

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ

Вукашин Ђ. Угриновић

**Композитни хидрогелови на бази
интерпенетрирајућих мрежа винилних и
природних полимера и наночестица
калцијум-фосфата: синтеза, својства и
примена у биомедицини**

Докторска дисертација

Београд, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Vukasin D. Ugrinovic

**Composite hydrogels based on
interpenetrating networks of vinyl and natural
polymers and nano-particles of calcium-
phosphates: Synthesis, properties and
application in biomedicine**

Doctoral Disertation

Belgrade, 2023.

Ментори:

др Ђорђе Вељовић, ванредни професор
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки
факултет

др Весна Панић, виши научни сарадник
Универзитета у Београду, Иновациони центар
Технолошко-металуршког факултета

Чланови комисије:

др Ђорђе Јанаћковић, редовни професор
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки
факултет

др Мелина Калагасидис Крушић, редовни професор
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки
факултет

др Маја Марковић, научни сарадник Универзитета у
Београду, Иновациони центар Технолошко-
металуршког факултета

др Бојан Божић, виши научни сарадник
Универзитета у Београду, Биолошки факултет

др Биљана Љујић, ванредни професор Универзитета
у Крагујевцу, Факултет медицинских наука

Датум одбране: _____

Захвалница

Узимајући у обзир суштинску природу човека као социјалног бића предодређеног да живи, ради и постоји у заједници, односно да у већој или мањој мери има потребу за другим људима, јасно је да је у корену сваке људске активности интеракција са другим људима и да је сваки рад на крају, ако не продукт интеракције у заједници, онда тежња човека за социјализацијом. Чак и ако се занемари социјална природа човека, и узме се у обзир све већа мултидисциплинарност савремених научних дисциплина, јасно је да је сваки научно-истраживачки рад, у већој или мањој мери, производ заједничке активности групе људи. Према томе, и научно-истраживачки рад уобличен у овој докторској дисертацији плод је вишегодишњег тимског рада и заједничког уложеног напора ментора, професора, колега, сарадника, пријатеља и чланова породице, без чије љубави, подршке, мотивације, стрпљења и разумевања његова реализација не би била могућа.

Професору др Ђорђу Вељовићу, свом ментору и пријатељу, сам неизмерно захвалан на несебичној подршци, стрпљењу, ентузијазму, инспирацији и саветима који су ми помогли не само да изаберем пут академске каријере, него и да се на том путу на најбољи начин развијам и обликујем у личном и професионалном смислу.

Коменторки др Весни Панић, захваљујем на усрдној помоћи приликом осмишљавања, реализације и писања научних радова и докторске дисертације.

Др Бојану Божићу, вишем научном сараднику, се најискреније захваљујем за посвећеност, преданост и помоћ током свих година бављења научно-истраживачким радом, чији су савети, сугестије и критике значајно допринели успешном објављивању неколико научних радова и коначном облику докторске дисертације.

Професорима др Ђорђу Јанаћковићу и др Ради Петровић одајем велико признање за безгранично стрпљење, разумевање, труд и искрену посвећеност у развоју личних и професионалних квалитета мене и свих млађих кадрова наше катедре.

Професору др Владимиру Павићевићу, истинском српском родољубу и просветитељу, дугујем велику захвалност за значајан утицај на унапређење мојих духовно-моралних начела, као и за дугогодишњи, предан и пожртвован рад на помоћи српском становништву окупираног Космета, кроз који су прошле, и духовно и људски се оплемењивале, многе генерације студената Технолошко-металушког факултета.

Колегама са катедре за полимерно инжењерство, др Маји Марковић, др Сањи Савић и др Павлу Спасојевићу захваљујем на несебичној подршци током израде научних радова пре свега у виду корисних савета и сугестија, али и различитих метода карактеризације попут механичког тестирања и термогравиметријске анализе.

Колегама др Наташи Обрадовић и др Предрагу Петровићу искрено захваљујем на великој помоћи у припреми узорака методом лиофилизације.

Професоркама др Биљани Љујић и др Биљани Божјић, и сарадницама др Марини Ковачевић и др Тањи Лунић захваљујем за помоћ у биолошкој карактеризацији материјала МТТ методом.

Колегиници др Милице Милутиновић захваљујем за помоћ у одређивању антимикробних својстава синтетисаних материјала.

Драгим пријатељима и колегама са катедре за НХТ Тамари, Александри, Милице, Марији, Јани, Немањи, Вељку, Жељку и чика Миши, захваљујем на дружењу, сарадњи, подршци и свим дивним успоменама које смо изградили током протеклих 5 година.

Свим пријатељима, кумовима, колегама и сарадницима захвалан сам за љубав, разумевање и подршку у различитим фазама живота.

Посебно се захваљујем родитељима, сестри, брату и осталим члановима породице зато што су ми у животу омогућили да радим оно што волим и личним примером ме васпитавали у духу највиших људских врлина човекољубља, пожртвовања, племенитости и љубави према отаџбини.

Композитни хидрогелови на бази интерпенетрирајућих мрежа винилних и природних полимера и наночестица калцијум-фосфата: Синтеза, својства и примена у биомедицини

РЕЗИМЕ

У овој докторској дисертацији синтетисани су и испитани различити хидрогелови чија се структура базира на интерпенетрирајућим мрежама поли(метакрилне киселине) (ПМК) и природних полимера (желатина, алгината и хитозана), при чему су детаљнија истраживања посвећена испитивању својстава хидрогелова на бази ПМК и желатина (ПМКЖ), који су показали најбоља механичка својства и задовољавајућу биокомпатибилност. Највише вредности затезне чврстоће, жилавости, притисне чврстоће и модула ПМКЖ хидрогелова износиле су $1,44 \pm 0,17$ МПа, $4,91 \pm 0,51$ MJ m⁻³, $24,81 \pm 5,85$ МПа и $0,75 \pm 0,06$ МПа, редом, при чему је удео воде у структури био у опсегу од 49-68%. Са додатком NaOH, добијени су ПМКЖ-Na хидрогелови повећане порозности, одличних механичких својстава и биокомпатибилности, погодни за примену у биомедицини. Удео воде у структури ПМКЖ-Na хидрогелова износио је од 50-80%, док су највише вредности притисне чврстоће и модула износиле $15,7 \pm 0,46$ и $0,16 \pm 0,01$ МПа, редом. Повећање односа желатин/ПМК у структури хидрогелова, као и смањење садржаја умреживача, допринело је повећању разградивости у симулираним физиолошким условима, док су се хидрогелови без умреживача скоро у потпуности разградили након 14 дана експеримента.

Након синтезе и карактеризације ПМКЖ хидрогелова, испитана је могућност инкорпорације честица биоактивне керамике у циљу добијања композитних хидрогелова погодних за инжењерство коштаног ткива. Биоактивна калцијум-фосфатна фаза коришћена као пунилац за композите састојала се од честица калцијум-хидроксиапатита (ХАП) и β-трикалцијум фосфата (β-ТЦП), добијених хидротермалним поступком и накнадном калцинацијом у случају β-ТЦП. Синтетисани композитни хидрогелови су се одликовали изразито порозном структуром (порозност у опсегу од 83-93%), прихватљивом биокомпатибилношћу (вијабилност L929 ћелија је била већа од 75% код свих узорака) и рН осетљивошћу. Механичка својства композита побољшана су са повећањем садржаја биоактивне керамике, при чему је додаток ХАП у односу на β-ТЦП имао израженији ефекат на побољшање механичких својстава.

Поред наведених истраживања, у овој дисертацији је испитан и утицај поли(етиленгликол)диакрилата (ПЕГДА) на својства хидрогелова, и могућност замене најчешће примењиваног умреживача за добијање хидрогелова на бази винилних мономера - N,N'-метиленбисакриламида (МБА). ПМК-ПЕГДА хидрогелови су показали значајно боља механичка својства у односу на ПМК-МБА, при чему су задржали својство рН-осетљивости. *In vitro* тестови отпуштања лекова, показали су да су ПМК-ПЕГДА хидрогелови погодни за контролисано отпуштање нестероидног антиупалног лека - оксапрозина у дебело црево. Осим умрежавања хемијским умреживачима на бази акрилата, показано је да се ПМК хидрогелови могу додатно умрежити и јонским везама помоћу вишевалентних катјона метала, при чему су на степен умрежавања утицали количина наелектрисања и јонски радијус катјона.

Кључне речи: поли(метакрилна киселина); желатин; интерпенетрирајуће мреже, композитни хидрогелови; калцијум-хидроксиапатит; β-трикалцијум-фосфат; механичка својства; отпуштање лекова;

Научна област: Технолошко инжењерство

Ужа научна област: Инжењерство материјала

УДК број:

Composite hydrogels based on interpenetrating networks of vinyl and natural polymers and calcium phosphate nanoparticles: Synthesis, properties and application in biomedicine

ABSTRACT

In this doctoral dissertation, various hydrogels based on interpenetrating networks of poly(methacrylic acid) (PMAA) and natural polymers (gelatin, alginate and chitosan) were synthesized and characterized, whereby the greatest attention was paid to the examination of hydrogels based on PMAA and gelatin (PMAG), which showed the best mechanical properties and satisfactory biocompatibility. The highest values of tensile strength, toughness, compressive strength and modulus of PMAG hydrogels were 1.44 ± 0.17 MPa, 4.91 ± 0.51 MJ m⁻³, 24.81 ± 5.85 MPa and 0.75 ± 0.06 MPa, respectively, while the water content (WC) of hydrogels was in the range of 49-68%. With the addition of NaOH, PMAG-Na hydrogels with increased porosity, excellent mechanical properties and biocompatibility, suitable for use in biomedicine, were obtained. The WC of PMAG-Na hydrogels was 50-80%, while the highest values of compressive strength and modulus were 15.7 ± 0.46 and 0.16 ± 0.01 MPa, respectively. Increasing the PMAA/gelatin ratio in the structure of hydrogels, as well as reducing the content of crosslinkers, contributed to the increase of degradability in simulated physiological conditions, while hydrogels without crosslinkers were almost completely degraded after 14 days of the experiment.

After the synthesis and characterization of PMAG hydrogels, the possibility of incorporating bioactive ceramic particles was investigated, in order to obtain composite hydrogels suitable for bone tissue engineering. The bioactive calcium-phosphate phase used as a filler for the composites consisted of calcium-hydroxyapatite (HAP) and β -tricalcium-phosphate (β -TCP) particles, obtained by a hydrothermal process and subsequent calcination in the case of β -TCP. The synthesized composite hydrogels were characterized by a highly porous structure (porosity in the range of 83-93%), good biocompatibility (viability of L929 cells was greater than 75% in all samples) and pH sensitivity. The mechanical properties of the composite improved with the increase in the content of bioactive ceramics, while the addition of HAP had a more pronounced effect on improving the mechanical properties compared to β -TCP.

In addition, this dissertation also examined the influence of poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) on the properties of hydrogels, and the possibility of replacing the most commonly used crosslinker for vinyl-based hydrogels - *N,N'*-methylenebisacrylamide (MBA). PMAA-PEGDA hydrogels showed significantly better mechanical properties compared to PMAA-MBA, while retaining the property of pH sensitivity. *In vitro* drug release tests showed that PMAA-PEGDA hydrogels are suitable for controlled release of oxaprozin in the colon. In addition to crosslinking with acrylate-based chemical crosslinkers, it was shown that PMAA hydrogels can be additionally crosslinked by ionic bonds using multivalent metal cations, where the degree of crosslinking was influenced by the amount of charge and the ionic radius of the cation.

Keywords: poly(methacrylic acid); gelatin; interpenetrating networks, composite hydrogels; calcium-hydroxyapatite; β -tricalcium-phosphate; mechanical properties; drug release;

Scientific field: Technological Engineering

Scientific subfield: Material Engineering

UDC Number:

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО	2
2.1. Хидрогелови: Појам и особине.....	2
2.1.1. Методе синтезе хидрогелова.....	3
2.1.2. Класификација хидрогелова.....	5
2.1.3. Хидрогелови осетљиви на спољашње стимулансе.....	6
2.1.3.1. рН-осетљиви хидрогелови.....	7
2.1.3.2. Хидрогелови на бази ПМК.....	9
2.2. Интерпенетрирајуће полимерне мреже – основни концепт.....	10
2.2.1. ИПМ хидрогелови.....	13
2.2.2. ИПМ хидрогелови на бази ПМК и природних полимера за примену у биомедицини.....	14
2.3. Калцијум-фосфатна керамика.....	17
2.4. Хидрогелови у медицини: примена и захтеви.....	20
2.4.1. Хидрогелови за инжењерство ткива хрскавице.....	21
2.4.2. Хидрогелови за инжењерство коштаног ткива.....	22
2.4.3. Хидрогелови за контролисано отпуштање активних супстанци.....	28
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	29
3.1. Реактанти.....	30
3.2. Синтеза калцијум-фосфатних пунилаца.....	30
3.3. Синтеза хидрогелова.....	31
3.3.1. Синтеза ИПМ хидрогелова ПМК и природних полимера.....	31
3.3.2. Синтеза физички умрежених ПМКЖ хидрогелова.....	32
3.3.3. Синтеза ПМКЖ хидрогелова са додатком умреживача и NaOH.....	32
3.3.4. Синтеза хемијски умрежених ПМК хидрогелова коришћењем различитих умреживача.....	33
3.3.5. Синтеза ПМК хидрогелова додатно умрежених јонским везама.....	33
3.3.6. Синтеза композитних хидрогелова.....	34
3.4. Методе карактеризације.....	34
3.4.1. Одређивање степена конверзије мономера у полимерну мрежу (СК).....	34
3.4.2. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (ФТИР).....	34
3.4.3. Диференцијално-скенирајућа калориметрија (ДСК).....	35
3.4.4. Рендгенска дифракциона анализа (РДА).....	35
3.4.5. Скенирајућа електронска микроскопија (СЕМ).....	35
3.4.6. Бубрење.....	35
3.4.7. Равнотежни садржај воде (СВ).....	35
3.4.8. Порозност.....	36
3.4.9. Разградња хидрогелова у симулираним физиолошким условима.....	36
3.4.10. Механичка својства.....	36
3.4.11. Степен самоисцељивости (ССИ).....	36
3.4.12. Способност памћења облика.....	37
3.4.13. <i>In vitro</i> отпуштање активних супстанци.....	37
3.4.14. Анализа кинетике отпуштања активних супстанци.....	37
3.4.15. Антимикробна испитивања.....	37
3.4.16. Ћелијске културе.....	38
3.4.17. Одређивање биокомпатибилности узорака.....	38
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	39

4.1. Хидрогелови на бази ИПМ ПМК и природних полимера.....	39
4.1.1. Дизајн и структура хидрогелова.....	39
4.1.2. Бубрење.....	40
4.1.3. Механичка својства.....	41
4.2. Хидрогелови на бази ПМК и желатина.....	43
4.2.1. Физички умрежени ПМКЖ хидрогелови.....	43
4.2.1.1. Структура физички умрежених ПМКЖ хидрогелова.....	43
4.2.1.2. Степен конверзије мономера.....	44
4.2.1.3. Садржај воде.....	45
4.2.1.4. Физичко-хемијска својства.....	45
4.2.1.5. Механичка својства.....	47
4.2.1.6. Самоисцељивост.....	53
4.2.1.7. Способност памћења облика.....	54
4.2.2. ПМКЖ хидрогелови за инжењерство ткива.....	54
4.2.2.1. Структура ПМКЖ-На хидрогелова.....	55
4.2.2.2. Степен конверзије.....	56
4.2.2.3. Садржај воде и порозност.....	57
4.2.2.4. Механичка својства.....	59
4.2.2.5. Разградивост у симулираним физиолошким условима.....	62
4.2.2.6. Бубрење.....	63
4.2.2.7. Утицај састава хидрогелова на биокомпатибилност.....	65
4.3. Утицај умрежавања на својства ПМК хидрогелова.....	66
4.3.1. ПМК хидрогелови умрежени двофункционалним умреживачима са винилним групама.....	67
4.3.1.1. Степен конверзије.....	67
4.3.1.2. Бубрење.....	68
4.3.1.3. Термичка разградња хидрогелова.....	68
4.3.1.4. Механичка својства.....	69
4.3.1.5. рН осетљивост.....	70
4.3.1.6. Отпуштање лекова.....	72
4.3.2. ПМК хидрогелови умрежени јонима.....	75
4.3.2.1. Структура хидрогелова.....	76
4.3.2.2. Садржај воде.....	76
4.3.2.3. Механичка својства.....	77
4.4. Композитни хидрогелови на бази ПМКЖ и калцијум-фосфата.....	77
4.4.1. Карактеризација калцијум-фосфатних пунилаца.....	78
4.4.2. Структура композитних хидрогелова.....	80
4.4.3. Хемијска структура композитних хидрогелова.....	80
4.4.4. Садржај воде, порозност и микроструктура.....	81
4.4.5. Бубрење.....	82
4.4.6. Механичка својства.....	83
4.4.7. Отпуштање лекова.....	84
4.4.8. Анализа кинетике отпуштања.....	86
4.4.9. Антимикробна активност.....	87
4.4.10. Биокомпатибилност.....	89
4.4.11. Утицај врсте калцијум-фосфатних пунилаца на својства композитних хидрогелова.....	90
4.4.11.1. Бубрење.....	90

4.4.11.2.	Микроструктура.....	91
4.4.11.3.	Механичка својства.....	91
4.4.11.4.	Отпуштање оксапрозина.....	92
5.	ЗАКЉУЧАК.....	94
	ЛИТЕРАТУРА.....	96

1. УВОД

Биомедицинско инжењерство представља мултидисциплинарну област која комбинује знања из техничких наука, биологије и медицине, у циљу унапређења здравља људи и развоја нових клиничких приступа [1]. Активности у оквиру биомедицинског инжењерства укључују:

1. Стицање нових знања и разумевање живих система кроз иновативну и садржајну примену експерименталних и аналитичких техника заснованих на инжењерским наукама.
2. Развој нових уређаја, алгоритама, процеса и система који унапређују биологију и медицину и побољшавају медицинску праксу и здравствену заштиту.

Развој и примена нових биоматеријала један је од основних циљева у биомедицинском инжењерству. Иако је област биоматеријала релативно млада, мултидисциплинарна област науке о материјалима која свој процват доживљава тек у другој половини 20. века захваљајући развоју науке о полимерима, данас има неизоставну улогу у различитим областима биомедицине, стоматологије и медицине. Корени науке о биоматеријалима сежу и до пре више од 2000 година, када су стари Римљани, Кинези и Астеци користили злато у зубарству, а током историје дрвени зуби и стаклене очи били у врло честој употреби, међутим, тек током 20. века развој и доступност вештачких материјала, довео је до многих истраживања и експеримената имплантације, што је довело до развоја и утемељења науке о биоматеријалима [2]. Данас се биоматеријали користе за широк спектар примена укључујући: праћење стања и параметара организма, контролисано отпуштање лекова и замену оштећених ткива и органа, при чему се могу дизајнирати да имају јединствена физичко-хемијска и биолошка својства у зависности од крајње намене. Чињеница да је 2000. године близу 20 милиона људи извршило имплантацију или замену нефункционалних органа доказује да биоматеријали данас имају значајан утицај на здравље људи. С обзиром на све старије становништво на планети, сваке године постојаће све већа потреба за развојем биоматеријала, тако да је потенцијал биоматеријала и инжењерства ткива (иако независне, ове две области су уско повезане и често се преплићу) велики [3].

Хидрогелови на бази интерпенетрирајућих мрежа (ИПМ) су се последњих година показали као изузетно перспективни материјали за примену у биомедицини, с обзиром да се карактеришу одличним механичким својствима уз висок садржај воде у структури, порозношћу, биокомпатибилношћу, као и могућношћу да контролисано отпуштају активне супстанце [4]. При синтези хидрогелова на бази ИПМ често су коришћени различити винилни полимери, због једноставности контроле процеса полимеризације и манипулације крајњим својствима хидрогелова. Међутим, хидрогелови на бази ИПМ поли(метакрилне киселине) (ПМК), винилног полимера који се одликује високом хидрофилношћу и биокомпатибилношћу, нису у довољној мери испитани за примену у биомедицини. Стога су у оквиру ове докторске дисертације синтетисани, окарактерисани и оптимизовани хидрогелови на бази ИПМ поли(метакрилне киселине) и различитих природних полимера: желатина, алгината и хитозана, за потенцијалну примену у инжењерству ткива кости и хрскавице, као и за циљано и контролисано отпуштање лекова.

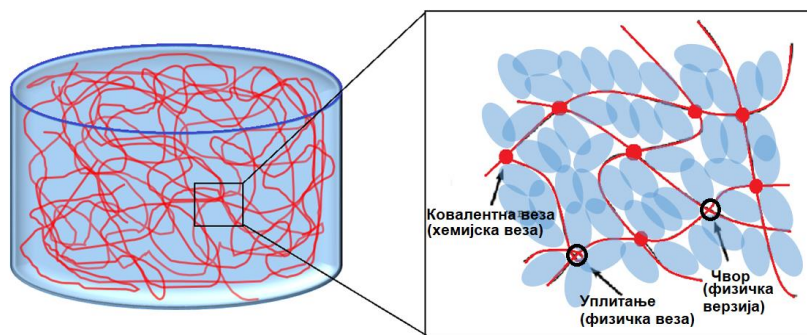
2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО

2.1. ХИДРОГЕЛОВИ: ПОЈАМ И ОСОБИНЕ

Хидрогелови представљају умрежене полимерне материјале који су нерастворни у води, али могу да набубре и достигну неколико пута веће запремине од почетне, при чему задржавају почетни облик [5, 6]. Због јединствених физичко-хемијских карактеристика као што су висока порозност, пропустљивост, и могућност апсорпције велике количине воде или биолошких флуида, хидрогелови су пронашли примену у козметици [7], контролисаном отпуштању лекова [8], имобилизацији ензима [9, 10], прехранбеној индустрији [11], пољопривреди [12], третману отпадних вода [13], сензорима [14], роботизици [15], итд. Због сличности са ванћелијским матриksom, биокомпатибилности и могућности инкорпорације и циљаног отпуштања ћелија, лекова и других активних супстанци, хидрогелови се најчешће примењују у биомедицини [16, 17].

Једна од најзначајнијих особина хидрогелова је њихова хидрофилност која је последица присуства великог броја хемијских група као што су $-OH$, $-COOH$, $-CONH-$, $-CONH_2$, $-SO_3H$, и других. Ипак, могуће је синтетисати и хидрогелове који су у одрђеној мери хидрофобни, што се постиже кополимеризацијом са хидрофобним мономерима, комбиновањем хидрофилних и хидрофобних полимерних компоненти (мреже, интерпенетранти) или модификацијом присутних функционалних група [5].

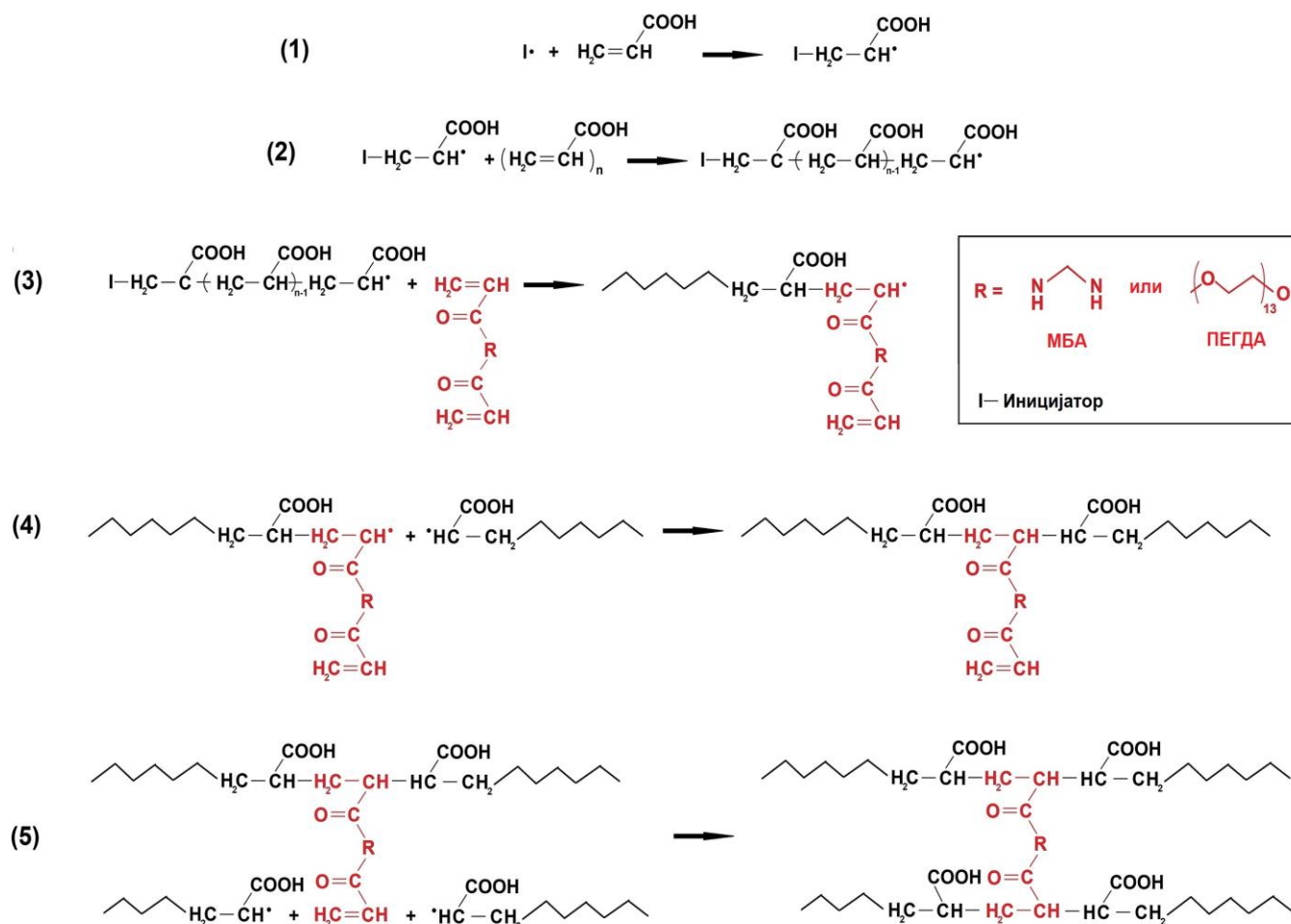
Узрок нерастворљивости гелова у води је специфична структура гелова у облику тродимензионалне полимерне мреже, због чега се јавља равнотежа између дисперзионих сила (солватационе силе које делују на полимерне ланце и теже да их одвоје од остатка мреже) и кохезионих сила (спречавају пенетрацију молекула воде у полимерну мрежу) [4]. Кохезионе силе последица су ковалентних веза између ланаца полимера (хемијски хидрогелови), или других асоцијативних, нековалентних сила укључујући: (1) Ван дер Валсове силе, (2) мицеларна паковања, (3) водоничне везе, (4) јонске везе, (5) кристалне сегменате, или (6) комбинације претходно наведених (физички хидрогелови) [5]. На слици 1 је шематски приказана структура хидрогелова са означеним хемијским и физичким умрежењима. Као што је већ наведено, структура хидрогела се шири када дође у контакт са водом. Ови материјали такође могу бити дизајнирани да бубре или се скупљају када су изложени специфичним сигнаlima из спољашње средине као што су промена температуре, промена рН, јонска јачина раствора, електрично поље, светлост, присуство појединих молекула или јона, итд [5].



Слика 1. Шематски приказ структуре хидрогелова. Стрелицама су означена хемијска (ковалентна веза) и физичка (уплитања и чворови макромолекула) умрежења. Плавом бојом су означени молекули воде.

2.1.1. Методе синтезе хидрогелова

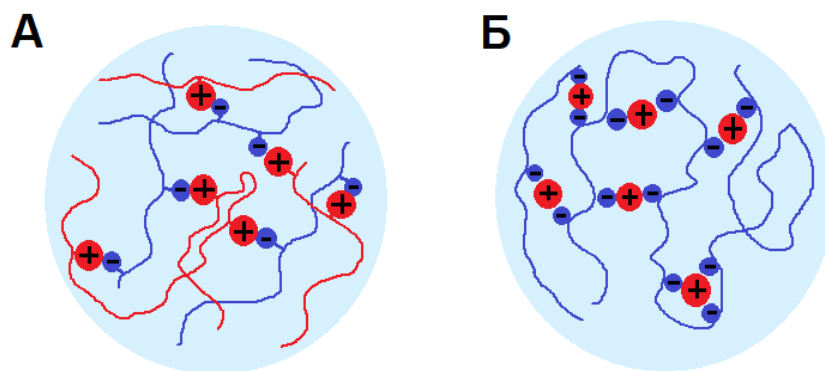
Хемијски хидрогелови се синтетишу полимеризацијом и умрежавањем мономера или макромономера, или умрежавањем полимера. Полазни раствори у случају реакције полимеризације винилних мономера садрже мономере (акрилна киселина, метакрилна киселина, акриламид, хидроксиетилметакрилат, глицидил-акрилат...), иницијатор (и активатор) и двофункционални или вишефункционални умреживач са винилним функционалним групама [5]. Шематски приказ полимеризације и умрежавања метакрилне киселине (МК) преко слободних радикала, користећи *N,N'*-метиленакриламид (МБА) или поли(етилена-гликол)диакрилат (ПЕГДА) као умреживач, дат је на слици 2.



Слика 2. Шема полимеризације метакрилне киселине и стварања тродимензионалних умрежених структура: (1) Иницијација – стварање слободних радикала метакрилне киселине. (2) Пропагација – адиција мономера метакрилне киселине на растући полимерни ланац. (3) Адиција винилне групе умреживача на растући полимерни ланац. (4) Терминација – реакција растућег полимерног ланца са другим растућим полимерним ланцом. (5) Реакција друге винилне групе са другим растућим ланцом што доводи до стварања тачака умрежења.

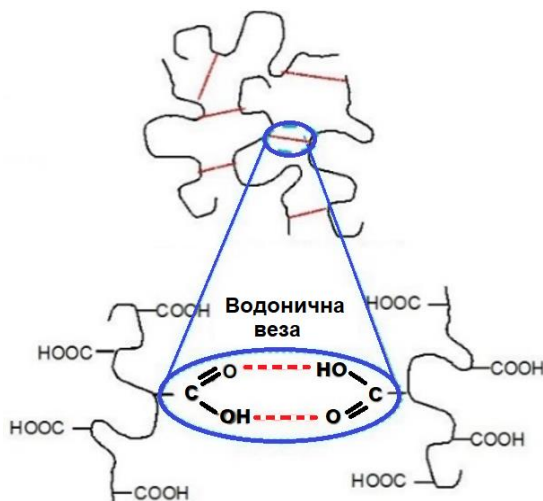
Осим хемијских хидрогелова, који су погодни због прецизно контролисаног процеса синтезе и поновљивости својстава, и физички хидрогелови су последњих година привукли значајну пажњу научне заједнице. Главни разлог је одсуство хемијске реакције приликом синтезе, чиме се избегава коришћење токсичних или екстремно реактивних молекула – иницијатора реакције умрежавања, тј. умреживача, што их чини погодним за енкапсулацију ћелија и осетљивих молекула. У случају физичких хидрогелова до умрежавања може доћи на више начина [5]:

1. Јонским интеракцијама између супротно наелектрисаних јонизованих група на полимерним ланцима (слика 3А) [18], или јонским интеракцијама између јонизованих група на полимерним ланцима и супротно наелектрисаних вишевалентних јона (Слика 3Б) [19, 20].



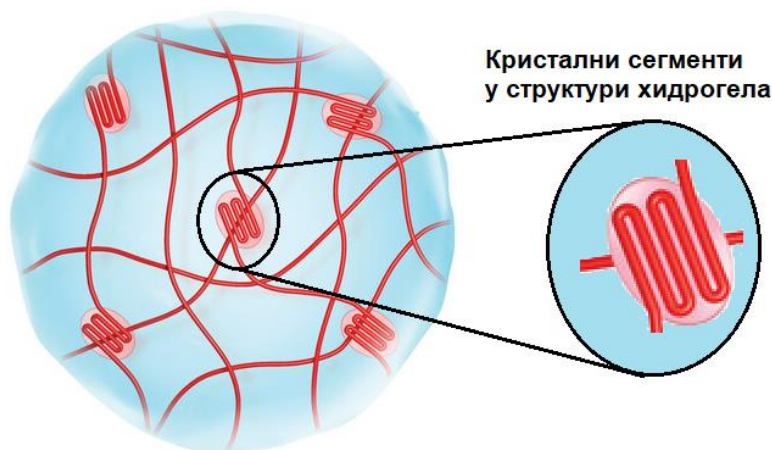
Слика 3. Шематски приказ структуре хидрогелова умрежених јонским интеракцијама.

2. Повезивањем полимерних молекула помоћу водоничних веза. Водонична веза настаје између протон-донорских (карбоксилна, хидроксилна, аминок и амидна група) и протон-акцепторских група (хидроксилна група, атом кисеоника, азота или халогене групе) (слика 4) [21, 22].



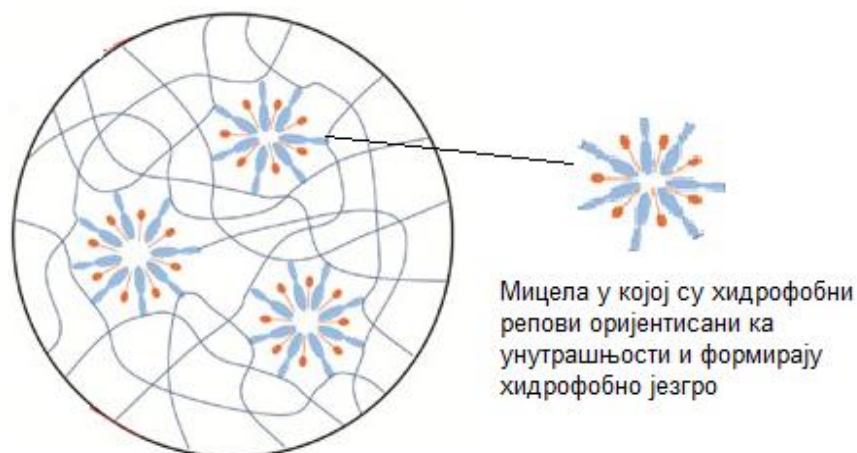
Слика 4. Хидрогел умрежен помоћу водоничних веза између карбоксилних група. Адаптирано из [23].

3. Кристаллизацијом одређених делова полимерних молекула који затим представљају места на којима долази до укрштања различитих полимерних ланаца (слика 5) [5].



Слика 5. Хидрогел умрежен путем кристалних сегмената у структури. Адаптирано из [24].

4. У случају амфифилних полимера и кополимера може доћи до сегрегације и агрегације хидрофобних група различитих полимерних молекула, при чему образовани хидрофобни домени представљају тачке умрежења (слика 6) [25, 26].



Слика 6. Хидрогел умрежен помоћу хидрофобних домена унутар структуре. Адаптирано из [27].

2.1.2. Класификација хидрогелова

Разврставање хидрогелова се може извести на више начина, при чему је најзаступљенија подела према пореклу и природи умрежавања. Према пореклу хидрогелови могу бити синтетички, природни и хибридни [28]. Синтетички хидрогелови настају реакцијама полимеризације при чему се одабиром мономера и контролом параметара синтезе могу добити хидрогелови жељених карактеристика. Боља механика и већа поновљивост својстава због контролисаних услова синтезе, основне су предности синтетичких хидрогелова у односу на природне [28]. С друге стране, природни хидрогелови се добијају умрежавањем природних полимера (хитозана,

алгината, скроба, желатина, хијалуронске киселине, итд.) и за разлику од синтетичких хидрогелова одликују се изразитом биокомпатибилношћу, биоразградиви су и садрже биолошки препознатљиве функционалне групе које подстичу метаболичку активност ћелија. Основни недостаци природних хидрогелова су лоша механичка својства, опасност од ношења патогена и изазивања нежељеног имунолошког одговара организма [29]. Према природи умрежења хидрогелови се могу поделити на хемијски умрежене и физички умрежене. Макромолекулски ланци хемијски умрежених полимера међусобно су повезани ковалентним везама, док су код физички умрежених полимера ланци повезани другим нековалентним силама попут хидрофобних интеракција [30, 31], водоничних веза, јонских веза [32, 33], мицеларног паковања [34], кристалних сегмената [35], или комбинацијом претходно наведених интеракција.

Према броју мономера који учествују у синтези, хидрогелови се могу разврстати на хомополимере, кополимере и мултиполимере [36]. Молекули хомополимера су изграђени само од једне врсте мономера, док су молекули кополимера изграђени од две или више врста мономера. Мултиполимери садрже две (или више) независних полимерних компоненти које се међусобно преплићу на молекулском нивоу, али нису повезане ковалентним везама. У случају ИПМ свака независна компонента представља мрежу (умрежене полимерне ланце) која се физички не може издвојити од осталих мрежа уколико се не раскину хемијске везе [37]. Структура семи-интерпенетрирајућих хидрогелова изграђена је од једне или више умрежене компоненте и једне или више неумрежене компоненте (линеарних или разгранатих полимера). Од ИПМ се разликују по томе што је компоненте хидрогела могуће раздвојити без раскидања хемијских веза [37]. Уопштено, ИПМ се могу синтетисати на два начина: 1) Истовременом полимеризацијом две или више врста мономера у истој реакционој смеси, чије се реакције полимеризације одвијају независно једна од друге и према различитом механизму; 2) Секвенцијалном полимеризацијом у којој се у првом кораку синтетише прва мрежа, а затим добијени хидрогел набубри у раствору прекурсора друге компоненте након чега се иницира реакција друге полимеризације [38].

У зависности од величине пора хидрогелови се могу разврстати и на непорозоне (<10 nm), микропорозне (10-100 nm), макропорозне (0,1-1 μm) и суперпорозне (>1 μm) [39], као и на неутралне, анјонске, катјонске и амфолитичке у зависности од наелектрисања бочних група [40].

У односу на понашање под утицајем надражаја из спољашње средине, хидрогелови се могу поделити на конвенционалне и хидрогелове осетљиве на спољашње стимулансе [41]. Конвенционални хидрогелови не реагују на стимулансе из спољашње средине, док у случају хидрогелова осетљивих на спољне стимулансе долази до значајних промена физичко-хемијских својстава као одговор на промене у окружењу.

2.1.3. Хидрогелови осетљиви на спољашње стимулансе

Хидрогелови осетљиви на спољашње стимулансе представљају тродимензионалне хидрофилне мреже које су у стању да нагло и значајно промене одређена физичка или хемијска својства као одговор на промене у условима окружења [41]. Називају се још и интелигентним или паметним хидрогеловима. Развој интелигентних хидрогелова отворио је врата новим приступима и стратегијама у области биомедицине. Према врсти надражаја на које могу да реагују, ови хидрогелови се могу разврстати у следеће подгрупе:

1. Хидрогелови осетљиви на физичке промене – нпр. на промену температуре [42], притиска [43], јачине светлости [44], јачине ултразвучног [45], електричног [46] и магнетног поља [47].
2. Хидрогелови осетљиви на хемијске промене – нпр. на промену рН [48], јонске јачине раствора [49], концентрације молекула/јона (нпр. глукозе).

3. Хидрогелови осетљиви на биохемијске стимулансе – нпр. на промену концентрације ензима, антитела.

Хидрогелови који су дизајнирани да реагују на два стимуланса средине називају се дуално осетљивим хидрогеловима [50].

2.1.3.1. рН – осетљиви хидрогелови

Хидрогелови осетљиви на промену рН пролазе кроз различите промене структуре и/или својстава, као што су промена површинског напона, конформације полимерних ланаца и растворљивости, услед промене рН вредности окружења. Они садрже јонизујуће функционалне групе (јонски хидрогелови) које у односу на рН вредност окружења могу да везују или отпуштају протоне.

За разлику од структуре хидрогелова који не садрже јонизујуће групе, структура јонских хидрогелова не зависи само од структурних параметара хидрогела, већ и од рН вредности средине. Постоје два типа рН-осетљивих хидрогелова: катјонски и ањонски (Слика 7) [51]. Код ањонских хидрогелова (обично садрже $-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$ или $-\text{PO}_3\text{H}_2$ бочне групе) када је рН вредност околног медијума већа од pK_a киселе бочне групе полимерног ланца, долази до отпуштања протона и јонизације бочних група. То доводи до настанка негативног наелектрисања на бочним групама хидрогела. С друге стране, у случају катјонских хидрогелова (садрже базне бочне групе попут NH_2) до јонизације долази када је рН вредност околине нижа од pK_b бочне базне групе.

Поли(карбоксилне киселине)



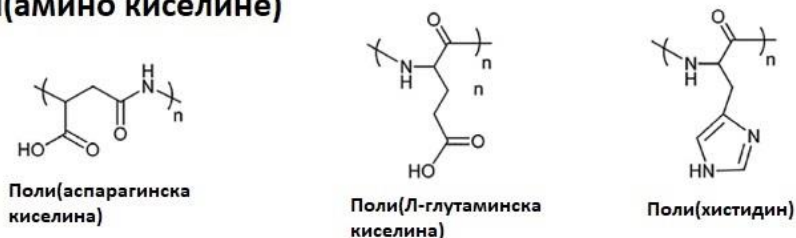
Поли(фосфорне киселине)



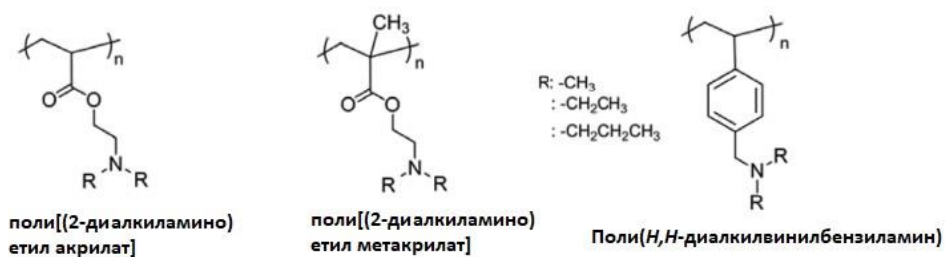
Поли(сулфонске киселине)



Поли(амино киселине)

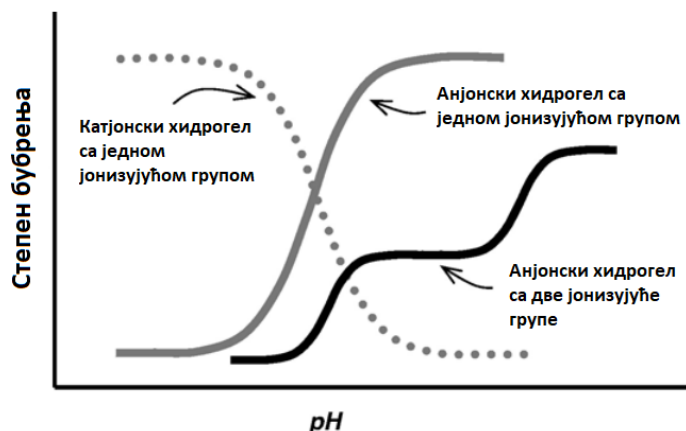


Полимери са терцијарним амино групама



Слика 7. Хемијска структура рН-осетљивих полимера класификованих према природи бочне групе.

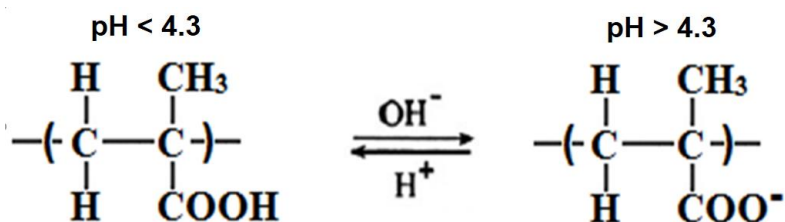
Најпознатија и најтемељније испитана физичка промена, која настаје као последица јонизације бочних група и промена у конформацији јонизованих полимера, је промена капацитета апсорпције медијума, односно равнотежног степена бубрења (РСБ). Приликом јонизације хидрогелова долази до ширења структуре услед електростатичких одбојних сила (које спречавају успостављање водоничних и хидрофобних веза између полимерних ланаца) што доводи до повећања хидродинамичке запремине [51]. Поред тога, повећање осмотског притиска унутар хидрогелова услед повећања јонске густине, такође доприноси повећаном степену бубрења. У зависности од врсте мономера коришћених у синтези и функционалних група заступљених у структури рН-осетљивих хидрогелова, крива зависности РСБ од рН вредности раствора показује једну или више превојних тачака близу рКа, односно рКв вредности бочних група (Слика 8).



Слика 8. Зависност степена бубрења јонских хидрогелова у односу на рН вредност средине. Адаптирано из [29].

2.1.3.2. Хидрогелови на бази ПМК

ПМК је анјонски, хидрофилни полимер, чија је структура приказана на слици 9 [52]. Умрежавањем ПМК добијају се тродимензионалне, хидрофилне мреже које имају релативно велику способност хидратације. Захваљујући бочним карбоксилним групама присутним у структури, хидрогелови ПМК се одликују рН осетљивошћу. При рН вредностима средине већим од рКа (≈ 4.3) долази до јонизације карбоксилних група ПМК, појаве негативног наелектрисања и ширења структуре хидрогела [52, 53]. У киселој средини не долази до јонизације и појаве негативног наелектрисања због чега су између полимерних ланаца доминантне водоничне везе и хидрофобне интеракције, што доводи до скупљања структуре [53]. Поред тога, бочна α -метил група игра значајну улогу у стабилизацији водоничних веза унутар ПМК. Хидрофобне интеракције које су последица α -метил групе, ограничавају количину воде која улази у структуру, али и смањују мобилност полимерних ланаца, што је искоришћено за добијање хидрогелова који се одликују добрим механичким својствима [54].



Слика 9. Структура и процес јонизације ПМК.

pH осетљивост ПМК је веома атрактивно својство за примену у биомедицини и системи на бази ПМК се интензивно истражују за примену у контролисаном отпуштању лекова [53]. На пример, Агуахо и сарадници су калемили молекуле ПМК на бочне групе целулозе медицинске газе, чиме је добијена газа повећаног капацитета бубрења са могућношћу качења и контролисаног отпуштања налидиксинске киселине [55]. ПМК-функционализована газа је показала апсолутну антимикуробну активност против *Escherichia coli* и *Staphylococcus epidermidis*.

Калдорера и сарадници су синтетисали наночестице хидрогелове на бази метакрилне киселине и етилен гликола, као носаче за контролисано отпуштање интерферона- α [56]. Синтетисане наночестице су показале pH осетљивост и омогућиле ефикасан транспорт активне супстанце кроз слојеве ћелијског модела гастроинтестиналног епитела.

Перез-Чавез и сарадници су испитивали ПМК хидрогелове за апсорпцију полиамина, који су важни за многе интер- и интра-целуларне процесе и чија је концентрација значајно повећана у окружењу туморских ћелија [57]. Упоредо са апсорпцијом полиамина, испитивано је контролисано отпуштање антитуморског лека – доксорубицина, и утврђено је да повећање концентрације полиамина узрокује повећано отпуштање лека.

Ватанках и сарадници су синтетисали наночестице на бази поли(2-хидроксиетил метакрилат-*co*-метакрилна киселина) за контролисано отпуштање доксорубицина [58]. *In vitro* отпуштање лека испитивано је у растворима различите киселости pH = 1.0 и 7.4, при чему је утврђено да се доксорубицин отпустио у значајно већој мери када је pH вредност раствора била 1,0, што је објашњено већом растворљивошћу доксорубицина у киселој средини.

