTT вредности добијених за растворе неутралне рН. Слично понашање се уочава и у случају неколико других нејонских полимера на бази OAG. Тако, за OEGMA и олиго(етилен гликол) етил етар метакрилат (OEGEMA) различитих молекулских тежина, олиго(етилен гликол) диметакрилат (OEGDMA), као и за OPGMA, LCST вредности су изнад вредности уочених у околини неутралне рН [16, 152, 226]. Овај утицај је највероватније последица незнатно јачих интеракција AG јединица са хидроксилним јонима или протонима него са водом [149, 223].



Слика 4.17: Утицај рН на температуру запреминског фазног прелаза за PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA и PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA хидрогелове.

У температурно осетљивим нејонским полимерима и мрежама број интеракција (као што су полимер-полимер и вода-полимер хидрофобне интеракције, као и вода-полимер и вода-вода водоничне везе) има кључну улогу, што дато објашњење чини делимично упитним. Вероватније је да јони не интерагују директно са EG јединицама већ да врше утицај на структуру воде што последично доводи до реорганизације водоничних веза у систему и до слабљења интеракција полимер-вода [16, 227].

### 4.3.3. Морфологија хидрогелова

Морфологије PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA и PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA, као и PPG<sub>5</sub>MA и PEG<sub>6</sub>MA хомополимерних хидрогелова, узетих ради поређења, представљене су на слици 4.18. Узорци су пре лиофилизације бубрени у пуферу рН 7.4 на температури T=25 °C до достизања равнотеже, након чега је урађена морфолошка карактеризација.

	PPG <sub>5</sub> MA q <sub>e</sub> (25 °C) = 0.1	PPG <sub>6</sub> EG <sub>3</sub> MA q <sub>e</sub> (25 °C) = 0.2	PPG <sub>3</sub> EG <sub>6</sub> MA q <sub>e</sub> (25 °C) = 7.5	PEG <sub>6</sub> MA q <sub>e</sub> (25 °C) = 8.0
ПОПРЕЧНИ ПРЕСЕК (x750)				

Слика 4.18: СЕМ микрографи испитиваних лиофилизованих хидрогелова набубрелих до равнотеже на T=25 °C у раствору пуфера рН 7.4 пре лиофилизације.

Порозност узорака се разликује за испитиване хидрогелове и повећава се са порастом степена бубрења. Узорци са већим садржајем EG јединица имају значајно већу порозност, што

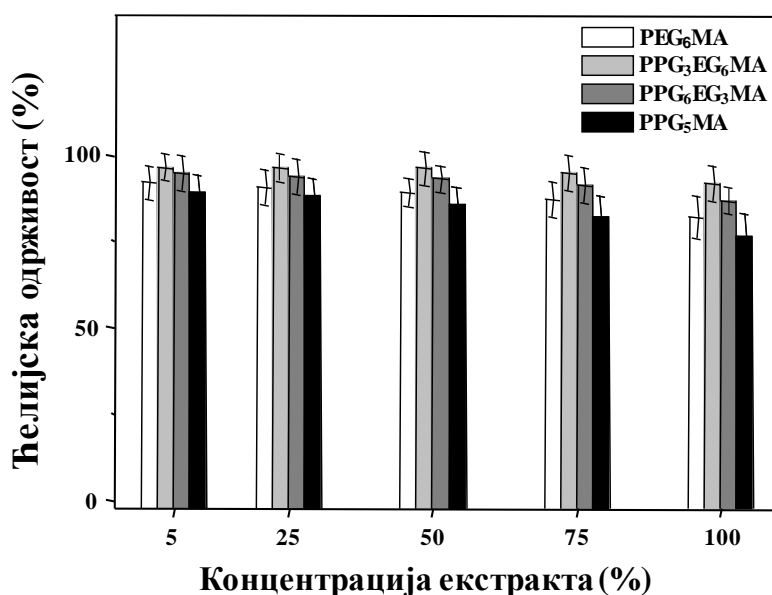
се односи како на величину тако и на број пора. Изражена разлика у морфологији између PPG<sub>5</sub>MA компактног састава и равномерне дистрибуције пора уочених за случај хидрогелова са већим садржајем EG јединица потврђује очекивање да са повећањем удела хидрофилније компоненте у систему долази не само до повећања равнотежног степена бубрења већ и до морфолошких промена хидрогела које се огледа у повећању порозности.

#### 4.3.4. Биокомпатибилност хидрогелова

Цитотоксичност и хемолитичка активност представљају примарне кораке за процену биокомпатибилности потенцијалних биоматеријала за клиничку употребу. Хидрогелови на бази OAGMA и производи њихове деградације се добро толеришу *in vivo* што омогућава њихова даља клиничка испитивања [142, 143].

У складу са ISO 10993-5 [228], цитотоксичност PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA и PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA хидрогелова испитана је преко *in vitro* анализе преживљавања (одрживости) ћелија [229]. Тест је рађен у разблаженом екстракту хидрогелова, на ћелијама субвезивног ткива миша, из *NCTC Clone 929* линије (*ATCC-CCL1*). Двочасовна инкубација је изведена у воденом купатилу на 37 °C. Раствор фенола (0.02 wt%) и екстракт полиетилена високе густине коришћени су као позитивна и негативна контрола. Цитотоксични потенцијал материјала је приказан као индекс цитотоксичности IC<sub>50%</sub> који представља концентрацију екстракта који сузбија формирање ћелијских колонија за 50% у поређењу са контролом [36].

У тесту цитотоксичности, израчунат је релативан проценат броја видљивих колонија са различитим концентрацијама екстракта, као продукта интеракције ћелија и хидрогела. Концентрација екстракта која изазва оштећење или смрт 50% ћелијске популације (IC<sub>50%</sub>) је позната као индекс цитотоксичности. Уколико је ћелијска одрживост узорка већа од 50%, узорак се може сматрати не-цитотоксичном [160]. Са слике 4.19, уочава се за све испитане хидрогелове и концентрације екстракта да су вредности ћелијске одрживости веће од 85% што је далеко изнад индекса цитотоксичности.



Слика 4.19: Ћелијска одрживост као функција концентрације екстракта за PPG<sub>5</sub>MA, PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA, PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA и PEG<sub>6</sub>MA хидрогелове.

Добијени резултати издвајају PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>МА хидрогелове као најпогодније због највећих одступања вредности ћелијске одрживости од индекса цитотоксичности за све концентрације екстракта.

Хемолитичка активност хидрогелова одређена је методом директног и индиректног контакта, према ISO 10993-4 [230].

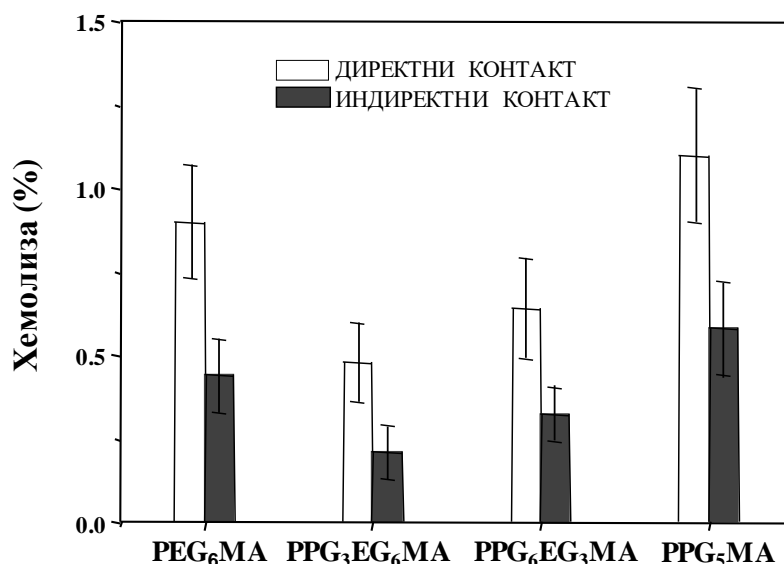
Метода директног контакта. Дискови хидрогелова потапани су у 5 ml физиолошког раствора у који је додато 0.25 ml чисте крви пацова. Као позитивна контрола коришћена је дестилована вода, док је физиолошки раствор коришћен као негативна контрола. Садржај епрувета је 1 h мешан и инкубиран у воденом купатилу на 37 °C, након чега је мерена апсорбанција бистре течности изнад талога на 545 nm коришћењем *Pharmacia LKB Ultrospec Plus* Уљ-Вид спектрофотометра и рачунат проценат хемоллизе.

Метода индиректног контакта. Коришћено је 5 ml изотоничног воденог раствора екстрахованог из дискова хидрогелова са 0.25 ml 10% суспензије еритроцита пацова. За припремање изотоничног воденог екстракта, дискови хидрогелова чувани су 72 h на 37 °C у 100 ml стерилисане деминерализоване воде уз додатак 0.9 g NaCl. Дестилована вода и физиолошки раствор коришћени су као позитивна и негативна контрола. Након двадесетчетворочасовне инкубације на 37 °C, мерена је апсорбанција аликуота на 545 nm и рачунат индекс хемоллизе као:

$$\text{Индекс хемоллизе (\%)} = \frac{(sh_u - sh_{np})}{sh_{pp} - sh_{np}} \cdot 100 \quad (3.3)$$

где је  $sh_u$  степен хемоллизе узорка,  $sh_{np}$  степен хемоллизе негативне пробе,  $sh_{pp}$  степен хемоллизе позитивне пробе. За сваки тип узорка рачуната је средња вредност три мерења.

Резултати хемолитичке активности су презентовани на **слици 4.20**. Хидрогелови у контакту са крвљу показали су средњу вредност хемоллизе од  $\leq 0.8\%$  у тесту директног контакта и  $\leq 0.5\%$  у тесту индиректног контакта. Добијени резултати су задовољавајући јер је средња вредност хемоллизе од 5% и мање сматрана прихватљивом [152, 223].



**Слика 4.20:** Хемолитичка активност PPGMA, PEG<sub>6</sub>PG<sub>3</sub>МА, PEG<sub>3</sub>PG<sub>6</sub>МА и PEGMA хидрогелова.

Висока ћелијска одрживост и ниска хемолитичка активност указују на то да сви испитани хидрогелови задовољавају *in vitro* биокомпатибилност, док су незнатно бољи резултати добијени за хидрогелове са EPG јединицама у бочном ланцу у односу на хидрогел са чистим PG и EG јединицама [151, 152].

#### 4.3.5. Контролисано отпуштање натријум диклофенака из PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>МА и PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>МА хидрогелова

Систем за контролисано отпуштање лека има за циљ да испоручи лек у одређеној дози, одржавајући концентрацију лека у телу на терапеутском нивоу ефикасности, односно да се обезбеди прикладан профил отпуштања лека [109, 110]. Међу системима за контролисано отпуштање лекова, хидрогелови су посебно интересантни због подесиве природе бубрења. Уопште, отпуштање лека зависи од природе самог хидрогела и лека, њихове узајамне интеракције, као и услова отпуштања.

Са циљем да се радијационо синтетисани кополимерни хидрогелови PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>МА и PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>МА испитају као потенцијални носачи за контролисано отпуштање лека, прах активне супстанце диклофенака, натријум диклофенак, коришћен је као модел-лек.

Хидрогелови приближно истих маса и дебљина потопани су у раствор натријум диклофенака концентрације 2 mg/ml и остављени 48h у фрижидеру на 5 °C како би апсорбовали лек и набубрели до равнотеже. Овако набубрели хидрогелови су потом вађени из раствора лека и остављени да се суше до константне масе при истим температурским условима и у одсуству светлости након чега су коришћени у експериментима контролисаног отпуштања лека.

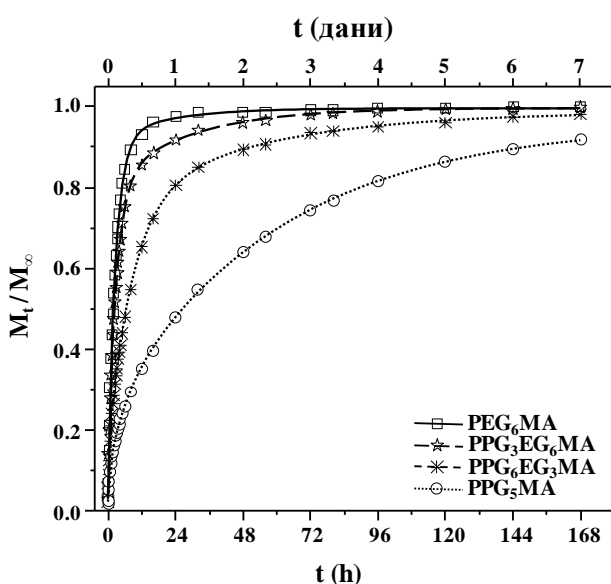


Слика 4.21: Експериментална поставка за *in vitro* контролисано отпуштање лека.

