

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ

Јована С. Вуковић

**СИНТЕЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА
ХИДРОГЕЛОВА НА БАЗИ
2-ХИДРОКСИЕТИЛ АКРИЛАТА И
ИТАКОНСКЕ КИСЕЛИНЕ ЗА ПРИМЕНУ У
КОНТРОЛИСАНОМ ОТПУШТАЊУ
ТЕРАПЕУТСКИ АКТИВНИХ ЈОНА
МЕТАЛА**

докторска дисертација

Београд, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Jovana S. Vuković

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION
OF HYDROGELS BASED ON
2-HYDROXYETHYL ACRYLATE AND
ITACONIC ACID FOR CONTROLLED
RELEASE OF THERAPEUTICALLY
ACTIVE METAL IONS
APPLICATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Ментор:

Др Симонида Томић, ванредни професор

Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Чланови комисије:

Др Александра Перић-Грујић, редовни професор

Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Биљана Божић, ванредни професор

Универзитет у Београду, Биолошки факултет

Датум одбране:

Захваљујем се ментору др Симоди Томић и члановима комисије др Александри Перић-Грујић и др Биљани Божич на подршци, саветима и сугестијама током израде ове дисертације.

Велику захвалност дугујем проф. др Јованки Филиповић, као и проф. др Сузани Димитријевић на корисним саветима и помоћи у истраживању и изради ове дисертације.

Посебну захвалност дугујем колегама.

Највећу захвалност дугујем својој породици и пријатељима.

Mojoj porodici.

СИНТЕЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ХИДРОГЕЛОВА НА БАЗИ 2-ХИДРОКСИЕТИЛ АКРИЛАТА И ИТАКОНСКЕ КИСЕЛИНЕ ЗА ПРИМЕНУ У КОНТРОЛИСАНОМ ОТПУШТАЊУ ТЕРАПЕУТСКИ АКТИВНИХ ЈОНА МЕТАЛА

ИЗВОД

У овој докторској дисертацији синтетисани су нови полимерни материјали као носачи за уградњу и контролисано отпуштање терапеутски активних јона метала, за примену у третману рана и регенерацији меког ткива. Способност контроле процеса локалног отпуштања уграђеног активног агенса, као и контроле постојећих и спречавање настанка нових инфекција, уз одговарајућу биолошку активност, обезбеђује успешно зарастање рана, што представља циљ овог рада.

Полимеризацијом преко слободних радикала синтетисани су рН и температурно осетљиви хидрогелови на бази 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине, при чему је вариран садржај итаконске киселине и на тај начин добијена Н серија хидрогелова. Уградњом бакар(II) јона у синтетисане хидрогелове добијени су хидрогелови СI серије. У циљу испитивања утицаја облика уграђеног метала на својства и понашање хидрогелова, извршена је хемијска редукција бакар(II) јона и тако добијена СR серија хидрогелова са редукованим бакром. Карактеризација све три серије хидрогелова извршена је применом инфрацрвене спектроскопије Фуријеовом (Fourier-овом) трансформацијом (ФТИР), скенирајуће електронске микроскопије (СЕМ), динамичко-механичке анализе (ДМА), диференцијално скенирајуће калориметрије (ДСК) и праћењем кинетике бубрења, као и рН и температурно осетљивог понашања при бубрењу.

Оптимизација профила отпуштања бакар(II) јона, као и редукованог бакра, може се постићи варирањем садржаја итаконске киселине у хидрогеловима, чиме се обезбеђује жељена брзина отпуштања и количина отпуштених активних агенса. Хемијска редукција бакар(II) јона за последицу је имала благо ниже брзине отпуштања редукованог бакра у односу на брзину отпуштања бакар(II) јона. С обзиром на задовољавајућу ефикасност уградње и кинетику отпуштања бакар(II) јона

и редукованог бакра, хидрогелови на бази 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине су даље испитивани као носачи за уградњу и контролисано отпуштање других јона метала који поседују значајан потенцијал за примену у зарастању рана, цинк(II) јона и сребро(I) јона, као и њихових редукованих облика. Добијени резултати су потврдили погодност испитиваних хидрогелова као система за контролисано отпуштање терапеутски активних агенса.

Способност обезбеђивања оптималних услова за ефикасно зарастање ране и регенерацију меког ткива применом хидрогелова CI и CR серије испитивана је одређивањем брзине преноса водене паре, пенетрације кисеоника, дисперзионих карактеристика и могућности задржавања течности. Утврђена је антимикуробна активност хидрогелова према Грам-позитивној бактерији *Staphylococcus aureus*, Грам-негативној бактерији *Escherichia coli* и гљиви *Candida albicans*, са смањењем броја ћелија микроорганизама преко 99,0 %, као и способност заштите ране, спречавањем пенетрације Грам-негативне бактерије *Pseudomonas aeruginosa* кроз CI и CR хидрогелове дебљине 4 mm. Биолошки тестови спроведени на ћелијској линији L929 (фибробласти миша) применом МТТ и Комет теста указују на задовољавајућу биокомпатибилност, која се уградњом бакар(II) јона и њиховом редукцијом побољшава, док је повећање локалне киселости система, увођењем 7 mol% итаконске киселине, утицало на смањење биокомпатибилности.

Могућност контроле локалног отпуштања јона метала и њихових редукованих облика, уз изузетну антимикуробну активност и задовољавајућу биокомпатибилност, сврстава испитиване хидрогелове у ефикасне полимерне материјале за третман рана и регенерацију меког ткива.

Кључне речи: 2-хидроксиетил акрилат, хидрогел, контролисано отпуштање, антимикуробна активност, биокомпатибилност, третман рана

Научна област: Технолошко инжењерство

Ужа научна област: Хемијско инжењерство

УДК број: 678.744:66.097.8:615

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF HYDROGELS BASED ON 2-HYDROXYETHYL ACRYLATE AND ITACONIC ACID FOR CONTROLLED RELEASE OF THERAPEUTICALLY ACTIVE METAL IONS APPLICATION

ABSTRACT

In this doctoral dissertation, the novel polymeric materials were synthesized as carriers for the incorporation and controlled release of therapeutically active metal ions, for the application in wound treatment and soft tissue regeneration. Ability to control the process of local release of incorporated active agent and management/prevention of infections, along with the appropriate biological activity, provides successful wound healing, which is the goal of this work.

pH and temperature sensitive hydrogels based on 2-hydroxyethyl acrylate and itaconic acid were synthesized by free radical polymerization, whereby the itaconic acid content was varied which resulted in H hydrogel series. CI hydrogel series was obtained by incorporation of copper(II) ions in synthesized hydrogels. In order to evaluate the influence of the incorporated metal form on the characteristics and behavior of the hydrogels, the chemical reduction of copper(II) ions was conducted and CR hydrogel series was obtained. The prepared hydrogel series were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), dynamic mechanical analysis (DMA), differential scanning calorimetry (DSC) and monitoring of swelling kinetics, as well as pH and temperature swelling behaviour.

Optimization of the release profiles of copper(II) ions and reduced copper can be achieved by varying the itaconic acid content in the hydrogels, thus providing the required release rates and amounts of released active agents. The chemical reduction of incorporated copper(II) ions resulted in slightly slower release rates of reduced copper compared to release rates of copper(II) ions. Considering the beneficial entrapment efficiency and release kinetics of copper(II) ions and reduced copper, hydrogels based on 2-hydroxyethyl acrylate and itaconic acid were further investigated as carriers for incorporation and controlled release of the other metal ions with great potential in wound healing application,

zinc(II) ions and silver(I) ions, as well as their reduced forms. The obtained results confirmed the suitability of investigated hydrogels as systems for controlled release of therapeutically active agents.

The capacity of CI and CR hydrogels to provide the optimal conditions for efficient wound healing and soft tissue regeneration was evaluated by investigating the water vapour transmission rate, oxygen penetration, dispersion characteristics and fluid retention. The antimicrobial activity of the hydrogels against Gram-positive *Staphylococcus aureus*, Gram-negative *Escherichia coli* and fungus *Candida albicans*, with the inhibition of microorganisms cell growth over 99,0 %, as well as the ability to protect the wound by preventing the penetration of Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa* through 4 mm thick CI and CR hydrogels was determined. Biological tests, including MTT and Comet test, conducted on L929 cell line (mouse fibroblasts), revealed beneficial biocompatibility, which was increased by the incorporation of copper(II) ions and its reduction, while the increasing of the localized acidity by introducing 7 mol% of itaconic acid had an influence on decrease of biocompatibility.

The possibility to control the local release of metal ions and its reduced forms, along with excellent antimicrobial activity and beneficial biocompatibility, classifies investigated hydrogels in efficient polymeric materials for wound treatment and soft tissue regeneration application.

Keywords: 2-hydroxyethyl acrylate, hydrogel, controlled release, antimicrobial activity, biocompatibility, wound treatment

Scientific field: Technological engineering

Field of academic expertise: Chemical engineering

UDC number: 678.744:66.097.8:615

САДРЖАЈ

УВОД	1
ТЕОРИЈСКИ ДЕО	3
1. Хидрогелови	4
1.1. Добијање хидрогелова.....	5
1.2. Структура хидрогелова и параметри мреже.....	7
1.3. Бубрење хидрогелова.....	9
1.4. Подела хидрогелова.....	10
1.5. рН осетљиви хидрогелови.....	12
1.6. Температурно осетљиви хидрогелови	13
1.7. Хидрогелови на бази 2-хидроксиетил акрилата	15
2. Примена хидрогелова као система за контролисано отпуштање активних агенса у третману рана.....	17
2.1. Кожа и настанак рана	17
2.1.1. Врсте рана	17
2.1.2. Третман рана – проблем глобалних размера	20
2.1.3. Фазе зарастања ране.....	21
2.1.4. Методе за зарастање рана.....	23
2.2. Хидрогелови као облоге за зарастање рана.....	26
2.3. Метали као антимикуробни агенси.....	27
2.3.1. Бакар.....	28
2.3.2. Цинк.....	29
2.3.3. Сребро	30
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	31
3. Добијање хидрогелова на бази 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине....	32
3.1. Реактанти	32
3.1.1. 2-хидроксиетил акрилат	32
3.1.2. Итаконска киселина	33

3.1.3. Етилен гликол диметакрилат	34
3.1.4. Калијум персулфат	35
3.1.5. N, N, N', N'-тетраметилетилен диамин.....	35
3.1.6. Бакар(II) сулфат пентахидрат.....	36
3.1.7. Цинк ацетат дихидрат	36
3.1.8. Сребро нитрат	37
3.1.9. Натријум борохидрид	37
3.2. Синтеза хидрогелова на бази 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине	38
4. Карактеризација хидрогелова.....	40
4.1. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом.....	41
4.2. Скенирајућа електронска микроскопија.....	41
4.3. Динамичко-механичка анализа.....	41
4.4. Диференцијално скенирајућа калориметрија.....	42
4.5. Испитивање бубрења.....	42
5. Хидрогелови 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине као системи за контролисано отпуштање бакар(II) јона и редукованог бакра.....	44
5.1. Ефикасност уградње бакар(II) јона	44
5.2. Контролисано отпуштање бакар(II) јона и редукованог бакра	44
5.3. Анализа механизма транспорта бакар(II) јона и редукованог бакра	45
6. Хидрогелови 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине као системи за контролисано отпуштање других јона метала и њихових редукованих облика	46
7. Процена погодности хидрогелова 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине са уграђеним бакар(II) јонима и редукованим бакром за примену у третману рана ...	47
7.1. Одређивање брзине преноса водене паре.....	47
7.2. Одређивање пенетрације кисеоника	48
7.3. Испитивање дисперзионих карактеристика	49
7.4. Испитивање задржавања течности.....	49
8. Антимикробна својства хидрогелова 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине са уграђеним бакар(II) јонима и редукованим бакром.....	50
8.1. Испитивање антимикробне активности.....	50
8.2. Испитивање пенетрације микроорганизама	51

9. Биокompatибилност хидрогелова 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине са уграђеним бакар(II) јонима и редукованим бакром	51
9.1. Испитивање цитотоксичности	51
9.2. Испитивање генотоксичности	53
РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	56
10. Синтеза и карактеризација хидрогелова	57
10.1. Синтеза хидрогелова	57
10.2. Карактеризација хидрогелова	58
10.2.1. Структурна својства хидрогелова	58
10.2.2. Морфологија хидрогелова	60
10.2.3. Механичка својства хидрогелова	62
10.2.4. Термичка својства хидрогелова	63
10.2.5. Бубрење хидрогелова	65
10.2.5.1. Кинетика бубрења хидрогелова	65
10.2.5.2. Утицај рН вредности на бубрење хидрогелова	67
10.2.5.3. Утицај температуре на бубрење хидрогелова	69
10.2.5.4. Параметри мреже	72
11. Хидрогелови 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине као системи за контролисано отпуштање бакар(II) јона и редукованог бакра	73
11.1. Ефикасност уградње бакар(II) јона	73
11.2. Контролисано отпуштање бакар(II) јона и редукованог бакра	74
11.3. Механизам транспорта бакар(II) јона и редукованог бакра	77
12. Хидрогелови 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине као системи за контролисано отпуштање других терапеутски активних јона метала и њихових редукованих облика	80
12.1. Цинк	80
12.1.1. Ефикасност уградње цинк(II) јона	80
12.1.2. Контролисано отпуштање цинк(II) јона и редукованог цинка	81
12.1.3. Механизам транспорта цинк(II) јона и редукованог цинка	83
12.2. Сребро	86
12.2.1. Ефикасност уградње сребро(I) јона	86

12.2.2. Контролисано отпуштање сребра(I) јона и редукованог сребра	86
12.2.3. Механизам транспорта сребра(I) јона и редукованог сребра	89
13. Процена погодности хидрогелова 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине са уграђеним бакар(II) јонима и редукованим бакром за примену у третману рана ...	92
13.1. Брзина преноса водене паре.....	92
13.2. Пенетрација кисеоника.....	95
13.3. Дисперзиона својства хидрогелова	96
13.4. Задржавање воде	97
14. Антимикробна својства хидрогелова 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине са уграђеним бакар(II) јонима и редукованим бакром.....	99
14.1. Антимикробна активност	99
14.2. Пенетрација микроорганизама	102
15. Биокompatибилност хидрогелова 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине са уграђеним бакар(II) јонима и редукованим бакром	105
15.1. Цитотоксичност	105
15.2. Генотоксичност	106
16. Закључак	109
17. Литература	113
Биографија аутора	132
Изјава о ауторству	133
Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада	134
Изјава о коришћењу	135

УВОД

Кожа представља највећи људски орган који пружа заштиту телу од штетних спољашњих утицаја и омогућава одржавање оптималног стања организма, захваљујући пропустљивости за одређене гасове и телесне течности. Поремећен интегритет коже, настао услед неповољних механичких, хемијских, топлотних утицаја, или присуства хроничних обољења, за последицу има стварање рана. Изостанак одговарајућег третмана рана може довести до нарушавања целокупног стања људског организма, а неретко и до смртог исхода. Сложени и често дуготрајни процеси зарастања рана захтевају систематичан приступ, уз примену ефикасних метода и материјала.

За разлику од традиционалних облога за зарастање рана и регенерацију меког ткива, као што су газе и завоји од природних или синтетичких материјала, које се деценијама уназад користе, савремене облоге поред тога што штите рану, обезбеђују повољне услове за њено зарастање. То пре свега подразумева одржавање оптималне влажности, контролу постојећих и спречавање настанка нових инфекција и подстицање бржег зарастања. Захваљујући специфичним својствима и понашању, хидрогелови се издвајају као веома ефикасни системи у третману рана. Њихова порозна структура и хидрофилност омогућавају упијање и задржавање велике количине воде и водених раствора, што их чини врло сличним меким живим ткивима. Са друге стране, делимично умрежење полимерних ланаца спречава растварање хидрогелова, обезбеђујући физичку и механичку стабилост приликом примене. Биокompatibilност, пропустљивост за нутријенте, транспарентност, комфорност, неадхезивност, тренутно ублажење бола и умирујући ефекат су својства која издвајају хидрогелове у односу на друге облоге. Савремен приступ у третману рана подразумева примену „паметних“ хидрогелова, осетљивих на суптилне промене спољашњих фактора, као носача за уградњу и контролисано отпуштање терапеутски активних агенса, који учешћем у једној или више фаза процеса зарастања ране обезбеђују успешност третмана.

Циљ овог рада је синтеза и карактеризација рН и температурно осетљивих хидрогелова на бази 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине као носача за уградњу и контролисано отпуштање терапеутски активних јона метала и њихових редукованих облика, као што су бакар, цинк и сребро, за примену у третману рана. Захваљујући изузетној антимикуробној активности и значајним улогама у биохемијским процесима који се одвијају у људском организму, ови метали поседују велики потенцијал за наведену примену. У оквиру рада су опсежно испитана структурна, морфолошка, механичка и термичка својства, понашање при бубрењу и погодност за примену у третману рана хидрогелова са уграђеним бакар(II) јонима, као и са редукованим бакром. Бакар је у сврху ових испитивања изабран као репрезентативни метал из горе наведене групе.

Хидрогелови на бази 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине као системи за уградњу и контролисано отпуштање бакар(II) јона, цинк(II) јона и сребро(I) јона и њихових редукованих облика до сада нису испитани, па се овим радом очекује значајан допринос у развоју нових полимерних материјала за биомедицинску примену у третману рана и регенерацији меког ткива.

ТЕОРИЈСКИ ДЕО

1. Хидрогелови

Хидрогелови представљају групу полимерних материјала делимично умрежене структуре хидрофилног карактера, која им омогућава упијање и задржавање велике количине воде унутар тродимензионалне мреже [1]. Хидрофилна природа потиче од бочних група полимерних ланаца, док умрежења ланаца омогућавају хидрогелу да остане нерастворан у води [2]. Количина апсорбоване воде/флуида унутар хидрогелова може бити чак хиљаду пута већа од тежине сувог хидрогела, „ксерогела“ [3]. Тако хидрогел представља стање између течног и чврстог, са специфичним карактеристикама и понашањем које га чине јединственим материјалом.

Последњих неколико деценија хидрогелови привлаче пажњу научника широм света. Од педесетих година прошлог века, када је званично синтетисан први хидрогел са применом у офталмологији за израду контактних сочива [4], приметан је континуитет и значајан напредак у развоју нових формулација хидрогелова [5-12].

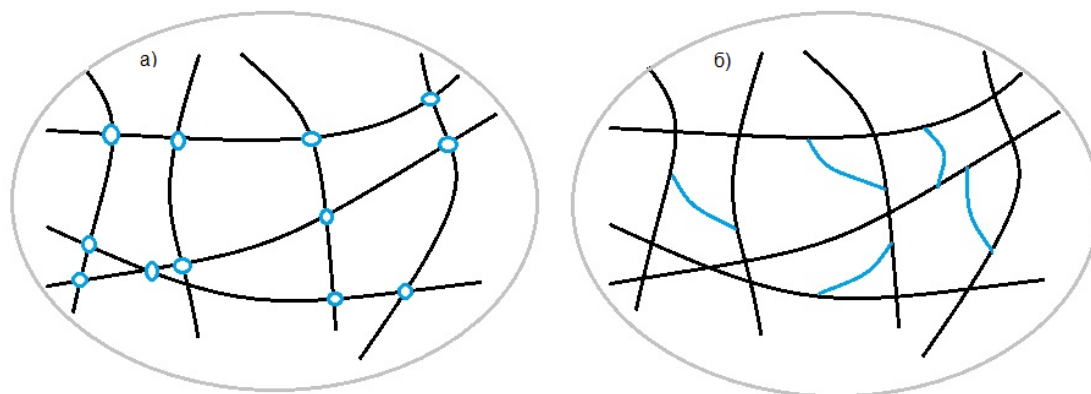
Захваљујући својим својствима, хидрогелови су нашли примену у различитим областима. Ипак, посебно су значајна открића у медицини и фармацији, у областима као што су контролисано/циљано отпуштање активних агенса у циљу лечења различитих обољења и поремећаја, инжењерство ткива и биосепарација протеина [13-16]. Због високог садржаја воде и одговарајуће мекоће имају сличности са живим меким ткивима [17]. Такође, висок садржај воде доприноси већој биокомпатибилности, што указује на то да се *in vivo* применом хидрогелова нежељене реакције и одговори организма своде на минимум или у потпуности изостају. Хидрогелови као јединствена група биоматеријала користе се у изради контактних сочива [18,19] и вештачких органа, као што су вештачки панкреас [20], хрскавица [21,22], рожњача [23,24] и кожа [25-27]. Заступљени су у третману рана и регенерацији меког ткива, у облику специјалних облога, о чему ће даље бити речи. С обзиром на њихову тродимензионалну порозну структуру, уз додатак одговарајућих

фактора неопходних за основне биолошке функције, погодни су као носачи за раст и развој различитих ћелијских линија [13,28-29].

Данас се развој нових формулација хидрогелова заснива на томе да се одговарајућим одабиром компоненти створе генерације надмоћнијих и ефикаснијих материјала. Потенцијални недостаци, као што су слаба механичка својства и биодеградабилност могу се превазићи применом различитих метода синтезе, као и увођењем неорганских и природних компоненти. „Паметни“ хидрогелови, захваљујући изузетној способности имитирања живих ткива и прилагођавању суптилним променама спољашњих фактора, показују особине живих система [30,31], што им омогућава значајну заступљеност у области биомедицинске примене.

1.1. Добијање хидрогелова

Хидрогелови представљају делимично умрежене полимерне структуре које се не растварају у води, већ у њој бубре. Да би се систем као такав одржао, односно, да би се спречило растварање полимерних ланаца у воденој средини, морају постојати умрежења [32]. Постоји значајан број метода умрежавања које се могу применити у синтезама хидрогелова. Основна класификација обухвата методе физичког и хемијског умрежавања (Слика 1). Под физички умреженим хидрогеловима подразумевају се они чија је структура формирана преко јонских интеракција, кристализацијом или стварањем стереокомплекса [33-35]. Иако физичко умрежавање искључује коришћење умреживача, који могу бити токсични, хемијски умрежени хидрогелови имају предност у случајевима када се од ових материјала очекује одређена стабилност, првенствено у домену механичких својстава.



Слика 1. Приказ а) физички и б) хемијски умреженог хидрогела.

Хемијско умрежавање подразумева формирање ковалентних хемијских веза између полимерних ланаца. Две најчешће примењиване технике полимеризације су полимеризација преко слободних радикала [36-38] и реакција поликондензације [39]. Поред ових метода, хемијско умрежавање је могуће постићи и реакцијама комплементарних група, коришћењем алдехида [40], реакцијама адиције [41] и др. У реакцијама полимеризације преко слободних радикала основне компоненте су мономер, иницијатор и умреживач, најчешће растворни у води. Реакција полимеризације се може одиграти у маси, раствору или суспензији [1], и да би започела, иницијатор мора генерисати слободне радикале и то под утицајем температуре, различитих видова зрачења или одабиром одговарајућег редокс иницијатора.

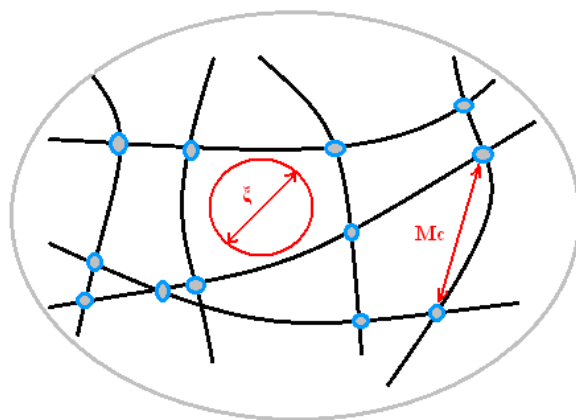
Полимеризација преко слободних радикала у раствору, метода синтезе хидрогелова примењена у овом раду, у односу на полимеризацију у маси, пружа могућност контроле не само температуре, већ и својстава хидрогела, као што је порозност, која даље утиче на понашање хидрогела приликом бубрења и контролисаног отпуштања уграђеног активног агенса. Омогућен је висок проценат конверзије, док је количина непрореаговалих реактаната сведена на минимум, што представља један од услова за биомедицинску примену [42]. У циљу уклањања могућих заосталих мономера и других нечистоћа, хидрогелови се после синтезе

испирају водом или бубре у њој. Као растварачи се користе вода, етанол или њихова мешавина, чиме се избегава употреба токсичних растварача.

1.2. Структура хидрогелова и параметри мреже

Својства и примена хидрогелова у значајној мери зависе од структуре мреже. Бубрење хидрогелова и количина апсорбованог флуида унутар мреже у директној су спреси са параметрима који карактеришу структуру хидрогела, међу којима су следећа три најзначајнија:

- запремински удео полимера у набубрелом стању ($\varphi_{2,s}$),
- средња моларна маса између две суседне тачке умрежења (M_c) и
- величина пора (ξ).



Слика 2. Структура хидрогела и параметри мреже.

Запремински удео полимера у набубрелом стању се може одредити експерименталним путем тј. праћењем кинетике бубрења, при чему се користи следећа једначина:

$$\varphi_{2,s} = \frac{1}{q} \quad (1)$$

где је q степен бубрења хидрогела.

Цајкара (Саукага) [43] је описао једначину за добијање средње моларне масе између две суседне тачке умрежења, M_c :

$$\frac{V_1 X^2 \varphi_{2,s}^2}{4I\bar{V}_r^2} \left(\frac{2K_{a1}K_{a2} + 10^{-pH} K_{a1}}{2(10^{-pH})^2 + 10^{-pH} K_{a1} + K_{a1}K_{a2}} \right)^2 = [\ln(1 - \varphi_{2,s}) + \varphi_{2,s} + \chi \varphi_{2,s}^2] + \left(\frac{V_1 \rho}{M_c} \right) \varphi_{2,r}^{2/3} \varphi_{2,s}^{1/3} \quad (2)$$

где су K_{a1} и K_{a2} прва и друга константа дисоцијације дипротонске киселине, X масени удео јонизованог полимера у систему, I јонска јачина медијума, $\varphi_{2,s}$ запремински удео полимера у набубрелом стању, $\varphi_{2,r}$ запремински удео полимера у релаксираном стању, V_1 моларна запремина воде, ρ густина полимера, V_r просечна моларна маса јединица које се понављају и χ Флоријев (Flory-јев) параметар интеракције полимер-растварач [44]:

$$\chi = \frac{\ln(1 - \varphi_{2,s}) + \varphi_{2,s}}{\varphi_{2,s}^2} \quad (3)$$

Величина пора се може израчунати коришћењем следеће једначине [45]:

$$\xi = \varphi_{2,s}^{1/3} l \left(\frac{2C_n M_c}{M_r} \right)^{1/2} \quad (4)$$

где је C_n карактеристични Флоријев однос, l дужина C–C везе (1,54 Å за винилне полимере) и M_r моларна маса основне структурне јединице полимерног ланца.

Поред наведених параметара, често се одређује и ефективна густина умрежења (v_e):

$$v_e = \frac{\rho}{M_c} \quad (5)$$

где је ρ густина полимера.

1.3. Бубрење хидрогелова

Способност упијања и задржавања велике количине флуида унутар полимерне мреже јесте јединствено својство хидрогелова. Када је хидрогел, који се налази у сувом стању, у контакту са флуидом, молекули флуида пенетрирају и на тај начин шире поре хидрогела и он почиње да бубри. Вода унутар хидрогела омогућава слободну дифузију неких растворених молекула, док полимерна мрежа има улогу да задржи упијену воду [2]. Међутим, бубрење није континуалан процес. Насупрот осмотском притиску који иницира бубрење, делује и еластична сила истезања полимерних ланаца, која спречава деформацију хидрогела. Када се успостави равнотежа између ове две силе, хидрогел престаје да бубри и настаје равнотежно стање [46].

Бубрење јонских хидрогелова зависи од својстава полимера, медијума у ком бубри, као и од интеракција полимер-растварач. Степен умрежења полимера представља однос умреживача и мономера који учествују у полимеризацији. Мале количине умреживача воде до формирања слабије умреженог хидрогела, који самим тим више бубри због повећања величине пора и слободног простора за пенетрацију флуида. Повећањем степена умрежења смањује се степен бубрења хидрогела [47]. Такође, мале промене хидрофилности система воде до значајних промена степена бубрења. Утврђено је да се увођењем хидрофилне компоненте, N-винил пиролидона, у систем, поспешује бубрење хидрогела, док присуство хидрофобног метилметакрилата доводи до смањења степена бубрења [48].

Јонска јачина и рН вредност медијума могу значајно утицати на бубрење јонских хидрогелова. Тако се са повећањем јонске јачине медијума смањује степен бубрења [49]. С обзиром да јонски хидрогелови садрже карактеристичне базне или киселе бочне групе, са одређеним pK_a или pK_b вредностима, малим променама рН вредности медијума могу се уочити значајне промене у понашању хидрогелова приликом бубрења.

Степен бубрења се одређује гравиметријски, тако што се у одређеним временским интервалима хидрогел вади из медијума у ком бубри и мери се његова

маса. После извесног времена успоставља се равнотежно стање тј. маса хидрогела постаје константна и он престаје да бубри. За одређивање степена бубрења и равнотежног степена бубрења користе се следеће једначине [50]:

$$q = \frac{m_t - m_0}{m_0} \quad (6)$$

и

$$q = \frac{m_e - m_0}{m_0} \quad (7)$$

где су m_0 , m_t и m_e масе ксерогела, набубрелог хидрогела у времену t и хидрогела набубрелог до равнотеже.

1.4. Подела хидрогелова

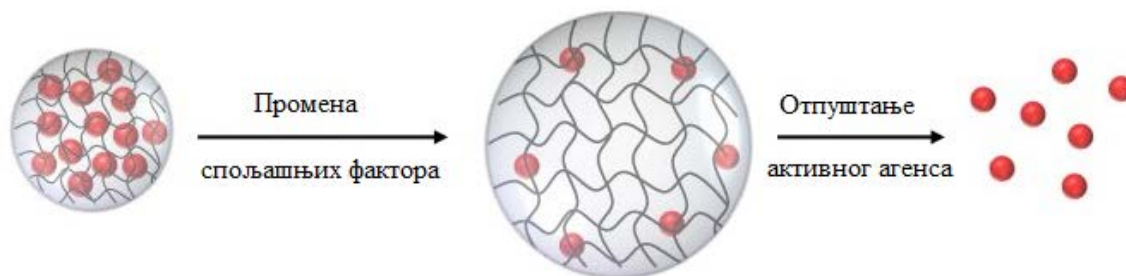
Постоји више критеријума [1] на основу којих се хидрогелови могу класификовати, при чему су неки од њих представљени на Слици 3. Тако се хидрогелови могу разликовати по пореклу, саставу, начину умрежавања, порозности и наелектрисању. Узимајући у обзир структуру, хидрогелови могу бити аморфни, семикристалинични и кристалинични, док се, поред дискова, могу појавити и у облику микросфера или филмова.



Слика 3. Подела хидрогелова.

Посебну групу чине хидрогелови осетљиви на промену спољашњих фактора тзв. „паметни“ хидрогелови. Они подлежу наглој промени запремине као одговор на мале промене спољашњих фактора, као што су температура, рН, јонска јачина, јачина светлости, електричног или магнетног поља [51,52]. Због свог карактеристичног понашања привукли су пажњу великом броју научника широм света, па тако развој нових „паметних“ хидрогелова доживљава експанзију последњих година [53]. Захваљујући својој флексибилности налазе примену у различитим областима, од индустрије до медицине. Тако они осетљиви на специфичне молекуле, као што су глукоза или антигени, могу се користити као биосензори [54], док осетљивост на светлост, притисак или електричне стимулансе омогућава примену у биосепарацији [55]. Значајан допринос дају у области контролисаног отпуштања лекова и других активних агенса [56]. Са становишта биомедицинске примене, температурно осетљиви и рН осетљиви хидрогелови заузимају централно место, с обзиром на то да

се процес отпуштања активног агенса може контролисати и у средини у којој долази до промена параметара, као што је варирање рН у гастроинтестиналном тракту или у специфичној средини као што је оболело ткиво или регија захваћена тумором [52,57-59]. „Паметно“ понашање ових хидрогелова омогућава синхронизацију контролисаног/циљаног отпуштања са променљивим физиолошким условима, што представља значајну предност у односу на традиционалне системе за контролисано отпуштање [60].



Слика 4. Хидрогелови осетљиви на промену спољашњих фактора.

1.5. рН осетљиви хидрогелови

рН осетљиви хидрогелови показују промене у понашању током бубрења при малим променама рН вредности средине у којој се налазе. Овај феномен је присутан код хидрогелова који поседују киселе или базне бочне групе у полимерним ланцима. У воденим растворима одговарајуће рН вредности и јонске јачине, ове групе јонизују стварајући наелектрисање у хидрогелу [11]. Том приликом долази до одбијања истоименог наелектрисања, полимерна мрежа се шири, а самим тим је и бубрење израженије. Слабе киселине и базе као што су карбоксилна и фосфорна киселина и амини, показују промене у јонизацији са променом рН вредности, што води до конформационе промене полимера и бубрења хидрогела [61].

На основу природе бочних група, хидрогелови могу бити анјонски (карбоксилна или сулфонска група), катјонски (амино група) или амфифилни (анјонске и катјонске бочне групе). У случају анјонских хидрогелова, јонизација се

дешава у воденој средини чија је рН вредност виша од pK_a бочних група. Са даљим повећањем рН вредности, повећава се број група које су јонизоване, као и електростатичко одбијање између њих. Код катјонских хидрогелова, слабо базне бочне групе јонизују при рН вредностима околине које су ниже од њихових pK_b , па за разлику од анјонских, више бубре на ниским рН.