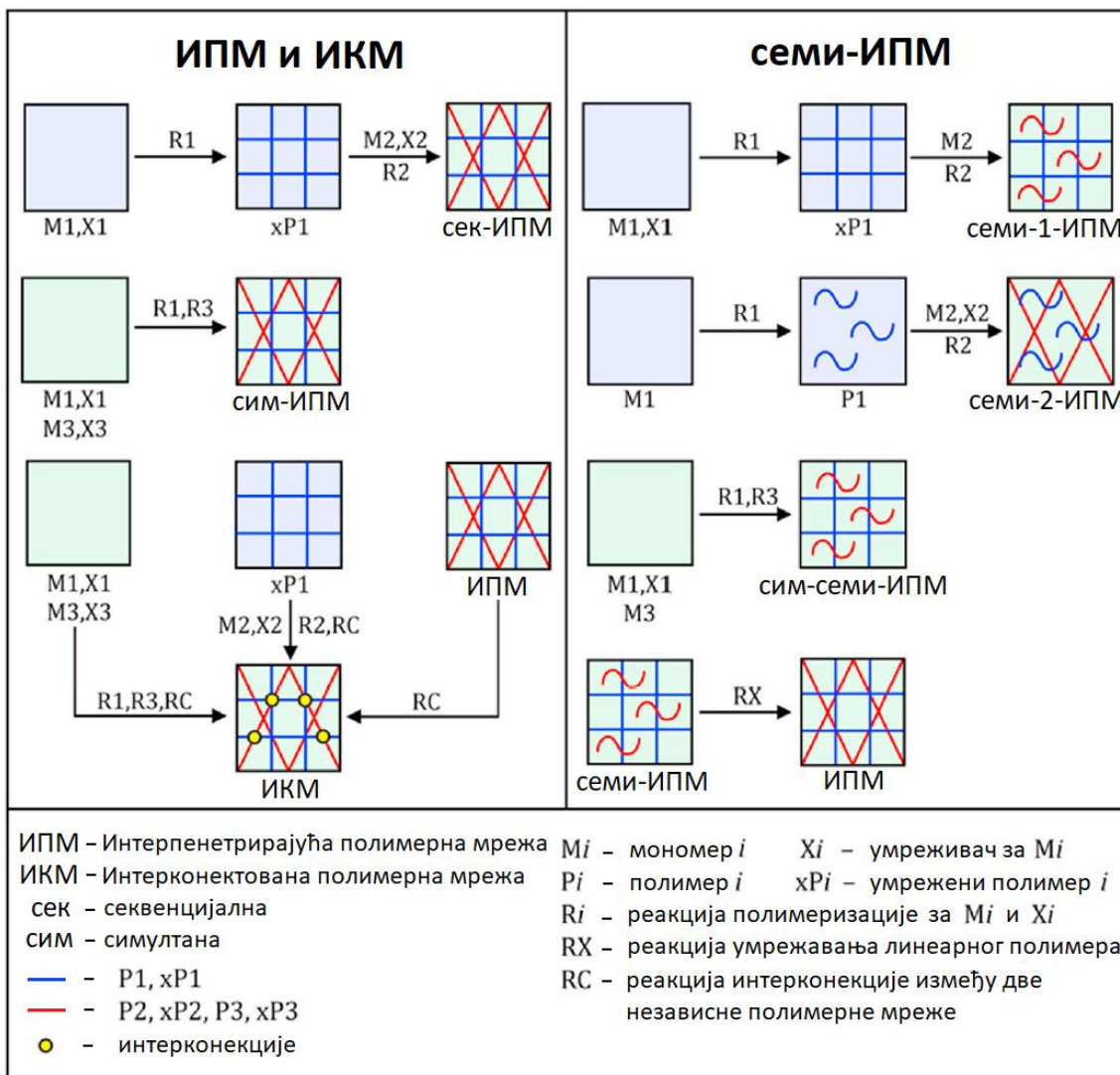
Са друге стране, испитивања ПМК хидрогелова за примену у инжењерству ткива су много скромнија, иако због високе хидрофилности, порозности, биокомпатибилности, могућности инкорпорације лекова и биоактивних фактора, као и могућности прецизне контроле структуре и својстава, ПМК има велики потенцијал за примену у овој области. На пример, показано је да је контролом степена неутрализације мономера метакрилне киселине у прекурсорском раствору, могуће контролисати порозност, степен бубрења и механичка својства добијених ПМК хидрогелова, што се може применити за синтезу порозних структура у инжењерству ткива [59]. Ипак, једнокомпонентни ПМК хидрогелови се одликују релативно slabим механичким својствима и због своје синтетичке природе у структури не поседују биоактивне секвенце, које поспешују ћелијску адхезију, пролиферацију и диференцијацију. Поред тога, ПМК хидрогелови нису биоразградиви што је у неким случајевима потребан услов при дизајну биоматеријала за примену у инжењерству неких ткива.

2.2. ИНТЕРПЕНЕТРИРАЈУЋЕ ПОЛИМЕРНЕ МРЕЖЕ – ОСНОВНИ КОНЦЕПТ

Синтеза интерпенетрирајућих полимерних мрежа се последњих година јавља као један од најчешће примењиваних начина за унапређење својстава хидрогелова. ИПМ се најједноставније може дефинисати као полимер који се састоји од две или више независних полимерних мрежа испреплетаних на молекулском нивоу, али које нису међусобно повезане ковалентним везама [60]. Уколико је један од полимера у линеарном облику (тј. није умрежен) такви системи се називају семи-интерпенетрирајуће полимерне мреже (семи-ИПМ). Поред ИПМ, постоје и интерконектоване полимерне мреже (ИКМ), које се од ИПМ разликују по томе што између независних полимерних мрежа постоје хемијске везе.

Шеме најчешће коришћених начина синтезе ИПМ, семи-ИПМ и ИКМ су дате на слици 10 [38]. На приказаној шеми M_i представља мономер i , X_i представља умреживач за мономер i , P_i представља полимер i , xP_i представља полимерну мрежу i , и R_i представља реакцију

полимеризације за M_i и X_i . R_1 и R_2 представљају две реакције полимеризације у секвенцијалној синтези, и према томе, могу се одвијати путем истог механизма полимеризације. Са друге стране, R_1 и R_3 представљају две реакције полимеризације у симултаном синтези, и према томе, морају се одвијати путем различитих механизма. R_X је селективна реакција умрежавања линеарног полимера, а R_C је селективна реакција синтезе ИКМ стварањем одређеног броја ковалентних веза између независних полимерних мрежа.



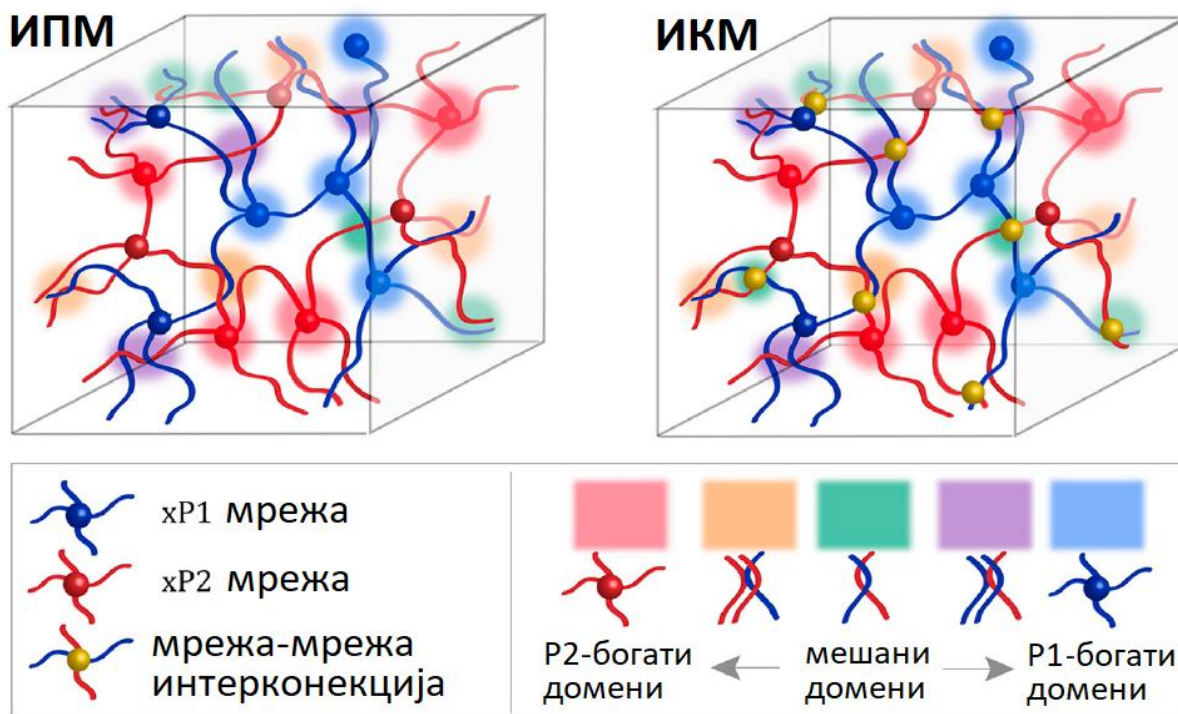
Слика 10. Шематски приказ најчешћих начина синтезе ИПМ, семи-ИПМ и ИКМ. Адаптирано из [38].

Секвенцијална ИПМ се синтетише у више узастопних корака, и према томе, исти механизам полимеризације може бити коришћен за синтезу xP_1 и xP_2 . Укратко, процес добијања секвенцијалне ИПМ је следећи: M_1 и X_1 се полимеризују тако да се добије xP_1 мрежа, након чега xP_1 бубри у раствору M_2 и X_2 , чијом полимеризацијом и умрежавањем се затим добија xP_2 мрежа унутар xP_1 мреже. Постоји могућност различитих варијација у оквиру секвенцијалне полимеризације. Ако се процес полимеризације одигра без X_1 (али са X_2) формираће се семи-2-ИПМ, односно добиће се систем у ком је P_1 у линеарном облику, а P_2 у умреженом. Уколико се процес полимеризације одигра без X_2 (али са X_1) формираће се семи-1-ИПМ. Ако је xP_1 мрежа само делимично набубрена у M_2 и X_2 , и брзина реакција полимеризације и умрежавања већа од

брзине дифузије M2 и X2 у xP1, формираће се ИПМ са градијентом макромолекулске топологије (повезаност и просторна распоређеност макромолекулских сегмената).

За разлику од секвенцијалне, симултана ИПМ се синтетише у једном кораку, истовременом полимеризацијом различитих типова мономера различитим механизмом полимеризације (xP1 и xP3). С обзиром да брзине реакција не морају бити исте, она реакција која се одвија брже може довести до наглог повећања вискозности, што може утицати на степен и брзину полимеризације мономера који полимеризују споријом реакцијом. Уколико X1 или X3 нису присутни у реакцији, односно ако један од умреживача не учествује у реакцији, један од полимера ће бити у линеарном облику и добијени систем ће бити семи-ИПМ.

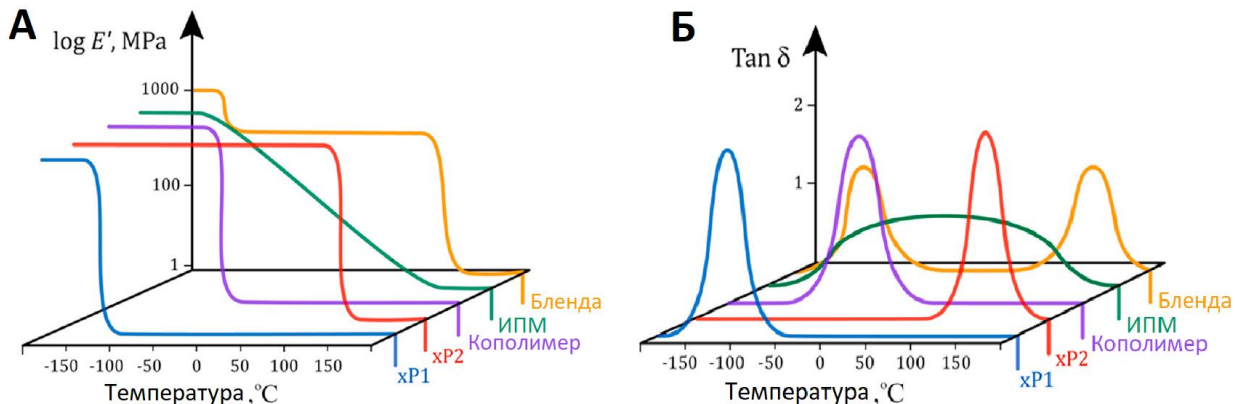
Основни концепт на ком се заснива развој ИПМ је синергија два или више полимера преплитањем на молекулском нивоу. Ови полимери су често некомпатибилни, тј. значајно се разликују у погледу физичко-хемијских својстава. Иако је такав систем термодинамички нестабилан, односно постоји покретачка енергија за раздвајање некомпатибилних полимерних мрежа, кинетика ових процеса је врло спора због мале покретљивости испреплетаних молекулских ланаца [38]. Ипак, због нехомогености у току процеса полимеризације, до раздвајања фаза ипак долази, иако су она обично ограничена на веома мале домene реда величине нанометара и микрометара. На овај начин настаје широк спектар домена чији састав континуално варира у зависности од полимера који учествују у структури ИПМ (Слика 11). Као резултат, добијена макромолекулска архитектура је значајно различита од структуре која се добија кополимеризацијом, мешањем или калемљењем истих полимерних врста [38].



Слика 11. Шематски приказ ИПМ и ИКМ са наглашеним доменима чији састав може да варира од P2 до P1. Адаптирано из [38].

Једна од најчешћих последица овакве молекулске структуре је постепен прелаз физичко-хемијских својстава ИПМ у односу на појединачне компоненте. На слици 12 су приказане вредности модула сачуване енергије (E') и фактора пригушења ($\tan \delta$) хипотетичких полимера

ниске температуре остакљивања (T_g) (xP1) и високе T_g (xP2). Претпостављено је да xP1 има $T_g = -100$ °C и низак E' на собној температури, док xP2 има $T_g = 150$ °C и високу вредност E' . T_g и E' насумичног кополимера добијеног кополимеризацијом истих компоненти M1, X1, M2 и X2, са односом $(M1+X1)/(M2+X2) = 1/1$, такође је приказан на слици. Претпостављена вредност T_g кополимера од ≈ 25 °C израчуната је помоћу Фоксове једначине [61] и приказана на слици 12 негде на половини вредности између $T_g(xP1)$ и $T_g(xP2)$, што такође важи и за вредност E' . Поред тога, са слике 12 може се видети да оба једнокомпонентна полимера, као и њихов кополимер и бленда, на температурама стакластог прелаза испољавају нагло смањење E' и релативно уске пикове $\tan \delta$. На слици 10 приказана је и крива зависности E' и $\tan \delta$ у односу на температуру хипотетичке бленде немешљивих полимера xP1 и xP2, која услед раздвајања фаза испољава две тачке стакластог прелаза. Са друге стране, карактеристична крива за ИПМ је значајно различита од кривих за кополимер и бленду, с обзиром да представља манифестацију структуре са фазним прелазима нанометарских домена, у којима континуално варира концентрација појединачних полимерних фаза. Због тога E' постепено опада од вредности $E'(xP2)$ према $E'(xP1)$, док је пик за $\tan \delta$ релативно широк и низак [38]. Приликом промене температуре, унутар нанометарских домена фазног раздвајања, у зависности од састава, долази до промене покретљивости молекулских сегмената што се манифестује као промена E' . Како у структури ИПМ постоји мноштво таквих домена различитог састава, који се постепено мења од домена до домена, промена у E' је такође постепена [38]. Ово је значајно другачије понашање у односу на смешу или кополимере где су у структури присутне две раздвојене фазе, или једна униформна. Може се рећи да у случају бленди говоримо о раздвајању фаза на макроскопском нивоу, због чега су појединачне компоненте скоро у потпуности независне једна од друге унутар таквих система.



Слика 12. Зависност E' (А) и $\tan \delta$ (Б) од температуре, хипотетичких полимера xP1 и xP2 и њиховог кополимера, бленде и ИПМ. Адаптирано из [38].

2.2.1. ИПМ хидрогелови

Представљени концепт ИПМ је општи и важи за било које мономере 1, 2 и 3. У случају хидрогелова принцип је исти али постоје одређена ограничења. Пре свега, хидрофобни мономери се због хидрофобне структуре не могу у потпуности користити за синтезу хидрогелова (али могу чинити део структуре хидрогела). Поред тога, важно је обратити пажњу и на токсичност мономера и умреживача с обзиром да током примене хидрогелова у биомедицини, постоји опасност од испуштања непрореагованих мономера у окружење. Стога, у контексту хидрогелова за примену у биомедицини, примери реалних компоненти у оквиру шеме на слици 10 би могли бити следећи: акриламид као M1 и МБА као X1, акрилна киселина као M2 и етилен-гликол диакрилат као X2, желатин као M3 и глутаралдехид као X3. Ипак, највећа специфичност у односу на општи концепт

ИПМ је висока порозност и значајно велики садржај воде у структури, чији се утицај на својства хидрогелова мора узети у обзир.

Развој хидрогелова на бази ИПМ довео је последњих деценија до значајног унапређења механичких својстава хидрогелова и проширења могућности њихове примене. На пример, Гонг и сарадници су развили ИПМ хидрогелове који се базирају на комбинацији релативно густо умреженог полиелектролита (нпр. поли(2-акриламидо-2-метил-1-пропан-сулфонска киселина) (ПАМПС)) и слабоумреженог нејонизујућег полимера (нпр. поли(акриламид) (ПАМ)), при чему је молски однос секундарне и примарне мреже 10:1 [62]. Овај посебан метод комбиновања два хидрофилна полимера резултује стварањем хидрогелова који садрже 60-90% воде и одликују се вредностима притисног напрезања реда величине 20 МПа, за разлику од чистих, једнокомпонентних ПАМПС и ПАМ хидрогелова чије су вредности притисног напрезања 0,4 и 0,8 МПа. Ови материјали се углавном добијају секвенцијалном полимеризацијом. Добијено драстично побољшање механичких својстава ИПМ хидрогелова резултат је способности секундарне мреже да спречи раст пукотина које могу довести до катастрофалног лома. Иако се у основи ИПМ хидрогелови базирају на комбинацији два ковалентно умрежена полимера, испитиване су и разне варијанте хидрогелова са додатним физичким умрежењима укључујући: водоничне везе [63], јонске координатне везе [64], хидрофобне интеракције [65] и комбинације претходних [66]. На овај начин се, поред перманентних ковалентних умрежења, у систем уносе и динамичка умрежења која су обновљиве природе и која значајно доприносе побољшању механичких својстава. С обзиром да су физичке природе, динамичка умрежења се током деловања напрезања раскидају, а затим се по престанку напрезања обнављају. Овакви хидрогелови се због својих изванредних механичких својстава, али и способности самообнављања структуре и памћења облика, интензивно истражују за примену у различитим областима науке и индустрије.

2.2.2. ИПМ хидрогелови на бази ПМК и природних полимера за примену у биомедицини

Најинтензивнија примена хидрогелова на бази ПМК у биомедицини је у области контролисаног отпуштања лекова, пре свега због рН-осетљивости и биокомпатибилности. С друге стране, чисти ПМК хидрогелови нису разградиви и одликују се релативно slabим механичким својствима, што ограничава њихову ширу употребу у биомедицини. Комбиновање ПМК са другим природним полимерима у циљу добијања ИПМ, један је од начина за унапређење механичких, физичкохемијских и биолошких својстава хидрогелова на бази ПМК. Ипак, у литератури постоји скроман број радова на ову тему. На пример, Сан и сарадници синтетисали су ксилан/ПМК семи-ИПМ хидрогелове порозне структуре, користећи МБА као умреживач. Добијени материјали показали су рН осетљивост и потпуну реверзибилност бубрења [67]. Повећање садржаја ксилана у структури семи-ИПМ, довео је до малог повећања равнотежног степена бубрења.

Ли и сарадници су на сличан начин синтетисали ИПМ хидрогелове на бази натријум карбоксиметил целулозе (КМЦ) и ПМК [68]. Добијени хидрогелови имали су порозну структуру са порима већим од 100 μm , док су тестови цитотоксичности показали задовољавајућу биокомпатибилност. Орална администрација инсулина инкапсулираног у КМЦ/ПМК хидрогелу, показала је продужени терапеутски ефекат (12 h) манифестован кроз постепено смањење концентрације глукозе у крви пацова са индукованим дијабетесом.

Шарма и колеге синтетисали су агар/ПМК семи-ИПМ хидрогелове микроталасно-индукованом слободно-радикалском полимеризацијом [69]. Синтетисани хидрогелови су показали антимикуробну активност на грам позитивне и грам негативне бактерије - *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*.

Примена ИПМ хидрогелова на бази гуар гуме (ГГ) и ПМК за циљано отпуштање лекова у дебелом цреву испитана је у раду Лија и сарадника [70]. С обзиром да су рН вредности танког и дебелог црева сличне (6,8 и 7,4 редом [71]), за циљано отпуштање лекова у дебело црево није довољно да носач буде само рН осетљив. Инкорпорацијом ГГ у структуру ПМК хидрогелова, добијени су семи-ИПМ хидрогелови који су поред рН-осетљивости подложни и деградацији услед деловања бактерија из микрофлоре слепог црева пацова. Очекивано, повећање односа ГГ/МК довело је до повећања разградивости семи-ИПМ мреже која је након 5 дана инкубације износила 26,3% у случају ГГ/МК = 0,4 g/g, док је при истим условима износила 5,3% када је ГГ/МК = 0,1 g/g. Експерименти отпуштања ацетил-салицилне киселине показали су да смањење вредности рН окружења са 7,4 на 2,2 значајно смањује брзину и количину отпуштеног лека. Осим тога, количина отпуштеног лека је била значајно већа у медијуму у којем су биле инкубирание бактерије из слепог црева пацова.

Марковић и сарадници са катедре за органску хемијску технологију Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, синтетисали су серију ПМК/казеин семи-ИПМ хидрогелова и испитали њихова физичко-хемијска својства и могућност инкапсулације слабо водорастворних активних супстанци [72, 73]. Показано је да додаток казеина смањује равнотежни степен бубрења хидрогелова због успостављања физичких интеракција у виду водоничних веза и хидрофобних интеракција између молекула казеина и ПМК. Поред тога, додатком казеина који се одликује амфифилном структуром, уравнотежена је изразито хидрофилна природа ПМК и омогућена ефикасна инкапсулација и отпуштање слабо водорастворног кафеина.

Шаолианг Ђи и сарадници произвели су серију различитих хидрогелова базираних на салекану - полисахариду добијеном из новог соја бактерија *Agrobacterium sp. ZX09*, изолованог у Кини [74, 75]. Салекан се одликује одличним антиоксидативним својствима и биокомпатибилношћу, што је веома пожељно за примену у прехранбеној и фармацеутској индустрији. Додатак салекана у ПМК довео је до повећања равнотежног степена бубрења и слабљења механичких својстава због већег садржаја воде, што су аутори објаснили присуством хидроксилних група на салекану чиме се повећава хидрофилност система. Дато објашњење највероватније није тачно, с обзиром да би водоничне везе између ПМК и салекана допринеле додатном умрежавању и смањењу степена бубрења. У овом случају највероватније долази до смањења степена полимеризације МК, што даје хидрогелове смањеног степена умрежења. Добијени салекан/ПМК семи-ИПМ хидрогелови су испитани као носачи за контролисано отпуштање антитуморског лека доксорубицина. Показано је да је кинетика отпуштања доксорубицина била зависна од рН окружења. На пример, при рН=7,4 након 18 h експеримента, отпуштено је 30% од укупне масе инкорпорисаног лека, док је за исто време при рН=5,0 отпуштено 70%, што је највероватније последица веће растворљивости доксорубицина у киселој средини [76].

Осим природних полимера, у ИПМ хидрогелове на бази ПМК често се уводе и други мономери ради постизања различитих функционалности у коначним својствима хидрогелова, као што су температурна осетљивост (N-изопропилакриламид) или повећање електричне проводљивости (анилин) [77–80].

Желатин као дериват колагена, најзаступљенијег протеина у организму човека, нашао је широку примену у биомедицини због своје биокомпатибилности, биоразградивости и биоактивности [81]. Постоји огроман број радова у литератури који се баве синтезом и применом хидрогелова на бази желатина у медицини, фармацији и биомедицини [82]. Ипак, због релативно лоших механичких својстава и брзе разградње у физиолошким условима, желатин се често третира различитим физичким и хемијским методама, или се комбинује са другим материјалима ради унапређења својстава. На основу представљених карактеристика желатина и ПМК, може се претпоставити да се њиховим комбиновањем могу добити хидрогелови унапређених биолошких,

механичких и физичко-хемијских својстава, са потенцијалном применом у различитим областима биомедицине. Ипак, у литератури постоје само 2 рада у којима су испитани ИПМ хидрогелови на бази желатина и ПМК. Гупта и сарадници синтетисали су грануле на бази ИПМ желатина и ПМК за контролисано отпуштање глипизида користећи глутаралдехид као умреживач за желатин и МБА као умреживач за ПМК [83]. Током 12 h отпуштања при рН=7,4 проценат отпуштене супстанце варирао је од 65,2% до 97,5% и био је директно пропорционалан степену бубрења, при чему је степен бубрења био највећи случају када је однос ПМК/желатин био највећи. Поред тога, Жанг и сарадници су синтетисали семи-ИПМ мреже на бази желатина и ПМК, помоћу нискотемпературне фото-индуковане слободно-радикалске полимеризације [84]. Овом методом, након изливања прекурсорског раствора у калупе, дошло је до физичког умрежавања желатина, након чега је помоћу ултраљубичасте светлости индукована полимеризација метакрилне киселине. На овај начин добијени су хидрогелови одличних механичких својстава, при чему је одлучујући утицај на својства имала температура претполимеризационог третмана. При снижењу температуре са 12 на 2 °C, затезна чврстоћа хидрогелова порасла је са 0,5 на 4,5 МПа. Иако су ови радови показали одличну компатибилност желатина и ПМК, као и могућност синтезе различитих типова хидрогелова побољшаних својстава, истраживачи се нису бавили даљим развојем ових материјала и детаљнијим испитивањем за примену у биомедицини.

Слична ситуација је и са хитозаном, који је други најзаступљенији полисахарид на Земљи после целулозе, и који је због биокомпатибилности, биоразградивости, антимикробних својстава, као и рН осетљивости, нашао широку примену у биомедицини [85]. Катјонске групе у структури хитозана омогућавају му стварање полиелектролитних комплекса са полианјонским полимерима попут поли(акрилне) и поли(метакрилне) киселине [86]. Такви полимерни материјали због своје бимодалне рН осетљивости могу бити интересантни за примену у контролисаном отпуштању лекова. Међутим, детаљним прегледом литературе пронађено је само један рад у ком су синтетисани ИПМ хидрогелови на бази хитозана и ПМК. Наиме, Маити и сарадници су синтетисали хитозан/ПМК ИПМ хидрогелове за адсорпцију отпадних индустријских боја [87]. Инкорпорација хитозана довела је до повећања топлотне стабилности хидрогелова као и значајног повећања адсорпционог капацитета. Поред тога постоји још један рад у ком је хитозан комбинован са кополимером МК и акриламида (ААм), при чему су ИПМ хидрогелови добијени секвенцијалном полимеризацијом [88]. У првом кораку синтетисани су поли(МК-*co*-ААм) хидрогелови умрежени са МБА, након чега су лиофилизоване узорци потопљени у раствор хитозана и диалдехида (умреживач за хитозан) да би се добила ИПМ. Добити ИПМ хидрогелови имали су нижи степен бубрења у односу на поли(МК-*co*-ААм) што је објашњено присуством секундарне мреже која интерагује са примарном мрежом и смањује порозност и мобилност молекулских ланаца. Поред тога, добијени ИПМ хидрогелови су адсорбовали мању количину протеина лизозима, али је отпуштање адсорбоване супстанце било брже него у случају кополимера.

Иако је рад са хитозаном као интерпенетрантом веома захтеван због његове нерастворљивости у води, прекурсорски раствор метакрилне киселине је одлична средина за растварање хитозана због своје киселе природе. С друге стране, у литератури постоји значајно више истраживања у којима се хитозан комбинује са поли(акрилном киселином) (ПАК) [89–92], па се поставља питање зашто хидрогелови на бази ПМК и хитозана нису детаљније истраживани.

Још један од природних полимера који је нашао широку примену у биомедицини, а чије ИПМ са ПМК нису у довољној мери истраживане је алгинат. То је линеаран, анјонски полисахарид претежно добијен из алги, чији се ланци састоје из *D*-мануронске киселине и *L*-гулурунске киселине повезане путем β-1,4 гликозидних веза. Због своје анјонске природе, алгинат може да гради умрежене структуре у реакцији са двовалентним катјонима као што су Ca²⁺ и Mg²⁺. Због хидрофилности, изванредне биокомпатибилности и великог апсорпционог капацитета

алгинат је широко заступљен у фармацији и биомедицини [93]. Радови на тему ИПМ алгината и ПМК су малобројни. Заип и Шарма су синтетисали ПМК/алгинат микрочестице за контролисано отпуштање инсулина [94]. Честице су показале рН зависно отпуштање, при чему се инсулин значајно спорије отпуштао у киселој средини у односу на неутралну.

Ким и сарадници су синтетисали ПМК/алгинат семи-ИПМ хидрогелове који су показали промену капацитета бубрења у зависности од спољашњих стимулуса попут температуре, рН средине и јонске јачине, а поред тога показано је да се електричном стимулацијом може индуковати контракција хидрогелова, што се може применити за добијање вештачких мишићних контрактилних структура, сензора, прекидача и система за контролисано отпуштање са електричном модулацијом [95, 96].

2.3. КАЛЦИЈУМ-ФОСФАТНА КЕРАМИКА

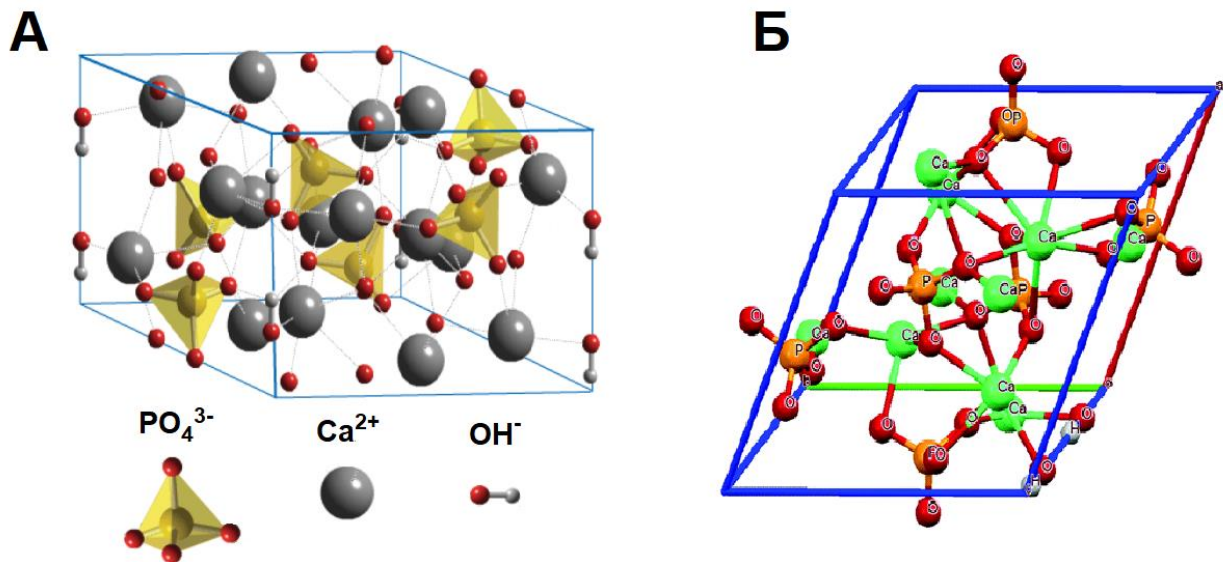
Калцијум-фосфатна керамика је група биоактивних материјала који се широко примењују за третман и репарацију оштећеног коштаног ткива. Најзаступљенији представници калцијум-фосфата у инжењерству коштаног ткива су хидроксиапатит (ХАП), трикалцијум-фосфат (ТЦП), аморфни (калцијум-фосфат) (АЦП), бифазни калцијум-фосфат (БЦП). Одликују се површинским својствима која подржавају адхезију и пролиферацију остеобласта (остеокондукција), и стимулишу образовање новог коштаног ткива (остеоиндукција). Различита способност индуковања остеогене диференцијације потиче од различитих физичко-хемијских карактеристика, као што су физичко-хемијска својства површине, кристалиничност и растворљивост, с обзиром да наведена својства директно утичу на кључне прекурсоре диференцијације – адсорпцију протеина и ћелијску адхезију [97]. Бројна истраживања која су показала способност индуковања остеогене диференцијације матичних ћелија од стране калцијум-фосфатних материјала изведена су уз додатак других остеоиндуцирајућих суплемената попут дексаметазона, аскорбинске киселине и β-глицеролфосфата. На основу ових истраживања закључено је да калцијум-фосфатни материјали располажу широким спектром остеоиндуктивног потенцијала који се може представити следећим редоследом: ТЦП > БЦП ≈ ХАП > АЦП [97]. Поред тога, неколико студија показало је способност остеоиндукције калцијум-фосфатне керамике и у условима одсуства остеогеног медијума [98–101].

ХАП и β-трикалцијум фосфат (β-ТЦП, β-Са₃(РО₄)₂) су највише коришћена калцијум-фосфатна једињења за израду костних калема у инжењерству коштаног ткива, захваљујући особинама као што су: биокомпатибилност, биоразградивост, остеоиндуктивност, остеоиндуктивност, промоција ћелијске адхезије и пролиферације [97, 102]. Показано је да ова једињења формирају површински, биоактивни слој апатита који може лако да награди везу са коштаном ткивом домаћина. Још један узрок добре остеоинтеграције ових материјала *in vivo* јесте могућност везивања природних цитокина и адхезивних протеина као што је фибронектин. Ови протеини и цитокини, адсорбовани на површину скафолда, обезбеђују основу за ћелијску адхезију [102]. ХАП се јавља у три модификације:

- стехиометријски ХАП
- калцијумом дефицитаран ХАП и
- оксихидроксиапатит

Стехиометријски ХАП може се представити формулом Са₁₀(РО₄)₆(ОН)₂ и има теоријски састав: 39,68 мас.% Са, 18,45 мас.% Р, Са/Р масени однос 2,151, Са/Р моларни однос 1,67. Кристална структура ХАП приказана је на слици 13А. Јединична ћелија ХАП састоји се од хексагоналне кристалне решетке чије су вредности параметара решетке $a = 0,942 \text{ nm}$ и $c = 0,688 \text{ nm}$ [103]. Јединична ћелија садржи 14 јона калцијума, од којих је шест унутар јединичне ћелије, док се осталих осам налази на периферији, делећи суседну јединичну ћелију. Поред тога, од

укупно десет фосфатних јона јединичне ћелије, два се налазе унутар јединичне ћелије, а осам на периферији. Укупно осам хидроксилних јона смештено је на ивици, делећи по четири јединичне ћелије. Према томе, јединична ћелија ХАП у просеку садржи десет јона калцијума, шест фосфатних јона и два хидроксилна јона (слика 13Б). Коефицијент топлотног ширења је $13,3 \times 10^{-6}$ W/m K, производ растворљивости, K_{sp} , износи 34×10^{-59} , топлотна проводљивост је 0,72 W/m K, а теоријска густина ХАП износи $3,219 \text{ g/cm}^3$ [104]. Поред свега наведеног, ХАП се одликује и високом топлотном стабилношћу. На температурама нижим од 1200° C не долази до фазне трансформације у друге калцијум-фосфате. До одступања од стехиометријског састава долази због присуства малих количина карбоната када се фосфатна група замењује карбонатном. Тако настаје калцијумом дефицитарни ХАП, односно карбонатни ХАП који је идентичан биолошком хидроксиапатиту који чини минералну фазу коштаног ткива [2].



Слика 13. Кристална структура стехиометријског ХАП (А) [105]. Структура јединичне ћелије кристалне решетке стехиометријског ХАП (Б) [103].

Иако се биолошки апатити обично наводе као калцијум–хидроксиапатит, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, они су обично калцијум-дефицитарни и увек карбонатно супституисани, и од чистог ХАП се разликују по стехиометрији, саставу и кристаличности, као и по механичким својствима [2]. У табели 1 дат је упоредни састав, кристаличност и механичка својства људске глеђи, костију и синтетичког ХАП.

Табела 1 Упоредни састав, кристалне и механичке карактеристике хумане глеђи, костију и синтетичког ХАП [1].

	Глеђ	Кост	Синтетички ХАП
Састав (мас %)			
Калцијум, Ca^{2+}	36,0	24,5	39,6
Фосфор, P	17,7	11,5	18,5
(Ca/P) моларни	1,62	1,65	1,67
Натријум, Na^+	0,5	0,7	Тр
Калијум, K^+	0,08	0,03	Тр
Магнезијум, Mg^{2+}	0,44	0,55	Тр
Карбонат, CO_3^{2-}	3,2	5,8	-

Флуорид, F ⁻	0,01	0,02	-
Хлорид, Cl ⁻	0,30	0,10	-
Неоргански део	97,0	65,0	100
Органски део	1,0	25,0	-
Абсорбована H ₂ O*	1,5	9,7	-
Кристалографске особине			
Параметри решетке			
<i>a</i> -оса	0,9441	0,9419	0,9422
<i>c</i> -оса	0,6882	0,6880	0,6880
Индекс кристаличности	70-75	33-37	100
Величина кристала, nm	130 x 30	25 x 2,5-5	
Производи после синтеровања (950°C)	ХАП + ТЦП	ХАП+СаО	ХАП
Механичка својства			
Модул еластичности (10 ⁶ МПа)	0,014	0,020	0,01
Затезна чврстоћа (МПа)	70	150	100

Као што се може видети из табеле 1, биолошки апатити глеђи се разликују од оних у дентину или кости по кристаличности и концентрацији јона као што су нпр. карбонати и магнезијум, и имају највеће кристале у поређењу са апатитом у дентину или костима. Што се тиче растворљивости, глеђни апатит је мање растворљив од апатита кости, али много више растворљив од густог, синтетичког ХАП. Разлике у величини кристала потичу од разлике у концентрацији карбонатних и магнезијумових јона. Показано је да магнезијумови и карбонатни јони узрокују смањење кристаличности и пораст растворљивости синтетичког ХАП [2].

Међутим, поред наведених позитивних особина калцијум-хидроксиапатита, чист ХАП нажалост поседује и недостатке као што су: мала жилавост и веома велика кртост (ово посебно долази до изражаја код макропорозних носача), мала брзина разградње и мања биоактивност у поређењу са другим биоактивним материјалима [106]. ХАП се у густој и макропорозној форми често добија високотемпературним синтеровањем, а синтетише хидротермалним поступком [107, 108]. У оба случаја ХАП је значајно кристалнији од природног коштаног минерала, што га чини хемијски стабилнијим и практично неразградивим након имплантације [109, 110]. Међутим, недостатак разградње може довести до коштаних деформитета, као и до повећања ризика од фрактура у околини ХАП имплантата [111].

Са друге стране, β-ТЦП се лако ресорбује и замењује природним коштаном ткивом након имплантације [111]. Растворљивост β-ТЦП-а је приближна растворљивости коштаног минерала, што значи да се β-ТЦП не раствара након имплантације, већ се ресорбује од стране коштаних ћелија – остеокласта. Осим што се одликује остекондуктивним својствима, истраживања су показала да се β-ТЦП одликује и значајним остеоиндуктивним потенцијалом, због чега је заправо један од најпогоднијих материјала за производњу костних калемова [111]. β-ТЦП је високо-температурна фаза која се добија калцинацијом аморфног калцијум-фосфата или поликристалног калцијумом-дефицитарног ХАП, на температурама изнад 650-750 °C [112]. На температурама изнад 1115-1150 °C β-ТЦП прелази у α-ТЦП, а при даљем повећању температуре, добија се α'-ТЦП који је стабилан на температурама изнад 1430-1470 °C [113]. Температуре фазних прелаза могу да варирају услед присуства елементарних нечистоћа и допаната.

Биолошке и физичко-хемијске карактеристике ХАП могу бити додатно унапређене допирањем јонима различитих метала. Магнезијум је један од најважнијих елемената присутних у траговима у биолошком ХАП, чија дефицијенција штетно утиче на метаболизам скелета [114]. Магнезијумови јони имају есенцијалну улогу у процесу калцификације кости, утичући на

активност остеобласта и остеокласта [115]. Познато је да костни калемови базирани на магнезијумом допираном ХАП подстичу остеогенезу и ангиогенезу, што је доказано и у *in vitro* и у *in vivo* експериментима [116–119]. Поред тога, супституција калцијумових јона магнезијумовим, фаворизује прелаз ХАП у β -ТЦП при нижим температурама калцинације, што може да резултује додатном стабилизацијом β -ТЦП и формирањем БЦП [120, 121]. БЦП представља смешу ХАП и β -ТЦП, комбинујући физичко-хемијска својства обе фазе, што као резултат даје механички стабилан, разградив, остеокондуктиван и остеоиндуктиван материјал [101, 122, 123].

2.4. ХИДРОГЕЛОВИ У БИМЕДИЦИНИ: ПРИМЕНА И ЗАХТЕВИ

У оквиру биомедицинских примена хидрогелови могу да имају различите функције, од замене оштећеног ткива, преко контролисаног отпуштања лекова, до енкапсулације ћелија и ензима. За све наведене примене постоје одређени општи критеријуми које треба узети у обзир приликом дизајнирања хидрогелова [124]. Ови критеријуми приказани су на слици 14.



Слика 14. Основни захтеви при дизајну хидрогелова за примену у биомедицини. Адаптирано из [124].

Биокомпатибилност материјала је један од императива; тј. материјал не сме да изазове инфламаторну реакцију организма, имуногеност или цитотоксичност. Хидрогелови су због високог степена хидратисаности слични природном ванћелијском матриксу, због чега су уз избор адекватних конституената и биокомпатибилни [124]. Ипак, присуство непрореагованих молекула умреживача или мономера код синтетских полимера, или могућност изазивања упалног одговора одређених природних полимера, могу негативно да утичу на биокомпатибилност.

Биоразградивост је још једна од карактеристика коју би у већој или мањој мери требало да поседују биоматеријали и она мора бити усаглашена са стварањем новог ткива, односно биоматеријал се не сме ресорбовати у организму већом брзином од брзине раста новог ткива. Када испуни своју сврху, идеалан исход је разлагање хидрогела у продукте који не изазивају имунски или упални одговор организма и који се могу безбедно излучити [125]. Алтернативно је могуће користити и небiorазградиве материјале, али такви материјали понекад захтевају додатну операцију уклањања из тела када им се испуни сврха, што може да представља сложен и неугодан процес.

Механичка својства морају да обезбеде структурни интегритет имплантата у току руковања или уобичајених активности пацијента. Иако су хидрогелови релативно мекани и подложни ерозији у поређењу са другим материјалима, јаки и жилави хидрогелови чија својства приближно одговарају својствима природних ткива могу бити добијени контролом степена умрежавања, увођењем секундарних умрежења, синтезом ИПМ и сл. [124]. У сваком случају,

велики је изазов синтетисати хидрогелове који ће поред добрих механичких својстава бити оптимални и у погледу других својстава попут хидратисаности, биокомпатибилности, биоразградивости и могућности апликације минимално инвазивним методама.

Осим наведених карактеристика, хидрогелови треба да садрже и хемијске или биолошке сигнале за ефикасну интеракцију са ћелијама. Основна намена хидрогелова у инжењерству ткива осим што треба да надоместе губитак запремине, је и да пруже потпору за адхезију, пролиферацију и диференцијацију ћелија. Ово укључује и ћелије које хидрогелови носе пре имплантације и ћелије које се регрутују из околног ткива у хидрогел након имплантације. На пример, децелуларизовани порозни носачи добијени из животињског ткива садрже сложене биолошке сигнале и могу да подстакну пролиферацију и диференцијацију, али постоји опасност од изазивања имунског одговора [126]. Аминокиселинске секвенце аргинин-глицин-аспарагинска киселина потичу од фибронектина и широко се користе као лиганди за ћелијску адхезију [127]. Хемијске функционалне групе присутне на синтетичким полимерима, као што су хидроксилне и карбоксилне групе, фосфати и амини, могу такође утицати на диференцијацију матичних ћелија [128]. Поред тога, биолошки сигнали попут фактора раста, сигналних молекула, цитокина, као и других протеина и ензима могу бити инкорпорирани на различите начине унутар хидрогелова. Механичка чврстоћа хидрогела такође може деловати као сигнал. На пример, мезенхималне матичне ћелије могу преференцијално да се диференцирају у ћелије сличне неуронима, миогене ћелије или остеобласте, на основу крутости хидрогела и геометријских ограничења простора у ком се развијају [124].

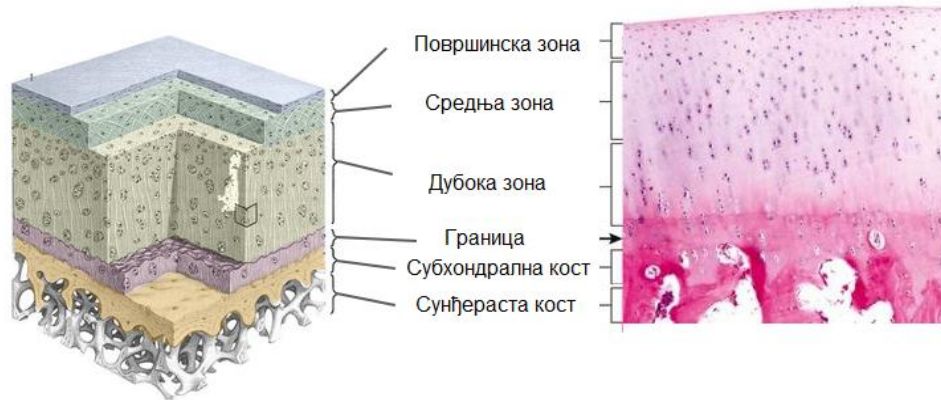
Уместо да хидрогел делује само као инертни материјал невидљив за имуни систем, манипулација имунолошким системом је понекад циљ имплантације хидрогела. Модулација сопственог одбрамбеног система тела против туморских ћелија је интересантна идеја и потенцијално ефикаснија од других врста терапија [129]. Такође, активирани макрофаги (ћелије имуног система) се могу индуковати лучењем азот-оксида и то може довести до појачане ангиогенезе [130]. Регулисањем секретума имуних ћелија је могуће променити микроокружење и привући друге ћелије које могу помоћи у регенерацији [131].

Инкорпорација активних супстанци у хидрогел не само да може да омогући продужени терапијски ефекат већ и контролисано отпуштање лекова у специфична ткива. Уопштено речено, хидрогелови пружају могућност просторно и временски контролисане испоруке активних супстанци [124]. При коришћењу хидрогелова инкапсулираних ћелијама, отпуштање антиуапалних лекова из истог хидрогела може помоћи у спречавању имунолошког одбацивања [132]. Матичне ћелије се такође могу инкапсулирати са факторима раста како би се подстакло њихово преживљавање и пролиферација [133]. Када се хидрогелови убризгавају интратуморално, хемотерапеутици се могу ослобађати локално унутар туморског микроокружења чиме се смањују непожељне последице системског дејства лека. Хидрогелови се такође могу дизајнирати да носе две и више активних супстанци и да их отпуштају на контролисан начин [134].

2.4.1. Хидрогелови за инжењерство ткива хрскавице

Поједностављено речено, хрскавица је ткиво које се састоји од једног типа ћелија – хондроцита (чине 5–10% запремине ткива), које су уметнуте у екстрацелуларни матрикс (ЕЦМ) изграђен претежно од молекула воде, колагена и протеогликана (чини око 90% запремине ткива) [135]. Структура ЕЦМ се генерално може поделити на три основна слоја: површинску зону, средњу зону и дубоку зону, које се разликују по структури, густини, садржају и типу хондроцита (Слика 15). У средњој зони хрскавично ткиво је круто, аваскуларно и има малу густину заобљених хондроцита окружених ЕЦМ-ом који се састоји од гликозаминогликана (ГАГ) и колагена типа II. Оштећење хрскавице услед трауме обично почиње као фокални дефект, који касније напредује до

дефекта пуне дебљине када лезија дође у контакт са околном кости. Због ниског садржаја ћелија, слабе васкуларизације и прокрвљености, минималног пролиферативног капацитета резиденцијалних хондроцита и занемарљиве миграције ћелија у подручја оштећења, зглобна хрскавица сама по себи није у стању да се регенерише [136].