Анализа контролисаног отпуштања диклофенака из хидрогелова изведена је у *in vitro* условима (слика 4.21). На магнетној мешалици са грејањем термостатираној на 37 °C постављени су хидрогелови са апсорбованим леком, у 30 ml раствора пуфера рН 7.4. Количина ослобођеног лека праћена је седам дана на Уљ-Вид спектрофотометру, мерењем апсорбанције аликуота раствора у одређеним временским интервалима. Како би се запремина раствора

очувала константном, аликуот је после сваког мерења враћан у пуферски раствор. За праћење отпуштања лека мерене су апсорбације на 276 nm, таласној дужини која одговара једној од хромофора (2,6-дихлородифенил амин) која омогућава Уљ-Вид спектрофотометријско мерење раствора диклофенака [231, 232].

Профили отпуштања лека за испитиване хидрогелове представљени су на **слици 4.22**. Евидентан је утицај односа EG и PG јединица на профил отпуштања. Код свих испитиваних гелова на самом почетку, у „раној фази“ отпуштања лека долази до тзв. „ефекта пуцања“, који је праћен ослобађањем велике количине лека, односно, наглим порастом криве отпуштања, након чега криве улазе у сатурацију. „Ефекат пуцања“ је најизраженији за PEG<sub>6</sub>МА хидрогел, а затим за PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>МА. У овој фази брзина миграције лека кроз хидрогел је већа, концентрација лека унутар хидрогела је много већа него изван хидрогела, па настала разлика у концентрацији представља погонску силу за дифузију. Нагли скок који се дешава у овој фази може се приписати отпуштању велике количине лека са површине хидрогела. У „касној фази“ јавља се смањење брзине ослобађања лека и постепено достизање равнотежних вредности.



**Слика 4.22:** Профил отпуштања натријум диклофенака на температури од 37 °C у раствору пуфера pH 7.4.

Уочен тренд за PEG<sub>6</sub>МА и PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>МА хидрогелове последица је најмањег садржаја хидрофобних PG јединица, високих вредности VPTT (изнад 47 °C), као и највећег степена бубрења и порозности. Са друге стране, PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>МА са VPTT (32 °C) која је нешто нижа од вредности температуре отпуштања лека (37 °C), за последицу има спорији профил отпуштања.

Вредности кинетичке константе ( $k$ ), дифузионог експонента ( $n$ ) и дифузионог коефицијента за „рану“ ( $D_e$ ) и „касну“ ( $D_l$ ) фазу процеса отпуштања лека су израчунате на основу једначина (1.22) и (1.23) датим у поглављу 1.2.4 и представљене у **табели 4.4**. Како би се испитала применљивост PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>МА и PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>МА хидрогелова за контролисано отпуштање лекова, време које је потребно да хидрогел отпусти половину упијеног лека у ксерогелу ( $t_{1/2}$ ), такође је дато у **табели 4.4**.

**Табела 4.4:** Кинетички параметри отпуштања натријум диклофенака из PAGMA хидрогелова на температури 37 °C у раствору пуфера рН 7.4.

ХИДРОГЕЛ	$k$ (h <sup>-n</sup> )	$n$	$D_e \cdot 10^7$ (cm <sup>2</sup> /s)	$D_l \cdot 10^8$ (cm <sup>2</sup> /s)	$t_{1/2}$ (h)
PPG <sub>5</sub> МА	0.12	0.44	0.07	0.49	26.7
PPG <sub>6</sub> EG <sub>3</sub> МА	0.21	0.46	0.45	0.97	6.6
PPG <sub>3</sub> EG <sub>6</sub> МА	0.31	0.48	0.92	1.32	2.3
PEG <sub>6</sub> МА	0.39	0.50	1.30	1.68	1.8

Вредности  $n$  се крећу од 0.44 до 0.50 и указују на то да се процес отпуштања може описати *Fick*-овим механизмом транспорта и представља систем отпуштања контролисан дифузијом. Хидрогел PPG<sub>5</sub>МА има  $n = 0.44$  и показује јасно *Fick*-ову дифузију. Даље, вредности дифузионих коефицијента расту за мешане PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>МА и PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>МА хидрогелове са повећањем броја EG јединица указујући уједно на то да је мобилност натријум диклофенака израженија за хидрогелове са већим садржајем хидрофилних јединица.

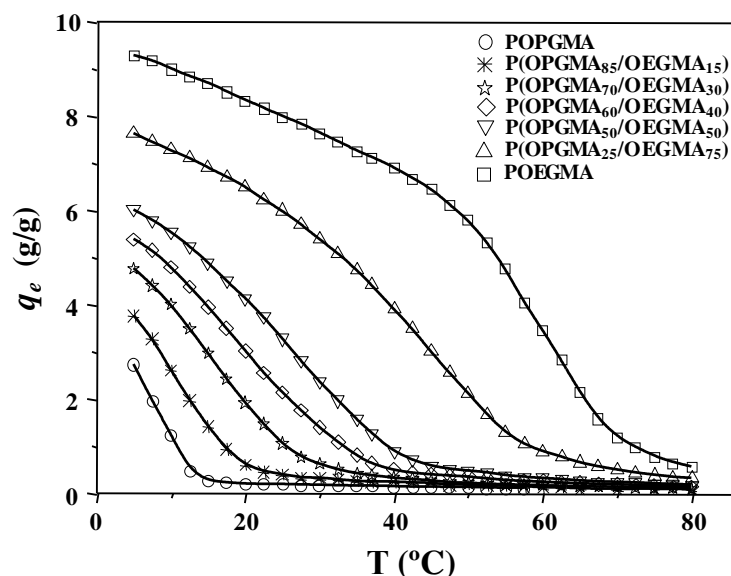
Време потребно за ослобађање половине почетне количине лека из хидрогелова ( $t_{1/2}$ ) креће се од 26.7 до 1.8 h, док укупно време трајања ослобађања лека од седам дана пружа увид у могућност примене ових хидрогелова као носача изабраног модел-лека за дужи терапијски период.

Вредности дифузионог коефицијента за „рану“ и „касну“ фазу процеса отпуштања лека,  $D_e$  и  $D_l$ , су такође под утицајем састава хидрогела, па тако и односа EG и PG јединица. Јасно се уочава да динамика бубрења/скуплања хидрогелова има доминантан утицај на процес отпуштања на начин да хидрогелови са већим степеном бубрења омогућавају бржу динамику отпуштања лека. Највише вредности  $D_e$  и  $D_l$  уочене су за PEG<sub>6</sub>МА и PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>МА хидрогелове, што има за последицу највеће количине ослобођеног лека из ових матрица. Дифузиони коефицијенти за преостала два хидрогела опадају са смањењем удела EG јединица у структури достижући најнижу вредност за хидрогел са чистим PG јединицама у саставу, PPG<sub>5</sub>МА.

#### 4.4. ТЕМПЕРАТУРНО ОСЕТЉИВИ КОПОЛИМЕРНИ ХИДРОГЕЛОВИ СА РАЗЛИЧИТИМ УДЕЛИМА ОЛИГО(ПРОПИЛЕН ГЛИКОЛ) МЕТАКРИЛАТА И ОЛИГО(ЕТИЛЕН ГЛИКОЛ) МЕТАКРИЛАТА

##### 4.4.1. Анализа бубрења и одређивање VРТТ хидрогелова

Испитујући температуру осетљивост система на бази OPGMA, синтетисани су и кополимерни хидрогелови P(OPGMA/OEGMA) са иницијално различитим уделом OPGMA и OEGMA као и хомополимерни хидрогелови, POPGMA и POEГMA. Анализиране су динамика бубрења, температурна и рН осетљивост, и одређене су вредности запреминског фазног прелаза. Због потенцијалне примене хидрогелова као носача за контролисано ослобађање лекова испитивања су изведена при физиолошким условима (Т=37 °C и рН 7.4) при чему је добијен и профил отпуштања диклофенака, коришћеног као модел-лек.

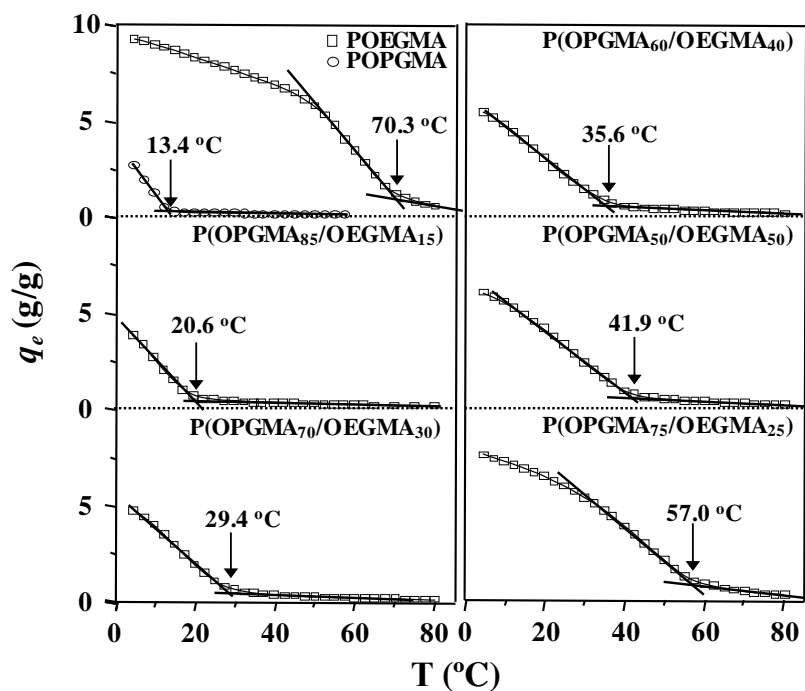


**Слика 4.23:** Утицај промене температуре на равнотежни степен бубрења хидрогелова: POPGMA, P(OPGMA<sub>85</sub>/OEGMA<sub>15</sub>), P(OPGMA<sub>70</sub>/OEGMA<sub>30</sub>), P(OPGMA<sub>60</sub>/OEGMA<sub>40</sub>), P(OPGMA<sub>50</sub>/OEGMA<sub>50</sub>), P(OPGMA<sub>25</sub>/OEGMA<sub>75</sub>), POEGMA.

Пратећи динамике бубрења испитиваних хидрогелова, уочава се јасна разлика између хидрогелова који садрже више олиго(етилен гликолних) јединица мономера и оних који садрже више олиго(пропилен гликолних) јединица (слика 4.23). Осим што показују знатно већи степен бубрења, хидрогелови са већим уделом OEGMA показују и слабу температурску зависност до око 40 °C, као и блажи пад равнотежног степена бубрења са порастом температуре. Као последица тога, температуре запреминских фазних прелаза су на вредностима далеко вишим од физиолошких температура, тј. температура од значаја за примену у биомедицини.