рН осетљиви хидрогелови су заступљени у различитим биомедицинским истраживањима. Постоји значајан број научних радова у којима су приказани поступци добијања, карактеризација и примена рН осетљивих хидрогелова [62-64]. У циљу испитивања контролисаног отпуштања кетопрофена, који је коришћен као модел лек, гама зрачењем су синтетисани биодеградабилни рН осетљиви хидрогелови желатина и акрилне киселине [65]. Анјонски хидрогелови на бази поли(метакрилне киселине) и поли(етилен гликол) метакрилата, добијени полимеризацијом преко слободних радикала, показали су драстичну промену степена бубрења са променом рН вредности медијума, што је уочено и приликом испитивања контролисаног отпуштања Родамина-Б, који је успешно уграђен у ове хидрогелове [66]. Разноврсност примене потврђују и рН осетљиви хидрогелови метакрилне киселине, метил метакрилата и 2-хидроксиетил метакрилата који су коришћени за инкапсулацију пестицида циперметрина и микронутријента бакар сулфата и њихово контролисано отпуштање, у циљу побољшања раста и приноса пољопривредних култура [67].

1.6. Температурно осетљиви хидрогелови

Температурно осетљиви хидрогелови показују нагле промене у запремини приликом промене температуре средине у којој се налазе. Постоје два типа температурно осетљивих хидрогелова, они који са повећањем температуре више бубре тј. полимерна мрежа се шири и повећава се количина апсорбованог флуида, и они код којих долази до скупљања полимерне мреже и изласка флуида из ње [68].

За температурно осетљиве полимере карактеристичне су критичне температуре растварања тј. доња критична температура растварања (low critical

solution temperature, LCST) и горња критична температура растварања (upper critical solution temperature, UCST) [69]. Полимери који имају LCST показују смањену растворљивост у води са повећањем температуре изнад ове тачке, док су испод ње растворни. Испод LCST раствор полимера је хомоген, док изнад ње фазе почињу да се раздвајају и постаје замућен. Са енергетског становишта, пораст температуре води до негативне слободне енергије ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$), што интеракцију вода-полимер чини нефаваоризованом. Негативна слободна енергија (ΔG) потиче од доприноса ентропије (ΔS), тачније ентропије воде, која је велика када полимер није растворен у води, па је и уређеност мања. Тада интеракције вода-вода постају доминантне [69,70]. Хидрогелови који су добијени из ових полимера изнад критичне температуре се скупљају, док на температурама испод ње бубре. Критична температура хидрогелова се назива температуром запреминског фазног прелаза (volume phase transition temperature, VPTT) [71].

Хидрогелови на бази полимера који имају LCST су веома заступљени као системи за контролисано отпуштање активних агенса. Раманан (Ramanan) и сарадници су наночестице поли(N-изопропилакриламида) синтетисане полимеризацијом у емулзији, уградили у хидрогел на бази полиетилен гликола [72] и добили температурно осетљиви материјал који је испитиван за контролисано отпуштање албумина, изолованог из говеђег серума. Природни полимери као што су хитозан и колаген коришћени су у синтези температурно осетљивих хидрогелова у циљу развијања новог типа екстрацелуларног матрикса за раст ћелија [73]. Температурно осетљив хидрогел на бази поли(винил етра) синтетисан је и испитиван за орално контролисано отпуштање хлорхексидина [74].

За разлику од полимера који имају доњу критичну температуру растварања, постоји веома мали број полимера који показују UCST тј. повећану растворљивост у води изнад ове температуре. Примери ових полимера су поли(акрилна киселина) и полиакриламид [75].

1.7. Хидрогелови на бази 2-хидроксиетил акрилата

2-хидроксиетил акрилат представља винилни мономер са хидроксилном групом. Захваљујући својствима сличним 2-хидроксиетил метакрилату, који је често испитиван и коришћен као компонента у синтезама хидрогелова за биомедицинску примену, 2-хидроксиетил акрилат заузима значајно место у области биоматеријала. Хидрофилна природа, тј. афинитет ка везивању молекула воде доприноси већој биокомпатибилности, што је један од главних предуслова за коришћење материјала у биомедицини. Кортазар (Cortazar) и сарадници су синтетисали хидрофилне сунђере кополимеризацијом 2-хидроксиетил акрилата и етиленгликол диметакрилата, као биоматеријале са израженом порозном структуром и потенцијалом за обезбеђивање услова за раст живих ћелија [76]. У циљу добијања полимера и хидрогелова који ће бити коришћени у биомедицинске сврхе, Варгун (Vargun) и сарадници су испитивали различите начине полимеризације 2-хидроксиетил акрилата, као што су полимеризација у раствору и маси и радикална полимеризација трансфером атома (atom transfer radical polymerization, ATRP) [77]. У зависности од коришћеног растварача приликом фотополимеризације 2-хидроксиетил акрилата, могуће је добити хидрогелове различите порозности и густине умрежења [78,79]. Применом различитих растварача, као што су вода, метанол или етанол може се утицати на морфологију ових хидрогелова. Начин везивања воде, као и њен утицај на својства кополимерних хидрогелова 2-хидроксиетил акрилата и етил акрилата, синтетисаних фотополимеризацијом у присуству бензоина као фотоиницијатора, описали су Киритсис (Kuritsis) и сарадници [80].

Хидрогелови на бази 2-хидроксиетил акрилата испитивани су као системи за контролисано отпуштање различитих лекова, па су тако хијалуронат-хидроксиетил акрилат хидрогелови синтетисани кополимеризацијом преко слободних радикала и анализирани као матрице за уградњу и контролисано отпуштање хлорпромазина хидрохлорида, катјонског модел лека [81]. Лин (Lin) и сарадници су синтетисали и карактерисали хидрогелове на бази 2-хидроксиетил акрилата и силицијум диоксида за контролисано отпуштање аспирина, са применом у лечењу костију и зглобова, при

чему је показано да је правилно дисперговани SiO_2 значајно допринео биокомпатибилности и продуженом отпуштању овог лека [82]. У случају примене хидрогелова на бази 2-хидроксиетил акрилата за контролисано отпуштање великих молекула као што су пептиди и протеини, утврђено је да је кључни фактор порозност хидрогелова, као и њена контрола [83].

Хидрофилност хидрогелова на бази 2-хидроксиетил акрилата може се побољшати додавањем компоненте наглашене хидрофилне природе. Итатонска киселина представља једињење које се добија из биообновљивих извора, ферментацијом меласе и скроба. С обзиром да садржи две карбоксилне групе са различитим pK_a вредностима, $pK_{a1} = 3,85$ и $pK_{a2} = 5,45$, очекује се да се њено присуство у хидрогелу одрази не само на повећање хидрофилности, већ и на израженије „паметно“ понашање тј. на осетљивост на промене параметара средине у којој се налазе.

2. Примена хидрогелова као система за контролисано отпуштање активних агенса у третману рана

2.1. Кожа и настанак рана

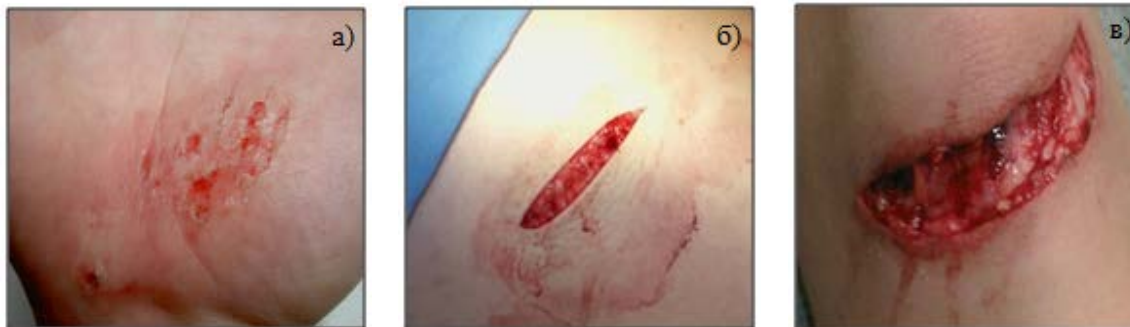
Кожа представља највећи људски орган који чини око 8 % укупне масе човека и покрива цело тело. Њена најбитнија функција је заштита тела од спољашњих штетних утицаја термичке, механичке или хемијске природе, или пак микроорганизама [84,85]. Поред баријерних својстава, пропустљивост коже за одређене гасове, као и телесне течности, значајан је чинилац у одржавању оптималног стања људског организма. Последице извесних поремећаја се могу уочити и на кожи, па је на основу стања коже могуће проценити и здравствено стање човека.

С обзиром да се кожа састоји од три дела: епидермиса, дермиса и субкутаног ткива, повреде се разликују по озбиљности и могућности зарастања и реепитализације; површинске епидермалне повреде имају могућност регенерације, док дубље повреде могу довести до трајног оштећења дермиса и субкутаног ткива, па самим тим изискују одговарајућу терапију [86].

2.1.1. Врсте рана

Класификација рана се може извршити на више начина, тј. на основу различитих фактора. На основу озбиљности повреде и периода лечења постоје акутне и хроничне ране. Акутне ране зарастају у периоду до 3 недеље, често без ожиљака. С обзиром да се ради о повредама површинског слоја коже, тј. епидермиса и горњег слоја дермиса, акутне ране могу настати механичким путем, односно у контакту коже и чврстих површина. На основу изгледа могу се поделити на резове, одеротине и ране настале гуљењем коже [87]. Акутне ране су последица хируршких

захвата, повреде ножем или метком, док утицај зрачења, термичких извора или агресивних хемикалија доводи до стварања опекотина [88].



Слика 5. Врсте акутних рана: а) огуљена кожа, б) хируршки рез и в) одеротина (фотографије преузете са <http://etmcourse.com/injury-description-in-the-ed/>).



Слика 6. Врсте опекотина настале дејством а) топлотног извора, б) хемикалија и в) зрачења (фотографија а) преузета са <https://en.wikipedia.org/wiki/Burn>; фотографија б) преузета са https://en.wikipedia.org/wiki/Chemical_burn; фотографија в) преузета са https://en.wikipedia.org/wiki/Radiation_burn).

За разлику од акутних, хроничне ране зарастају спорије, дуже од 3 недеље, а чак се често поново појављују. Разлог компликованог лечења ових рана лежи у физиолошким условима, присуству различитих поремећаја, дијабетеса, малигнух болести, као и упорних инфекција ране [89].

Последица дијабетеса и неконтролисаног нивоа шећера у крви је поремећено зарастање рана, па се могу појавити улцерације на стопалу. Данас у свету представља један од највећих проблема, изискујући дуг период лечења, а самим тим и велике трошкове. Повећање броја ампутација, па и смртности, указује на неопходност адекватног и систематичног лечења [90-92].

Декубитус представља улцерацију која настаје услед смањене покретљивости пацијента, који је обично везан за инвалидска колица или постељу, и последица је дужег притиска на одређену површину коже [93]. Овај притисак доводи до ограниченог протока крви, оштећења и одумирања ткива [94].

Венска улцерација настаје услед неправилне функције крвних судова, при чему долази до нагомилавања крви у венама и њеног изливања у околно ткиво, које притом пуца стварајући рану на кожи [95,96]. Најчешће се ствара на доњим екстремитетима, изнад чланка или испод колена.



Слика 7. Врсте улцерација: а) дијабетични, б) декубитус и в) венски (фотографија а) преузета са <http://cottonwoodpodiatry.com/diabetic-wound-care>; фотографија б) преузета са <http://decubitusulcervictim.com/decubitus-ulcer-pictures>; фотографија в) преузета са <http://www.aafp.org/afp/2010/0415/p989.html>).

2.1.2. Третман рана – проблем глобалних размера

Последњих неколико деценија несумњиво се може уочити значајан напредак у области лечења рана. Сложен процес зарастања рана захтева непрекидно усавршавање, иновативне технологије и унапређена научна и клиничка истраживања. Колико је ова област медицине значајна говоре и подаци, који, нажалост делују забрињавајуће ако се у обзир узме велики проценат популације широм света који се суочава са неким видом претходно поменутих типова рана. Дуготрајно и сложено лечење са собом повлачи и велике трошкове, који на годишњем нивоу достижу и суме од преко милијарду долара, што потврђују и подаци који следе [97,98].

Иако се под термином акутна рана подразумева повреда коже која се може санирати у краћем временском периоду и најчешће без последица у виду ожиљака, незанемарљив број људи се свакодневно суочава са неком од њих. Процењује се да се у свету годишње уради преко 100 милиона хируршких захвата који захтевају одређени третман. Приближно 20 милиона повреда у виду посекотина или одеротина изискују хируршку обраду у току краћег временског периода. Постоји велика учесталост пацијената са опекотинама, преко 6 милијарди на годишњем нивоу, које најчешће бивају третиране неким од савремених производа за зарастање рана. Притом се не може занемарити и чињеница да се велики број људи, с обзиром да се ради о лакшим повредама коже, одлучује за кућни третман, без одласка лекару, коришћењем неких од доступних средстава, као што су газе или фластери.

С друге стране, настанак хроничних рана, који прати дужи период лечења и различите компликације, захтева озбиљнији и сложенији приступ. Светска популација се, на годишњем нивоу, суочава са приближно 4,5 милиона декубитуса и 9,7 милиона венских улцерација, док 10 милиона људи пати од улцерација насталих као последица дијабетеса, једне од најучесталијих болести данашњице. Процењује се да у САД-ма годишњи трошкови лечења улцерација на нози насталих услед дијабетеса достижу чак 5 милијарди долара. Један од разлога овако високих трошкова је и значајан број ампутација доњих екстремитета, које се извршавају услед

немогућности успешног зарастања ових рана, а са циљем спашавања људског живота.

2.1.3. Фазе зарастања ране

Рана на кожи настаје као последица поремећеног интегритета коже и процес успешног зарастања зависи од локалних или системских фактора, врсте обољења и повреде, и састоји се из следећих фаза: 1) инфламације, 2) пролиферације и 3) ремоделовања [99] (Слика 8).

Хемостаза представља прву реакцију организма на појаву ране на кожи. Активацијом и агрегацијом тромбоцита ствара се крвни угрушак који има за циљ спречавање локалне хеморагије тј. крварења [100]. Након тога долази и до производње фактора раста добијеног из тромбоцита (platelet-derived growth factor, PDGF), трансформишућег фактора раста (transforming growth factor, TGF), фактора раста фибробласта (fibroblast growth factor, FGF) и васкуларног ендотелног фактора раста (vascular endothelial growth factor, VEGF) [101].

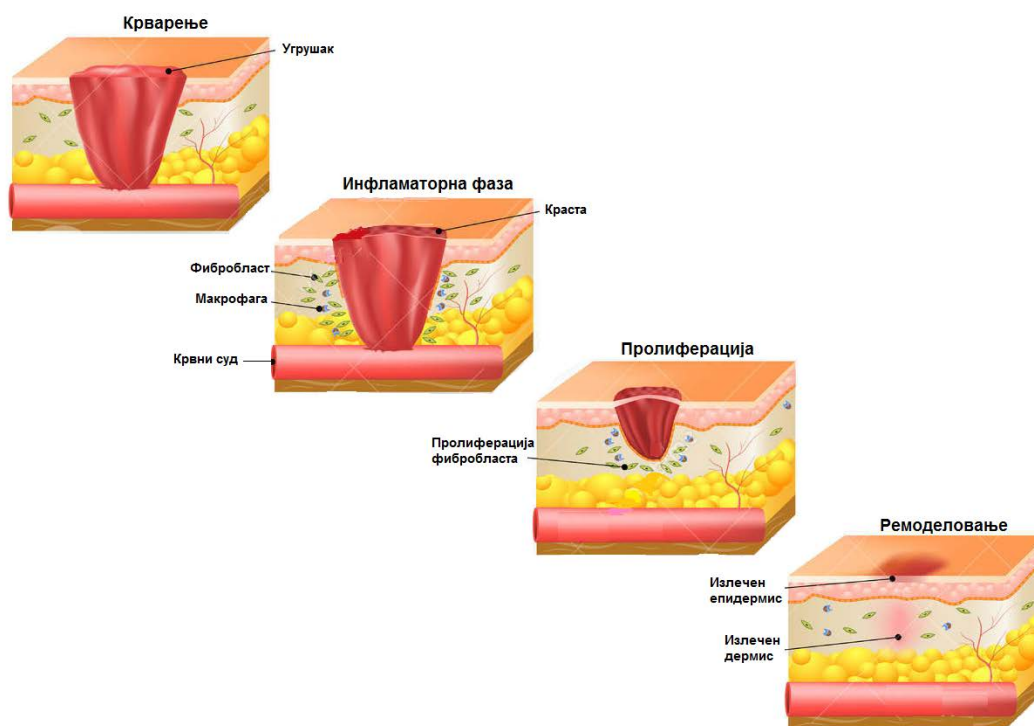
Инфламаторна фаза почиње скоро истовремено са хемостазом, пар минута до 24 h од повреде и траје око 3 дана, укључујући и ћелијске и васкуларне одговоре [88]. Фагоцити улазе у рану у току лучења течности из ње, са циљем уклањања мртвих ћелија тј. некротичног ткива које притом из чврстог облика прелази у жућкасто обојену течност. У исто време, долази до формирања фибриноског угрушка и дегранулације нагомиланих тромбоцита. Лучењем наведених фактора раста поспешује се пролиферација леукоцита, посебно неутрофила, макрофага и фибробласта [102], који удруженим снагама утичу на уклањање некротичног ткива и микроорганизама из ране.

Специфична појава је и миграција околних епителних ћелија и фибробласта до саме ране са циљем замене оштећеног ткива, праћена брзим ћелијским растом преко површине ране, што за последицу има тањење околног епитела [88].

Пролиферативна фаза се делом преклапа са инфламаторном фазом и за исход има формирање епитела миграцијом ћелија преко привременог матрикса, формирање

крвних судова, депоновање колагена и стварање екстрацелуларног матрикса [103]. Фибробласти производе колаген, градивну јединицу везивног ткива. У току пролиферације фибробласта долази до повећања количине колагена, све до постизања хомеостазе тј. равнотеже између синтезе и деградације колагена [104]. Притом се формира гранулативно ткиво са новим крвним судовима насталим ангиогенезом.

Фаза ремоделовања обухвата стварање и јачање ћелијског везивног ткива, које из гранулативног стања прелази у нормално ткиво, што може трајати и до 2 године. Јачање ткива је директно повезано са организацијом влакана колагена у што уређенију и компактнију структуру [105].

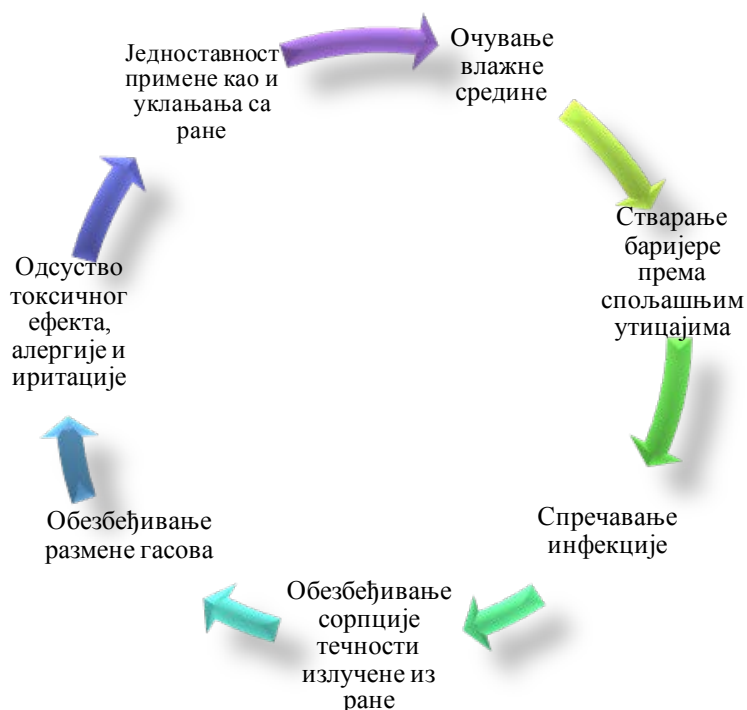


Слика 8. Фазе зарастања ране (преузето са <http://www.shieldhealthcare.com/community/wound/2015/12/18/how-wounds-heal-the-4-main-phases-of-wound-healing/> уз модификацију).

2.1.4. Методе за зарастање рана

Још од древних времена, људска врста се суочава са бројним изазовима везаним за третман различитих облика рана, насталих као последица физичких повреда или одређених обољења. Први записи о методама за зарастање рана потичу још из доба Месопотамијске цивилизације, око 2500 година п. н. е. [106]. На глиненим плочама пронађеним из тог периода су описане три фазе: чишћење ране, прављење својеврсних облога и завијање ране. За испирање ране Месопотамци су користили млеко или воду [107], док су облоге прављене од блата, глине, биљака или уља. Египћани су први почели са применом меда у третману рана, које поред одличне антибактеријске активности поседује и друга погодна својства, па је и данас састојак бројних облога [108,109].

Цивилизацијски развој доноси и значајан напредак у овом пољу [110]. Примитивне методе замењују хирургија и примена нових материјала који показују високу ефикасност у зарастању рана. Проналазак антибиотика и њихова примена за зарастање рана може се сматрати једном од најзначајнијих прекретница у овој области медицине. XX век карактерише брз развој облога за третман рана сачињених од најразноврснијих састојака, почевши од природних, који су присутни од древних цивилизација, до синтетских материјала као што су полимери. Данас се научна истраживања заснивају на развоју софистицираних материјала, са циљем постизања успешног зарастања, које је условљено великим бројем фактора (Слика 9).



Слика 9. Критеријуми успешности облоге за зарастање ране.

Традиционалне облоге за зарастање рана подразумевају газе, завоје од природних или синтетичких материјала, памук и вуну, и као такве, рани могу пружити одређену физичку заштиту. Примена традиционалних облога на ране које луче веће количине течности доводи до њене сорпције, а самим тим и влажења облоге изискујући њено често мењање, које за пацијента може бити веома болно [111]. Због ниских трошкова, доступности и могућности примене на различите типове рана, газе се и данас врло често могу срести у употреби [112]. Међутим, немогућност одржавања оптималне влажне средине, која је неопходна за нормалан ток лечења ране, чини их инфериорним у односу на генерације савремених облога.

Савремене облоге за зарастање рана развијају се са циљем да поред тога што је физички штите, обезбеде оптималне услове за њено зарастање. То пре свега подразумева одржавање влажности, спречавање настанка инфекције и подстицање

бржег зарастања. Рана не сме бити ни превише влажна ни сува; када рана лучи мању количину течности, облоге могу очувати хидрацију ткива без значајног упијања, међутим, у случају хроничних рана када долази до прекомерног лучења течности, облоге морају бити у стању да сорпцијом успоставе нормалну влажност [113].

Најзначајније категорије савремених облога поред хидрогелова су: хидроколоидне и алгинатне облоге, као и пене и филмови [114,115]. Њихова својства приказана су у Табели 1.

Табела 1. Типови савремених облога и њихова својства (модификовано [116])

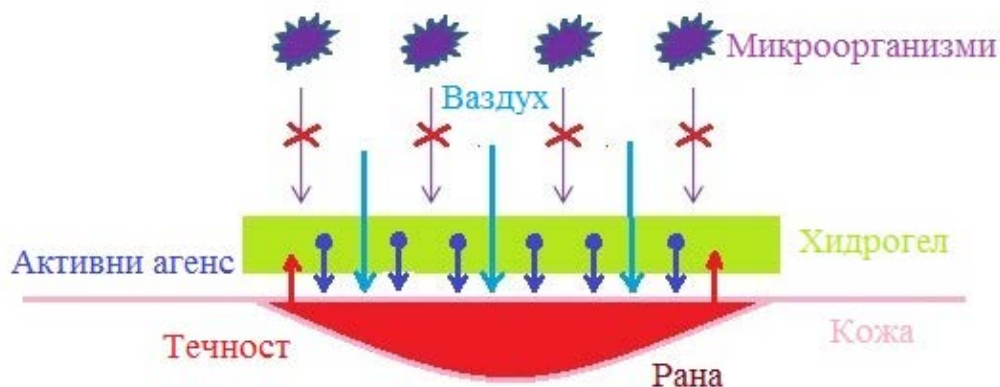
Типови облога	Састав	Предности	Мане
Хидроколоиди	Комбинација еластомера (полиуретан) и гелирајућег агенса (карбоксиметил целулоза, пектин, желатин)	Непропусни према води; обезбеђују заштиту од бактерија; једноставни за примену	Непропусни према кисеонику, па се може јавити инфекција узрокована анаеробним бактеријама; веће количине излучене течности из ране могу преоптеретити облогу
Алгинати	Натријумове и калцијумове соли алгината, које се састоје од две јединице мануронске и гулуронске киселине	Сорпција течности из ране; неки од њих имају добру механичку јачину, па се са ране могу уклонити читави	Захтевају „секундарну облогу“; ризик од исушивања ране
Филмови	Полиуретан	Прозирни; задржавају влагу	Немогућност сорпције
Пене	Полиуретан	Комфорни; добри сорбенти; лако уклањање са ране; не лепе се за рану	Захтевају „секундарну облогу“

2.2. Хидрогелови као облоге за зарастање рана

Хидрогелови представљају једну од најважнијих група савремених облога за зарастање рана. Последњих година испитивање њиховог потенцијала и примене у третману рана привлачи велику пажњу. Захваљујући својој тродимензионалној структури и способности бубрења, хидрогелови могу упити и задржати велике количине течности. Умрежења полимерних ланаца спречавају растварање хидрогелова, што обезбеђује физичку и механичку стабилост приликом примене. Велики капацитет упијања течности и флексибилност структуре чине да хидрогелови имају велику сличност са живим меким ткивима [117]. Због своје неадхезивности, не лепе се за рану, па је и њихово отклањање једноставније и мање болно у односу на традиционалне облоге [118]. Комфорност и тренутно ублажење бола приликом примене, као и умирујући ефекат додатно издвајају хидрогелове од осталих типова облога [119]. Велики садржај воде у хидрогелу хлади подручје ране које је захваћено упалним процесима. Хидрогелови су пропустљиви за гасове (кисеоник), нутријенте и водорастворне метаболите, при чему могу обезбедити оптималне услове за зарастање ране. Њихова транспарентност омогућава континуално праћење процеса зарастања ране без уклањања облоге [120]. Показују одличну биокомпатибилност, уз минималне токсичне ефекте [121-125].

Релативно нови приступ у третману рана укључује употребу полимерних облога у циљу уградње и контролисаног отпуштања различитих терапеутских агенаса који активно учествују у једној или више фаза процеса зарастања ране [94]. Системи за контролисано отпуштање се користе у сврху смањења количине активног агенаса који је неопходан за постизање терапеутског ефекта код пацијента [126]. Такође, могућност контроле изложености примењеном агенсу у току времена, савладавање физиолошких баријера, спречавање превременог отпуштања, као и циљано отпуштање на жељено место уз минималну изложеност остатка тела, су најзначајније особине система за контролисано отпуштање [127]. Хидрогелови као системи за контролисано отпуштање су препознати већ деценијама уназад. Захваљујући способности прилагођавања променама спољашњих фактора припадају генерацији

„паметних“ система за контролисано отпуштање. Синергија изузетних својстава хидрогелова као облога, и активности агенса, који се успешно уграђују, а затим и контролисано отпуштају, доприноси бржем зарастању ране.



Слика 10. Хидрогел као облога за зарастање рана.

2.3. Метали као антимикуробни агенси

Настанак инфекције, након повреде коже и стварања ране, представља веома озбиљну компликацију, која услед неодговарајућег лечења може довести до сепсе, па чак и до смрти пацијента. Изложено субкутано ткиво представља повољну подлогу за контаминацију и колонизацију широког спектра микроорганизама [128]. Инфекција настаје када се један или више микроорганизама такмичи са одбрамбеним системом домаћина, па њихова инвазија и ширење узрокују низ локалних и системских одговора организма [129]. Најчешћи узрочници инфекција су бактерије као што су *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* и гљива *Candida albicans* [130-132].

У циљу спречавања настанка инфекције или контроле већ постојеће инфекције, која услед неадекватних мера може имати фаталне последице по пацијента, користе се различити активни агенси. Већ више деценија антибиотици су

веома заступљени у овој области, нарочито због тога што локална примена изискује коришћење мање количине лека у односу на системску администрацију (интравенско, орално и др.). Међутим, упорна и честа примена антибиотске терапије кроз дуги низ година доводи до стварања отпорности микроорганизама, па самим тим и до неуспешног третмана. Да би се овај проблем превазишао, потреба за алтернативним приступима у зарастању рана се повећава. Научна истраживања су усредсређена на развој нових облога за зарастање рана са активним агенсима изражене антимикуробне активности према различитим микроорганизмима [133-136].

2.3.1. Бакар

Бакар припада групи олигоелемената и микронутријената, који се у одређеним количинама налазе у људском организму и активно учествују у бројним биохемијским процесима. За нормално функционисање организма континуалан унос нутријената у одређеним количинама је обавезан. У САД-ма средња вредност дневног уноса бакра код жена износи око 1,0 до 1,1 mg по дану, док је за мушкарце овај унос нешто већи, 1,2 до 1,6 mg по дану [137]. Горња граница уноса бакра која се толерише, процењена на основу могућих оштећења јетре као нежељеног ефекта, је 10 mg по дану.

Древне цивилизације, као што су Египатска и Грчка, препознале су значајан антимикуробни потенцијал бакра, који се чак око 2200 година п. н. е. користио у лечењу различитих обољења, инфекција као и за стерилизацију воде [138]. Данас налази широку примену као антимикуробни агенс [139]. Тако у условима где је неопходан висок ниво хигијене, препоручује се коришћење површина направљених од бакра, које су у клиничким студијама показале изузетну антимикуробну активност према широком спектру микроорганизама, са акцентом на најчешће узрочнике инфекција *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *E. coli* [138,140,141]. У циљу спречавања настанка и развоја инфекције на површинама од нерђајућег челика, које су, поред клиничких услова, често присутне и у домаћинствима, школама и вртићима,

синтетисани су и хидрогелови на бази поли(етилен гликол) диакрилата са уграђеним наночестицама бакра, као превлаке са бактерицидним дејством [142].

Бакар представља есенцијални елемент у процесу зарастања рана. Подстиче ангиогенезу тј. раст и ширење нових крвних судова, тако што индукује стварање најважнијег фактора овог процеса, васкуларног ендотелног фактора раста [143]. Такође, бакар има стимулишући ефекат на пролиферацију епителних ћелија, фибробласта и колагена [144-146]. Значајна биолошка активност и изузетан антимикуробни потенцијал овог метала допринели су развоју нових облога за зарастање рана. Тако се уградњом бакар(II) јона у алгинатне хидрогелове постиже ефикасно зарастање, уз контролу упалних процеса и спречавање/елиминацију инфекција у рани [147]. Утврђено је да нанокompозити на бази хитозана и бакра убрзавају зарастање рана, утичући на ћелије, цитокине и факторе раста у различитим фазама процеса зарастања [148].

Ипак, биомедицинску примену прелазних метала, па и бакра прати њихова потенцијална токсичност и имунолошки одговор организма. Међутим, иако елетропозитивни јон бакра као такав може дифундовати кроз биолошке мембране и са протеинима формирати комплексе, различити тестови су показали да бакар има низак потенцијал иритације људске коже. У литератури постоји веома мали број клиничких случајева који указују на имуногено својство бакра, који се, притом, односе на системску изложеност овом металу, али не и на његову топикалну примену [149].

2.3.2. Цинк

Поред бакра, цинк такође припада групи олигоелемената и као кофактор бројних ензима укључен је у биохемијске процесе у људском организму [150]. Сматра се есенцијалним за процесе као што су синтеза колагена, производња антитела, као и ћелијска пролиферација, који су неопходни за нормалан ток зарастања ране [151]. Као један од антимикуробних агенса, показује антибактеријску

активност према широком спектру бактерија [152-154]. Алгинатни хидрогелови са уграђеним јонима цинка показали су се погодним за примену у зарастању рана, захваљујући контролисаном отпуштању нетоксичних концентрација цинка и задовољавајућој антибактеријској активности према *E. coli* [155]. Контрола и инхибиција раста микроорганизама као што су *E. coli* и *S. aureus* може се постићи и уградњом цинк хлорида ($ZnCl_2$) у хидрогелове поли(акрилне киселине) [156].

2.3.3. Сребро

Сребро представља један од најчешће испитиваних метала са аспекта антимикробног потенцијала. Показује изражену антимикробну активност како према Грам-позитивним и Грам-негативним бактеријама, тако и према гљивама [157]. Једно од најбитнијих својстава сребра јесте ниска токсичност коју испољава у организму, па је тако ризик од нежељених ефеката сведен на минимум [158]. Захваљујући овим особинама, сребро налази примену у различитим формулацијама облога за зарастање рана [159,160]. Утврђено је да хидрогелови поли(винил пиролидона) и алгината са уграђеним наночестицама сребра показују огроман потенцијал у зарастању рана, захваљујући израженој антимикробној активности према *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *C. albicans* [161]. Контролисаним отпуштањем наночестица сребра из хидрогелова на бази поли(винил алкохола) постиже се спречавање раста бактерија и одржавање стерилне средине у рани, што омогућава нормалан ток зарастања [117]. *In vivo* студије изведене на мишевима показују да долази до убрзавања зарастања ране, без нежељених упалних процеса, у присуству хидрогелова на бази поли(винил алкохола), хитозана и наночестица сребра [162].

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3. Добијање хидрогелова на бази 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине

3.1. Реактанти

За синтезу и припрему хидрогелова коришћени су следећи реактанти:

- Мономери: 2-хидроксиетил акрилат и итаконска киселина,
- Умреживач: етилен гликол диметакрилат,
- Иницијатор: калијум персулфат,
- Убрзивач: N, N, N', N'-тетраметилетилен диамин,
- Бакар(II) сулфат пентахидрат,
- Сребро нитрат,
- Цинк ацетат дихидрат,
- Натријум борохидрид.

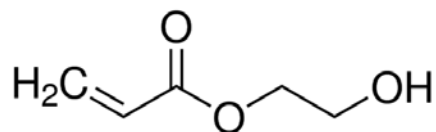
Наведене хемикалије су коришћене у облику добијеном од произвођача, без даљег пречишћавања.