Слика 15. Структура хрскавице. Адаптирано из [137].

Постојеће стратегије за регенерацију фокалних и дефеката хрскавице пуне дебљине, еволуирале су од операције чији је циљ да изазове ендogene механизме опоравка (нпр. микрофрактура), до остеохондралне трансплантације, а недавно и до техника заснованих на ћелијама, као што је имплантација аутологних хондроцита (ИАХ) [138]. ИАХ је процедура у којој се хондроцити пацијента уграђују у дефект хрскавице [139]. Међутим, код процедура микрофрактура и ИАХ не постоји тродимензионални носач који пружа потпору ћелијама и управља формирањем матрикса. Из тих разлога развијена је новија метода – имплантација хидрогелова са аутологним хондроцитима која допуњује ИАХ обезбеђујући хондроцитима потпору за формирање матрикса [139]. Упркос обећавајућим резултатима, ове клиничке технике нису без својих ограничења, укључујући хируршке процедуре и квалитет формиране хрскавице.

Један од кључних критеријума при дизајну хидрогелова за регенерацију хрскавице је механички интегритет. Традиционални једнокомпонентни хидрогелови су обично далеко инфериорнији у погледу механичких својстава од природне хрскавице [135]. Међутим, побољшање механике кроз повећање степена умрежења може угрозити вијабилност инкапсулираних ћелија због смањене дифузије, због чега се фокус помера са конвенционалних једнокомпонентних хидрогелова ка сложенијим системима, укључујући ИПМ. Ови системи не само да често постижу значајно боља механичка својства, већ могу показати супериорну интеграцију са околним ткивом *in vivo*.

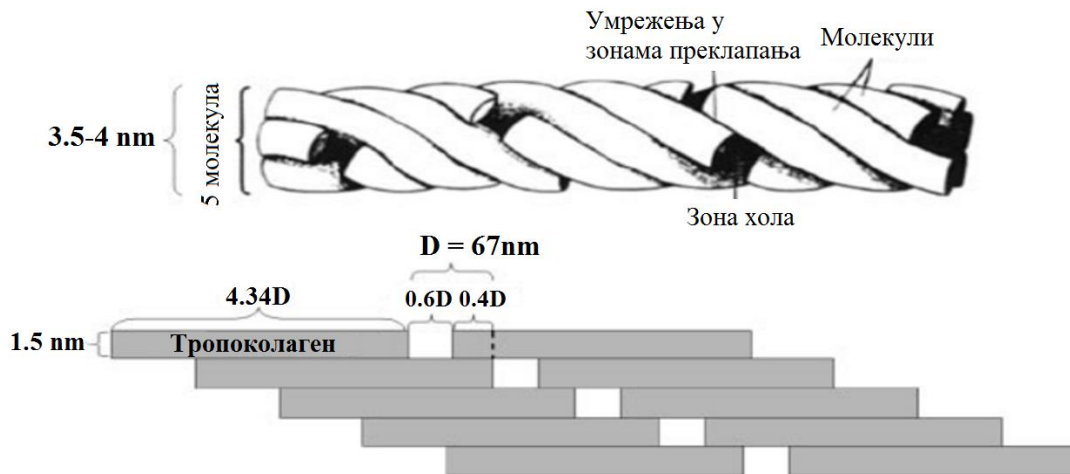
2.4.2. Хидрогелови за инжењерство коштаног ткива

Коштано ткиво има неколико виталних физиолошких функција у људском телу укључујући одржавање облика тела, детоксикацију, заштиту коштане сржи или органа и кретање. Осим тога, представља складиште минерала и одржава минералну хомеостазу путем складиштења или ослобађања минералних супстанци [140]. Дефекти настали услед траума, инфекција, тумора и старости су неки од најчешћих оштећења коштаног ткива при којима долази до критичног губитка масе [141]. Иако се коштано ткиво одликује потентним ендogenим капацитетом за самоизлечење, реконструктивна хирургија има значајну улогу у третману коштаних дефеката, али је истовремено изазовна и за пацијенте и за клиничке хирурге.

Конвенционални репаративни третмани костних дефеката подразумевају коришћење костних калемова узетих са ткива пацијента (аутологни калемии) или са ткива донора (алогени калемии), али поседују одређена ограничења као што су постоперативне компликације на месту узимања ткива, неусклађеност морфологије, ограниченост залиха и могућност преноса патогена [142]. Ово је довело до појаве вештачких костних калемова који могу бити једнофазни и вишефазни. Ови материјали су успели да превазиђу, до неке мере, ограничења и компликације који се јављају код аутологних и алогених калемова. Међутим, основни проблем који се јавља код ових материјала је структурна и функционална различитост у односу на природну кост.

Микроскопски посматрано, кост се може поделити на три основне компоненте: ванћелијски матрикс, ћелије и биоактивне факторе. Калцификовани коштани ванћелијски матрикс чине органска фаза (чини око 20% ванћелијског матрикса), минерална фаза (65%) и вода (10%) [106].

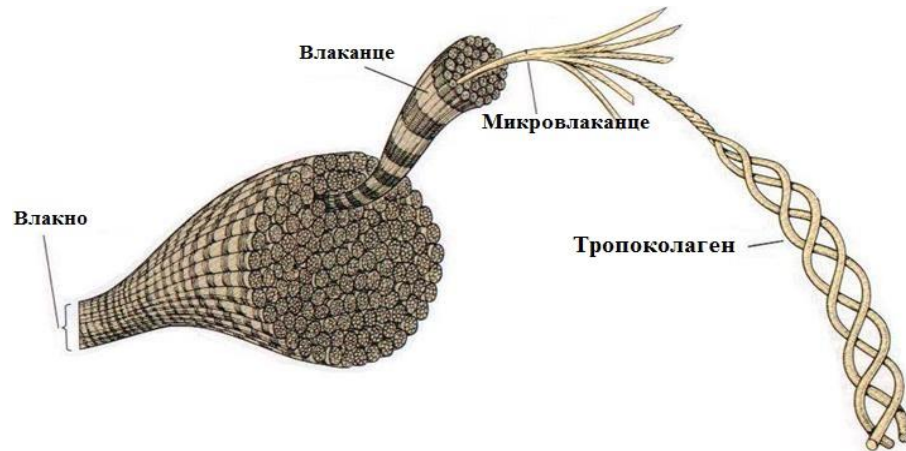
Органска фаза костију састоји се претежно од колагена (90%) стабилизованог водом и серијом неколагених протеина и липида. Колаген је најзаступљенији протеин коштаног ванћелијског матрикса и најзаступљенија материја у телима сисара [2, 143]. Постоји више од дванаест различитих врста колагена, сваки детерминисан тачним секвенцама аминокиселина у својим молекулима. Колаген у костима је типа I и синтетишу га коштане ћелије – остеобласти. Три полипептидна ланца (дужине око 1000 молекула аминокиселина [144]) повезана у структуру троструког хеликса формирају молекул тропоколагена дужине 300 nm и пречника 1.5 nm током процеса који се одвија унутар ћелија [143]. Затим се тропоколаген отпушта у ванћелијски простор где се иницира процес слагања молекула тропоколагена у микровлаканца колагена (енг. *microfibrils*) – пет молекула тропоколагена слаже се и формира микровлаканце које има карактеристичну дужину траке од 67 nm (D – период понављања), коју чине зона шупљине (енг. *hole region*) и зона преклапања (енг. *overlap region*) (слика 16) [143]. Претпоставља се да регион шупљина (холова) може бити место на коме започиње нуклеација калцијум-хидроксиапатита [2].



Слика 16. Структура колагеног микровлаканца састављеног од пет међусобно повезаних молекула тропоколагена. Адаптирано из [145].

Микровлаканца се везују бочно и уздужно са другим микровлаканцима, формирајући влаканца (енг. *fibrils*) чији пречник може да варира [143]. У биолошким ткивима влаканца не постоје сама, већ се повезују у веће, уређене структуре које се називају влакна (енг. *fibers*) [144].

Колагена влакна се затим уређују формирајући ламеле и остеооне [143]. Хијерархијска структура колагена приказана је на слици 17.



Слика 17. Хијерархијска структура колагена. Адаптирано из [2].

Најважнија неорганска компонента коштаног ткива је ХАП са многим супституцијама унутар молекула: К, Mg, Sr, и Na уместо Са; карбонати уместо фосфата и флуориди уместо ОН⁻ групе, итд. [2]. Јавља се у облику плочастих нано-кристала дебљине 2-10 nm, дужине 20-50 nm и ширине 15-30 nm, депонованих дуж колагених микровлаканаца. Мала величина и нестехиометричност ХАП кристала, омогућавају потребну растворљивост минералне фазе за процес ресорпције, који врше ћелије остеокласти [143]. Иако структура коштаног ткива може значајно да варира у зависности од места у скелету, основна јединица грађе костију коју чине минерализована колагена влакнаца остаје иста. Заправо је специфична наноструктурна организација оно што кости чини природним нано-композитом и пружа им изванредна механичка својства и могућност ремоделовања [143]. Неколагени протеини чине до 10% органске фазе и имају важну улогу у регулацији нуклеације и раста минералне фазе у току биоминерализације костију [143]. Поред органске и неорганске фазе, вода је трећи значајни конституент коштаног ткива. Налази се између молекула колагена где стабилише структуру повезујући суседне молекуле путем водоничних веза. Има значајан утицај на механичка својства коштаног ткива [143, 144]

С обзиром на комплексну структуру коштаног ткива и наведене недостатке конвенционалних приступа, научници су развили низ терапијских метода заснованих на различитим порозним, тродимензионалним носачима – скафолдима (енг. *scaffold*). Скафолди представљају тродимензионалне порозне структуре које се имплантирају на места костних дефеката да надоместе постојећи губитак запремине и пруже потпору за адхезију, раст и пролиферацију ћелија, а са циљем да се омогући раст и регенерација оштећеног ткива. Постоје два основна приступа у инжењерству коштаног ткива [146]:

- 1) Изоловање аутологних матичних ћелија, размножавање *ex vivo*, имобилизација на порозном носачу и култивација у биореакторским условима, након чега се целокупна конструкција имплантира у место дефекта.
- 2) Имплантирација ацелуларног биоматеријала.

Имплантирација ацелуларног биоматеријала је једноставнији приступ који не захтева решавање проблема избора ћелија и имунолошког одговора организма. Погодан је за репарацију

мањих оштећења и добро прокрвљених ткива, док није ефикасан при третману већих дефеката и ткива која се спонтано не регенеришу (хрскавица, нерви, лигаментни, срчани мишић, итд.) [2]. Суочавајући се са комплексним и осетљивим биолошким системом какав је људски организам, изазови за дизајнирање биоматеријала за инжењерство коштаног ткива су вишеструки и веома захтевни. Пре свега, биокомпатибилност материјала је један од императива; тј. материјал не сме да изазове инфламаторну реакцију организма, имуногеност или цитотоксичност. Поред тога, механичка својства морају да обезбеде структурни интегритет скафолда у току руковања или уобичајених активности пацијента. Као и сви остали материјали који су у контакту са људским организмом, скафолди морају имати могућност једноставне стерилизације ради спречавања инфекције. Даљи услов за дизајн скафолда који се користе за репарацију коштаног ткива, је могућност формирања структура са контролисаним међусобно повезаним порама, које ће усмеравати раст ћелија у жељену структуру, омогућавати васкуларизацију ураслог ткива и размену гасова, храњивих и отпадних материја. Познато је да су типична порозност од 90% као и величина пора од минимално 100 μm обавезне за добру пенетрацију ћелија и васкуларизацију новонасталог ткива. Друге веома пожељне особине које се тичу процесирања скафолда биле би могућност једноставног добијања финалног производа (енг. *near-net-shape*) и прилагодљивост економичној индустријској производњи [147].

Велики број биоматеријала данас се истражује за употребу у инжењерству коштаног ткива од којих су најзначајнији природни и синтетички полимери, биокерамички и биокомпозитни материјали. Полимерни скафолди привлаче велику пажњу због својстава као што су велика специфична површина, порозност, биокомпатибилност и разноврсност у погледу хемијских, биолошких и механичких својстава [148]. Природни полимери коришћени у инжењерству коштаног ткива припадају групи биоразградивих материјала и према хемијском саставу и структури могу се поделити у две групе: протеини (свила, колаген, соја, фибрин) и полисахариди (скроб, хитин/хитозан, алгинат и деривати хијалуронске киселине) [147]. Основна предност природних полимера је велика биокомпатибилност и могућност биолошког препознавања од стране ћелија, што доводи до побољшане адхезије и диференцијације ћелија. Међутим, природни полимери поседују неколико недостатака укључујући лоша механичка својства и могућност изазивања имунолошког одговора услед нечистоћа присутних након процесирања.

Синтетички полимери се широко користе и истражују за биомедицинске примене, с обзиром да њихова својства (нпр. порозност, брзина деградације, механичке карактеристике) могу бити прилагођена за примену у специфичним околностима. Поред тога, често су јефтинији од биолошких скафолда и могу бити произведени у великим количинама. Велики број комерцијално доступних синтетичких полимера испољава физичко-хемијска и механичка својства упоредива са својствима биолошких ткива [148]. Генерално, испољавају предвидива и репродуцибилна механичка и физичка својства као што су затезна чврстоћа, модул еластичности и брзина деградације. Још једна предност им је могућност контроле нечистоћа. Могући ризици од токсичности, имуногености и инфекција су мањи код чистих, синтетичких полимера. Највише коришћени синтетички полимери у биомедицини су поливинил алкохол, поли (лактозна киселина), поли (гликолна киселина) и поли (хидроксибутират) [147].

Биоактивна керамика спада у групу најистраживанијих материјала за примену у инжењерству коштаног ткива. Заједничка карактеристика биоактивних керамичких материјала је образовање биолошки активног наноструктурног слоја карбонатног хидроксиапатита на површини материјала, након имплантације. Карбонатни ХАП који се формира на површини биоактивних импланата је хемијски и структурно еквивалентан минералној фази коштаног ткива, што омогућава успостављање биолошке везе између импланта и околног ткива [147]. На овај начин се спречава формирање фиброзне опне и промовише осеоинтеграција, што може бити од пресудног значаја за функционалност и успешну примену имплантираног материјала [149].

ХАП је као најважнији конституент неорганске фазе костију и зуба, уз друга калцијум-фосфатна једињења (нпр. α -ТЦП и β -ТЦП), један од највише испитиваних материјала из групе биоактивне керамике за примену у инжењерству коштаног ткива. Калцијум-фосфатне материјале одликује одлична биокompatibilност и остеокондуктивност, а поред тога подстичу адхезију, диференцијацију и пролиферацију остеобласта и мезенхималних матичних ћелија [102, 147]. Ипак, спора деградација и незадовољавајућа механичка својства ограничавају примену ХАП у инжењерству коштаног ткива [147].

С друге стране, биоактивна стакла су биоразградива и брзина њихове разградње се може контролисати [102]. Показано је и да подстичу активност ензима и васкуларизацију, промовишу адхезију, раст и диференцијацију остеобласта, а индукују и диференцијацију мезенхималних матичних ћелија у остеобласте. Ипак, као и у случају калцијум-фосфатне керамике, мала жилавост лома и лоша механичка својства у порозној форми, условљавају област примене биоактивних стакала на дефекте који нису подвргнути великим напрезањима [147].

Једнофазни материјали не испуњавају све захтеве у погледу хемијских, механичких и биолошких својстава скафолда за примену у инжењерству коштаног ткива. Биокерамички материјали су превише крти, а полимери не поседују задовољавајућу механичку чврстоћу и не испољавају биоактивност. Због тога се последњих година велика пажња посвећује развоју композитних материјала. Комбинацијом полимера и биоактивне керамике обједињују се пожељна својства појединачних компоненти у заједнички композитни материјал [148]. Резултујући материјал задржава својства обрадивости и пластичности полимерне компоненте, уз побољшање механичких својстава и биоактивности услед инклузије честица биоактивне керамике [147].

Хидрогелови се одликују својствима атрактивним за примену у инжењерству коштаног ткива, међутим, релативно слаба механичка својства и недостатак остеокондуктивних и остеоиндуктивних фактора значајно ограничавају ширу употребу хидрогелова у репарацији дефеката коштаног ткива. Синтезом ИПМ хидрогелова последњих година, границе механичких својстава су значајно померене, док је инкорпорација честица калцијум-фосфатне керамике допринела побољшању остеоиндуктивних својстава хидрогелова [150, 151]. Ипак, и даље је велики изазов синтетисати хидрогелове са оптималним својствима не само у погледу механике и остеоиндуктивности, већ и других својстава као што су порозност, брзина разградње, биокompatibilност, контролисано отпуштање лекова и биоактивних фактора, итд. Композитни хидрогелови ојачани честицама калцијум-фосфатне керамике, намењени за инжењерство коштаног ткива предмет су изучавања бројних научних радова последњих година [106].

Ли и сарадници су развили нано-ХАП/полиакриламид композитне хидрогелове са вишим вредностима затезног напрезања и компресивне чврстоће у односу на чисте полиакриламидне хидрогелове [152]. Компресивна чврстоћа чистих хидрогелова повећана је са 22 МПа на 36 МПа инкорпорацијом 15% ХАП, што је повећање од 63%

Ху и сарадници су синтетисали нано-ХАП/агароза композитне хидрогелове и показали да уношење наночестица ХАП у структуру хидрогелова побољшава термичку стабилност, механичка својства и диференцијацију MG63 ћелија (ћелије хуманог остеосаркома) [153]. Композит са масеним односом агарозе и ХАП 70/30 имао је највише вредности компресивне чврстоће (~400 МПа), док је композит са односом 65/35 имао највише вредности модула еластичности (~1100 МПа, дупло веће од чистог агарозног гела). Значајно побољшање механичких својстава аутори су објаснили формирањем интермолекулских водоничних веза између полимерне матрице и честица ХАП.

Сферне порозне честице ХАП и БЦП инкорпорирани у композитне хидрогелове на бази алгината и желатина, допринеле су значајном повећању притисне чврстоће композитних хидрогелова [154]. Поред тога, *in vivo* испитивања на зечевима показала су значајно брже образовање новог коштаног ткива у случају композита са 25% ХАП, у односу на чисте композите.

Чанг је синтетисао нано-ХАП/хитин хидрогелове са порозном структуром, добрим механичким својствима и одличном биокомпатибилношћу [155]. Додатак 20% наночестица ХАП знатно је утицао на побољшање механичких својства и термичку стабилност хидрогелова. Притисна чврстоћа хидрогелова достигла је 274 кРа, што је десетоструко повећање у односу на чисте хидрогелове, док је вредност модула еластичности повећана са ~23 кРа на ~320 кРа. Поред тога, пролиферација ћелија из ткива мајмунских бубрега била је израженија на композитним хидрогеловима у поређењу са чистим хитиновим хидрогелом.

Кумар и сарадници су синтетисали бризгљиве хитин/поликапролактон/ХАП композитне хидрогелове, који су показали прилагодљива реолошка својства и добру бризгљивост и након додатка 25% ХАП [156]. Композитни хидрогелови су са додатком ХАП показали и двоструко повећање вредности модула еластичности ($14,2 \pm 0,5$ кРа) у односу на чисте хидрогелове ($7,2 \pm 0,3$ кРа).

Композитни хидрогелови хидроксипропил-гуара, поли(винилалкохола) (ПВА) и ХАП, добијени методом замрзавање-одмрзавање, имали су већу термичку стабилност у односу на једнофазне хидрогелове хидроксипропил-гуара и ПВА. Такође, током *in vitro* испитивања биоактивности у симулираној телесној течности (ССТ) дошло је до образовања кристала ХАП на површини композита. Резултати *in vitro* испитивања на мишијим остеобластима МС3Т3 показали су задовољавајућу цитокомпатибилност без знакова цитотоксичности, за разлику од једнофазног ПВА [157].

Стојковска и сарадници су синтетисали композитне хидрогелове на бази БЦП и алгината, са отвореним и међусобно повезаним порама, који су показали значајно побољшање механичких својстава у односу на чисте алгинатне хидрогелове. Честице БЦП добијене су калцинацијом магнезијумом-допираног ХАП добијеног хидротермалном методом. Испитивања биоактивности композитних хидрогелова у ССТ након 28 дана, показала су значајно већу биоактивност композита инкубираних у биореактору под динамичким условима, у поређењу са статичким. Добијени резултати се могу објаснити позитивним ефектима перфузије медијума на пренос масе и кинетику формирања ХАП, као и на деградацију полимера под хидродинамичким смицајним напрезањима [158].

Хидрогелови ПВА/ХАП у истраживању Менга и сарадника, синтетисани су комбинацијом метода замрзавање-одмрзавање и *in situ* преципитације. Повећање садржаја ХАП од 0-8% довело је до смањења садржаја воде од 86,9% до 80,2% и до побољшања механичких својстава композита. Најјефективније побољшање механичких својстава, са вредностима затезне и притисне чврстоће од 0,29 и 0,40 МРа (0,23 и 0,15 МРа су вредности чистих хидрогелова), било је при додатку 6% ХАП, након чега је даље повећање садржаја ХАП довело до деградације механике композитних хидрогелова. Објашњење оваквог понашања је да наночестице ХАП због високе чврстоће и велике специфичне површине, ефективно интерагују са матрицом и побољшавају механичка својства материјала, али да након достизања критичног садржаја ХАП у композиту долази до агрегације честица и слабљења механичких својстава [159, 160].

Суварнапатаки и сарадници показали су значајно побољшање механичких и биолошких својстава хидрогелова на бази желатин-метакрилата са додатком микрочестица ХАП [161]. При масеном односу ХАП/полимер = 0,4 вредности притисног модула су порасле дупло, док су маркери остеогене диференцијације преостеобласта били повишени, у поређењу са чистим хидрогеловима.

У раду Емамија и сарадника, додатак наночестица ХАП значајно је унапредио механичка својства хидрогелова на бази желатина и оксидованог алгината. Вредности модула сачуване енергије и притисног модула порасле су са 4,7 и 14,7 кРа, на 13,0 и 23,2 кРа, са додатком 15% ХАП. Поред тога, композитни хидрогелови са 10% ХАП показали су већу биокомпатибилност у односу на чисте хидрогелове. Чисти хидрогелови су садржали велики удео оксидованог алгината

и слободних алдехидних група које имају велику реактивност и могу да интерагују са ћелијама. Алдехидне групе могу да формирају комплексе са ДНК, РНК и протеинима, што ремети ћелијску хомеостазу, оштећује ДНК и доводи до смрти ћелије [162]. Са додатком ХАП, слободне алдехидне групе интерагују са честицама ХАП и умањују негативан утицај на биокомпатибилност хидрогелова.

2.4.3. Хидрогелови за контролисано отпуштање активних супстанци

Репарација дефеката ткива, поред уграђивања тродимензионалних порозних материјала који надомешћују губитак запремине, често захтева и локалну снабдевеност дефекта и околине ћелијама, биоактивним факторима и различитим активним супстанцама, чија је сврха подстицање раста новог ткива и сузбијање потенцијалних нежељених ефеката имплантације, као што су појава инфекције или претеран имунолошки одговор организма. Орално уношење лекова поред тога што има системски утицај на организм, често захтева коришћење високих доза, значајно повећавајући ризик од различитих нежељених дејстава која могу имати озбиљне последице по здравље организма. Хидрогелови, с друге стране, представљају ефикасне носаче помоћу којих се активне супстанце могу отпуштати локално и на контролисан начин. На пример, хидрогелови на бази полимера и ХАП представљају атрактивна решења у ортопедији с обзиром на хемијску и структурну сличност са природним коштаном ткивом, а контролисано отпуштање лекова с нпр. антимицробним и антиупалним дејствима може да омогући активну заштиту од инфекција и прекопотребну аналгезу дефекта након операције, при том делујући локално и избегавајући штетна дејства лекова на друге органе. Примери клиничке праксе у којима би хидрогелови са контролисаним отпуштањем активних супстанци били од користи укључују третман остеомијелитиса, остеосаркома и других малигнитета коштаног ткива, остеоартритиса, остеонекрозе, псеудоартрозе и других крупних дефеката коштаног ткива [163]. Остеомијелитис представља инфекцију коштаног ткива изазвану бактеријом *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) која може да доведе до озбиљних компликација [164]. Акутни остеомијелитис се може успешно лечити антибиотикима ако се реагује правовремено, док се у случају хроничног остеомијелитиса формира биофилм који се тешко третира. Системска администрација антибиотика за лечење остеомијелитиса може проузроковати негативне споредне ефекте по организм укључујући нефротоксичност, ототоксичност или последице по гастроинтестинални (ГИТ) систем, због чега се хидрогелови са контролисаним отпуштањем лека нуде као ефикасно решење за третман остеомијелитиса [165]. У најчешће коришћене лекове који се испитују као активне супстанце система за контролисано отпуштање, при третману остеомијелитиса, спадају ванкомицин, гентамицин, цефазолин, тобрамицин, као и лекови из породице флорокинолона – ломефлоксацин, левофлоксацин и ципрофлоксацин [165]. Ципрофлоксацин (1-циклопропил-6-флуоро-4-оксо-7-(пиперазин-1-ил)-хинолин-3-карбоксилна киселина) је синтетички антибиотик из породице флорокинолона који се одликује одличном антибактеријском активношћу против грам-позитивних и грам-негативних бактерија [166]. Широко се примењује за третман различитих инфекција коже, костију и ГИТ система, узрокованих мултирезистентним патогенима, полно преносивим болестима, компликованим уринарним инфекцијама, упалама плућа итд.

Осим антибиотика, хидрогелови се често користе као носиоци антиупалних лекова за третман остеоартритиса, улцерозног колитиса [167, 168], колоректалног канцера [169], итд., при чему су у те сврхе коришћени различити стероидни и нестероидни антиупални лекови попут ацетил-салицилне киселине, ибупрофена, накспрофена, хидрокортизон, итд. Нестероидни антиупални лекови (НАУЛ) су класа антиупалних лекова чији се механизам дејства заснива на инхибирању активности циклооксигеназе, кључног ензима за катализу реакције преласка арахидонске киселине у простагландине - медијаторе упалне реакције [170].

Оксапрозин, дериват пропанске киселине један је од водећих НАУЛ лекова на америчком тржишту који се претежно користи у третману мускулоскелетних болести као што су реуматоидни артритис, остеоартритис, анкилозирајући спондилитис, тендинитис и бурситис [171]. Доказано је да је оксапрозин једнако ефикасан као аспирин у значајно мањим дозама [172]. Осим антиупалног дејства, неколико истраживања која су показала повезаност повећане експресије циклооксигеназе и пролиферације туморских ткива [173–176], као и апоптозу туморских ћелија инхибицијом циклооксигеназе [177, 178], указују и на потенцијална антиканцерогена својства оксапрозина.

У раду Жанга и сарадника, синтетисан је композит хитозан/ β -ТЦП/биоактивно стакло за отпуштање гентамицина [179]. Гентамицин је инкапсулиран урањањем композита у раствор гентамицина током 48 h. Кинетика отпуштања лека чистих скафолда на бази хитозана у фосфатном пуферу, одликовала се наглим почетним отпуштањем у току првих 12 h, при чему је отпуштено око 77% инкапсулираног гентамицина. Додатком 10% β -ТЦП и биоактивног стакла, почетно отпуштање је опало на 39%. Након 5 дана отпуштено је 80% гентамицина, док је укупан период отпуштања лека износио око 3 недеље. За постизање оптималних остеогенетских услова, терапеутска доза гентамицина на местима повреде процењује се на 1–10 ng/mL током периода од 4 недеље. Како се већина система за доставу лекова одликује наглим почетним отпуштањем, додаток биоактивне керамике могао би да буде један од начина за смањење претераног иницијалног отпуштања и бољу контролу кинетике отпуштања

Сличне резултате објавили су у свом истраживању и Вицлер и сарадници. Додатак 67% ХАП агарозним геловима смањио је количину отпуштеног аденозин трифосфата током првих 8 h са 90% на 20%, уз продужено отпуштање у периоду од 4 дана [180].

Јан и сарадници су синтетисали бризгљиве композитне хидрогелове на бази алгината и ХАП, у чију су структуру инкорпориране микросфере желатина, носиоци активне супстанце [181]. Током 21 дана испитивања, отпуштено је 46,4% тетрациклин-хидрохлорида, показујући значајно различиту кинетику отпуштања у односу на чисте алгинатне хидрогелове, код којих је дошло до наглог почетног отпуштања и достизања платоа већ након 7 дана.

Парис и сарадници су синтетисали композитни хидрогел агарозе и ХАП за примену у инжењерству коштаног ткива, са двоструким отпуштањем [182]. Истовремено отпуштање золедронске киселине (антиостеопоротски агенс) и ибупрофена (антиупални лек) праћено је у физиолошком раствору на температури од 37 °C. Резултати су показали да се ибупрофен отпустио веома брзо, већ после 3 h, док се за исти временски период отпустило само 9% золедронске киселине. Након 72 h само 20% золедронске киселине је отпуштено. Оно што је занимљиво је да је кинетика отпуштања ибупрофена независна од начина инкорпорирања ибупрофена у композит (у једном случају ибупрофен је додат током синтезе, док је у другом случају инкапсулиран након синтезе) и контролисана је брзином бубрења композита. С друге стране, између фосфонатних група золедронске киселине и калцијумових јона хидроксиапатита долази до образовања хелатних веза што спречава отпуштање золедронске киселине у већој мери.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

Експериментални део дисертације обухвата синтезу ИПМ хидрогелова на бази ПМК и природних полимера (желатина, алгината и хитозана), при чему је највећа пажња посвећена системима на бази ПМК и желатина. Након утврђивања оптималних састава и својстава синтетисаних ИПМ, синтетисани су и испитани композитни хидрогелови на бази исте полимерне

матрице и различитих калцијум-фосфатних пунилаца као биоактивне компоненте за подстицање регенерације коштаног ткива. Карактеризација добијених материјала подразумевала је различите методе испитивања физичко-хемијских, механичких и биолошких својстава хидрогелова, при чему је посебан акценат био на испитивању могућности контролисаног отпуштања активних супстанци.

3.1. РЕАКТАНТИ

Реактанти који су коришћени за синтезу ИПМ хидрогелова, калцијум-фосфатних пунилаца и композита су коришћени у облику у ком су добијени, без накнадног пречишћавања.

Реактанти за синтезу хидрогелова:

- Метакрилна киселина ($C_4H_6O_2$) (99,5%), Merck KGaA, Дармштад, Немачка
- Акрилна киселина ($C_3H_4O_2$) (99,5%), Merck KGaA, Дармштад, Немачка
- Желатин, од говеђе коже, тип Б, „Sigma-Aldrich“, Сент Луис, Мисури, САД
- Натријум-алгинат, „Sigma-Aldrich“, Сент Луис, Мисури, САД
- Хитозан, средње молекулске масе, „Sigma-Aldrich“, Сент Луис, Мисури, САД
- *N,N'*-метиленбисакриламид (МБА), „Sigma-Aldrich“, Сент Луис, Мисури, САД
- Полиетилен гликол диакрилат (ПЕГДА)
- Натријум хидроксид (NaOH), грануле „Sigma-Aldrich“, Сент Луис, Мисури, САД
- Иницијатор 2,2'-азобис[2-(2-имидазолин-2-ил)пропан] дихидрохлорид (VA-044) (99,8%), Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Осака, Јапан
- Етанол (96%),

Активне супстанце:

- Оксапрозин је синтетисан на катедри за органску хемију Технолошко-метаулршког факултета, Универзитета у Београду, према процедури описаној у литератури [183].
- Ципрофлоксацин ($C_{17}H_{18}FN_3O_3$)($\geq 98\%$), Merck KGaA, Дармштад, Немачка

Реактанти за синтезу калцијум-фосфатних пунилаца:

- Калцијум-нитрат тетрадрат ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$) ($\geq 98\%$), „Carl Roth GmbH“, Немачка
- Динатријум-етилендиаминтетраацетат дихидрат ($Na_2H_2EDTA \cdot 2H_2O$) ($> 99\%$), „Sigma-Aldrich“, Сент Луис, Мисури, САД
- Натријум-дихидроген-фосфат дихидрат ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) ($> 99\%$), „Sigma-Aldrich“, Сент Луис, Мисури, САД
- Магнезијум-нитрат хексахидрат ($Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$), „Sigma-Aldrich“, Сент Луис, Мисури, САД
- Уреа (CH_4N_2O) ($\geq 99,5\%$), „Sigma-Aldrich“, Сент Луис, Мисури, САД

3.2. СИНТЕЗА КАЛЦИЈУМ-ФОСФАТНИХ ПУНИЛАЦА

Наноструктурне честице ХАП синтетисане су на катедри за неорганску хемијску технологију Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, хидротермалним поступком [108, 184, 185]. Прекурсорски раствор је припремљен растварањем компоненти приказаних у табели 2 у 1500 ml дејонизоване воде. Реакциони суд са раствором постављен је у

аутоклав, у који је додато још 1500 ml дејонизоване воде, након чега је третиран на температури од 160 °C и притиску од 8 bar, током 3 h. Након завршетка реакције и хлађења раствора до собне температуре, добијени прах је процеђен кроз филтер папир на Бихнеровом левку, испран дејонизованом водом и осушен на 105 °C. Честице БЦП добијене су накнадном калцинацијом ХАП-Mg наноструктурног праха 2 h на 1050 °C [158, 185].

Табела 2. Састави прекурсорских раствора за синтезу калцијум-фосфатних пунилаца.

Пунилац	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ (g)	Na_2H_2EDTA $\cdot 2H_2O$ (g)	$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (g)	Urea (g)	$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (g)	(Ca+Mg)/P
ХАП	11,80 (50,0 mmol)	11,18	4,68 (0,03 mmol)	12	0 (0,0 mmol)	1,67
ХАП-Mg	10,22 (43,3 mmol)	11,80	4,68 (0,03 mmol)	12	0,583 (2,3 mmol)	1,52

3.3. СИНТЕЗА ХИДРОГЕЛОВА

3.3.1. Синтеза ИПМ хидрогелова ПМК и природних полимера

Процес синтезе ИПМ хидрогелова изведен је термички индукованом полимеризацијом преко слободних радикала (ТИПСР) метакрилне киселине, у присуству умреживача (МБА), иницијатора и природних полимера. Конкретно, у реакционом суду растворено је 0,3 ml МК у 1,0 ml дестиловане воде, након чега је додато 0,4 ml 1% раствора МБА, 0,2 ml 1 M раствора NaOH, и 0,2 ml 1% раствора VA-044. Након умешавања реакционе смеше додата је одређена количина природног полимера (Табела 3). После 10 min мешања (у случају желатина мешање се одиграло на 70 °C, а у осталим случајевима на собној температури) реакциона смеша је изливена у цилиндричне калупе пречника 8 mm, који су остављени у сушници на 70 °C током 3 h, ради одигравања реакција полимеризације и умрежавања. Добијени хидрогелови су извађени из калупа и исечени на дискове дебљине 5 mm, након чега су припремани за даља испитивања у зависности од методе карактеризације.

Табела 3. Кодни називи узорака и концентрација природних полимера у реакционој смеси

Узорак	Врста природног полимера	Концентрација природног полимера (g/ml)
ПМК0	/	0,0
ПМКЖ1	желатин	0,1
ПМКЖ2	желатин	0,2
ПМКЖ3	желатин	0,3
ПМКА1	алгинат	0,015
ПМКА2	алгинат	0,025
ПМКА3	алгинат	0,035
ПМКХ1	хитозан	0,01
ПМКХ2	хитозан	0,015
ПМКХ3	хитозан	0,025

3.3.2. Синтеза физички умрежених ПМКЖ хидрогелова

Синтеза ИПМ хидрогелова на бази ПМК и желатина (ПМКЖ) изведена је путем ТИПСР, у присуству МК, желатина и иницијатора. У овом кораку испитивања ПМКЖ хидрогелова синтетисани су и испитани хидрогелови без додавања умреживача и NaOH. Конкретно, у реакционом суду растворена је одређена количина МК и желатина у 1,0 ml дестиловане воде (Табела 4). После 10 min темељног мешања на 70 °С, додата је одређена количина 1% раствора иницијатора, након чега је реакциона смеша изливена у ваљкасте калупе пречника 6 mm. Калупи су постављени у сушници на 65 °С током 5 h, ради одигравања реакције полимеризације. Добијени хидрогелови су извађени из калупа и исечени на дискове дебљине 5 mm, након чега су припремљени за даља испитивања у зависности од захтева методе карактеризације.

Табела 4. Кодни називи хидрогелова и концентрације компоненти у реакционој смеси приликом синтезе физички умрежених ПМКЖ хидрогелова.

Узорак	МК (ml/ml)	желатин (g/ml)	Иницијатор 1% раствор (ml)
ПМК30Ж10	0,30	0,10	0,12
ПМК40Ж10	0,40	0,10	0,16
ПМК50Ж10	0,50	0,10	0,20
ПМК60Ж10	0,60	0,10	0,24
ПМК80Ж10	0,80	0,10	0,32
ПМК60Ж0	0,60	0,00	0,24
ПМК60Ж5	0,60	0,05	0,24
ПМК60Ж20	0,60	0,20	0,24
ПМК60Ж30	0,60	0,30	0,24
ПМК60Ж40	0,60	0,40	0,24

3.3.3. Синтеза ПМКЖ хидрогелова са додатком умреживача и NaOH

Синтеза ПМКЖ хидрогелова у овом кораку изведена је путем ТИПСР, у присуству МК, NaOH, желатина, МБА и иницијатора. Садржај умреживача, као и концентрација МК и желатина, варирали су у циљу добијања хидрогелова различитих опсега бубрења, порозности и механичких својстава. Однос NaOH/МК фиксиран је на основу претходних искустава у циљу оптимизације хидратисаности хидрогелова и износио је 0,02 g/ml. Конкретно, у реакционом суду растворена је одређена количина МК, желатина и умреживача у 1,0 ml дестиловане воде (Табела 5). После 10 min темељног мешања на 70 °С, додат је иницијатор (однос иницијатор/МК био је фиксиран и износио је 0,0025 g/ml), након чега је реакциона смеша изливена у ваљкасте калупе пречника 8 mm. Калупи су стављени 3 h у сушницу на 70 °С, ради одигравања реакција полимеризације и умрежавања. Добијени хидрогелови су извађени из калупа и исечени на дискове дебљине 5 mm, након чега су припремљени за даља испитивања у зависности од захтева методе карактеризације. Детаљнији приказ састава реакционих смеша дат је у табели 5.

Табела 5. Кодни називи узорака и концентрације компоненти у реакционој смеши приликом синтезе ПМКЖ-На хидрогелова.

Узорак	Концентрација МК (ml/ml)	Концентрација желатина (g/ml)	Концентрација МБА (mol/mol $\times 10^2$)
ПМК20Ж20-На	0,20	0,20	1,10
ПМК30Ж20-На	0,30	0,20	1,10
ПМК40Ж20-На	0,40	0,20	1,10
ПМК67Ж20-На	0,67	0,20	1,10
ПМК40Ж0-На	0,40	0,00	1,10
ПМК40Ж10-На	0,40	0,10	1,10
ПМК40Ж40-На	0,40	0,40	1,10
ПМК40Ж20-МБА0-На	0,40	0,20	0,00
ПМК40Ж20-МБА1-На	0,40	0,20	0,55

3.3.4. Синтеза хемијски умрежених ПМК хидрогелова коришћењем различитих умреживача

Синтеза ПМК хидрогелова изведена је путем ТИПСР, у присуству умреживача и иницијатора, при чему су за умрежавање коришћени МБА или ПЕГДА. Конкретно, у реакционом суду растворено је 0,4 ml МК у 1,0 ml дестиловане воде, након чега је додата одређена количина умреживача и 2 mg иницијатора. Након мешања, реакциона смеша је изливена у ваљкасте калупе пречника 6 mm, који су остављени у сушници на 65 °C током 5 h, ради одигравања реакција полимеризације и умрежавања. Количине умреживача коришћене у синтези хидрогелова одговарале су следећим молским односима умреживач/полимер: 0,1%, 0,2%, 0,5% и 1,0%, а узорци су били означени као ПМК-*xy*, где је *x* = М када је коришћен МБА, или П када је коришћен ПЕГДА; и *y* = 0,1, 0,2, 0,5 и 1,0 у зависности од молског односа умреживача и полимера.

3.3.5. Синтеза ПМК хидрогелова додатно умрежених јонским везама

У случају јонски-умрежених хидрогелова, у реакционом суду растворено је 0,3 ml МК у 1,0 ml дестиловане воде, након чега је додато 0,4 ml 1% раствора МБА, 0,2 ml 1М-раствора NaOH, и 0,2 ml 1% раствора ВА-044. Након полимеризације на 70 °C током 3 h, хидрогелови су додатно умрежени у растворима различитих двовалентних и тровалентних јона, при различитим концентрацијама коришћених јона. Умрежавање је изведено тако што су хидрогелови исечени на дискове и уроњени у растворе јона током 24 h. Концентрације раствора јона вариране су од 0,1-1,0 М, а узорци су означени као ПМК-*xy* где је *x* = Ca, Sr, Al и Fe у зависности од врсте јона који су коришћени за умрежавање, а *y* = 0,1, 0,3, 0,5 и 1,0 у зависности од концентрације раствора јона.

3.3.6. Синтеза композитних хидрогелова

Синтеза ПМКЖ/ХАП композитних хидрогелова изведена је путем ТИПСР, у присуству МК, NaOH, калцијум-фосфатних пунилаца, желатина, МБА и иницијатора. Конкретно, 0,2 ml МК, 0,016 g NaOH, 8 mg МБА и одређена количина калцијум-фосфата додато је у 1,0 ml дестиловане воде, након чега је смеша третирана ултразвучним таласима 5 min. Однос NaOH/МК фиксиран је на 0,08 g/ml у циљу добијања изразито порозних хидрогелова. Садржај и врста калцијум-

фосфатних пунилаца варирани су у циљу испитивања утицаја на својства хидрогелова (Табела 6). Након ултразвучног третмана, у смешу је додато 0,2 g желатина и мешана је на 70 °C током 20 min. У последњем кораку, додато је 2 mg иницијатора, након чега је реакциона смеша изливена у ваљкасте калупе пречника 8 mm, који су остављени у сушници на 70 °C током 3 h ради одигравања реакција полимеризације и умрежавања. Добијени хидрогелови су извађени из калупа и исечени на дискове дебљине 5 mm, након чега су припремљени за даља испитивања у зависности од захтева методе карактеризације.

Табела 6. Кодни називи композитних хидрогелова и садржај ХАП.

Узорак	ХАП (g)	БЦП (g)
ПМКЖ/ХАП0	/	/
ПМКЖ/ХАП10	0,04	/
ПМКЖ/ХАП20	0,08	/
ПМКЖ/ХАП30	0,12	/
ПМКЖ/ХАП40	0,16	/
ПМКЖ/ХАП/БЦП	0,08	0,08
ПМКЖ/БЦП40	/	0,16

3.4. МЕТОДЕ КАРАКТЕРИЗАЦИЈЕ

3.4.1. Одређивање степена конверзије мономера у полимерну мрежу (СК)

СК је израчунат помоћу следеће једначине:

$$СК = \frac{m_0}{m_p} \quad (1)$$

Где је m_0 маса осушеног хидрогела (ксерогел) добијена сушењем хидрогелова до константне масе, након 24 h бубрења и испирања у дестилованој води, и m_p је маса осушеног хидрогела добијена сушењем хидрогелова до константне масе одмах након процеса синтезе.

3.4.2. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (ФТИР)

ФТИР спектри синтетисаних прахова и хидрогелова снимљени су помоћу Nicolet™ iS™10 FT-IR спектрофотометра (Thermo Fisher SCIENTIFIC), методом пригушене тоталне рефлексације у опсегу таласних бројева од 400 до 4000 cm^{-1} , при резолуцији од 4 cm^{-1} и 20 скенова. Спектри су снимани и обрађивани у Omnic 9 софтверском пакету. Калцијум-фосфатни прахови су снимљени у облику у ком су добијени, док су хидрогелови претходно осушени 24 h на 105 °C, након чега су спрашени и испитани.

3.4.3. Диференцијално-скенирајућа калориметрија (ДСК)

Термална анализа узорака хидрогелова изведена је методом ДСК. Пре анализе узорци хидрогелова су сушени 24 h на 105 °C, након чега су спрашени и подвргнути испитивању. Анализа је изведена у атмосфери азота при протоку од 30 mL min⁻¹, у опсегу температура од 25 °C до 300 °C и при брзини загревања од 10 °C min⁻¹.

3.4.4. Рендгенска дифракциона анализа (РДА)

РДА узорака у прашкастој форми изведена је коришћењем дифрактометра (Ultima IV Rigaku) са монохроматском CuK α 1,2 радијацијом. Радни напон уређаја је износио 40.0 kV а јачина струје 40.0 mA. Снимање је изведено у опсегу 20-50°, у континуалном скенирајућем моду са кораком 0.02° и брзином скенирања 10°/min, користећи D/TeX Ultra high-speed детектор.

3.4.5. Скенирајућа електронска микроскопија (СЕМ)

Морфолошке анализе прахова и узорака извршене су помоћу FESEM Tescan MIRA 3 XMU скенирајућег електронског микроскопа, при радном напону од 20 keV. Узорци хидрогелова су након достизања равнотежног степена бубрења у симулираној телесној течности (СТТ) или дестилованој води, замрзнути на -80 °C и лиофилизоване на уређају Martin Christ Freeze-dryer Alpha 1-2 LDplus. Процес лиофилизације је изведен на температури од -32 °C, при вакууму од 0,310 mbar, у трајању од 48 h. Пре скенирања, сви узорци су напарени танким слојем злата на уређају Polaron SC502 Sputter Coater.

3.4.6. Бубрење

Степен бубрења (СБ) праћен је гравиметријски тако што су хидрогелови вађени у одређеним временским интервалима, мерени и опет потапани у исто купатило. У зависности од типова узорака и начина тестирања, хидрогелови су бубрили у дестилованој води, СТТ и стандардним пуферима различитих рН вредности. СБ у тренутку t одређен је према једначини [186]:

$$\text{СБ (g/g)} = \frac{m_t}{m_0} \quad (2)$$

Где је m_t маса набубрелог хидрогела у тренутку t, а m_0 маса ксерогела. Равнотежни степен бубрења (РСБ) је одређен према истој једначини тако што је уместо m_t коришћена маса хидрогела након 24 h бубрења (након достизања максималног степена бубрења, тј. константне масе).

3.4.7. Равнотежни садржај воде (СВ)

СВ је одређен према следећој једначини [186]:

$$\text{СВ (\%)} = \frac{m_{eq} - m_0}{m_{eq}} \times 100 \quad (3)$$

Где је m_{eq} маса хидрогела са равнотежним садржајем воде.

3.4.8. Порозност

Порозност хидрогелова је израчуната према следећој једначини [186]:

$$\text{Порозност (\%)} = \frac{m_{eq} - m_0}{\rho_v V_{eq}} \times 100 \quad (4)$$

Где је ρ_v густина воде на датој температури, а V_{eq} запремина набубрелог хидрогела.

3.4.9. Разградња хидрогелова у симулираним физиолошким условима

Разградња хидрогелова испитивана је инкубацијом у СТТ на 37 °С. Након одређених временских интервала узорци су извађени, осушени до константне масе, и измерени (m_{pm}). Степен разградње (СРЗГ) израчунат је помоћу једначине:

$$\text{СРЗГ (\%)} = \left(1 - \frac{m_{pm}}{m_0}\right) \times 100 \quad (5)$$

3.4.10. Механичка својства

Механичка својства хидрогелова тестирана су помоћу кидалице (Universal Testing Machine AG-Xplus (Shimadzu, Japan)), опремљене алатом са максималном силом од 1000 N (распон силе је од 0,01 до 1000 N). Тестови затезног напрезања су изведени до потпуног кидања узорака при брзини од 20 mm/min и на собној температури. Узорци су били цилиндрични пречника 2 mm. Вредности затезне чврстоће (σ_t) одређене су са стандардних кривих напон-деформација у тачки кидања узорака, док је жилавост (U_t) израчуната као површина испод криве, односно енергија која је уложена за деформацију материјала.