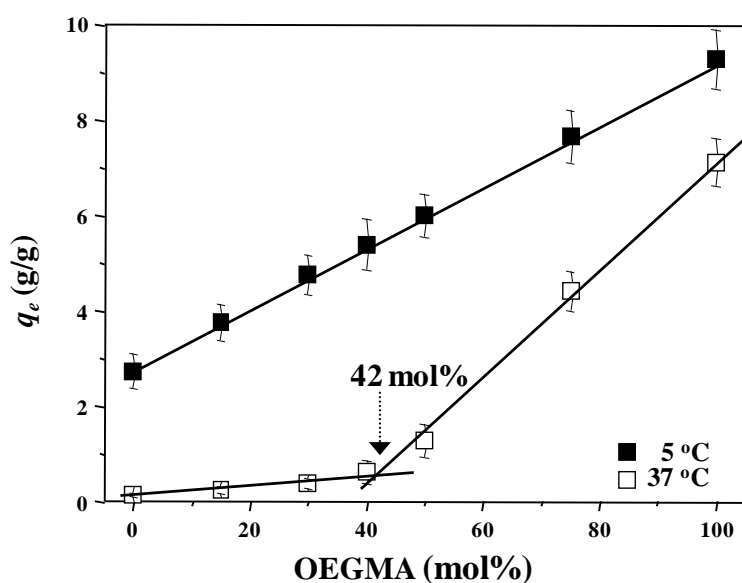
Са друге стране, хидрогелови са већим уделом OPGMA имају ниже степене бубрења и оштрији температурски прелаз при чему повећање удела OEGMA доводи, не само до померања фазног прелаза ка вишим температурама, већ и до повећања степена бубрења (слика 4.24). Уочено је да се VPTT вредности за овај сет хидрогелова крећу од 13.7 до 70.3 °C за хомополимерне хидрогелове, док за кополимерне хидрогелове са опадањем удела OPGMA у хидрогелу VPTT расте од 20.6 до 57 °C. Кополимерни хидрогелови чије су VPTT вредности најближе физиолошкој температури, што их чини и најподеснијим као материјале за биомедицинску примену, су: P(OPGMA<sub>60</sub>/OEGMA<sub>40</sub>) чија је вредност VPTT 35.6 °C и P(OPGMA<sub>50</sub>/OEGMA<sub>50</sub>) чија је вредност VPTT 41.9 °C.





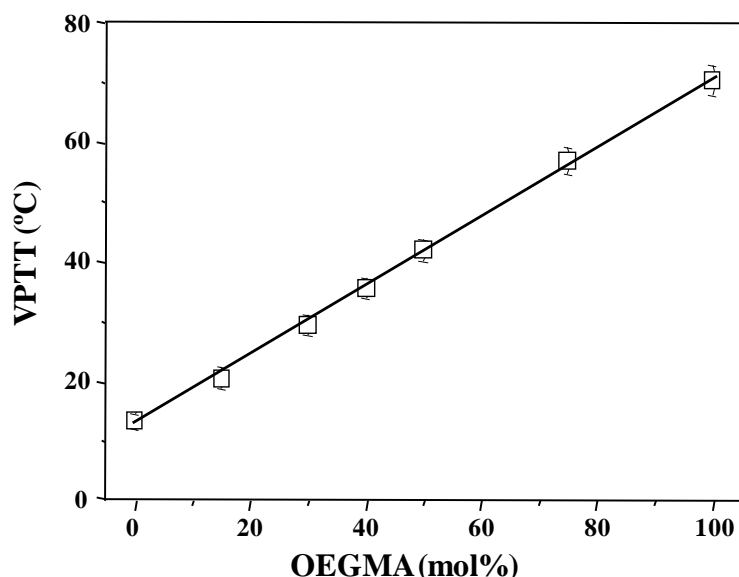
**Слика 4.24:** Утицај температуре на равнотежни степен бубрења РОЕГМА и РОРГМА хомополимерних хидрогелова и Р(ОЕГМА/ОПГМА) кополимерних хидрогелова у раствору пуфера рН 7.4

Узимајући у обзир зависности равнотежног степена бубрења од молског удела мономера ОЕГМА на две температуре (5 и 37 °C) у раствору пуфера рН 7.4 (слика 4.25), уочавају се два тренда. Зависност добијена за 5 °C показује линеарни пораст промене степена бубрења са повећањем удела ОЕГМА мономера у хидрогелу, док је зависност добијена за 37 °C сложенија. За ниже уделе мономера ОЕГМА уочава се незнатна промена равнотежног степена бубрења, да би са повећањем удела ОЕГМА већим од 42 mol% дошло до наглог скока равнотежног степена бубрења.



**Слика 4.25:** Утицај удела ОЕГМА мономера у кополимерним Р(ОПГМА/ОЕГМА) хидрогеловима на равнотежни степен бубрења, на две температуре, 5 и 37 °C.

Посматрајући из угла потенцијалне примене хидрогелова као матрица за отпуштање лекова и других активних супстанци, може се закључити да су од интереса управо хидрогелови са уделом од око 42 mol% OEGMA. Очекивано је да уочена разлика између добијених вредности за равнотежни степен бубрења на 5 °C (температури упијања лека) и 37 °C (температури отпуштања лека) за 42 mol% OEGMA представља довољан услов да хидрогел упије довољну количину лека и да га при физиолошким условима у што већој мери отпусти.



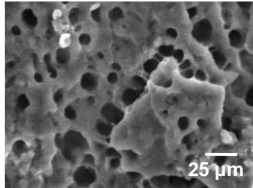
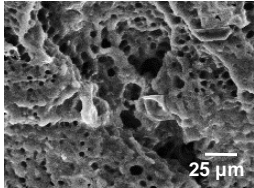
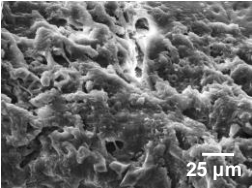
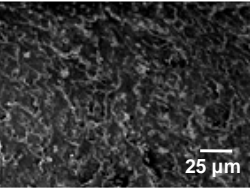
**Слика 4.26:** Утицај удела OEGMA мономера у кополимерним P(OPGMA/OEGMA) хидрогеловима на температуру запреминског фазног прелаза.

Даље, одређивањем VPTT за испитиване хидрогелове, направљен је детаљан увид у температурско понашање система у зависности од молског удела OEGMA, односно OPGMA, у саставу P(OPGMA/OEGMA) хидрогела (слика 4.26). Добијен линеарни однос указује на могућност да се у зависности од вредности на којој се јавља запреминска промена, лако може наћи однос комономера неопходан за синтезу хидрогела за жељену примену.

#### 4.4.2. Морфолошка испитивања

Морфолошка анализа је урађена за P(OPGMA/OEGMA) хидрогел са једнаким моларним уделом мономера на четири температуре и при увеличању од 750 пута (слика 4.27).

На основу СЕМ микрографа попречног пресека лиофилизованог хидрогела, уочен је утицај температуре на његове морфолошке карактеристике. Са променом температуре од 5 до 45 °C запажено је да долази до опадања порозности. За узорак сниман на 5 °C уочена је изражена сунђераста порозна структура, са релативно униформном дистрибуцијом пора, карактеристичним за хидрогелове са већим степеном бубрења. Са порастом температуре долази до смањења броја и величине пора, да би на температури од 45 °C структура хидрогела постала компактна, што се одражава и на његов степен бубрења који опада на свега 0.6.

	P(OPGMA <sub>50</sub> /OEGMA <sub>50</sub> )			
	q <sub>e</sub> (5 °C) = 6.0	q <sub>e</sub> (25 °C) = 3.3	q <sub>e</sub> (37 °C) = 1.3	q <sub>e</sub> (45 °C) = 0.6
ПОПРЕЧНИ ПРЕСЕК (x750)				

**Слика 4.27:** СЕМ микрографи лиофилизованих хидрогелова P(OPGMA<sub>50</sub>/OEGMA<sub>50</sub>); попречни пресеци микроструктура набубрелих до равнотеже за четири температуре: 5, 25, 37 и 45 °C у раствору пуфера рН 7.4 пре лиофилизације.

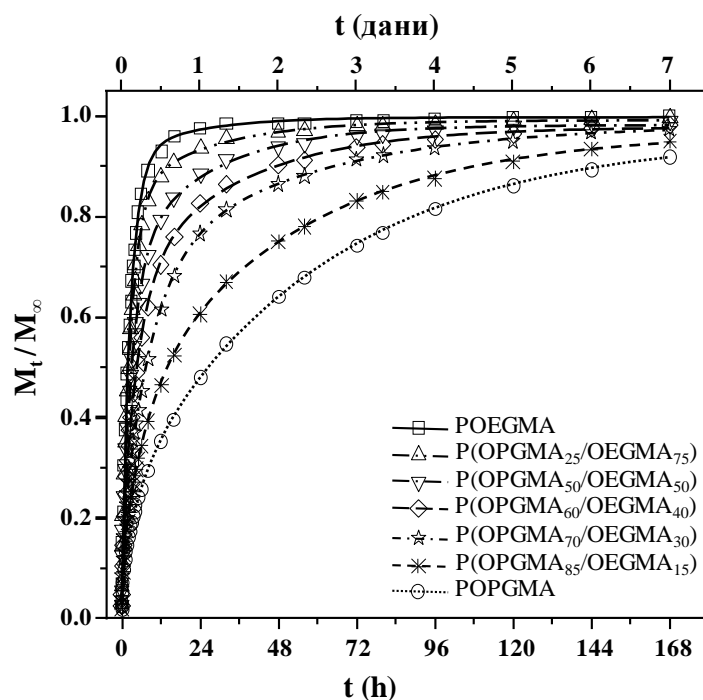
Добијена микроструктура подржава чињеницу да порозност хидрогелова може бити контролисана не само саставом, већ и спољним утицајима попут температуре (или рН средине).

#### 4.4.3. Контролисано отпуштање натријум диклофенака из P(OPGMA/OEGMA) хидрогелова

Процедура описана у поглављу 4.3.5. поновљена је са циљем да се радијационо синтетисани кополимерни хидрогелови P(OPGMA/OEGMA) са различитим уделима мономера OPGMA и OEGMA испитају као потенцијални носачи за контролисано отпуштање лека.

Кинетика *in vitro* процеса отпуштања натријум диклофенака из P(OPGMA/OEGMA) хидрогелова анализирана је преко „ране“ и „касне“ фазе процеса отпуштања описана једначинама (1.22) и (1.23) у поглављу 1.2.4. Профили отпуштања лека у физиолошким условима, у пуферу рН 7.4 на температури 37 °C, за целокупан период отпуштања представљени су на **слици 4.28**. Концентрација натријум диклофенака у раствору у ком се одвија отпуштање у било ком тренутку  $t (c_t)$  је рачуната из одговарајуће калибрационе криве, из чега је даље рачуната количина лека ослобођена у одређеном времену ( $M_t$ ). Отпуштање лека је праћено у периоду од седам дана. Свака тачка представља средњу вредност три мерења при истим условима.

Транспорт лека и флуида унутар хидрогела током процеса отпуштања представља динамички и сложен процес. За све P(OPGMA/OEGMA) хидрогелове је уочен дуготрајан процес за који се разликују две фазе. У „раној“ фази долази до појаве „ефекта пуцања“, како се назива отпуштање велике количине лека и за ову фазу су карактеристичне већа брзина миграције лека и значајна разлика концентрације лека унутар и изван гела, што заправо представља погонску силу за дифузију. У овој фази такође долази до отпуштања велике количине натријум диклофенака са површине хидрогела. У „каснијој“ фази долази до опадања брзине отпуштања лека и постепеног достизања сатурације.



**Слика 4.28:** Профил отпуштања натријум диклофенака из хидрогелова: РОЕГМА, P(OPGMA<sub>25</sub>/OEGMA<sub>75</sub>), P(OPGMA<sub>50</sub>/OEGMA<sub>50</sub>), P(OPGMA<sub>60</sub>/OEGMA<sub>40</sub>), P(OPGMA<sub>70</sub>/OEGMA<sub>30</sub>), P(OPGMA<sub>85</sub>/OEGMA<sub>15</sub>) и РОРГМА.

Анализом кинетике отпуштања натријум диклофенака из P(OPGMA/OEGMA) хидрогелова одређене су вредности кинетичке константе отпуштања лека ( $k$ ), дифузионог експонента ( $n$ ), коефицијента дифузије за „рану“ ( $D_e$ ) и „касну“ ( $D_l$ ) фазу процеса отпуштања лека, као и време за које се ослободи половина апсорбованог лека ( $t_{1/2}$ ) (табела 4.5). Вредности дифузионог експонента се крећу од 0.44 до 0.50 указујући на то да се процес отпуштања лека може описати *Fick*-овим механизмом транспорта и представља систем отпуштања контролисан дифузијом. Највеће вредности дифузионог експонента добијене су за чист РОЕГМА и P(OPGMA<sub>25</sub>/OEGMA<sub>75</sub>) хидрогел. Повећање броја EG јединица у хидрогелу доводи до повећања степена бубрења и упоредо повећање вредности дифузионих коефицијената, што указује и на повећање покретљивости натријум диклофенака у датом хидрогелу.

Најбржи профил за целокупни период отпуштања има РОЕГМА са чистим EG јединицама због највеће хидрофилности, степена бубрења и порозности. Хидрогелови који садрже веће уделе OPGMA комомера, као и чист РОРГМА хидрогел, показују постепеније отпуштање. Време потребно за отпуштање половине почетне количине лека из хидрогелова ( $t_{1/2}$ ) креће се од 1.8 до 26.7 h, док укупно време отпуштања од 168 h указује на могућност примене ових хидрогелова као носача лека, за дужи терапеутски период.