3.1.1. 2-хидроксиетил акрилат

2-хидроксиетил акрилат или етиленгликол моноакрилат је естар акрилне киселине. То је безбојна течност, надражујућег мириса, која се лако раствара у води и етанолу и лако полимеризује. У овом раду је коришћен 2-хидроксиетил акрилат (Sigma Aldrich, САД) са следећим карактеристикама:

- Моларна маса: $116,12 \text{ g mol}^{-1}$;

- Молекулска формула: $C_5H_8O_3$;
- Температура кључања: 90 - 92 °C;
- Индекс рефракције: 1,45 (на 20 °C);
- Густина: $1,011 \text{ g ml}^{-1}$ (на 25 °C);
- Чистоћа: 96 %;
- Инхибитор: монометил етар хидрохинон (200 - 650 ppm).

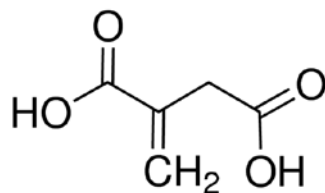


Слика 11. Структурна формула 2-хидроксиетил акрилата.

3.1.2. Итаконска киселина

Итаконска киселина представља незасићену дикарбоксилну киселину која се добија из биообновљивих извора. Растворна је у води и, према произвођачу (Sigma Aldrich, САД), њене карактеристике су:

- Моларна маса: $130,10 \text{ g mol}^{-1}$;
- Молекулска формула: $C_5H_6O_4$;
- Температура топљења: 165 - 168 °C;
- Чистоћа: $\geq 99 \%$.

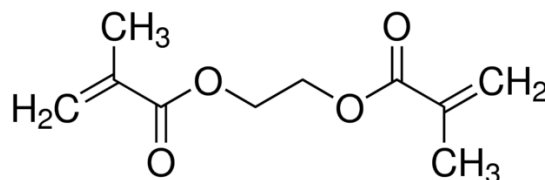


Слика 12. Структурна формула итаконске киселине.

3.1.3. Етилен гликол диметакрилат

Етилен гликол диметакрилат или етилен диметакрилат (Sigma Aldrich, САД) коришћен је као умреживач у свим синтезама. То је безбојна течност и има следеће карактеристике:

- Моларна маса: $198,22 \text{ g mol}^{-1}$;
- Молекулска формула: $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4$;
- Температура кључања: $98 - 100 \text{ }^\circ\text{C}$;
- Индекс рефракције: $1,454$ (на $20 \text{ }^\circ\text{C}$);
- Густина: $1,051 \text{ g ml}^{-1}$ (на $25 \text{ }^\circ\text{C}$);
- Чистоћа: 98% ;
- Инхибитор: монометил етар хидрохинон ($90 - 110 \text{ ppm}$).

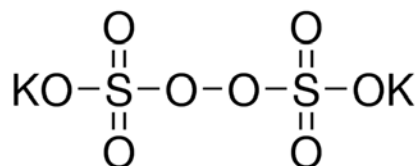


Слика 13. Структурна формула етилен гликол диметакрилата.

3.1.4. Калијум персулфат

Као иницијатор у свим синтезама коришћен је калијум персулфат (Sigma Aldrich, САД), бела кристална супстанца растворна у води, са следећим карактеристикама:

- Моларна маса: $270,32 \text{ g mol}^{-1}$;
- Молекулска формула: $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$;
- Чистоћа: $\geq 99 \%$.



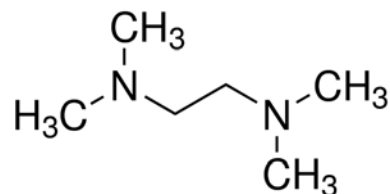
Слика 14. Структурна формула калијум персулфата.

3.1.5. N, N, N', N'-тетраметилетилен диамин

N, N, N', N'-тетраметилетилен диамин је коришћен као убрзивач. То је жућкасто обојена течност непријатног мириса. Према произвођачу (Sigma Aldrich, САД) има следеће карактеристике:

- Моларна маса: $116,20 \text{ g mol}^{-1}$;
- Молекулска формула: $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$;
- Температура кључања: $120 - 122 \text{ }^\circ\text{C}$;
- Индекс рефракције: $1,4179$ (на $20 \text{ }^\circ\text{C}$);
- Густина: $0,775 \text{ g ml}^{-1}$ (на $20 \text{ }^\circ\text{C}$);

- Чистоћа: 99 %.



Слика 15. Структурна формула N, N, N', N'-тетраметилетилен диаминa.

3.1.6. Бакар(II) сулфат пентахидрат

Бакар(II) сулфат пентахидрат је коришћен као извор за уградњу бакар(II) јона у синтетисане хидрогелове. То је плава кристална супстанца која према произвођачу (Sigma Aldrich, САД) има следеће карактеристике:

- Моларна маса: 249,69 g mol⁻¹;
- Молекулска формула: CuSO₄ x 5H₂O;
- Температура топљења: 110 °C;
- Чистоћа: ≥ 98 %.

3.1.7. Цинк ацетат дихидрат

Цинк ацетат дихидрат (Sigma Aldrich, САД) је коришћен као извор за уградњу цинк(II) јона у синтетисане хидрогелове. То је бела кристална супстанца са следећим карактеристикама:

- Моларна маса: 219,51 g mol⁻¹;

- Молекулска формула: $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$;
- Чистоћа: $\geq 98 \%$.

3.1.8. Сребро нитрат

Сребро нитрат (Sigma Aldrich, САД) је коришћен као извор за уградњу сребро(I) јона у синтетисане хидрогелове. То је бела кристална супстанца са следећим карактеристикама:

- Моларна маса: $169,87 \text{ g mol}^{-1}$;
- Молекулска формула: AgNO_3 ;
- Температура топљења: $212 \text{ }^\circ\text{C}$;
- Чистоћа: $\geq 99 \%$.

3.1.9. Натријум борохидрид

Натријум борохидрид је коришћен као редукционо средство, у циљу редукције јона метала који су уграђени у синтетисане хидрогелове. То је бела прашкаста супстанца која бурно реагује са водом. Карактеристике ове супстанце, према произвођачу (Sigma Aldrich, САД) су следеће:

- Моларна маса: $37,83 \text{ g mol}^{-1}$;
- Молекулска формула: NaBH_4 ;
- Температура топљења: $> 300 \text{ }^\circ\text{C}$;
- Чистоћа: $\geq 99 \%$.

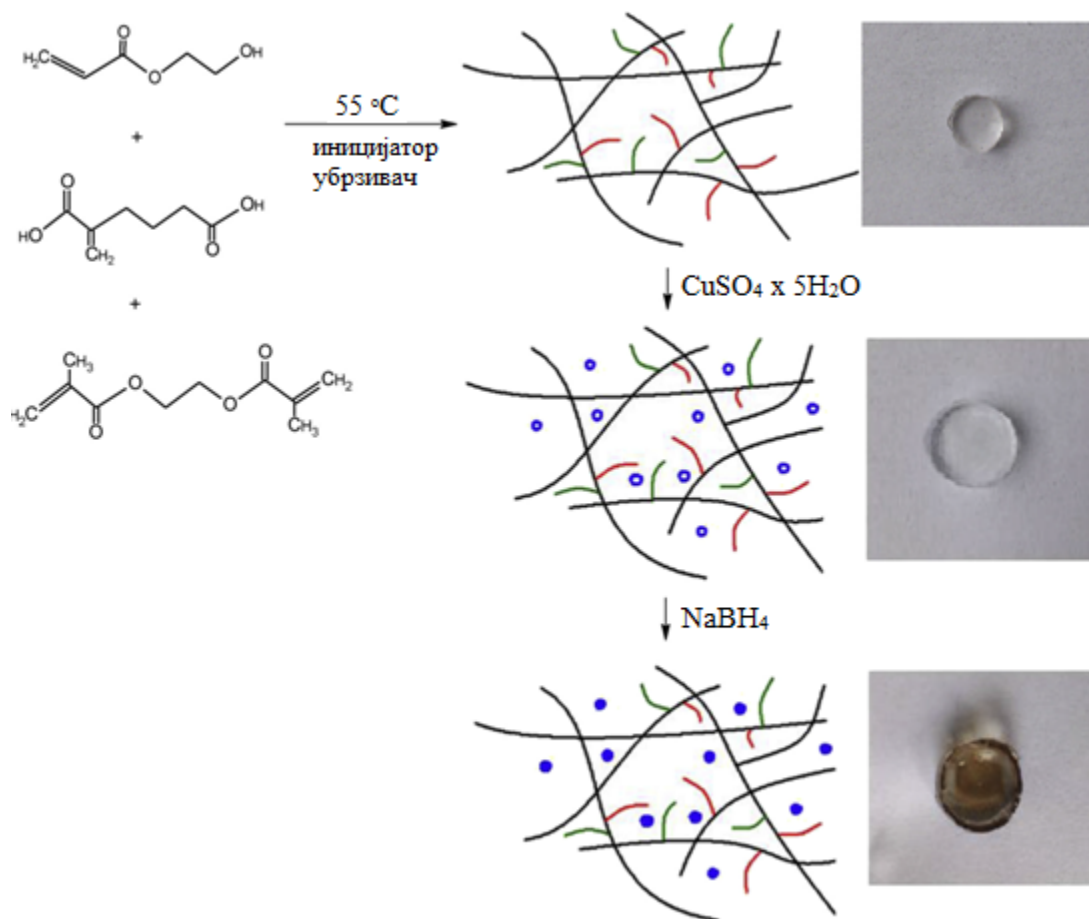
3.2. Синтеза хидрогелова на бази 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине

Хидрогелови 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине су синтетисани полимеризацијом преко слободних радикала у раствору. Као растварач је коришћена смеша воде и етанола. При синтезама је вариран садржај мономера у циљу испитивања утицаја састава на својства хидрогелова. Удео итаконске киселине у хидрогеловима је вариран (0,0; 2,0; 3,5; 5,0; 7,0 mol%) и на тај начин је добијена серија од пет хидрогелова који су обележени скраћеницама Н0, Н2, Н3.5, Н5 и Н7, где Н означава хидрогелове 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине, док број указује на садржај итаконске киселине у хидрогелу. Концентрације умреживача, иницијатора и убрзивача су биле константне.

Одмерене су масе реактанта и појединачно растворене у смеси воде и етанола. Након тога су раствори помешани, продувани азотом 20 min и изливени у калуп који се састоји од две стаклене плоче оивичене цревом од поливинил хлорида дебљине 2 mm. Калуп је стављен у сушницу на 55 °C, у трајању од 24 h. По завршетку полимеризације, узорци су извађени из калупа и исечени у облику дискова (пречника 10 mm). Дискови су потопљени у дестиловану воду, у циљу уклањања непрореаговалих материја. Вода је мењана свакодневно у току седам дана, након чега су добијени хидрогелови осушени на собној температури.

Уградња бакар(II) јона у синтетисане хидрогелове извршена је потапањем хидрогелова у раствор $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (10^{-4} M) у трајању од 24 h, после чега су узорци извађени и осушени на собној температури. Добијени хидрогелови означени су следећим скраћеницама: CI0, CI2, CI3.5, CI5 и CI7, где CI указује на хидрогелове 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине са уграђеним бакар(II) јонима, док број представља садржај итаконске киселине у хидрогеловима. У циљу добијања хидрогелова са редукованим обликом бакра, извршена је хемијска редукција, па су тако хидрогелови CI серије потопљени у раствор редукционог средства, NaBH_4 (10^{-2} M), у трајању од 24 h, након чега су хидрогелови осушени на собној температури. Ови хидрогелови су означени на следећи начин: CR0, CR2, CR3.5, CR5 и CR7, при

чему CR указује на присуство редукованог бабра у хидрогеловима 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине, док број, као и у претходној серији, потиче од удела итаконске киселине у хидрогеловима.



Слика 16. Добијање хидрогелова.

У циљу утврђивања погодности синтетисаних хидрогелова на бази 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине као система за контролисано отпуштање других терапеутски активних метала, извршена је уградња цинк(II) јона и сребро(I) јона, а потом и њихова редукција.

Уградња цинк(II) јона у хидрогелове 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине изведена је на следећи начин. Синтетисани хидрогелови су потопљени у раствор $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (10^{-4} M), на 24 h, после чега су извађени и осушени на

собној температури. Добијени хидрогелови означени су следећим скраћеницама: ZI0, ZI2, ZI3.5, ZI5 и ZI7, аналогно ознакама CI хидрогелова. ZI указује на хидрогелове са уграђеним цинк(II) јонима, док је број показатељ садржаја итаконске киселине у хидрогеловима. У циљу редукције уграђених цинк(II) јона, ZI хидрогелови су потопљени у раствор NaBH_4 (10^{-2} M), на 24 h, након чега су осушени на собној температури. Ови хидрогелови су означени скраћеницама: ZR0, ZR2, ZR3.5, ZR5 и ZR7, при чему ZR указује на присуство редукованог цинка у хидрогеловима, док број, као и у претходним серијама, потиче од удела итаконске киселине у хидрогеловима.

Уградња сребро(I) јона у хидрогелове на бази 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине изведена је тако што су синтетисани хидрогелови потопљени у раствор AgNO_3 (10^{-4} M), на 24 h, након чега су извађени и осушени на собној температури. За добијене хидрогелове коришћене су следеће скраћенице: AI0, AI2, AI3.5, AI5 и AI7, у складу са ознакама CI хидрогелова. AI указује на хидрогелове са уграђеним сребро(I) јонима, док број указује на удео итаконске киселине у хидрогеловима. Као и у претходним серијама хидрогелова, у циљу редукције уграђених сребро(I) јона, AI хидрогелови су потопљени у раствор NaBH_4 (10^{-2} M), на 24 h, након чега су осушени на собној температури. Ови хидрогелови су означени на следећи начин: AR0, AR2, AR3.5, AR5 и AR7, при чему AR указује на присуство редукованог сребра у хидрогеловима, док број потиче од удела итаконске киселине у хидрогеловима.

4. Карактеризација хидрогелова

Хидрогелови су карактерисани применом инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом (ФТИР), скенирајуће електронске микроскопије (СЕМ), динамичко-механичке анализе (ДМА), диференцијално скенирајуће калориметрије (ДСК), као и праћењем процеса бубрења.

4.1. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом

Структурна својства хидрогелова испитивана су применом инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом. Суви хидрогелови су спрашени и помешани са калијум бромидом (Sigma Aldrich, САД) у односу 1:100, а затим компримовани у циљу добијања таблетица. Коришћењем спектрофотометра BOMEM Michelfan MB-102 FTIR, добијени су ФТИР спектри испитиваних хидрогелова, у распону таласног броја од 4000 - 700 cm^{-1} , са резолуцијом 4 cm^{-1} .

4.2. Скенирајућа електронска микроскопија

Морфологија хидрогелова је испитивана коришћењем JEOL JSM-5800 скенирајућег електронског микроскопа. Пре анализе испитивани хидрогелови су лиофилизован. Леофилизован хидрогелови су потопљени у течни азот и пресечени. Затим су фиксирани на титанијумски носач и напарени платином.

4.3. Динамичко-механичка анализа

Механичка својства хидрогелова су испитивана на уређају Discovery HR-2 hybrid rheometer. Коришћена је геометрија паралелних плоча пречника 25 mm. Хидрогелови су изложени константном напону на смицање од 10 %, на температури од 25 °C и промени фреквенције у интервалу од 0,1 до 100 rad s^{-1} . Мерења су изведена на хидрогеловима који су претходно набубрени. Н хидрогелови су претходно набубрени у пуферу рН 7,40, док су CI и CR хидрогелови испитивани након њихове припреме тј. након бубрења у раствору $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ и NaBH_4 .

4.4. Диференцијално скенирајућа калориметрија

У циљу испитивања термичких својстава хидрогелова и одређивања вредности температуре прелаза у стакласто стање, коришћен је TA Instruments DSC Q2000 систем. Хидрогелови су претходно сушени на 40 °C, у трајању од 24 h. Затим су постављени у алуминијумске посуде које су смештене у атмосферу азота (проток азота 50 ml min⁻¹) уз загревање од 20 °C min⁻¹. Примењен је двостепени циклус загревања/хлађења у температурном опсегу од -50 до 150 °C у циљу уклањања заостале воде.

4.5. Испитивање бубрења

Процес бубрења хидрогелова праћен је гравиметријском методом. На почетку експеримента су измерене маса m_0 и димензије (пречник и дебљина) сувог хидрогела (ксерогела). Затим је хидрогел постављен у посуду са одговарајућим (фосфатним или ацетатним) пуфером, на одређеној температури. Хидрогел се, у унапред одређеним временским интервалима, вади из пуфера, филтер папиром се уклања вишак течности са његове површине и поново измери његова маса m_t . Мерења се настављају до постизања константне масе тј. равнотежног стања хидрогела. Степен бубрења q као и равнотежни степен бубрења q_e рачунају се коришћењем једначина (6) и (7).

У циљу утврђивања осетљивости хидрогелова на промену спољашњих фактора, процес бубрења је испитиван а) на константној температури, 37 °C, у пуферима различитих рН вредности (2,20; 3,85; 4,50; 5,45; 6,20; 6,80; 7,40; 8,00) и б) у фосфатном пуферу константне рН вредности 7,40 на различитим температурама (25; 30; 37; 40; 45; 50 °C).

Кинетика бубрења је праћена применом следеће једначине [163]:

$$\frac{M_t}{M_e} = kt^n \quad (8)$$

где су M_t и M_e количине апсорбованог флуида у времену t и у стању равнотеже, t дифузионо време, k кинетичка константа и n дифузиони експонент, чија вредност указује на начин транспорта флуида. Вредности $n \leq 0,50$ описују Фиково (Fickian) понашање или дифузионо контролисани механизам транспорта флуида (случај I), док $n > 0,50$ указује на не-Фиково (non-Fickian) понашање. Вредност $n = 1$ (случај II) карактерише транспорт флуида нултог реда, док $n > 1$ описује случај III [163]. Применом логаритамског облика једначине (8) на експерименталне резултате бубрења хидрогела, константа k и експонент n се могу израчунати из нагиба и одсечка линеарне зависности $\log M_t/M_e$ и $\log t$. Овај модел се примењује на вредности $M_t/M_e \leq 0,60$.

Дифузиони коефицијент D ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) је израчунат коришћењем следеће једначине:

$$\frac{M_t}{M_e} = 4 \left(\frac{Dt}{\pi l^2} \right)^{0,5} \quad (9)$$

где је l дебљина диска. Ова једначина је, такође, применљива на експерименталне податке за $M_t/M_e < 0,60$.

Кинетика бубрења праћена је и применом Шотове (Schott-ове) једначине другог реда [164]:

$$\frac{dq}{dt} = K(q_e - q)^2 \quad (10)$$

уз коришћење интегралног облика [165], када је $K = \frac{1}{Aq_e^2}$ и $q_e = \frac{1}{B}$:

$$\frac{t}{q} = A + Bt \quad (11)$$

где је q_e равнотежни степен бубрења, q степен бубрења у времену t , и K карактеристична константа.

5. Хидрогелови 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине као системи за контролисано отпуштање бакар(II) јона и редукованог бакра

5.1. Ефикасност уградње бакар(II) јона

Ефикасност уградње EE (%) бакар(II) јона у синтетисане хидрогелове 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине израчуната је применом следеће једначине:

$$EE (\%) = \frac{\text{садржај активног агенса у хидрогелу}}{\text{теоријски садржај активног агенса}} \times 100 \quad (12)$$

Коришћењем атомског апсорпционог спектрофотометра Phillips PYE UNICAM SP9 измерена је почетна количина бакар(II) јона (теоријска количина) у раствору $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, као и количина неуграђених бакар(II) јона, која је измерена у раствору $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ након што су хидрогелови извађени. На основу почетне количине бакар(II) јона у раствору, која је била доступна хидрогелу, и количине неуграђених бакар(II) јона, који су заостали у раствору, одређен је садржај бакар(II) јона који су уграђени у хидрогел. На основу ових вредности израчуната је и ефикасност уградње бакар(II) јона.

5.2. Контролисано отпуштање бакар(II) јона и редукованог бакра

Студије контролисаног отпуштања бакар(II) јона, као и редукованог бакра из испитиваних хидрогелова, изведене су *in vitro*, у симулираним физиолошким условима. Као медијум за отпуштање коришћен је фосфатни пуфер рН 7,40, док је температура била 37 °C. CI и CR хидрогелови су смештени у појединачне посуде са магнетним мешалицама, у којима се налази одређена запремина медијума за отпуштање (50 ml). Брзина мешања је била константна за време трајања

експеримента и износила је 50 обртаја по минути. У претходно дефинисаним временским интервалима, позната запремина фосфатног пуфера је узоркована и анализирана коришћењем атомског апсорпционог спектрофотометра Phillips PУЕ UNICAM SP9, при чему су добијене концентрације отпуштених бакар(II) јона и редукованог бакра из испитиваних хидрогелова.

5.3. Анализа механизма транспорта бакар(II) јона и редукованог бакра

Механизам транспорта бакар(II) јона и редукованог бакра у току контролисаног отпуштања из испитиваних хидрогелова анализиран је коришћењем следећа три модела:

1. Ритгер-Пепас (Ritger-Peppas) [163]:

$$\frac{M_t}{M_e} = k_1 t^n \quad (13)$$

где су M_t и M_e количине отпуштеног активног агенса у времену t и у стању равнотеже, k_1 кинетичка константа, t време отпуштања и n дифузиони експонент који се односи на тип механизма транспорта активног агенса. За хидрогелове у облику танких филмова, вредност $n = 0,50$ се односи на механизам транспорта контролисан Фиковом дифузијом. Када је $n = 1$ транспорт активног агенса подлеже случају II, указујући на отпуштање нултог реда. Вредности $0,50 < n < 1$ карактеришу аномални тип транспорта активног агенса.

2. Пепас-Салин (Peppas-Sahlin) [166]:

$$\frac{M_t}{M_e} = k_1 t^m + k_2 t^{2m} \quad (14)$$

Први члан десног дела једначине представља допринос Фикове дифузије, док се други члан односи на допринос релаксације полимерних ланаца отпуштању активног

агенса. Коefицијент m је експонент Фикове дифузије и указује на тип система за контролисано отпуштање [166].

3. Пепас-Салин (Peppas-Sahlin) са експонентом $m = 0,50$:

$$\frac{M_t}{M_e} = k_1 t^{0,5} + k_2 t \quad (15)$$

Ови модели су применљиви само на вредности $M_t/M_e < 0,60$. Модел који најбоље описује експерименталне податке јесте онај са најмањом SSR (sum of square residuals) вредношћу. Примењен је и дискриминаторни критеријум, Акаике информациони критеријум (Akaike Information Criterion, AIC), дефинисан следећом једначином:

$$AIC = N(\ln SSR) + 2p \quad (16)$$

N представља број експерименталних података, док је p број параметара примењеног модела. Модел који показује најмање AIC вредности, сматра се да најбоље описује механизам отпуштања активног агенса [167].

6. Хидрогелови 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине као системи за контролисано отпуштање других јона метала и њихових редукованих облика

У циљу утврђивања погодности синтетисаних хидрогелова на бази 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине као система за контролисано отпуштање других терапеутски активних метала са значајним потенцијалом у области зарастања рана и регенерације меког ткива, изведене су студије контролисаног отпуштања цинк(II) јона и сребро(I) јона, као и њихових редукованих облика.

Коришћењем једначине (12) одређена је ефикасност уградње цинк(II) јона и сребро(I) јона, а затим је праћено контролисано отпуштање цинк(II) јона из ZI и редукованог цинка из ZR хидрогелова, као и сребро(I) јона из AI и редукованог

сребра из AR хидрогелова. Студије контролисаног отпуштања су изведене *in vitro*, у симулираним физиолошким условима. Као медијум за отпуштање коришћен је фосфатни пуфер рН 7,40, док је температура на којој је експеримент изведен била 37 °С. Испитивани хидрогелови су смештени у појединачне посуде са магнетним мешалицама, у којима се налази одређена запремина медијума за отпуштање (50 ml). Брзина мешања је била константна за време трајања експеримента и износила је 50 обртаја по минути. У претходно дефинисаним временским интервалима, позната запремина фосфатног пуфера је узоркована и анализирана коришћењем атомског апсорпционог спектрофотометра Phillips PYE UNICAM SP9, при чему су добијене концентрације отпуштених јона метала, као и њихових редукованих облика. Механизам транспорта јона метала и њихових редукованих облика у току контролисаног отпуштања из испитиваних хидрогелова је анализиран применом модела описаних у Поглављу 5.3.

7. Процена погодности хидрогелова 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине са уграђеним бакар(II) јонима и редукованим бакром за примену у третману рана

Са циљем процене погодности хидрогелова на бази 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине са уграђеним бакар(II) јонима и редукованим бакром за примену у третману рана и регенерацији меког ткива, коришћене су *in vitro* методе процене, које обухватају одређивање брзине преноса водене паре, пенетрације кисеоника, дисперзионих карактеристика и задржавања течности.

7.1. Одређивање брзине преноса водене паре

Пропустљивост хидрогелова за влагу испитивана је одређивањем брзине преноса водене паре. Н хидрогелови су претходно набубрени у пуферу рН 7,40, док су CI и CR хидрогелови испитивани након њихове припреме тј. након бубрења у

раствору $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ и NaBH_4 . Припремљени хидрогелови су постављени на отвор пластичних цилиндричних посуда, покривајући целу површину отвора. Посуде садрже одређену запремину дејонизоване воде (10 ml). Након тога, посуде са хидрогеловима, претходно измерених маса, су пребачене у ексикатор који је затим стављен у сушницу, на $37\text{ }^\circ\text{C}$. Релативна влажност ваздуха унутар ексикатора била је 76 %, захваљујући засићеном раствору натријум хлорида (Sigma Aldrich, САД) који је у плиткој посуди смештен на дно ексикатора. У одређеним временским интервалима посуде са хидрогеловима су извађене из ексикатора и њихове масе су поново измерене. Губитак влаге (g) у функцији времена приказује се графички. Користећи вредности нагиба ових линеарних зависности, брзина преноса водене паре се рачуна применом следеће једначине [120]:

$$\text{Брзина преноса водене паре} = (\text{нагиб} \times 24) / A \quad (17)$$

где A представља испитивану површину хидрогела изражену у m^2 .

7.2. Одређивање пенетрације кисеоника

Пропустљивост за кисеоник или пенетрација кисеоника кроз хидрогел испитивана је мерењем раствореног кисеоника. На отворе (пречника 25 mm) ерленмајера запремине 250 ml, у којима се налази 200 ml дејонизоване воде, постављени су хидрогелови тако да прекривају целу површину отвора [168]. Н хидрогелови су претходно набубрени у пуферу рН 7,40, док су CI и CR хидрогелови испитивани након њихове припреме тј. након бубрења у раствору $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ и NaBH_4 . Негативна контрола је ерленмајер затворен одговарајућим чепом који спречава улазак кисеоника у ерленмајер, док је позитивна контрола потпуно отворен ерленмајер, при чему је омогућен улазак кисеоника и његово растварање у води. Ерленмајери су остављени у просторији са сталним протоком ваздуха, у трајању од 24 h. Након тога, вода из ерленмајера је узоркована и количина раствореног

кисеоника (mg l^{-1}) у њој је анализирана коришћењем уређаја Охуметер HI9142 (Hanna Instruments).

7.3. Испитивање дисперзионих карактеристика

Дисперзионе карактеристике хидрогелова су анализирани тако што су хидрогелови (пречника 5 cm) смештени у ерленмајере запремине 250 ml у којима се налази 50 ml фосфатног пуфера рН 7,40. Ерленмајери су затим благо мешани, без настанка вртлога, при чему је визуелно испитиван интегритет хидрогелова [169].

7.4. Испитивање задржавања течности

У циљу одређивања задржавања течности, хидрогелови који су претходно набубрени у фосфатном пуферу рН 7,40, а затим измерени, смештени су у ексикатор. Релативна влажност ваздуха унутар ексикатора била је 76 %, захваљујући засићеном раствору натријум хлорида (Sigma Aldrich, САД), који је у плиткој посуди стављен на дно ексикатора. Након тога, ексикатор је смештен у сушницу, на 37 °C. У одређеним временским интервалима хидрогелови су извађени и њихове масе су поново измерене. Задржавање воде (%) у хидрогелу је израчунато на следећи начин [168]:

$$\text{Задржавање воде (\%)} = \frac{W_t}{W_0} \times 100 \quad (18)$$

где је W_0 почетна маса, а W_t маса хидрогела измерена у времену t .

8. Антимикробна својства хидрогелова 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине са уграђеним бакар(II) јонима и редукованим бавром

8.1. Испитивање антимикробне активности

Антимикробна активност хидрогелова испитивана је према Грам-негативној бактерији *Escherichia coli* (АТСС 25922), Грам-позитивној бактерији *Staphylococcus aureus* (АТСС 25923) и гљиви *Candida albicans* (АТСС 10259). Децимално разблажење свежег бујона културе (Триптон соја бујон са 0,60 % екстракта квасца – TSYB, Торлак, Београд) је припремљено у физиолошком раствору, у циљу постизања почетне концентрације ћелија 10^5 CFU ml⁻¹, уз подешавања применом МекФарланд стандарда замућења (McFarland turbidity standard).

У циљу утврђивања антимикробне активности у току периода контролисаног отпуштања бакар(II) јона и редукованог бакра из хидрогелова, изабране су одређене временске тачке отпуштања, док су као контроле коришћени Н хидрогелови. Након 1., 24. и 72. h отпуштања хидрогелови су извађени из медијума за отпуштање и спроведена је следећа процедура. Квантитативни тест [170] је изведен са одређеним модификацијама.

Хидрогел је био изложен 1 ml физиолошког раствора са концентрацијом ћелија 10^5 CFU ml⁻¹. После одговарајућег времена инкубације (2 h и 24 h) на 37 °C, још 9 ml физиолошког раствора је додато, уз енергично мешање, након чега је 100 µl аликвота разблажено физиолошким раствором. Одговарајуће количине аликвота су узете из свих разблажења, и изливене у стерилне петри шоље, у којима се налази агар триптон соја (Торлак, Србија), а затим инкубирани на 37 °C, у трајању од 24 h. Након инкубације, број формираних колонија (colony forming unit, CFU) је одређен за сваку петри шољу, а затим је израчунато и смањење броја ћелија микроорганизама у присуству испитиваних хидрогелова:

$$\text{Смањење броја ћелија (\%)} = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100 \quad (19)$$

где C_0 представља број ћелија микроорганизама у петри шољи са контролом, а C број ћелија микроорганизама у петри шољама са испитиваним хидрогеловима.

8.2. Испитивање пенетрације микроорганизама

Пенетрација микроорганизама кроз хидрогел испитивана је на хидрогеловима одговарајуће дебљине (4 mm). Хидрогелови су смештени у стерилне петри шоље у којима се налази агар триптон соја (Торлак, Србија). На горњу површину хидрогела накупано је 50 μ l инокулума Грам-негативне бактерије *Pseudomonas aeruginosa* (DV 2739) (10^7 CFU ml⁻¹). Потом су петри шоље инкубирани на 37 °C, у трајању од 48 h, након чега је анализирана пенетрација *P. aeruginosa* кроз испитиване хидрогелове.

9. Биокompatibilност хидрогелова 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине са уграђеним бакар(II) јонима и редукованим бакром

9.1. Испитивање цитотоксичности

Припрема екстракта хидрогелова

Појединачни узорци хидрогелова су измерени (0,2 g) и потопљени у DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (PAA Laboratories, Аустрија) који у себи садржи и 10 % феталног говеђег серума (fetal bovine serum, FBS) (PAA Laboratories, Аустрија), 2 mM стабилног глутаминa (PAA Laboratories, Аустрија) и раствор антибиотика и антимицотика (PAA Laboratories, Аустрија). Екстракција хидрогелова је изведена у стерилним условима, у воденом купатилу на 37 °C у трајању од 3 дана, после чега су уследила *in vitro* испитивања на ћелијским културама.

Ћелијска култура

За тест цитотоксичности/вијабилности коришћена је L929 ћелијска линија (фибробласти миша) (ATCC, Manassas, САД). L929 ћелије су култивисане у DMEM-у који у себи садржи и 10 % феталног говеђег серума, 2 mM стабилног глутаминa и раствор антибиотика и антимицотика, у боцама за ћелијске културе запремине 25 cm² (Greiner Bio-One, Немачка), на 37 °C у влажној атмосфери са 5 % CO₂.

Тест вијабилности

Коришћењем Трипсин-EDTA раствора (Трипсин-етилен диамин тетрасирћетна киселина) (PAA Laboratories, Аустрија) ћелије су издвојене из култура, опране и центрифугиране на 4 °C, 10 min при брзини од 1000 обртаја по минути. Одговарајућа густина ћелија је подешена коришћењем методе искључења бојењем трипан плавим (Trypan Blue Dye Exclusion method). Након тога ћелије су засађене у плочама са 96 места (Greiner Bio-One, Немачка), са густином од 2 x 10⁴ ћелија по месту. 24 h након култивације ћелија, екстракти испитиваних хидрогелова су додати ћелијама у пет различитих концентрација (100 %, 50 %, 25 %, 10 % и 5 %). Концентрације екстраката мање од 100 % добијене су растварањем 100 %-ог екстракта у DMEM-у који у себи садржи и 10 % феталног говеђег серума, 2 mM стабилног глутаминa и раствор антибиотика и антимицотика. Ћелије инкубиране само у овом медијуму су коришћене као контрола. Свака концентрација екстракта хидрогела, као и контрола, тестирана је у 4 до 8 понављања. Ћелије су инкубиране са екстрактима хидрогелова 24 h, након чега је уследио МТТ тест.