Тестови притисног напрезања изведени су на цилиндричним узорцима до 100% деформације, при брзини од 6 mm/min, на собној температури. Аутоматска детекција контакта између алата и узорка изведена је притискањем узорка задатом силом од 0,02 N. Вредности притисне чврстоће (σ_c) су у зависности од узорака израчунате или до тачке кидања материјала, или када то није било могуће до вредности деформације од 90%. Притисни модул (E_c) је израчунат као нагиб на криви напон-деформација у опсегу деформација између 0-90%. Сви тестови су рађени три пута и израчунате су средње вредности и стандардне девијације мерења. Тестови цикличног притисног напрезања изведени су у 10 циклуса до деформације од 80%, при брзини напрезања од 10 mm/min, без паузе између узастопних циклуса. Енергија хистерезиса (H) је израчуната као површина између криви напрезања и отпуштања.

3.4.11. Степен самоисцељивости (ССИ)

У сврху тестирања ССИ, хидрогелови су исечени на два дела која су затим залепљена један за други једноставним физичким спајањем, након чега је састављени хидрогел замотан у фолију и остављен током 24 h. Након процеса исцељења, односно обнављања физичких интеракција на месту физичког спајања, хидрогел је подвргнут механичком тестирању затезне чврстоће. Количник затезне чврстоће након самоисцељења и затезне чврстоће полазног хидрогела, представљен је као ССИ [187].

3.4.12. Способност памћења облика

Синтетисани хидрогелови цилиндричног облика загрејани су урањањем у воду температуре 70 °С. Након омекшавања услед раскидања водоничних веза, хидрогелови су савијени у облик латиничног слова U и фиксирани урањањем у хладну воду температуре 5 °С. Након фиксирања тренутног облика, хидрогелови су поново уроњени у врелу воду температуре 70 °С да би повратили првобитни облик. Способност памћења облика хидрогелова квантификована је рачунањем коефицијента опоравка (КО) помоћу следеће једначине [188]:

$$\text{КО (\%)} = \frac{\theta_t - \theta_f}{\theta_t} \times 100 \quad (6)$$

Где је θ_t тренутни угао између крака узорка након фиксирања, and θ_f је коначни угао између крака узорка након поновног урањања у врелу воду.

3.4.13. *In vitro* отпуштање активних супстанци

Отпуштање лекова праћено је у различитим медијумима у зависности од врсте узорака, на 37 °С. Хидрогелови са активном супстанцом су уроњени у 20 ml медијума, након чега су у одређеним временским интервалима вађени аликвоти од 2 ml, анализирани спектрофотометарски и поново враћани у медијум. Спектрофотометарска анализа аликвота изведена је помоћу спектрофотометра (Shimadzu UV-1800 UV/Vis), читавањем апсорбанце медијума на одговарајућој таласној дужини за дату активну супстанцу.

3.4.14. Анализа кинетике отпуштања активних супстанци

Анализа кинетике отпуштања лекова из хидрогелова изведена је применом различитих математичких модела укључујући модел Првог реда ($\ln(1 - \alpha) = -k_1 t$), Хигучијев модел ($\alpha = k_H t^{1/2}$) и Корсмејер-Пепасов модел ($\alpha = k_H t^{1/2}$), где α представља фракцију лека отпуштену до тренутка t , k_1 представља константу отпуштања првог реда, k_H представља Хигучијеву константу, а k_p Корсмејер-Пепасову константу. n је дифузиони експонент који указује на механизам отпуштања [189–191].

3.4.15. Антимикробна испитивања

У овој дисертацији су коришћени следећи сојеви бактерија и гљивица за одређивање антимикробне активности: Грам-негативна бактерија *Escherichia coli* ATCC 25922, грам-позитивна бактерија *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и гљивица *Candida Albicans* ATCC 10259. Микроорганизми су узгајани преко ноћи на 37 °С у триптон-сојиној чорби, допуњеној са 0,6% екстрактом квасца.

Стерилни раствори ССТ (20 ml) су инокулисани са 0,5 ml квасца или бактеријске суспензије да би се постигла коначна концентрација од 5×10^5 микроба/ml. Након тога узорци хидрогелова, са или без лека, стављени су у судове и инкубирани на 37 °С током 24 h. После 24 h припремљена је серија разблажења и аликвот од 1 ml раствора је пребачен у стерилну Петријеву посуду и прекривен триптон сојиним агаром. Инокулисане плоче су затим инкубиране на 37 °С током 24 h. Процент вијабилних микроба израчунат је помоћу следеће једначине:

$$\text{Вијабилност (\%)} = \frac{c}{c_0} \times 100 \quad (7)$$

Где је C_0 број микроба на контролним узорцима хидрогелова, а број микроба на хидрогеловима са активним супстанцама.

3.4.16. Ћелијске културе

За испитивање цитокомпатибилности узорака, коришћене су следеће ћелијске линије: хумане матичне ћелије из периодонталног лигамента (МЋ), хумани фибробласти – ћелијска линија *MRC-5* (МРЦ-5) и мишији фибробласти – ћелијска линија *L929* (Л929). МЋ и МРЦ-5 су добијене из ткива здравог, одраслог човека, док су Л929 добијене из мишева. Ћелије су одржаване у Дулбековом модификованом „Eagle” медијуму (ДМЕМ) допуњеном са 10% феталним говеђим серумом, 100 u/ml пеницилина, 100 µg/ml стрептомицина, 2 mM Л-глутамина и 1 mM/L неесенцијалних аминокиселина. Ћелије су култивисане на 37 °C у атмосфери 5% CO₂ и апсолутној влажности. Подлога за културу је мењана свака 3 дана до постизања конfluence од 80%, након чега су ћелије пасажиране и поново постављене. Након трећег пасажа, одвојене су од дна боце краткотрајним 0,25% трипсином-ЕДТА. Ћелије су затим ресуспендоване у 10 ml ДМЕМ да би се неутралисао трипсин и спречило оштећење, а затим су центрифугиране на 1500 обртаја/мин током 10 min. Добијене ћелије су ресуспендоване у 1 ml ДМЕМ, након чега је одређена вијабилност ћелија коришћењем трипан-плавог бојења. У експериментима су коришћене суспензије ћелија са вијабилношћу већом од 95%.

3.4.17. Одређивање биокомпатибилности узорака

Биокомпатибилност хидрогелова испитивана је применом МТТ ((3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил- 2Н-тетразолијум бромид)) теста. У случају ПМКЖ-На хидрогелова тестирање је изведено директним сејањем ћелија на узорке хидрогелова на следећи начин: Хидрогелови су исечени на цилиндричне узорке пречника 4 mm и висине 2 mm, и испрани у води и 70% етанолу. Пре МТТ теста, хидрогелови су испрани у фосфатном пуферу и пребачени у судове за тестирање. Суспензије МЋ и МРЦ-5 (10³ ћелије по бунарчићу) су изливене на површину сваког узорка. Исти број ћелија засејан је и у празним посудама као контролна група. Посуде су затим инкубиране током 48 h на 37 °C у атмосфери 5% CO₂ и апсолутној влажности. Након инкубације, медијум је био уклоњен и додато је 100 µl ДМЕМ и 25 µl МТТ (5 mg/ml) у сваки суд. После 3 h инкубације на 37 °C, МТТ раствор је уклоњен и додато је 150 µl диметилсулфоксида. За то време, под дејством митохондријалне дехидрогеназе у метаболички активним ћелијама, МТТ се редукује до формазана, а раствор жуте боје постаје љубичаст, што се региструје спектроскопски мерењем апсорбанце на 550 nm. Контролна група се узима као референца у односу на коју се пореди вијабилност ћелија из осталих група. Резултати се приказују као удео вијабилних ћелија у односу на контролну групу.

У случају експеримента са Л929 ћелијама, узорци су били инкубирани током 24 h, након чега су узорковани супернатанти од сваке групе материјала и додати у посуде са ћелијама. Након 24 h инкубације урађен је МТТ тест према већ описаном поступку.

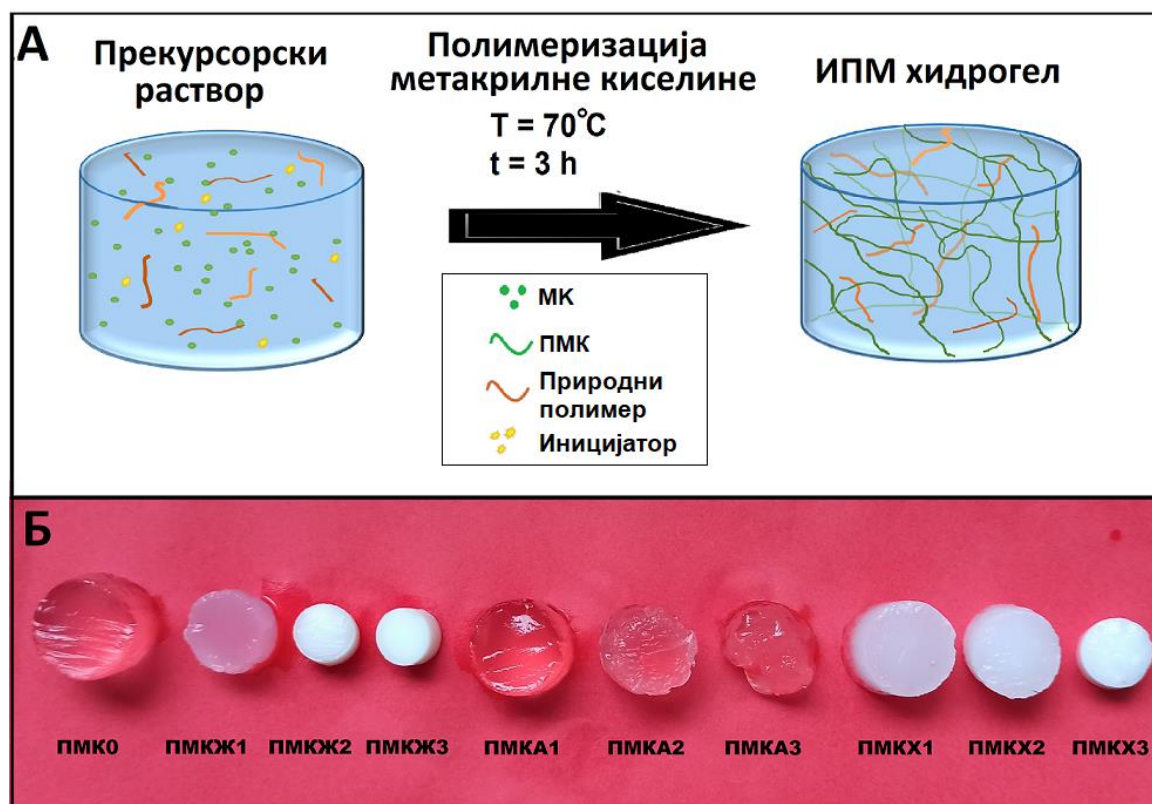
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. ХИДРОГЕЛОВИ НА БАЗИ ИПМ ПМК И ПРИРОДНИХ ПОЛИМЕРА

У првом делу докторске дисертације испитана је могућност синтезе ИПМ хидрогелова комбиновањем ПМК и 3 различита природна полимера: желатина, алгината и хитозана, при чему је главни циљ био добити функционалне, тродимензионалне материјале који имају задовољавајућа механичка својства и који би се могли примењивати у биомедицини. Највећи изазов у процесу синтезе представљала је различита растворљивост природних полимера у реакционој смеси, могућност стварања јонских комплекса између супротно наелектрисаних функционалних група, формирање агрегата и раздвајање фаза након изливања у калуп услед недовољне вискозности реакционе смеше. Претходно наведени проблеми могу довести до формирања нехомогених и нефункционалних хидрогелова незадовољавајућег физичког интегритета. Због тога је пре синтезе урађена оптимизација процесних параметара, приликом чега су одређени опсежи концентрација природних полимера и услови при којима се они могу растворити у воденом раствору метакрилне киселине.

4.1.1. Дизајн и структура хидрогелова

Шематски приказ синтезе и структуре ИПМ хидрогелова на бази ПМК и природних полимера (желатина, алгината и хитозана) приказан је на слици 18А.



Слика 18. Шематски приказ процеса синтезе и формирања ИПМ на бази ПМК и природних полимера (А). Фотографија добијених хидрогелова након достизања равнотежног степена бубрења у дејонизованој води (Б).

Након изливања реакционе смеше у калуп и реакције полимеризације, долази до раста макромолекулских ланаца ПМК према шеми приказаној на слици 2. Истовремено, молекули природних полимера остају заробљени унутар формиране тродимензионалне структуре хидрогелова, при чему ступају у интеракцију путем физичких веза са молекулима ПМК. У зависности од функционалних група присутних на молекулима природних полимера ове интеракције могу бити водоничне везе, јонске интеракције и/или хидрофобне интеракције. На слици 18Б је приказана фотографија ИПМ хидрогелова након бубрења у дејонизованој води. У случају ПМКЖ и ПМКХ хидрогелова са порастом садржаја природног полимера (желатина или хитозана) долази до смањења димензија и формирања компактније структуре хидрогелова. Поред тога, смањује се транспарентност, односно хидрогелови постају бели и непрозирни. Ова макроскопска запажања наводе на закључак да у овим системима долази до повећаног степена интеракције између молекула ПМК и природног полимера, са повећањем садржаја природног полимера. У случају ПМКЖ хидрогелова, највероватније долази до интеракција путем водоничних веза између поларних група ПМК и желатина, као и до хидрофобних интеракција између α -метил групе ПМК и хидрофобних група присутних у структури желатина, што ће бити детаљније дискутовано у наставку дисертације [25]. У прилог овом објашњењу иде и смањење прозирности хидрогелова као последица нехомогености, односно стварања нанометарских и микрометарских домена у којима долази до раздвајања фаза [25]. У случају ПМКХ хидрогелова такође се уочава смањење прозирности што је највероватније последица сличног ефекта као код ПМКЖ хидрогелова. Маити и сарадници су у свом истраживању уочили промене у фреквенцијама вибрација функционалних група ПМК и хитозана након формирања ИПМ [87]. Прецизније, приликом инкорпорације хитозана у ПМКХ, долази до промене фреквенције вибрирања C=O, N-H и C-N група хитозана, са 1659, 1595 и 1321 cm^{-1} , на 1721, 1704 и 1394 cm^{-1} , док се истовремено фреквенције C-O вибрација карбоксилне групе ПМК мењају са 1265 и 1157 cm^{-1} , на 1266 и 1192 cm^{-1} . Ова померања указују на успостављање међумолекулских интеракција између молекула хитозана и ПМК. Према аналогiji са другим системима који садрже хитозан, а у којима такође долази до смањења прозирности са повећањем садржаја хитозана, може се претпоставити да је и у ПМКХ хидрогеловима синтетисаним у овом раду дошло до појаве следећих интеракција: стварање водоничних веза између молекула хитозана и ПМК, успостављање електростатичких интеракција између позитивно наелектрисаних амонијум група хитозана и негативно наелектрисаних карбоксилатних јона ПМК, и формирање хидрофобних интеракција [192].

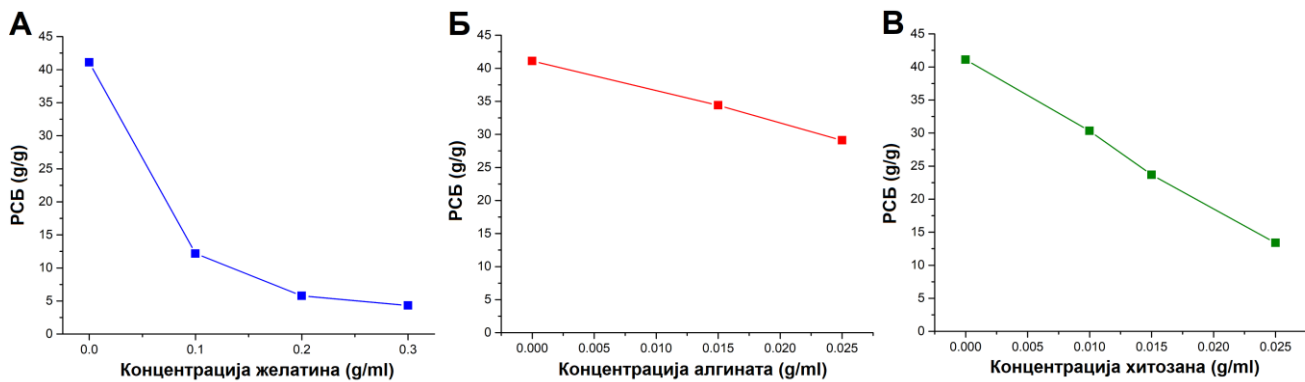
Што се тиче ПМКА хидрогелова, са слике 18Б се може приметити да са повећањем садржаја алгината долази до смањења компактности хидрогелова. Иако су ПМКА1 и ПМКА2 релативно компактни и механички постојани, ПМКА3 се одликује слабом механиком и непостојаношћу. Могуће је да повећање садржаја алгината у реакционој смеси значајно омета процес полимеризације и умрежавања због чега је добијени хидрогел недовољно умрежен и вискоеластичан. Због непостојаности структуре, узорак ПМКА3 је искључен из даљих испитивања.

4.1.2. Бубрење

Бубрење је једна од најважнијих карактеристика хидрогелова. Посебно је важно за хидрогелове са применом у биомедицини с обзиром да се они имплантирају у близини ткива и органа осетљивих на оптерећења. Кинетика бубрења такође може утицати и на кинетику отпуштања активних супстанци што је важно у случајевима примене хидрогелова као носача лекова.

РСБ, као мера способности бубрења хидрогела, директно зависи од унутрашње структуре хидрогелова и параметара полимерне мреже. На пример, РСБ је обрнуто пропорционалан степену

умрежења хидрогелова. На слици 19 је приказана зависност РСБ у води од концентрације природног полимера у прекурорском раствору за ПМКЖ, ПМКА и ПМКХ хидрогелове. У свим случајевима дошло је до смањења РСБ са порастом концентрације природног полимера. Код ПМКЖ хидрогелова повећање концентрације желатина до 0,3 g/ml довела је до осмоструког смањења РСБ (са 40 на 8 g/g), док је у случају ПМКХ повећање концентрације хитозана до 0,025 g довело до смањења од приближно 2,5 пута (са 40 на 15 g/g). Код ПМКЖ и ПМКХ хидрогелова овај тренд је логичан и у корелацији са макроскопски уоченим променама димензије и прозирности хидрогелова, односно указује на повећање степена умрежења. Са друге стране, код ПМКА хидрогелова очекивао би се супротан тренд, односно повећање РСБ са повећањем садржаја алгината, с обзиром да је претходно закључено да повећање садржаја алгината нарушава процес полимеризације, односно смањује средњу молекулску масу ПМК ланаца. Међутим, треба узети у обзир да и упркос смањењу степена полимеризације услед повећања садржаја алгината, укупно посматрано долази до замене хидрофилније ПМК са мање хидрофилним алгинатом, услед чега се смањује и способност хидрогелова за апсорпцију воде, а самим тим и до смањења РСБ.

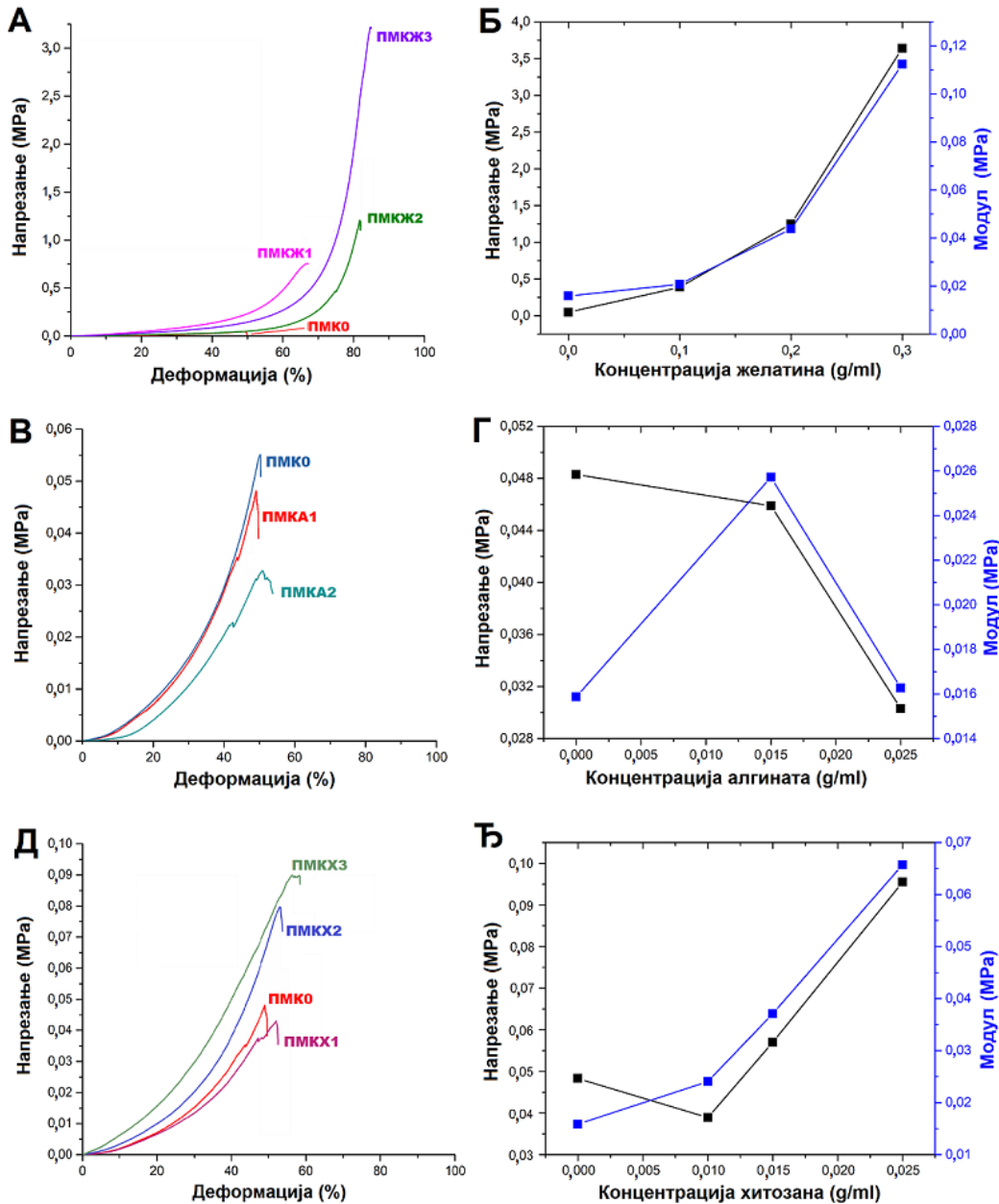


Слика 19. Зависност ранотежног степена бубрења од садржаја природног полимера за ИПМ хидрогелове са (А) желатином, (Б) алгинатом и (В) хитозаном.

4.1.3. Механичка својства

Процена механичких својстава хидрогелова испитана је тестирањем униаксијалног притисног напрезања. На слици 20 су приказане криве напон-деформација, као и трендови промене притисне чврстоће и притисног модула хидрогелова у зависности од садржаја природног полимера. У случају ПМКЖ и ПМКХ хидрогелова, уочава се значајно побољшање притисних механичких својстава хидрогелова са повећањем садржаја желатина, односно хитозана. На пример, додатком 0,3 g желатина, притисна чврстоћа ПМК хидрогелова се повећава са 0,05 на 3,64 МРа, што је повећање од приближно 75 пута. Слично, вредности модула се повећавају са 0,016 на 0,112 МРа, што представља седмоструко повећање. У случају хитозана повећања притисне чврстоће и модула су мање изражена него у случају желатина, односно при максималном испитиваном садржају хитозана притисна чврстоћа и модуло се повећавају двоструко, односно четвороструко, у односу на чисте ПМК хидрогелове. При дискутовању механичких својстава хидрогелова увек треба водити рачуна и о садржају воде, с обзиром да она има највећи удео у структури хидрогела, па тако и кључни утицај на његова механичка својства. Резултати испитивања механичких својстава ПМКЖ и ПМКХ хидрогелова су у сагласности са вредностима РСБ. Са повећањем садржаја воде у структури долази и до повећања порозности структуре и слабљења полимерне мреже. У случају ПМКЖ и ПМКХ хидрогелова, интеракције молекула природног полимера са молекулима ПМК доводе до повећања умрежености структуре и смањења РСБ, што се манифестује унапређеним механичким својствима. С друге стране,

повећање садржаја алгината у структури ПМК хидрогелова доводи до смањења притисне чврстоће, иако се истовремено РСБ смањује. У овом случају смањење РСБ са повећањем садржаја алгината није последица повећања степена умрежавања, већ је највероватније последица повећања концентрације алгината на уштрб ПМК која значајно више доприноси бубрењу. Према томе, слабљење механичких својстава ПМКА са повећањем садржаја алгината највероватније је последица смањења степена полимеризације МК, као и смањења степена умрежења.



Слика 20. Криве напон-деформација за ПМКЖ (А), ПМКА (В) и ПМКХ (Д) хидрогелове. Трендови промене притисних механичких својстава у односу на концентрацију природног полимера за ПМКЖ (Б), ПМКА (Г) и ПМКХ (Ђ) хидрогелове.

4.2. ХИДРОГЕЛОВИ НА БАЗИ ПМК И ЖЕЛАТИНА

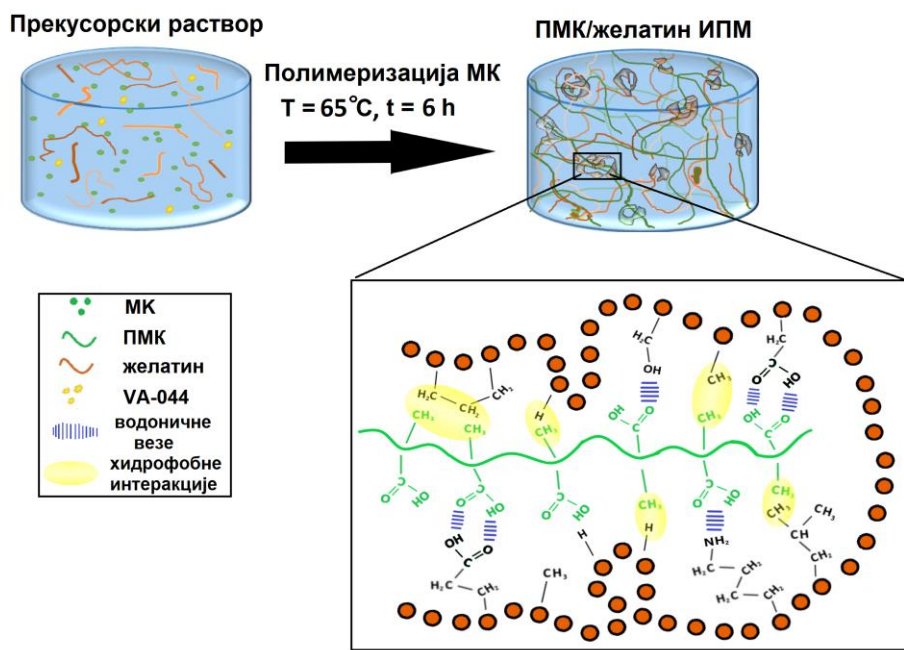
4.2.1. Физички умрежени ПМКЖ хидрогелови

Након што су у оквиру поглавља 4.1. детаљно испитани и окарактерисани ИПМ хидрогелови на бази ПМК и три различита природна полимера - желатина, алгината и хитозана, закључено је да ПМКЖ хидрогелови представљају материјале са највећим потенцијалом за примену у биомедицини, са нагласком на инжењерство ткива. Овакав закључак је изведен на основу следећег: 1) могућност додавања значајно већих количина желатина у ИПМ хидрогелове на бази ПМК у односу на хитозан и алгинат, 2) значајно боља механичка својства добијених ИПМ, 3) нижа цена желатина у односу на алгинат и хитозан, и 4) желатин је денатурисани облик колагена, најзаступљенијег протеина у ткивима сисара, тј. хемијски је идентичан са колагеном и у својој структури садржи аргинин-глицил-аспарагинску киселину аминокиселинске секвенце, које промовишу адхезију, пролиферацију и диференцијацију ћелија [81].

Могућност додавања већих количина желатина у прекурсорски раствор, при чему се процес полимеризације значајно не нарушава, значајан је са аспекта контроле механичких, структурних и биолошких својстава, с обзиром да желатин не само да побољшава механичка својства, већ као изразито биоактивна и биопромотивна компонента побољшава и биолошка својства материјала [193]. У поглављу 4.1.3. показано је да концентрација желатина у прекурсорској смеси може достићи и 0,3 g/ml, а да притом утиче позитивно на механичка својстава. С друге стране, концентрација алгината при истим условима већа од 0,025 g/ml доводи до значајног смањења степена полимеризације и механичких својстава, при чему се добијају непотпуно полимеризовани и нефункционални хидрогелови. У случају хитозана, при концентрацијама већим од 0,025 g/ml прекурсорска смеша постаје превише вискозна што онемогућава једноставно изливање у калупе и добијање хидрогелова уједначених својстава. Како су прелиминарна испитивања показала да ПМКЖ хидрогелови имају највећи потенцијал за примену у инжењерству ткива, у овом поглављу ће ови системи бити детаљније испитани, пре свега са аспекта примене у инжењерству хрскавице.

4.2.1.1. Структура физички-умрежених ПМКЖ хидрогелова

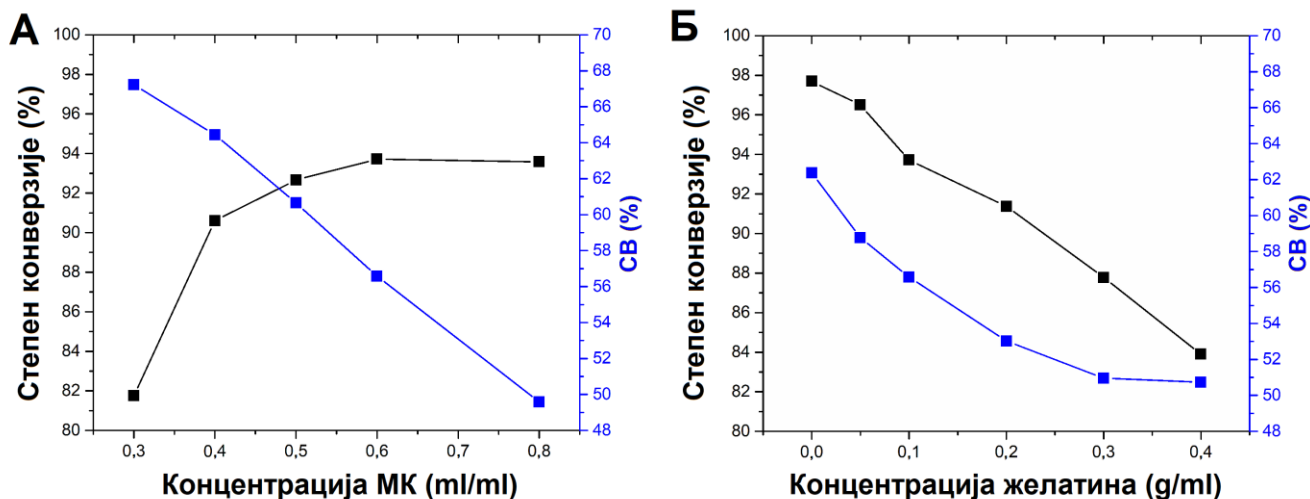
Шематски приказ синтезе ПМКЖ хидрогелова приказан је на слици 21. Након термички инициране полимеризације долази до раста молекулских ланаца ПМК, при чему молекули желатина остају заробљени унутар тродимензионалне структуре хидрогелова. Између молекулских ланаца ПМК и желатина успостављају се физичке везе у виду водоничних веза и хидрофобних интеракција, што доводи до формирања полимером-богатих и полимером-сиромашних домена унутар хидрогелова [26]. Структура полимером богатих домена састоји се од густо пакованих ланаца желатина и ПМК при чему се успостављају водоничне везе између хидрофилних група желатина и карбоксилне групе ПМК. Овако успостављене водоничне везе биле би изложене нападу молекула воде приликом бубрења хидрогелова, уколико не би биле стабилисане хидрофобним интеракцијама између хидрофобних група на желатину и α -метил група на ПМК. Желатин садржи велики број хидрофобних аминокиселина попут глицина, аланина, пролина, леуцина, итд., које чине више од 60% укупног аминокиселинског састава желатина [194]. На овај начин, формира се велики број полимером-богатих агрегата, различитих величина, који делују као основне тачке умрежења у структури хидрогелова. Полимером-богати домени окружени су полимером-сиромашном фазом која везује молекуле воде, доприносећи високој хидратисаности полимерне мреже.



Слика 21. Процес синтезе и претпостављена структура ПМКЖ хидрогелова.

4.2.1.2. Степен конверзије мономера

СК директно утиче на физичка и механичка својства хидрогелова, с обзиром да представља однос количине мономера уграђеног у структуру хидрогела и укупне количине мономера коришћене за синтезу хидрогела. У оквиру ове дисертације испитан је утицај концентрације МК и желатина у прекурсорском раствору на СК мономера. Као што је приказано на слици 22, повећање концентрације МК довело је до повећања СК, док је повећање садржаја желатина утицало на супротан начин. На пример, СК узорка ПМК30Ж10 износио је 82% у поређењу са СК узорка ПМК40Ж10 који је износио 91%. Разлог за релативно мали СК узорка ПМК30Ж10 је највероватније недовољна количина иницијатора у поређењу са укупном запремином прекурсорског раствора, што је резултовало већом количином непрореаговалог мономера. Када је концентрација мономера повећана, повећан је био и садржај иницијатора с обзиром да је однос иницијатор/мономер био сталан, што је резултовало значајно већим СК. При мањој концентрацији иницијатора мањи је број слободних радикала који се образује при истим условима у односу на раствор са већом концентрацијом иницијатора, док мања концентрација мономера значи и да ће формирани слободни радикали у мањем степену реаговати са мономерима с обзиром да се у истој запремини налази мањи број молекула мономера, односно да су покретљивији и да је просечна дистанца између молекула већа. Када је садржај мономера премашио 0,5 ml, садржај иницијатора је био довољан да ефективно иницира реакцију полимеризације због чега даље повећање мономера (и иницијатора) није довело до повећања СК. Штавише, дошло је и до благог смањења СК што се може објаснити ограничењима услед повећања вискозности. Наиме, током реакције полимеризације концентрација полимера се повећава како реакција напредује, што узрокује смањену покретљивост непрореагованих мономера [195]. У неком моменту концентрација полимера ће бити довољна да драстично редукује покретљивост непрореагованих мономера и спречи њихову инкорпорацију у растући полимерни ланац.



Слика 22. Утицај концентрације МК (А) и желатина (Б) на СК и СВ ПМКЖ хидрогелова.

4.2.1.3. Садржај воде

Степен хидратације и СВ су једна од најважнијих својстава хидрогелова. Вода у структури хидрогелова не само да побољшава биолошки одговор материјала, већ смањује трење и помаже у преносу напона кроз структуру. СВ је код везивних ткива човека, попут хрскавице, коже и мишића, у опсегу 20-85%. С друге стране, вода омекшава хидрогелове и смањује њихову механичку снагу. Као што се може видети са слике 22, СВ синтетисаних ПМКЖ хидрогелова је у опсегу 50-70%, што одговара СВ биолошких ткива. Такође, јасно је да повећање садржаја МК и желатина доводи до смањења СВ, што је последица смањења порозности и повећања степена умрежења.

4.2.1.4. Физичко-хемијска својства

На слици 23А су приказани ФТИР спектри чистог ПМК хидрогела, ПМКЖ хидрогелова и желатина. У спектру чистог ПМК издвајају се следећи апсорпциони максимуми: изражен пик на 1690 cm^{-1} који одговара $\text{C}=\text{O}$ вибрацијама карбоксилне групе, мали пикови на 1481 cm^{-1} (CH_3 асиметрично савијање), 1449 cm^{-1} (CH_2 савијање) и 1388 cm^{-1} (CH_3 симетрично савијање), пик на 1252 cm^{-1} ($\text{C}-\text{C}-\text{O}$ истезање), и пик на 1158 cm^{-1} који је карактеристичан за $\text{C}-\text{O}$ истезање [196].

ФТИР спектар чистог желатина одликује се карактеристичним апсорпционим максимумима на 1628 , 1522 и 1234 cm^{-1} који одговарају $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ и ν_{CN} вибрацијама полипептидног ланца, δ_{NH} и ν_{CN} вибрацијама амид II траке, и ν_{CN} и δ_{NH} вибрацијама амид III траке, редом [197]. У поређењу са ФТИР спектрима чистог желатина и ПМК, ИПМ хидрогелови испољавају спектралне карактеристике обе компоненте у зависности од њиховог садржаја у хидрогеловима. Са повећањем садржаја желатина, пик који одговара $\text{C}=\text{O}$ вибрацијама полипептидног ланца, конволуира са пиком за $\text{C}=\text{O}$ истезање карбоксилних група ПМК, формирајући широк апсорпциони максимум смањеног интензитета, у опсегу од $1590-1750\text{ cm}^{-1}$. Поред тога, пик који одговара вибрационом моду $\text{N}-\text{H}$ групе у основном ланцу желатина, помера се са 1522 на 1540 cm^{-1} , што указује на успостављање интеракција између карбоксилних група ПМК и амидних група желатина. Такође, хипсохромно померање апсорпционог максимума $\text{C}=\text{O}$ истезања амидних група желатина може да укаже на прераспodelу наелектрисања и слабљење $p-\pi$ коњугационог ефекта амидне групе, као последицу образовања водоничних веза у ИПМ хидрогеловима [198].

Према томе, може се тврдити са великим степеном вероватноће да уочена спектрална померања указују на формирање водоничних веза [72].

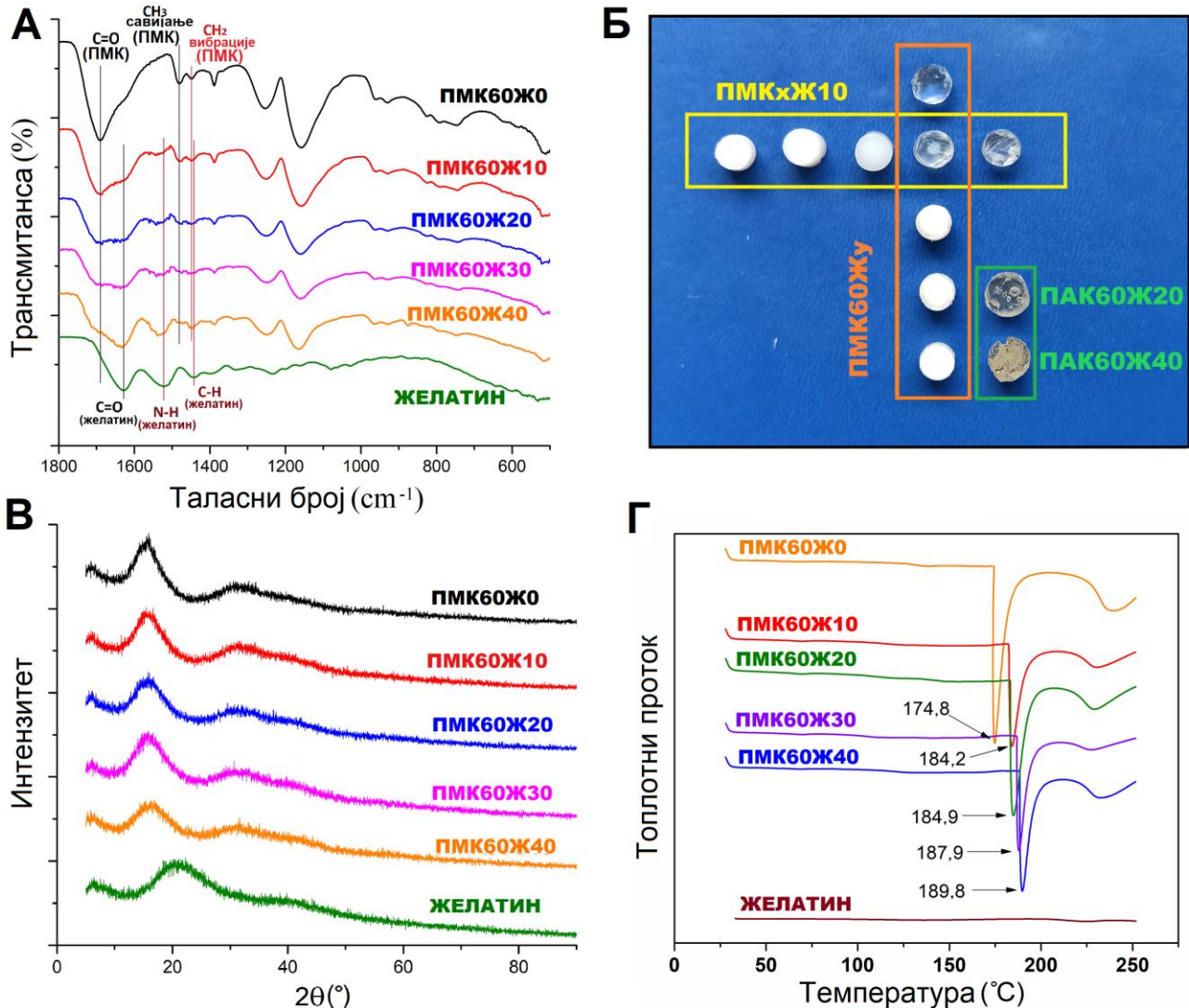
Поред наведених промена, у ФТИР спектрима ПМКЖ хидрогелова такође долази и до малих померања апсорпционих максимума који одговарају вибрацијама CH_3 групе. На пример, са постепеним повећањем садржаја желатина пик за CH_3 групу се помера на следећи начин: $1481 \rightarrow 1477 \rightarrow 1475 \rightarrow 1473 \rightarrow 1471 \text{ cm}^{-1}$, док се пик који одговара вибрацијама CH_2 група (1449 cm^{-1}) ПМК куплује са пиком који потиче од вибрација $\text{sp}^3 \text{ C-N}$ група желатина (1442 cm^{-1}). На овај начин настаје заједнички апсорпциони максимум који може да укаже на образовање хидрофобних интеракција између молекула ПМК и желатина.

Осим наведених промена у ФТИР спектрима ПМКЖ хидрогелова, смањење прозирности са повећањем односа желатин/ПМК такође указује на формирање хетерогених микрофаза услед успостављања хидрофобних интеракција (Слика 23Б), што доводи до расипања светлости приликом проласка кроз хидрогел [199]. Познато је да је оптичка прозирност хидрогелова функција броја и величине хетерогених домена [200]. Хидрогелови са нижим садржајем МК у односу на желатин (ПМК60Ж0, ПМК60Ж10, ПМК80Ж10) су прозирни, док су остали непрозирни. Занимљиво, ИПМ хидрогелови синтетисани користећи акрилну киселину (АК) уместо МК су били прозирни и при већим садржајима АК у односу на желатин, потврђујући чињеницу да α -метил група ПМК и хидрофобне интеракције утичу на прозирност хидрогелова. Поред тога, ПАК60Ж20 и ПАК60Ж40 хидрогелови су имали мекану, гумолику структуру што је последица веће покретљивости ланаца и мањег степена умрежења структуре. Насупрот њима, ПМКЖ хидрогелови су образовали релативно чврсту, тродимензионалну структуру, у чијем је формирању важну улогу имала α -метил група доприносећи смањењу покретљивости полимерних ланаца и стварању хидрофобних домена који делују као тачке умрежења. Жанг и сарадници су такође уочили смањење прозирности желатин/поли(МК-*co*-АК) ИПМ хидрогелова са повећањем односа МК/АК, што су објаснили као последицу микрометарских фазних раздвајања [25]. Поред тога, повећање садржаја МК довело је до постепеног прелаза структуре из хомогене мреже у хетерогену структуру са фазним раздвајањима различите величине домена. С друге стране, због одсуства хидрофобних група у АК, и великог броја хидрофилних група, АК и желатин формирају релативно хомоген раствор и образују униформну ИПМ структуру која не расипа видљиву светлост.

Дифрактограми ПМК, ИПМ хидрогелова и желатина, добијени методом РДА приказани су на слици 23В. Дифрактограм чистог желатина указује на аморфну структуру са широким дифракционим максимумом на око 20° , што се приписује реконструисаним троструким хеликсима карактеристичним за колаген и физички умрежен желатин [201]. Дифрактограм ПМК открива аморфну структуру са уређеношћу на малим раздаљинама (енг. *short range order*), с обзиром да се уочавају два основна дифракциона максимума: релативно изражен пик на 15° и широк пик на 31° [68, 202]. Што се тиче ПМКЖ хидрогелова, карактеристичан дифракциони максимум за троструко спиралне чворове у структури желатина нестaje, док изражени дифракциони максимум карактеристичан за ПМК опада у интензитету. Наведене промене указују да се молекули желатина преуређују и уједначено распоређују унутар ПМК мреже, док у исто време смањују њену уређеност, што је у складу са претходним претпоставкама о структури ПМКЖ система.

Термограми ПМКЖ хидрогелова, добијени ДСК анализом, приказани на слици 23Г, одликују се следећим карактеристичним пиковима: 1) оштар ендотермни пик у оспегу температура од $174\text{--}190^\circ\text{C}$, и широк ендотермни пик на око 240°C . Оба пика указују на различите ступење разградње полимерне мреже. Први пик се приписује дехидратацији карбоксилних група и образовању цикличних полианхидрида [203], док се други пик односи на даљу разградњу основних ланаца ПМК, укључујући декарбоксилацију и деполимеризацију [203, 204]. Са

повећањем садржаја желатина, први ступањ деградације ПМКЖ хидрогелова помера се према вишим температурама (са 174,8 на 189,8 °C), што значи да долази до побољшања термичке стабилности хидрогелова. Овај ефекат је још један доказ успешне и ефикасне инкорпорације желатина у структуру ПМК, што је утицало на повећање степена умрежења као последицу насталих међумолекулских интеракција.

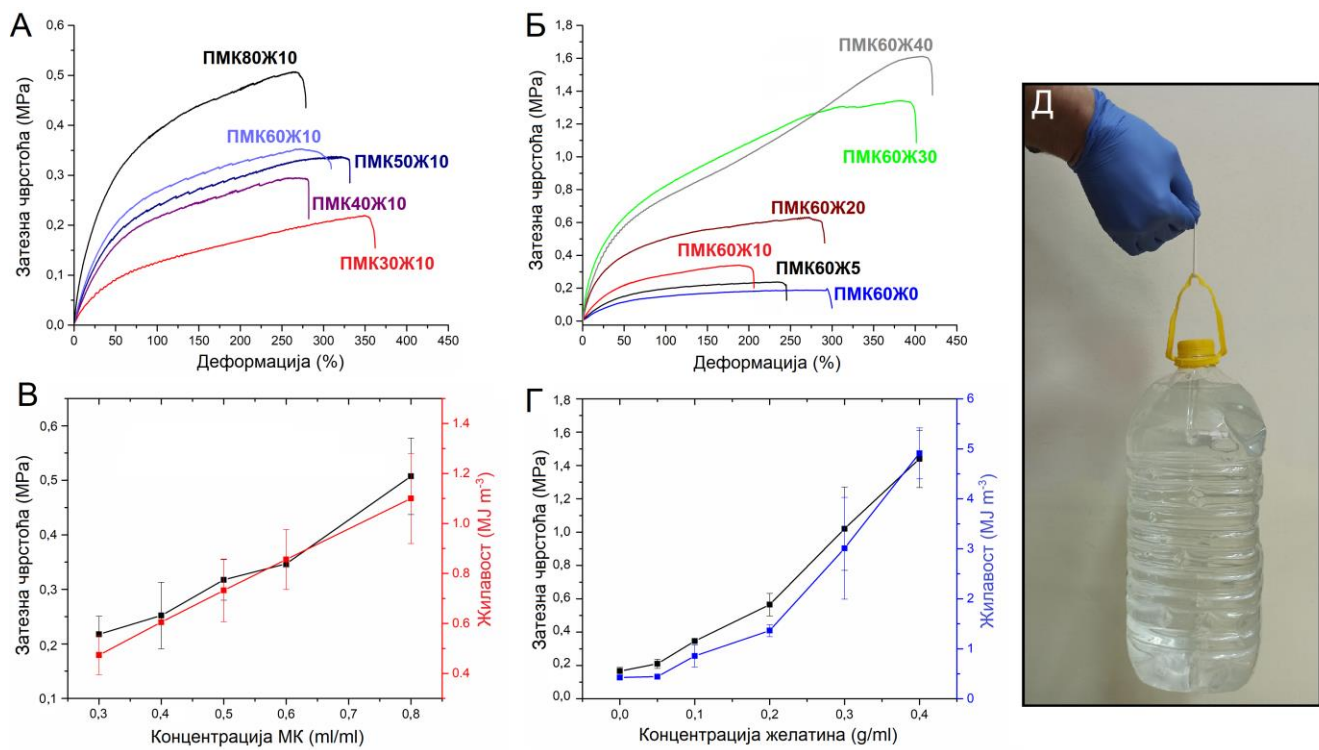


Слика 23. ФТИР спектар чистог ПМК хидрогела, ПМКЖ хидрогелова и желатина (А). Фотографије добијених ИПМ хидрогелова (Б). Дифрактограми чистог ПМК хидрогела, ПМКЖ хидрогелова и желатина (В). ДСК криве чистог ПМК хидрогела, ПМКЖ хидрогелова и желатина (Г).