**Табела 4.5.** Кинетички параметри отпуштања натријум диклофенака из различитих P(OPGMA/OEGMA) хидрогелова на температури 37 °С у раствору пуфера рН 7.4.

ХИДРОГЕЛ	$k$ (h <sup>-n</sup> )	$n$	$D_e \cdot 10^7$ (cm <sup>2</sup> /s)	$D_l \cdot 10^8$ (cm <sup>2</sup> /s)	$t_{1/2}$ (h)
POPGMA	0.12	0.44	0.07	0.49	26.7
P(OPGMA <sub>85</sub> /OEGMA <sub>15</sub> )	0.16	0.45	0.21	0.78	14.5
P(OPGMA <sub>70</sub> /OEGMA <sub>30</sub> )	0.21	0.46	0.41	0.92	7.6
P(OPGMA <sub>60</sub> /OEGMA <sub>40</sub> )	0.24	0.47	0.58	1.05	4.7
P(OPGMA <sub>50</sub> /OEGMA <sub>50</sub> )	0.28	0.48	0.76	1.15	3.2
P(OPGMA <sub>25</sub> /OEGMA <sub>75</sub> )	0.34	0.49	1.13	1.33	2.1
POEGMA	0.39	0.50	1.30	1.68	1.8

Повезаност особина бубрења P(OPGMA/OEGMA) хидрогелова са динамиком отпуштања лека је очигледна. Хидрогелови већег степена бубрења, попут POEGMA, имају способност да апсорбују веће количине лека, али и наглашен „ефекат пуцања“. Највише вредности  $D_e$  и  $D_l$  добијене су за POEGMA, што указује и на највећу брзину отпуштања лека. Дифузиони коефицијенти осталих хидрогелова опадају са опадањем удела POEGMA комомера у структури хидрогела.

Кополимерни P(OPGMA/OEGMA) хидрогелови показали су се као погодан систем за уградњу активних супстанци и за потенцијалну примену у системима за контролисано отпуштање натријум диклофенака. Ови хидрогелови могу апсорбовати довољне количине лека и обезбедити континуално отпуштање лека на дужи период због њихових дуготрајних профила отпуштања.

## 5. ЗАКЉУЧАК

---

Докторска дисертација обухвата преглед резултата проистеклих из испитивања хидрогелова који у свом саставу садрже олиго(пропилен гликол) као PORGMA хомополимер, ORGMA ко-мономер или као један од ORG висећих ланаца у метакрилатном полимеру. Сви хидрогелови су радијационо синтетисани након чега им је испитан утицај температуре и рН вредности раствора на процес бубрења, термичка својства и морфологију. Утицај различитог удела мономера, биокompatibilност хидрогелова и отпуштање лека су испитивани за појединачне системе/случајеве.

Након изведених испитивања могу се извести следећи закључци:

- Сви системи су успешно радијационо синтетисани применом гама зрачења из извора  $^{60}\text{Co}$ . Конверзија мономера у гел фазу током реакције умрежавања је ефикасна и скоро комплетна за све синтетисане хидрогелове. Добијени су високи степени гелирања ( $> 90\%$ ) при условима синтезе који подразумевају умрежавање хидрогелова у раствору вода/етанол при брзини зрачења од  $0.5 \text{ kGy/h}$  и укупној апсорбованој дози зрачења од  $25 \text{ kGy}$  и уз EGDMA као умреживач.
- Температурска осетљивост је уочена за све синтетисане хидрогелове.
- рН осетљивост је посебно наглашена у случају хидрогелова који садрже итаконску киселину. Степен бубрења директно зависи од удела итаконске киселине у хидрогелу и већи је што је удео итаконске киселине већи.
- ФТИЦ мерењима установљена је успешна кополимеризација (и умрежавање) синтетисаних хидрогелова.
- Резултати СЕМ анализе показали су да хидрогелови имају порозну структуру и да величина пора зависи од састава хидрогела и температуре на којој је бубрен испитивани хидрогел пре лиофилизације.
- Термичка, ДСК мерења хидрогелова и Уљ-Вид мерења њима одговарајућих раствора мономера, потврдила су постојање температурске осетљивости и добијене су вредности температура прелаза које су у доброј сагласности са вредностима добијеним испитивањем кинетике бубрења хидрогелова.
- Кополимеризацијом хидрофобног ORGMA мономера и температурски неосетљиве и нешто хидрофилније компоненте, НЕМА, са малим уделом итаконске киселине (2 и 4 wt%) добијен је први сет кополимерних хидрогелова P(ORGMA/НЕМА/IA) за које је поред температурске осетљивости, добијен и значајан одзив на промену рН вредности средине. Осим што за рН вредности изнад константи дисоцијације итаконске киселине равнотежни степени бубрења расту са порастом удела киселине, уочено је и да P(ORGMA/НЕМА/IA) кополимерни хидрогелови имају добре морфолошке и термалне карактеристике. Такође, P(ORGMA/НЕМА/IA4) хидрогел показује температурски прелаз на  $37.8 \text{ }^\circ\text{C}$  из анализе бубрења, односно  $38.4 \text{ }^\circ\text{C}$  из ДСК мерења, који одговара физиолошким вредностима што омогућава њихову потенцијалну примену у биомедицини.
- Други сет хидрогелова чине метакрилатни хидрогелови са олиго(пропилен гликол) и олиго(етилен гликол) висећим ланцима, PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA и PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA, чијим испитивањем је утврђено да су температурски осетљиви. Иако рН неосетљиви, на

температурама нижим од запреминског температурског прелаза, њихова рН осетљивост постаје уочљива приближавањем VPTT. Стога, највероватније због незнатно јачих интеракција EG и PG група са хидроксилним јонима или протонима него са водом, уочава се да рН има знатан утицај у близини VPTT. На температурама вишим од VPTT доминира хидрофобно понашање хидрогелова, па тако бубрење и рН осетљивост постају занемарљиви.

- Присуство етилен гликола, компоненте далеко хидрофилније од пропилен гликола, условио је појаву већег степена бубрења, као и појаву температурског прелаза неколико степени изнад физиолошких вредности температура. Поред високе ћелијске одрживости и ниске хемолитичке активности које указују на то да PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA и PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA хидрогелови задовољавају *in vitro* биокомпатибилност, добијени резултати за ову серију хидрогелова подражавају њихову потенцијалну примену као носача у магнетној и/или фототермалној хипертермијској терапији за лечење рака.
- Трећу серију чине кополимерни P(OPGMA/OEGMA) хидрогелови са различитим моларним уделима OPGMA и OEGMA мономера. Њиховим испитивањем уочен је тренд да са порастом удела EG висећих ланаца у иницијалној смеси, долази до линеарног пораста температуре запреминског прелаза. Оваква зависност VPTT од хемијског састава хидрогела је од изузетног значаја јер омогућава да се у складу са потенцијалном применом и захтеваних температура прелаза из ове зависности очита и тачан однос мономера у саставу хидрогела који ће задовољити постављени услов. Посматрајући из угла потенцијалне примене хидрогелова као носача за отпуштање лекова и других активних супстанци, може се закључити да су од интереса управо хидрогелови са уделом OEGMA мономера око 42 mol%. Наиме, разлика између добијених вредности за равнотежни степен бубрења на температури упијања лека за коју је степен бубрења за дати кополимер највећи, и равнотежни степен бубрења на експериментално одабраној температури отпуштања лека, указује на то да је потенцијал отпуштања лека највећи за хидрогел са уделом OEGMA мономера од 42 mol%.
- Уопштено, анализом је утврђено да је процес отпуштања лека условљен саставом хидрогела. Испитивани температурно осетљиви хидрогелови PPG<sub>6</sub>EG<sub>3</sub>MA, PPG<sub>3</sub>EG<sub>6</sub>MA и P(OPGMA/OEGMA) су се показали као системи погодни за уградњу активних супстанци и за потенцијалну примену у системима за контролисано отпуштање натријум диклофенака коришћеног као модел-лек. Ови хидрогелови могу апсорбовати довољне количине лека, и у исто време, услед њихових дуготрајних профила отпуштања, обезбеђују континуално ослобађање лека дужи временски период. Анализом профила отпуштања може се закључити да је динамика отпуштања лека условљена саставом хидрогела код обе серије хидрогелова. Брзина отпуштања лека расте са уделом EG јединица у саставу хидрогела. Способност испитиваних хидрогелова да отпуштају лек контролисаном брзином, која директно зависи од избора састава хидрогела, чини их погодним носачима у системима за контролисано отпуштање лекова.

## РЕФЕРЕНЦЕ

---

- [1] D. Williams, Advanced applications for materials implanted within the human body, *Materials science and technology* 3 (1987) 797-806.
- [2] W.R. Wagner, S.E. Sakiyama-Elbert, G. Zhang, M.J. Yaszemski, *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, Academic Press 2020.
- [3] S. Ramakrishna, J. Mayer, E. Wintermantel, K.W. Leong, *Biomedical applications of polymer-composite materials: a review*, *Composites science and technology* 61 (2001) 1189-1224.
- [4] R. Fazel-Rezai, *Biomedical Engineering: Frontiers and Challenges*, BoD–Books on Demand 2011.
- [5] J.A. Burdick, A.J. Peterson, K.S. Anseth, Conversion and temperature profiles during the photoinitiated polymerization of thick orthopaedic biomaterials, *Biomaterials* 22 (2001) 1779-1786.
- [6] S.J. Peter, P. Kim, A.W. Yasko, M.J. Yaszemski, A.G. Mikos, Crosslinking characteristics of an injectable poly (propylene fumarate)/ $\beta$ -tricalcium phosphate paste and mechanical properties of the crosslinked composite for use as a biodegradable bone cement, *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials* 44 (1999) 314-321.
- [7] F. Ullah, M.B.H. Othman, F. Javed, Z. Ahmad, H.M. Akil, Classification, processing and application of hydrogels: A review, *Materials Science and Engineering: C* 57 (2015) 414-433.
- [8] J. Li, X. Jia, L. Yin, Hydrogel: Diversity of structures and applications in food science, *Food Reviews International* 37 (2021) 313-372.
- [9] J. Park, R.S. Lakes, *Biomaterials: an introduction*, Springer Science & Business Media 2007.
- [10] E.M. Ahmed, Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *Journal of advanced research* 6 (2015) 105-121.
- [11] 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.
- [12] J. Rosiak, P. Ulański, Synthesis of hydrogels by irradiation of polymers in aqueous solution, *Radiation Physics and Chemistry* 55 (1999) 139-151.
- [13] E. Nedkov, S. Tsvetkova, Effect of gamma irradiation on the crystalline structure of ultra high molecular weight poly(ethylene oxide), *Radiation Physics and Chemistry* 43 (1994) 397-401.
- [14] J.M. Rosiak, P. Ulański, L. Pajewski, F. Yoshii, K. Makuuchi, Radiation formation of hydrogels for biomedical purposes. Some remarks and comments, *Radiation Physics and Chemistry* 46 (1995) 161-168.
- [15] J.M. Rosiak, Radiation formation of hydrogels for drug delivery, *Journal of Controlled Release* 31 (1994) 9-19.
- [16] E. Suljovrujic, Z.R. Miladinovic, M. Micic, D. Suljovrujic, D. Milicevic, The influence of monomer/solvent feed ratio on POEGDMA thermoresponsive hydrogels: Radiation-induced synthesis, swelling properties and VPTT, *Radiation Physics and Chemistry* 158 (2019) 37-45.
- [17] J.M. Rosiak, F. Yoshii, Hydrogels and their medical applications, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 151 (1999) 56-64.
- [18] M. Şen, M. Sarı, Radiation synthesis and characterization of poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate-co-N-vinyl 2-pyrrolidone) hydrogels, *European Polymer Journal* 41 (2005) 1304-1314.
- [19] C. von Sonntag, *Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair: A Chemical Perspective*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2006.
- [20] L.T. Bugaenko, M.G. Kuzmin, L.S. Polak, *Chemistry of High Energies*, Khimiya, Moscow, 1988.
- [21] J.W. Spinks, R.J. Woods, *An introduction to radiation chemistry*, (1990).