МТТ тест

МТТ тест је заснован на редукцији жуте тетразолијум соли 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромидa (МТТ) митохондријалним дехидрогеназама живих ћелија, и стварању љубичастог формаза. После инкубације

са екстрактима хидрогелова, ћелије су опране раствором фосфатног пуфера, а затим је ћелијама додато 100 µl МТТ раствора (Carl Roth, Немачка) концентрације 1 mg ml⁻¹. Ћелије са МТТ раствором су инкубирани следећа 3 h, након чега су настали кристали формазана растворени додатком 100 µl 2-пропанола (Fischer Chemical, САД). Апсорбанца раствореног формазана мерена је коришћењем уређаја Multiskan Ascent Photometric plate reader (Thermo Labsystems) на таласној дужини од 540 nm. Средње вредности апсорбанце су израчунате за све испитиване концентрације екстраката хидрогелова, као и за контролу. Вијабилност ћелија (%) је израчуната према следећој једначини:

$$\text{Вијабилност ћелија (\%)} = \left(\frac{\text{вредност апсорбанце ћелија третираних екстрактима}}{\text{вредност апсорбанце контролних ћелија}} \right) \times 100 \quad (20)$$

Статистичка анализа је извршена коришћењем ANOVA софтвера SPSS 18.0, са вредностима апсорбанци добијених из најмање два независна мерења, при чему су резултати статистички значајни за $p < 0,05$.

9.2. Испитивање генотоксичности

Ћелијска култура

Генотоксични потенцијал екстраката хидрогелова испитиван је на L929 ћелијској линији (фибробласти миша) (ATCC, Manassas, САД). Ћелије су узгајане у DMEM-у који у себи садржи и 10 % феталног говеђег серума, 2 mM стабилног глутамини и раствор антибиотика и антимицотика, на 37 °C у влажној атмосфери која садржи 5% CO₂. Медијум је мењан на свака 2 до 3 дана. После достизања приближно 70 % конфлуенце, ћелије су издвојене коришћењем Трипсин-EDTA раствора, центрифугиране 10 min при 1000 обртаја по минути и температури од 4 °C и потом опране. Одговарајућа густина ћелија подешена је помоћу методе искључења бојењем трипан плавим.

Третман ћелија

L929 ћелије су засађене у плочама са 24 места, са густином од 5×10^4 ћелија ml^{-1} . После 24 h медијум је замењен екстрактима хидрогелова нетоксичних концентрација: 100 % (неразблажен) екстракт H0, C10 и CR0, 25 % H7, 50 % CR7 и 10 % C17. Уследила је инкубација ћелија са екстрактима хидрогелова у трајању од 24 h. Истовремено, контролне ћелије су третиране 15 min са $200 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ у циљу добијања позитивне контроле. Негативна контрола су биле ћелије инкубиране само у DMEM-у који у себи садржи и 10 % феталног говеђег серума, 2 mM стабилног глутаминa и раствор антибиотика и антимицотика (нетретиране ћелије). Сви узорци, као и контроле, испитивани су у 3 независна мерења.

Комет тест

Комет тест је изведен према процедури [171] уз модификације. После инкубације са екстрактима хидрогелова, ћелије су опране раствором фосфатног пуфера. Затим, $100 \mu\text{l}$ ћелијске суспензије је помешано са агарозом ниске тачке топљења (SERVA, Немачка) (0,75 mas%), након чега је $50 \mu\text{l}$ аликвота разливено на плоче превучене агарозом нормалне тачке топљења (Applied Biosystems, САД) (1 mas%). Плоче су урођене у хладан, свеже направљен раствор лизе (2,5 M NaCl, 100 mM динатријум EDTA, 10 mM Tris, 1 % Triton X-100; pH 10) (Sigma-Aldrich, САД). Лизе ћелија су изведене у мрачној и хладној ($5 \text{ }^\circ\text{C}$) просторији у трајању од 2 h. Плоче су затим урођене у хладан раствор пуфера за електрофорезу (300 mM NaOH, 1 mM EDTA; pH ≥ 13) на 40 min. Потом су биле изложене електрофорези (30 V и 300 mA) у трајању од 40 min, а затим неутралисане 5 min помоћу 400 mM Tris пуфера (pH 4) и обојене етидијум бромидом (SERVA, Немачка) ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$). ДНК миграција је праћена коришћењем флуоресцентног микроскопа LEICA DMR (Wetzlar, Немачка). Помоћу камере LEICA DC 300 добијене су слике са приближно десет поља сваке плоче. Систем за анализу слика CometScore v1.5 (TriTek Corp., САД) коришћен је у циљу одређивања количине ДНК у репу комете, DNK_t (%), на следећи начин:

$$DNK_t(\%) = \frac{I_t}{I_c} \times 100 \quad (21)$$

где је I_t укупан интензитет репа комете, а I_c укупан интензитет комете.

Такође, као мера оштећења ДНК, израчунат је и моменат репа M_t :

$$M_t = DNK_t(\%) \times L_t \quad (22)$$

где је L_t дужина репа.

Статистичка анализа резултата, односно вредности количине ДНК у репу комете, као и момента репа ($DNK_t(\%)$ и M_t), добијених из два независна мерења извршена је применом Студент т-теста. У току ове анализе испитивано је приближно 100 ћелија по свакој плочи.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

10. Синтеза и карактеризација хидрогелова

10.1. Синтеза хидрогелова

Хидрогелови на бази 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине синтетисани су полимеризацијом преко слободних радикала. Варирањем удела итаконске киселине, добијена је Н серија коју чине Н0, Н2, Н3.5, Н5 и Н7 хидрогелови. Уградња бакар(II) јона постигнута је потапањем синтетисаних хидрогелова у раствор $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$. На тај начин добијени су CI0, CI2, CI3.5, CI5 и CI7 хидрогелови. Третманом редукционим средством, NaBH_4 , у циљу редукције уграђених бакар(II) јона, добијена је CR серија хидрогелова: CR0, CR2, CR3.5, CR5 и CR7.

Након припреме хидрогелова, примећена је оптичка транспарентност свих хидрогелова, без обзира на присуство бакар(II) јона у CI и редукованог бакра у CR хидрогеловима. Уочено је обојење CI и CR хидрогелова, што је један од доказа уградње бакар(II) јона (благо плаво) и њихове редукције (браон) (Слика 17).



Слика 17. Фотографија добијених серија хидрогелова.

10.2. Карактеризација хидрогелова

10.2.1. Структурна својства хидрогелова

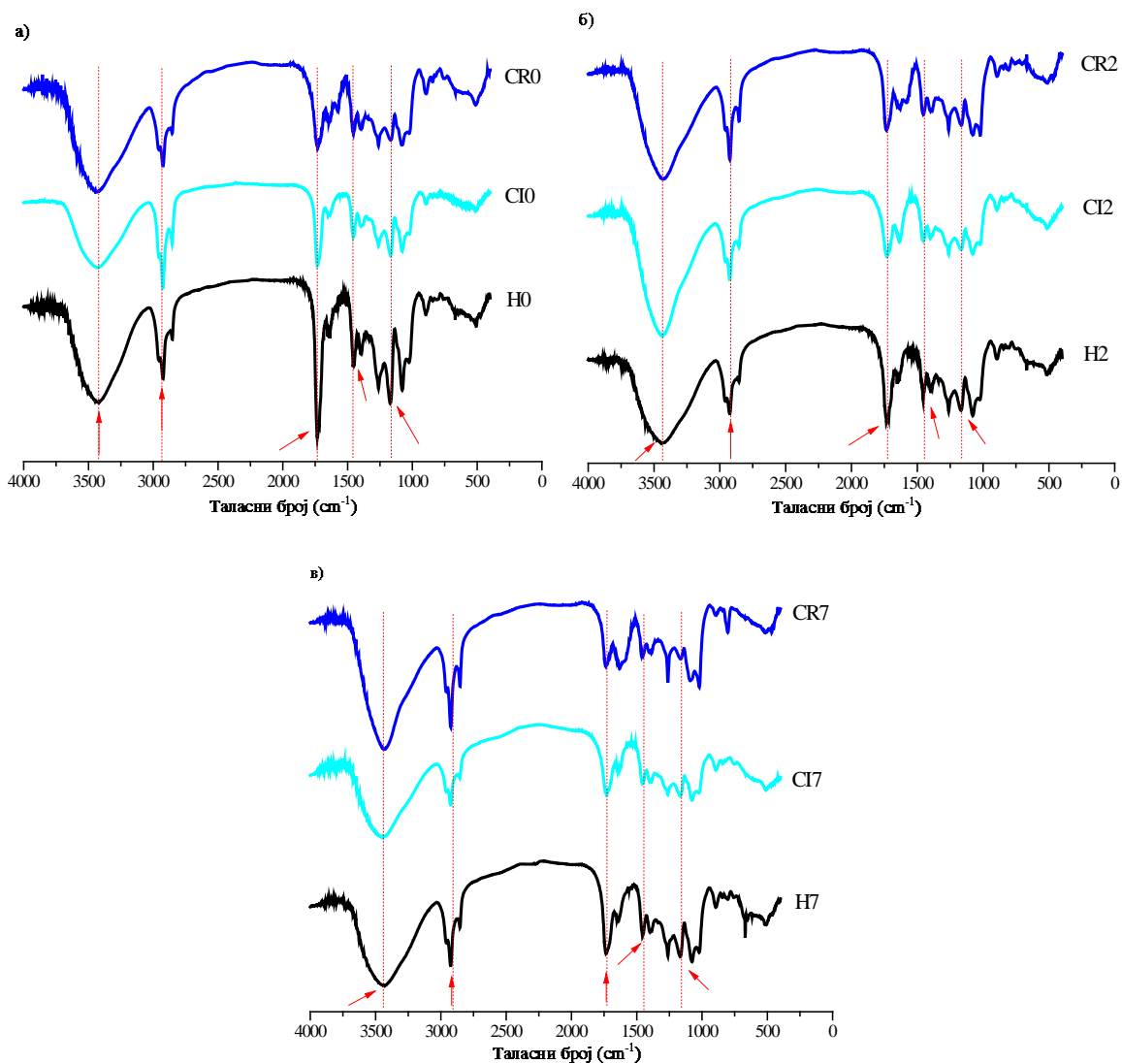
У циљу испитивања хемијске структуре синтетисаних хидрогелова, утврђивања присуства уграђених бакар(II) јона, као и редукованог бакара, Н, СИ и СR хидрогелови са 0,0, 2,0 и 7,0 mol% итаконске киселине анализирани су применом ФТИР спектроскопије. Слика 18 приказује ФТИР спектре испитиваних хидрогелова.

ФТИР спектри Н хидрогелова указују на присуство пикова који су карактеристични за 2-хидроксиетил акрилат и итаконску киселину, што представља један од доказа успешне синтезе хидрогелова. Пик на 3437 cm^{-1} представља вибрацију растезања О-Н групе, док вибрацији растезања естарске групе С=О одговара пик на 1730 cm^{-1} . Растезање алифатских СН, СН₂, и СН₃ група карактерише пик на 2925 cm^{-1} .

У случају СИ хидрогелова запажено је померање карактеристичних пикова у односу на Н хидрогелове. Пик на 3448 cm^{-1} односи се на симетричне вибрације растезања О-Н групе, што указује на интеракцију ових група са бакар(II) јонима. Пик на 1730 cm^{-1} , који одговара вибрацији растезања С=О група из 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине, померен је на виши таласни број (1733 cm^{-1}), указујући на учествовање ових група у уградњи бакар(II) јона. Деформацију О-Н групе коју карактерише пик на 1169 cm^{-1} померен је на виши таласни број (1187 cm^{-1}). На основу ових резултата може се потврдити присуство бакар(II) јона у СИ хидрогеловима, као и њихова интеракција са одређеним функционалним групама полимерних ланаца.

ФТИР спектри СR хидрогелова такође показују одређена померања пикова. Тако је пик карактеристичан за О-Н групу са 3437 cm^{-1} померен на 3432 cm^{-1} . Пик на 2950 cm^{-1} померен је на 2930 cm^{-1} указујући на промене у вибрационим енергијама полимерних ланаца, захваљујући интеракцији функционалних група и редукованог бакара. Промена облика пикова карактеристичних за С-Н растезање у опсегу 1450 до 1210 cm^{-1} указује на интеракције са редукованим бакром [172].

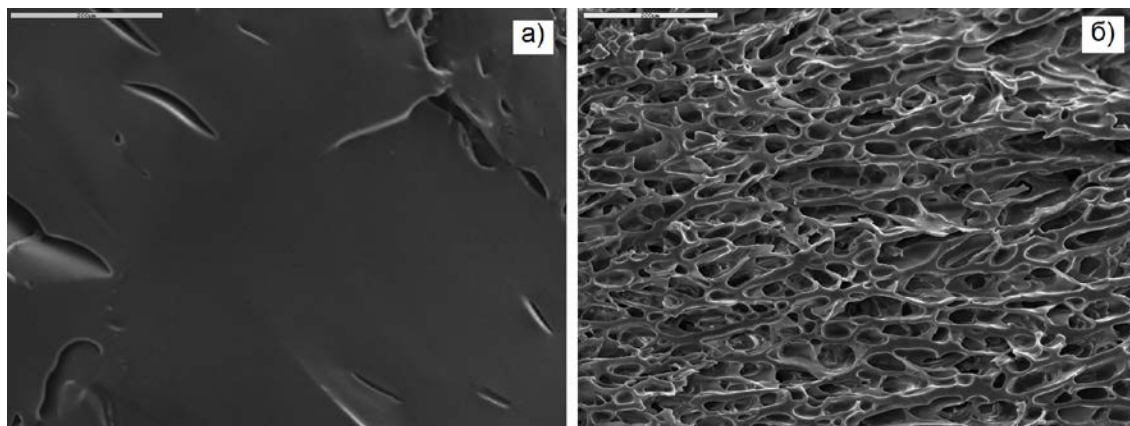
Уградња бакар(II) јона у хидрогелове 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине, као и њихова редукција, за последицу је имала структурне промене у хидрогеловима и померање карактеристичних пикова. Може се закључити да су ФТИР спектри испитиваних хидрогелова дали увид у структуру хидрогелова, потврду о уградњи, а затим и редукцији уграђених бакар(II) јона.



Слика 18. ФТИР спектри H, CI и CR хидрогелова: а) без итаконске киселине, б) са 2 mol% итаконске киселине и в) 7 mol% итаконске киселине.

10.2.2. Морфологија хидрогелова

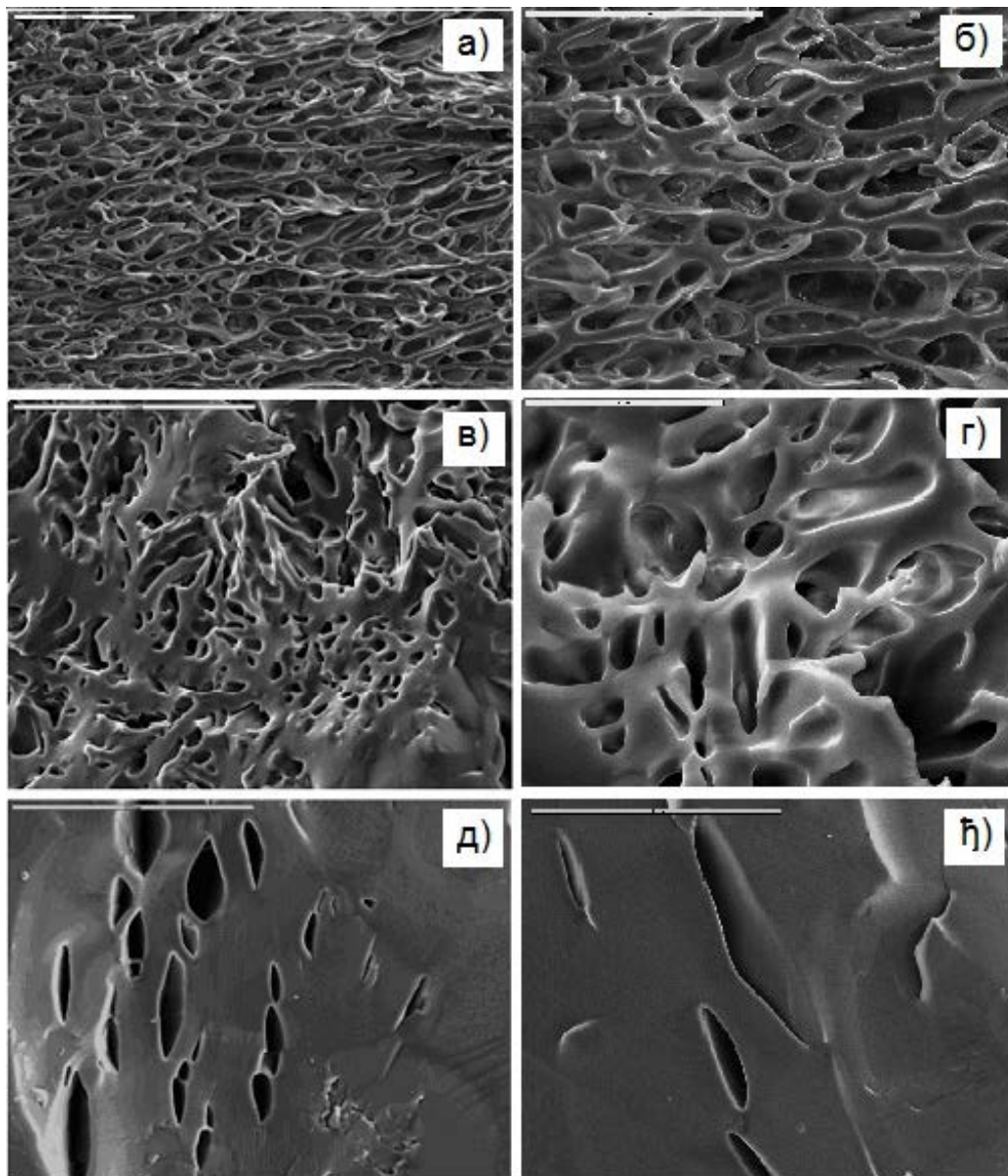
Морфолошка својства синтетисаних хидрогелова, као и присуство и утицај уграђених бакар(II) јона и редукованог бакра, анализирани су коришћењем скенирајуће електронске микроскопије. Слика 19 приказује морфологију хомополимерног Н0 хидрогела (Слика 19 а)) и хидрогела са највећим уделом итаконске киселине, Н7 (Слика 19 б)), при чему се може запазити утицај присуства итаконске киселине на повећање порозности хидрогела. Док је за Н0 карактеристична густа и збијена морфологија, Н7 хидрогел се одликује израженом порозношћу.



Слика 19. СЕМ микрографи а) Н0 ('bar' 200 μm) и б) Н7 ('bar' 200 μm).

СЕМ микрографи попречних пресека Н7, С17 и СР7 хидрогелова приказани су на Слици 20. Утицај уграђених бакар(II) јона огледа се у значајним морфолошким променама. У случају С17 хидрогела примећене су благо веће поре измењеног облика у поређењу са Н7 хидрогелом (Слика 20 в) и г)). Као последица третмана редукционим средством, морфологија СР7 хидрогела (Слика 20 д) и њ)) је знатно компактнија, са уоченим насумичним пукотинама у поређењу са порозним Н7 и С17 хидрогеловима.

На основу добијених резултата може се закључити да итаконска киселина има значајан утицај на морфологију хидрогела тј. њеним увођењем повећава се порозност хидрогела. Такође, уградња бакар(II) јона потврђена је променом у величини и облику пора, док је хемијска редукција ових јона за последицу имала смањену порозност и повећање компактности хидрогела.



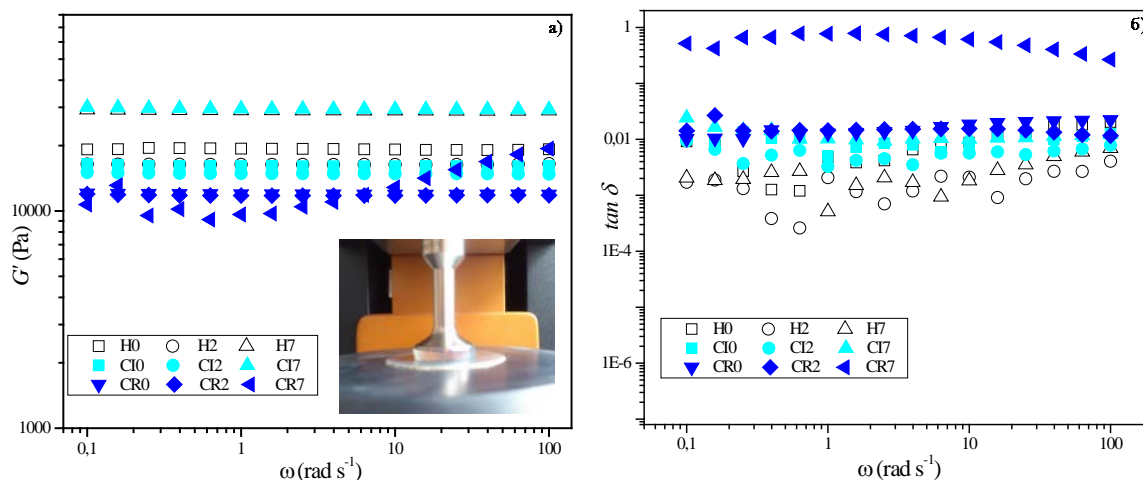
Слика 20. СЕМ микрографи а) Н7 ('bar' 200 μm), б) Н7 ('bar' 50 μm), в) CI7 ('bar' 200 μm), г) CI7 ('bar' 50 μm), д) CR7 ('bar' 200 μm) и њ) CR7 ('bar' 50 μm).

10.2.3. Механичка својства хидрогелова

Механичка својства хидрогелова испитивана су динамичко-механичком анализом. У циљу утврђивања утицаја састава хидрогелова, односно садржаја итаконске киселине, присуства бакар(II) јона као и редукованог бакара, на њихова механичка својства, анализирани су Н, СI и СR хидрогелови са 0,0, 2,0 и 7,0 mol% итаконске киселине. Зависност модула сачуване енергије G' од фреквенције приказана је на Слици 21 а). Добијени резултати указују да је G' независан у односу на примењену фреквенцију, а самим тим и да је деформација хидрогела повратна у потпуности. Увођење итаконске киселине побољшава механичка својства хидрогела, тако да највише G' вредности показују хидрогелови са највећим садржајем итаконске киселине (7 mol%), у оквиру серије којој припадају. СI хидрогелови показали су благо повишене вредности модула сачуване енергије у односу на Н хидрогелове. Специфичне интеракције између функционалних група полимерних ланаца и бакар(II) јона [173] побољшавају механичке особине хидрогела чинећи га еластичнијим, што је потврђено добијеним резултатима. С друге стране, ниже вредности модула сачуване енергије СR хидрогелова у односу на Н и СI хидрогелове могу бити последица третмана редукционим средством у циљу редукције бакар(II) јона. Претпоставља се да се утицај редукционог средства огледа у поништавању интеракција бакар(II) јона и функционалних група полимерних ланаца, па се, са аспекта механичких својстава, хидрогел враћа у почетно стање [174]. Међутим, ниже G' вредности СR хидрогелова, у поређењу са Н хидрогеловима, указују на могућност „негативног“ утицаја редукционог средства и на примарну структуру хидрогела, а самим тим и на слабљење механичких својстава. Благо одступање G' вредности СR7 хидрогела од фреквенцијски независног понашања може се приписати нехомогености између различитих регија хидрогела [175].

Добијене вредности модула изгубљене енергије G'' испитиваних хидрогелова значајно су ниже од вредности модула сачуване енергије, па се израчунате вредности тангенса губитка ($\tan\delta = \frac{G''}{G'}$) приближавају нули (Слика 21 б)), што указује да је

еластични карактер хидрогелова доминантнији у односу на њихову вискозност [176-178].



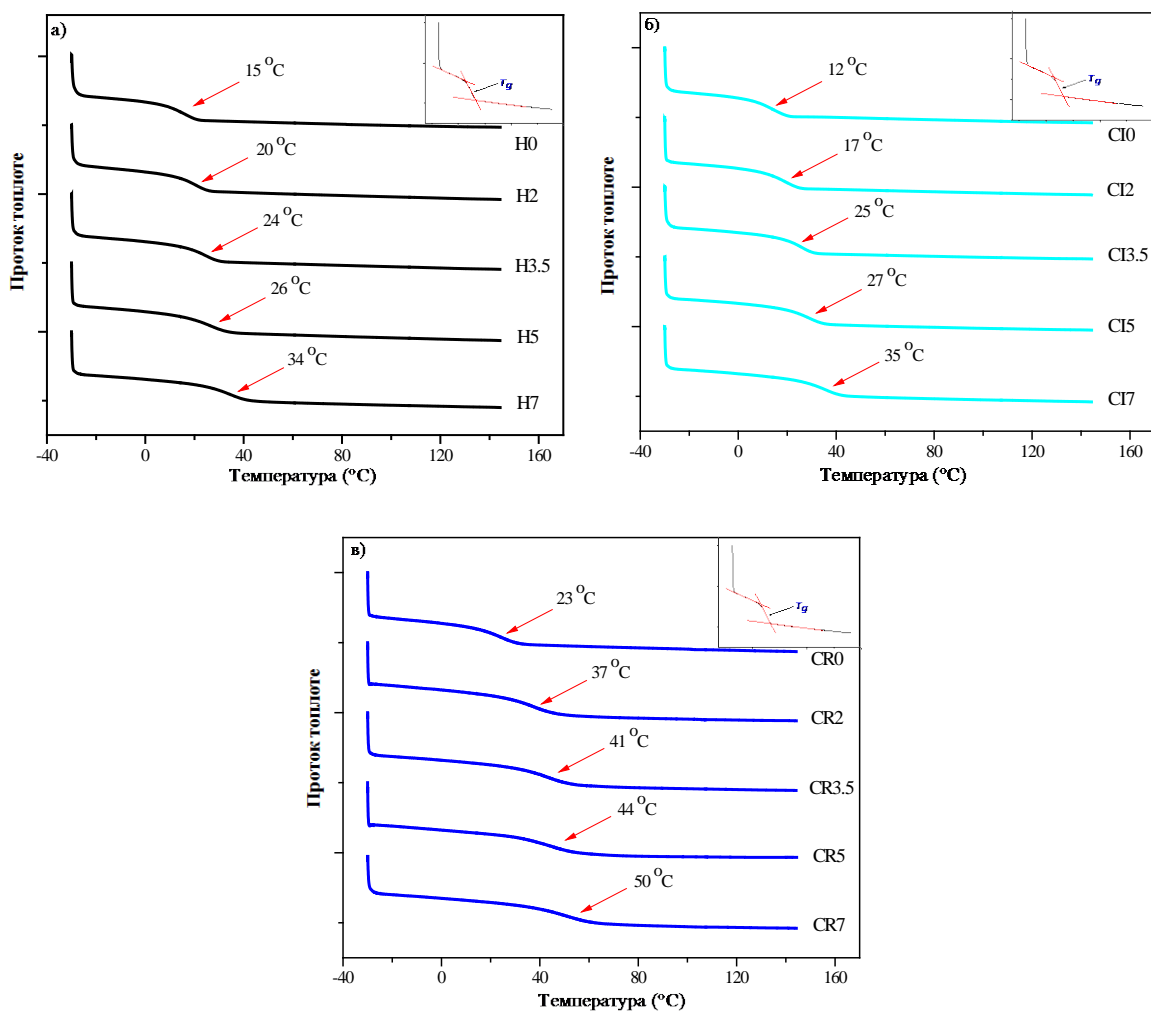
Слика 21. Зависност а) модула сачуване енергије и б) $\tan \delta$ од угаоне фреквенције.

10.2.4. Термичка својства хидрогелова

У циљу испитивања термичких својстава H, CI и CR серије хидрогелова, као и одређивања вредности температуре прелаза у стакласто стање T_g , коришћена је диференцијална скенирајућа калориметрија. Термограми су снимљени у температурном опсегу од -50 до 150 °C. Као што се може уочити са Сликe 22, испитивани хидрогелови су показали једну температуру прелаза, што може бити показатељ успешне кополимеризације 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине. Такође, нису уочени ендотермијски пикови ни на једном термограму, који би указивали на присуство кристалиничних регија у хидрогелу, као последицу нехомогене расподеле и агрегације уграђених бакар(II) јона у CI и редукованог бакара у CR хидрогеловима. Може се приметити да са повећањем садржаја итаконске киселине у хидрогелу долази до померања T_g ка вишим вредностима. Уградња бакар(II) јона утицала је на благо повишење T_g вредности, док CR хидрогелови показују знатно више T_g вредности у поређењу са H хидрогеловима. Мања слободна

запремина CR хидрогелова у односу на Н и CI хидрогелове повезана је са умањеном покретљивошћу полимерних ланаца, што за последицу има више T_g вредности.

Са аспекта термичке анализе, може се рећи да повећање садржаја итаконске киселине, уградња бакар(II) јона и његова редукција имају значајан утицај на термичка својства испитиваних хидрогелова. Показало се да ова три фактора утичу на померање T_g ка вишим вредностима.



Слика 22. Термограми а) Н, б) CI и в) CR хидрогелова.

10.2.5. Бубрење хидрогелова

10.2.5.1. Кинетика бубрења хидрогелова

Кинетички параметри бубрења, кинетичка константа k , дифузиони експонент n и коефицијент дифузије D , одређени су применом једначина (8) и (9) на резултате добијене испитивањем бубрења Н, С1 и СР хидрогелова у фосфатном пуферу рН 7,40, на температури 37 °С. Вредности параметара испитиваних хидрогелова приказане су у Табелама 2, 3 и 4. Анализирањем вредности дифузионог експонента, може се закључити да се транспорт флуида у хидрогеловима Н0 и Н2 одвија према Фиковом закону тј. контролисан је дифузијом ($n < 0,50$). У случају Н3.5, Н5 и Н7 хидрогелова ($n > 0,50$) бубрење је контролисано и дифузијом и релаксацијом полимерних ланаца. Бубрење хидрогелова са уграђеним бакар(II) јонима прати механизам не-Фикове дифузије, контролисан и дифузијом и релаксацијом полимерних ланаца, док се бубрење СР хидрогелова одвија по механизму дифузије.

Други приступ праћења кинетике бубрења јесте примена Шотове једначине другог реда, при чему су одређене вредности карактеристичних параметара, на основу којих се анализира кинетика. R^2 вредности у опсегу 0,9945 - 0,9991, које су приказане у Табелама 2, 3 и 4, указују да бубрење испитиваних хидрогелова прати кинетику другог реда. Такође, вредности константе K , као и q_{exp} су израчунате и приказане у наведеним табелама.

Табела 2. Кинетички параметри хидрогелова Н серије

	Параметри бубрења			Кинетика II реда			
	k (s^{-1})	n	$D \times 10^7$ ($cm^2 s^{-1}$)	K	R^2	q_e	
						q_{calc}	q_{exp}
H0	0,389	0,400	2,379	0,170	0,9984	3,070	2,910
H2	0,351	0,451	1,940	0,074	0,9984	5,670	5,100
H3.5	0,318	0,505	1,597	0,042	0,9979	7,793	6,500
H5	0,317	0,522	1,585	0,034	0,9975	8,906	7,100
H7	0,328	0,521	1,700	0,032	0,9975	9,857	7,700

Табела 3. Кинетички параметри хидрогелова CI серије

	Параметри бубрења			Кинетика II реда			
	k (s^{-1})	n	$D \times 10^7$ ($cm^2 s^{-1}$)	K	R^2	q_e	
						q_{calc}	q_{exp}
CI0	0,274	0,595	1,184	0,072	0,9945	3,698	2,935
CI2	0,276	0,553	1,203	0,038	0,9982	6,867	5,612
CI3.5	0,274	0,575	1,186	0,024	0,9986	10,099	7,814
CI5	0,258	0,602	1,049	0,019	0,9982	11,476	8,497
CI7	0,275	0,591	1,191	0,017	0,9952	13,322	9,646

Табела 4. Кинетички параметри хидрогелова CR серије

	Параметри бубрења			Кинетика II реда			
	k	n	$D \times 10^7$	K	R^2	q_e	
	(s^{-1})		($cm^2 s^{-1}$)			q_{ecalc}	q_{exp}
CR0	0,559	0,297	4,916	0,426	0,9984	2,553	2,375
CR2	5,051	0,085	401,9	0,476	0,9991	3,052	2,853
CR3.5	4,914	0,081	380,5	0,247	0,9987	4,382	4,000
CR5	2,977	0,071	139,7	0,156	0,9980	6,090	5,559
CR7	2,502	0,066	98,70	0,121	0,9965	7,136	6,536

10.2.5.2. Утицај рН вредности на бубрење хидрогелова

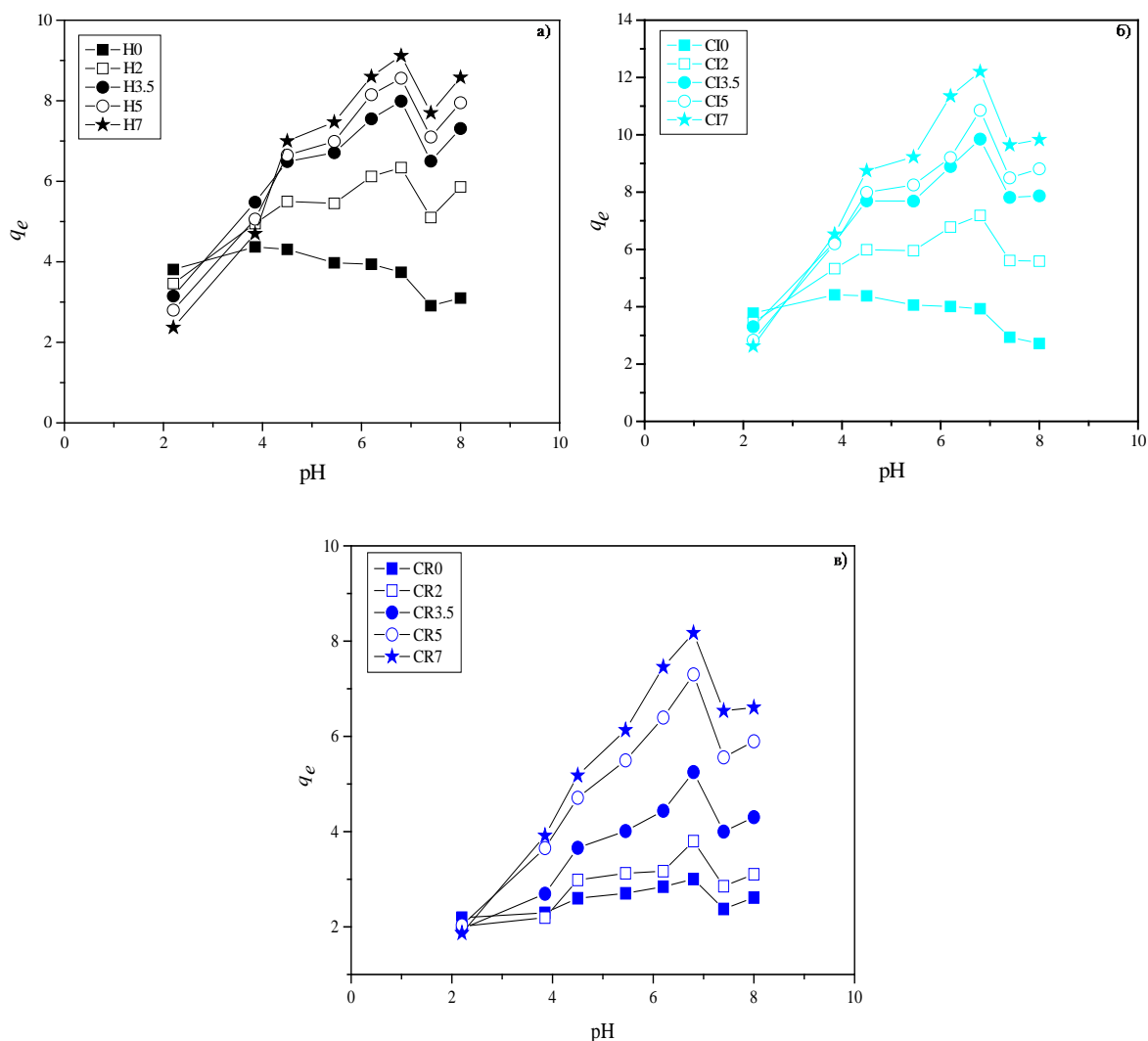
У циљу утврђивања рН осетљивог понашања, бубрење Н, CI и CR хидрогелова је испитивано у ширем опсегу рН (2,20 - 8,00), на температури 37 °C. Добијени резултати приказани су на Слици 23. Као што се може уочити, долази до пораста вредности равнотежног степена бубрења q_e са повећањем садржаја итаконске киселине у хидрогеловима. Тако највише q_e вредности, при испитиваним условима, имају хидрогелови са највећим уделом итаконске киселине (7 mol%), у оквиру серије којој припадају. Дакле, бубрење Н, CI и CR хидрогелова веома зависи од 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 анјонски.