4.2.1.5. Механичка својства

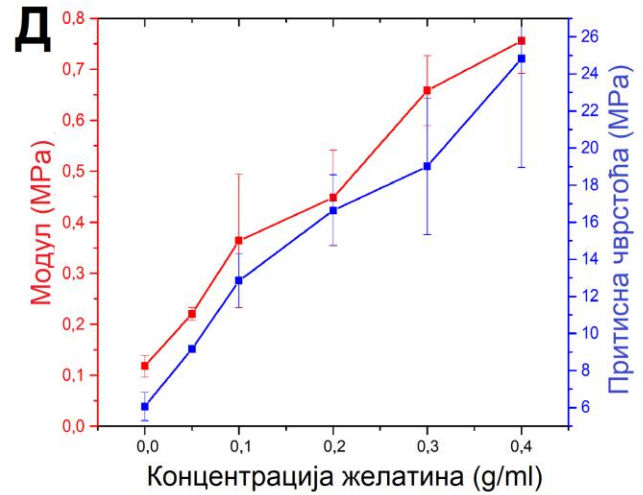
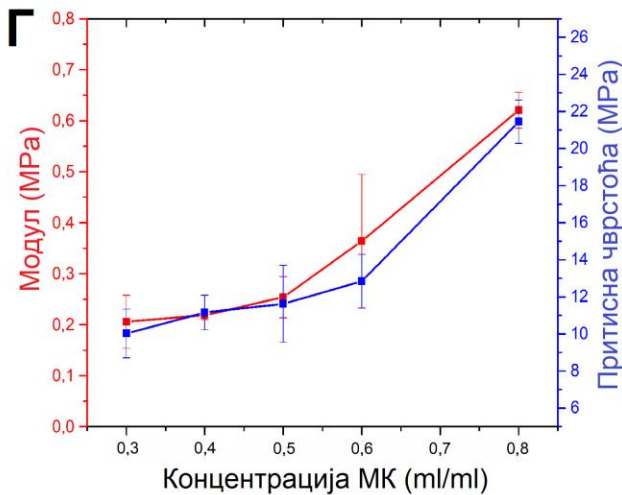
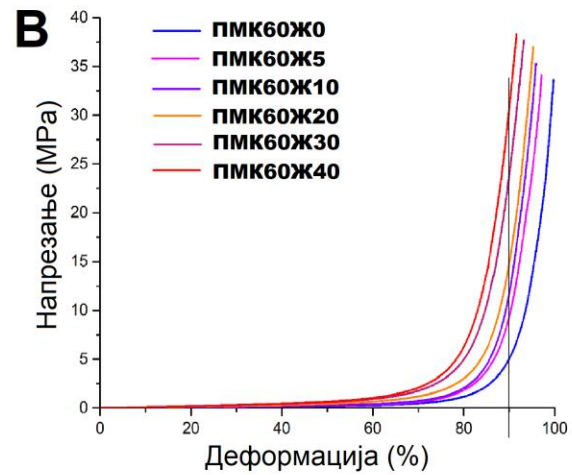
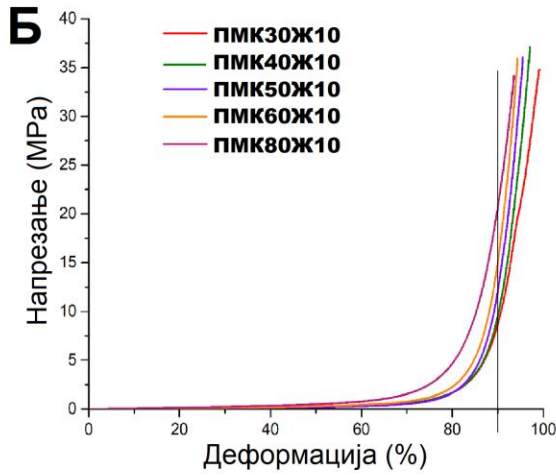
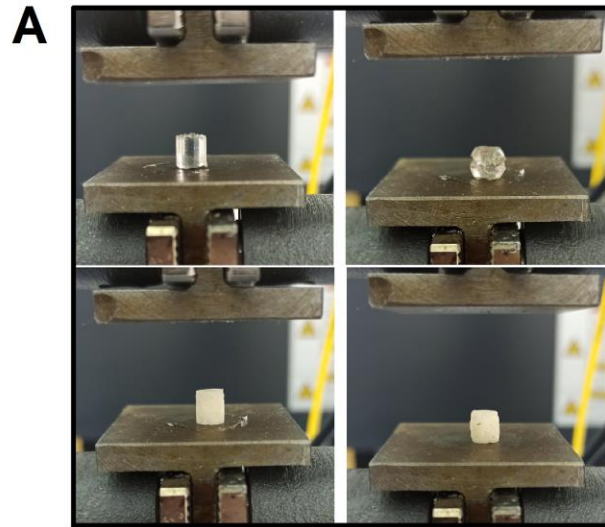
Испитивање статичког затезног и притисног напрезања, као и динамичког притисног напрезања изведени су у циљу проучавања механичких својстава хидрогелова. Стандардне криве напон-деформација, као и трендови промене затезне чврстоће и жилавости са променом садржаја МК и желатина, приказани су на слици 24. Повећање концентрације МК од 0,3 до 0,8 ml/ml довело је до повећања затезне чврстоће и жилавости приближно 2,3, односно 2 пута, тј. достижања вредности од $0,51 \pm 0,07$ МПа и $1,10 \pm 0,18$ MJ m⁻³, редом. Слично, приликом повећања

концентрације желатина од 0,0 до 0,4 g/ml, вредности σ_t and U_t достигле су $1,44 \pm 0,17$ МПа и $4,91 \pm 0,51$ MJ m⁻³, редом. Ове вредности представљају значајан напредак у механичким својствима с обзиром да су вредности σ_t и U_t чистих ПМК хидрогелова износиле $0,17 \pm 0,02$ МПа и $0,42 \pm 0,03$ MJ m⁻³. Штавише, цилиндрични узорак ПМК60Ж40 пречника 5 mm могао је да подржи тежину петолитарског балона напуњеног водом, без значајне деформације током неколико секунди (слика 24Д).



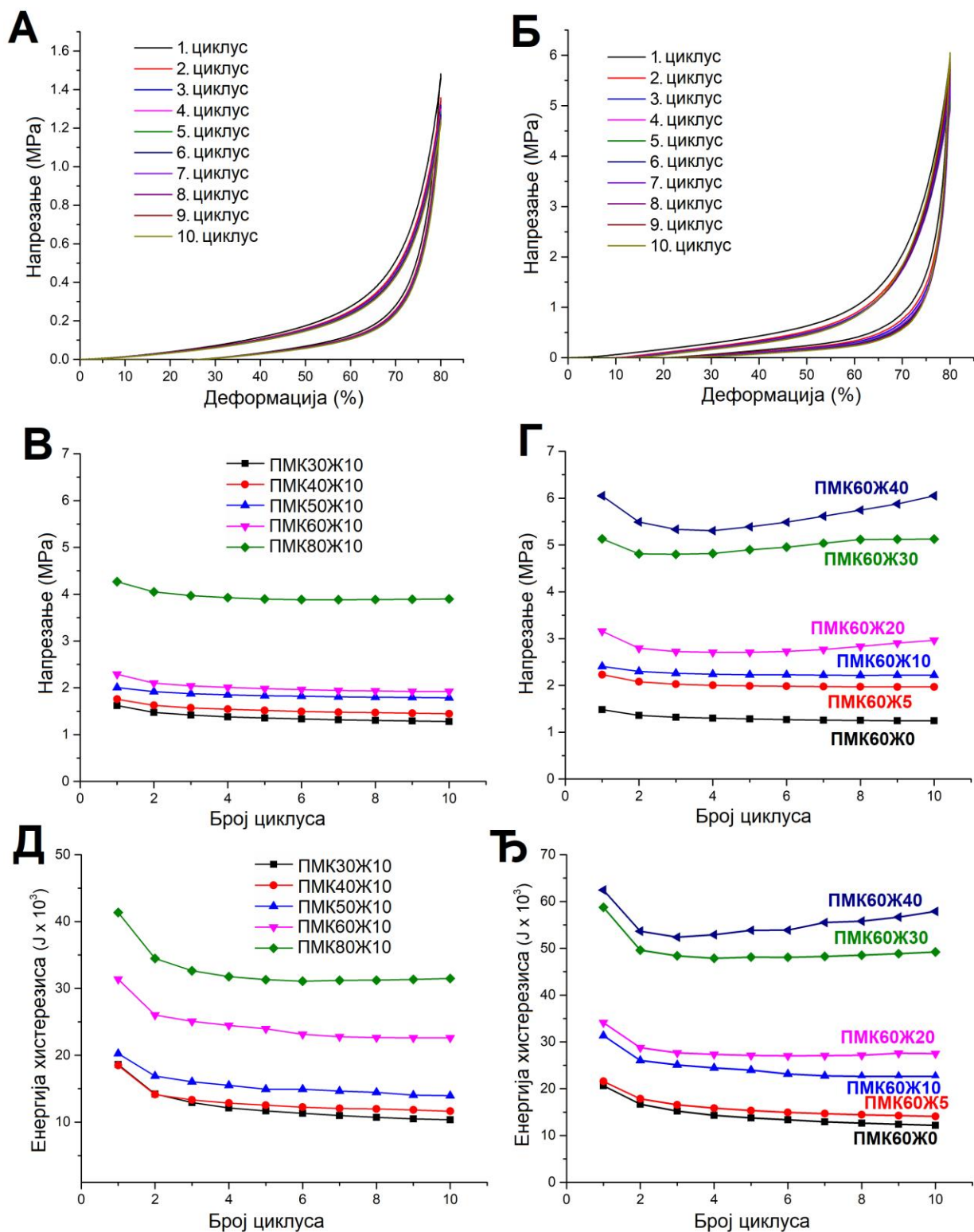
Слика 24. Криве напон-деформација за ПМКЖ хидрогелове са: различитим садржајем ПМК (А) и различитим садржајем желатина (Б). Зависност затезне чврстоће и жилавости ПМКЖ хидрогелова од: концентрације МК (В) и концентрације желатина (Г) у прекурсорској смеси. ПМК60Ж40 хидрогел подиже балон од 5 литара напуњен водом (Д).

Притисна механичка својства пратила су сличан тренд (слика 25). Криве напон-напрезање имале су типичан експоненцијални облик, што је карактеристика хидрогелова умрежених физичким интеракцијама. Пошто није било могуће одредити тачан моменат пуцања хидрогелова с обзиром да нису пукли упркос деформацији од приближно 100%, за вредност притисне чврстоће узет је износ напона при деформацији од 90%. Повећање садржаја МК и желатина драстично је побољшало притисна механичка својства хидрогелова. На пример, вредности притисног модула и притисне чврстоће за узорак ПМК80Ж10 износиле су $0,62 \pm 0,03$ МПа и $21,45 \pm 1,17$ МПа што је 3 и 2 пута веће од одговарајућих вредности за ПМК30Ж10. Слично, вредности E_c и σ_c за узорак ПМК60Ж40 износиле су $0,75 \pm 0,06$ МПа и $24,81 \pm 5,85$ МПа, што је 7 и 4 пута веће од одговарајућих вредности за ПМК60Ж0. Очигледно је да су добијени ИПМ хидрогелови значајно јачи од једнокомпонентних ПМК хидрогелова. Штавише, по притисним механичким својствима они су у рангу са другим изразито јаким хидрогеловима који садрже минимум 50% воде у структури, о чему ће бити дискутовано у наставку дисертације.



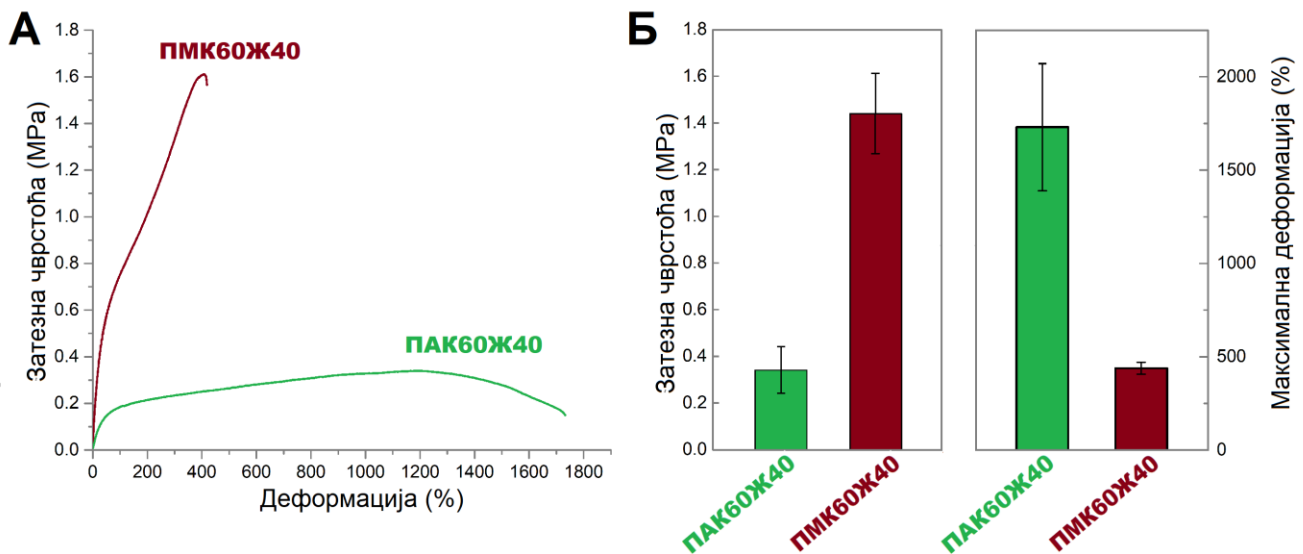
Слика 25. Фотографије ПМК60Ж0 и ПМК60Ж40 пре и након тестирања униаксијалног притисног напрезања (А). Криве напон-напрезање за ИПМ хидрогелове са различитим садржајем: ПМК (Б) и желатина (В). Утицај концентрације МК (Г) и желатина (Д) на притисна механичка својства хидрогелова.

Имплантирани биоматеријали се у реалној примени често подвргавају динамичком напрезању због чега је важно да поседују задовољавајућа динамичка механичка својства и отпорност на замор. Да би се испитала наведена својства, ПМКЖ хидрогелови су подвргнути цикличном притисном напрезању у 10 узастопних циклуса напрезање-попуштање до 80% деформације, без паузе између циклуса. Типичне криве напон-напрезање за 10 узастопних циклуса, као и трендови максималног напрезања и дисипације енергије за сваки циклус приказани су на слици 26. Хистерезисне петље и фактори губитка су се смањили током другог циклуса напрезања у случају свих хидрогелова, што говори да је унутрашња структура хидрогелова била делимично урушена. Током следећих циклуса вредности σ_c и енергије хистерезиса су или достигле плато, или су се опоравиле до одређеног степена, у зависности од састава хидрогелова. На пример, σ_c и H вредности за ПМК30Ж10 су редуковане до 79,0% и 55,5%, у поређењу са иницијалним циклусом. С друге стране, одговарајуће вредности за ПМК80Ж10 су се смањиле до 91,4% и 76,1% у поређењу са иницијалним циклусом. Повећање концентрације МК утицало је на стварање већег броја дужих макромолекулских ланаца унутар структуре ИПМ хидрогелова што је довело до веће густине динамичких умрежења и повећања жилавости. Ипак, хидрогелови из серије ПМКxЖ10 нису показали значајну обновљивост својстава након 10 циклуса тестирања. Супротно, ПМК60Жy хидрогелови ($y = 20, 30$ и 40) су показали значајну обновљивост притисног напрезања и умерену обновљивост енергије хистерезиса. У односу на чист ПМК хидрогел, чије су вредности σ_c и H након 10-ог циклуса смањене на 83,9% и 59,0%, σ_c ПМК60Ж40 се у потпуности опоравио након 10-ог циклуса упркос паду на 87,7% током 4-ог циклуса. H је истовремено опао на 83,8% након трећег циклуса и повратио 92,7% од почетне вредности након 10-ог. Приказани резултати јасно наглашавају позитиван утицај желатина на побољшање обновљивости и отпорности на замор ПМКЖ хидрогелова.



Слика 26. Типичне криве цикличног притисног напрезања за 10 циклуса: ПМК60Ж0 хидрогела (А) и ПМК60Ж40 хидрогела (Б). Притисно напрезање при деформацији од 80% за 10 циклуса за хидрогелова хидрогелове са различитим садржајем МК (В) и желатина (Г). Енергија хистерезиса након 80% деформације за 10 циклуса за хидрогелова хидрогелове са различитим садржајем МК (Д) и желатина (Ђ).

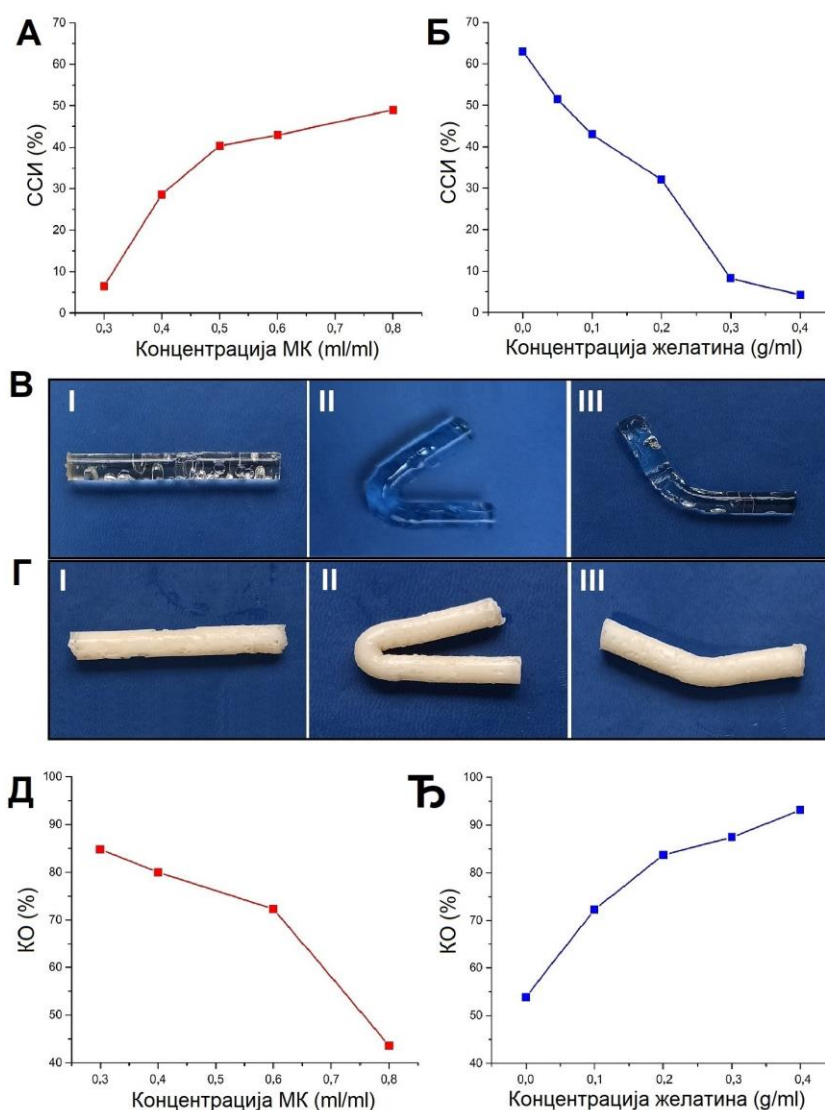
Резултати механичких испитивања су јасно показали да је увођење желатина у структуру ПМК хидрогелова драстично унапредило механичка својства. Дифрактограми дифракције рендгенских зрака показали су одсуство троструко-спиралних умрежења у желатину, што значи да желатин није формирао независну мрежу, већ је био инкорпориран у ПМК мрежу образовану током процеса полимеризације. Значајно унапређена механичка својства, као и смањење РСБ са повећањем садржаја желатина, указују на повећање степена умрежења у случају ИПМ. ФТИР спектроскопија и непрозирност хидрогелова сугеришу да је дошло до фазних раздвајања и образовања полимером-богатих домена са повећаним степеном хидрофобних интеракција, који су образовали трајна умрежења унутар структуре. Жанг и сарадници, су током испитивања желатин/поли(МК-*co*-АК) хидрогелова претпоставили да је повећање односа МК/желатин довело до увијања ланаца и образовања полимером-богатих домена са израженим хидрофобним интеракцијама и стабилованим водоничним везама [25]. Са друге стране, када је МК/АК однос био низак, ефекат је био мање изражен с обзиром да је био смањен и број хидрофобних домена. Слична структура се може претпоставити и за ПМКЖ хидрогелове где повећање садржаја желатина доводи до већег броја хидрофобних домена и већег степена умрежења, што је на крају позитивно утицало на механичка својства, бржу релаксацију полимерних ланаца и опорављање механичких својстава. Уз то, повећање садржаја желатина је допринело повећању динамичких умрежења између молекула желатина и ПМК, што је побољшало дисипацију енергије и жилавост хидрогелова. Да би се истакла улога хидрофобних веза на физичко-механичка својства ПМКЖ хидрогелова, упоредни ПАК60Ж40 хидрогел синтетисан је коришћењем АК уместо МК као основног мономера. Хидрогел ПАК60Ж40 испољио је за цео ред величине слабија механичка својства у односу на ПМК60Ж40 (слика 27), при чему је био значајно истегљивији, што је још једна потврда утицаја хидрофобних интеракција на степен умрежења и механичка својства ИПМ ПМК и желатина.



Слика 27. Типичне криве напон-деформација за ПМК60Ж40 и ПАК60Ж40 хидрогелове (А). Поређење вредности затезне чврстоће и максималне деформације ПМК60Ж40 и ПАК60Ж40 хидрогелова (Б).

4.2.1.6. Самоисцељивост

На сликама 28А и Б приказан је утицај концентрације МК и желатина на ССИ хидрогелова. Као што се може приметити, повећање садржаја МК (у случају фиксног садржаја желатина) повећава вредности ССИ, док повећање садржаја желатина (при константном садржају МК) има супротан ефекат. На пример, вредности ССИ за ПМК30Ж10 и ПМК80Ж10 износе 6,5% и 49,0%, док су вредности ССИ за ПМК60Ж0 и ПМК60Ж40 износиле 63,0% и 4,3%. Јасно је да однос желатин/ПМК има кључни утицај на способност самоисцељивости ПМКЖ хидрогелова. Када је однос низак, степен умрежења као последица образовања хидрофобних домена је нижи, што повећава удео динамичких веза, односно водоничних веза које нису стабилизоване хидрофобним интеракцијама, покретљивост молекула и способност молекула да образује водоничне везе са молекулима на површини залепљеног дела. С друге стране, повећање односа желатин/ПМК доприноси повећању трајних физичких умрежења (водоничне везе стабилизоване хидрофобним интеракцијама) и смањује способност самоисцељивости ПМКЖ хидрогелова.



Слика 28. Утицај концентрације МК (А) и желатина (Б), на ССИ хидрогелова. Фиксирање тренутног облика и враћање почетног облика ПМК60Ж0 (В) и ПМК60Ж40 (Г) хидрогела. Утицај концентрације МК (Д) и желатина (Е), на својство памћења облика хидрогелова.

4.2.1.7. Способност памћења облика

Присуство водоничних веза и хидрофобних интеракција омогућавају својство памћења облика (енг. *shape-memory*) синтетисаним ПМКЖ хидрогеловима. Полимером-богати домени, стабилисани хидрофобним интеракцијама, делују као перманенте тачке умрежења настале приликом процеса полимеризације. Са друге стране, водоничне везе као топлотно осетљиве интеракције, делују као тренутна, односно динамичка умрежења. Добијена структура омогућава раскидање водоничних веза на вишим температурама, након чега је могуће променити почетни облик хидрогела и фиксирати га снижавањем температуре. На сликама 28В и Г приказан је процес раскидања водоничних веза (урањањем у воду температуре 70 °С) и фиксирања тренутног U-облика ПМК60Ж0 и ПМК60Ж40 хидрогелова (урањањем у воду температуре 4 °С), након чега су хидрогелови у већој мери повратили почетни облик поновним урањањем у воду температуре 70 °С.

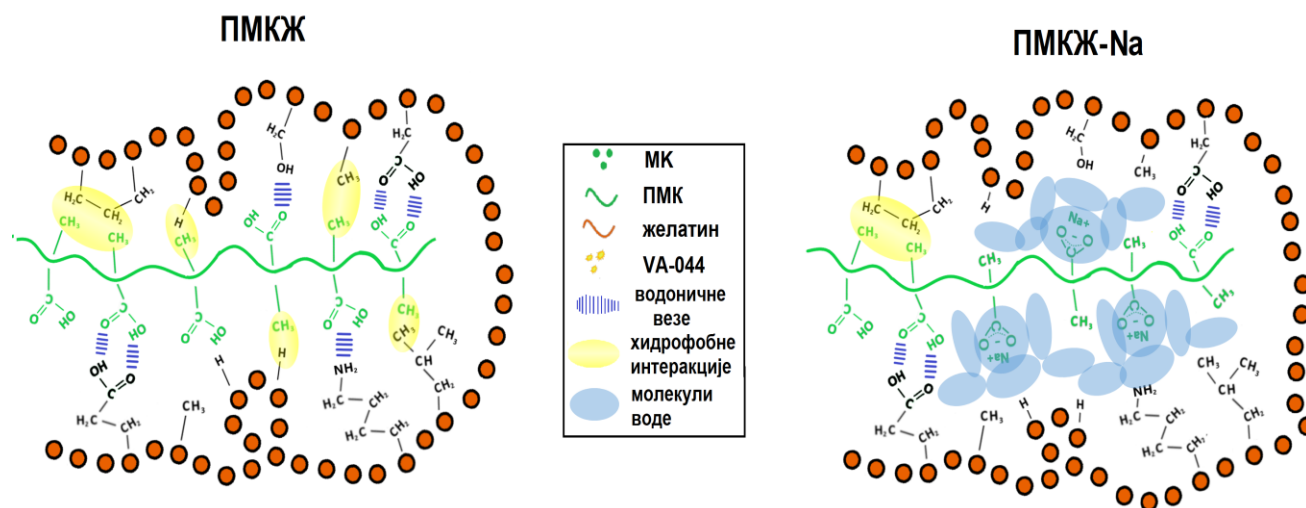
Као што се може видети са слика 28Д и Ђ, повећање садржаја МК смањило је коефицијент опоравка, док је повећање садржаја желатина значајно унапредило способност памћења облика хидрогелова. Повећање садржаја МК, при константном садржају желатина, довело је до већег броја водоничних веза у односу на хидрофобне интеракције, чиме је смањена способност обнављања првобитног облика хидрогелова због мањег броја трајних умрежења у структури. Са друге стране, повећање садржаја желатина имало је супротан ефекат с обзиром да је број хидрофобних домена, односно трајних тачака умрежења порастао. Ипак, ПМК60Ж0 хидрогел, без желатина у структури, такође је испољио умерену способност за памћење облика. Ово значи да чисти ПМК хидрогелови такође поседују својство памћења облика највероватније због одређеног степена хидрофобних интеракција, као и физички испреплетаних ланаца који делују као тачке трајних умрежења образоване приликом процеса полимеризације.

4.2.2. ПМКЖ хидрогелови за инжењерство ткива

У претходном одељку синтетисани су и окарактерисани физички умрежени ПМКЖ хидрогелови који су показали изванредна механичких својстава, као и способност самоисцељења и памћења облика, што их кандидује за широк спектар примена у биомедицини. Ипак, синтетисани хидрогелови са већим садржајем желатина се одликују релативно малом порозношћу и слабом разградивошћу, што може бити ограничавајући фактор за примене у инжењерству ткива и биомедицини. Као што је већ било речи, један од основних захтева при дизајну вештачких ткивних супституената јесте порозност. Иако постоје варијације око величине пора оптималних за примену биоматеријала у инжењерству ткива у зависности од ткива за које је материјал намењен, општи захтеви су да поре треба да буду међусобно повезане и минималног пречника $\approx 50 \mu\text{m}$. Према томе, да би добијени ПМКЖ хидрогелови имали функционалну примену у инжењерству ткива и биомедицини, потребно је даље оптимизовати унутрашњу архитектуру, при чему је потребно повећати порозност хидрогелова и истовремено не ослабити притисна механичка својства у значајној мери. На порозност и механичка својства хидрогелова може да се утиче и неутрализацијом мономера у прекурсором раствору, као и променом садржаја умреживача, иницијатора, МК и желатина. У наставку дисертације, варирањем споменутих параметара, биће оптимизована структура ПМКЖ хидрогелова у циљу добијања функционалних тродимензионалних супституената за потенцијалну примену у инжењерству ткива хрскавице.

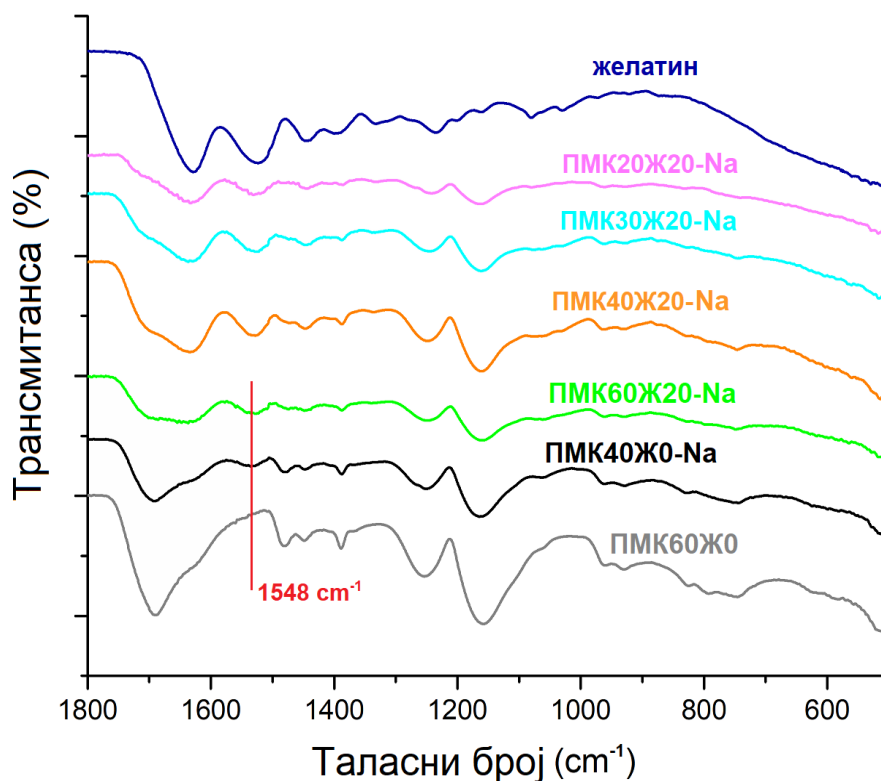
4.2.2.1. Структура ПМКЖ-На хидрогелова

Један од ефикасних начина за контролу хидратисаности и порозности ПМК хидрогелова јесте неутрализација МК у прекурсорском раствору коришћењем NaOH. Шематски приказ синтезе ПМКЖ-На хидрогелова приказан је на слици 29. Као и у случају ПМКЖ хидрогелова, након термички инициране полимеризације долази до раста молекулских ланаца ПМК, при чему молекули желатина остају заробљени унутар тродимензионалне структуре хидрогелова. Међутим, у случају ПМКЖ-На хидрогелова приликом додавања NaOH у прекурсорски раствор, долази до неутрализације МК и образовања Na-метакрилата (Na-МК). Електростатичке интеракције које се при томе успостављају онемогућавају ближе контакте између молекула мономера и желатина, чему доприноси и интеракција Na-МК са поларним молекулима воде и повећање хидродинамичког радијуса [51]. Према томе, приликом иницирања процеса полимеризације молекули мономера су на већим растојањима него у случају ПМКЖ хидрогелова, што умањује утицај хидрофобних интеракција на структуру. То значи да је у поређењу са ПМКЖ хидрогеловима, структура ПМКЖ-На хидрогелова релативно уједначенија са мањим бројем фазних раздвајања (хидрофобних домена), мањим степеном умрежења и већом покретљивошћу молекула.



Слика 29. Молекули Na-МК везују веће количине молекула воде и онемогућавају ближи контакт између молекула ПМК и желатина, што онемогућава хидрофобне интеракције и смањује број хидрофобних домена који делују као тачке умрежења.

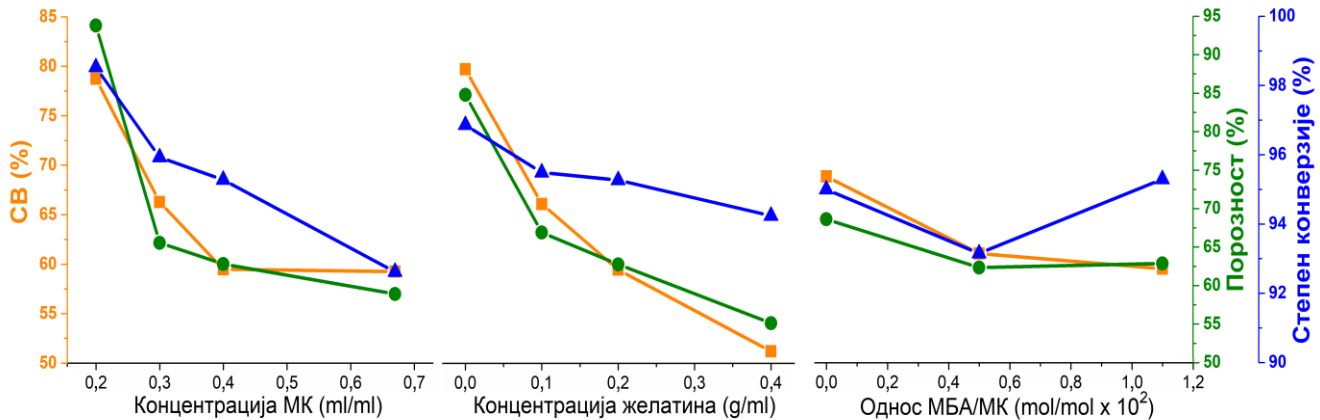
ФТИР спектри ПМКЖ-На хидрогелова су у сагласности са претпостављеном структуром (слика 30). Наиме, иако се у квалитативном смислу слажу са спектрима ПМКЖ хидрогелова, тј. долази до истих спектралних померања повезаних са успостављањем водоничних веза и хидрофобних интеракција, за разлику од ПМКЖ хидрогелова јавља се нови апсорпциони максимум на 1548 cm^{-1} који указује на присуство карбоксилатних јона и последица је неутрализације карбоксилних група метакрилне киселине у присуству NaOH [205]. Међутим, овом методом није могуће квантификовати допринос наведених интеракција, односно конкретан међусобни однос водоничних, хидрофобних и електростатичких интеракција.



Слика 30. ФТИР спектри желатина, ИПМ хидрогелова и чистог ПМК хидрогела.

4.2.2.2. Степен конверзије

С обзиром да су и ПМКЖ- Na хидрогелови намењени за потенцијалну примену унутар људског организма, СК је важан параметар који има директан утицај на биокompatibilност хидрогелова. Сви ПМКЖ- Na хидрогелови демонстрирали су релативно висок удео прореагованих мономера са вредностима СК вишим од 92,6% (Слика 31). Иако вредности СК нису биле значајно различите, генерални тренд смањења СК са порастом садржаја МК и желатина је био уочљив. Повећање концентрације МК са 0,2 на 0,67 ml/ml довело је до смањења СК са 98,5% на 92,6%. Ово је супротно уоченом тренду у односу на ПМКЖ хидрогелове, али треба узети у обзир да разлике нису велике, тј. вредности СК су релативно високе. Што се тиче желатина, као и у случају ПМКЖ хидрогелова, повећање концентрације желатина довело је до благог смањења СК, што је већ објашњено. Повећање садржаја умреживача такође је довело до повећања СК што се може објаснити мањим уделом растворљиве фазе (непрореагованих молекула мономера и умреживача, неумрежених олигомера и полимерних ланаца) у структури хидрогела, као последице већег степена умрежења [206].



Слика 31. Утицај концентрације МК, желатина и односа МБА/МК на СВ, порозност и СК хидрогелова.

4.2.2.3. Садржај воде и порозност

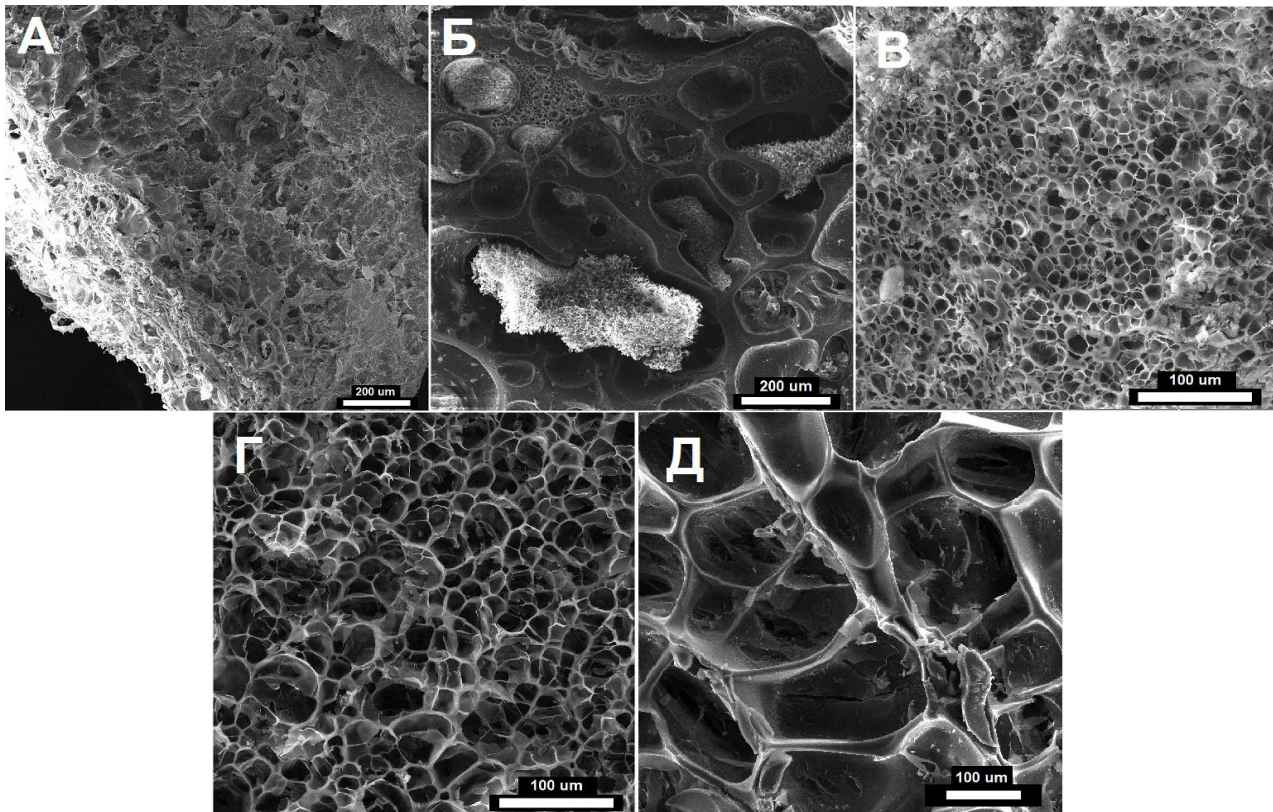
Као што је већ споменуто, СВ је један од најважнијих карактеристика хидрогелова за примену у инжењерству ткива. С обзиром да хидрогелови намењени за замену оштећеног ткива треба не само да надоместе губитак запремине, већ и да у великој мери надокнаде функцију оштећеног ткива, од суштинске је важности да имају сличне физичко-хемијске и структурне карактеристике као природно ткиво. Основна биолошка функција протеогликана у хрскавици потиче од физичко-хемијских својстава гликозаминогликана (ГАГ), који обезбеђују хидратацију хрскавичног ткива [207]. Молекулски ланци ГАГ представљају линеарне полисахариде са негативно наелектрисаним сулфатним и карбоксилатним групама које привлаче катјоне, чиме се повећава осмотска концентрација унутар хрскавице и везује вода [208]. Осим што значајно смањује трење, верује се да интерстицијална вода (везана вода) унутар хрскавице преузима више од 90% напрезања приликом дејства спољашње силе на хрскавицу, док се остатак расподељује на колагенско-протеогликанску матрицу [209–211]. У ПМКЖ-На хидрогеловима, натријум-хидроксидом неутрализована ПМК је имала улогу протеогликана у хрскавици, при чему је степен неутрализације ПМК, односно удела карбоксилатних јона у структури, оптимизован тако да СВ буде у опсегу 50–80%, што одговара СВ природне хрскавице. Са друге стране, улога желатина је била да механички ојача ПМК матрицу и обезбеди биоактивна својства. С обзиром на комплексну структуру ИПМ хидрогелова, испитан је утицај неколико параметара (слика 31) на СВ и порозност ПМКЖ-На хидрогелова.

Са повећањем садржаја МК, желатина и умреживача, СВ и порозност постепено опадају. Познато је да повећање концентрације мономера доводи до формирања гушће полимерне мреже, што доводи до смањења порозности и СВ [212]. Слично, повећање концентрације умреживача доводи до већег степена умрежења, што за последицу има гушћу мрежу и мању порозност.

Микроструктурне карактеристике хидрогелова испитиваних методом СЕМ су биле у сагласности са теоријски прорачунатом порозношћу, као и са претпостављеном структуром ПМКЖ хидрогелова описаном у претходном поглављу. Наиме, на слици 32А уочава се слабо-порозна, неправилна микроструктура узорка ПМК20Ж20-На, са слојевима желатина који доминирају у структури. Већ код узорка ПМК30Ж20-На, микроструктура се одликује јасним фазним раздвајањима (слика 32Б). Са друге стране, хидрогелови ПМК40Жу-На серије, испољавају уједначенију, порозну структуру са порама пречника од 10–100 μm , чије су величине обрнуто пропорционалне садржају умреживача (слике 32В, Г и Д). При мањем односу

желатин/ПМК доминантну улогу у изградњи структуре има реакција полимеризације МК, на шта указује и микроструктура чистог ПМК хидрогела која се по архитектури не разликује од микроструктуре ПМК40Ж20-На, осим што има значајно веће поре. Из претходних запажања могу се извести следећи закључци: 1) При односу ПМК/желатин ≤ 1 структура је релативно нехомогена и доминира желатин који гради континуалну мрежу. 2) При односу ПМК/желатин = 1,5 јасно су уочљива фазна раздвајања, односно хидрофилна острва богата ПМК фазом уметнута у континуалну мрежу желатина. 3) При односу ПМК/желатин ≥ 2 , ПМК има довољно да образује континуалну, релативно уједначену мрежу у којој су молекули желатина униформно расподељени.

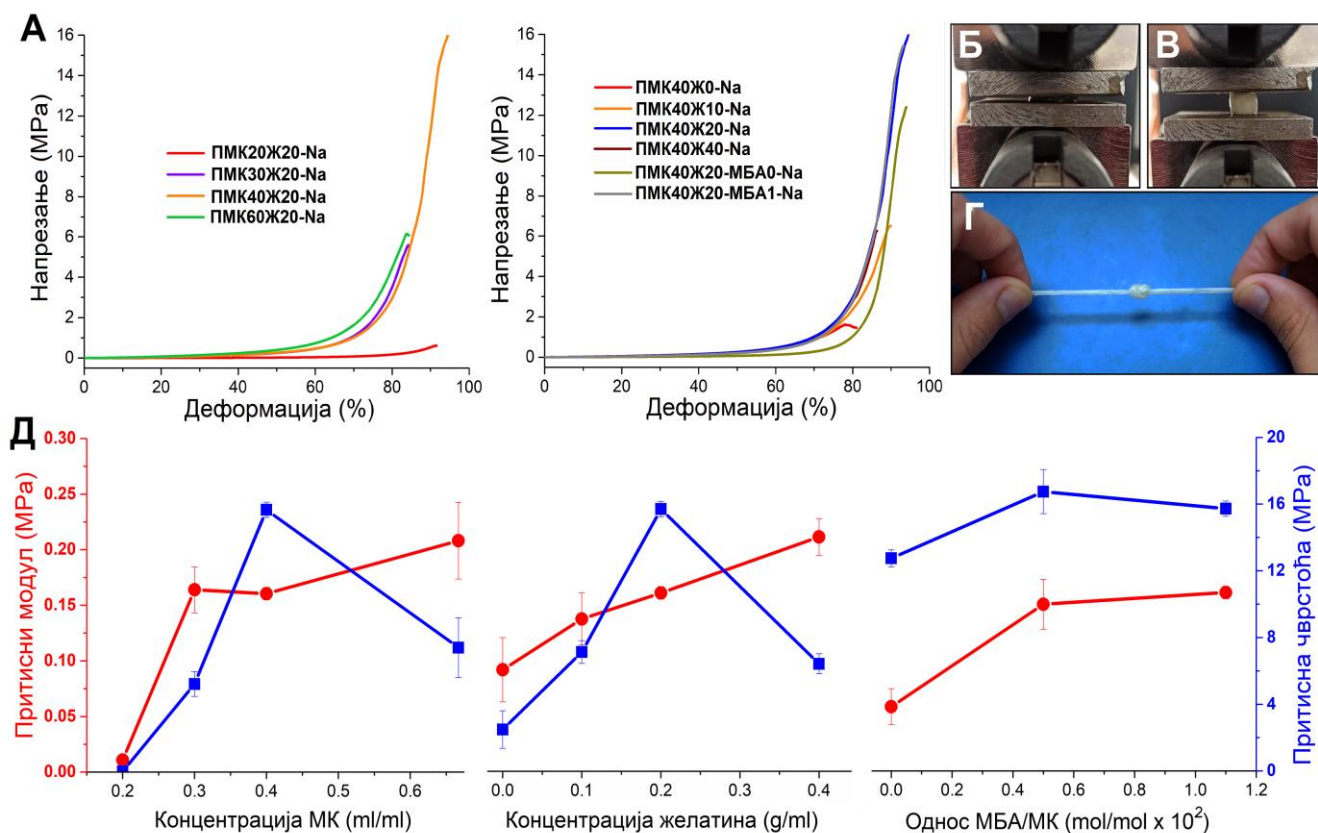
Што се тиче оптималне величине пора за хидрогелове намењене за инжењерство ткива хрскавице, постоје опречна истраживања објављена у научној литератури. На пример, Им и сарадници, уочили су значајнију хондрогену диференцијацију ћелија у *in vitro* условима и бољу хондрогенезу у *in vivo* условима у скафолдима са порама величине 400 μm , у поређењу са онима код којих је величина пора била 100 и 200 μm [213]. Сличне резултате су објавили и други истраживачи [214–216]. Постоје и истраживања која су показала да су поре пречника од 70–250 μm оптималне за хондрогенезу [217–220]. Истраживање Кемпаинена и Холистера указује да мања порозност више погодује хондроцитима због снижене концентрације кисеоника, што имитира њихово природно окружење [221]. Насупрот томе, стромалним ћелијама коштане сржи више прија високо порозно окружење с обзиром да им је потребна снабдевеност нутријентима из медијума за диференцијацију. Генерално посматрано, синтетисани ПМКЖ-На хидрогелови су имали погодну структуру за примену у инжењерству ткива са релативно високом порозношћу и порама широког опсега величина.