- [22] J. Rosiak, I. Janik, S. Kadlubowski, M. Kozicki, P. Kujawa, P. Stasica, P. Ulanski, Radiation formation of hydrogels for biomedical application, *Radiation synthesis and modification of polymers for biomedical applications* 5 (2002).
- [23] C. Dispenza, S. Alessi, J. Spadaro, Radiation processing of polymers in aqueous media, *Applications of Ionizing Radiation in Materials Processing*. Warszawa: INCT (2017) 291-326.
- [24] W.E. Hennink, C.F. van Nostrum, Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Advanced drug delivery reviews* 64 (2012) 223-236.
- [25] P. Ulanski, E. Bothe, K. Hildenbrand, J.M. Rosiak, C. von Sonntag, Hydroxyl-radical-induced reactions of poly (acrylic acid); a pulse radiolysis, EPR and product study. Part II. Oxygenated aqueous solutions, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* (1996) 23-28.
- [26] J.M. Rosiak, F. Yoshii, Hydrogels and their medical applications, *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms* 151 (1999) 56-64.
- [27] W.E. Hennink, C.F. van Nostrum, Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Adv Drug Deliver Rev* 54 (2002) 13-36.
- [28] T. Schmidt, C. Querner, K.F. Arndt, Characterization methods for radiation crosslinked poly(vinyl methyl ether) hydrogels, *N. 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] K. Deligkaris, T.S. Tadele, W. Olthuis, A. van den Berg, Hydrogel-based devices for biomedical applications, *Sensors and Actuators B: Chemical* 147 (2010) 765-774.
- [31] K. Pal, A. Banthia, D.K. Majumdar, Polymeric hydrogels: characterization and biomedical applications, *Designed monomers and polymers* 12 (2009) 197-220.
- [32] C.L. Bell, N.A. Peppas, Measurement of the swelling force in ionic polymer networks. III. Swelling force of interpolymer complexes, *Journal of controlled release* 37 (1995) 277-280.
- [33] N. Peppas, Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers, *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 60 (1985) 110-111.
- [34] A.S. Hoffman, Hydrogels for biomedical applications, *Advanced drug delivery reviews* 64 (2012) 18-23.
- [35] A. Patel, K. Mequanint, Hydrogel biomaterials, *Biomedical engineering-frontiers and challenges*, IntechOpen2011.
- [36] N. Peppas, Y. Huang, M. Torres-Lugo, J. Ward, J. Zhang, Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology, *Annual review of biomedical engineering* 2 (2000) 9-29.
- [37] N. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa, Hydrogels in pharmaceutical formulations, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 50 (2000) 27-46.
- [38] M.P. Mullarney, T.A. Seery, R. Weiss, Drug diffusion in hydrophobically modified N, N-dimethylacrylamide hydrogels, *Polymer* 47 (2006) 3845-3855.
- [39] J. Siepmann, N.A. Peppas, Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), *Advanced drug delivery reviews* 64 (2012) 163-174.
- [40] 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, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 19 (2008) 2771-2780.
- [41] J. Seuring, S. Agarwal, Polymers with upper critical solution temperature in aqueous solution, *Macromolecular rapid communications* 33 (2012) 1898-1920.
- [42] K. Bansal, P. Upadhyay, G. Saraogi, A. Rosling, J. Rosenholm, Advances in thermo-responsive polymers exhibiting upper critical solution temperature (UCST), *eXPRESS Polymer Letters* 13 (2019) 974-992.

- [43] J. Niskanen, C. Wu, M. Ostrowski, G.G. Fuller, H. Tenhu, S. Hietala, Interfacial and fluorescence studies on stereoblock poly (N-isopropylacrylamide)s, *Langmuir* 28 (2012) 14792-14798.
- [44] L. Hou, P. Wu, LCST transition of PNIPAM-b-PVCL in water: cooperative aggregation of two distinct thermally responsive segments, *Soft Matter* 10 (2014) 3578-3586.
- [45] Q. Zhang, C. Weber, U.S. Schubert, R. Hoogenboom, Thermoresponsive polymers with lower critical solution temperature: from fundamental aspects and measuring techniques to recommended turbidimetry conditions, *Materials Horizons* 4 (2017) 109-116.
- [46] Y. Cao, C. Zhang, W. Shen, Z. Cheng, L.L. Yu, Q. Ping, Poly (N-isopropylacrylamide)-chitosan as thermosensitive in situ gel-forming system for ocular drug delivery, *Journal of controlled release* 120 (2007) 186-194.
- [47] C. Weber, S. Rogers, A. Vollrath, S. Hoepfner, T. Rudolph, N. Fritz, R. Hoogenboom, U.S. Schubert, Aqueous solution behavior of comb-shaped poly (2-ethyl-2-oxazoline), *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 51 (2013) 139-148.
- [48] W. Steinhauer, R. Hoogenboom, H. Keul, M. Moeller, Block and gradient copolymers of 2-hydroxyethyl acrylate and 2-methoxyethyl acrylate via RAFT: Polymerization kinetics, thermoresponsive properties, and micellization, *Macromolecules* 46 (2013) 1447-1460.
- [49] R. Hoogenboom, A.-M. Zorn, H. Keul, C. Barner-Kowollik, M. Moeller, Copolymers of 2-hydroxyethylacrylate and 2-methoxyethyl acrylate by nitroxide mediated polymerization: kinetics, SEC-ESI-MS analysis and thermoresponsive properties, *Polymer Chemistry* 3 (2012) 335-342.
- [50] Q. Zhang, P. Schattling, P. Theato, R. Hoogenboom, Tuning the upper critical solution temperature behavior of poly (methyl methacrylate) in aqueous ethanol by modification of an activated ester comonomer, *Polymer Chemistry* 3 (2012) 1418-1426.
- [51] Q. Zhang, P. Schattling, P. Theato, R. Hoogenboom, UV-tunable upper critical solution temperature behavior of azobenzene containing poly (methyl methacrylate) in aqueous ethanol, *European Polymer Journal* 62 (2015) 435-441.
- [52] F.D. Jochum, L. Zur Borg, P.J. Roth, P. Theato, Thermo- and light-responsive polymers containing photoswitchable azobenzene end groups, *Macromolecules* 42 (2009) 7854-7862.
- [53] N.S. Jeong, M. Hasan, D.J. Phillips, Y. Saaka, R.K. O'Reilly, M.I. Gibson, Polymers with molecular weight dependent LCSTs are essential for cooperative behaviour, *Polymer Chemistry* 3 (2012) 794-799.
- [54] Y. Zhang, S. Furyk, D.E. Bergbreiter, P.S. Cremer, Specific ion effects on the water solubility of macromolecules: PNIPAM and the Hofmeister series, *Journal of the American Chemical Society* 127 (2005) 14505-14510.
- [55] Q. Zhang, J.-D. Hong, R. Hoogenboom, A triple thermoresponsive schizophrenic diblock copolymer, *Polymer Chemistry* 4 (2013) 4322-4325.
- [56] Q. Zhang, N. Vanparijs, B. Louage, B.G. De Geest, R. Hoogenboom, Dual pH- and temperature-responsive RAFT-based block co-polymer micelles and polymer-protein conjugates with transient solubility, *Polymer Chemistry* 5 (2014) 1140-1144.
- [57] M. Sahn, T. Yildirim, M. Dirauf, C. Weber, P. Sungur, S. Hoepfner, U.S. Schubert, LCST behavior of symmetrical PNIPAm-b-PEtOx-b-PNIPAm triblock copolymers, *Macromolecules* 49 (2016) 7257-7267.
- [58] K. Piechocki, M. Kozanecki, S. Kadlubowski, B. Pacholczyk-Sienicka, P. Ulanski, T. Biela, Controlling the properties of radiation-synthesized thermoresponsive oligoether methacrylate hydrogels by varying the monomer side-chain length; self-composite network containing crystalline phase, *Polymer* 150 (2018) 275-288.
- [59] J. Almeida, P. Ferreira, P. Alves, A. Lopes, M. Gil, Synthesis of a dextran based thermo-sensitive drug delivery system by gamma irradiation, *International journal of biological macromolecules* 61 (2013) 150-155.

- [60] R.X. Zhuo, W. Li, Preparation and characterization of macroporous poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels for the controlled release of proteins, *Journal of polymer science part A: polymer chemistry* 41 (2003) 152-159.
- [61] Z. Zhao, Z. Li, Q. Xia, H. Xi, Y. Lin, Fast synthesis of temperature-sensitive PNIPAAm hydrogels by microwave irradiation, *European Polymer Journal* 44 (2008) 1217-1224.
- [62] 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, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 85 (2013) 614-623.
- [63] J. Chen, A. Ahmad, B. Ooi, Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) hydrogels for copper ion adsorption: Equilibrium isotherms, kinetic and thermodynamic studies, *Journal of Environmental Chemical Engineering* 1 (2013) 339-348.
- [64] 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.
- [65] 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, *Journal of controlled release* 152 (2011) 57-66.
- [66] Á. Némethy, K. Solti, L. Kiss, B. Gyarmati, M.A. Deli, E. Csányi, A. Szilágyi, pH-and temperature-responsive poly (aspartic acid)-I-poly (N-isopropylacrylamide) conetwork hydrogel, *European polymer journal* 49 (2013) 2392-2403.
- [67] 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.
- [68] W. Li, A. Zhang, A.D. Schlüter, Thermoresponsive dendronized polymers with tunable lower critical solution temperatures, *Chemical communications* (2008) 5523-5525.
- [69] L.M. Geever, D.M. Devine, M.J. 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, *European Polymer Journal* 42 (2006) 2540-2548.
- [70] H. Adelnia, I. Blakey, P.J. Little, H.T. Ta, Hydrogels Based on Poly (aspartic acid): Synthesis and Applications, *Frontiers in chemistry* 7 (2019) 755.
- [71] Q. Lv, X. Hu, X. Zhang, L. Huang, Z. Liu, G. Sun, Highly efficient removal of trace metal ions by using poly (acrylic acid) hydrogel adsorbent, *Materials & Design* 181 (2019) 107934.
- [72] M. Azkune, I. Ayesta, L. Ruiz-Rubio, E. Arrospide, J.L. Vilas-Vilela, J. Zubia, Hydrogel-Core Microstructured Polymer Optical Fibers for Selective Fiber Enhanced Raman Spectroscopy, *Sensors* 21 (2021) 1845.
- [73] N.B. Milosavljević, M.Đ. Ristić, A.A. Perić-Grujić, J.M. Filipović, S.B. Štrbac, Z.L. Rakočević, M.T.K. Krušić, Hydrogel based on chitosan, itaconic acid and methacrylic acid as adsorbent of Cd<sup>2+</sup> ions from aqueous solution, *Chemical Engineering Journal* 165 (2010) 554-562.
- [74] M. Sakthivel, D. Franklin, S. Guhanathan, pH-sensitive Itaconic acid based polymeric hydrogels for dye removal applications, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 134 (2016) 427-432.
- [75] S. Agnihotri, R. Singhal, Synthesis and characterization of novel poly (acrylic acid/sodium alginate/sodium humate) superabsorbent hydrogels. Part II: The effect of SH variation on Cu<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> metal ions, MB, CV dye adsorption study, *Journal of Polymers and the Environment* 26 (2018) 383-395.
- [76] G.R. Deen, X.J. Loh, Stimuli-responsive cationic hydrogels in drug delivery applications, *Gels* 4 (2018) 13.
- [77] J.M. Brown, W.R. Wilson, Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment, *Nature Reviews Cancer* 4 (2004) 437-447.