У изражено киселој средини (рН < 3,85) COOH групе итаконске киселине нису јонизоване, што им омогућава формирање водоничних веза са ОН групом 2-хидроксиетил акрилата [179]. Ове водоничне везе додатно умрежавају структуру, па

се као последица јавља смањење способности бубрења хидрогелова. На $pH > 3,85$ почиње јонизација карбоксилних група са $pK_a = 3,85$, као и електростатичко одбијање истоименог негативног наелектрисања полимерних ланаца, које доводи до пораста q_e вредности. Са повећањем pH вредности изнад 5,45, $COOH$ групе са $pK_a = 5,45$ постају јонизоване, што за последицу има даље повећање вредности равнотежног степена бубрења. Највише q_e вредности уочене су при pH 6,80, док повећањем pH до 7,40 долази до њиховог смањења. При $pH > 7,40$ приметан је благи пораст ових вредности. На основу приказаних резултата, варирања вредности равнотежног степена бубрења при промени pH вредности, може се закључити да Н хидрогелови показују pH осетљиво понашање у опсегу испитиваних услова.

Бубрење С1 хидрогелова прати слично pH осетљиво понашање, уз нешто више вредности равнотежног степена бубрења (Слика 23 б)). С друге стране, утицај редукованог бакра у СR хидрогеловима огледа се у смањењу капацитета бубрења ових хидрогелова (Слика 23 в)), што може бити последица значајно гушће морфологије у односу на друге две серије. Иако слабије способности бубрења, СR хидрогелови такође показују pH осетљиво понашање.

Може се закључити да синтетисани хидрогелови 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине, као и они са уграђеним бакар(II) јонима и редукованим бакром показују pH осетљиво понашање при испитиваним условима, што је од великог значаја за биомедицинску примену ових хидрогелова. Увођењем итаконске киселине постиже се израженије pH осетљиво бубрење, док уградња бакар(II) јона, као и њихова редукција нису пореметили ово специфично понашање хидрогелова.



Слика 23. Зависност равнотежног степена бубрења од рН а) Н, б) CI и в) CR хидрогелова.

10.2.5.3. Утицај температуре на бубрење хидрогелова

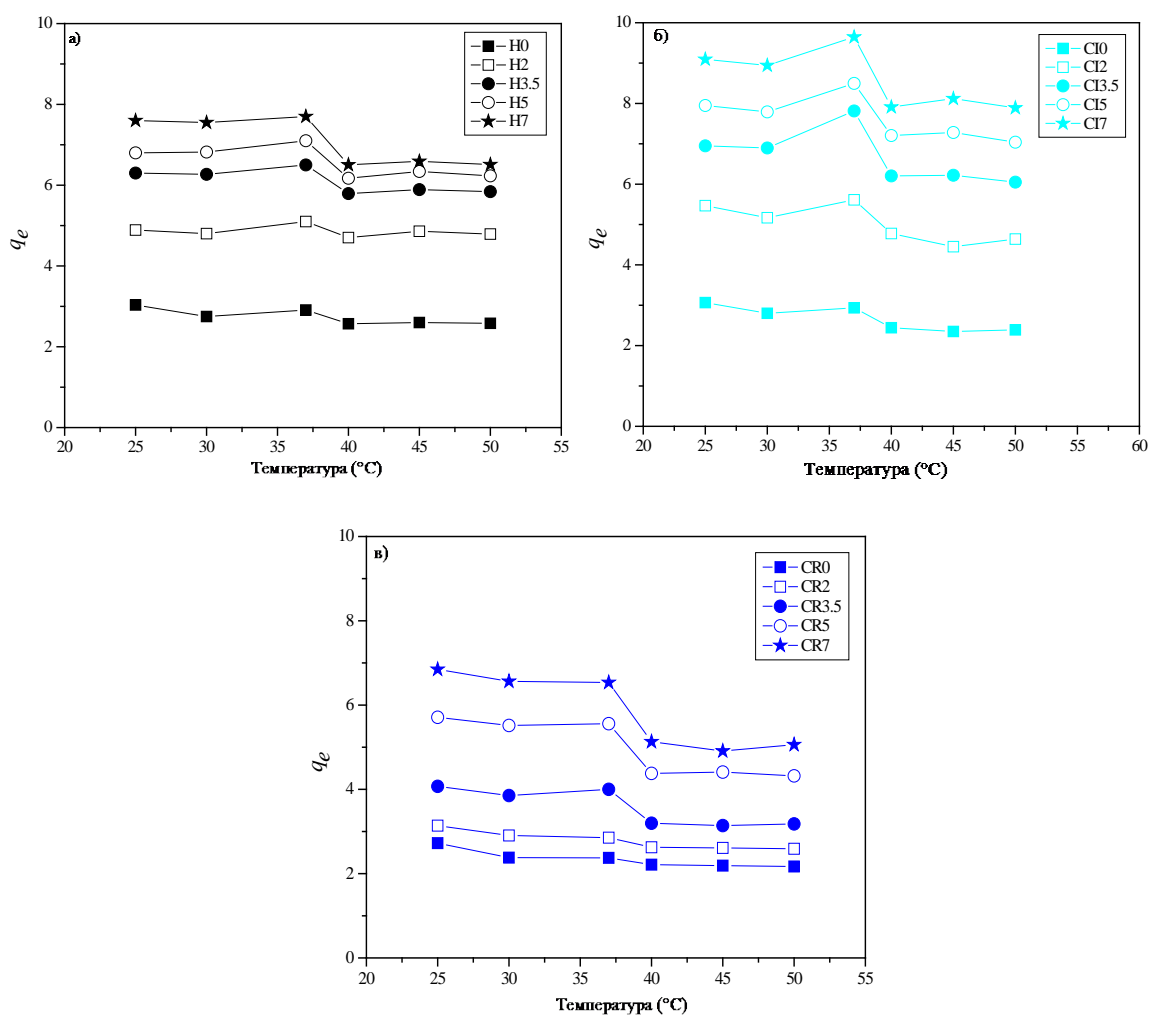
Као што је већ познато, температурно осетљиви хидрогелови представљају значајно напреднију класу хидрогелова у односу на „традиционалне“ хидрогелове, захваљујући појави запреминског фазног прелаза као одговора на промену спољашње температуре. На критичној температури, која се назива температуром

запреминског фазног прелаза, долази до повећања или смањења степена бубрења хидрогелова. Феномен фазног прелаза је веома значајан у контролисаном отпуштању активног агенса уграђеног у хидрогел, јер се применом температурно осетљивих хидрогелова може постићи синхронизација отпуштања са физиолошким условима, као и њиховим променама [60].

Утицај температуре на бубрење Н, СI и СR хидрогелова је испитиван у фосфатном пуферу, константне рН вредности 7,40, у ширем температурном опсегу (25 - 50 °C). Слика 24 представља зависност равнотежног степена бубрења Н, СI и СR хидрогелова од температуре. Као што се може уочити, код све три серије хидрогелова присутан је исти тренд повећања равнотежног степена бубрења са повећањем садржаја итаконске киселине. У оквиру испитиваних серија максималне q_e вредности, на свим температурама, показују управо хидрогелови са 7 mol% итаконске киселине. Н хидрогелови су показали видљив пад q_e вредности у температурном опсегу од 37 до 40 °C, што се може протумачити као запремински фазни прелаз. Испод температуре запреминског фазног прелаза хидрогелови поседују израженију способност бубрења, захваљујући доминантним интеракцијама полимер-вода. Повећање температуре изнад ове вредности доводи до смањења бубрења и скупљања хидрогела, јер интеракције полимер-полимер и вода-вода постају фаворизоване у односу на интеракције полимер-вода. Као што се може приметити, фазни прелаз је израженији код хидрогелова са вишим вредностима равнотежног степена бубрења. Хидрогелови са уграђеним бакар(II) јонима, као и са редукованим бакром прате слично понашање у току бубрења у поређењу са Н хидрогеловима. Као што се показало и у студији испитивања рН осетљивог понашања, СI хидрогелови више бубре, а СR мање у односу на Н хидрогелове.

Све три испитиване серије хидрогелова показују температурно осетљиво понашање, с обзиром на уочене промене вредности равнотежног степена бубрења у физиолошки битном температурном опсегу. Повећање садржаја итаконске киселине у хидрогелу утиче не само на повећање q_e вредности, већ и на израженији фазни прелаз. Уграђивањем бакар(II) јона, као и њиховом редукијом, задржава се температурно осетљиво понашање хидрогелова. Запремински фазни прелаз

испитиваних хидрогелова уочен је у температурном интервалу 37 - 40 °С, који је физиолошки значајан у области третмана рана и регенерације меког ткива. Нормална температура људске коже налази се у опсегу 32 - 35 °С, зависно од спољашњих услова и општег стања организма. Настанак ране на кожи прате одређени запаљенски процеси и инфекције које утичу на пораст температуре коже у регији ране за неколико степени у односу на температуру здраве коже. „Паметно“ понашање испитиваних хидрогелова у наведеном температурном опсегу пружа могућност прилагођавања процеса контролисаног отпуштања бакар(II) јона, као и редукованог бакра, физиолошким променама, а самим тим и контролу тока зарастања ране.



Слика 24. Зависност q_e од температуре а) H, б) CI и в) CR хидрогелова.

10.2.5.4. Параметри мреже

Најважнији параметри који описују структуру мреже хидрогела су средња моларна маса између две суседне тачке умрежења (M_c), запремински удео полимера у набубрелом стању ($\phi_{2,s}$) и величина пора (ζ). На основу резултата добијених испитивањем бубрења Н, С1 и СR хидрогелова у фосфатном пуферу рН 7,40, на температури 37 °С, израчунати су параметри мреже и представљени у Табелама 5, 6 и 7.

На основу приказаних вредности параметара мреже Н хидрогелова може се приметити утицај састава испитиваних хидрогелова. Са повећањем садржаја итаконске киселине запремински удео полимера у набубрелом стању се смањује, док вредности величине пора и средње моларне масе између две суседне тачке умрежења расту сразмерно са повећањем удела итаконске киселине у хидрогеловима.

Утицај садржаја итаконске киселине на параметре мреже хидрогела потврђен је и код хидрогелова С1 и СR серије (Табела 6 и 7). Вредност величине пора хидрогела указује на способност бубрења, па тако С1 хидрогелови који више бубре од Н хидрогелова имају веће ζ вредности, док су за СR хидрогелове ове вредности ниже.

Табела 5. Параметри мреже Н хидрогелова

Хидрогел	M_c (g mol ⁻¹)	v_e (mol dm ⁻³)	ζ (nm)
Н0	1916	0,610	3,663
Н2	8291	0,119	8,826
Н3.5	16869	0,058	13,47
Н5	21657	0,045	15,65
Н7	27006	0,036	17,87

Табела 6. Параметри мреже CI хидрогелова

Хидрогел	M_c (g mol ⁻¹)	v_e (mol dm ⁻³)	ζ (nm)
CI0	1954	0,610	3,706
CI2	10982	0,119	9,066
CI3.5	28658	0,058	14,22
CI5	36195	0,046	16,50
CI7	50875	0,036	19,12

Табела 7. Параметри мреже CR хидрогелова

Хидрогел	M_c (g mol ⁻¹)	v_e (mol dm ⁻³)	ζ (nm)
CR0	1084	0,610	2,623
CR2	1522	0,119	3,244
CR3.5	4039	0,058	5,760
CR5	10597	0,045	10,20
CR7	16843	0,036	13,46

11. Хидрогелови 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине као системи за контролисано отпуштање бакар(II) јона и редукованог бакра

11.1. Ефикасност уградње бакар(II) јона

Ефикасност уградње ЕЕ (%) бакар(II) јона у синтетисане хидрогелове на бази 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине израчуната је коришћењем једначине (12). Добијене вредности су приказане у Табели 8. Као што се може приметити, најмања количина бакар(II) јона уграђена је у хомополимерни хидрогел, док је

највећа количина уграђена у хидрогел са највећим садржајем итаконске киселине. Може се закључити да састав хидрогела има велики утицај на количину уграђеног активног агенса, тачније, са повећањем садржаја итаконске киселине у хидрогелу, повећава се ефикасност уградње бакар(II) јона.

Табела 8. Ефикасност уградње бакар(II) јона

ИК (mol%)	ЕЕ (%)
0,0	10,21
2,0	64,10
3,5	65,32
5,0	67,90
7,0	78,13

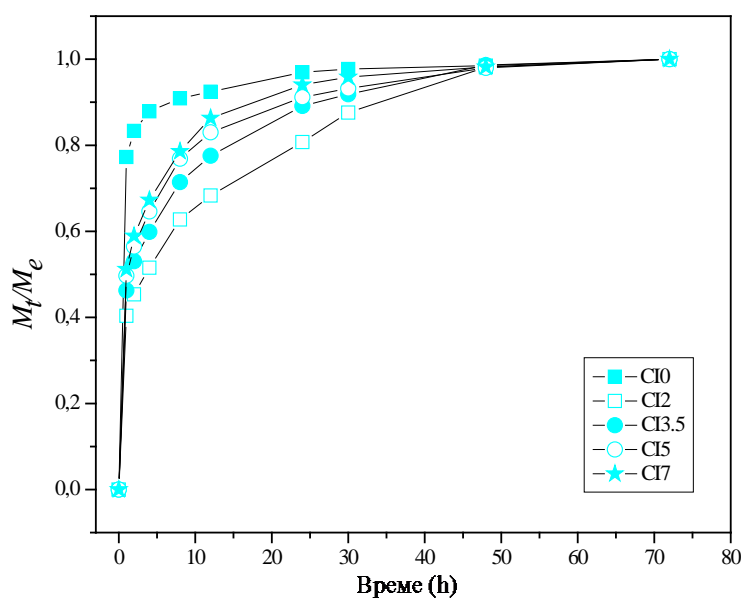
11.2. Контролисано отпуштање бакар(II) јона и редукованог бакра

Студије контролисаног отпуштања бакар(II) јона, као и редукованог бакра из хидрогелова 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине изведене су у симулираним физиолошким условима, у фосфатном пуферу рН 7,40, на температури 37 °С. Профили отпуштања приказани на Сликама 25 и 26 прате промену концентрације бакар(II) јона и редукованог бакра у медијуму за отпуштање у току 72 h.

Отпуштање бакар(II) јона. Контролисано отпуштање бакар(II) јона може се посматрати кроз две фазе (Слика 25). Прву фазу одликује почетно брзо отпуштање, које може бити последица површински везаних бакар(II) јона. Одмах након 1 h отпуштања, примећен је нагли пораст количине отпуштених бакар(II) јона. У току првих 12 h отпуштено је 92,42 (CI0), 68,32 (CI2), 77,55 (CI3.5), 82,99 (CI5) и 86,31 % (CI7) од укупне количине отпуштених бакар(II) јона из CI хидрогелова. Другу фазу

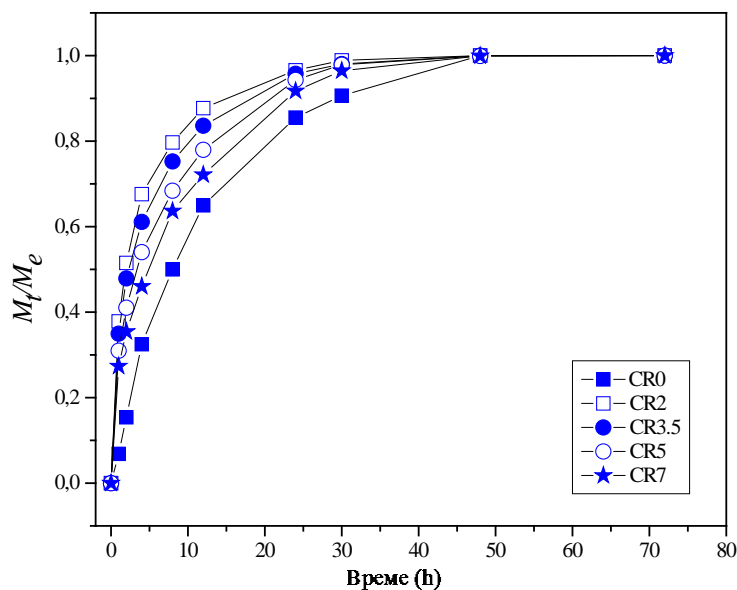
карактерише значајно спорије отпуштање, које је уочено после 12 h. За овај временски период везују се и највеће количине отпуштених бакар(II) јона из испитиваних хидрогелова. После 48 h отпуштање се успорава и концентрације отпуштених јона достижу плато, при чему остају константне до краја експеримента.

За хомополимерни C10 хидрогел карактеристично је веома брзо отпуштање, док су у случају кополимерних C12, C13.5, C15 и C17 хидрогелова брзине отпуштања спорије. На основу ових резултата може се закључити да брзина отпуштања зависи од састава хидрогела тј. садржаја итаконске киселине у њему. Са повећањем удела итаконске киселине, повећава се количина отпуштених бакар(II) јона. Увођењем ове дикарбоксилне киселине повећава се број карбоксилних група у хидрогелу, које у јонизованом стању привлаче позитивно наелектрисане јоне бабра. На тај начин обезбеђује се уградња бакар(II) јона унутар хидрогела, чиме се постиже и њихово спорије отпуштање у односу на случај наглог отпуштања површински везаних бакар(II) јона. Такође, са порастом броја карбоксилних група у хидрогелу, повећава се и количина уграђених бакар(II) јона, односно ефикасност уградње приказана у Табели 8, што се може довести у везу са добијеним трендом отпуштања из кополимерних хидрогелова.



Слика 25. Профили отпуштања бакар(II) јона из C1 хидрогелова.

Отпуштање редукованог бабра. У поређењу са резултатима добијеним испитивањем контролисаног отпуштања бакар(II) јона из CI хидрогелова, може се рећи да отпуштање редукованог бабра прати слично понашање (Слика 26), уз нешто спорије брзине отпуштања. Након 12 h отпуштено је 64,98 (CR0), 87,71 (CR2), 83,60 (CR3.5), 77,97 (CR5), 72,14 % (CR7) од укупне количине отпуштеног бабра. Најмању количину бабра отпустио је хомополимерни CR0 хидрогел. Кополимерни CR2, CR3.5, CR5 и CR7 хидрогелови показали су брже отпуштање у односу на CR0, али обрнутим редоследом у поређењу са CI хидрогеловима. Овакав тренд може бити тумачен као последица морфолошких промена услед третмана редукционим средством у циљу редукције бакар(II) јона, што је и потврђено скенирајућом електронском микроскопијом.



Слика 26. Профили отпуштања редукованог бабра из CR хидрогелова.

На основу приказаних резултата може се закључити да хидрогелови 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине поседују велики потенцијал као системи за контролисано отпуштање, поготово што се варирањем њиховог састава може извршити оптимизација профила отпуштања у складу са жељеном применом.

Варирањем удела само једне компоненте, у овом случају итаконске киселине, могу се постићи жељене брзине отпуштања као и отпуштене количине, па се на једноставан начин могу избећи могући токсични ефекти проузроковани отпуштањем већих концентрација активног агенса.

11.3. Механизам транспорта бакар(II) јона и редукованог бакра

У циљу анализе механизма транспорта бакар(II) јона и редукованог бакра у току контролисаног отпуштања из испитиваних хидрогелова коришћена су три модела: Ритгер-Пепас, Пепас-Салин и Пепас-Салин ($m = 0,50$). Ови модели су примењени на експерименталне податке добијене испитивањем контролисаног отпуштања бакар(II) јона и редукованог бакра.

Вредности карактеристичних параметара примењених модела приказане су у Табелама 9 и 10. Наведени модели нису били применљиви у случају C10 хидрогела због брзог иницијалног отпуштања бакар(II) јона и $M_t/M_e > 0,60$. Одређене су и AIC и SSR вредности, као показатељи прикладности коришћеног модела за анализу механизма транспорта. Као што је већ поменуто, најниже AIC вредности указују на модел који најбоље описује механизам. Добијени резултати указују на погодност сва три примењена модела за анализу отпуштања бакар(II) јона и редукованог бакра из испитиваних хидрогелова, при чему се може издвојити Пепас-Салин-ов модел са најнижим AIC вредностима. Додатно, R^2 вредности потврдиле су применљивост модела за анализу експерименталних података. На основу нижих вредности кинетичке константе релаксације полимерних ланаца K_2 у поређењу са дифузионом кинетичком константом K_1 , може се рећи да Фикова дифузија има доминантан утицај на механизам транспорта бакар(II) јона у току отпуштања из C1 хидрогелова. С друге стране, механизам транспорта бакра током отпуштања из CR хидрогелова контролисана је и релаксацијом полимерних ланаца и дифузијом.

Табела 9. Параметри модела примењених за анализу механизма транспорта бакар(II) јона у току контролисаног отпуштања из CI хидрогелова

Модели	Параметри	Хидрогелови				
		CI0	CI2	CI3.5	CI5	CI7
Ритгер-Пепас	k_{RP}	-	0,162	0,194	0,205	0,220
	n	-	0,216	0,209	0,212	0,206
	R^2	-	0,9973	0,9989	0,9991	0,9998
	$SSR \times 10^4$	-	4,673	2,474	2,285	0,490
	AIC	-	-32,342	-35,522	-35,919	-43,620
Пепас-Салин	K_1	-	0,143	0,170	0,180	0,192
	K_2	-	0,031	0,037	0,039	0,042
	m	-	0,163	0,157	0,160	0,155
	R^2	-	0,9964	0,9986	0,9989	0,9998
	$SSR \times 10^4$	-	4,120	2,114	1,835	0,341
	AIC	-	-32,972	-36,310	-37,015	-45,427
Пепас-Салин $m = 0,50$	K_1	-	0,056	0,066	0,070	0,074
	K_2	-	-0,0013	-0,0015	-0,0016	-0,0018
	R^2	-	0,9740	0,9788	0,9798	0,9832
	SSR	-	0,0044	0,0048	0,0053	0,0046
	AIC	-	-21,074	-20,727	-20,229	-20,854

Табела 10. Параметри модела примењених за анализу механизма транспорта редукованог бабра у току контролисаног отпуштања из CR хидрогелова

Модел	Параметри	Хидрогелови				
		CR0	CR2	CR3.5	CR5	CR7
Ритгер-Пепас	k_{RP}	0,005	0,070	0,071	0,068	0,049
	n	0,757	0,414	0,393	0,375	0,415
	R^2	0,9885	0,9997	0,9987	0,9993	0,9985
	$SSR \times 10^4$	0,003	0,556	1,743	1,443	2,542
	AIC	-30,875	-35,189	-30,620	-40,216	-37,387
Пепас-Салин	K_1	-0,312	-0,841	-8,479	-0,517	0,0558
	K_2	0,171	0,757	8,163	0,481	0,005
	m	0,170	0,092	0,018	0,099	0,311
	R^2	0,9978	0,9999	0,9999	0,9999	0,9987
	$SSR \times 10^4$	0,0011	0,0001	0,0012	0,005	1,480
	AIC	-34,713	-85,267	-64,851	-54,878	-38,092
Пепас-Салин $m = 0,50$	K_1	0,0094	0,0544	0,0519	0,0441	0,0359
	$K_2 \times 10^4$	5,782	-6,944	-7,994	-5,903	-3,257
	R^2	0,9842	0,9999	0,9996	0,9999	0,9965
	$SSR \times 10^4$	0,0041	0,078	0,586	0,194	0,583
	AIC	-28,937	-43,065	-34,978	-50,261	-33,236

12. Хидрогелови 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине као системи за контролисано отпуштање других терапеутски активних јона метала и њихових редукованих облика

У циљу утврђивања погодности синтетисаних хидрогелова на бази 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине као носача за уградњу и контролисано отпуштање других терапеутски активних јона метала, као и њихових редукованих облика, који поседују значајан потенцијал за примену у третману рана и регенерацији меког ткива, изведене су студије контролисаног отпуштања цинк(II) јона и сребро(I) јона и њихових редукованих облика.

12.1. Цинк

12.1.1. Ефикасност уградње цинк(II) јона

Коришћењем једначине (12) израчуната је ефикасност уградње цинк(II) јона, чије вредности су приказане у Табели 11. Као и у случају уградње бакар(II) јона у синтетисане хидрогелове, најмање количине цинк(II) јона уграђене су у хомополимерне, док су највећу ефикасност уградње показали хидрогелови са највећим садржајем итаконске киселине. Ови резултати потврђују утицај састава хидрогелова на уградњу активног агенса, тачније, са повећањем садржаја итаконске киселине у хидрогелу, повећава се ефикасност уградње цинк(II) јона.

Табела 11. Ефикасност уградње цинк(II) јона

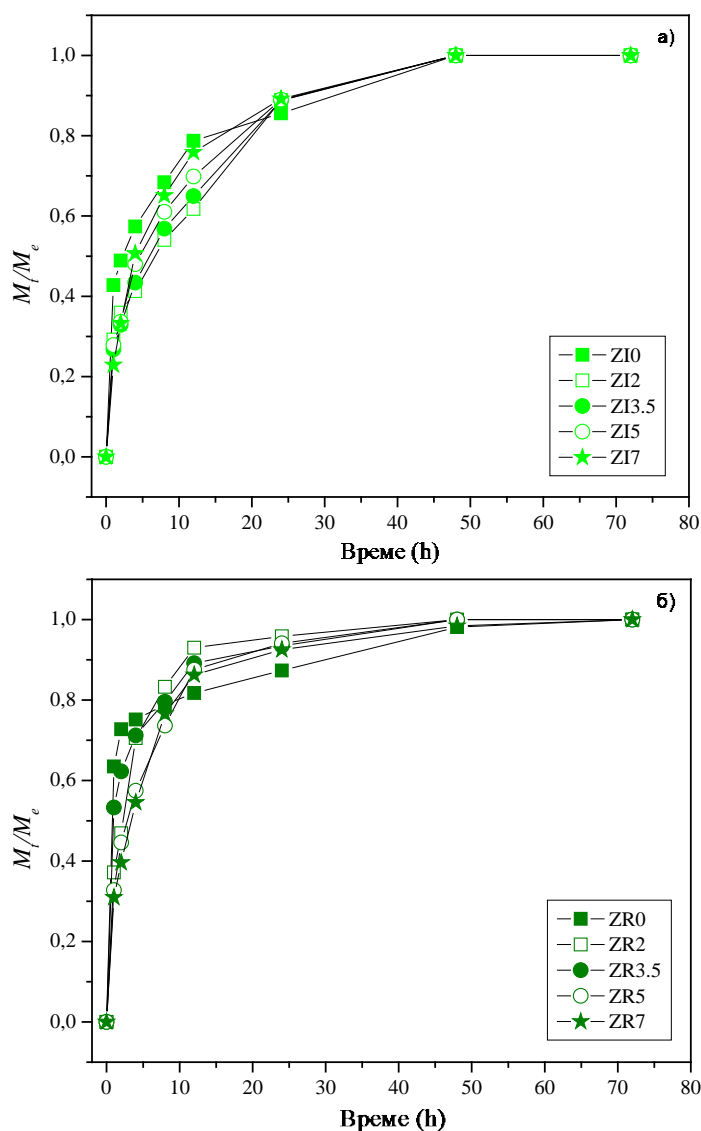
ИК (mol%)	ЕЕ (%)
0,0	18,46
2,0	69,23
3,5	73,85
5,0	76,92
7,0	83,08

12.1.2. Контролисано отпуштање цинк(II) јона и редукованог цинка

Студије контролисаног отпуштања цинк(II) јона и редукованог цинка из хидрогелова 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине изведене су у симулираним физиолошким условима, у фосфатном пуферу рН 7,40, на 37 °С. На основу добијених концентрација отпуштених цинк(II) јона и редукованог цинка из испитиваних хидрогелова у току 72 h формиран су профили отпуштања приказани на Слици 27.

Отпуштање цинк(II) јона. Резултати испитивања контролисаног отпуштања цинк(II) јона из ZI хидрогелова, приказани на Слици 27 а), указују да се промена концентрације ових јона у медијуму за отпуштање одвијала кроз две фазе. Брзо почетно отпуштање у току првих 12 h карактерише прву фазу, при чему је отпуштено 78,73 (ZI0), 61,77 (ZI2), 64,97 (ZI3.5), 69,86 (ZI5), 75,87 % (ZI7) од укупне количине отпуштених цинк(II) јона из ZI хидрогелова. Након 12 h започиње друга фаза, у току које је примећено спорије отпуштање у односу на почетну фазу. У овом периоду отпуштене су највеће количине цинк(II) јона из испитиваних хидрогелова, које после 48 h улазе у плато и остају непромењене до краја експеримента.

На основу добијених резултата уочљив је утицај састава хидрогелова на брзину отпуштања цинк(II) јона. Хидрогелови са итаконском киселином отпуштају цинк(II) јоне спорије у односу на хомополимерни ZI0 хидрогел. Такође, различит садржај итаконске киселине у кополимерним хидрогеловима утиче на брзину отпуштања, па се може приметити да са повећањем удела итаконске киселине долази до пораста брзине отпуштања, а самим тим и количине отпуштених цинк(II) јона.



Слика 27. Профили отпуштања а) цинк(II) јона из ZI хидрогелова и б) редукованог цинка из ZR хидрогелова.

Отпуштање редукованог цинка. Као што се може приметити са Сlike 27 б), отпуштање редукованог цинка из ZR хидрогелова се такође одвија у две фазе, као и у претходном случају. Временски оквир који подразумева првих 12 h експеримента чини прву фазу коју одликује брзо отпуштање. После 12 h отпуштено је 81,74 (ZR0), 93,02 (ZR2), 89,14 (ZR3.5), 87,55 (ZR5), 86,26 % (ZR7) од укупне количине

отпуштеног цинка из ZR хидрогелова. Следи друга фаза са значајно споријим отпуштањем и достизањем константних вредности отпуштених количина цинка из испитиваних хидрогелова, које је уочено након 48 h.

Утицај састава хидрогелова присутан је и код отпуштања цинка из ZR хидрогелова. Присуство као и различит садржај итаконске киселине одражава се на брзину отпуштања. За разлику од отпуштања цинк(II) јона из ZI хидрогелова, овај случај карактерише обрнути тренд, тј. спорије отпуштање цинка из хомополимерног ZR0 у односу на кополимерне хидрогелове. Такође, пораст садржаја итаконске киселине у кополимерним хидрогеловима доводи до споријег отпуштања. Овакво понашање може бити последица морфолошких промена услед третмана редукционим средством, што је уочено и у случају отпуштања бакра из CR хидрогелова.

12.1.3. Механизам транспорта цинк(II) јона и редукованог цинка

Механизам транспорта цинк(II) јона и редукованог цинка у току контролисаног отпуштања из ZI и ZR хидрогелова анализиран је коришћењем три модела: Ритгер-Пепас, Пепас-Салин и Пепас-Салин ($m = 0,50$). Ови модели су примењени на експерименталне податке добијене испитивањем контролисаног отпуштања цинк(II) јона и редукованог цинка.

Табеле 12 и 13 приказују вредности карактеристичних параметара сваког примењеног модела, које су добијене њиховом применом на експерименталне податке. У Табели 13 изостале су вредности параметара за ZR0 хидрогел, јер наведени модели нису могли бити примењени у овом случају због брзог иницијалног отпуштања и $M_t/M_e > 0,60$. Као главни показатељи погодности коришћених модела за анализу механизма транспорта цинк(II) јона и редукованог цинка, одређене су AIC и SSR вредности. Добијене су ниске и приближне AIC вредности ових модела, што указује на њихову применљивост за анализу контролисаног отпуштања цинк(II) јона и редукованог цинка из испитиваних хидрогелова. R^2 вредности потврдиле су прикладност примене ових модела на експерименталне податке. На основу вредности

дифузионе кинетичке константе K_1 и кинетичке константе релаксације полимерних ланаца K_2 , може се рећи да је транспорт цинк(II) јона и редукованог цинка у току отпуштања контролисан и Фиковом дифузијом и релаксацијом полимерних ланаца.