Слика 32. Микрографије попречних пресека лиофилизованих ПМКЖ-На хидрогелова: ПМК20Ж20-На (А), ПМК30Ж20-На (Б), ПМК40Ж20-На (В), ПМК40Ж20-МБА1-На (Г) и ПМК40Ж0-На (Д).

4.2.2.4. Механичка својства

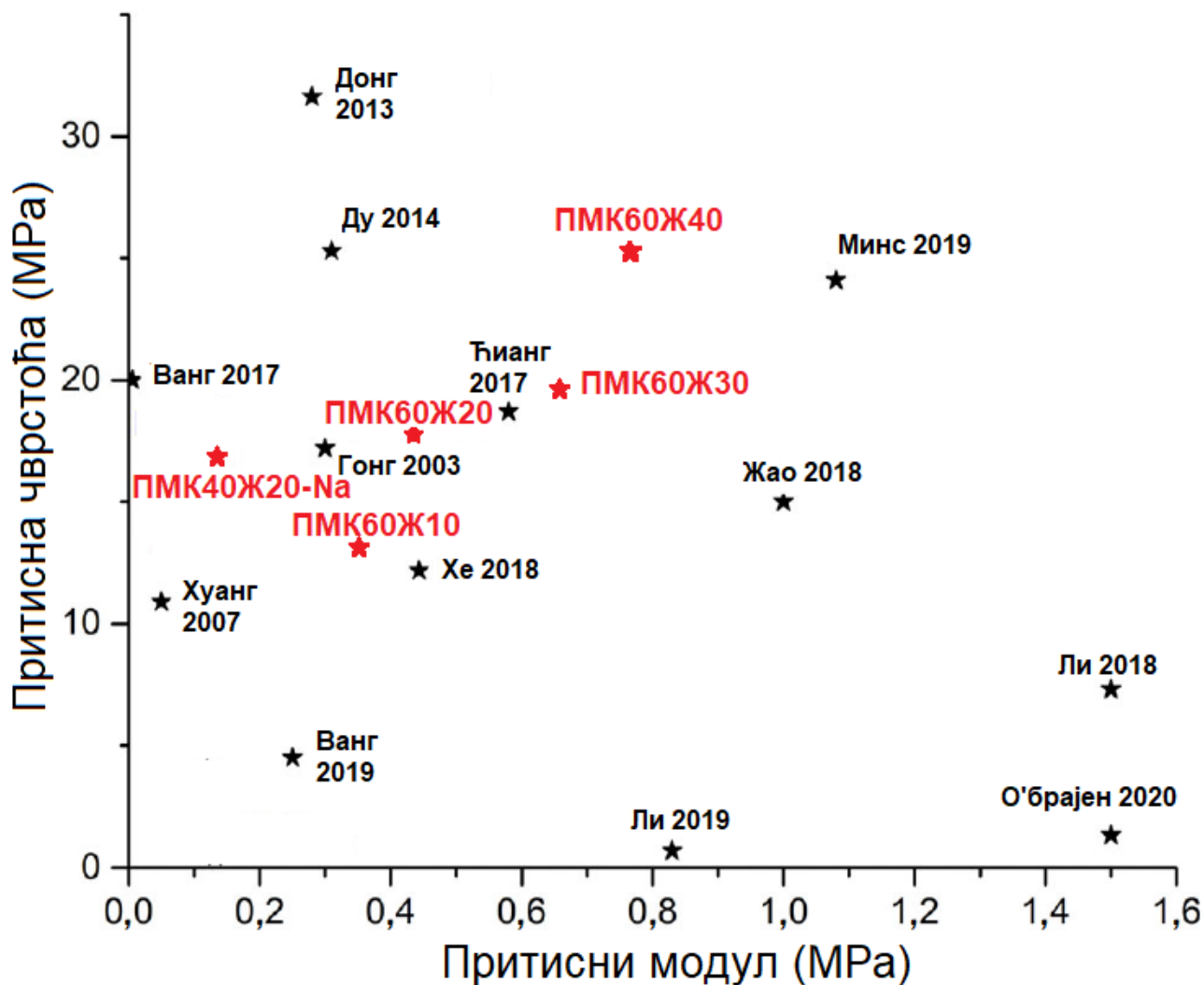
Ради испитивања механичке компетентности ПМКЖ-На хидрогелова за примену у инжењерству ткива хрскавице, хидрогелови су подвргнути тестовима притисног механичког испитивања. На слици 33А су приказане криве напон-деформација, док су фотографије ПМК40Ж20-На хидрогела током испитивања притисних механичких својстава и затезања приказане на сликама 33Б, В и Г. Трендови промене притисног модула и чврстоће, у односу на концентрацију МК, желатина и МБА, приказани су на слици 33Д. Притисна чврстоћа и модул су значајно побољшани када је концентрација МК повећана са 0,2 на 0,4 ml/ml. На пример, вредности σ_c и E_c ПМК40Ж20-На биле су 306 и 14 пута веће од одговарајућих вредности за ПМК20Ж20. Даље повећање концентрације МК резултирало је слабијом притисном чврстоћом хидрогелова. Слично, повећање концентрације желатина довело је до побољшања σ_c , достижући максимум при концентрацији од 0,2 g/ml, са вредношћу ≈ 16 МПа, а затим опадајући до ≈ 6 МПа при даљем повећању концентрације желатина. Са друге стране, E_c је континуирано растао од $\approx 0,09$ до 0,21 МПа са повећањем концентрације желатина од 0,0 до 0,4 g/ml. Механичка својства свих ИПМ хидрогелова драстично су била боља у односу на једнокомпонентне ПМК-На хидрогелове. Такође, додатак умреживача значајно је унапредио E_c и σ_c .



Слика 33. Криве напон-напрезање ПМКЖ-На хидрогелова (А). Фотографије макроскопског изгледа хидрогелова током испитивања притисних механичких својстава: ПМК40Ж20-На хидрогел под притисним напрезањем и деформацијом од 80% (Б) и након релаксације (В). Висока еластичност и жилавост хидрогелова демонстрирана везивањем у чвор и истезањем (Г). Трендови притисне чврстоће и модула хидрогелова у зависности од концентрације МК, желатина и односа МБА/МК (Д).

Јасно је да је увођење желатина у структуру ПМК хидрогелова значајно унапредило механичка својства, а притисна чврстоћа и модул ПМК40Ж20-На узорка су упоредиви са другим јаким хидрогеловима пријављеним у литератури (Слика 34). Иако су неки истраживачи добијени ефекат објаснили стварањем независне, физичке мреже желатина у ИПМ хидрогеловима, која преузима напрезање приликом преоптерећења примарне мреже и отежава катастрофални раст пукотине, дифрактограм ПМКЖ хидрогелова је показао супротно, односно да нема присуства троструко-спиралне надструктуре желатина. Као што је већ описано у одељку 4.2.1.1., код ПМКЖ хидрогелова се додавањем желатина повећава густина динамичких умрежења, претежно водоничних веза и хидрофобних интеракција. Створени хидрофобни домени обезбеђују додатне тачке перманентних умрежења док водоничне везе између молекула желатина и ПМК значајно повећавају густину динамичких веза. Претпоставља се да у случају ПМКЖ-На, због већег степена неутрализације карбоксилних група МК, ово друго има већи утицај на механику у односу на хидрофобне домene који су заступљени у мањем броју. Иако су ПМКЖ-На хидрогелови били и хемијски умрежени са МБА и утицај овог умрежења мора да се узме у обзир, недостатак желатина у једнокомпонентном ПМК хидрогелу јасно је указао на последице отсуства динамичких веза. Може се рећи да успостављене физичке везе делују као амортизери приликом утицаја спољашњег напрезања, односно да се континуално раскидају и обнављају апсорбујући енергију напрезања, при чему се основна структура хидрогела не нарушава. У тренуцима када јачина напрезања превазиђе енергију динамичких веза, долази до нарушавања ковалентних веза и трајног оштећења узорка. Такође, треба узети у обзир и СВ, с обзиром да вода чини највећи део структуре хидрогела. Са мањим СВ јачају и механичка својства, али је такође чињеница да умреженост и унутрашња структура хидрогелова имају одлучујући утицај и на СВ. Све ово је потребно узети у обзир приликом дизајнирања хидрогелова за употребу у инжењерству ткива и пронаћи оптималне параметре који ће обезбедити жељена својства имплантата и/или скафолда.

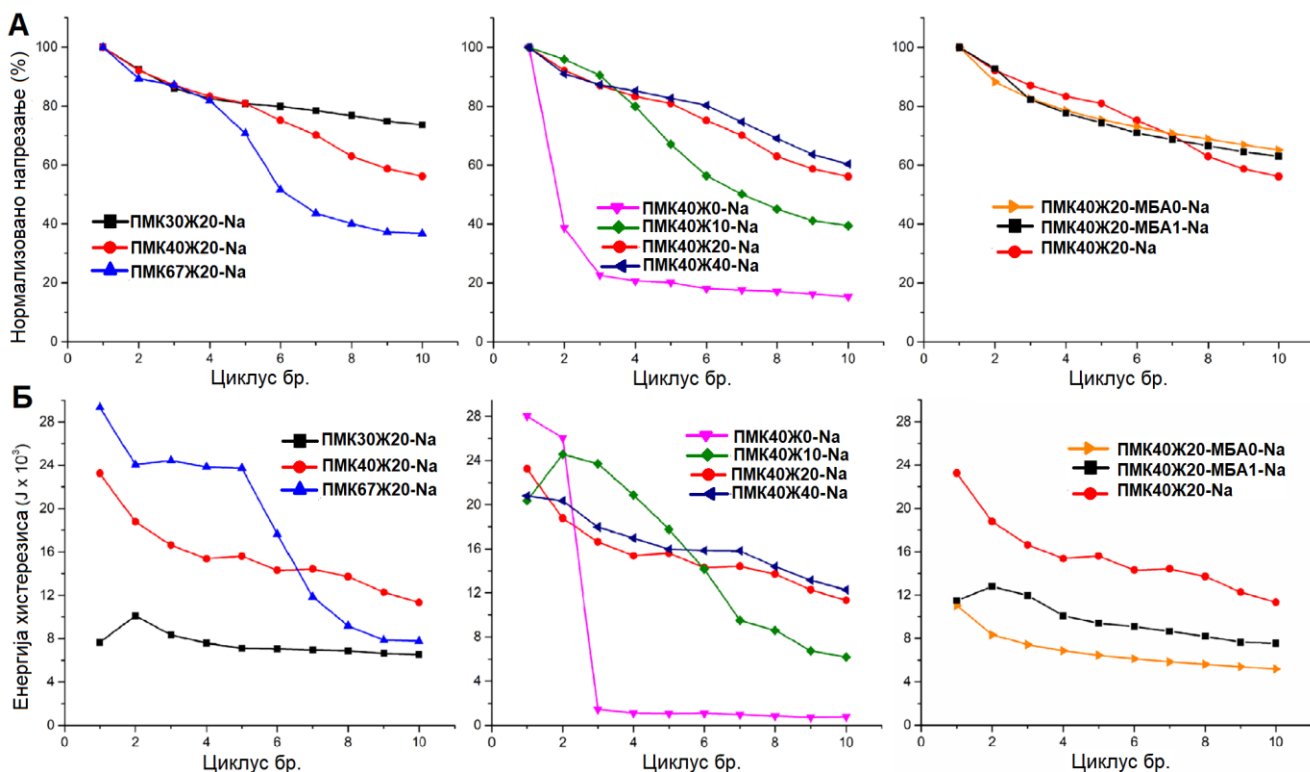
Мања притисна чврстоћа узорака синтетисаних са нижом концентрацијом МК приписана је порознијој структури, односно већем СВ. Поред тога, када је концентрација МК била ниска, приликом полимеризације није било довољно мономера да образује чврсту, примарну структуру, и ефикасно зароби желатин, што је резултовало нехомогеном структуром и slabим механичким својствима. Када је пак концентрација МК била довољна, полимеризација и умрежавање МК су били ефикаснији, распоређеност компоненти хомогена, чиме је омогућен већи степен интеракције између молекула ПМК и желатина и сходно томе боља механичка својства. Оштар скок механичких својстава евидентиран при порасту концентрације МК са 0,2 на 0,4 ml/ml управо указује на образовање чврсте, примарне структуре ПМК, што је и у складу са резултатима анализе микроструктуре. Нижа притисна чврстоћа ПМК60Ж20 узорка приписана је јаким унутрашњим напрезањима због велике количине воде у структури. Наиме, као што се може видети са слике, узорак ПМК60Ж20 је био најмање порозан, али је садржао исту количину воде као и ПМК40Ж20, због великог удела хидрофилне ПМК, што је довело до напрезања унутрашње структуре.



Слика 34. Графички приказ притисних механичких својстава хидрогелова објављених у литератури чији је $СВ \geq 50\%$, и хидрогелова синтетисаних у овој дисертацији [62, 222, 231–233, 223–230].

Осим испитивања статичког напрезања, хидрогелови су такође били подвргнути тестовима цикличног притисног напрезања да би се испитала отпорност на замор. Примењено је 10 узастопних циклуса напрезања и отпуштања, до деформације од 80%, без паузе између циклуса. Узорак ПМК20Ж20 је изостављен из тестова због слабих механичких својстава. Трендови нормализованог максималног напрезања и дисипације након сваког циклуса приказани су на сликама 35А и Б. Након узастопних напрезања, стрес и енергија хистерезиса су постепено опадали у случају скоро свих хидрогелова. Повећање концентрације МК смањило је отпорност на замор, док је повећање концентрације желатина имало супротан ефекат. Једнокомпонентни ПМК40Ж0-На хидрогел колабирао је након другог циклуса, при чему су вредности максималног напрезања и енергије хистерезиса пале на 22,7% и 5,2%, указујући на масивно раскидање ковалентних веза и урушавање унутрашње структуре. Са друге стране, динамичке везе у ИМП хидрогеловима расипају и апсорбују енергију напрезања, при чему основна ковалентна мрежа остаје већим делом неоштећена. Као што је приказано на слици 35Б, након благог почетног смањења због трајног оштећења дела ковалентних веза, вредности хистерезиса су углавном стабилизоване током наредних циклуса, док је у случају чистог ПМК хидрогела енергија хистерезиса опала

скоро до 0 J. С обзиром да енергија хистерезиса представља меру утрошене енергије потребне за деформацију узорка и раскидање унутрашњих веза током једног циклуса, може се закључити да код узорака са стабилним вредностима хистерезиса долази до обнављања структуре након сваког циклуса, што је последица присуства великог броја динамичких умрежења. Наравно, у системима с ковалентним везама увек ће доћи и до раскидања одређеног броја ковалентних веза, односно до трајног нарушавања структуре. С повећањем садржаја желатина у односу на ПМК повећан је и број динамичких веза у систему у односу на ковалентне, што је допринело већој отпорности хидрогелова на циклично напрезање. Повећање садржаја МБА, допринело је повећању ковалентних веза у систему, односно хемијских умрежења, чиме је и отпорност на замор смањена.

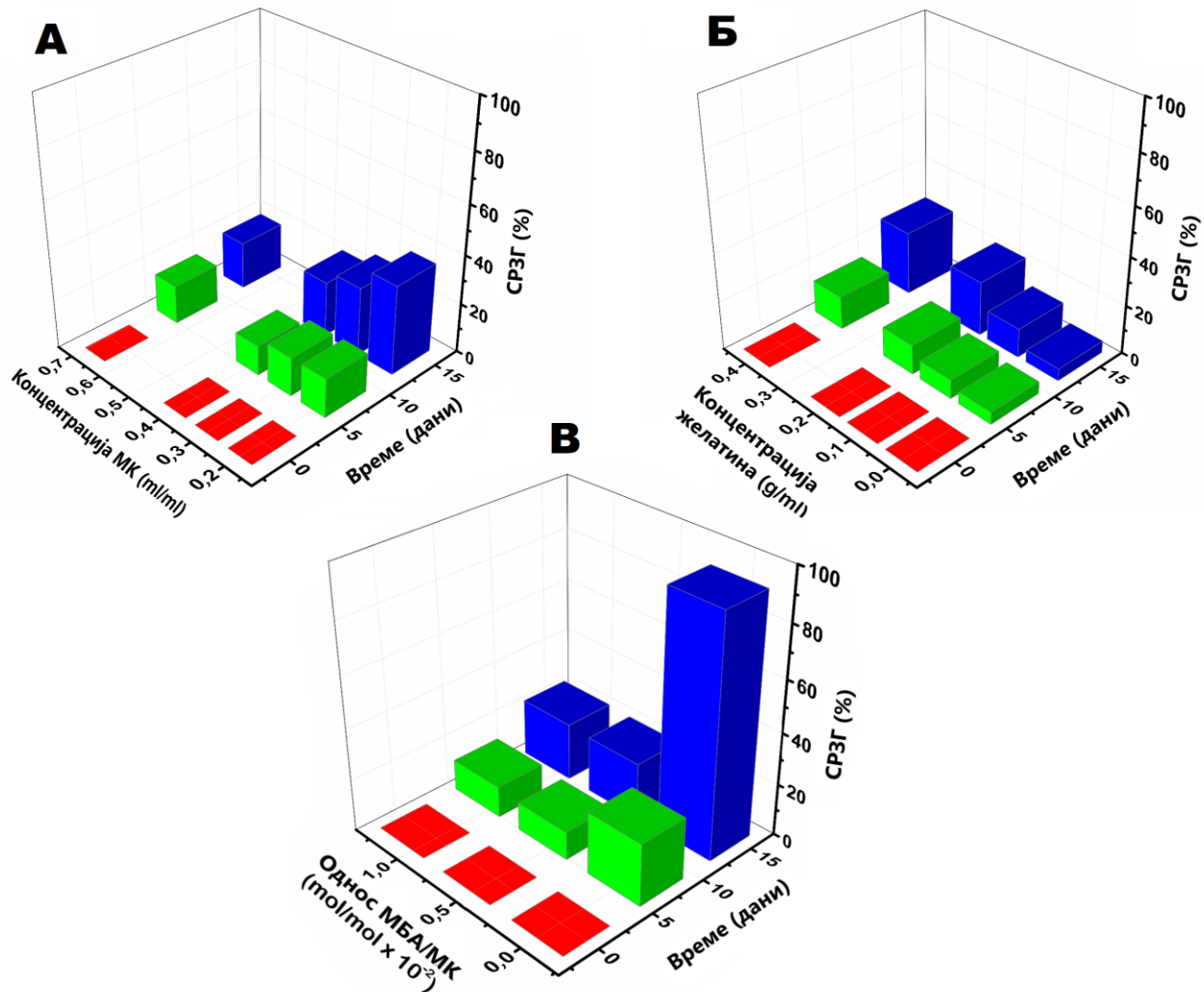


Слика 35. Вредности нормализованог напрезања (А) и енергије хистерезиса (Б) ПМКЖ-На хидрогелова током 10 циклуса динамичког притисног напрезања.

4.2.2.5. Разградивост у симулираним физиолошким условима

Разградња ПМКЖ-На хидрогелова праћена је у симулираној телесној течности на 37 °C (Слика 36). Смањење масе хидрогелова током две недеље износило је између 5% и 93% у зависности од састава. Са повећањем односа ПМК/желатин у структури, смањивао се степен разградње. На пример, ПМК67Ж20-На је био најотпорнији на разградњу у поређењу са хидрогеловима из исте серије. Код хидрогелова са фиксном концентрацијом МК (0,4 ml/ml) најотпорнији на разградњу је био узорак без желатина, ПМК40Ж0-На. Постепено повећање садржаја желатина у структури довело је до повећања разградивости хидрогелова због већег броја хидролитички осетљивих пептидних веза. Узорак ПМК40Ж20-МБА0-На, без додатка умреживача, скоро у потпуности се разградио након две недеље, док је додаток умреживача драстично побољшао отпорност на разградњу. Са додатком умреживача повећава се удео неразградиве мреже, односно ковалентно-умрежене фазе хидрогела. Ковалентне везе настале као

последица умрежавања са МБА, за разлику од пептидних и водоничних веза, се не могу раскинути на физиолошкој температури што доводи до смањења разградивости. Добијени резултати указују на широке могућности подешавања брзине разградње хидрогелова у зависности од крајње примене.

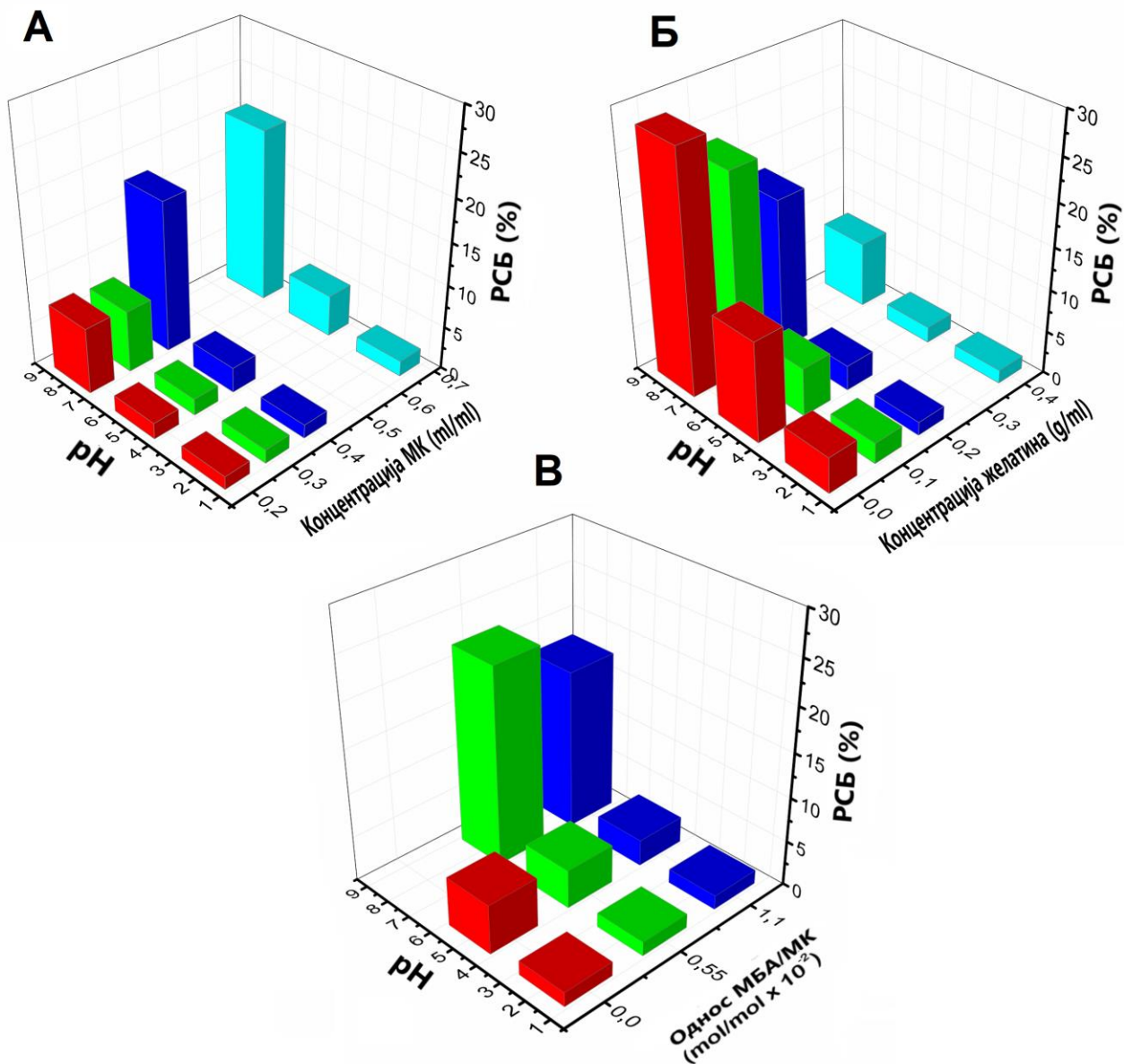


Слика 36. Утицај концентрације МК (А), желатина (Б) и односа МБА/МК (В) на СРЗГ ПМКЖ-На СРЗГ хидрогелова током 14 дана.

4.2.2.6. Бубрење

Бубрење ПМКЖ-На хидрогелова испитивано је у опсегу рН вредности од 2 до 8, на 25 °С. Дијаграми равнотежног степена бубрења (РСБ) у зависности од рН и концентрације желатина, МК и умреживача, приказани су на слици 37. Као што се може уочити са слике сви хидрогелови су рН осетљиви. При рН 2, што је испод константе дисоцијације карбоксилних група ПМК ($pK_a \approx 4,3$), РСБ је био низак за све хидрогелове. Када је рН вредност раствора премашила вредност константе дисоцијације дошло је до јонизације карбоксилних киселина, што је довело до значајног повећања РСБ због појаве одбојних електростатичких сила између негативно наелектрисаних карбоксилатних јона и повећања јонске густине хидрогелова. Ефекат је био још израженији са повећањем концентрације МК (Слика 37А) и са смањењем концентрација желатина (Слика 37Б) и МБА (слика 37В). У хидрогеловима са фиксном концентрацијом

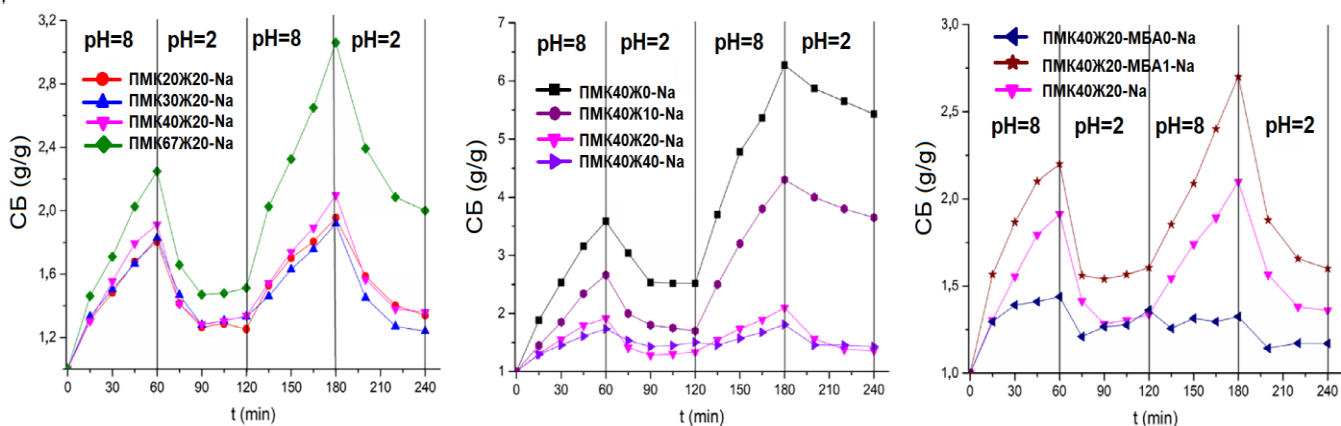
желатина, повећање ПМК довело је до повећања броја карбоксилних група које значајно повећавају хидрофилност система, посебно након неутрализације. У хидрогеловима са фиксним садржајем ПМК, повећање желатина и МБА довело је до већег степена умрежења, што је резултирало мање порозном мрежом и нижим РСБ. Због великог степена неутрализације, и недостатка хемијског умреживача, узорак ПМК40Ж20-МБА0-На се релативно брзо растворио при рН 8. При рН 2 и 5, јонизација карбоксилних група није била толико изражена, па су физичке интеракције између макромолекула биле довољно јаке да одрже физички интегритет хидрогелова.



Слика 37. Утицај рН раствора и концентрације МК (А), желатина (Б) и МБА (В), на РСБ хидрогелова.

Тестови наизменичног бубрења и скупљања хидрогелова у базним и киселим растворима изведени су да би се проценила реверзибилност бубрења и брзина реакције на рН стимулус. Као што се може видети са слике 38, реверзибилност бубрења је била израженија са смањивањем

односа ПМК/желатин. Ово се може објаснити чињеницом да су се у базној средини хидрогелови са већим уделом ПМК у структури брзо ширили, изазивајући истезање макромолекула и успостављање нових физичких веза и конформација. Када су пребачени у кисело окружење макромолекули нису могли да се у потпуности врате у пређашње стање, с обзиром да су новоуспостављене физичке интеракције (електростатичке интеракције, водоничне везе, заплитање ланаца) биле јаче од погонске силе за релаксацију и/или није било довољно времена за враћање у претходно стање. С повећањем концентрације желатина, структура хидрогелова је постајала ригиднија због већег степена умрежења, што је утицало на слабије бубрење и лакше враћање у пређашње стање. Ипак, амплитуда бубрење-скупљање је била значајно мања него у случају система са већим односом ПМК/желатин. Повећање садржаја МБА утицало је на исти начин као и повећање концентрације желатина, с тим што се узорак ПМК40Ж20-МБА0-На значајно разградио на рН 8, што је разлог за ниску вредност РСБ на слици 38.

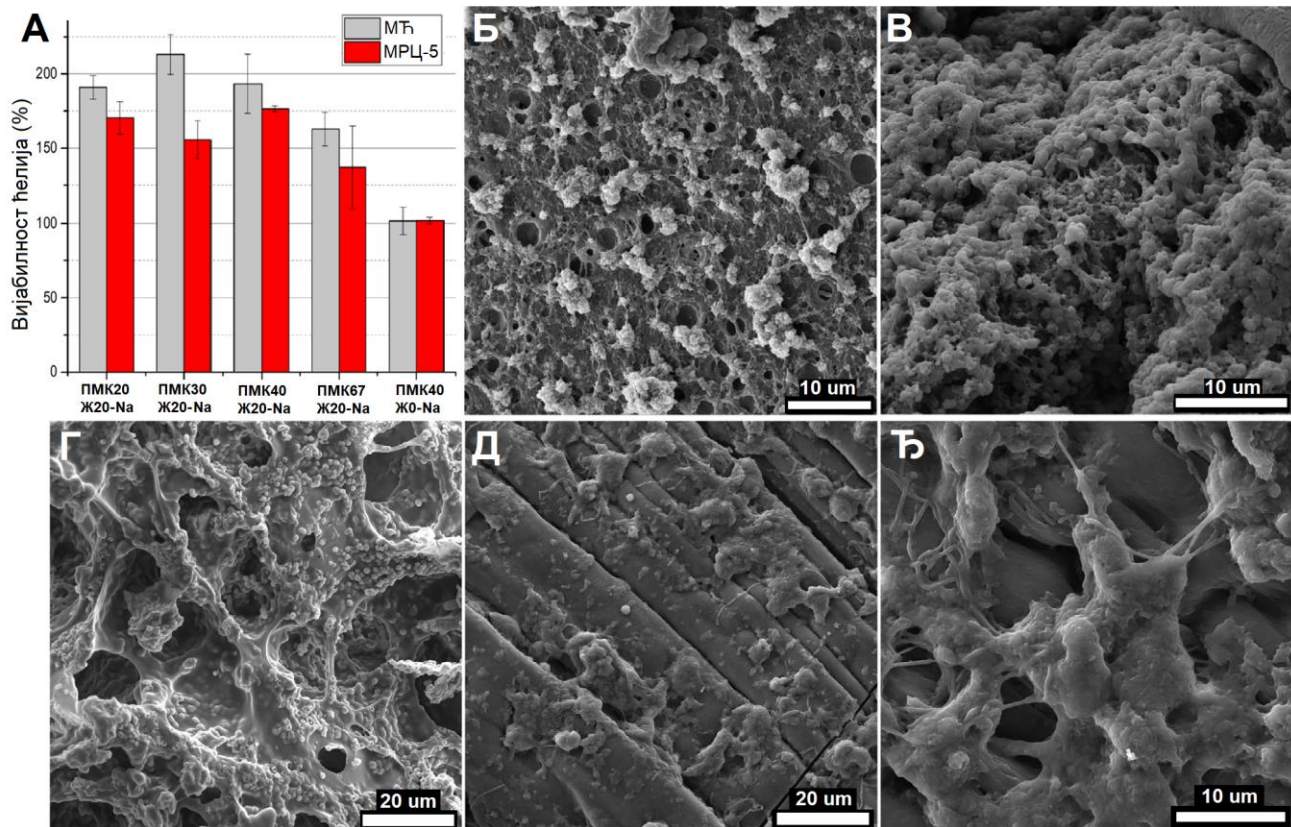


Слика 38. Наизменично бубрење и скупљање ПМКЖ-На хидрогелова при промени рН вредности раствора.

4.2.2.7. Утицај састава хидрогелова на биокompatibilност

Ради испитивања цитотоксичности ПМКЖ-На хидрогелова, пролиферација МЋ и МРЦ-5 праћена је током 48 h. Као што се уочава са слике 39, сви узорци осим ПМК40Ж0, значајно су поспешили пролиферацију МЋ, уз релативну вијабилност ћелија већу од 150%. Ћелије култивисане на ПМК40Ж0 имале су најнижу метаболичку активност која је била слична као код контролног узорка. Највећу стопу вијабилности имале су ћелије култивисане на узорку ПМК30Ж20, док је уочено постепено опадање вијабилности са повећањем односа ПМК/желатин. Сличан тренд је уочен и у случају МРЦ-5 ћелија, са нешто мањим вредностима вијабилности у односу на МЋ. Повећање садржаја желатина у хидрогеловима подстакло је ћелијску адхезију што је последица присуства аргинин-глицил-аспарагинска киселина аминокиселинских секвенци у желатину, које промовишу адхезију, пролиферацију и диференцијацију ћелија [234–236]. Поред тога, ћелијска морфологија на ИПМ хидрогеловима снимљена помоћу СЕМ, потврдила је цитокомпатибилност хидрогелова. На површинама узорака ПМК67Ж20-На и ПМК40Ж0-На приказаним на сликама 39Б и В, уочавају се ћелије са раширеним филаподама и формираним међућелијским конекцијама. Штавише, попречни пресек узорка ПМК20Ж20-На (Слика 39Г) показује да су ћелије могле да уђу у поре и мигрирају ка унутрашњости материјала. СЕМ микрографије МРЦ-5 ћелија на узорцима ПМК40Ж20 и ПМК67Ж20 (слике 39Д и Ђ) показале су да су хидрогелови подстакли ћелијску адхезију на шта указују раширене филапode и међућелијске

конекције. Узимајући у обзир да се материјали код којих је ћелијска вијабилност преко 80% сматрају цитокомпатибилним према ISO 10993–5 стандарду [237], може се закључити да су сви испитани хидрогелови испољили благотворан утицај на ћелијску адхезију и пролиферацију, што их чини перспективним за даља испитивања биокompatibilности и примену у биомедицини.



Слика 39. Резултати ћелијске вијабилности након 48 h, добијене МТТ методом (А) (вијабилност контролног узорка ћелија износи 100%). СЕМ микрографије које приказују морфологију МТТ: на површини ПМК67Ж20-На (Б), на површини ПМК40Ж0-На (В) и у унутрашњости ПМК20Ж20-На (Г). СЕМ микрографије које приказују морфологију МРЦ-5 на површини: ПМК40Ж20-На (Д) и ПМК67Ж20-На (Ђ).

4.3. УТИЦАЈ УМРЕЖАВАЊА НА СВОЈСТВА ПМК ХИДРОГЕЛОВА

Како је степен умрежења један од најважнијих параметара који диктира својства хидрогелова, у овом делу истраживања испитан је утицај различитих стратегија за умрежавање ПМК и могућности добијања тродимензионалних, функционалних хидрогелова. Хидрогелови на бази винилних полимера су најчешће умрежени помоћу двофункционалних умреживача са винилним групама, методом ТИПСР на начин који је шематски приказан на слици 2, што је и најчешћа метода за умрежавање ПМК. Поред тога, ПМК хидрогелови у теорији могу бити умрежени и јонским везама између негативно наелектрисаних карбоксилних група ПМК и позитивно наелектрисаних јона вишевалентних метала, о чему у литератури нема много података. Због тога је у овом поглављу дисертације пажња усмерена на могућност добијања и карактеризацију основних својстава јонски-умрежених ПМК хидрогелова.

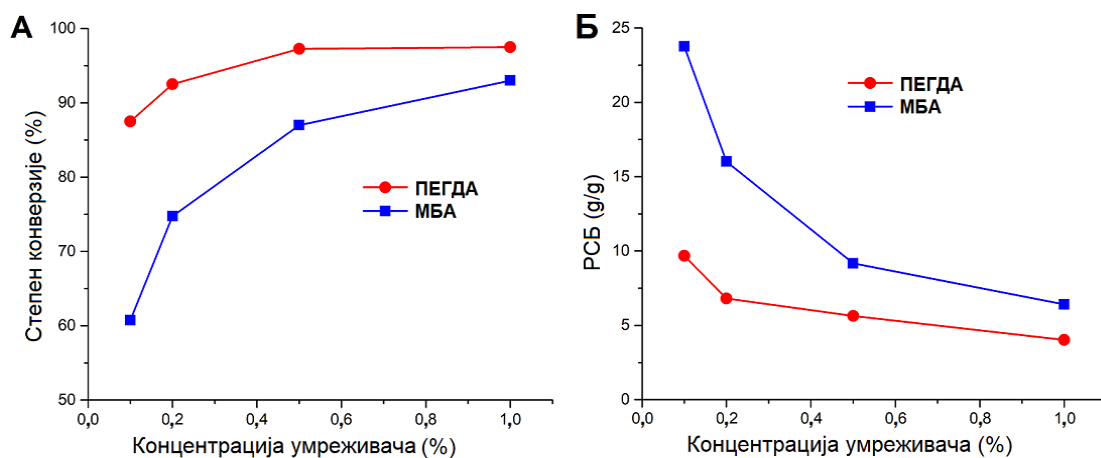
4.3.1. ПМК хидрогелови умрежени двофункционалним умреживачима са винилним групама

ПМК хидрогелови, као и други полимери на бази винилних мономера који се користе у биомедицини попут ПАК и поли(акриламида) се уобичајено умрежавају коришћењем МБА, етилен-гликол-диакрилата и етилен-гликол-диметакрилата, који су познати као релативно токсична једињења [73, 238–240]. МБА је ефикасан умреживач широко коришћен за добијање хемијски умрежених ПМК хидрогелова, међутим, непрореаговали молекули МБА могу да буду токсични у случају отпуштања у организам током *in vivo* примена [241]. Накнадно испирање хидрогелова ради уклањања непрореагованих молекула спречава могућност уношења активне супстанце током синтезе хидрогелова, с обзиром да може довести до губитака активне супстанце. Према томе, најједноставније решење за овај проблем је коришћење нетоксичних умреживача који су безбедни за *in vivo* примену.

Поли(етилен-гликол)диакрилат (ПЕГДА) је дериват поли(етилен-гликола) који је један од најчешће примењиваних материјала у фармацији и биомедицини због биокompatбилности, нетоксичности, хидрофилности и релативно добрих механичких својстава [242]. Терминалне акрилатне функционалне групе на ПЕГДА омогућавају формирање двофункционалних радикала током процеса полимеризације преко слободних радикала, што је у овој дисертацији искоришћено за добијање ПМК хидрогелова умрежених помоћу ПЕГДА. Процес синтезе и хемијска структура ПМК-П(М) хидрогелова су већ приказани на слици 2.

4.3.1.1. Степен конверзије

СК је израчунат мерењем масе ксерогела након синтезе и поређењем са масом ксерогела добијеног сушењем после испирања у води. Хидрогелови су имали висок степен полимеризације с обзиром да су измерене масе ксерогелова након синтезе биле блиске збиру маса појединачних компоненти које су коришћене за синтезу. Са друге стране, масе ксерогелова након испирања су биле мање и зависне од типа и садржаја умреживача. Слика 40А приказује зависност СК хидрогелова од садржаја МБА и ПЕГДА. Повећање садржаја умреживача резултовало је хидрогеловима са већим вредностима СК. Штавише, утицај ПЕГДА на СК је био значајно већи у поређењу са МБА, при истим молским концентрацијама. Имајући у виду чињеницу да је степен полимеризације био висок, тј. да је број непрореагованих молекула мономера био релативно мали, губитак масе након испирања би могао да буде последица уклањања мањих и неумрежених полимерних ланаца, који су могли лакше да дифундују из структуре. Према томе, повећање садржаја умреживача даје више умрежену структуру са мањим уделом растворљиве фазе (непрореаговали молекули мономера и умреживача, неумрежени олигомерни и полимерни ланци) [206]. Што се тиче вишег СК ПМК-П хидрогелова у поређењу са ПМК-М, претпоставка је да молекули ПЕГДА имају значајно већу тенденцију да реагују са слободним радикалима и буду инкорпорирани у растући ланац током процеса полимеризације, што се може приписати мањој реактивности акриламида у поређењу са метакрилатима [243]. На овај начин се добија ефективније умрежена структура хидрогела.



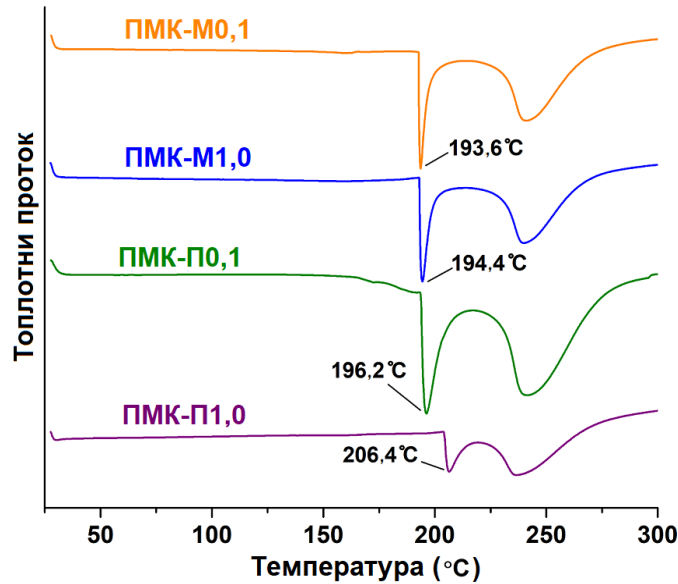
Слика 40. Утицај умреживача на СК (А) и РСБ (Б).

4.3.1.2. Бубрење

Праћење бубрења у ПБС на 37 °C током 24 h, приказано на слици 40Б, показало је да повећање количине умреживача доводи до смањења РСБ, што указује на повећање степена умрежења [212]. РСБ ПМК-П хидрогелова био је нижи у поређењу са ПМК-М хидрогеловима, што је супротно нашој иницијалној хипотези да коришћење ПЕГДА као умреживача може дати хидрогелове са већим РСБ због дужих, флексибилнијих молекула. Ипак, мањи РСБ ПМК-П хидрогелова у сагласности је са вишим вредностима СК, што указује да је СК имао пресудан утицај на структуру хидрогелова [206]. У случају ПМК-М хидрогелова СК је био драстично нижи у поређењу са ПМК-П хидрогелова због чега су добијени хидрогелови са мањим степеном умрежења. Да би се потврдила ефикасност ПЕГДА умреживача, ПМК хидрогелови синтетисани без додатка умреживача такође су подвргнути испитивањима у идентичним условима. Међутим, у овом случају дошло је до потпуног растварања хидрогелова с обзиром да су били умрежени искључиво физичким умрежењима, што доказује да ПЕГДА може ефективно да умрежи ПМК.

4.3.1.3. Термичка разградња хидрогелова

Термограми ПМК хидрогелова, добијени ДСК анализом и приказани на слици 41, одликују се оштрим ендотермним пиком у опсегу температура 193-207 °C (T1), и широким ендотермним пиком на око 240 °C. Оба пика указују на различите ступњеве разградње полимерне мреже. Први се односи на дехидратацију карбоксилних група и образовање цикличних полианхидрида [203], док се други пик приписује даљој разградњи основних ланаца ПМК, укључујући процесе декарбоксилације и деполимеризације [203, 204]. С повећањем садржаја умреживача, први ступањ деградације ПМК хидрогелова помера се ка вишим температурама, што значи да долази до побољшања термичке стабилности хидрогелова. Померање температуре деградације ка вишим вредностима је израженије код ПМК-П хидрогелова у поређењу са ПМК-М хидрогеловима. На пример, када је концентрација МБА повећана 10 пута T1 се повећала за 0,8 °C, док је идентично повећање концентрације ПЕГДА довело до повећања T1 за чак 10,4 °C. Побољшање термичке стабилности је још један доказ ефикасног умрежавања ПМК.

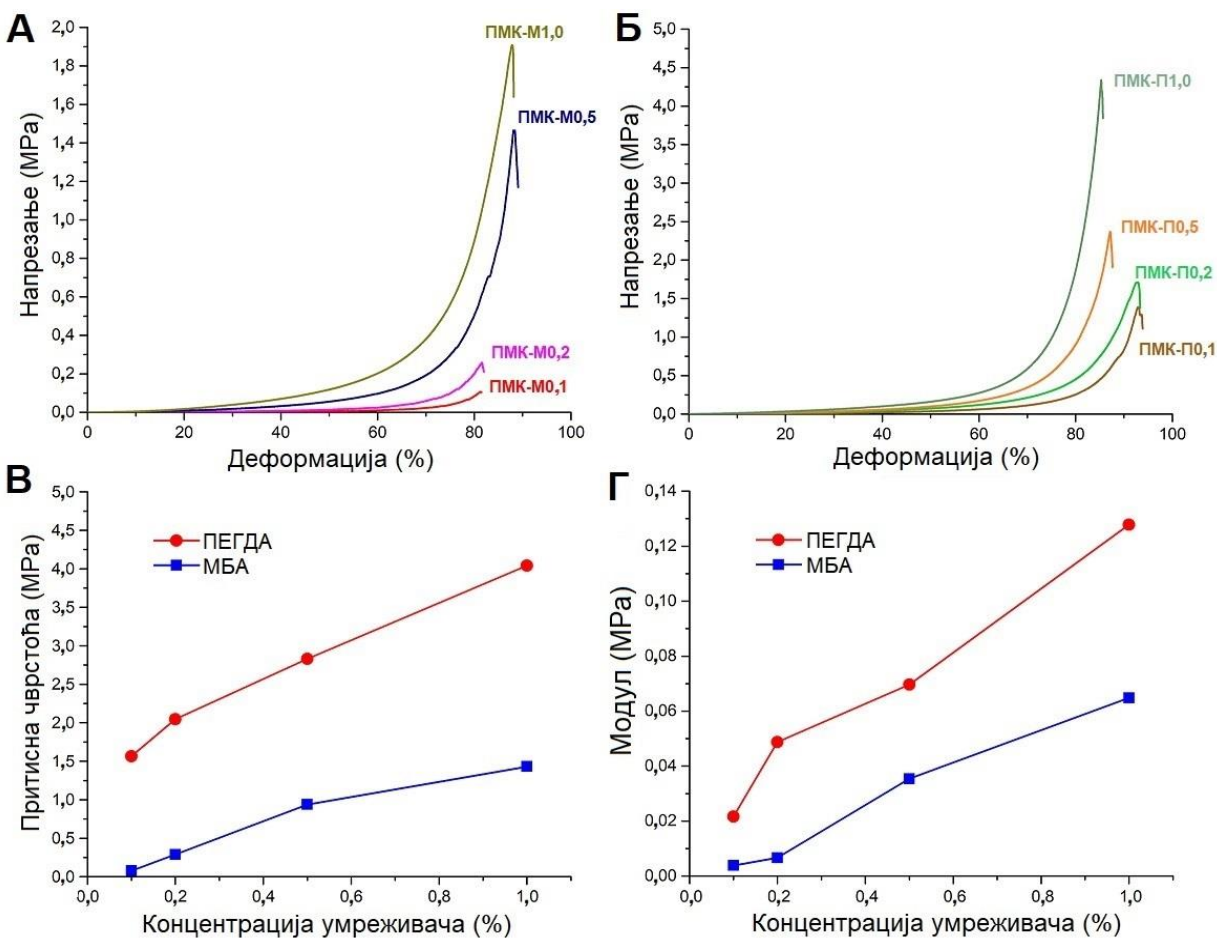


Слика 41. Термограми хидрогелова синтетисаних коришћењем различитих концентрација МБА и ПЕГДА.