- [78] M. Milosevic, P. Warde, C. Ménard, P. Chung, A. Toi, A. Ishkanian, M. McLean, M. Pintilie, J. Sykes, M. Gospodarowicz, Tumor hypoxia predicts biochemical failure following radiotherapy for clinically localized prostate cancer, *Clinical cancer research* 18 (2012) 2108-2114.
- [79] V. Estrella, T. Chen, M. Lloyd, J. Wojtkowiak, H.H. Cornnell, A. Ibrahim-Hashim, K. Bailey, Y. Balagurunathan, J.M. Rothberg, B.F. Sloane, Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion, *Cancer research* 73 (2013) 1524-1535.
- [80] X. Liu, P. Zhang, D. He, W. Rödl, T. Preiß, J.O. Rädler, E. Wagner, U. Lächelt, pH-reversible cationic RNase A conjugates for enhanced cellular delivery and tumor cell killing, *Biomacromolecules* 17 (2016) 173-182.
- [81] A. Jhaveri, P. Deshpande, V. Torchilin, Stimuli-sensitive nanopreparations for combination cancer therapy, *Journal of controlled release* 190 (2014) 352-370.
- [82] A. Wicki, D. Witzigmann, V. Balasubramanian, J. Huwyler, Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications, *Journal of controlled release* 200 (2015) 138-157.
- [83] G. Chen, A.S. Hoffman, A new temperature-and pH-responsive copolymer for possible use in protein conjugation, *Macromolecular Chemistry and Physics* 196 (1995) 1251-1259.
- [84] M. Fathi, M. Alami-Milani, M.H. Geranmayeh, J. Barar, H. Erfan-Niya, Y. Omid, Dual thermo- and pH-sensitive injectable hydrogels of chitosan/(poly (N-isopropylacrylamide-co-itaconic acid)) for doxorubicin delivery in breast cancer, *International journal of biological macromolecules* 128 (2019) 957-964.
- [85] H.T. Hoang, S.-H. Jo, Q.-T. Phan, H. Park, S.-H. Park, C.-W. Oh, K.T. Lim, Dual pH-/thermo-responsive chitosan-based hydrogels prepared using "click" chemistry for colon-targeted drug delivery applications, *Carbohydrate Polymers* 260 (2021) 117812.
- [86] X. Bai, Z. Bao, S. Bi, Y. Li, X. Yu, S. Hu, M. Tian, X. Zhang, X. Cheng, X. Chen, Chitosan-based thermo/pH double sensitive hydrogel for controlled drug delivery, *Macromolecular bioscience* 18 (2018) 1700305.
- [87] C. Ramkissoon-Ganorkar, F. Liu, M. Baudyš, S.W. Kim, Modulating insulin-release profile from pH/thermosensitive polymeric beads through polymer molecular weight, *Journal of Controlled Release* 59 (1999) 287-298.
- [88] Z. Yue, Y. Che, Z. Jin, S. Wang, Q. Ma, Q. Zhang, Y. Tan, F. Meng, A facile method to fabricate thermo- and pH-sensitive hydrogels with good mechanical performance based on poly (ethylene glycol) methyl ether methacrylate and acrylic acid as a potential drug carriers, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 30 (2019) 1375-1398.
- [89] C. Maldonado-Codina, N. Efron, Impact of manufacturing technology and material composition on the clinical performance of hydrogel lenses, *Optometry and vision science* 81 (2004) 442-454.
- [90] X. Hu, L. Hao, H. Wang, X. Yang, G. Zhang, G. Wang, X. Zhang, Hydrogel contact lens for extended delivery of ophthalmic drugs, *International Journal of Polymer Science* 2011 (2011).
- [91] R.A. Siegel, Stimuli sensitive polymers and self regulated drug delivery systems: a very partial review, *Journal of controlled release* 190 (2014) 337-351.
- [92] S.K. Kushwaha, P. Saxena, A. Rai, Stimuli sensitive hydrogels for ophthalmic drug delivery: a review, *International journal of pharmaceutical investigation* 2 (2012) 54.
- [93] Y.-H. Cheng, T.-H. Tsai, Y.-Y. Jhan, A.W.-h. Chiu, K.-L. Tsai, C.-S. Chien, S.-H. Chiou, C.J.-l. Liu, Thermosensitive chitosan-based hydrogel as a topical ocular drug delivery system of latanoprost for glaucoma treatment, *Carbohydrate polymers* 144 (2016) 390-399.
- [94] K. Kesavan, S. Kant, P.N. Singh, J.K. Pandit, Effect of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on the ocular bioavailability of dexamethasone from a pH-induced mucoadhesive hydrogel, *Current eye research* 36 (2011) 918-929.
- [95] P.A. Faccia, F.M. Pardini, J.I. Amalvy, Uptake and release of Dexamethasone using pH-responsive poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-2-(diisopropylamino) ethyl methacrylate) hydrogels for potential use in ocular drug delivery, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 51 (2019) 45-54.

- [96] G.D. Nicodemus, S.J. Bryant, Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications, *Tissue Engineering Part B: Reviews* 14 (2008) 149-165.
- [97] Z. Pan, H. Ye, D. Wu, Recent advances on polymeric hydrogels as wound dressings, *APL bioengineering* 5 (2021) 011504.
- [98] J.S. Boateng, K.H. Matthews, H.N. Stevens, G.M. Eccleston, Wound healing dressings and drug delivery systems: a review, *Journal of pharmaceutical sciences* 97 (2008) 2892-2923.
- [99] A. Kumar, M. Jaiswal, Design and in vitro investigation of nanocomposite hydrogel based in situ spray dressing for chronic wounds and synthesis of silver nanoparticles using green chemistry, *Journal of Applied Polymer Science* 133 (2016).
- [100] S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, E. Schacht, Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review, *Biomacromolecules* 12 (2011) 1387-1408.
- [101] C. Bilici, V. Can, U. Nöchel, M. Behl, A. Lendlein, O. Okay, Melt-processable shape-memory hydrogels with self-healing ability of high mechanical strength, *Macromolecules* 49 (2016) 7442-7449.
- [102] J. Koehler, F.P. Brandl, A.M. Goepferich, Hydrogel wound dressings for bioactive treatment of acute and chronic wounds, *European Polymer Journal* 100 (2018) 1-11.
- [103] S. Tavakoli, H. Mokhtari, M. Kharaziha, A. Kermanpur, A. Talebi, J. Moshtaghian, A multifunctional nanocomposite spray dressing of Kappa-carrageenan-polydopamine modified ZnO/L-glutamic acid for diabetic wounds, *Materials Science and Engineering: C* 111 (2020) 110837.
- [104] S.M. Mihaila, A.K. Gaharwar, R.L. Reis, A.P. Marques, M.E. Gomes, A. Khademhosseini, Photocrosslinkable kappa-carrageenan hydrogels for tissue engineering applications, *Advanced healthcare materials* 2 (2013) 895-907.
- [105] D. Chouhan, T.u. Lohe, P.K. Samudrala, B.B. Mandal, In situ forming injectable silk fibroin hydrogel promotes skin regeneration in full thickness burn wounds, *Advanced healthcare materials* 7 (2018) 1801092.
- [106] F. Masuda, Trends in the development of superabsorbent polymers for diapers, *ACS Publications* 1994.
- [107] A. Sannino, C. Demitri, M. Madaghiale, Biodegradable cellulose-based hydrogels: design and applications, *Materials* 2 (2009) 353-373.
- [108] H. Omidian, J.G. Rocca, K. Park, Advances in superporous hydrogels, *Journal of controlled release* 102 (2005) 3-12.
- [109] M.M. Ozmen, O. Okay, Swelling behavior of strong polyelectrolyte poly (Nt-butylacrylamide-co-acrylamide) hydrogels, *European polymer journal* 39 (2003) 877-886.
- [110] A.K. Bajpai, S.K. Shukla, S. Bhanu, S. Kankane, Responsive polymers in controlled drug delivery, *Progress in Polymer Science* 33 (2008) 1088-1118.
- [111] L. Brannon-Peppas, Polymers in controlled drug delivery, *Medical Plastic and Biomaterials* 4 (1997) 34-45.
- [112] J.F. Coelho, P.C. Ferreira, P. Alves, R. Cordeiro, A.C. Fonseca, J.R. Góis, M.H. Gil, Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments, *EPMA journal* 1 (2010) 164-209.
- [113] A.M. Lowman, N.A. Peppas, Hydrogels, *Encyclopedia of controlled drug delivery* 1 (1999) 397-418.
- [114] R. Mohapatra, D. Ray, A. Swain, T. Pal, P. Sahoo, Release study of alfuzosin hydrochloride loaded to novel hydrogel P (HEMA-co-AA), *Journal of applied polymer science* 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, *Journal of applied polymer science* 108 (2008) 1273-1280.
- [116] S. Kim, J.-H. Kim, O. Jeon, I.C. Kwon, K. Park, Engineered polymers for advanced drug delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 71 (2009) 420-430.
- [117] J.K. Tessmar, A.M. Göpferich, Matrices and scaffolds for protein delivery in tissue engineering, *Advanced drug delivery reviews* 59 (2007) 274-291.

- [118] S.W. Kim, Y.H. Bae, T. Okano, Hydrogels: swelling, drug loading, and release, *Pharmaceutical research* 9 (1992) 283-290.
- [119] H. Sokker, A.A. Ghaffar, Y. Gad, A. Aly, Synthesis and characterization of hydrogels based on grafted chitosan for the controlled drug release, *Carbohydrate polymers* 75 (2009) 222-229.
- [120] T.R. Hoare, D.S. Kohane, Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges, *Polymer* 49 (2008) 1993-2007.
- [121] N. Sood, A. Bhardwaj, S. Mehta, A. Mehta, Stimuli-responsive hydrogels in drug delivery and tissue engineering, *Drug delivery* 23 (2016) 748-770.
- [122] F. Ganji, E. Vasheghani-Farahani, Hydrogels in Controlled Drug Delivery Systems, *Iranian Polymer Journal* 18 (2009) 63-88.
- [123] L. Masaro, X. Zhu, Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids, *Progress in polymer science* 24 (1999) 731-775.
- [124] R. Zarzycki, Z. Modrzejewska, K. Nawrotek, Drug release from hydrogel matrices, *Ecol Chem Eng S* 17 (2010) 117-136.
- [125] D. Schmaljohann, Thermo-and pH-responsive polymers in drug delivery, *Advanced drug delivery reviews* 58 (2006) 1655-1670.
- [126] X. Li, P.D.B.R. Jasti, Design of controlled release drug delivery systems, *Buku Digital* 2006.
- [127] A.J. Cadotte, T.B. DeMarse, Poly-HEMA as a drug delivery device for in vitro neural networks on micro-electrode arrays, *Journal of neural engineering* 2 (2005) 114.
- [128] 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, *Journal of controlled release* 5 (1987) 23-36.
- [129] J. Liu, L. Li, Diffusion of camptothecin immobilized with cationic surfactant into agarose hydrogel containing anionic carrageenan, *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* 83 (2007) 1103-1109.
- [130] Y. Fu, W.J. Kao, Drug release kinetics and transport mechanisms from semi-interpenetrating networks of gelatin and poly (ethylene glycol) diacrylate, *Pharmaceutical research* 26 (2009) 2115-2124.
- [131] M.A. Kelland, Tuning the thermoresponsive properties of hyperbranched poly (ester amide) s based on diisopropanolamine and cyclic dicarboxylic anhydrides, *Journal of Applied Polymer Science* 121 (2011) 2282-2290.
- [132] H.D. Chirra, J.Z. Hilt, Nanoscale characterization of the equilibrium and kinetic response of hydrogel structures, *Langmuir* 26 (2010) 11249-11257.
- [133] H.G. Schild, Poly (N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application, *Progress in polymer science* 17 (1992) 163-249.
- [134] Y. Xia, N.A. Burke, H.D. Stöver, End group effect on the thermal response of narrow-disperse poly (N-isopropylacrylamide) prepared by atom transfer radical polymerization, *Macromolecules* 39 (2006) 2275-2283.
- [135] J.W. Seo, U.S. Shin, Ionic thermo-responsive copolymer with multi LCST values: easy and fast LCST-change through anion exchange, *Polymers for Advanced Technologies* 27 (2016) 486-493.
- [136] R. Fei, J.T. George, J. Park, A.K. Means, M.A. Grunlan, Ultra-strong thermoresponsive double network hydrogels, *Soft Matter* 9 (2013) 2912-2919.
- [137] D. Roy, W.L. Brooks, B.S. Sumerlin, New directions in thermoresponsive polymers, *Chemical Society Reviews* 42 (2013) 7214-7243.
- [138] X. Wang, X. Qiu, C. Wu, Comparison of the coil-to-globule and the globule-to-coil transitions of a single poly (N-isopropylacrylamide) homopolymer chain in water, *Macromolecules* 31 (1998) 2972-2976.
- [139] P. Kujawa, F. Segui, S. Shaban, C. Diab, Y. Okada, F. Tanaka, F.M. Winnik, Impact of end-group association and main-chain hydration on the thermosensitive properties of hydrophobically modified telechelic poly (N-isopropylacrylamides) in water, *Macromolecules* 39 (2006) 341-348.