Табела 12. Параметри модела примењених за анализу механизма транспорта цинк(II) јона у току контролисаног отпуштања из ZI хидрогелова

Модели	Параметри	Хидрогелови				
		ZI0	ZI2	ZI3.5	ZI5	ZI7
Ритгер-Пепас	k_{RP}	0,164	0,080	0,058	0,057	0,033
	n	0,230	0,308	0,369	0,381	0,484
	R^2	0,9994	0,9963	0,9993	0,9970	0,9924
	$SSR \times 10^4$	1,216	6,864	1,579	7,585	14,200
	AIC	-41,072	-39,705	-48,520	-39,105	-28,771
Пепас-Салин	K_1	0,147	0,081	0,034	-0,139	-1,481
	K_2	0,030	0,011	0,032	0,160	1,238
	m	0,172	0,231	0,210	0,144	0,070
	R^2	0,9994	0,9960	0,9991	0,9963	0,9959
	$SSR \times 10^4$	0,877	5,669	1,513	7,034	5,136
	AIC	-40,708	-38,852	-46,776	-37,557	-31,870
Пепас-Салин $m = 0,50$	K_1	0,060	0,038	0,035	0,037	0,032
	$K_2 \times 10^4$	-13,600	-5,679	-4,080	-4,060	-1,002
	R^2	0,9841	0,9841	0,9972	0,9972	0,9931
	$SSR \times 10^4$	32,600	29,900	5,951	6,955	13,000
	AIC	-24,629	-30,881	-40,560	-39,625	-29,208

Табела 13. Параметри модела примењених за анализу механизма транспорта редукованог цинка у току контролисаног отпуштања из ZR хидрогелова

Модели	Параметри	Хидрогелови				
		ZR0	ZR2	ZR3.5	ZR5	ZR7
Ритгер-Пепас	k_{RP}	-	0,072	0,313	0,065	0,054
	n	-	0,394	0,135	0,398	0,419
	R^2	-	0,9988	0,9957	0,9990	0,9987
	$SSR \times 10^4$	-	1,746	8,048	0,919	1,358
	AIC	-	-30,611	-24,500	-33,180	-31,617
Пепас-Салин	K_1	-	0,077	0,114	-2,598	0,060
	K_2	-	0,009	-0,005	2,404	0,007
	m	-	0,295	0,458	0,043	0,313
	R^2	-	0,9982	1,0000	1,0000	0,9981
	$SSR \times 10^4$	-	1,310	$2,465 \times 10^{-28}$	$1,541 \times 10^{-28}$	0,994
	AIC	-	-29,762	-285,122	-287,002	-30,865
Пепас-Салин $m = 0,50$	K_1	-	0,052	0,095	0,048	0,042
	$K_2 \times 10^4$	-	-7,502	-34,300	-7,125	-4,825
	R^2	-	0,9976	0,9998	0,9998	0,9979
	$SSR \times 10^4$	-	3,451	0,440	0,218	2,241
	AIC	-	-27,887	-36,127	-38,937	-29,613

12.2. Сребро

12.2.1. Ефикасност уградње сребро(I) јона

Коришћењем једначине (12) израчуната је ефикасност уградње сребро(I) јона чије вредности су приказане у Табели 14. Најниже количине сребро(I) јона уграђене су у хомополимерне хидрогелове, док су највећу ефикасност уградње показали хидрогелови са највећим садржајем итаконске киселине. Из добијених резултата може се закључити да састав хидрогелова има утицаја на уградњу, јер се са повећањем садржаја итаконске киселине у хидрогелу, повећава ефикасност уградње сребро(I) јона.

Табела 14. Ефикасност уградње сребро(I) јона

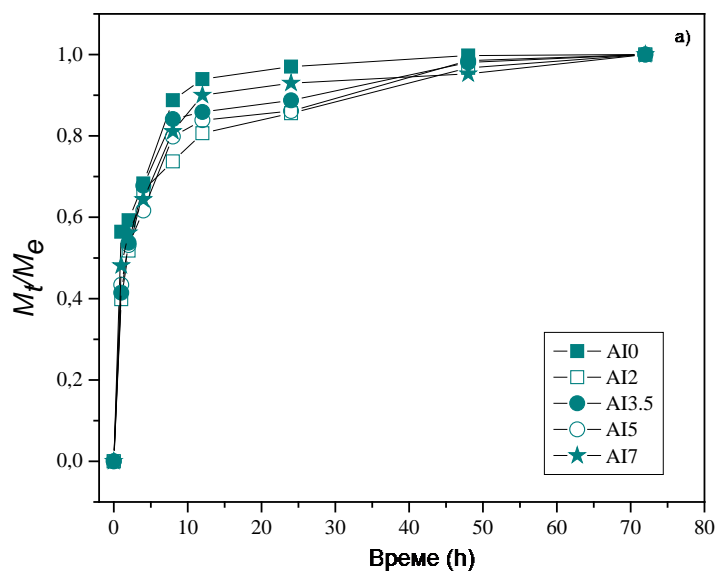
ИК (mol%)	ЕЕ (%)
0,0	12,31
2,0	63,02
3,5	66,96
5,0	69,27
7,0	79,55

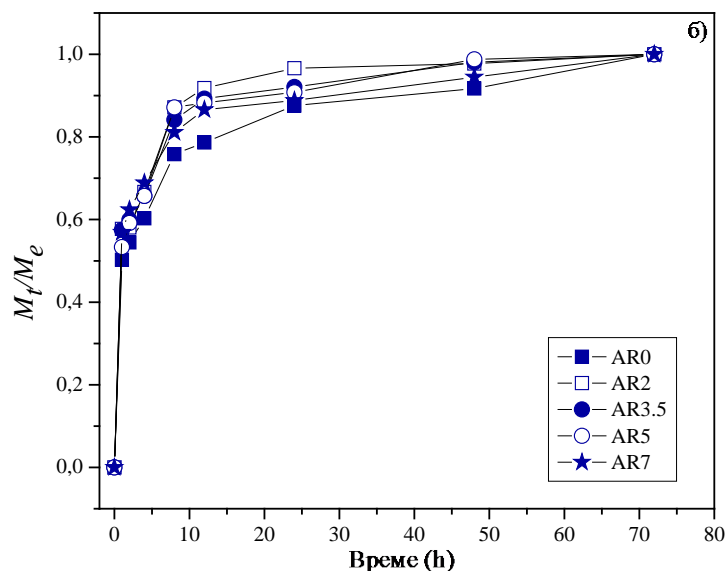
12.2.2. Контролисано отпуштање сребра(I) јона и редукованог сребра

Студије контролисаног отпуштања сребро(I) јона и редукованог сребра из хидрогелова 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине изведене су у симулираним физиолошким условима, у фосфатном пуферу рН 7,40, на 37 °С. На основу измерених концентрација отпуштених сребро(I) јона и редукованог сребра из испитиваних хидрогелова формирани су профили отпуштања приказани на Слици 28.

Отпуштање сребро(I) јона. Контролисано отпуштање сребро(I) јона из AI хидрогелова одвијало се кроз две фазе (Слика 28 а)), што је установљено и код отпуштања бакар(II) јона и цинк(II) јона. Иницијална фаза укључује временски период од првих 12 h, где је примећено брзо отпуштање јона сребра из испитиваних хидрогелова. Након 12 h из хидрогелова отпуштено је 93,98 (AI0), 80,64 (AI2), 85,89 (AI3.5), 83,85 (AI5), 90,00 % (AI7) од укупне количине отпуштених сребро(I) јона из AI хидрогелова. Друга фаза коју карактерише значајно спорије отпуштање, започиње после првих 12 h, у којој су измерене и највеће количине отпуштених јона сребра из испитиваних хидрогелова. После 48 h отпуштање се успорава, концентрације отпуштених јона достижу плато и остају константне до краја експеримента.

Утицај састава хидрогелова и у овој студији испитивања контролисаног отпуштања долази до изражаја кроз утицај садржаја итаконске киселине. За хомополимерни AI0 хидрогел карактеристично је спорије отпуштање јона сребра у поређењу са кополимерним хидрогеловима. Узимајући у обзир кополимерне хидрогелове, може се приметити пораст брзине отпуштања са порастом удела итаконске киселине. Овакав тренд је уочен код отпуштања бакар(II) јона из CI и цинк(II) јона из ZI хидрогелова, што несумњиво указује на учешће карбоксилних група итаконске киселине на уградњу и отпуштање ових јона.





Слика 28. Профили отпуштања а) сребро(I) јона из AI хидрогелова и б) редукованог сребра из AR хидрогелова.

Отпуштање редукованог сребра. На основу резултата приказаних на Слици 28 б) може се уочити сличност у поређењу са резултатима добијеним испитивањем контролисаног отпуштања јона сребра из AI хидрогелова. У иницијалној фази долази до брзог отпуштања сребра, па је тако након 12 h отпуштено 78,65 (AR0), 91,82 (AR2), 89,25 (AR3.5), 88,27 (AR5), 86,58 % (AR7) од укупне количине отпуштеног сребра из AR хидрогелова. Фаза споријег отпуштања сребра се наставља на почетну и карактерише је достизање константних вредности концентрације отпуштеног сребра које остају непромењене до краја експеримента.

Поред утицаја присуства и садржаја итаконске киселине у AR хидрогеловима на контролисано отпуштање сребра, још једном је потврђен и утицај редуccionог средства. Хемијском редуccionом коришћењем NaBH_4 дошло је до извесних морфолошких промена које су у директној спреси са начином отпуштања уграђених метала. Варирањем садржаја итаконске киселине у испитиваним хидрогеловима постижу се различите брзине отпуштања сребра, међутим у поређењу са резултатима добијеним за AI хидрогелове, тренд је обрнут, што управо може бити последица третмана редуccionим средством.

12.2.3. Механизам транспорта сребра(I) јона и редукованог сребра

Механизам транспорта сребро(I) јона и редукованог сребра у току контролисаног отпуштања из хидрогелова 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине анализиран је коришћењем следећих модела: Ритгер-Пепас, Пепас-Салин и Пепас-Салин ($m = 0,50$). Ови модели су примењени на експерименталне податке добијене испитивањем контролисаног отпуштања сребро(I) јона и редукованог сребра.

Вредности карактеристичних параметара примењених модела, које су добијене њиховом применом на експерименталне податке, приказане су у Табелама 15 и 16. Применљивост сва три наведена модела на резултате добијене испитивањем контролисаног отпуштања сребро(I) јона и редукованог сребра из AI и AR хидрогелова, потврђена је добијеним AIC и SSR вредностима. Израчунате AIC вредности, које су ниске и приближне, показују да су ови модели изузетно погодни за анализу транспорта сребро(I) јона и редукованог сребра у току контролисаног отпуштања. R^2 вредности додатно су потврдиле прикладност примењених модела на експерименталне податке. Вредности дифузионе кинетичке константе K_1 и кинетичке константе релаксације полимерних ланаца K_2 указују на доминантнији утицај дифузије на отпуштање сребра из AR хидрогелова, док је у случају отпуштања сребро(I) јона из AI хидрогелова укључена и релаксација ланаца.

Табела 15. Параметри модела примењених за анализу механизма транспорта сребро(I) јона у току контролисаног отпуштања из АI хидрогелова

Модел	Параметри	Хидрогелови				
		AI0	AI2	AI3.5	AI5	AI7
Ритгер-Пепас	k_{RP}	0,310	0,088	0,099	0,159	0,205
	n	0,142	0,370	0,351	0,249	0,209
	R^2	0,9972	0,9999	0,9998	0,9991	0,9999
	$SSR \times 10^4$	5,313	0,0494	0,372	1,354	0,181
	AIC	-26,160	-44,873	-36,792	-31,629	-39,687
Пепас-Салин	K_1	0,244	-0,186	-1,115	-85,718	0,041
	K_2	0,073	0,235	1,063	85,621	$-6,559 \times 10^{-4}$
	m	0,107	0,138	0,071	0,001	0,646
	R^2	0,9946	1,0000	1,0000	0,9996	1,0000
	$SSR \times 10^4$	5,175	$3,081 \times 10^{-29}$	$6,471 \times 10^{-28}$	0,285	0,206
	AIC	-24,266	-293,440	-281,261	-35,856	-37,168
Пепас-Салин $m = 0,50$	K_1	0,093	0,059	0,063	0,071	0,080
	$K_2 \times 10^4$	-32,300	-10,400	-12,400	-20,400	-24,900
	R^2	0,9836	0,9998	0,9999	0,9997	0,9978
	$SSR \times 10^4$	31,800	0,289	0,103	0,401	3,624
	AIC	-19,009	-37,809	-41,931	-36,498	-27,691

Табела 16. Параметри модела примењених за анализу механизма транспорта редукованог сребра у току контролисаног отпуштања из AR хидрогелова

Модели	Параметри	Хидрогелови				
		AR0	AR2	AR3.5	AR5	AR7
Ритгер-Пелас	k_{RP}	0,291	0,361	0,381	0,287	0,322
	n	0,132	0,108	0,098	0,151	0,138
	R^2	0,9999	0,9945	0,9992	1,0000	1,0000
	$SSR \times 10^4$	0,211	10,300	1,575	0,008 x 10 ⁻⁴	0,045
	AIC	-39,057	-23,502	-31,025	-61,429	-45,244
Пелас-Салин	K_1	0,227	0,274	0,286	0,263	0,253
	K_2	0,070	0,093	0,099	0,032	0,077
	m	0,099	0,082	0,074	0,127	0,104
	R^2	0,9997	0,9892	0,9984	1,0000	1,0000
	$SSR \times 10^4$	0,190	10,200	1,539	1,643	0,0334
	AIC	-37,475	-21,546	-29,117	-28,854	-44,432
Пелас-Салин $m = 0,50$	K_1	0,085	0,096	0,098	0,090	0,097
	$K_2 \times 10^4$	-30,400	-34,700	-36,600	-31,400	-34,200
	R^2	0,9916	0,9743	0,9856	0,9944	0,9931
	$SSR \times 10^4$	13,100	48,300	27,200	10,200	13,900
	AIC	-22,566	-17,329	-19,626	-23,538	-22,312

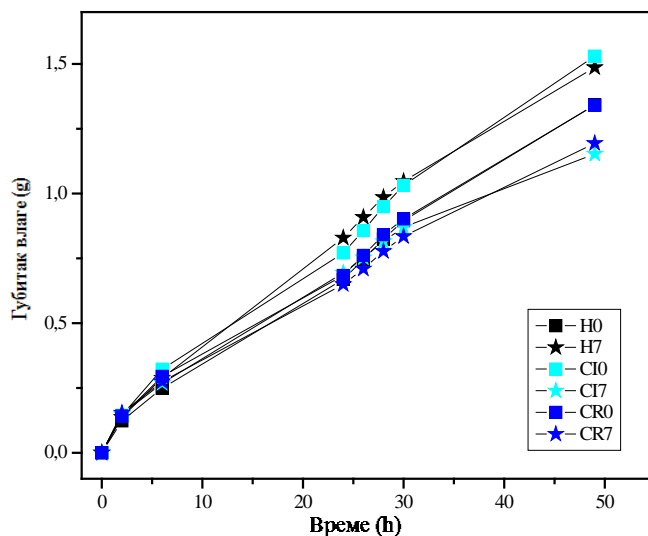
На основу приказаних резултата може се донети закључак да су синтетисани хидрогелови на бази 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине веома погодни за примену у контролисаном отпуштању терапеутски активних јона метала и

њихових редукованих облика, не само бакра, већ и цинка и сребра који, на основу својих својстава и активности, заузимају значајно место у третману рана и регенерацији ткива. Профили добијени испитивањем отпуштања цинка и сребра указују на слично понашање у поређењу са контролисаним отпуштањем бакра из CI и CR хидрогелова. Применом познатих модела Ритгер-Пепас, Пепас-Салин и Пепас-Салин ($m = 0,50$) потврђена је и релевантност експерименталних података, као и погодност модела за анализу транспорта наведених метала у току испитивања контролисаног отпуштања из хидрогелова 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине.

13. Процена погодности хидрогелова 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине са уграђеним бакар(II) јонима и редукованим бакром за примену у третману рана

13.1. Брзина преноса водене паре

Једно од најважнијих својстава облога за зарастање рана јесте контрола губитка воде из ране испаравањем. Пренос влаге кроз хидрогел је анализиран у влажној средини, релативне влажности 76 %, на температури од 37 °C. У циљу утврђивања утицаја састава хидрогела на брзину преноса водене паре, испитивани су хомополимерни (H0, CI0, CR0) и хидрогелови са највећим садржајем итаконске киселине (H7, CI7, CR7). Губитак влаге (g) у функцији времена приказан је на Слици 29. Вредности брзине преноса водене паре кроз испитиване хидрогелове израчунате су коришћењем једначине (17) и налазе се у опсегу од 1620 до 2008 g m⁻² по дану (Табела 17). Узимањем у обзир препорученог опсега вредности брзине преноса водене паре кроз облогу, од 2000 - 2500 g m⁻² по дану, за које се сматра да могу обезбедити одговарајућу равнотежу количине течности и влаге у рани, без ризика од појаве дехидрације [180], испитивани хидрогелови показују вредности које су блиске или припадају жељеном опсегу.



Слика 29. Губитак влаге (g) у функцији времена.

На основу приказаних резултата (Слика 29) може се уочити утицај присуства итаконске киселине у хидрогеловима на губитак и пренос влаге кроз хидрогел. У случају Н хидрогелова, хомополимерни хидрогел Н0 је показао већи губитак влаге у односу на Н7 хидрогел. Као што је већ поменуто, увођењем итаконске киселине повећава се хидрофилност хидрогела, услед присуства COOH група. С обзиром да су хидрогелови пре почетка експеримента набубрени у фосфатном пуферу рН 7,40, карбоксилне групе су јонизоване (COO^-) и као такве привлаче и задржавају молекуле воде унутар мреже хидрогела. Хидрогел без итаконске киселине има значајно мању могућност задржавања воде у односу на Н7 хидрогел, што је и потврђено добијеним резултатима.

Уградња бакар(II) јона у хомополимерни Н0 хидрогел за последицу је имала већи губитак и брзину преноса влаге. Овакво понашање може се објаснити морфолошким променама, које су уследиле након уградње бакар(II) јона, као што је повећање слободног простора између полимерних ланаца, што омогућава израженије бубрење, али и лакши пролаз влаге кроз мрежу хидрогела. С друге стране, утврђене

су ниже вредности брзине преноса водене паре кроз CI7 хидрогел у односу на H7. За разлику од CI0, CI7 хидрогел у себи садржи јонизоване карбоксилне групе итаконске киселине које, поред тога што привлаче и задржавају воду унутар мреже, остварују и интеракцију са јонима бакра, што може водити до стварања комплекса и додатне хидратације, односно привлачења молекула воде. Самим тим је и губитак влаге нижи у односу на H7 хидрогел.

Као што је већ поменуто, третман примењеним редукционим средством, у циљу редукције бакар(II) јона, доводи до смањења слободног простора између полимерних ланаца хидрогела, чинећи структуру знатно гушћом и компактнијом, што се одразило и на пренос влаге кроз ове хидрогелове. Тако су вредности брзине преноса водене паре за CR0 и CR7 хидрогелове ниже у односу на њихове аналоге H0 и H7.

Табела 17. Вредности брзине преноса водене паре испитиваних хидрогелова

Брзина преноса водене паре (g m^{-2} по дану)			
% ИК	H	CI	CR
0,0	1664	1892	1652
7,0	2008	1620	1518

На основу приказаних резултата може се закључити да су испитивани хидрогелови показали задовољавајућа својства. Утврђена је њихова способност обезбеђивања оптималне пенетрације влаге кроз хидрогел, чиме се спречава акумулација течности у рани и прекомерна влажност. С друге стране, постоји могућност задржавања довољне количине воде, а самим тим и оптималне влажности, што смањује ризик од исушивања ране. Малим променама састава тј. варирањем садржаја итаконске киселине у хидрогелу може се утицати на губитак влаге. Уколико се хидрогелови примењују у третману рана које у процесу зарастања луче мале количине течности, неопходно је постићи њено задржавање, па се предност даје

хидрогеловима који су показали ниже вредности брзине преноса водене паре. У супротном, ране које луче веће количине течности морају бити третиране хидрогеловима са већом брзином преноса водене паре.

13.2. Пенетрација кисеоника

Један од неопходних захтева који облога за зарастање рана мора испунити јесте размена гасова са спољашњом средином од које је физички одвојена примењеном облогом, у овом случају хидрогелом. С обзиром да је кисеоник најважнији елемент у скоро свим процесима у људском организму, нормалан ток зарастања ране и регенерације меког ткива подразумева приступ довољној и оптималној концентрацији кисеоника. С тога, облога која се примењује мора омогућити „дисање“ ткива које покрива.

Пенетрација кисеоника кроз хидрогел је испитивана мерењем вредности раствореног кисеоника. Да би се утврдио утицај састава хидрогелова, испитивани су хомополимерни хидрогелови (Н0, СI0, СR0), као и они са највећим уделом итаконске киселине (Н7, СI7, СR7). Вредност раствореног кисеоника негативне контроле (затвореног ерленмајера) је 5,1 mg l⁻¹, док је позитивна контрола (отворен ерленмајер) била 6,4 mg l⁻¹. Вредности раствореног кисеоника за испитиване хидрогелове измерене су у опсегу 5,4 – 6,0 mg l⁻¹ (Табела 18).

Табела 18. Вредности раствореног кисеоника

Растворени кисеоник (mg l ⁻¹)			
% ИК	Н	СI	СR
0,0	5,7	5,8	5,4
7,0	5,8	6,0	5,6

Приказани резултати се могу довести у везу са резултатима добијеним испитивањем преноса водене паре кроз хидрогелове. Тако се тренд који је утврђен у вредностима брзине преноса водене паре испитиваних хидрогелова, може уочити и у измереним вредностима раствореног кисеоника. Увођењем итаконске киселине повећава се концентрација раствореног кисеоника, па је вредност измерена за Н7 хидрогел већа у односу на Н0.

С1 хидрогелови омогућавају бољу пенетрацију кисеоника у односу на Н хидрогелове, захваљујући већем слободном простору између полимерних ланаца услед уградње бакар(II) јона. За разлику од молекула воде који се могу задржати у мрежи, смањујући на тај начин губитак влаге из хидрогела, пенетрација кисеоника је боља кроз С17 у поређењу са С10 хидрогелом. Услед смањеног слободног простора између полимерних ланаца СR хидрогелова, пенетрација кисеоника је отежана, па су вредности раствореног кисеоника ниже у односу на вредности измерене за Н и С1 хидрогелове.

Поређењем вредности раствореног кисеоника измерених у ерленмајерима прекривеним хидрогеловима и вредностима добијеним за одговарајуће контроле може се закључити да испитивани хидрогелови омогућавају задовољавајућу пенетрацију кисеоника. Ове вредности се налазе између оних измерених за негативну и позитивну контролу, што указује на способност хидрогелова да обезбеде доток кисеоника до ране, убрзавајући њено зарастање.

13.3. Дисперзиона својства хидрогелова

Испитивање интегритета хидрогела може указати на промене његових физичких својстава када се налази у контакту са течном излученом из ране. Тако очување првобитне структуре хидрогела, или на супрот томе, распадање хидрогела наговештава начин уклањања након његове примене. Облоге које задржавају физички интегритет обезбеђују лакше и безболније уклањање са ране, док примена

облоге слабијих механичких својстава са собом носи ризик од заосталих делова у рани, што компликује њено уклањање.

У овој студији испитивани су Н, С1 и СR хидрогелови. Резултати су показали да није дошло до дисперзије хидрогелова након контакта са флуидом. Нису уочене промене изгледа хидрогелова, ни делови хидрогелова као последица распадања структуре. Очекује се да, након примене у третману рана, ови хидрогелови задрже своју првобитну чврстину и флексибилност, која им омогућава да буду једноставно и безболно уклоњени са ране.

13.4. Задржавање воде

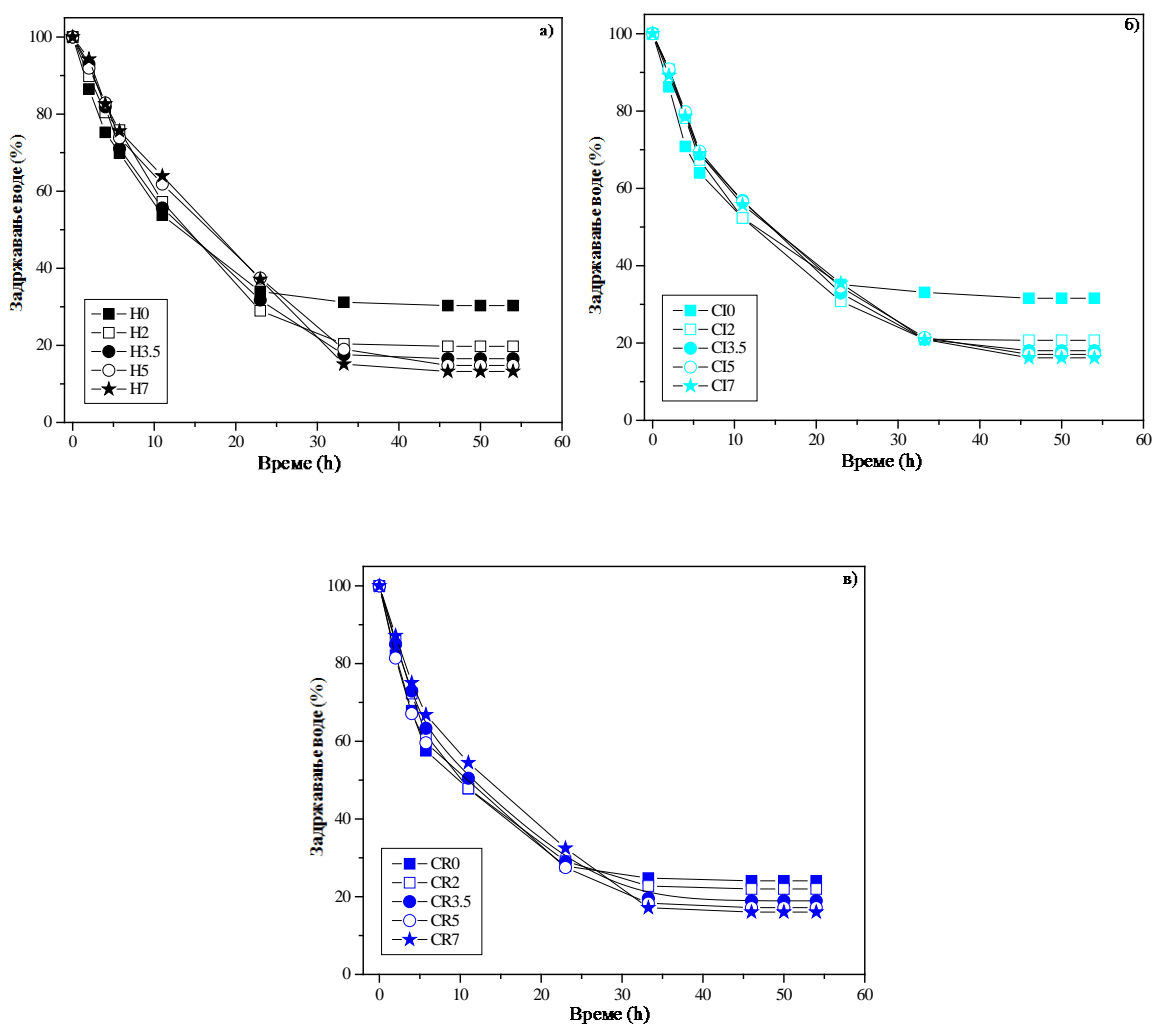
Захваљујући способности бубрења тј. упијања воде и других флуида, хидрогелови се издвајају у односу на друге материјале који се користе у третману рана. Велики садржај воде у хидрогелу омогућава тренутно ублажење бола и хлађење ране која је захваћена запаљенским процесима, док неадхезивност хидрогелова обезбеђује комфорно и лако уклањање без ризика од повлачења и даље повреде већ оштећеног ткива. Због тога је у овој студији испитиван капацитет задржавања воде унутар мреже хидрогела и брзина губитка воде.

Способност задржавања воде испитивана је у влажној средини, релативне влажности од 76 %, на 37 °C. На Слици 30 приказано је задржавање воде (%) у функцији времена за хидрогелове Н, С1 и СR серије. Испитивани хидрогелови су показали задовољавајући капацитет задржавања воде, задржавајући до 32 % после 3 дана излагања влажном ваздуху. 12 h након почетка експеримента уочен је губитак воде око 50 % код свих хидрогелова. Овакво понашање омогућава хидрогелу да упије течност која се лучи из ране у току процеса зарастања [181], спречавајући прекомерну влажност ране. После 30 h сви хидрогелови су задржали одређену количину воде, која је остала константна до краја експеримента.

Код све три серије испитиваних хидрогелова уочен је пораст губитка воде са повећањем садржаја итаконске киселине у њима, што је у складу са резултатима

бубрења. Хидрогелови који више бубре упијају већу количину воде, па самим тим је и могућност губитка воде већа. CI хидрогелови имају већи капацитет бубрења у односу на хидрогелове H серије, тако да је и губитак воде већи, док, с друге стране, CR хидрогелови, густе и компактне морфологије, показују мањи губитак воде.

Губитак воде може бити компензован упијањем течности излучене из ране тако да не дође до исушивања саме облоге тј. хидрогела. У случају сувих рана или рана које у току процеса зарастања луче мале количине течности, препоручљиво је да се ови хидрогелови додатно овлаже стерилном водом или физиолошким раствором [182].



Слика 30. Задржавање воде (%) у функцији времена а) H, б) CI и в) CR хидрогелова.

14. Антимикробна својства хидрогелова 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине са уграђеним бакар(II) јонима и редукованим бакром

14.1. Антимикробна активност

У циљу утврђивања антимикробне активности у току процеса контролисаног отпуштања бакар(II) јона и редукованог бакра из испитиваних хидрогелова, изведени су микробиолошки тестови са најчешћим узрочницима инфекција *E. coli*, *S. aureus* и *C. albicans*, према описаној процедури [172]. Смањење броја ћелија микроорганизама (%) у присуству хидрогелова израчунато је према једначини (19). Као контроле су коришћени Н хидрогелови са одговарајућим садржајем итаконске киселине, Н0 и Н7. Испитивани су хомополимерни (CI0, CR0) и хидрогелови са највећим уделом итаконске киселине (CI7, CR7). Праћена је антимикробна активност у току процеса отпуштања бакар(II) јона и редукованог бакра из ових хидрогелова, и то после 1., 24. и 72. h отпуштања.

На Сликама 31, 32 и 33 су приказане вредности смањења броја ћелија *E. coli* и *S. aureus*, и гљиве *C. albicans* у присуству испитиваних хидрогелова, утврђених за различите периоде инкубације, 2 и 24 h. Као што се може уочити из приказаних резултата, ови хидрогелови показују изражену антимикробну активност према испитиваним микроорганизмима. Чак и после само 2 h инкубације, уочена је антимикробна активност хидрогелова, док је након 24 h инкубације она још више изражена.

После периода инкубације од 2 h, уочено је смањење броја ћелија *E. coli* за 30,8 (CI0), 89,4 (CI7), 26,9 (CR0), 81,8 % (CR7), док је после 24 h инкубације смањење броја ћелија било веће, чак преко 99,0 %.

Испитивани хидрогелови су се показали подједнако ефикасни у смањењу броја ћелија *S. aureus* за 69,4 (CI0), 74,9 (CI7), 45,7 (CR0) и 89,1 % (CR7) после 2 h инкубације. Антимикробна активност испитиваних хидрогелова према овој

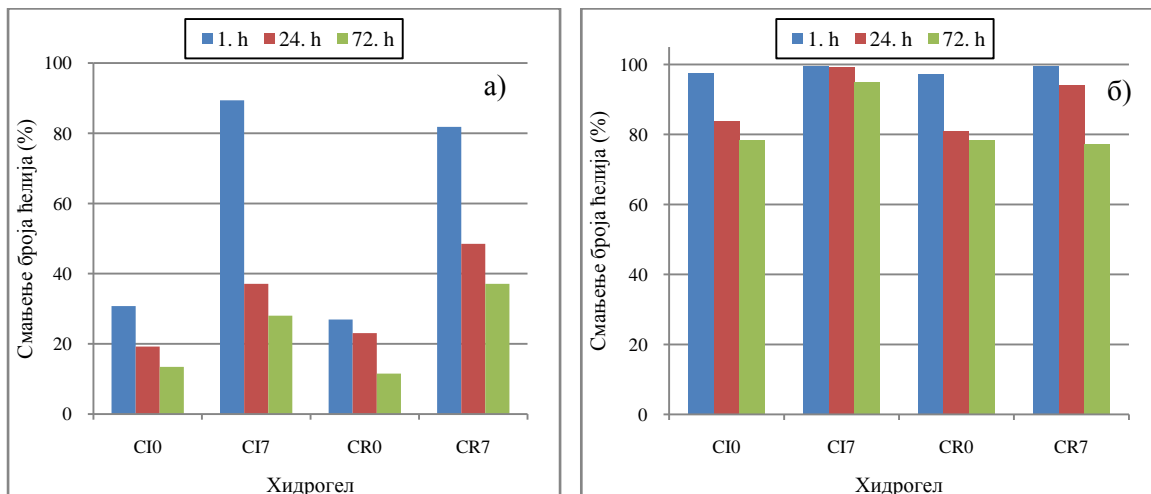
бактерији је веома изражена после 24 h инкубације, када је број ћелија микроорганизама смањен скоро у потпуности, преко 99,0 %.