4.3.1.4. Механичка својства

Механичка својства ПМК хидрогелова испитана су тестирањем понашања под утицајем униаксијалног притисног напрезања. Криве напон-деформација су дате на сликама 42А и Б, док су трендови промене притисне чврстоће и модула у зависности од концентрације ПЕГДА и МБА, приказани на сликама 42В и Г. Вредности притисне чврстоће и модула су се значајно повећале са повећањем концентрације умреживача у оба случаја. На пример, вредности за σ_c и E_c ПМК-М1,0 су биле 20 пута веће него одговарајуће вредности за ПМК-М0,1, док је у случају ПМК-П1,0 побољшање износило 2,5 и 6 пута у односу на ПМК-П0,1, редом. У оба случаја, притисна чврстоћа и модул су имали скоро у потпуности линеарну зависност од концентрације умреживача. Упоредијући утицаје различитих умреживача, коришћењем ПЕГДА добијени су хидрогелови значајно бољих механичких својстава, што је у сагласности са вредностима СК и РСБ. Мање умрежени хидрогелови са већим РСБ одликују се слабијим механичким својствима у поређењу са истим типом хидрогелова који имају већи степен умрежења и мање воде у структури.

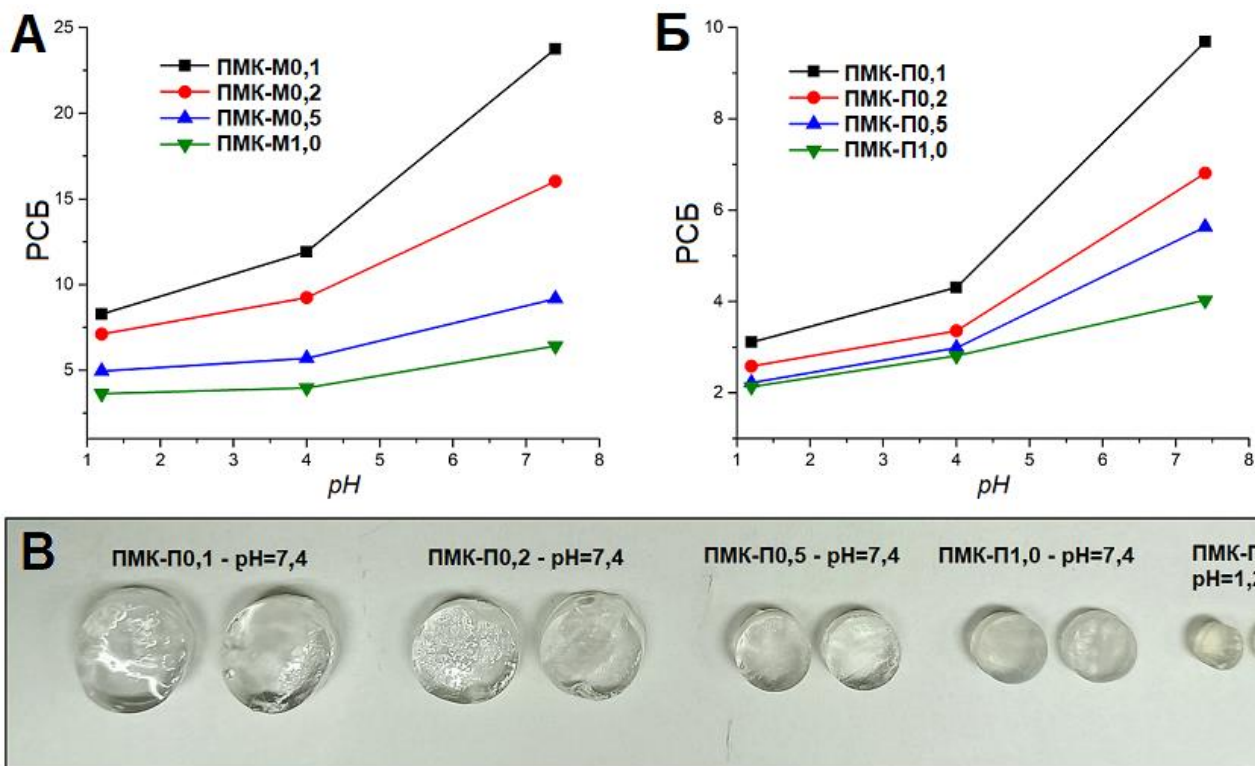
Вредности притисне чврстоће добијених ПМК-П хидрогелова биле су упоредиве са вредностима притисне чврстоће зглобне хрскавице човека (израчунато је да човек тежине 90 kg врши притисак од 2,5 МПа на колена током ходања [244]), што потврђује механичку компетенцију добијених материјала за биомедицинске примене.



Слика 42. Криве напон-деформација хидрогелова са различитим концентрацијама МБА (А) и ПЕГДА (Б). Утицај концентрације умреживача на притисну чврстоћу (В) и модул (Г) датих хидрогелова.

4.3.1.5. рН осетљивост

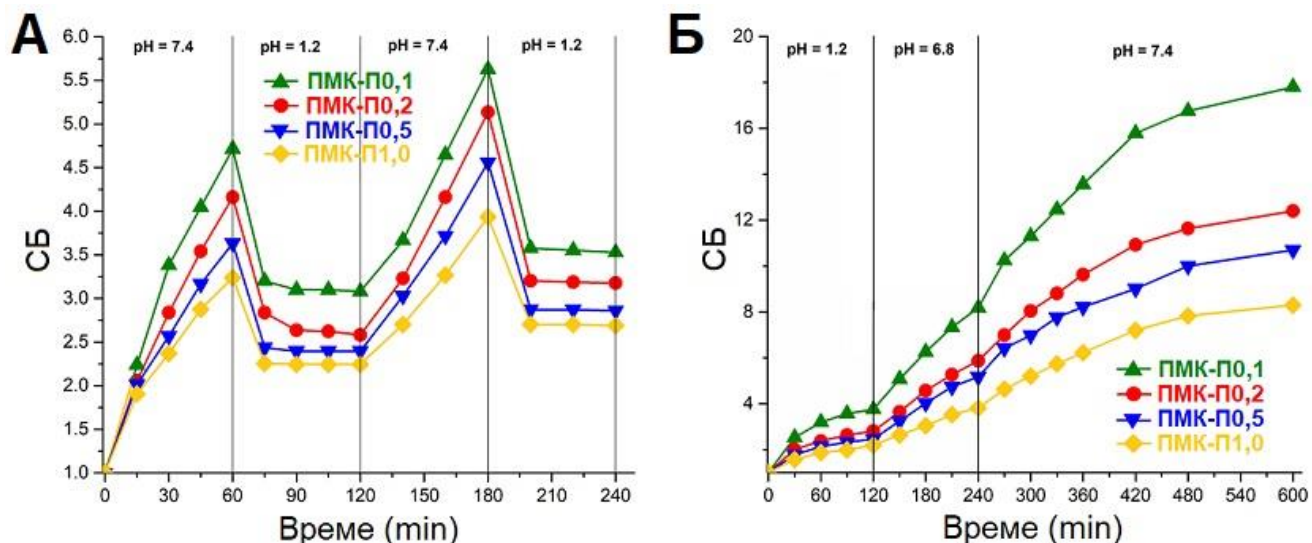
рН осетљивост ПМК хидрогелова умрежених различитим типом умреживача испитивана је у физиолошки релевантном рН опсегу од 1,2 до 7,4 на 37 °С, као и у симулираним условима гастроинтестиналног тракта (ГИТ). Хидрогелови су такође били подвргнути наизменичном бубрењу у кисело-базним условима ради испитивања реверзибилности и брзине бубрења. РСБ као функција рН вредности, за хидрогелове са различитим типовима и концентрацијама умреживача, приказан је на сликама 43А и Б. Као што се може видети на сликама, бубрење свих хидрогелова је било зависно од рН средине. При рН=1,2, што је значајно ниже од рКа вредности за ПМК, РСБ је био низак за све хидрогелове. Када је рН вредност раствора била већа од вредности рКа ПМК, карбоксилне групе су постале јонизоване што је довело до значајно већег РСБ, као што је већ објашњено у претходним одељцима (види 4.2.2.6.). Ефекат је био израженији како је концентрација умреживача опадала. Уопштено гледано, ПМК-М хидрогелови су имали значајно веће вредности РСБ у поређењу са ПМК-П, због слабије умрежене структуре. Ипак, коришћење ПЕГДА није утицало на рН-осетљивост ПМК хидрогелова. На слици 43В су приказане фотографије ПМК-П хидрогелова након достизања РСБ у рН=7,4, као и фотографија ПМК-П1,0 хидрогела након бубрења у киселој средини.



Слика 43. Зависност РСБ од рН за хидрогелове умрежене различитим концентрацијама МБА (А) и ПЕГДА (Б). Фотографије ПМК-П хидрогелова након бубрења у рН=7,4 и рН=1,2 (В).

Испитивање наизменичног бубрења ПМК-П хидрогелова показало је да се хидрогелови после бубрења у базној средини значајно скупљају након 15 min у киселој средини, односно да им вредност СБ опада за $\approx 35\%$, након чега практично не долази до даљег скупљања (Слика 44А). Реверзибилност бубрења је слабо опадала са смањењем концентрације умреживача. Ово је последица већег истезања макромолекула и успостављања нових физичких веза у структури хидрогелова у базним условима, који касније нису могли да се у потпуности релаксирају у условима киселе средине. Ефекат је био израженији када је истезање молекула било израженије, што је био случај са мање умреженим хидрогеловима.

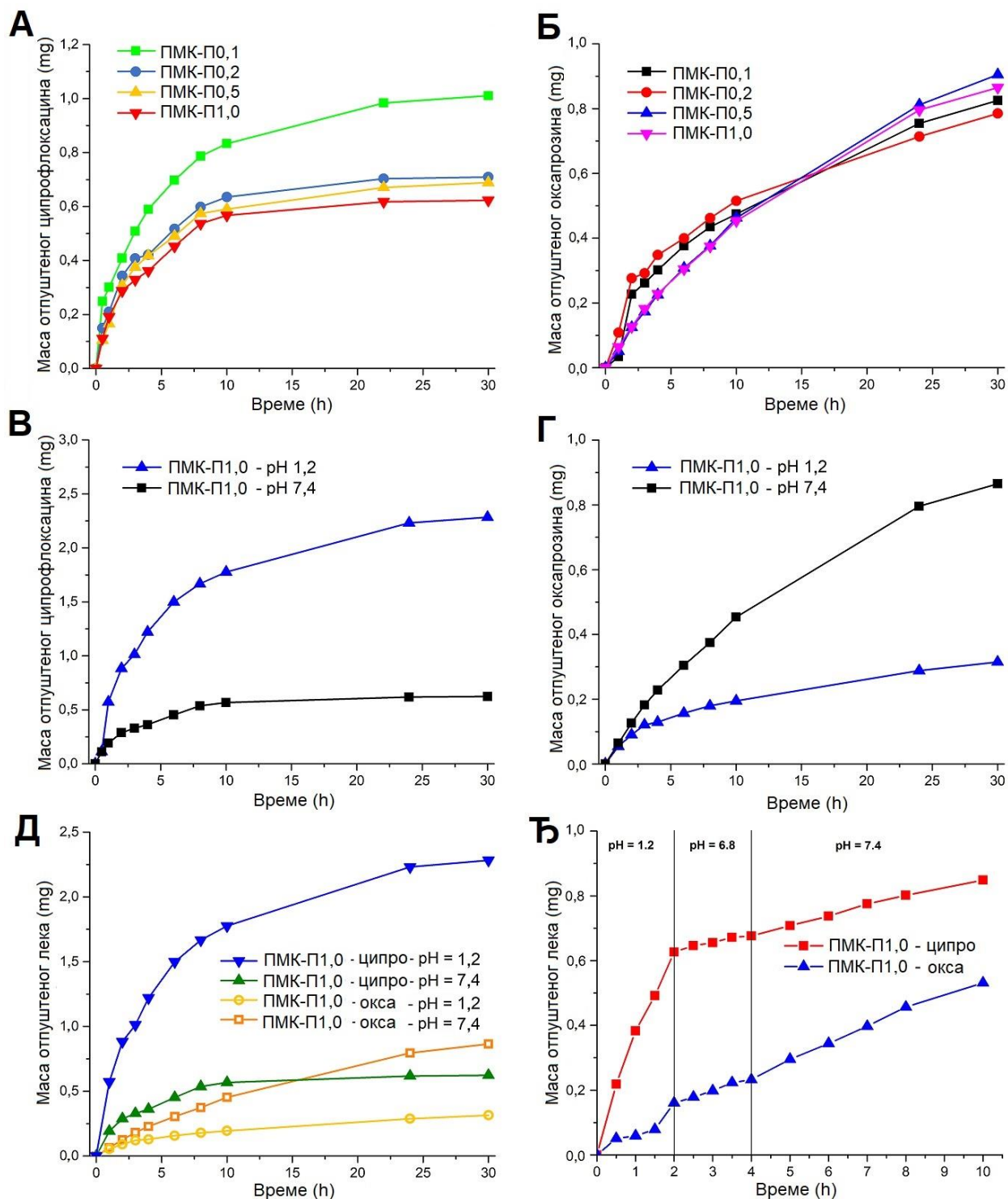
Резултати бубрења у ГИТ условима представљени су на слици 44Б. Као што се може видети са слике, вредности СБ су биле релативно ниске при рН=1,2 (СБ = 2-4 у зависности од узорка), али су значајно порасле када су узорци пребачени у базне услове (СБ = 8-18 у зависности од узорка). Овакво рН-осетљиво бубрење ПМК-П хидрогелова је веома погодно за дизајнирање материјала са контролисаним отпуштањем супстанци у дебело црево. Ови системи могу да заштите лек од оштрих услова у желуцу и омогуће контролисано отпуштање у танко црево и дебело црево. Такав начин контролисаног отпуштања посебно је важан за отпуштање лекова који могу да изазову озбиљне нежељене последице на горњи део ГИТ, али и да повећају ефикасност лекова намењених за третман патолошких стања дебелог црева.



Слика 44. Бубрење ПМК-П хидрогелова у наизменичним кисело-базним условима (А) и симулираним ГИТ условима (Б).

4.3.1.6. Отпуштање лекова

Примењивост добијених ПМК-П хидрогелова као система за контролисано отпуштање лекова, испитана је њиховим коришћењем за отпуштање ципрофлоксацина и оксапрозина у различитим рН условима, а резултати су приказани на слици 45. Експерименти *in vitro* отпуштања ципрофлоксацина при рН = 7,4 показали су да концентрација умреживача има пресудан утицај на кинетику отпуштања (Слика 45А). Наиме, повећање концентрације умреживача довело је до смањења количине отпуштеног лека током првих 5 h, што је последица смањења дифузије услед повећања густине умрежења. С друге стране, степен умрежавања није имао значајан утицај на количину отпуштеног лека у случају отпуштања оксапрозина (Слика 45Б). Слабије умрежени хидрогелови (ПМК-П0,1 и ПМК-П0,2) су имали изражен ефекат наглог отпуштања, али су након 30 h отпустили мало већу количину лека у односу на ПМК-П0,5 и ПМК-П1,0. Што се тиче отпуштања у различитим рН условима, укупна количина отпуштеног ципрофлоксацина је била скоро 5 пута већа при рН=1,2 него при рН=7,4 (Слика 45В), иако су тестови бубрења показали скоро дупло мањи РСБ при рН=1,2 у поређењу са рН=7,4. Очигледно, РСБ није имао пресудан утицај на отпуштање ципрофлоксацина у овом случају, и дифузија није била корак који одређује брзину отпуштања.

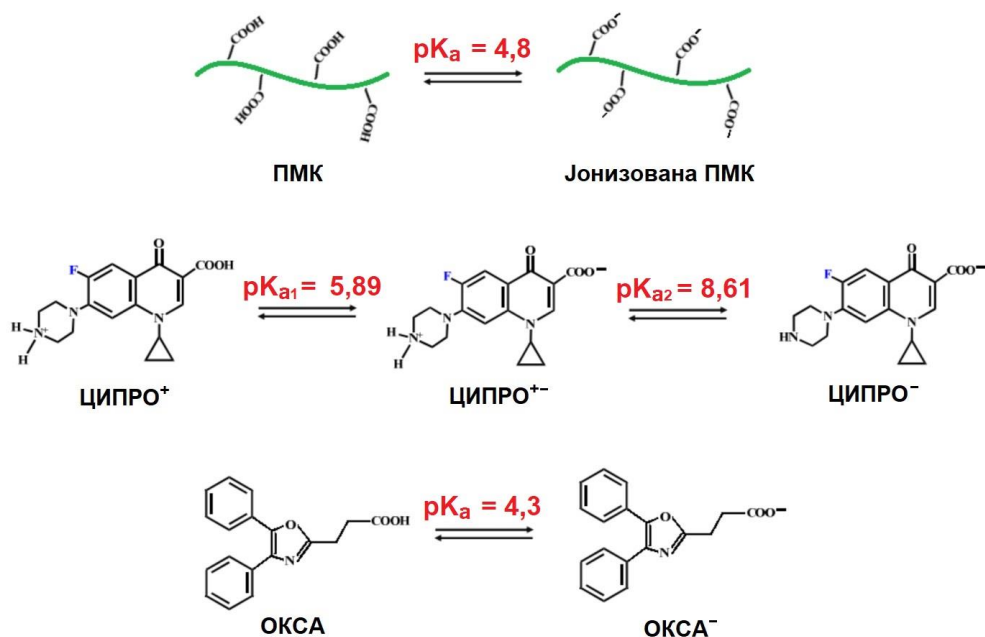


Слика 45. *In vitro* отпуштање ципрофлоксацина (А) и оксапрозина (Б) из хидрогелова са различитим садржајем ПЕГДА, при рН = 7,4. *In vitro* отпуштање ципрофлоксацина (В) и оксапрозина (Г) из ПМК-П1,0 хидрогела при различитим рН условима. Упоредни приказ кривих отпуштања ципрофлоксацина и оксапрозина из ПМК-П1,0 хидрогела, при различитим рН условима (Д). *In vitro* отпуштање ципрофлоксацина и оксапрозина из ПМК-П1,0 хидрогела у симулираним ГИТ условима (Е).

Може се претпоставити да је главни утицај на брзину отпуштања имала растворљивост лекова, као и степен интеракције између лека, медијума и полимера. Ципрофлоксацин има две константе дисоцијације које одговарају двома основним местима везивања протона – карбоксилној групи ($pK_1=5,89$) и атому азота на пиперазиновом прстену ($pK_2=8,61$), због чега у зависности од рН вредности окружења, ципрофлоксацин може да буде у форми катјона, анјона или цвистерјона (слика 46) [245]. Са друге стране, pK_a МК је $\approx 4,3$. Када је рН вредност медијума била 1,2, што је ниже од pK_a ПМК, карбоксилне групе су биле неутралне, док су молекули ципрофлоксацина били у катјонском облику, што је спречило електростатичке интеракције између њих. У исто време, због високе растворљивости ципрофлоксацина у киселој средини, слабе физичке везе између молекула ципрофлоксацина и хидрогела су биле релативно лако раскинуте, и ципрофлоксацин је отпуштен у медијум. У овом случају процес дифузије је био једини ограничавајући корак да молекули лека напусте хидрогел, а сам процес дифузије је зависио од РСБ. С друге стране, када је рН вредност медијума била 7,4, већина карбоксилних група хидрогела је била у форми анјона, док су молекули ципрофлоксацина били у форми цвистерјона, што је омогућило електростатичке интеракције између позитивно наелектрисаних група ципрофлоксацина и негативно наелектрисаних карбоксилних група хидрогела. Заједно са слабом растворљивошћу ципрофлоксацина у базним условима, ово је резултовало малом количином отпушеног лека с обзиром да су молекули лека преферирали интеракцију с хидрогелом, а не с медијумом [246].

Ситуација с отпуштањем оксапрозина је била обрнута. Количина отпушеног оксапрозина је била значајно већа у базним условима него у киселим (слика 45Г). У киселим условима, хидрогел и оксапрозин су били у неутралном стању и могли су да успоставе интеракцију путем водоничних веза. Штавише, оксапрозин је нерастворљив у воденом раствору при $pH=1,2$, чиме је његово ослобађање било додатно отежано. Када је рН медијума била 7,4, карбоксилне групе у хидрогелу и оксапрозину су биле у форми негативно наелектрисаног карбоксилатног анјона због чега су између њих владале одбојне електростатичке интеракције. У комбинацији са високом растворљивошћу оксапрозина у базној средини, ово је довело до значајно веће брзине и степена отпуштања. Упоредни приказ кривих отпуштања оксапрозина и ципрофлоксацина у различитим условима киселости средине (слика 45Д), показују већу количину отпушеног ципрофлоксацина, што указује да је у примењеним *in vitro* условима, ципрофлоксацин имао већу тенденцију да се отпушта.

In vitro експерименти отпуштања ципрофлоксацина и оксапрозина у симулираним ГИТ условима пратили су сличан тренд као и у одговарајућим рН условима (слика 45Б). На пример, током прва два сата отпуштања у симулираним ГИТ условима ($pH=1,2$), ПМК-П1,0 хидрогел је отпустио више од 0,6 mg лека што је било више од 70% масе ципрофлоксацина отпуштене током 10 h експеримента. Ово значи да би већина ципрофлоксацина била отпуштена у желуцу. Са друге стране, током прва 2 h отпуштања у симулираним ГИТ условима, исти хидрогел је отпустио само 30% од укупне масе оксапрозина отпушеног током тестирања. Највећи део инкорпорисаног лека је отпуштен када је хидрогел пребачен у симулиране услове дебелог црева ($pH=7,4$). Добијени резултати указују да су ПМК-П хидрогелови погодни за контролисано отпуштање оксапрозина у дебело црево.



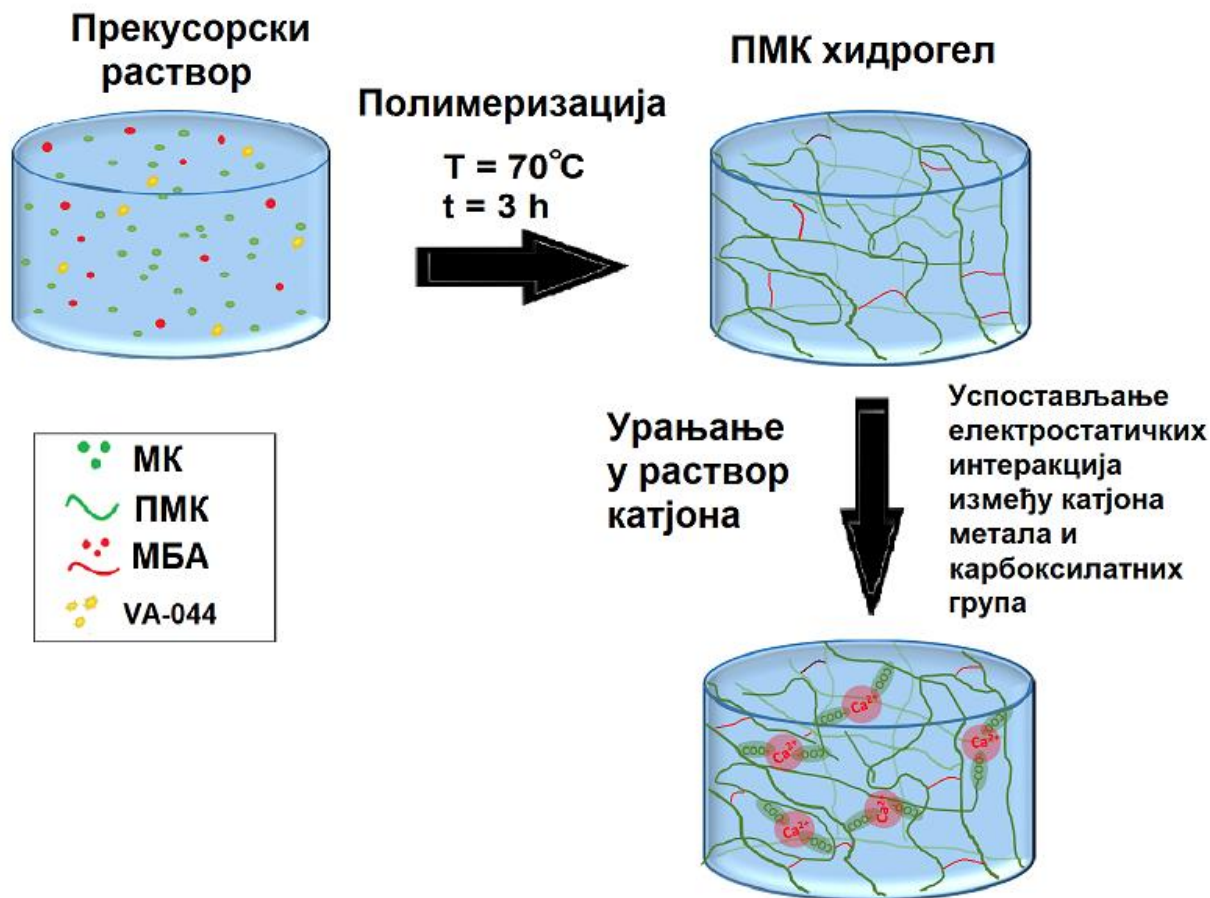
Слика 46. Структуре молекула ПМК, ципрофлоксацина (ЦИПРО) и оксапрозина (ОКСА), и њихова јонизациона стања.

4.3.2. ПМК хидрогелови умрежени јонима

У претходном одељку је показано да ковалентна умрежења могу значајно да унапреде механичка својства ПМК хидрогелова. Међутим, осим што хемијски умреживачи могу да буду токсични, умрежавање ковалентним везама смањује способност самообнављања структуре и отпорност на замор. Физичка умрежења попут јонских интеракција, водоничних веза или хидрофобних домена, доприносе повећању густине динамичких умрежења која се раскидају приликом напрезања и обнављају по престанку дејства напрезања [247]. На овај начин се значајно повећава жилавост хидрогелова, као и способност самообнављања структуре. Увођење јонских умрежења у структуру може драстично да побољша механичка својства хидрогелова што је документовано у литератури [247–249]. Поред тога, структура се може циљано умрежавати јонима који су од значаја за намењену примену. На пример, хидрогелови за инжењерство коштаног ткива се могу умрежавати Ca^{2+} , Mg^{2+} или Sr^{2+} јонима који се природно налазе у костима и за које се зна да стимулишу пролиферацију остеобласта и учествују у процесима регенерације кости [250]. Отпуштање таквих јона из структуре хидрогела имало би благотворан утицај на процесе обнављања коштаног ткива. Ипак, у литератури не постоји ниједно истраживање које се бави умрежавањем ПМК хидрогелова јонима, као ни испитивањем њиховог утицаја на својства хидрогелова. У литератури постоји један рад који се бави умрежавањем ПАК помоћу Fe^{3+} јона [19]. По аналогији са тим истраживањем, и такође знајући чињеницу да су ПМК хидрогелови заправо полиелектролити чије су функционалне групе у физиолошким условима негативно наелектрисане, у овом одељку испитали смо могућност умрежавања ПМК хидрогелова са физиолошки релевантним јона попут: Ca^{2+} , Sr^{2+} , Fe^{3+} , итд.

4.3.2.1. Структура хидрогелова

Као и у претходним случајевима, ПМК хидрогелови су синтетисани путем ТИПСР, при чему су у прекурсорски раствор додати МБА и NaOH. Тако добијени хидрогелови су након полимеризације уроњени у раствор вишевалентних катјона метала, при чему су се између негативно наелектрисаних карбоксилатних јона у структури хидрогелова и позитивно наелектрисаних јона метала, успоставиле електростатичке интеракције које су допринеле додатном умрежавању структуре. На овај начин добијени су двоструко умрежени ПМК хидрогелови (слика 47).

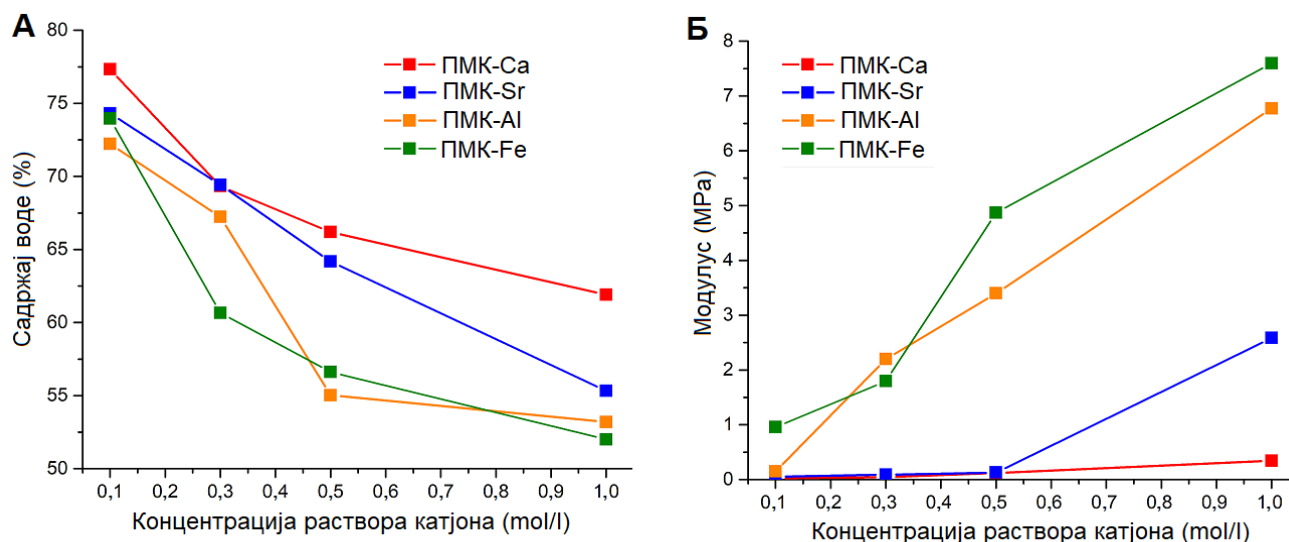


Слика 47. Шематски приказ процеса синтезе и формирања ПМК хидрогелова умрежених катјонима.

4.3.2.2. Садржај воде

На слици 48А је приказан утицај врсте и концентрације катјона на СВ у хидрогеловима. Апсорпциони капацитет хидрогелова у односу на молекуле воде опада са порастом концентрације раствора катјона, при чему такође опада у односу на врсту катјона према следећем редоследу $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Al}^{3+} > \text{Fe}^{3+}$. Смањење СВ са порастом концентрације раствора катјона указује на повећање степена умрежења структуре са повећањем садржаја катјона. Већи број катјона у раствору значи да ће више катјона дифундовати у структуру хидрогела и успоставити електростатичке интеракције са супротно наелектрисаним карбоксилатним јонима. Повећање наелектрисања јона такође повећава степен умрежења хидрогелова због јачег електростатичког

поља којим делује на већи број карбоксилатних јона. Такође, оно што се може приметити је да у случају истовалентног наелектрисања јони који имају већи радијус јаче умрежавају структуру, што је примећено и у случају алгинатних хидрогелова [251].



Слика 48. Зависност СВ (А) и притисног модула хидрогелова (Б) од врсте и концентрације катјона.

4.3.2.3. Механичка својства

Механичка својства ПМК хидрогелова процењена су тестирањем утицаја притисног механичког напрезања. На слици 48Б приказана је зависност притисног модула од врсте и концентрације катјона. Генерално, вредности притисног модула прате тренд садржаја воде у ПМК хидрогеловима. С повећањем концентрације, наелектрисања и радијуса катјона, долази и до повећања притисног модула хидрогелова. На пример, с повећањем концентрације катјона Ca^{2+} са 0,1 М на 1,0 М, притисни модул хидрогелова се повећава са 0,02 на 0,344 МПа, односно за 17 пута. Такође, с повећањем наелектрисања катјона (поређење узорака са Ca^{2+} и узорака са Fe^{3+}), при истим концентрацијама, притисни модул се повећава од 20 до 50 пута и достиже вредности од 4,87 МПа и 7,59 МПа за ПМК-Fe0,5 и ПМК-Fe1,0, редом, што је упоредиво са вредношћу модула зглобне хрскавице [251]. Повећање радијуса катјона при истом наелектрисању и концентрацији, такође доводи до повећања вредности модула.

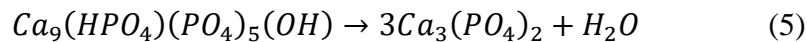
4.4. КОМПОЗИТНИ ХИДРОГЕЛОВИ НА БАЗИ ПМКЖ И КАЛЦИЈУМ-ФОСФАТА

У првом делу дисертације синтетисани су ПМКЖ хидрогелови и детаљно окарактерисани у погледу структуре, физичких и механичких својстава. Поред тога, испитана је и могућност потенцијалне примене хидрогелова у биомедицини. Показано је да се варирањем садржаја МК, желатина, умреживача и NaOH могу добити хидрогелови широког распона механичких својстава, СВ и порозности, при чему добијени материјали нису испољили цитотоксичност на неколико врста ћелијских култура. Све наведено сврстава добијене хидрогелове у кандидате за даља биолошка испитивања за примену у биомедицини, са нагласком на инжењерство хрскавице и

контролисано отпуштање лекова. Ипак, за примену у инжењерству коштаног ткива, осим значајно порозније структуре, потребно је да синтетисани ПМКЖ хидрогелови садрже и биоактивне керамичке честице. Стога су у овом делу докторске дисертације синтетисани композитни хидрогелови на бази ПМКЖ хидрогелова и честица калцијум-фосфатне керамике. Треба напоменути да су прелиминарна истраживања која нису приказана у овој дисертацији, показала да при ниској концентрацији NaOH, односно у условима густе ПМКЖ мреже, додаток честица калцијум-фосфатне керамике негативно утиче на механичка својства хидрогелова, што је највероватније последица смањеног степена конверзије са додатком пунилаца. С друге стране, када су хидрогелови знатно порознији, односно кад је СВ ≥ 80% и вода чини највећи део структуре чак и мали додаток керамичких честица високе чврстоће, значајно унапређује својства хидрогелова, што ће бити и показано у наставку дисертације.

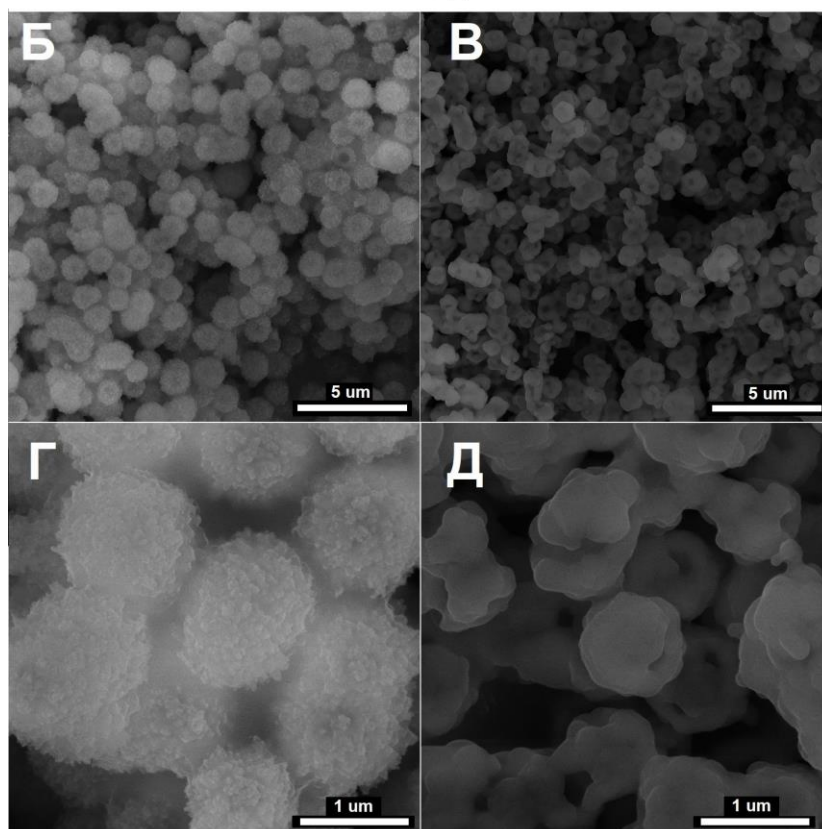
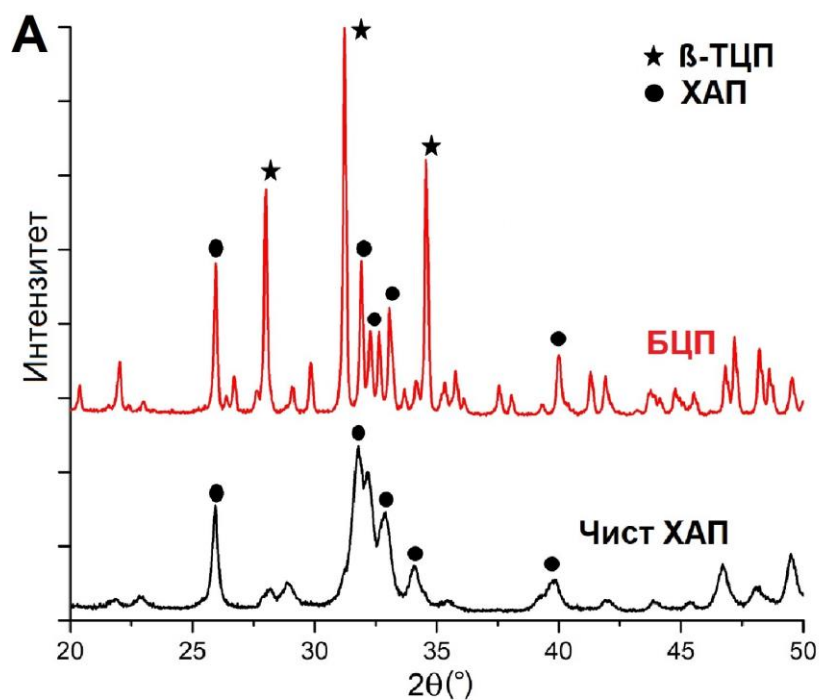
4.4.1. Карактеризација калцијум-фосфатних пунилаца

Нано-структурне честице ХАП, и магнезијумом-допиране честице БЦП коришћене су као биоактивни пуниоци за ПМКЖ хидрогелове. На слици 49 су приказани дифрактограми и СЕМ микрографије синтетисаних прахова. Дифрактограм чистог ХАП одликује се дифракционим максимумима карактеристичним искључиво за ХАП (према JCPDS 09-0432 стандарду), што говори да је ХАП једина присутна фаза. Са друге стране, БЦП осим ХАП садржи и дифракционе максимуме карактеристичне за β-ТЦП фазу, што је последица калцинације калцијумом дефицитарног ХАП-Mg на 1050° С (Слика 49А). Приликом калцинације калцијумом дефицитарног ХАП на температурама вишим од 800 °С, започиње процес трансформације ХАП у β-ТЦП фазу према следећој једначини:



Присуство Mg²⁺ јона у структури ХАП уместо јона Ca²⁺, почетак фазне трансформације ХАП у β-ТЦП помера према нижим температурама, што је последица веће нестабилности решетке и унутрашњих напрезања услед замене Ca²⁺ пречника 0,99 Å, значајно мањим Mg²⁺ јонима пречника 0,65 Å [252–254]. При синтези БЦП прахова у овој дисертацији, примењена је температура калцинације од 1050 °С која обезбеђује значајан удео β-ТЦП у БЦП, а не дозвољава прелазак β-ТЦП у α-ТЦП фазу, која се у случају недопираног калцијумом дефицитарног ХАП у неким случајевима јавља већ на око 1100 °С, а у случају магнезијумом допираног на 1300 °С [254, 255]. Добијени БЦП пунилац је коришћен као биоактивнија фаза у поређењу са ХАП, што је потврђено на композитним хидрогеловима на бази алгината, у раду Стојковске и сарадника [158].

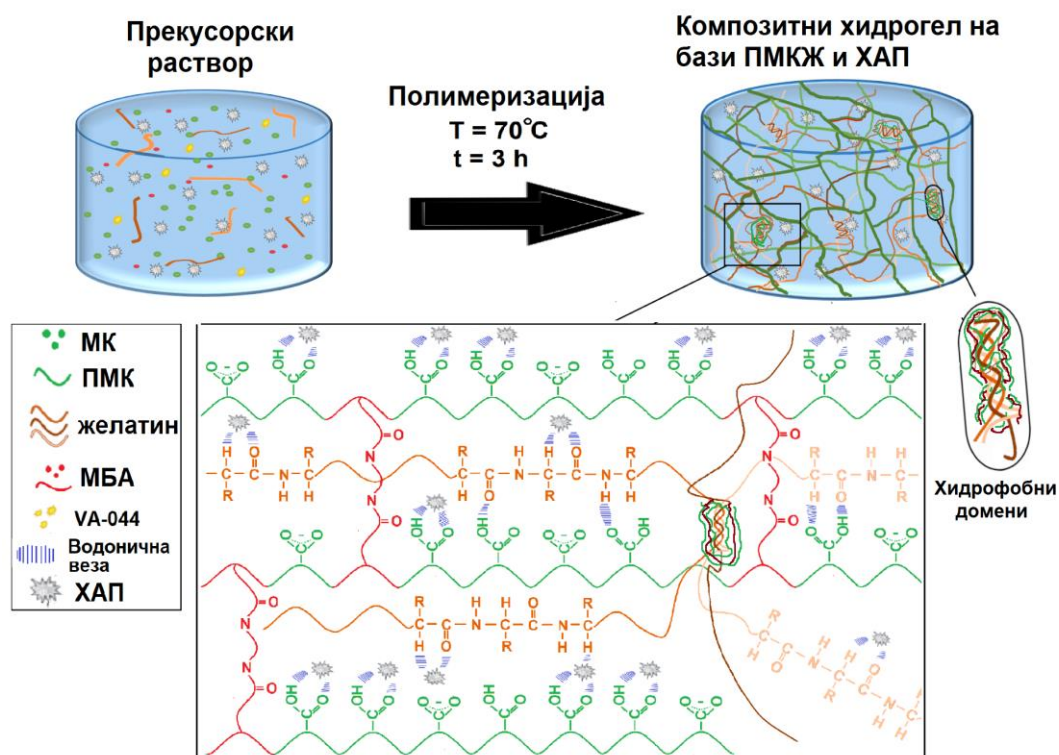
СЕМ микрографије добијених прахова приказују релативно сферну морфологију са јасним разликама услед различитих поступака добијања. Честице ХАП састоје се од сферичних агломерата величине око 1 μm, који се састоје од иглица величина 50-100 nm (Слике 49Б и Г). За разлику од ХАП, честице БЦП су у виду сфера величина 1 μm са глатком зрнастом површином, као последицом процеса синтеровања (Слике 49В и Д).



Слика 49. Упоредни приказ дифрактограма синтетисаних калцијум-фосфатних пунилаца (А). СЕМ микрографије калцијум-фосфатних пунилаца под различитим увећањима: ХАП – 10000 пута увећање (Б), БЦП – 10000 пута увећање (В), ХАП – 50000 пута увећање (Г) и БЦП – 50000 пута увећање (Д).

4.4.2. Структура композитних хидрогелова

Шематски приказ синтезе и структуре ПМКЖ/ХАП хидрогелова приказан је на слици 50. Као и у случају ПМКЖ хидрогелова, у току ТИПСР долази до раста молекулских ланаца ПМК, при чему молекули желатина остају заробљени унутар тродимензионалне структуре хидрогелова. И у овом случају NaOH је додат у прекурсорски раствор да би се добила изразито порозна структура, при чему је NaOH/МК однос износио 0,08 g/ml у односу на 0,2 g/ml код ПМКЖ-На хидрогелова, односно 4 пута више. Због тога је ИПН мрежа била значајно порознија, односно стварање хидрофобних домена је било ограничено у односу на ПМКЖ хидрогелове. Према томе, очекивано је било да калцијум-фосфатни пуниоци имају пресудни утицај на структурна и механичка својства, утичући на параметре мреже кроз физичке интеракције којима интерагују са полимерном матрицом. Резултујућа структура композита састојала се из високо порозне, ковалентно и физички умрежене ИПМ желатина и ПМК, и честица калцијум-фосфатне керамике. Оваква структура имала је за циљ да опонаша структуру ванћелијског матрикса природног коштаног ткива.

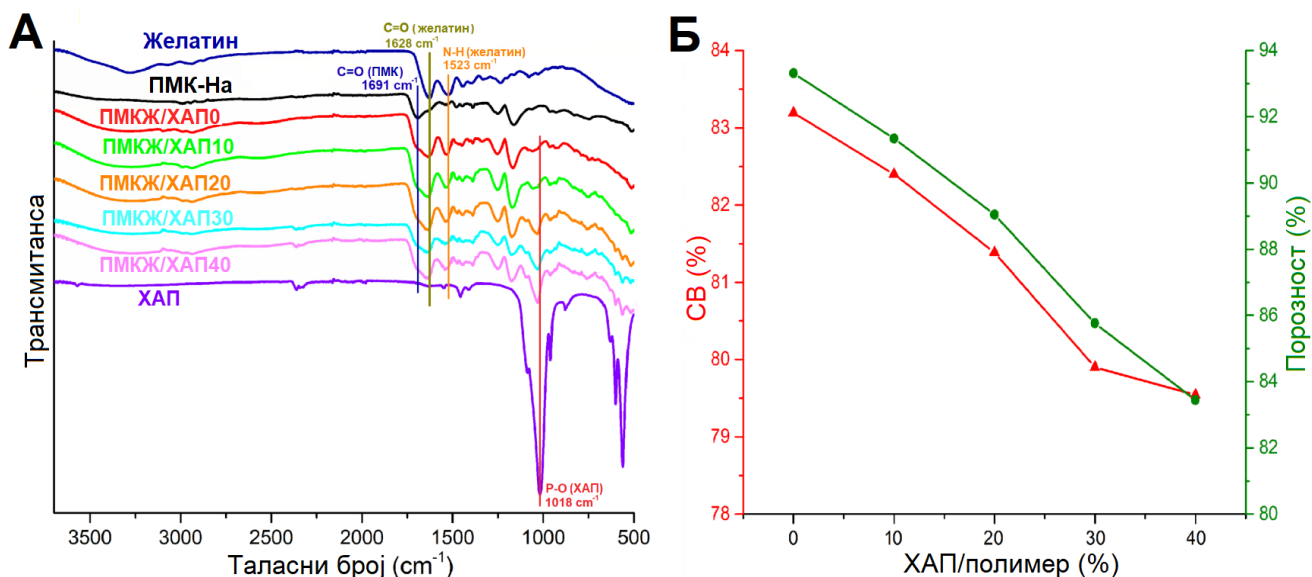


Слика 50. Процес синтезе и претпостављена структура ПМКЖ хидрогелова.

4.4.3. Хемијска структура хидрогелова

На слици 51А приказани су ФТИР спектри желатина, чистог ПМК хидрогела, синтетисаних композитних хидрогелова и ХАП. Спектар чистог ПМКЖ хидрогела (без додатка ХАП) одликовао се карактеристичним апсорпционим тракама које су већ дискутоване у делу 4.2.1.4., а одговарају вибрацијама карбоксилне групе ПМК и амидне групе желатина, и указују на успостављање водоничних веза између њих. Са додатком ХАП, појављује се нова апсорпциона

трака на 1030 cm^{-1} , која одговара P–O вибрацијама фосфатне групе. Интензитет ове траке расте са повећањем садржаја ХАП у композитним хидрогеловима. Исти пик се, међутим, јавља на 1018 cm^{-1} у апсорпционом спектру чистог ХАП, што указује на значајна спектрална померања и интеракције између честица ХАП и полимерне матрице. Уочена спектрална померања су највероватније последица успостављања водоничних веза између честица ХАП и матрице [256], као и електростатичких интеракција између Ca^{2+} хидроксиапатита и COO^- поли(метаакрилне киселине) [152].