- [140] H. Vihola, A. Laukkanen, L. Valtola, H. Tenhu, J. Hirvonen, Cytotoxicity of thermosensitive polymers poly (N-isopropylacrylamide), poly (N-vinylcaprolactam) and amphiphilically modified poly (N-vinylcaprolactam), *Biomaterials* 26 (2005) 3055-3064.
- [141] M.A. Cooperstein, H.E. Canavan, Assessment of cytotoxicity of (N-isopropyl acrylamide) and poly (N-isopropyl acrylamide)-coated surfaces, *Biointerphases* 8 (2013) 19.
- [142] N.M. Smeets, E. Bakaic, M. Patenaude, T. Hoare, Injectable poly (oligoethylene glycol methacrylate)-based hydrogels with tunable phase transition behaviours: Physicochemical and biological responses, *Acta biomaterialia* 10 (2014) 4143-4155.
- [143] N.M. Smeets, E. Bakaic, M. Patenaude, T. Hoare, Injectable and tunable poly (ethylene glycol) analogue hydrogels based on poly (oligoethylene glycol methacrylate), *Chemical Communications* 50 (2014) 3306-3309.
- [144] J.F. Lutz, Polymerization of oligo (ethylene glycol)(meth) acrylates: Toward new generations of smart biocompatible materials, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 46 (2008) 3459-3470.
- [145] M. Teodorescu, M. Andrei, G. Turturică, P.O. Stănescu, A. Zaharia, A. Sârbu, Novel thermoreversible injectable hydrogel formulations based on sodium alginate and poly (N-isopropylacrylamide), *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 64 (2015) 763-771.
- [146] 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.
- [147] 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.
- [148] F. Hua, X. Jiang, D. Li, B. Zhao, Well-defined thermosensitive, water-soluble polyacrylates and polystyrenics with short pendant oligo (ethylene glycol) groups synthesized by nitroxide-mediated radical polymerization, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 44 (2006) 2454-2467.
- [149] C.R. Becer, S. Hahn, M.W. Fijten, H.M. Thijs, R. Hoogenboom, U.S. Schubert, Libraries of methacrylic acid and oligo (ethylene glycol) methacrylate copolymers with LCST behavior, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 46 (2008) 7138-7147.
- [150] J.V. Jokerst, T. Lobovkina, R.N. Zare, S.S. Gambhir, Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy, *Nanomedicine* 6 (2011) 715-728.
- [151] Z.R. Miladinovic, M. Micic, A. Mrakovic, E. Suljovrujic, Smart hydrogels with ethylene glycol propylene glycol pendant chains, *Journal of Polymer Research* 25 (2018) 1.
- [152] E. Suljovrujic, M. Micic, Smart poly (oligo (propylene glycol) methacrylate) hydrogel prepared by gamma radiation, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 342 (2015) 206-214.
- [153] D. Fournier, R. Hoogenboom, H.M. 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.
- [154] 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.
- [155] J. Trmcic-Cvitas, E. Hasan, M. Ramstedt, X. Li, M.A. Cooper, C. Abell, W.T. Huck, J.E. Gautrot, Biofunctionalized protein resistant oligo (ethylene glycol)-derived polymer brushes as selective immobilization and sensing platforms, *Biomacromolecules* 10 (2009) 2885-2894.
- [156] M.M. Ali, H.D. Stöver, Well-defined amphiphilic thermosensitive copolymers based on poly (ethylene glycol monomethacrylate) and methyl methacrylate prepared by atom transfer radical polymerization, *Macromolecules* 37 (2004) 5219-5227.

- [157] C. Boyer, M.R. Whittaker, M. Luzon, T.P. Davis, Design and synthesis of dual thermoresponsive and antifouling hybrid polymer/gold nanoparticles, *Macromolecules* 42 (2009) 6917-6926.
- [158] J. Li, W. Zhang, Z. Hu, X.-J. Jiang, T. Ngai, P.-C. Lo, W. Zhang, G. Chen, Novel phthalocyanine and PEG-methacrylates based temperature-responsive polymers for targeted photodynamic therapy, *Polymer Chemistry* 4 (2013) 782-788.
- [159] R. París, 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, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 49 (2011) 1928-1932.
- [160] X.J. Loh, Poly (DMAEMA-co-PPGMA): Dual-responsive “reversible” micelles, *Journal of applied polymer science* 127 (2013) 992-1000.
- [161] H. Tai, D. Howard, S. Takae, W. Wang, T. Vermonden, W.E. Hennink, P.S. Stayton, A.S. Hoffman, A. Endruweit, C. Alexander, 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.
- [162] S.L. Tomić, M.M. Mičić, J.M. Filipović, E.H. Suljovrujić, Synthesis, characterization and controlled release of cephalexin drug from smart poly (2-hydroxyethyl methacrylate/poly (alkylene glycol)(meth) acrylates hydrogels, *Chemical Engineering Journal* 160 (2010) 801-809.
- [163] 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.
- [164] H. Tai, W. 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.
- [165] A. Tochwin, A. El-Betany, H. Tai, K.Y. Chan, C. Blackburn, W. Wang, Thermoresponsive and reducible hyperbranched polymers synthesized by RAFT polymerisation, *Polymers* 9 (2017) 443.
- [166] R. Wanka, F. Koschitzki, V. Puzovic, T. Pahl, E. Manderfeld, K.Z. Hunsucker, G.W. Swain, A. Rosenhahn, Synthesis and Characterization of Dendritic and Linear Glycol Methacrylates and Their Performance as Marine Antifouling Coatings, *ACS Applied Materials & Interfaces* 13 (2021) 6659-6669.
- [167] S. Abraham, S. Brahim, K. Ishihara, A. Guiseppi-Elie, Molecularly engineered p (HEMA)-based hydrogels for implant biochip biocompatibility, *Biomaterials* 26 (2005) 4767-4778.
- [168] M. Solovskii, E. Tarabukina, A. Shpyrkov, V. Denisov, E. Vlasova, A. Korchagin, Synthesis and properties of soluble copolymers of N-vinyl-2-pyrrolidone with 2-hydroxyethyl methacrylate, *Russian journal of applied chemistry* 78 (2005) 636-640.
- [169] D. Pamfil, C. Schick, C. Vasile, New hydrogels based on substituted anhydride modified collagen and 2-hydroxyethyl methacrylate. Synthesis and characterization, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 53 (2014) 11239-11248.
- [170] X. Lou, C. van Copenhagen, Mechanical characteristics of poly (2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels crosslinked with various difunctional compounds, *Polymer International* 50 (2001) 319-325.
- [171] S. Park, S.H. Nam, W.G. Koh, Preparation of collagen-immobilized poly (ethylene glycol)/poly (2-hydroxyethyl methacrylate) interpenetrating network hydrogels for potential application of artificial cornea, *Journal of Applied Polymer Science* 123 (2012) 637-645.
- [172] M. Macret, G. Hild, Hydroxyalkyl methacrylates: hydrogel formation based on the radical copolymerization of 2-hydroxyethylmethacrylate and 2, 3-dihydroxypropylmethacrylate, *Polymer* 23 (1982) 748-753.
- [173] M.T. am Ende, N.A. Peppas, Transport of ionizable drugs and proteins in crosslinked poly (acrylic acid) and poly (acrylic acid-co-2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. II. Diffusion and release studies, *Journal of controlled release* 48 (1997) 47-56.



- [174] D. Garcia, J. Escobar, Y. Noa, N. Bada, E. Hernaez, I. Katime, Timolol maleate release from pH-sensitive poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-methacrylic acid) hydrogels, *European Polymer Journal* 40 (2004) 1683-1690.
- [175] S.L. Tomić, M.M. Mičić, S.N. Dobić, J.M. Filipović, E.H. Suljovrujić, Smart poly (2-hydroxyethyl methacrylate/itaconic acid) hydrogels for biomedical application, *Radiation Physics and Chemistry* 79 (2010) 643-649.
- [176] M. Bocourt, N. Bada, N. Acosta, E. Bucio, C. Peniche, Synthesis and characterization of novel pH-sensitive chitosan-poly (acrylamide-co-itaconic acid) hydrogels, *Polymer international* 63 (2014) 1715-1723.
- [177] M.M. Babić, K.M. Antić, J.S.J. Vuković, B.Đ. Božić, S.Z. Davidović, J.M. Filipović, S.L. Tomić, Oxaprozin/poly (2-hydroxyethyl acrylate/itaconic acid) hydrogels: morphological, thermal, swelling, drug release and antibacterial properties, *Journal of Materials Science* 50 (2015) 906-922.
- [178] M. Mertoglu, S. Garnier, A. Laschewsky, K. Skrabania, J. Storsberg, Stimuli responsive amphiphilic block copolymers for aqueous media synthesised via reversible addition fragmentation chain transfer polymerisation (RAFT), *Polymer* 46 (2005) 7726-7740.
- [179] Z. Hu, T. Cai, C. Chi, Thermoresponsive oligo (ethylene glycol)-methacrylate-based polymers and microgels, *Soft Matter* 6 (2010) 2115-2123.
- [180] T. Cai, P.D. Hu, M. Sun, J. Zhou, Y.-T. Tsai, D. Baker, L. Tang, Novel thermogelling dispersions of polymer nanoparticles for controlled protein release, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 8 (2012) 1301-1308.
- [181] W. Shen, Y. Chang, G. Liu, H. Wang, A. Cao, Z. An, Biocompatible, antifouling, and thermosensitive core-shell nanogels synthesized by RAFT aqueous dispersion polymerization, *Macromolecules* 44 (2011) 2524-2530.
- [182] T. McCallister, E. Gidney, D. Adams, D.R. Diercks, S. Ghosh, Engineered, thermoresponsive, magnetic nanocarriers of oligo (ethylene glycol)-methacrylate-based biopolymers, *Applied Physics Express* 7 (2014) 117003.
- [183] H. Kempe, *Advances in Separation Science: Molecular Imprinting: Development of Spherical Beads and Optimization of the Formulation by Chemometrics*, Institutionen för analytisk kemi, 2007.
- [184] G.A. Selim, Tailored-design of molecularly imprinted polymers with induced cavities of high conformational stability as new platforms for chemical sensing applications, (2016).
- [185] G. Pasero, R. Marcolongo, U. Semi, M. Parnham, F. Ferrer, A multi-centre, double-blind comparative study of the efficacy and safety of aceclofenac and diclofenac in the treatment of rheumatoid arthritis, *Current medical research and opinion* 13 (1995) 305-315.
- [186] H. Khalaf, L. Salste, P. Karlsson, P. Ivarsson, J. Jass, P.-E. Olsson, In vitro analysis of inflammatory responses following environmental exposure to pharmaceuticals and inland waters, *Science of the total environment* 407 (2009) 1452-1460.
- [187] S.G. Dastidar, K. Ganguly, K. Chaudhuri, A. Chakrabarty, The anti-bacterial action of diclofenac shown by inhibition of DNA synthesis, *International journal of antimicrobial agents* 14 (2000) 249-251.
- [188] D.W. Scholer, E.C. Ku, I. Boettcher, A. Schweizer, Pharmacology of diclofenac sodium, *The American journal of medicine* 80 (1986) 34-38.
- [189] L.F. Žilnik, A. Jazbinšek, A. Hvala, F. Vrečer, A. Klamt, Solubility of sodium diclofenac in different solvents, *Fluid phase equilibria* 261 (2007) 140-145.
- [190] L.A. Pérez-Estrada, S. Malato, W. Gernjak, A. Agüera, E.M. Thurman, I. Ferrer, A.R. Fernández-Alba, Photo-Fenton degradation of diclofenac: identification of main intermediates and degradation pathway, *Environmental science & technology* 39 (2005) 8300-8306.
- [191] A. Johnson, V. Keller, R. Williams, A. Young, A practical demonstration in modelling diclofenac and propranolol river water concentrations using a GIS hydrology model in a rural UK catchment, *Environmental Pollution* 146 (2007) 155-165.