Поред израженог бактерицидног потенцијала испитиваних хидрогелова, утврђен је и њихов фунгицидни потенцијал према гљиви *C. albicans*. Утврђено је смањење броја ћелија за 54,84 (CI0), 90,42 (CI7), 77,42 (CR0), 90,08 % (CR7) после 2 h инкубације са наведеним хидрогеловима, и преко 99,0 %, након 24 h инкубације, што указује на изузетну антифунгалну активност.

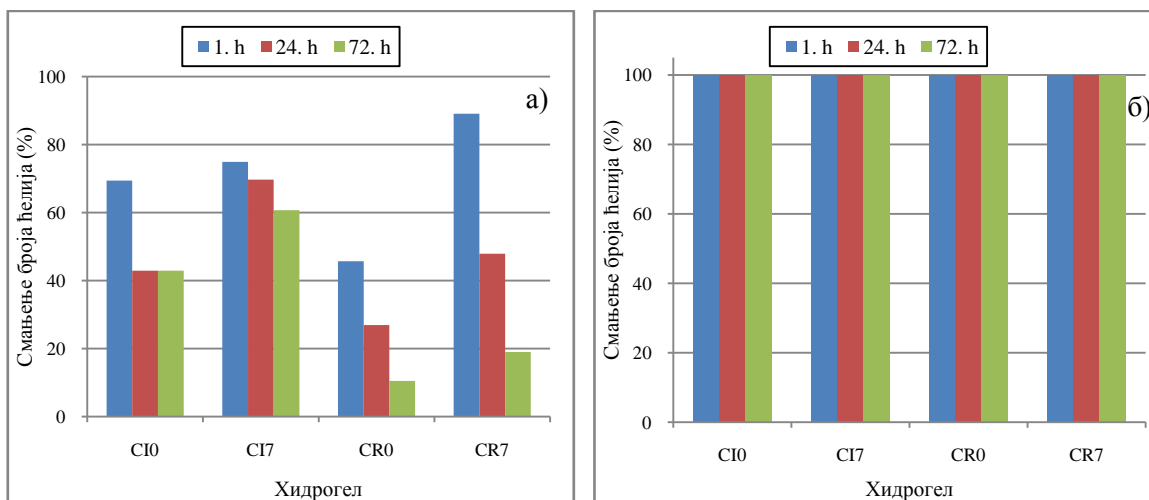
Анализом добијених резултата уочен је пад антимикуробне активности хидрогелова у односу на изабране тачке отпуштања бакар(II) јона и редукованог бакра. Испитивани хидрогелови су показали најизраженију антимикуробну активност након 1. h отпуштања, док је најслабија одређена за 72. h отпуштања. Објашњење оваквог понашања може се наћи у количини заосталих бакар(II) јона и редукованог бакра у хидрогеловима након изабраних тачака отпуштања. Наиме, после 1. h отпусти се мања количина бакар(II) јона и редукованог бакра, што указује на значајну количину која је и даље присутна у хидрогеловима и која је уједно носилац антимикуробне активности хидрогела. Насупрот томе, мања количина заосталих бакар(II) јона и редукованог бакра у хидрогеловима након 72. h отпуштања доводи до пада антимикуробне активности испитиваних хидрогелова у односу на резултате добијене за 1. h отпуштања. Као што је већ дискутовано, присуство, као и повећање садржаја итаконске киселине у хидрогеловима утиче на повећање количине уграђених бакар(II) јона, што се одражава и на антимикуробну активност хидрогелова. Тако CI7 и CR7 хидрогелови поседују значајно већи антимикуробни потенцијал према *E. coli*, *S. aureus* и *C. albicans* у поређењу са хомополимерним CI0 и CR0 хидрогеловима.

Резултати ове студије указују на изузетну антимикуробну активност испитиваних хидрогелова. Показало се да хемијска редукција бакар(II) јона није довела до значајне промене антимикуробне активности, па се и CI и CR хидрогелови могу применити у третману рана и спречавању развоја потенцијалних инфекција. Изузетна антибактеријска и антифунгална активност сврстава ове хидрогелове у

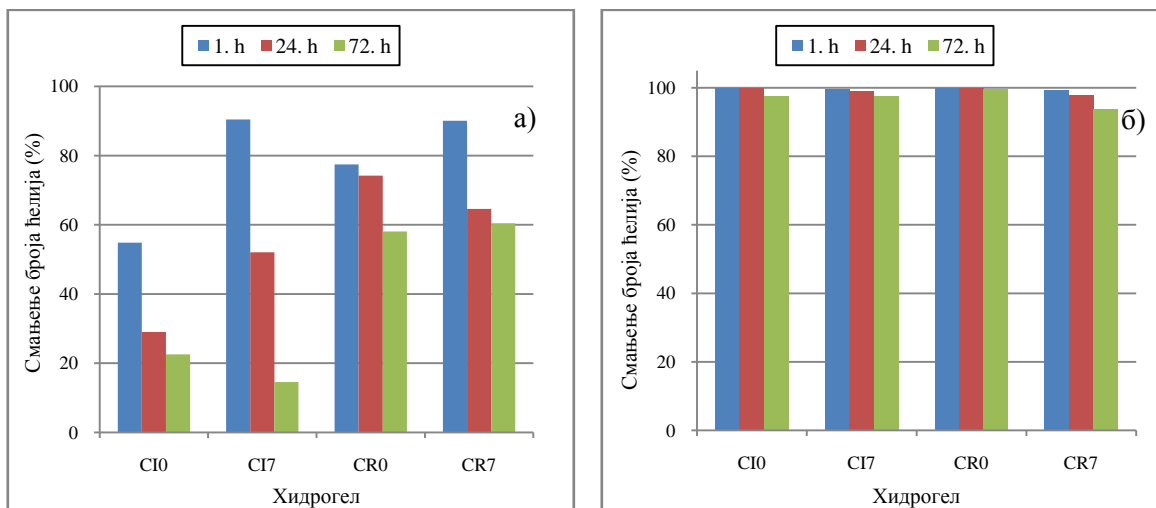
веома моћне системе у борби против инфекција које могу у значајној мери закомпликовати процес зарастања ране.



Слика 31. Антибактеријска активност хидрогелова према *E. coli* после а) 2 h и б) 24 h инкубације.



Слика 32. Антибактеријска активност хидрогелова према *S. aureus* после а) 2 h и б) 24 h инкубације.



Слика 33. Антифунгална активност хидрогелова према *C. albicans* после а) 24 h и б) 72 h инкубације.

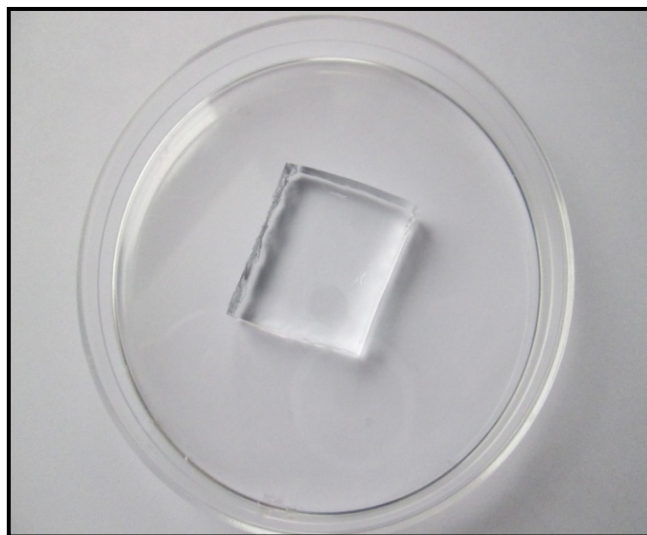
14.2. Пенетрација микроорганизама

P. aeruginosa је Грам-негативна бактерија која је присутна у животној околини и једна је од најчешћих узрочника инфекција у клиничким условима. Присуство ове бактерије, као и њена способност стварања отпорних биофилмова компликује зарастање хроничних рана [183]. Појава инфекције узроковане *P. aeruginosa* код пацијената са опекотинама значајно отежава њихово зарастање, у тој мери да у неким случајевима долази и до смртог исхода [184]. Тако превенција оваквих инфекција представља један од главних услова који се мора испунити у циљу успешног зарастања ране.

Способност обезбеђивања заштите ране и спречавања пенетрације бактерија, применом хидрогелова у третману рана, испитана је микробиолошким тестом. Испитивање је извршено на хомополимерним CI0 и CR0, као и на хидрогеловима са највећим садржајем итаконске киселине CI7 и CR7. Сlike 34, 35 и 36 приказују један од испитиваних хидрогелова, CR7. Током анализе пенетрације *P. aeruginosa*, утврђено је да није дошло до раста ове бактерије, како на горњој површини хидрогела, тако ни испод њега. Исти резултати су добијени и за остале испитиване

хидрогелове. Уочљива промена боје хидрогела указује на дифузију медијума у коме су гајене бактерије. Као што је приказано у претходним студијама у овом раду, ови хидрогелови су показали задовољавајућу пропустљивост за кисеоник и влагу, па је и пропустљивост за коришћени медијум, али не и за бактерије доказ одговарајуће селективности хидрогелова. Спречавању пенетрације *P. aeruginosa* несумњиво је допринео и снажан антибактеријски потенцијал CI и CR хидрогелова.

На основу добијених резултата микробиолошке анализе може се закључити да би испитивани хидрогелови примењени у третману рана у облику облога дебљине 4 mm пружили потпуну заштиту, спречавајући пенетрацију бактерија и настанак инфекције.



Слика 34. CR7 хидрогел пре микробиолошког теста.



Слика 35. Горња површина CR7 хидрогела након 48 h инкубације.



Слика 36. Доња површина CR7 хидрогела након 48 h инкубације.

15. Биокompatибилност хидрогелова 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине са уграђеним бакар(II) јонима и редукованим бакром

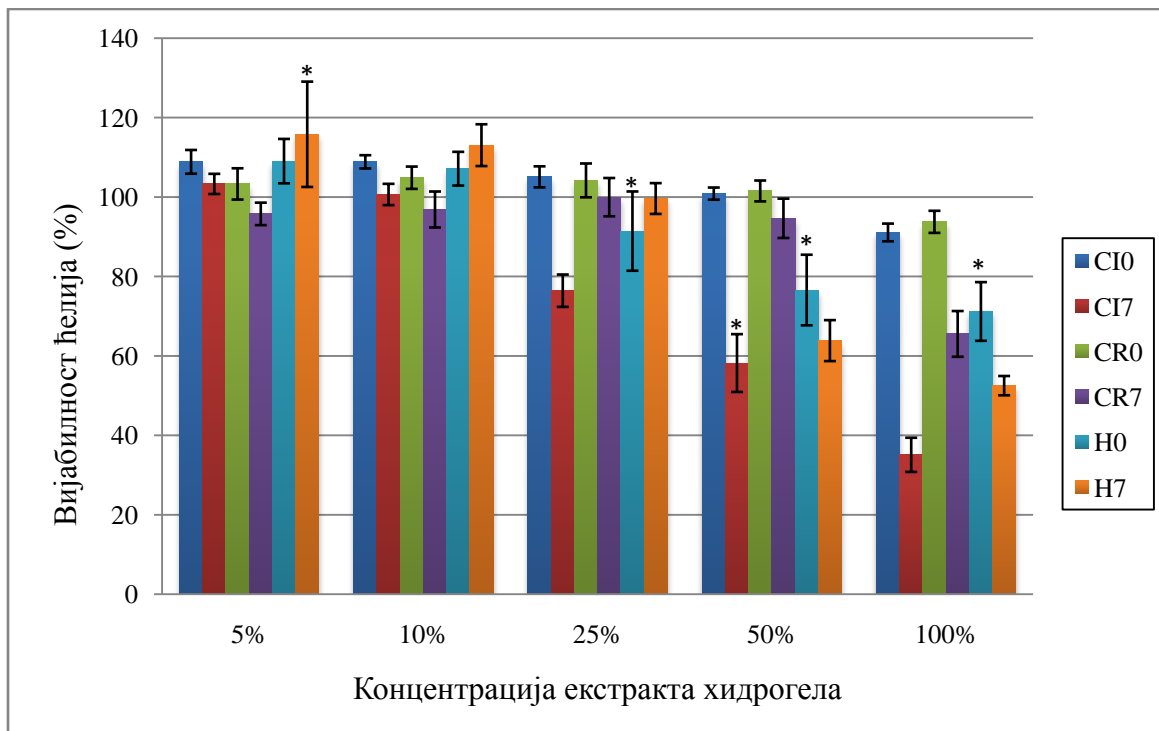
15.1. Цитотоксичност

У циљу утврђивања погодности хидрогелова за биомедицинску примену, изведена је *in vitro* студија испитивања биокompatибилности. МТТ тест представља добро познат и ефикасан прелиминарни тест процене цитотоксичности биоматеријала и претходи *in vivo* тестирању [185].

Испитивање је извршено на хомополимерним (H0, C10 и CR0) и хидрогеловима са највећим садржајем итаконске киселине (H7, C17 и CR7). На Слици 37 је приказана вијабилност L929 ћелија у присуству различитих концентрација екстраката хидрогелова 5, 10, 25, 50 и 100 %. Екстракти хидрогелова концентрације 5, 10 и 25 % скоро да нису имали никаквог утицаја на ћелије фибробласта, односно, раст ћелија се несметано одвијао. Вијабилност ћелија у присуству 50 % -ног екстракта C17 је била испод 60 %, док је у случају осталих екстраката ове концентрације била задовољавајућа.

Анализом вијабилности ћелија фибробласта које су били у контакту са екстрактима испитиваних хидрогелова концентрације 100 %, може се уочити смањење биокompatибилности хидрогелова са итаконском киселином у односу на хомополимерне хидрогелове. Најизраженија вијабилност ћелија, изнад 90 %, уочена је у контакту са C10 и CR0 хидрогеловима. Ипак, у случају C17 хидрогела, вијабилност ћелија је била испод 40 %, што је значајно ниже у поређењу са осталим резултатима. Такође, смањење вијабилности ћелија уочено је и у присуству H7 и CR7, у односу на њихове хомополимерне аналоге H0 и CR0. Овакво понашање се може тумачити тиме да присуство 7 mol% итаконске киселине у хидрогеловима доводи до пораста локалне киселости, које може имати негативан ефекат на вијабилност ћелија, а самим тим и на смањење биокompatибилности испитиваних хидрогелова.

Може се закључити да су испитани хидрогелови показали способност обезбеђивања својеврсне подршке расту ћелија фибробласта, као и то да не узрокују акутне токсичне одговоре. Већина испитаних хидрогелова омогућава вијабилност ћелија преко 60 %, што представља погодну и задовољавајућу биокompatibilност материјала са применом у третману рана.



Слика 37. Вијабилност L929 ћелија у функцији различитих концентрација екстраката хидрогелова (* $p \leq 0,05$).

15.2. Генотоксичност

Биомедицинска примена материјала са собом може поред позитивних ефеката донети и нежељене последице. Најчешће се говори о токсичном, штетном ефекту који се испољава на живим ћелијама. Механизам токсичности често укључује

оштећење ДНК ланаца [186], па је испитивање генотоксичности материјала логичан наставак студије испитивања њихове цитотоксичности.

У циљу утврђивања генотоксичног потенцијала хидрогелова спроведен је Комет тест који представља брзу и осетљиву методу одређивања оштећења ДНК ланаца појединачних ћелија [187]. Сlike које се добијају применом ове методе дају увид у специфичне резултате, миграцију ДНК, чији изглед подсећа на комету, при чему глава комете представља неоштећену ДНК, док реп обухвата оштећене или покидане фрагменте ДНК. Дужина репа представља меру генотоксичног потенцијала испитиваног материјала. Поред дужине репа, карактеристична величина је и моменат репа, који такође даје увид генотоксичност.

С обзиром да се надовезује на испитивање цитотоксичности, Комет тест обухвата анализу концентрација екстраката хидрогелова које се нису показале токсичним по ћелије фибробласта у спроведеном МТТ тесту. У Табели 19 приказани су добијени резултати у виду средњих вредности ДНК у репу, DNK_t (%), и момента репа, M_t , за неке од нетоксичних концентрација екстраката хидрогелова.

Табела 19. DNK_t (%) и M_t вредности (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,1$; *** $p \leq 0,01$)

	Оштећење ДНК	
	DNK_t (%)	M_t
Негативна контрола	4,29 ± 0,26	0,8 ± 0,54
СI0 (100 %)	3,93 ± 0,59	1,3 ± 0,27
СI7 (10 %)	4,83 ± 0,88	0,99 ± 0,29
СR0 (100 %)	5,34 ± 0,37	0,73 ± 0,08
СR7 (50 %)	7,71 ± 0,44	2,12 ± 0,23 *
Н0 (100 %)	8,7 ± 1,23	3,59 ± 0,81 **
Н7 (25 %)	15,73 ± 1,30	10,76 ± 1,70 ***
Позитивна контрола	46,97 ± 1,24 ***	22,05 ± 3,52 ***

На основу вредности DNK_t (%) која је веома ниска, у поређењу са вредношћу добијеном за негативну контролу, може се закључити да неразблажени екстракт С10 хидрогела није проузроковао оштећења и миграцију ДНК. Вредности DNK_t (%) и M_t блиске вредностима негативне контроле добијене су и за 10 %-ни екстракт хидрогела С17. Поређењем DNK_t (%) вредности добијених за ова два екстракта, уочљив је благи пораст генотоксичног потенцијала увођењем итаконске киселине, што је у складу са резултатима МТТ теста. Испитивани екстракти СР хидрогелова показали су већи генотоксични потенцијал у односу на С1 хидрогелове. За разблажени екстракт (50 %) СР7 хидрогела утврђена је статистички значајно већа M_t вредност, указујући на утицај присуства итаконске киселине. Пораст генотоксичности уочен је код екстраката хидрогелова Н серије, са статистички значајно већим M_t вредностима неразблаженог екстракта Н0 хидрогела и 25 %-ог екстракта Н7 хидрогела у односу на негативну контролу.

Приказани резултати Комет теста указују на повезаност генотоксичног потенцијала хидрогелова са њиховим саставом. Може се закључити да уградња бакар(II) јона утиче на смањење генотоксичности синтетисаних хидрогелова, при чему су се хидрогелови С1 серије показали нетоксичним по генетски материјал. Редукција бакар(II) јона за последицу је имала нешто више вредности параметара генотоксичности у поређењу са хидрогеловима са уграђеним бакар(II) јонима, али су и даље биле ниже у односу на вредности чистих хидрогелова. Анализом резултата уочен је утицај итаконске киселине на генотоксичност код све три серије хидрогелова. Хидрогелови са 7 mol% итаконске киселине имају већи генотоксични потенцијал у односу на хомополимерне хидрогелове у оквиру исте серије. Овакав тренд је примећен и у резултатима МТТ теста, што указује на негативан утицај киселе компоненте хидрогела на ДНК. Да би се избегло оштећење ДНК, које може довести до мутације гена и озбиљних поремећаја и обољења, препоручљива је примена хидрогелова са нижим садржајем итаконске киселине.

16. Закључак

У овој докторској дисертацији су, полимеризацијом преко слободних радикала, синтетисани хидрогелови на бази 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине, при чему је вариран садржај итаконске киселине и на тај начин добијена Н серија хидрогелова. Уградњом бакар(II) јона у синтетисане хидрогелове добијени су хидрогелови CI серије, док је хемијском редукцијом ових јона, коришћењем натријум борохидрида, добијена CR серија хидрогелова са редукованим обликом бакра. Карактеризација ове три серије хидрогелова извршена је применом инфрацрвене спектроскопије Фуријеовом трансформацијом, скенирајуће електронске микроскопије, динамичко-механичке анализе, диференцијално скенирајуће калориметрије и праћењем бубрења. Анализиран је процес контролисаног отпуштања бакар(II) јона, као и редукованог бакра из хидрогелова, у симулираним физиолошким условима. У циљу процене погодности синтетисаних хидрогелова као система за контролисано отпуштање, изведене су студије контролисаног отпуштања и других терапутски активних јона метала, цинк(II) јона и сребро(I) јона, као и њихових редукованих облика. Испитивана је могућност примене хидрогелова у третману рана, одређивањем брзине преноса водене паре, пенетрације кисеоника, дисперзионих карактеристика и могућности задржавања течности. Изведени су микробиолошки тестови који обухватају утврђивање антимикуробне активности према *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans*, као и пенетрације *P. aeruginosa* кроз хидрогелове. Одговор ћелија фибробласта на присуство испитиваних хидрогелова је анализиран применом МТТ и Комет теста. На основу добијених резултата, може се закључити следеће:

- Утврђена структурна, морфолошка, механичка и термичка својства испитиваних хидрогелова потврдила су успешну синтезу, уградњу бакар(II) јона, као и њихову редукцију. ФТИР спектри омогућили су увид у структуру хидрогелова, потврду о уградњи, а затим и редукцији бакар(II) јона. Показано је да итаконска киселина има значајан утицај на морфологију хидрогела тј. на повећање порозности. Уградња бакар(II) јона утицала је на промену величине

и облика пора, док је хемијска редукција ових јона имала за последицу смањену порозност и повећање компактности хидрогела. Динамичко-механичком анализом утврђена је независност вредности модула сачуване енергије од примењене фреквенције, што указује да је деформација хидрогелова повратна у потпуности. Додатак итаконске киселине, као и уградња бакар(II) јона побољшавају механичка својства хидрогелова, док је третман редукционим средством за последицу имао ниже G' вредности. Са аспекта термичке анализе, може се рећи да повећање садржаја итаконске киселине, уградња бакар(II) јона и његова редукција имају значајан утицај на термичка својства испитиваних хидрогелова, померајући T_g ка вишим вредностима.

- Синтетисани хидрогелови 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине показали су рН осетљиво понашање у опсегу рН вредности 2,20 - 8,00. Испитивањем утицаја температуре на бубрење, уочен је пад q_e вредности у температурном опсегу од 37 до 40 °С, што се може протумачити као запремински фазни прелаз, који карактерише испитиване хидрогелове као температурно осетљиве. Увођењем итаконске киселине постиже се израженије рН и температурно осетљиво бубрење, док уградња бакар(II) јона, као и њихова редукција нису пореметили „паметно“ понашање хидрогелова.
- Оптимизација профила отпуштања бакар(II) јона, као и редукованог бакра из испитиваних хидрогелова може се постићи варирањем садржаја итаконске киселине, чиме се обезбеђује жељена брзина отпуштања и количина отпуштених активних агенса. Хемијска редукција бакар(II) јона за последицу је имала благо ниже брзине отпуштања редукованог бакра у односу на отпуштање бакар(II) јона из хидрогелова. С обзиром на задовољавајућу ефикасност уградње и постигнуту кинетику отпуштања бакар(II) јона и редукованог бакра, хидрогелови на бази 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине су даље испитани као носачи за уградњу и контролисано отпуштање метала који такође поседују велики потенцијал за примену у третману рана,

цинк(II) јона и сребро(I) јона, као и њихових редукованих облика. Добијени резултати су потврдили погодност хидрогелова као система за контролисано отпуштање терапеутски активних агенса.

- У складу са потенцијалном применом у третману рана и регенерацији ткива, коришћене су *in vitro* методе испитивања погодности CI и CR хидрогелова. Утврђена је њихова способност обезбеђивања оптималне пенетрације кисеоника и влаге кроз хидрогел, чиме се може спречити акумулација течности у рани и прекомерна влажност, док задржавањем довољне количине воде нема ризика од исушивања ране. С обзиром на одсуство дисперзије хидрогелова после контакта са флуидом, очекује се да, након примене у третману рана, они задрже своју првобитну чврстину и флексибилност, која им омогућава да буду једноставно и безболно уклоњени са ране. Утврђено је да испитани хидрогелови имају могућност задржавања одређене количине течности у себи тако да не дође до њиховог исушивања приликом примене. Свакако, губитак воде из хидрогела може бити компензован упијањем течности која се лучи из ране.
- Антимикробна активност, која је испитана у току контролисаног отпуштања бакар(II) јона и редукованог бакра, према Грам-позитивној бактерији *S. aureus*, Грам-негативној бактерији *E. coli* и гљиви *C. albicans*, изражена у виду смањења броја ћелија ових микроорганизама преко 99,0 %, сврстава испитиване хидрогелове у веома моћне системе за спречавање развоја потенцијалних инфекција на рани. Могућност ефикасне заштите ране од микроорганизама потврђена је и испитивањем пенетрације Грам-негативне бактерије *P. aeruginosa* кроз CI и CR хидрогелове дебљине 4 mm.
- Биолошки тестови изведени на ћелијској линији L929 (фибробласти миша) указују на задовољавајућу биокомпатибилност. Уградњом бакар(II) јона и њиховом редукцијом побољшана је биокомпатибилност синтетисаних хидрогелова, док је увођење 7 mol% итаконске киселине утицало на повећање

киселости система, и за последицу имало смањење биокомпатибилности. Да би се избегао и минималан негативан утицај, пожељна је примена хидрогелова са мањим садржајем итаконске киселине.

На основу добијених резултата може се закључити да хидрогелови на бази 2-хидроксиетил акрилата и итаконске киселине поседују значајан потенцијал као носачи за уградњу и контролисано отпуштање терапеутски активних јона метала, као и њихових редукованих облика. Могућност контроле локалног отпуштања, уз изузетну антимикуробну активност и задовољавајућу биокомпатибилност CI и CR хидрогелова, може обезбедити успешно зарастање рана и регенерацију меког ткива, смањујући могућност настанка инфекције и других нежељених појава на минимум.

17. Литература

- [1] E.M. Ahmed, Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *J. Adv. Res.* 6 (2015) 105–121.
- [2] O. Okay, General Properties of Hydrogels, in G. Gerlach, K.-F. Arndt (eds.), *Hydrogel Sensors and Actuators, Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors 6*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 2009, pp. 1-14.
- [3] A.S. Hoffman, Hydrogels for biomedical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 18–23.
- [4] O. Wichterle, D. Lim, Hydrophilic gels for biological use, *Nature* 185 (1960) 117-118.
- [5] Y. Ikada, T. Mita, Preparation of hydrogels by radiation technique, *Radiat. Phys. Chem.* 9 (1977) 633-645.
- [6] J. Rosiak, K. Burozak, W. Pekala, Polyacrylamide hydrogels as sustained release drug delivery dressing materials, *Radiat. Phys. Chem.* (1977) 22 (1983) 907–915.
- [7] K.V. Ranga Rao, K. Padmalatha Devi, Swelling controlled-release systems: recent developments and applications, *Int. J. Pharm.* 48 (1988) 1-13.
- [8] I.Yu. Galaev, B. Mattiasson, Thermoreactive water-soluble polymers, nonionic surfactants, and hydrogels as reagents in biotechnology, *Enzyme Microb. Tech.* 15 (1993) 354-366.
- [9] W.R. Gombotz, D.K. Pettit, Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery, *Bioconjugate Chem.* 6 (1995) 332-351.
- [10] I.Y. Galaev, B. Mattiasson, ‘Smart’ polymers and what they could do in biotechnology and medicine, *Trends in Biotechnol.* 17 (1999) 335–340.

- [11] N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa, Hydrogels in pharmaceutical formulations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (2000) 27–46.
- [12] D. Macaya, M. Spector, Injectable hydrogel materials for spinal cord regeneration: a review, *Biomed. Mater.* 7 (2012) 1-22.
- [13] S. Utech, A.R. Boccaccini, A review of hydrogel-based composites for biomedical applications: Enhancement of hydrogel properties by addition of rigid inorganic fillers, *J. Mater. Sci.* 51 (2016) 271–310.
- [14] I. Roy, M.N. Gupta, Smart Polymeric Materials: Review Emerging Biochemical Applications, *Chem. Biol.* 10 (2003) 1161–1171.
- [15] J. Kopecek, Hydrogel biomaterials: a smart future? *Biomaterials* 28 (2007) 5185–5192.
- [16] I. Tomatsu, K. Peng, A. Kros, Photoresponsive hydrogels for biomedical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 1257–1266.
- [17] B.D. Ratner, A.S. Hoffman, Synthetic hydrogels for biomedical applications, in: J.D. Andrade (Ed.), *Hydrogels for Medical and Related Applications*, ACS Symposium Series, No. 31, American Chemical Society, Washington, DC, 1976, pp. 1-36.
- [18] L. Xinming, C. Yingde, A.W. Lloyd, S.V. Mikhalovsky, S.R. Sandeman, C.A. Howel, L. Liewen, Polymeric hydrogels for novel contact lens-based ophthalmic drug delivery systems: A review, *Cont. Lens Anterior Eye* 31 (2008) 57–64.
- [19] J. Xu, X. Li, F. Sun, Cyclodextrin-containing hydrogels for contact lenses as a platform for drug incorporation and release, *Acta Biomater.* 6 (2010) 486–493.
- [20] K. Burczak, E. Gamian, A. Kochman, Long-term *in vivo* performance and biocompatibility of poly(vinyl alcohol) hydrogel macrocapsules for hybrid-type artificial pancreas, *Biomaterials* 17 (1996) 2351-2356.

- [21] F. Li, Y. Su, J. Wang, G. Wu, C. Wang, Influence of dynamic load on friction behavior of human articular cartilage, stainless steel and polyvinyl alcohol hydrogel as artificial cartilage, *J. Mater. Sci.-Mater. Med.* 21 (2010) 147–154.
- [22] K. Arakaki, N. Kitamura, H. Fujiki, T. Kurokawa, M. Iwamoto, M. Ueno, F. Kanaya, Y. Osada, J.P. Gong, K. Yasuda, Artificial cartilage made from a novel double-network hydrogel: *In vivo* effects on the normal cartilage and *ex vivo* evaluation of the friction property, *J. Biomed. Mater. Res. A* 93A (2010) 1160–1168.
- [23] R. Parke-Houben, C.H. Fox, L.L. Zheng, D.J. Waters, J.R. Cochran, C.N. Ta, C.W. Frank, Interpenetrating polymer network hydrogel scaffolds for artificial cornea periphery, *J. Mater. Sci.-Mater. Med.* (2015) 26 1-12.
- [24] X. Fenglan, L. Yubao, Y. Xiaoming, L. Hongbing, Z. Li, Preparation and *in vivo* investigation of artificial cornea made of nano-hydroxyapatite/poly (vinyl alcohol) hydrogel composite, *J. Mater. Sci.-Mater. Med.* 18 (2007) 635–640.
- [25] C. Helary, I. Bataille, A. Abed, C. Illoul, A. Anglo, L. Louedec, D. Letourneur, A. Meddahi-Pelle, M.M. Giraud-Guille, Concentrated collagen hydrogels as dermal substitutes, *Biomaterials* 31 (2010) 481–490.
- [26] C.D. Young, J.R. Wu, T.L. Tsou, High-strength, ultra-thin and fiber-reinforced pHEMA artificial skin, *Biomaterials* 19 (1998) 1745—1752.
- [27] N.A. Peppas, Y. Huang, M. Torres-Lugo, J.H. Ward, J. Zhang, Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2 (2000) 9-29.
- [28] S.M. DePorter, I. Lui, B.R. McNaughton, Programmed cell adhesion and growth on cell-imprinted polyacrylamide hydrogels, *Soft Matter* 8 (2012) 10403-10408.
- [29] V.A. Schulte, D.F. Alves, P.P. Dalton, M. Moeller, M.C. Lensen, P. Mela, Microengineered PEG Hydrogels: 3D Scaffolds for Guided Cell Growth, *Macromol. Biosci.* 13 (2013) 562–572.

- [30] H.L. Lim, Y. Hwang, M. Kar, S. Varghese, Smart hydrogels as functional biomimetic systems, *Biomater. Sci.* 2 (2014) 603–618.
- [31] S. Chaterji, I.K. Kwon, K. Park, Smart polymeric gels: redefining the limits of biomedical devices, *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 1083–1122.
- [32] W.E. Hennink, C.F. van Nostrum, Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 13–36.
- [33] K. Deligkaris, T.S. Tadele, W. Olthuis, A. van den Berg, Hydrogel-based devices for biomedical applications, *Sensor. Actuat. B* 147 (2010) 765–774.
- [34] C. Xiao, F. Gao, Y. Gao, Controlled preparation of physically crosslinked chitosan-g-poly(vinyl alcohol) hydrogel, *J. Appl. Polym. Sci.* 117 (2010) 2946–2950.
- [35] D.M. Devine, C.L. Higginbotham, The synthesis of a physically crosslinked NVP based hydrogel, *Polymer* 44 (2003) 7851–7860.
- [36] K. Haraguchi, Y. Xu, G. Li, Poly(N-isopropylacrylamide) prepared by free-radical polymerization in aqueous solutions and in nanocomposite hydrogels, *Macromol. Symp.* 306-307 (2011) 33–48.
- [37] M. Ebara, Smart Hydrogels in Y. Kotsuchibashi, R. Narain, N. Idota, Y.J. Kim, J.M. Hoffman, K. Uto, T. Aoyagi (eds.), *Smart Biomaterials*, NIMS Monographs, National Institute for Materials Science, Japan, Springer Japan, 2014, pp 9-65.
- [38] M. Ebara, Carbohydrate-derived hydrogels and microgels in Ravin Narain (eds.), *Engineered Carbohydrate-based materials for biomedical applications*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2011, doi: 10.1002/9780470944349.ch9.
- [39] N.A. Peppas, A.R. Khare, Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 11 (1993) 1-35.
- [40] W.S. Dai, T.A. Barbari, Hydrogel membranes with mesh size asymmetry based on the gradient crosslinking of poly(vinyl alcohol), *J. Membrane Sci.* 156 (1999) 67-79.