- [192] J.O. Eloy, M.C. de Souza, R. Petrilli, J.P.A. Barcellos, R.J. Lee, J.M. Marchetti, Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 123 (2014) 345-363.
- [193] A. Parmar, S. Sharma, Engineering design and mechanistic mathematical models: standpoint on cutting edge drug delivery, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 100 (2018) 15-35.
- [194] N.M. Davies, K.E. Anderson, Clinical pharmacokinetics of diclofenac, *Clinical pharmacokinetics* 33 (1997) 184-213.
- [195] J. Willis, M. Kendall, R. Flinn, D. Thornhill, P. Welling, The pharmacokinetics of diclofenac sodium following intravenous and oral administration, *European journal of clinical pharmacology* 16 (1979) 405-410.
- [196] M. Kendall, D. Thornhill, J. Willis, Factors affecting the pharmacokinetics of diclofenac sodium (Voltarol), *Rheumatology and rehabilitation* (1979) 38-46.
- [197] Á. Sáfrány, B. Beiler, Á. Vincze, Radiation polymerization and crosslinking: A viable alternative for synthesis of porous functional polymers, *Radiation Physics and Chemistry* 79 (2010) 462-466.
- [198] K. Parvez, Chapter 2 - Characterization Techniques of Two-Dimensional Nanomaterials, in: M. Nurunnabi, J.R. McCarthy (Eds.), *Biomedical Applications of Graphene and 2D Nanomaterials*, Elsevier2019, pp. 27-41.
- [199] P.-C. Lin, S. Lin, P.C. Wang, R. Sridhar, Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials, *Biotechnology advances* 32 (2014) 711-726.
- [200] P.H. Salame, V.B. Pawade, B.A. Bhanvase, Characterization tools and techniques for nanomaterials, *Nanomaterials for green energy*, Elsevier2018, pp. 83-111.
- [201] J.B. Bindell, SEM: Scanning electron microscopy, *Encyclopedia of materials characterization*, Elsevier1992, pp. 70-84.
- [202] M.M. Siek, Electrochemical preparation of Ag-and Au-based plasmonic platforms, Institute of Physical Chemistry Polish Academy of Sciences, 2016.
- [203] S. Nikara, E. Ahmadi, A.A. Nia, Effects of different preparation techniques on the microstructural features of biological materials for scanning electron microscopy, *Journal of Agriculture and Food Research* 2 (2020) 100036.
- [204] G. Bellisola, C. Sorio, Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis, *American journal of cancer research* 2 (2012) 1.
- [205] M. Paraskevaidi, P.L. Martin-Hirsch, F.L. Martin, ATR-FTIR spectroscopy tools for medical diagnosis and disease investigation, *Nanotechnology Characterization Tools for Biosensing and Medical Diagnosis*, Springer2018, pp. 163-211.
- [206] M. L.C. Passos, M.L. M.F.S. Saraiva, Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies, *Measurement* 135 (2019) 896-904.
- [207] B.M. Tissue, Ultraviolet and Visible Absorption Spectroscopy, *Characterization of Materials*2012, pp. 1-13.
- [208] F.S. Rocha, A.J. Gomes, C.N. Lunardi, S. Kaliaguine, G.S. Patience, Experimental methods in chemical engineering: Ultraviolet visible spectroscopy—UV-Vis, *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 96 (2018) 2512-2517.
- [209] H.-H. Perkampus, *UV-VIS Spectroscopy and its Applications*, Springer Science & Business Media2013.
- [210] D.C. Boffito, C. Neagoe, G. Cerrato, C. Boffito, G.L. Chiarello, C.L. Bianchi, M.G. Rigamonti, A. Benamer, G.S. Patience, Chapter 11 - Spectroscopy, in: G.S. Patience (Ed.), *Experimental Methods and Instrumentation for Chemical Engineers (Second Edition)*, Elsevier2018, pp. 339-383.
- [211] J.M.M. Vidart, T.L.d. Silva, P.C.P. Rosa, M.G.A. Vieira, M.G.C.d. Silva, Development of sericin/alginate particles by ionic gelation technique for the controlled release of diclofenac sodium, *Journal of Applied Polymer Science* 135 (2018) 45919.

- [212] A.A. Gouda, M.I.K. El-Sayed, A.S. Amin, R. El Sheikh, Spectrophotometric and spectrofluorometric methods for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review, *Arabian Journal of Chemistry* 6 (2013) 145-163.
- [213] J.D. Menczel, R.B. Prime, *Thermal analysis of polymers: fundamentals and applications*, John Wiley & Sons 2009.
- [214] P. Kaur, M. Singh, P. Birwal, Differential Scanning Calorimetry (DSC) for the Measurement of Food Thermal Characteristics and Its Relation to Composition and Structure, in: M.S. Khan, M. Shafiur Rahman (Eds.), *Techniques to Measure Food Safety and Quality: Microbial, Chemical, and Sensory*, Springer International Publishing, Cham, 2021, pp. 283-328.
- [215] S. Mentus, U. Mioč, *Odabrane metode fizičko-hemijske analize*, Fakultet za fizičku hemiju 1993.
- [216] K. Otake, H. Inomata, M. Konno, S. Saito, Thermal analysis of the volume phase transition with N-isopropylacrylamide gels, *Macromolecules* 23 (1990) 283-289.
- [217] K.A. da Silva Aquino, Sterilization by gamma irradiation, *Gamma radiation* 9 (2012) 172-202.
- [218] P. Schmidt, J. Dybal, A. Šturcová, ATR FTIR investigation of interactions and temperature transitions of poly (ethylene oxide), poly (propylene oxide) and ethylene oxide–propylene oxide–ethylene oxide tri-block copolymers in water media, *Vibrational Spectroscopy* 50 (2009) 218-225.
- [219] 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, *Radiation Physics and Chemistry* 81 (2012) 1451-1455.
- [220] L. Ferreira, M. Vidal, M. Gil, Evaluation of poly (2-hydroxyethyl methacrylate) gels as drug delivery systems at different pH values, *International journal of pharmaceutics* 194 (2000) 169-180.
- [221] T.J. Kashi, M. Erfan, D. Watts, Effect of water on HEMA conversion by FT-IR spectroscopy, *Frontiers in Dentistry* (2007) 123-129.
- [222] 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, *Polymer Chemistry* 2 (2011) 975-982.
- [223] M. Micic, E. Suljovrujic, Network parameters and biocompatibility of p (2-hydroxyethyl methacrylate/itaconic acid/oligo (ethylene glycol) acrylate) dual-responsive hydrogels, *European polymer journal* 49 (2013) 3223-3233.
- [224] M. Glassner, K. Lava, V.R. de la Rosa, R. Hoogenboom, Tuning the LCST of poly (2-cyclopropyl-2-oxazoline) via gradient copolymerization with 2-ethyl-2-oxazoline, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 52 (2014) 3118-3122.
- [225] K. Jain, R. Vedarajan, M. Watanabe, M. Ishikiriyama, N. Matsumi, Tunable LCST behavior of poly (N-isopropylacrylamide/ionic liquid) copolymers, *Polymer Chemistry* 6 (2015) 6819-6825.
- [226] C. Becer, Controlling polymer architectures: high-throughput experimentation, tailor-made macromolecules and glycopolymers via "click" reactions, (2009).
- [227] M.N. Olejniczak, K. Piechocki, M. Kozanecki, K. Koynov, A. Adamus, R.A. Wach, The influence of selected NSAIDs on volume phase transition in poly (2-(2-methoxyethoxy) ethyl methacrylate) hydrogels, *Journal of Materials Chemistry B* 4 (2016) 1528-1534.
- [228] ISO Document 10993-5, *Biological evaluation of medical devices, Part 5, Tests for cytotoxicity: in vitro methods*, (1992).
- [229] 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.
- [230] ISO Document 10993-4, *Biological evaluation of medical devices, Part 4, Selection of tests for interactions with blood*, (1992).
- [231] S. Encinas, F. Bosca, M.A. Miranda, Photochemistry of 2, 6-Dichlorodiphenylamine and 1-Chlorocarbazole, the Photoactive Chromophores of Diclofenac, Meclofenamic Acid and Their Major Photoproducts, *Photochemistry and photobiology* 68 (1998) 640-645.
- [232] H. Görner, Photocyclization of 2, 6-dichlorodiphenylamines in solution, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 211 (2010) 1-6.

## БИОГРАФИЈА

---

Зорана Рогоић Миладиновић рођена је 24. августа 1981. године у Београду, где је завршила основну и средњу школу. Дипломирала је на Факултету за физичку хемију Универзитета у Београду 22. маја 2009. године, одбранивши дипломски рад под називом „Примена физичкохемијских метода за анализу продуката радијационе обраде хране“ под руководством проф. др Милоша Мојовића. На истом факултету стекла је звање мастера физикохемичара одбранивши мастер рад под називом „Дифузијски магнетно-резонантни имиџинг тумора дојке и повезивање са хистопатологијом“ под руководством проф. др Горана Бачића, 28. јуна 2011. године. На истом факултету је уписала докторске студије школске 2011/2012. године, са периодом мировања школске 2018/19, 2019/20 и 2020/21. године.

Од 1. маја 2010. године до данас, запослена је у Институту за нуклеарне науке „Винча“, Институту од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду. У периоду до 1. јануара 2018. године радила је у Лабораторији за физичку хемију као истраживач сарадник, након чега прелази у Лабораторију за радијациону хемију и физику „Гама“.

Била је ангажована на пројекту Министарства, просвете и технолошког развоја Републике Србије број III45005, под називом: „Функционални, функционализовани и усавршени нано материјали“, чији је руководилац био др Златко Ракочевић, научни саветник.

Од 2020. године учествује на теми „Радијациона синтеза, процесирање и стерилизација полимера и полимерно-композитних биоматеријала“ под руководством др Едина Суљоврујића, научног саветника.

До данас има укупно осам објављених радова, три у врхунским међународним часописима ( $M_{21}$ ) и пет у истакнутим међународним часописима ( $M_{22}$ ) који су цитирани 44 пута. Шест радова су из области материјала.

Члан је Друштва физикохемичара Србије и Друштва за истраживање материјала Србије.

# БИБЛИОГРАФИЈА

---

Публикације из области дисертације

Рад у врхунском међународном часопису (M<sub>21</sub>):

1. Micic, M., **Miladinovic, Z.R.**, and Suljovrujic, E., *Tuning the thermoresponsive properties of poly (oligo (propylene glycol) methacrylate) hydrogels via gradient copolymerization with 2-hydroxyethyl methacrylate*. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 2016. **65**(1): p. 18-27.

Радови у истакнутим међународним часописима (M<sub>22</sub>):

1. Suljovrujic, E., **Miladinovic, Z.R.**, and Krstic, M., *Swelling properties and drug release of new biocompatible POEGOPGMA hydrogels with VPTT near to the human body temperature*. Polymer Bulletin, 2021. **78**(5): p. 2405-2425.
2. **Miladinovic, Z.R.**, et al., *Smart hydrogels with ethylene glycol propylene glycol pendant chains*. Journal of Polymer Research, 2018. **25**(1): p. 1.
3. **Miladinovic, Z.R.**, Micic, M., and Suljovrujic, E., *Temperature/pH dual responsive OPGMA based copolymeric hydrogels prepared by gamma radiation: an optimisation study*. Journal of Polymer Research, 2016. **23**(4): p. 1-12.

Научна саопштења на међународним скуповима штампана у књигама радова у облику кратког извода (M<sub>34</sub>):

1. Suljovrujic, E., **Miladinovic, Z.R.**, Milicevic, D., Micic, M., *Temperature responsive hydrogels with ethylene glycol propylene glycol pendant chains*, Eighteenth Annual Conference YUCOMAT, p. 74, Book of Abstracts ISBN 978-86-919111-1-9, Herceg Novi, Montenegro, September 5-10, **2016**.

## Прилог 1.

### Изјава о ауторству

Потписана: Зорана Рогић Миладиновић

број индекса: 2011/319

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**„Испитивање температурне осетљивости радијационо синтетисаних кополимерних хидрогелова олиго(пропилен-гликол)-метаркрилат”**

- 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, 9. 5. 2022. године

---

## Прилог 2.

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

Име и презиме аутора: Зорана Рогић Миладиновић

Број индекса: 2011/319

Студијски програм: физичка хемија материјала

Наслов рада: „Испитивање температурне осетљивости радијационо синтетисаних кополимерних хидрогелова олиго(пропилен-гликол)-метакрилат“

Ментори: Проф. др Марко Даковић, ванредни професор Факултета за физичку хемију, Универзитета у Београду и

др Маја Крстић, научни сарадник Института за нуклеарне науке „Винча“, Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду.

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.

**Потпис докторанда**

У Београду, 9. 5. 2022. године

---

### Прилог 3.

#### Изјава о коришћењу

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

**„Испитивање температурне осетљивости радијационо синтетисаних кополимерних хидрогелова олиго(пропилен-гликол)-метакрилат“**

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, 9. 5. 2022. године

---



1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.