- [41] S.H. Gehrke, L.H. Uhden, J.F. McBride, Enhanced loading and activity retention of bioactive proteins in hydrogel delivery systems, *J. Control. Release* 55 (1998) 21–33.
- [42] X. Dai, X. Chen, L. Yang, S. Foster, A.J. Coury, T.H. Jozefiak, Free radical polymerization of poly(ethylene glycol) diacrylate macromers: impact of macromer hydrophobicity and initiator chemistry on polymerization efficiency, *Acta Biomater.* 7 (2011) 1965–1972.
- [43] T. Caykara, M. Dogmus, O. Kantoglu, Network structure and swelling-shrinking behaviors of pH-sensitive poly(acrylamide-co-itaconic acid) hydrogels, *J. Polym. Sci. Pol. Phys.* 42 (2004) 2586-2594.
- [44] B. Tasdelen, N. Kayaman-Apohan, O. Guven, B.M. Baysal, Preparation of poly(N-isopropylacrylamide/itaconic acid) copolymeric hydrogels and their drug release behavior, *Int. J. Pharm.* 278 (2004) 343-351.
- [45] T. Canal, N.A. Peppas, Correlation between mesh size and equilibrium degree of swelling of polymeric networks, *J. Biomed. Mater. Res.* 23 (1989) 1183-1193.
- [46] F. Ganji, S. Vasheghani-Farahani, E. Vasheghani-Farahani, Theoretical description of hydrogel swelling: A review, *Iran. Polym. J.* 19 (2010) 375-398.
- [47] J.E. Elliott, M. Macdonald, J. Nie, C.N. Bowman, Structure and swelling of poly(acrylic acid) hydrogels: effect of pH, ionic strength, and dilution on the crosslinked polymer structure, *Polymer* 45 (2004) 1503–1510.
- [48] L. Brannon-Peppas, N.A. Peppas, Dynamic and equilibrium swelling behaviour of pH-sensitive hydrogels containing 2-hydroxyethyl methacrylate, *Biomaterials* 11 (1990) 635-644.
- [49] L. Brannon-Peppas, N.A. Peppas, Equilibrium swelling behavior of pH-sensitive hydrogels, *Chem. Eng. Sci.* 46 (1991) 715-722.
- [50] C.L. Bell, N.A. Peppas, Measurement of the swelling force in ionic polymer networks. III. Swelling force of interpolymer complexes, *J. Control. Release* 37 (1995) 277–280.

- [51] E.M. White, J. Yatvin, J.B. Grubbs III, J.A. Bilbrey, J. Locklin, Advances in smart materials: stimuli-responsive hydrogel thin films, *J. Polym. Sci. Pol. Phys.* 51 (2013) 1084–1099.
- [52] A.K. Bajpai, S.K. Shukla, S. Bhanu, S. Kankane, Responsive polymers in controlled drug delivery, *Prog. Polym. Sci.* 33 (2008) 1088–1118.
- [53] S.J. Buwalda, K.W.M. Boere, P.J. Dijkstra, J. Feijen, T. Vermonden, W.E. Hennink, Hydrogels in a historical perspective: from simple networks to smart materials, *J. Control. Release* 190 (2014) 254–273.
- [54] S. Brahim, D. Narinesingh, A. Guiseppi-Elie, Bio-smart hydrogels: co-joined molecular recognition and signal transduction in biosensor fabrication and drug delivery, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 973-981.
- [55] Y. Qiu, K. Park, Environment-sensitive hydrogels for drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53 (2001) 321–339.
- [56] C.C. Lin, A.T. Metters, Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (2006) 1379–1408.
- [57] Z. Zhang, L. Chen, C. Zhao, Y. Bai, M. Deng, H. Shan, X. Zhuang, X. Chen, X. Jing, Thermo- and pH-responsive HPC-g-AA/AA hydrogels for controlled drug delivery applications, *Polymer* 52 (2011) 676-682.
- [58] Z. Zhang, X. Gao, A. Zhang, X. Wu, L. Chen, C. He, X. Zhuang, X. Chen, Biodegradable pH-dependent thermo-sensitive hydrogels for oral insulin delivery, *Macromol. Chem. Physic.* 213 (2012) 713–719.
- [59] L.M. Geever, C.C. Cooney, J.G. Lyons, J.E. Kennedy, M.J.D. Nugent, S. Devery, C.L. Higginbotham, Characterisation and controlled drug release from novel drug-loaded hydrogels, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 1147–1159.
- [60] P. Gupta, K. Vermani, S. Garg, Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery, *Drug Discov. Today* 7 (2002) 569-579.

- [61] D. Schmaljohann, Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (2006) 1655–1670.
- [62] K.S. Chen, Y.A. Ku, H.R. Lin, T.R. Yan, D.C. Sheu, T.M. Chen, F.H. Lin, Preparation and characterization of pH sensitive poly(N-vinyl-2-pyrrolidone/itaconic acid) copolymer hydrogels, *Mater. Chem. Phys.* 91 (2005) 484–489.
- [63] Y.C. Nho, Y.M. Lim, Y.M. Lee, Preparation, properties and biological application of pH-sensitive poly(ethylene oxide) (PEO) hydrogels grafted with acrylic acid (AAc) using gamma-ray irradiation, *Radiat. Phys. Chem.* 71 (2004) 239–242.
- [64] J. Yang, J. Chen, D. Pan, Y. Wan, Z. Wang, pH-sensitive interpenetrating network hydrogels based on chitosan derivatives and alginate for oral drug delivery, *Carbohydr. Polym.* 92 (2013) 719–725.
- [65] A.I. Raafat, Gelatin based pH-sensitive hydrogels for colon-specific oral drug delivery: synthesis, characterization, and *in vitro* release study, *J. Appl. Polym. Sci.* 118 (2010) 2642–2649.
- [66] B. Kim, Y. Shin, pH-sensitive swelling and release behaviors of anionic hydrogels for intelligent drug delivery system, *J. Appl. Polym. Sci.* 105 (2007) 3656–3661.
- [67] W.E. Rudzinski, T. Chipuk, A.M. Dave, S.G. Kumbar, T.M. Aminabhavi, pH-sensitive acrylic-based copolymeric hydrogels for the controlled release of a pesticide and a micronutrient, *J. Appl. Polym. Sci.* 87 (2003) 394–403.
- [68] B.V. Slaughter, A.T. Blanchard, K.F. Maass, N.A. Peppas, Dynamic swelling behavior of interpenetrating polymer networks in response to temperature and pH, *J. Appl. Polym. Sci.* 132 (2015) doi: 10.1002/app.42076.
- [69] M.A. Ward, T.K. Georgiou, Thermoresponsive polymers for biomedical applications, *Polymers* 3 (2011) 1215–1242.
- [70] L. Klouda, A.G. Mikos, Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications - a review, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68 (2008) 34–45.

- [71] 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.
- [72] R.M. Ramanan, P. Chellamuthu, L. Tang, K.T. Nguyen, Development of a temperature-sensitive composite hydrogel for drug delivery applications, *Biotechnol. Progr.* 22 (2006) 118–125.
- [73] K. Song, M. Qiao, T. Liu, B. Jiang, H.M. Macedo, X. Ma, Z. Cui, Preparation, fabrication and biocompatibility of novel injectable temperature-sensitive chitosan/glycerophosphate/collagen hydrogels, *J. Mater. Sci.-Mater. M.* 21 (2010) 2835–2842.
- [74] A.S. Kiremitci, A. Ciftci, M. Ozalp, M. Gumusderelioglu, Novel chlorhexidine releasing system developed from thermosensitive vinyl ether-based hydrogels, *J. Biomed. Mater. Res. B* 83 (2007) 609-614.
- [75] N. Shimada, S. Kidoaki, A. Maruyama, Smart hydrogels exhibiting UCST-type volume changes under physiologically relevant conditions, *RSC Adv.* 4 (2014) 52346-52348.
- [76] I.C. Cortazar, A. Vidaurre, G.G. Ferrer, M.M. Pradas, J.L.G. Ribelles, J.M.M. Duenas, Hydrophilic sponges based on poly(hydroxyethyl acrylate), *J. Non-Cryst. Solids* 287 (2001) 130–134.
- [77] E. Vargun, A. Usanmaz, Polymerization of 2-hydroxyethyl acrylate in bulk and solution by chemical initiator and by ATRP method, *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* 43 (2005) 3957–3965.
- [78] A.S. Aroca, A.J.C. Fernandez, J.L.G. Ribelles, M.M. Pradas, G.G. Ferrer, P. Pissis, Porous poly(2-hydroxyethyl acrylate) hydrogels prepared by radical polymerisation with methanol as diluents, *Polymer* 45 (2004) 8949–8955.

- [79] M.M. Pradas, J.L.G. Ribelles, A.S. Aroca, G.G. Ferrer, J.S. Anton, P. Pissis, Porous poly(2-hydroxyethyl acrylate) hydrogels, *Polymer* 42 (2001) 4667-4674.
- [80] A. Kyritsis, A. Spanoudaki, C. Pandis, L. Hartmann, R. Pelster, N. Shinyashiki, J.C.R. Hernández, J.L.G. Ribelles, M.M. Pradas, P. Pissis, Water and polymer dynamics in poly(hydroxyl ethyl acrylate-co-ethyl acrylate) copolymer hydrogels, *Eur. Polym. J.* 47 (2011) 2391–2402.
- [81] M. Inukai, Y. Jin, C. Yomota, M. Yonese, Preparation and characterization of hyaluronate/hydroxyethyl acrylate blend hydrogel for controlled release device, *Chem. Pharm. Bull.* 48 (2000) 850-854.
- [82] M. Lin, P. Xu, W. Zhong, Preparation, characterization, and release behavior of aspirin-loaded poly(2-hydroxyethyl acrylate)/silica hydrogels, *J. Biomed. Mater. Res. B* 100 (2012) 1114–1120.
- [83] P. Caliceti, F. Veronese, O. Schiavon, Controlled release of proteins and peptides from hydrogels synthesized by gamma ray-induced polymerization, *Farmaco* 47 (1992) 275-286.
- [84] L. Ludriksone, N.G. Bartels, V. Kanti, U. Blume-Peytavi, J. Kottner, Skin barrier function in infancy: a systematic review, *Arch. Dermatol. Res.* 306 (2014) 591–599.
- [85] N. Mayet, Y.E. Choonara, P. Kumar, L.K. Tomar, C. Tyagi, L.C. Du Toit, V. Pillay, A comprehensive review of advanced biopolymeric wound healing systems, *J. Pharm. Sci.* 103 (2014) 2211–2230.
- [86] E.J. Chong, T.T. Phan, I.J. Lim, Y.Z. Zhang, B.H. Bay, S. Ramakrishna, C.T. Lim, Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution, *Acta Biomater.* 3 (2007) 321–330.
- [87] H.C. Korting, C. Schöllmann, R.J. White, Management of minor acute cutaneous wounds: importance of wound healing in a moist environment, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 25 (2011) 130–137.

- [88] J.S. Boateng, K.H. Matthews, H.N. Stevens, G.M. Eccleston, Wound healing dressings and drug delivery systems: a review, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 2892-2923.
- [89] H.E. Koschwanetz, E. Broadbent, The use of wound healing assessment methods in psychological studies: a review and recommendations, *Brit. J. Health Psych.* 16 (2011) 1–32.
- [90] R. Eldor, I. Raz, A.B. Yehuda, A.J.M. Boulton, New and experimental approaches to treatment of diabetic foot ulcers: a comprehensive review of emerging treatment strategies, *Diabetic Med.* 21 (2004) 1161–1173.
- [91] S. Zimny, H. Schatz, M. Pfohl, Determinants and estimation of healing times in diabetic foot ulcers, *J. Diabetes Complicat.* 16 (2002) 327–332.
- [92] K.M. Pickwell, V.D. Siersma, M. Kars, P.E. Holstein, N.C. Schaper, Eurodiale consortium, Diabetic foot disease: impact of ulcer location on ulcer healing, *Diabetes-Metab. Res.* 29 (2013) 377–383.
- [93] F. Mizokami, Y. Takahashi, K. Hasegawa, H. Hattori, K. Nishihara, H. Endo, K. Furuta, Z. Isogai, Pressure ulcers induced by drug administration: A new concept and report of four cases in elderly patients, *J. Dermatol.* 43 (2016) 436–438.
- [94] J. Boateng, O. Catanzano, Advanced therapeutic dressings for effective wound healing - A review, *J. Pharm. Sci.* 104 (2015) 3653–3680.
- [95] T.J. Phillips, Current approaches to venous ulcers and compression, *Dermatol. Surg.* 27 (2001) 611–621.
- [96] M.C. Stacey, Investigation and treatment of chronic venous ulcer disease, *ANZ J. Surg.* 71 (2001) 226–229.
- [97] <http://blog.mediligence.com/2013/01/29/wound-prevalence-and-wound-management-2012-2020/>.

- [98] <http://blog.mediligence.com/2016/01/28/global-wound-management-market-segment-size-growth-to-2024/>.
- [99] S. Schreml, R.M. Szeimies, L. Prantl, M. Landthaler, P. Babilas, Wound healing in the 21st century, *J. Am. Acad. Dermatol.* 63 (2010) 866-881.
- [100] N. Laurens, P. Koolwijk, M.P.M. De Maat, Fibrin structure and wound healing, *J. Thromb. Haemost.* 4 (2006) 932–939.
- [101] J.M. Shah, E. Omar, D.R. Pai, S. Sood, Cellular events and biomarkers of wound healing, *Indian J. Plast. Surg.* 45 (2012) 220–228.
- [102] N. Pazyar, R. Yaghoobi, E. Rafiee, A. Mehrabian, A. Feily, Skin wound healing and phytomedicine: a review, *Skin Pharmacol. Physi.* 27 (2014) 303–310.
- [103] A. Nauta, G.C. Gurtner, M.T. Longaker, Wound healing and regenerative strategies, *Oral Dis.* 17 (2011) 541–549.
- [104] W.K. Stadelmann, A.G. Digenis, G.R. Tobin, Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds, *Am. J. Surg.* 176(2A) (1998) 26S–38S.
- [105] R.F. Diegelmann, M.C. Evans, Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing, *Front. Biosci.* 9 (2004) 283-289.
- [106] R. Forrest, Early history of wound treatment, *J. Roy. Soc. Med.* 75 (1982) 198–205.
- [107] G. Majno, *The healing hand: man and wound in the ancient world*, Harvard University Press, 1991.
- [108] J.B. Shah, The History of Wound Care, *J. Am. Col. Certif. Wound Spec.* 3 (2011) 65–66.
- [109] O.A. Moore, L.A. Smith, F. Campbell, K. Seers, H.J McQuay, R.A. Moore, Systematic review of the use of honey as a wound dressing, *BMC Complementary and Alternative Medicine* 1 (2001) doi:10.1186/1472-6882-1-2.

- [110] D. Queen, H. Orsted, H. Sanada, G. Sussman, A dressing history, *Int. Wound J.* 1 (2004) 59-77.
- [111] S. Dhivya, V.V. Padma, E. Santhini, Wound dressings – a review, *Biomedicine* 5 (2015) 24-28.
- [112] P.S. Murphy, G.R.D. Evans, Advances in wound healing: a review of current wound healing products, *Plast. Surg. Int.* 2012 (2012) doi: 10.1155/2012/190436.
- [113] L.G. Ovington, Advances in wound dressings, *Clin. Dermatol.* 25 (2007) 33–38.
- [114] T. Helfman, L. Ovington, V. Falanga, Occlusive dressings and wound healing, *Clin. Dermatol.* 12 (1994) 121-127.
- [115] I.R. Sweeney, M. Miraftab, G. Collyer, A critical review of modern and emerging absorbent dressings used to treat exuding wounds, *Int. Wound J.* 9 (2012) 601–612.
- [116] W.H. Eaglestein, Moist wound healing with occlusive dressings: a clinical focus, *Dermatol. Surg.* 27 (2001) 175-181.
- [117] S. Bhowmick, V. Koul, Assessment of PVA/silver nanocomposite hydrogel patch as antimicrobial dressing scaffold: synthesis, characterization and biological evaluation, *Mater. Sci. Eng. C* 59 (2016) 109–119.
- [118] J.R. Hanna, J.A. Giacomelli, A review of wound healing and wound dressing products, *J. Foot Ankle Surg.* 36 (1997) 2-14.
- [119] M. Madaghiele, C. Demitri, A. Sannino, L. Ambrosio, Polymeric hydrogels for burn wound care: advanced skin wound dressings and regenerative templates, *Burns & Trauma*, 2 (2014) 153-161.
- [120] B. Balakrishnan, M. Mohanty, P.R. Umashankar, A. Jayakrishnan, Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin, *Biomaterials* 26 (2005) 6335–6342.

- [121] J. Kopecek, J. Yang, Hydrogels as smart biomaterials, *Polym. Int.* 56 (2007) 1078–1098.
- [122] J.M. Rosiak, Radiation formation of hydrogels for drug delivery, *J. Control. Release* 31 (1994) 9–19.
- [123] S.O. Rogero, S.M. Malmonge, A.B. Lugao, T.I. Ikeda, L. Miyamaru, A.S. Cruz, Biocompatibility study of polymeric biomaterials, *Artif. Organs* 27 (2003) 424–427.
- [124] C.J. De Groot, M.J.A. Van Luyn, W.N.E. Van Dijk-Wolthuis, J.A. Cadee, J.A. Plantinga, W. Den Otter, W.E. Hennink, *In vitro* biocompatibility of biodegradable dextran-based hydrogels tested with human fibroblasts, *Biomaterials* 22 (2001) 1197–1203.
- [125] E. Karadag, D. Saraydin, S. Cetinkaya, O. Guven, *In vitro* swelling studies and preliminary biocompatibility evaluation of acrylamide-based hydrogels, *Biomaterials* 17 (1996) 67–70.
- [126] X. Huang, C.S. Brazel, On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems, *J. Control. Release* 73 (2001) 121–136.
- [127] R.A. Siegel, M.J. Rathbone, Overview of controlled release mechanisms in J. Siepmann, R.A. Siegel, M.J. Rathbone (eds.), *Fundamentals and applications of controlled release drug delivery, Advances in Delivery Science and Technology, Controlled Release Society* 2012, Springer US, pp 19–43.
- [128] P.G. Bowler, B.I. Duerden, D.G. Armstrong, Wound microbiology and associated approaches to wound management, *Clin. Microbiol. Rev.* 14 (2001) 244–269.
- [129] D. Church, S. Elsayed, O. Reid, B. Winston, R. Lindsay, Burn wound infections, *Clin. Microbiol. Rev.* 19 (2006) 403–434.
- [130] H. Vindenes, R. Bjerckne, Microbial colonization of large wounds, *Burns* 21 (1995) 575–579.

- [131] K. Twum-Danso, C. Grant, S.A. Al-Suleiman, S. Abdel-Khader, M.S. Al-Awami, H. Al-Breiki, S. Taha, A.A. Ashloor, L. Wosornu, Microbiology of postoperative wound infection: a prospective study of 1770 wounds, *J. Hosp. Infect.* 21 (1992) 29-37.
- [132] G. Revathi, J. Puri, B.K. Jain, Bacteriology of burns, *Burns* 24 (1998) 347–349.
- [133] P. Vowden, K. Vowden, K. Carville, Antimicrobials made easy, *Wounds Int.* 2 (2011) 1-6.
- [134] S.P. Tan, P. McLoughlin, L. O’Sullivan, M.L. Prieto, G.E. Gardiner, P.G. Lawlor, H. Hughes, Development of a novel antimicrobial seaweed extract-based hydrogel wound dressing, *Int. J. Pharm.* 456 (2013) 10–20.
- [135] I. Liakos, L. Rizzello, D.J. Scurr, P.P. Pompa, I.S. Bayer, A. Athanassiou, All-natural composite wound dressing films of essential oils encapsulated in sodium alginate with antimicrobial properties, *Int. J. Pharm.* 463 (2014) 137–145.
- [136] N. Beyth, Y. Houry-Haddad, A. Domb, W. Khan, R. Hazan, Alternative antimicrobial approach: nano-antimicrobial materials, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2015 (2015) doi: 10.1155/2015/246012.
- [137] Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc, Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients, Washington (DC), National Academies Press (US), 2001.
- [138] G. Grass, C. Rensing, M. Solioz, Metallic copper as an antimicrobial surface, *Appl. Environ. Microb.* 77 (2011) 1541–1547.
- [139] J.P. Ruparelia, A.K. Chatterjee, S.P. Duttagupta, S. Mukherji, Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles, *Acta Biomater.* 4 (2008) 707-716.
- [140] A. Mikolay, S. Huggett, L. Tikana, G. Grass, J. Braun, D.H. Nies, Survival of bacteria on metallic copper surfaces in a hospital trial, *Appl. Microbiol. Biot.* 87 (2010) 1875–1879.

- [141] S.W.J. Gould, M.D. Fielder, A.F. Kelly, M. Morgan, J. Kenny, D.P. Naughton, The antimicrobial properties of copper surfaces against a range of important nosocomial pathogens, *Ann. Microbiol.* 59 (2009) 151-156.
- [142] S. Cometa, R. Iatta, M.A. Ricci, C. Ferretti, E. De Giglio, Analytical characterization and antimicrobial properties of novel copper nanoparticle-loaded electrosynthesized hydrogel coatings, *J. Bioact. Compat. Pol.* 28 (2013) 508– 522.
- [143] H. Xie, Y.J. Kang, Role of copper in angiogenesis and its medicinal implications, *Curr. Med. Chem.* 16 (2009) 1304-1314.
- [144] G. Hu, Copper stimulates proliferation of human endothelial cells under culture, *J. Cell. Biochem.* 69 (1998) 326–335.
- [145] A. Simeon, H. Emonard, W. Hornebeck, F.X. Maquart, The tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺ stimulates matrix metalloproteinase-2 expression by fibroblast cultures, *Life Sci.* 67 (2000) 2257–2265.
- [146] E.D. Harris, J.K. Rayton, J.E. Balthrop, R.A. DiSilvestro, M. Garcia-de-Quevedo, Copper and the synthesis of elastin and collagen, *Ciba Found Symp.* 79 (1980) 163-182.
- [147] W. Klinkajon, P. Supaphol, Novel copper (II) alginate hydrogels and their potential for use as anti-bacterial wound dressings, *Biomed. Mater.* 9 (2014) doi: 10.1088/1748-6041/9/4/045008.
- [148] A. Gopal, V. Kant, A. Gopalakrishnan, S.K. Tandan, D. Kumar, Chitosan-based copper nanocomposite accelerates healing in excision wound model in rats, *Eur. J. Pharmacol.* 731 (2014) 8–19.
- [149] J.J. Hostynek, H.I. Maibach, Copper hypersensitivity: dermatologic aspects, *Dermatol. Ther.* 17 (2004) 328–333.
- [150] A.B.G. Lansdown, U. Mirastschijski, N. Stubbs, E. Scanlon, M.S. Agren, Zinc in wound healing: theoretical, experimental, and clinical aspects, *Wound Repair. Regen.* 15 (2007) 2–16.

- [151] M. Ashfaq, N. Verma, S. Khan, Copper/zinc bimetal nanoparticles-dispersed carbon nanofibers: A novel potential antibiotic material, *Mater. Sci. Eng. C* 59 (2016) 938–947.
- [152] B. Xu, Y. Li, F. Gao, X. Zhai, M. Sun, W. Lu, Z. Cao, W. Liu, High strength multifunctional multiwalled hydrogel tubes: ion triggered shape memory, antibacterial, and anti-inflammatory efficacies, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7 (2015) 16865–16872.
- [153] N. Jones, B. Ray, K.T. Ranjit, A.C. Manna, Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms, *FEMS Microbiol. Lett.* 279 (2008) 71–76.
- [154] Y. Liu, L. He, A. Mustapha, H. Li, Z.Q. Hu, M. Lin, Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7, *J. Appl. Microbiol.* 107 (2009) 1193-201.
- [155] M.C. Straccia, G. Gomez d’Ayala, I. Romano, P. Laurienzo, Novel zinc alginate hydrogels prepared by internal setting method with intrinsic antibacterial activity, *Carbohydr. Polym.* 125 (2015) 103–112.
- [156] J.S. Park, J. Kuang, H.J. Gwon, Y.M. Lim, S.I. Jeong, Y.M. Shin, M.S. Khil, Y.C. Nho, Synthesis and characterization of zinc chloride containing poly(acrylic acid) hydrogel by gamma irradiation, *Radiat. Phys. Chem.* 88 (2013) 60–64.
- [157] S.L. Percival, W. Slone, S. Linton, T. Okel, L. Corum, J.G. Thomas, The antimicrobial efficacy of a silver alginate dressing against a broad spectrum of clinically relevant wound isolates, *Int. Wound J.* 8 (2011) 237–243.
- [158] T. Maneerung, S. Tokura, R. Rujiravanit, Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing, *Carbohydr. Polym.* 72 (2008) 43–51.
- [159] P. Aramwit, P. Muangman, N. Namviriyachote, T. Srichana, *In vitro* evaluation of the antimicrobial effectiveness and moisture binding properties of wound dressings, *Int. J. Mol. Sci.* 11 (2010) 2864-2874.

- [160] B.S. Atiyeh, M. Costagliola, S.N. Hayek, S.A. Dibo, Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature, *Burns* 33 (2007) 139–148.
- [161] R. Singh, D. Singh, Radiation synthesis of PVP/alginate hydrogel containing nanosilver as wound dressing, *J. Mater. Sci.-Mater. Med.* 23 (2012) 2649–2658.
- [162] M. Jaiswal, V. Koul, A.K. Dinda, *In vitro* and *in vivo* investigational studies of a nanocomposite-hydrogel-based dressing with a silver-coated chitosan wafer for full-thickness skin wounds, *J. Appl. Polym. Sci.* 133 (2016) doi: 10.1002/app.43472.
- [163] P.L. Ritger, N.A. Peppas, A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swelling devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs, *J. Control. Release* 5 (1987) 23–36.
- [164] H. Scott, Swelling kinetics of polymers, *J. Macromol. Sci. B* 31 (1992) 1-9.
- [165] Y. Yin, Y. Yang, H. Xu, Hydrogels for colon-specific drug delivery: swelling kinetics and mechanism of degradation *in vitro*, *J. Polym. Sci. Pol. Phys.* 39 (2001) 3128-3137.
- [166] N.A. Peppas, J.J. Sahlin, A simple equation for the description of solute release.III. Coupling of diffusion and relaxation, *Int. J. Pharm.* 57 (1989) 169-172.
- [167] K. Yamaoka, T. Nakagawa, T. Uno, Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations, *J. Pharmacokinet. Biop.* 6 (1978) 165-175.
- [168] G. Lu, K. Ling, P. Zhao, Z. Xu, C. Deng, H. Zheng, J. Huang, J. Chen, A novel in situ-formed hydrogel wound dressing by the photocross-linking of a chitosan derivative *Wound Repair Regen.* 18 (2010) 70-79.
- [169] D. Prabu, C.B. Tharani, N. Narayanan, A. Maheswaran, Biomedical evaluation of polymeric hydrogel dermal patches as wound dressing, *IJAPR* 2 (2011) 569-575.

- [170] V. Stanic, S. Dimitrijevic, D.G. Antonovic, B.M. Jokic, S.P. Zec, S.T. Tanaskovic, S. Raicevic, Synthesis of fluorine substituted hydroxyapatite nanopowders and application of the central composite design for determination of its antimicrobial effects, *Appl. Surf. Sci.* 290 (2014) 346-352.
- [171] A. Dhawan, M. Bajpayee, D. Parmar, Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models, *Cell Biol. Toxicol.* 25 (2009) 5-32.
- [172] J. Diaz-Visurraga, C. Daza, C. Pozo, A. Becerra, C. von Plessing, A. Garcia, Study on antibacterial alginate-stabilized copper nanoparticles by FT-IR and 2D-IR correlation spectroscopy, *Int. J. Nanomed.* 7 (2012) 3597-3612.
- [173] Y. Liu, D. Liu, S. Chen, T. Tung, T. Liu, In situ synthesis of hybrid nanocomposite with highly order arranged amorphous metallic copper nanoparticle in poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and its potential for blood-contact uses, *Acta Biomater.* 4 (2008) 2052–2058.
- [174] R.D. Harris, J.T. Auletta, S.A.M. Motlagh, M.J. Lawless, N.M. Perri, S. Saxena, L.M. Weiland, D.H. Waldeck, W.W. Clark, T.Y. Meyer, Chemical and electrochemical manipulation of mechanical properties in stimuli-responsive copper-cross-linked hydrogels, *ACS Macromol. Lett.* 2 (2013) 1095–1099.
- [175] P.O. Guglielmi, E.G. Herbert, L. Tartivel, M. Behl, A. Lendlein, N. Huber, E.T. Lilleodden, Mechanical characterization of oligo(ethylene glycol)-based hydrogels by dynamic nanoindentation experiments, *J. Mech. Behav. Biomed.* 46 (2015) 1–10.
- [176] Z. Lian, L. Ye, Synthesis and properties of carboxylated poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressings, *J. Polym. Res.* 22 (2015) 72:11p.
- [177] F. Song, L.M. Zhang, J.F. Shi, N.N. Li, Viscoelastic and fractal characteristics of a supramolecular hydrogel hybridized with clay nanoparticles, *Colloid. Surface. B* 81 (2010) 486–491.
- [178] V.V. Panic, P.M. Spasojevic, T.S. Radoman, E.S. Dzunuzovic, I.G. Popovic, S.J. Velickovic, Methacrylic acid based polymer networks with a high content of

unfunctionalized nanosilica: particle distribution, swelling, and rheological properties, *J. Phys. Chem. C* 119 (2015) 610–622.

[179] S. Lj. Tomic, J.S. Jovasevic, J.M. Filipovic, Hemocompatibility, swelling and thermal properties of hydrogels based on 2-hydroxyethyl acrylate, itaconic acid and poly(ethylene glycol) dimethacrylate, *Polym. Bull.* 70 (2013) 2895-2909.

[180] D. Queen, J.D.S. Gaylor, J.H. Ebans, J.M. Courtney, An *in vitro* assessment of wound dressing conformability, *Biomaterials* 8 (1987) 372-376.

[181] B. Kickhofen, H. Wokalek, D. Scheel, H. Ruh, Chemical and physical properties of a hydrogel wound dressing, *Biomaterials* 7 (1986) 67-72.

[182] R.N. Dave, H.M. Joshi, V.P. Venugopalan, Biomedical evaluation of a novel nitrogen oxides releasing wound dressing, *J. Mater. Sci.- Mater. M* 23 (2012) 3097-3106.

[183] T.R. Thomsen, M.S. Aasholm, V.B. Rudkjobing, A.M. Saunders, T. Bjarnsholt, M. Givskov, K. Kirketerp-Moller, P.H. Nielsen, The bacteriology of chronic venous leg ulcer examined by culture-independent molecular methods, *Wound Repair Regen.* 18 (2010) 38-49.

[184] H.K. Estabhati, P.P. Kashani, F. Ghanaatpisheh, Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics, *Burns* 28 (2002) 340-348.

[185] M. Jaiswal, V. Koul, Assessment of multicomponent hydrogel scaffolds of poly(acrylic acid-2-hydroxy ethyl methacrylate)/gelatin for tissue engineering applications, *J. Biomater. Appl.* 27 (2013) 848-861.

[186] S. Vandghanooni, M. Eskandani, Comet assay: a method to evaluate genotoxicity of nano-drug delivery system, *BioImpacts* 1 (2011) 87-97.

[187] D.W. Fairbairn, P.L. Olive, K.L. O'Neill, The comet assay: a comprehensive review, *Mutat. Res.* 339 (1995) 37-59.

Биографија аутора

Јована С. Вуковић (рођ. Јовашевић) рођена је у Пожеги, 07.07.1984. године. Основну школу и Гимназију завршила је у Ариљу. Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду уписала је 2003. године. Дипломирала је 2008. године на Катедри за Органску хемијску технологију, са просечном оценом 8,76, одбранивши дипломски рад на тему „Антимикробна активност хидрогелова на бази поли(винил пиролидона) са сребром“ са оценом 10. 2009. године уписала је докторске студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду.

Од 2010. године запослена је у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета. У периоду од 2010. до 2011. године била је ангажована на два научно-истраживачка пројекта: „Развој нанокompозита на бази хидрогелова за примене у реконструктивној хирургији“ (MNTR 19027) и „Регенерација скелетних ткива помогнута биоматеријалима као ткивним матрицама - *in vivo* и *in vitro* студија“ (MNTR 145072). Од 2011. је ангажована на два пројекта: „Хемијско и структурно дизајнирање наноматеријала за примену у медицини и инжењерству ткива“ (MNTR 172026) и „Синтеза и карактеризација нових функционалних полимера и полимерних нанокompозита“ (MNTR 172062). Од 2014. године је ангажована на међународном пројекту (руководилац проф. др Симонида Томић): „Intelligent Scaffolds as a Tool for Advanced Tissue Regeneration“ (Serbia-Slovenia-Switzerland, SCOPES – Swiss National Science Foundation).

Изјава о ауторству

Изјава о ауторству

Прилог 1.

Потписани-а Јована Вуковић
број индекса 4013/2009

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

СИНТЕЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ХИДРОГЕЛОВА НА БАЗИ 2-ХИДРОКСИМЕТИЛ АКРИЛАТА
И ИТАКОНСКЕ КИСЕЛИНЕ ЗА ПРИМЕНУ У КОНТРОЛИСАНУ ОТПУШТАЊУ ТЕРАПЕУТСКИ АКТИВНИХ
ЈОНА МЕТАЛА

- 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, 16.06.2016.

Јована Вуковић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Прилог 2.

Име и презиме аутора Јована Вуковић
Број индекса 4013/2009
Студијски програм ХЕМИЈСКО ИНЖЕЊЕРСТВО
Наслов рада СИНТЕЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ХИДРОГЕЛА НА БАЗИ 2-ХИДРОКСИЕТИЛ АКРИЛАТА
И ИТАЛОНСКЕ КИСЕЛИНЕ ЗА ПРИМЕНУ У КОНТРОЛИСАНМ ОТПУСКАЊУ ТЕРАПЕУТСКИ АКТИВНИХ ЗОНА МЕТАЛА
Ментор проф. др Симоновић Томит
Потписани/а Јована Вуковић

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, 16.06.2016.

Јована Вуковић

Изјава о коришћењу

Изјава о коришћењу

Прилог 3.

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

СИНТЕЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ХИДРОГЕЛОВА НА БАЗИ 2-ХИДРОКСИМЕТИЛ АКРИЛАТА И ИТАКОНСКЕ КИСЕЛИЦЕ ЗА ПРИМЕНУ У КОНТРОЛИСАНУ ОТПУШТАЊУ ТЕРАПЕУТСКИ АКТИВНИХ ЈОНА МЕТАЛА

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, 16.06.2016.

Јована Бујинић

1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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.