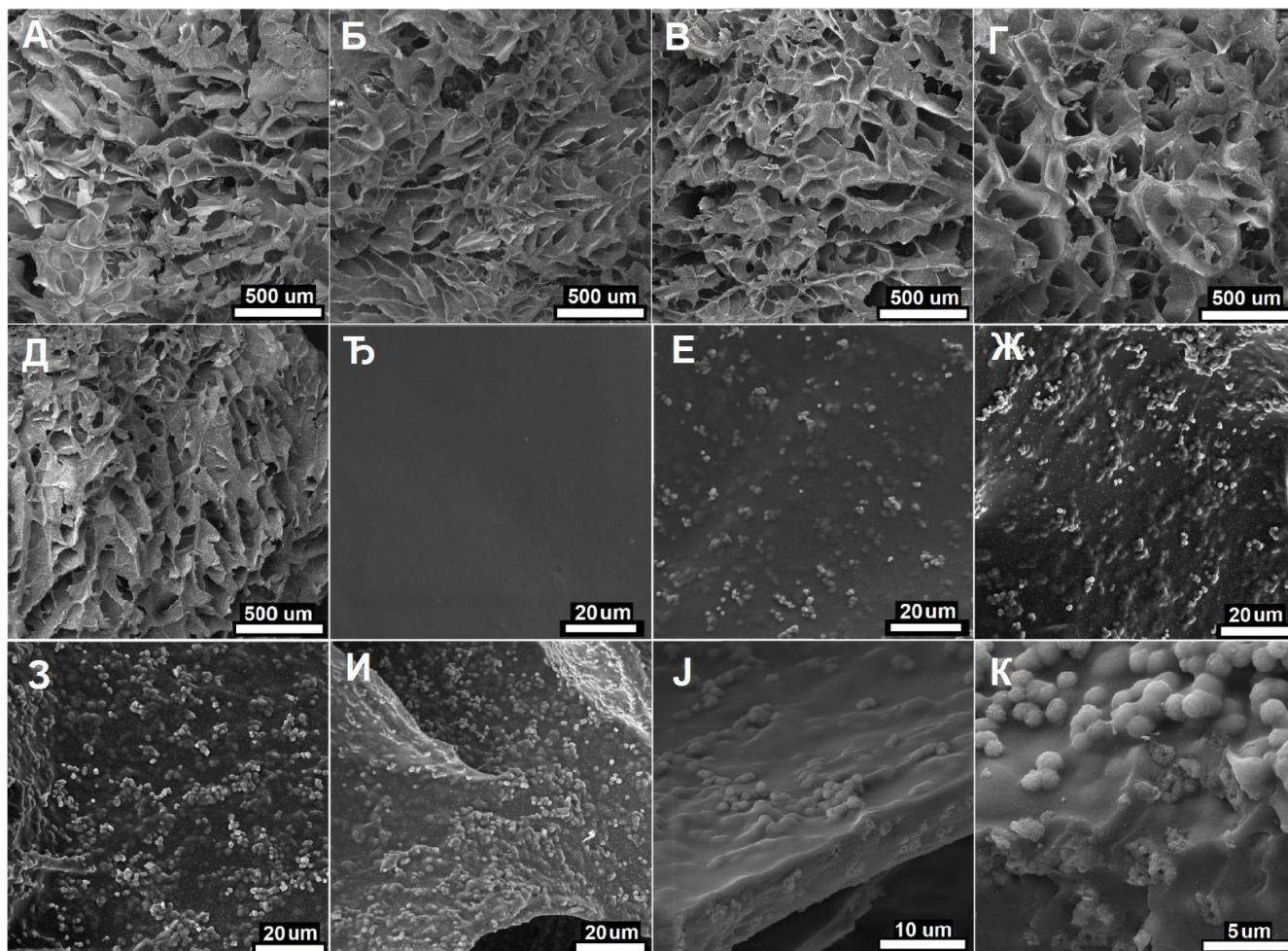


Слика 51. ФТИР спектри желатина, чистог ПМК хидрогела, композитних хидрогелова и ХАП (А). Утицај ХАП на СВ и порозност композитних хидрогелова (Б).

4.4.4. Садржај воде, порозност и микроструктура

СВ композитних хидрогелова након бубрења у СТТ на $37\text{ }^\circ\text{C}$ био је у опсегу од 79 до 84% (слика 51Б) што је упоредиво са вредностима СВ биолошких ткива [257, 258]. Повећање садржаја ХАП довело је до смањења СВ, што у комбинацији са анализом ФТИР спектра потврђује да су честице ХАП деловале као умреживач. Прорачуната теоријска порозност хидрогелова је била релативно висока, што је потврђено и СЕМ микрографијама попречног пресека ксерогелова. Микрографије су откриле високо порозну структуру са међусобно повезаним порама величина између $100\text{--}400\text{ }\mu\text{m}$. Није примећена значајна разлика у микроструктури и макропорозности са повећањем садржаја ХАП, али је дошло до благог смањења теоријске порозности. Ова запажања указују да ХАП није имао значајан утицај на процес полимеризације, односно да друге компоненте као што су МК, желатин, МБА, NaOH и иницијатор имају одлучујући утицај на структуру мреже и макропорозност хидрогелова. Са друге стране, честице ХАП су биле уједначено расподељене унутар полимерне матрице, што се уочава на СЕМ микрографијама (слике 52А-К). Површина ПМКЖ/ХАП0 била је глатка (слика 52Ђ), док је са повећањем садржаја ХАП уочено постепено повећање броја честица уметнутих у матрицу хидрогела (слике 52Е-И). Поред тога, не само да су честице биле ефикасно уграђене у структуру хидрогела, односно јасно обложене слојем полимера, већ је добар део честица био изложен на површини полимерне матрице (слике 52Ј и К). Изложене честице ХАП би могле да допринесу бољем биолошком одговору материјала кроз хемијске сигнале које саопштавају ћелијама са којима интерагују, и кроз

повећану храпавост површине [259]. С друге стране, уметнуте честице могу значајно да утичу на побољшање механичких својстава.

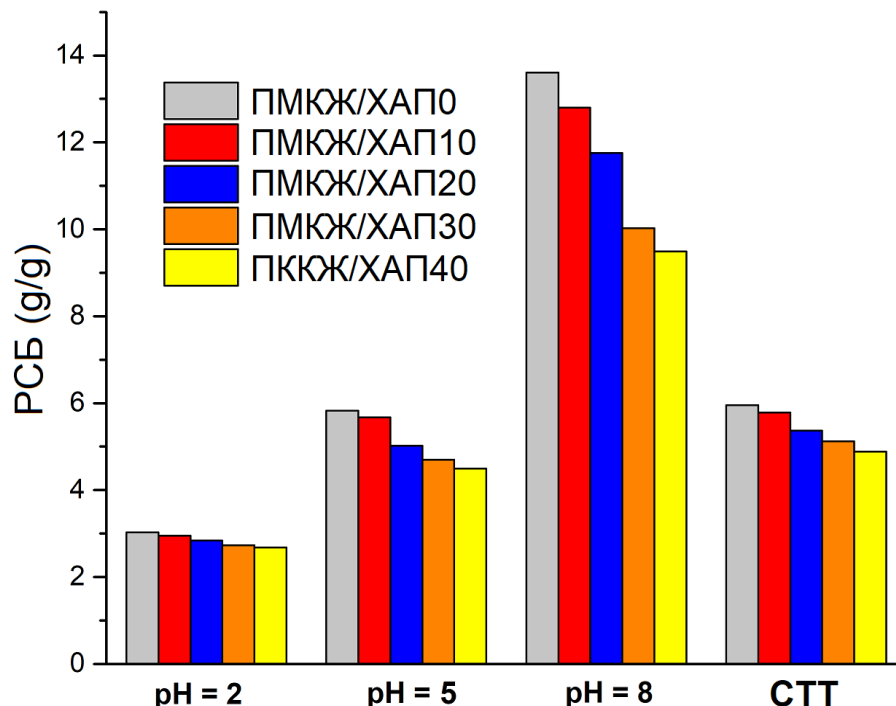


Слика 52. Микрографије попречног пресека лиофилизованих композитних хидрогелова: ПМКЖ/ХАП0 (А и Ђ), ПМКЖ/ХАП10 (Б и Е), ПМКЖ/ХАП20 (В и Ж), ПМКЖ/ХАП30 (Г и З) и ПМКЖ/ХАП40 (Д и И). Честице ХАП уметнуте у полимерну матрицу ПМКЖ/ХАП20 (Ј) и ПМКЖ/ХАП40 (К) хидрогела.

4.4.5. Бубрење

Бубрење рН осетљивих хидрогелова је веома важна карактеристика за примену у контролисаном отпуштању лекова с обзиром да може значајно да утиче на кинетику отпуштања биоактивних молекула [260]. С обзиром да је у претходном одељку већ испитиван утицај садржаја различитих компоненти на бубрење и рН осетљивост ПМКЖ хидрогелова, у овом делу дисертације фокус је стављен на утицај ХАП. Експеримент је изведен у физиолошки релевантном опсегу рН вредности од 2 до 8, на 37 °С. РСБ композитних хидрогелова, као функција рН вредности и садржаја ХАП, приказан је на слици 53. При рН 2, што је мање од вредности константе дисоцијације МК, РСБ је био низак за све хидрогелове с обзиром да је већина карбоксилних група била у протонаном облику. Како је рН вредност раствора порасла изнад вредности рКа, карбоксилне групе су постале јонизоване што је проузроковало повећање РСБ. Ефекат је био слабији са повећањем садржаја ХАП с обзиром да честице ХАП делују као умреживач на структуру хидрогелова. С друге стране, бубрење у СТТ било је значајно слабије него у пуфери

чија је рН 8, иако је рН вредност СТТ била 7,4. Велика јонска густина околног раствора СТТ, снизила је осмотски притисак унутар композитних хидрогелова, што је узроковало ниже вредности РСБ [261].

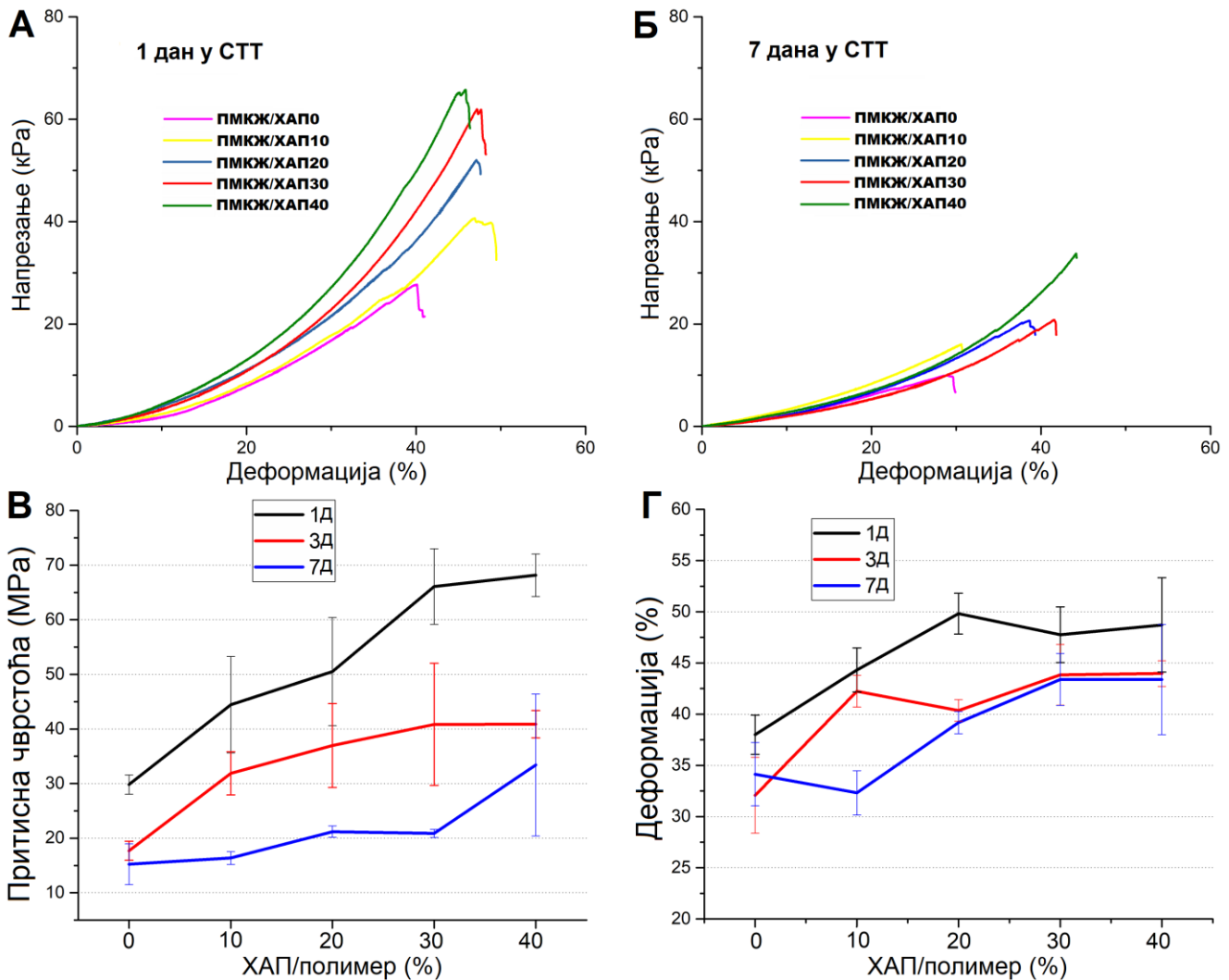


Слика 53. Утицај рН вредности раствора на РСБ композитних хидрогелова са различитим садржајем ХАП.

4.4.6. Механичка својства

Испитивања притисних механичких својстава композитних хидрогелова изведени су након 1, 3 и 7 дана инкубације материјала у СТТ на 37 °С, чиме су имитирани физиолошки услови. Карактеристичне криве напон-деформација након 1 и 7 дана у СТТ, као и трендови притисне чврстоће и максималне деформације приказани су на сликама 54А, Б, В и Г, редом. Притисна чврстоћа се драстично повећала са повећањем односа ХАП/полимер од 0 до 40%, док су вредности максималне деформације такође показале растући тренд. На пример, σ_c ПМКЖ/ХАП40 је била 2 пута већа од вредности ПМКЖ/ХАП0. Ово указује да су честице ХАП имале кључну улогу у ојачавању хидрогелова. Ли и сарадници су објавили сличне резултате за ХАП/полакриламид композитне хидрогелове, приписујући побољшање механике мањем СВ услед појачаног ефекта умрежења честицама ХАП [152]. У композитним хидрогеловима синтетисаним у овој дисертацији, додаток ХАП није значајно утицао на СВ да би проузроковао тако оштар скок у вредностима притисне чврстоће, што говори да смањење СВ није било главни разлог бољих механичких својстава. Претпоставка је да су честице ХАП деловале као баријера за раст пукотине приликом лома, изискујући више енергије за раст пукотине приликом наилаaska на тврду честицу пуниоца [262]. Поред тога, честице ХАП су биле уједначено распоређене у матрици што је један од основних предуслова за добра механичка својства композита. Након 3 и 7 дана у СТТ, механичка својства су значајно погоршана због разлагања желатина. Као што је већ објашњено код ПМКЖ хидрогелова, висок садржај желатина омогућава разградивост ових материјала и овај процес је бржи што је температура раствора виша. Разградња хидрогелова би

могао да буде пожељан процес за потенцијалну примену у инжењерству коштаног ткива, с обзиром да је основна улога желатина у овом систему да обезбеди почетну механичку потпору и сигнализира ћелијама да се адхезују и пролиферирају. Током следећег корака репарације коштаног ткива, инфилтриране ћелије би започеле процес лучења природног ванћелијског матрикса, који би постепено преузимао улогу механичке потпоре. Структурни посредник између разградње желатина и стварања новог ткива била би биокомпатибилна, биоактивна ПМК/ХАП матрица. Као што се види са слика 54В и Г, са повећањем садржаја ХАП побољшавају се механичка својства након 3 и 7 дана у ССТ, што указује да је контролом садржаја ХАП могуће утицати на кинетику разградње композитних хидрогелова.



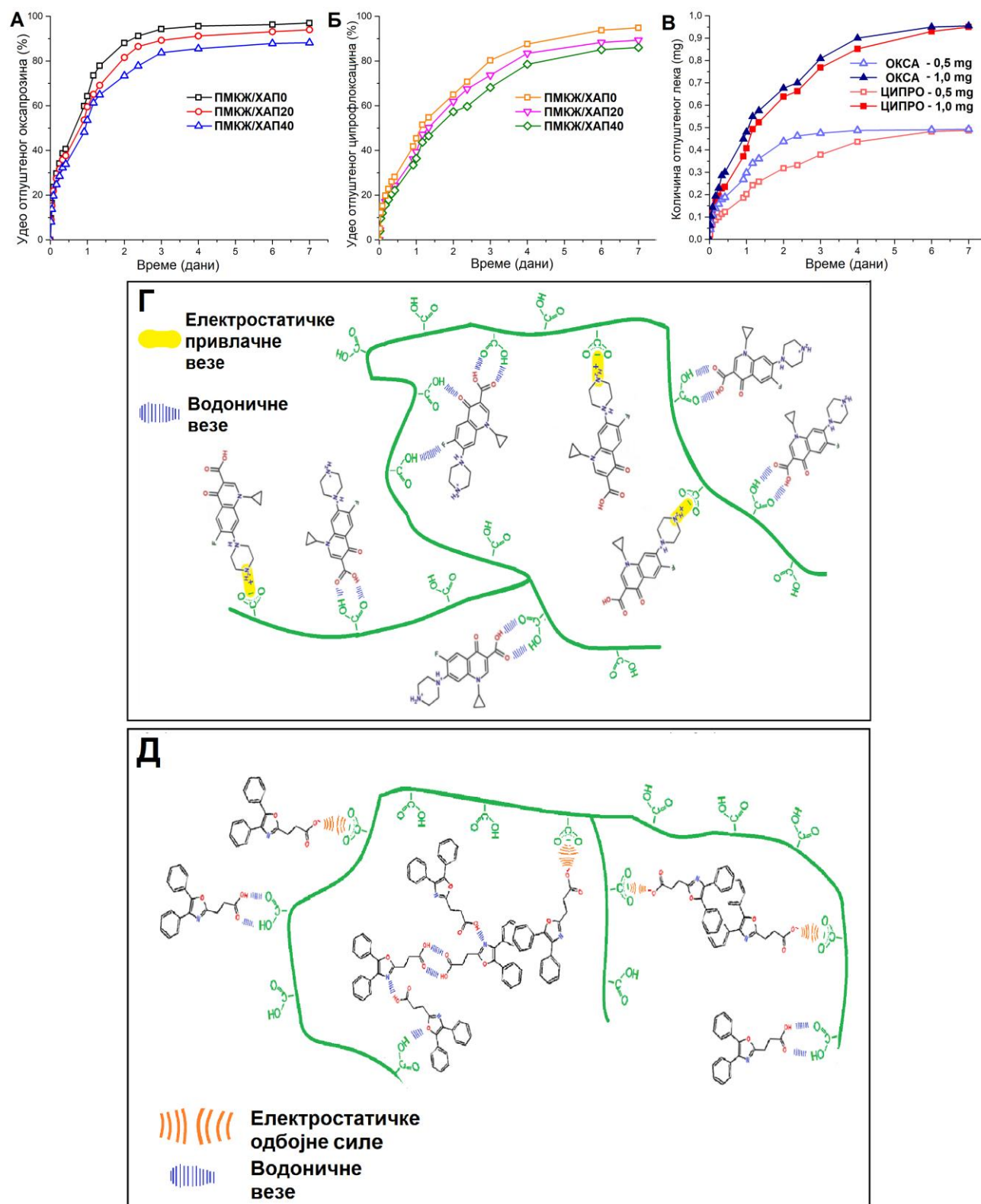
Слика 54. Криве напон-деформација за композитне хидрогелове након 1 дана у ССТ (А) и након 7 дана у ССТ (Б). Утицај садржаја ХАП на притисну чврстоћу (В) и деформацију при лому (Г), композитних хидрогелова.

4.4.7. Отпуштање лекова

Због својих јединствених својстава, макропорозни композити на бази хидрогелова су атрактивни материјали за локално и контролисано отпуштање лекова. С обзиром на честе проблеме са инфекцијом, током и након хируршких третмана, контролисано ослобађање лека на

месту имплантације једна је од главних предности композитних макропорозних хидрогелова у поређењу са другим материјалима за инжењерство коштаног ткива.

Ради испитивања могућности отпуштања лекова из композитних хидрогелова, два структурно различита лека – ципрофлоксацин и оксапрозин, инкорпорирана су у хидрогелове током синтезе и отпуштана у СТТ на 37 °С. Слика 55 приказује криве отпуштања лекова током 7 дана. Као што се може уочити са слике 55А, криве отпуштања оксапрозина одликују се наглим отпуштањем током првих 24 h. ПМКЖ/ХАП0 је имао највећу стопу отпуштања, с обзиром да је отпустио више од 90% инкорпорираног лека током 7 дана трајања експеримента. С повећањем садржаја ХАП, степен отпуштања оксапрозина се смањило због нижег РСБ, који је последица већег степена умрежења (слика 55А). С друге стране, ефекат наглог отпуштања био је мање изражен код ципрофлоксацина (слика 55Б), највероватније због јачих електростатичких интеракција ципрофлоксацина са матрицом композита, у којој је карбоксилна киселина најдоминантнија функционална група. У случају дуго већих количина инкорпорираног лека отпуштање је било значајно брже у случају оба лека (слика 55В). Поређење структура и вредности константи дисоцијације МК, ципрофлоксацина и оксапрозина, даје јаснији увид у електростатичке интеракције које се могу јавити између ових једињења. С обзиром да је измерена рН вредност прекурсорског раствора била $\approx 4,1$, док су рКа вредности МК и оксапрозина 4,65 и 4,3, функционалне групе МК су биле делимично јонизоване, што је дало гелове са значајним уделом негативно наелектрисаног карбоксилатног анјона (што је и потврђено ФТИР анализом). У исто време, оксапрозин је био у молекулском облику али са одређеним уделом јонског облика, с обзиром да је рН вредност била благо повишена у односу на процењену рКа оксапрозина. С друге стране, ципрофлоксацин који има цвитерјонску структуру и може бити различито наелектрисан у зависности од рН вредности средине, био је позитивно наелектрисан зато што су аминок групе пиперазина биле протонване при $\text{pH} < 5,05$ [263]. Према томе, позитивно наелектрисани молекули ципрофлоксацина су могли да успоставе електростатичке интеракције са негативно наелектрисаним анјонима МК (Слика 55Г). С друге стране, јасно је да су молекули МК и оксапрозина били већински у анјонском облику, што је изазвало међусобна одбијања између молекула (Слика 55Д). Након реакције полимеризације, молекули ципрофлоксацина су били јаче везани за ПМК матрицу. Током *in vitro* тестова у СТТ, слабо везани оксапрозин будући растворљив у слабо-базним условима (рН СТТ је 7,4) могао је релативно лако да дифундује из структуре, док је ципрофлоксацин, који је јаче везан за матрицу, споро напуштао структуру хидрогела, што се може видети по мањој количини отпуштеног ципрофлоксацина у односу на оксапрозин.



Слика 55. Криве *in vitro* отпуштања: 0,5 mg оксапрозина (А) и 0,5 mg ципрофлоксацина (Б), ПМКЖ/ХАП композитних хидрогелова. Криве *in vitro* отпуштања ПМКЖ/ХАП40 са различитим садржајима оксапрозина и ципрофлоксацина (В). Упростиена шема предложених интеракција хидрогелова: са ципрофлоксацином (Г) и оксапрозином (Д).

4.4.8. Анализа кинетике отпуштања

Познати математички модели су примењени за анализу кинетике отпуштања лекова из композитних хидрогелова укључујући: Корсмејер-Пепасов (К-П_{100%}) модел, Хигучијев и модел првог реда, и кинетички параметри су дати у табели. Највећи коефицијент корелације указује на модел који најбоље описује дату кинетику отпуштања. У случају отпуштања ципрофлоксацина из композитних хидрогелова, добијене су релативно високе вредности коефицијената корелације за све примењене моделе ($R^2 > 0,964$). С друге стране, у случају оксапрозина, К-П_{100%} модел је имао значајно већу вредност коефицијента корелације у поређењу са Хигучијевим и моделом првог реда. Вредности k параметра, који представља нагиб криве отпуштања, односно брзину отпуштања лека, опадале су са порастом садржаја ХАП код свих примењених модела, и у случају оба испитивана лека. Ово указује да са повећањем садржаја ХАП у композитним хидрогеловима долази до смањења брзине отпуштања лекова, независно од њихове хемијске структуре. Да би се стекао увид у механизам отпуштања лекова, Корсмејер-Пепасов модел је такође израчунат за $\alpha \approx 60\%$ при чему су израчунате вредности дифузионог експонента. У случају оксапрозина, вредности дифузионог коефицијента су биле у опсегу од 0,448-0,455, док су у случају ципрофлоксацина биле у опсегу од 0,500–0,519. Према К-П_{60%} моделу, дифузија је била основни механизам отпуштања оксапрозина ($n < 0,5$), док је у случају отпуштања ципрофлоксацина, поред дифузије, на кинетику отпуштања утицала и релаксација полимерних ланаца ($n > 0,5$). Ово указује да су физичко-хемијска својства лека имала значајан утицај на механизам отпуштања. Слично понашање је запажено и код поли(*N*-изопропилакриламид-*co*-кротонска киселина) хидрогелова приликом отпуштања ибупрофена и лидокаин хидрохлорида [50].

Табела 7. Кинетички параметри и коефицијенти корелације кривих отпуштања за различите математичке моделе.

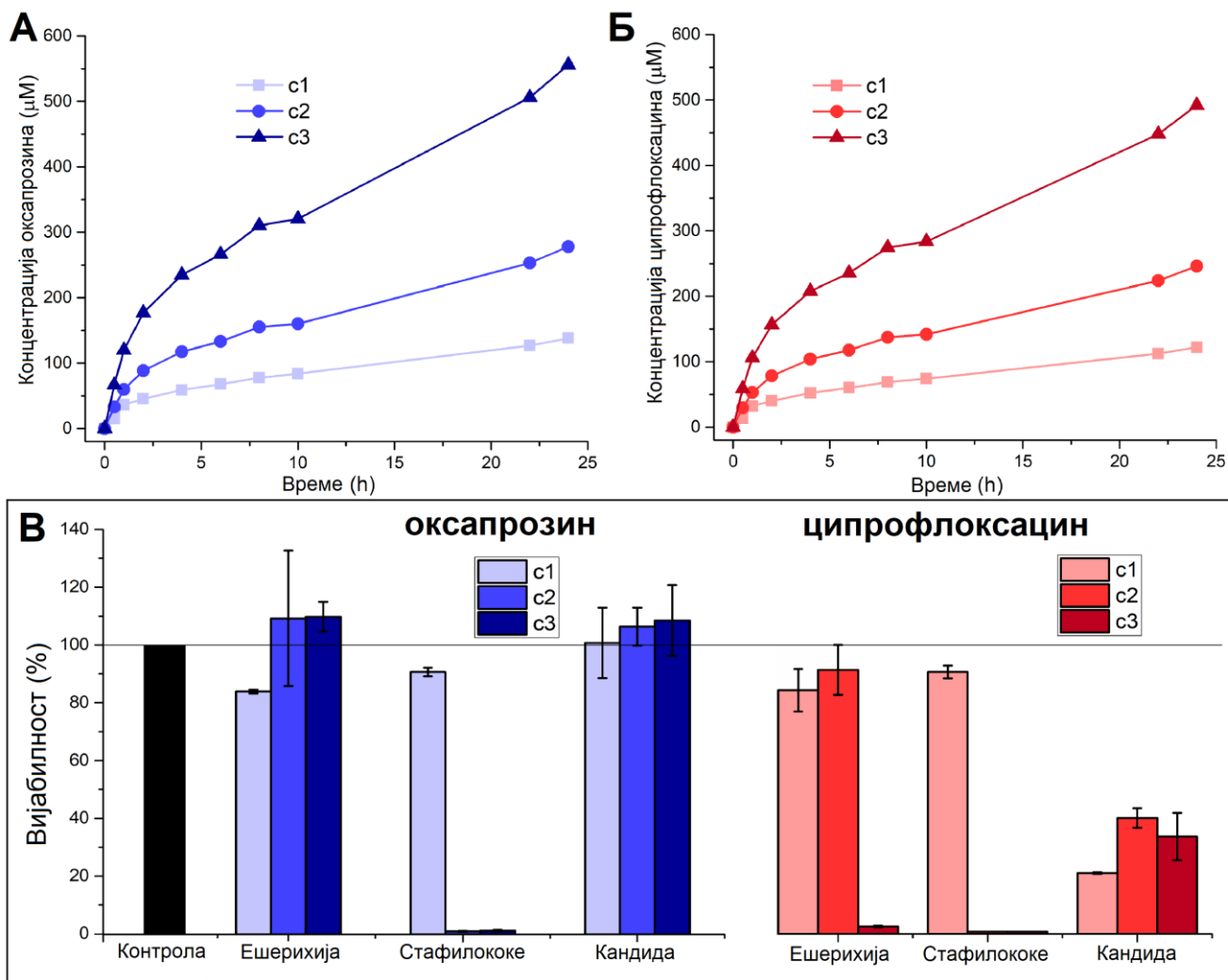
Узорак	К – П _{100%}			Хигучи		Модел првог реда		К – П _{60%}		
	k	R^2	n	k	R^2	k	R^2	k	R^2	n
ПМКЖ/ХАП0 - окса	0,589	0,960	0,399	0,395	0,862	0,543	0,866	0,640	0,976	0,451
ПМКЖ/ХАП20 - окса	0,548	0,969	0,404	0,382	0,892	0,387	0,873	0,587	0,980	0,448
ПМКЖ/ХАП40 - окса	0,502	0,972	0,412	0,360	0,904	0,326	0,853	0,539	0,983	0,455
ПМКЖ/ХАП0 - ципро	0,446	0,977	0,476	0,389	0,970	0,435	0,988	0,464	0,968	0,500
ПМКЖ/ХАП20 - ципро	0,403	0,978	0,496	0,372	0,970	0,338	0,964	0,415	0,968	0,514
ПМКЖ/ХАП40 - ципро	0,373	0,980	0,504	0,355	0,980	0,295	0,970	0,382	0,973	0,519

4.4.9. Антимикробна активност

Композитни хидрогелови са инкапсулираним леком подвргнути су *in vitro* испитивањима антимикробне активности. Познато је да се ципрофлоксацин додаје у хидрогелове ради унапређивања антимикробне активности [264, 265]. Међутим, најчешће коришћене методе

испитивања антимикробних својстава, попут мерења зоне инхибиције, не имитирају реалне физиолошке услове примене. Због тога је антимикробна активност испитана директним дејством хидрогелова у раствор СТТ у ком су били инкубирани микроби. Овај начин омогућава испитивање утицаја временски зависне концентрације лека на вијабилност микроорганизама. Криве зависности промене концентрације оксапрозина и ципрофлоксацина од времена, приказане су на сликама 56А и Б, док је антимикробна активност хидрогелова приказана на слици 56В. Отпуштање оксапрозина није показало антимикробни ефекат на *C. Albicans* (кандида) и *E. Coli* (ешерихија) ни при једној од испитиваних концентрација. Са друге стране, оксапрозин је био ефикасан против *S. Aureus* (стафилококе) при вишим концентрацијама лека, док је при најнижој концентрацији имао благо антимикробно дејство. Прелиминарна истраживања антибактеријског утицаја оксапрозина на стафилококе показало је потпуну инхибицију раста бактерија, чак и при минималној испитиваној концентрацији од 85 μM . Током експеримента отпуштања са најнижом концентрацијом (с1), потребна бактерицидна концентрација лека од 85 μM постигнута је тек после 10 h, док је почетна доза током првих 30 min била 15 μM . Ова концентрација није била довољна да убије све микробе, али је повећање концентрације лека ефикасно уништило све бактерије. Антибактеријски ефекат оксапрозина није изненађење с обзиром да су различити нестероидни антиинфламаторни лекови попут ибупрофена, ацетилсалицилне киселине и ацетаминофена показали антибактеријска својства под различитим условима [266, 267]. Ипак, ово је први пут да је документован антибактеријски ефекат оксапрозина. У светлу растуће преваленције мултирезистентних бактерија и ограничене ефикасности тренутно доступних антибиотика, пренамена лекова који су већ одобрени за друге болести може бити од великог значаја у третману различитих патолошких стања. Поред тога, овакав приступ омогућава третман неколико проблема са мањим бројем лекова, што може смањити трошкове лечења и нежељена дејства традиционално примењиваних лекова.

Хидрогелови са ципрофлоксацином су показали антибактеријски ефекат против ешерихије само при највећој испитиваној концентрацији, док ниже концентрације нису утицале на раст бактеријске културе. Што се тиче стафилокока, само најнижа испитивана концентрација није показала бактерицидно дејство, док су више концентрације ефикасно уништиле бактеријску културу. Ово указује на већу отпорност ешерихије на ципрофлоксацин у поређењу са стафилококама. Штавише, хидрогелови са ципрофлоксацином су показали и антигљивично дејство с обзиром да су редуковали културу кандиде на 22-38% у односу на контролну групу. Овај резултат је занимљив с обзиром да је у супротности са неким другим радовима објављеним на тему антигљивичног дејства ципрофлоксацина, где није примећен такав ефекат [268, 269].

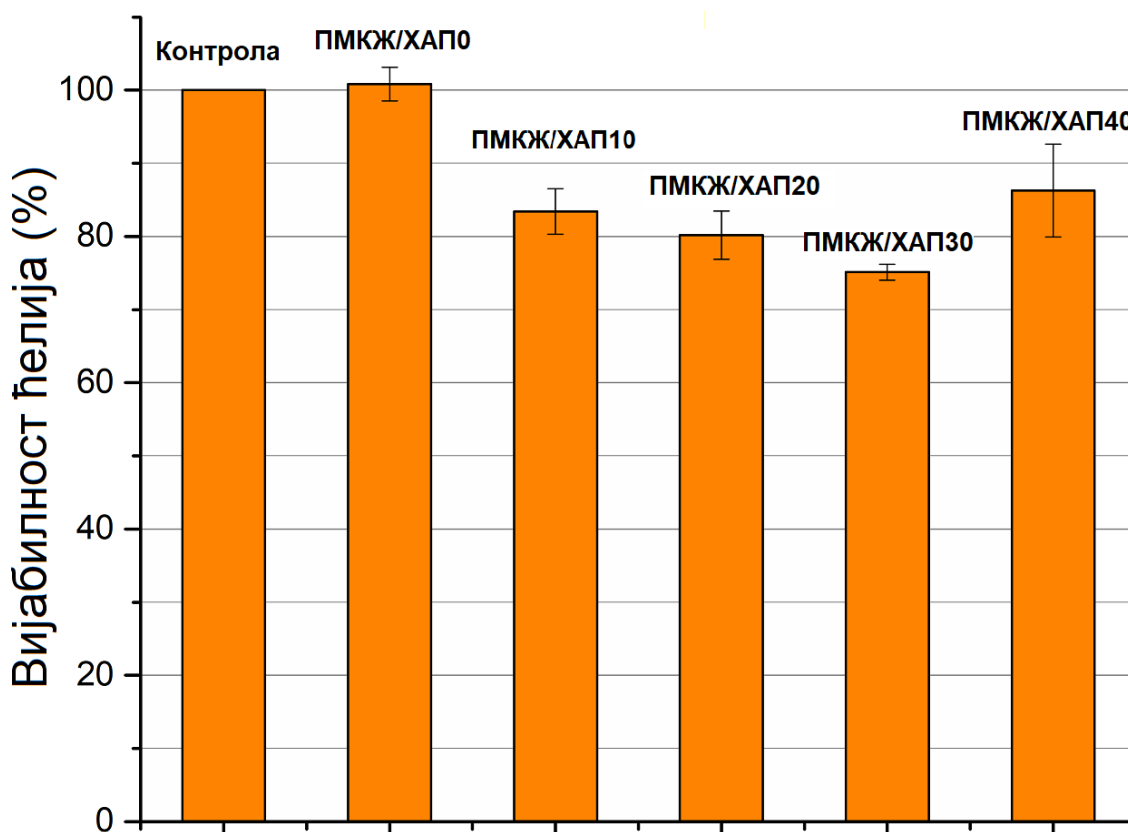


Слика 56. Зависност концентрације лека у раствору од времена отпуштања лека за ПМКЖ/ХАП40 током отпуштања оксапрозина (А) и ципрофлоксацина (Б). Антимикробна активност ПМКЖ/ХАП40 хидрогела са инкапсулираним леком након 24 h отпуштања у култури ешерихије, стафилокока и кандиде (В). Концентрације c1, c2 и c3 одговарају концентрацијама лека са кривих отпуштања након 24 h.

4.4.10. Биокомпатибилност

Ради испитивања потенцијалне цитотоксичности хидрогелова, пролиферација мишијих фибробласта је праћена након 24 h култивације у припремљеним супернатантима хидрогелова. Утицај хидрогелова на вијабилност ћелија приказан је на слици 57. Највећа вијабилност забележена је у случају ПМКЖ/ХАП0 узорка, и постепено се смањивала са повећањем садржаја ХАП, осим у случају ПМКЖ/ХАП40. Потенцијални узрок смањења вијабилности са повећањем садржаја ХАП могао би да буде смањен степен полимеризације услед повећања вискозности реакционе смеше и ометања процеса полимеризације. У том случају би део мономера остао у непрореаговалом стању и могао би да испољи цитотоксичност у контакту са ћелијама. Ипак, с обзиром да материјали који при МТТ тестовима показују вијабилност ћелија већу од 70%, према ИСО 10993–5 стандарду се не сматрају цитотоксичним, може се закључити да су испитивани композитни хидрогелови биокомпатибилни, што их препоручује за даља биолошка и

биомедицинска испитивања. Такође, треба нагласити да су сви хидрогелови испитивани без претходног испирања у води након синтезе, а потенцијално заостали мономер ако је и био присутан, био је у концентрацијама које нису угрозиле биокомпатибилност синтетисаних хидрогелова. Ово је веома важно са аспекта безбедности приликом примене у отпуштању лекова, с обзиром да лекови могу бити инкорпорисани у хидрогел приликом синтезе хидрогелова и као такви се могу директно користити, без накнадног испирања које може резултовати губитком активне супстанце и ефикасности отпуштања.



Слика 57. Утицај садржаја ХАП на биокомпатибилност композитних хидрогелова.

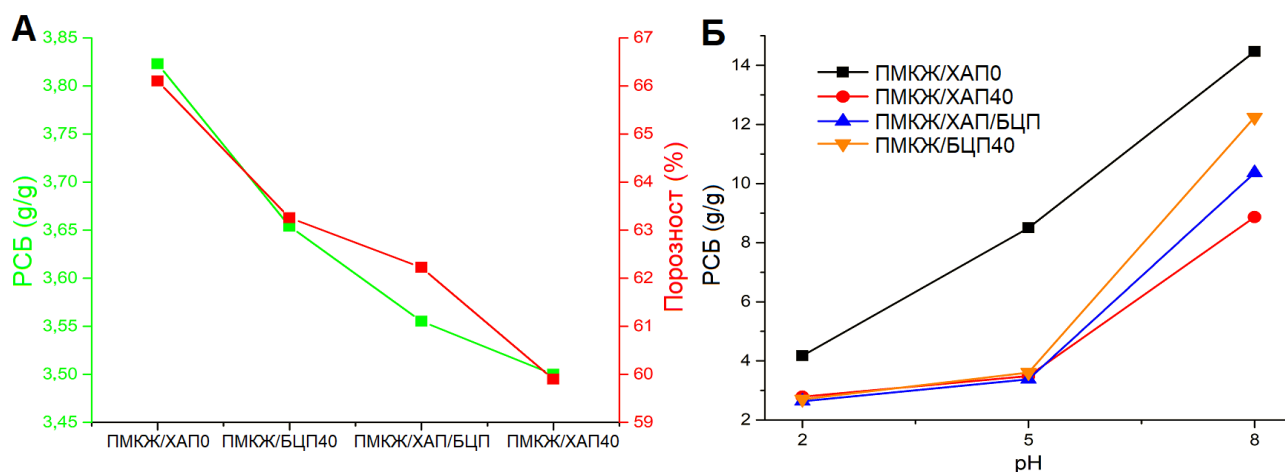
4.4.11. Утицај врсте калцијум-фосфатних пунилаца на својства композитних хидрогелова

У претходном одељку синтетисани су и испитивани ПМКЖ/ХАП композитни хидрогелови и проучен је утицај ХАП на њихова својства. Иако су експерименти показали да повећање садржаја ХАП значајно побољшава механичка својства ПМКЖ хидрогелова, ХАП је релативно инертан у односу на остале биоактивне материјале из групе калцијум-фосфатне керамике, због чега се често комбинује са знатно растворљивијим и биоактивнијим једињењима попут β -ТЦП. Комбиновањем ХАП и β -ТЦП добија се БЦП фаза која се одликује својствима оба једињења и има оптимална механичка и биоактивна својства. У овом одељку испитан је утицај замене ХАП БЦП фазом на својства ПМКЖ хидрогелова.

4.4.11.1. Бубрење

Испитивање утицаја пуниоца на апсорпциони капацитет композитних хидрогелова изведен је праћењем бубрења у СТТ на 37 °С. На слици 58А је приказана зависност РСБ и порозности композитних хидрогелова од врсте калцијум-фосфатних пунилаца. У односу на чист ПМКЖ хидрогел, додаток калцијум-фосфатних пунилаца значајно смањује порозност и РСБ, при чему је смањење мање када у структури доминира БЦП. Добијени резултати указују да честице ХАП у већој мери умрежавају структуру хидрогела у односу на честице БЦП, што је највероватније последица веће специфичне површине честица ХАП. Приликом синтеровања долази до смањења специфичне површине честица, што је лако уочљиво и на микрографијама добијеним помоћу СЕМ (Слике 49Г и Д), а манифестовано кроз смањење храпавости површине. Услед смањења специфичне површине смањује се ефективна површина контакта између честица и матрице што за последицу има смањен ефекат умрежавања.

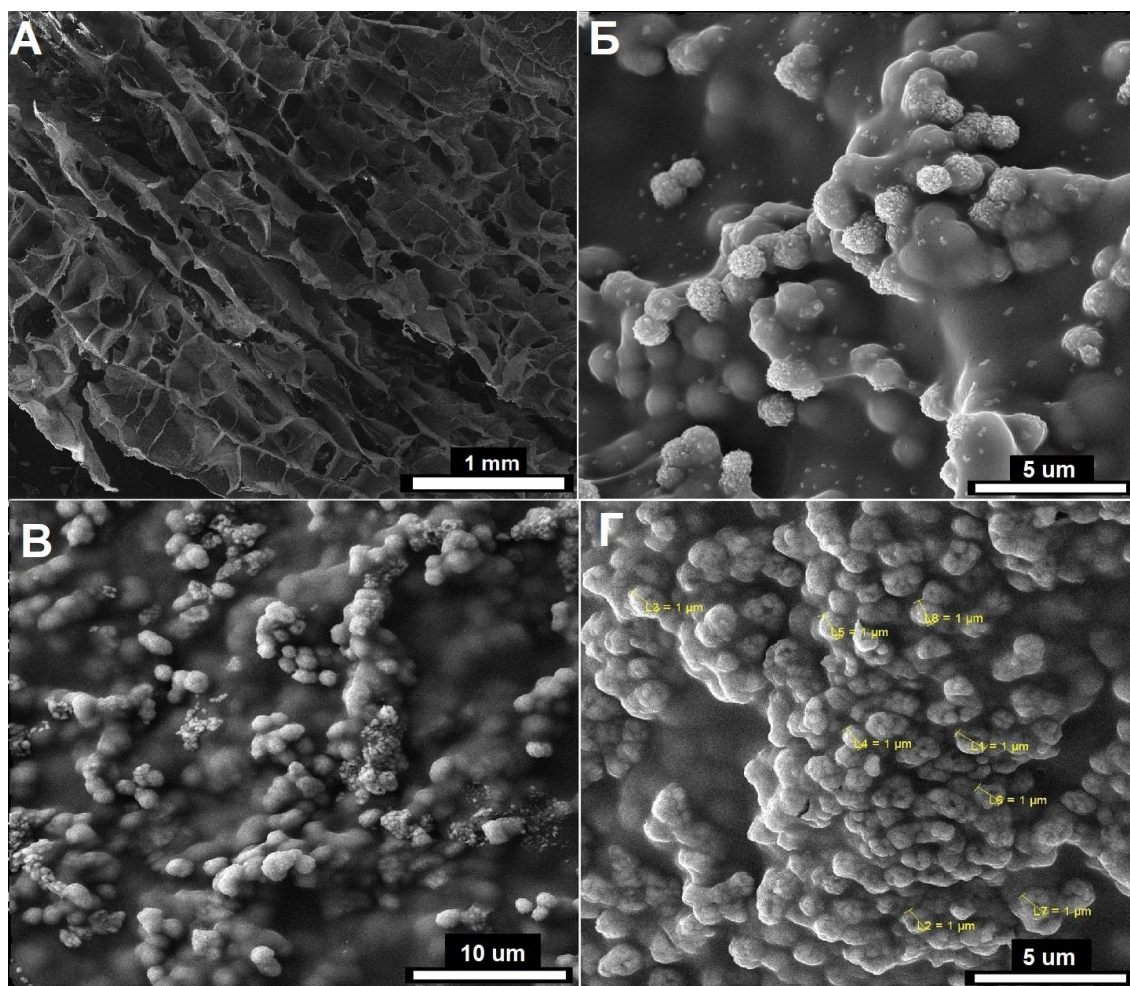
На слици 58Б приказан је утицај рН вредности средине на бубрење композитних хидрогелова. Додатак БЦП није утицао на промену својства рН-осетљивости, с тим што су као и код бубрења у СТТ, композитни хидрогелови са већим садржајем БЦП имали више вредности РСБ при свим рН вредностима.



Слика 58. Утицај састава композитних хидрогелова на РСБ и порозност (А). Утицај рН вредности раствора на РСБ за различите композитне хидрогелове (Б).

4.4.11.2. Микроструктура

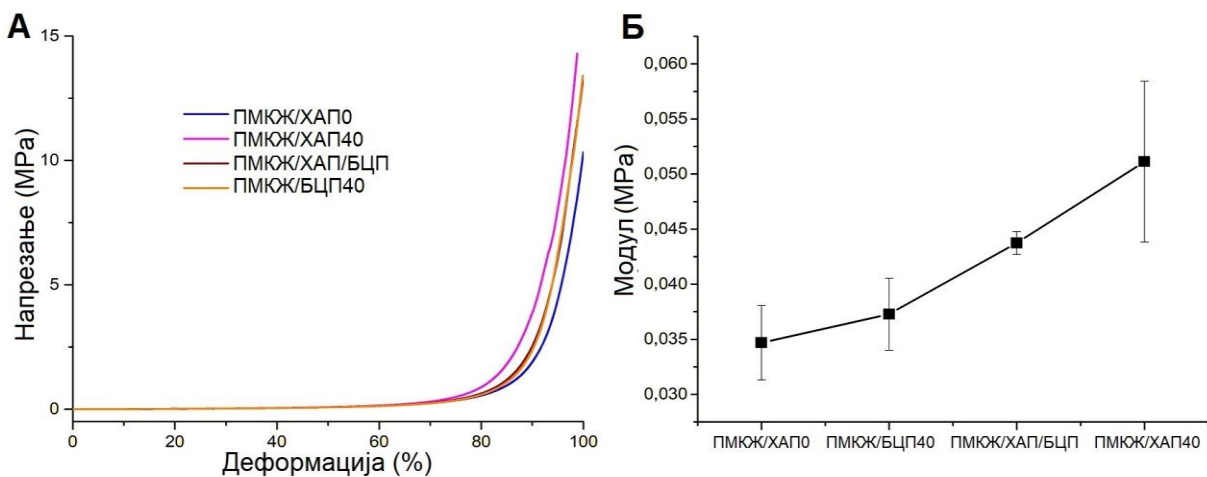
Микроструктура ПМКЖ/БЦП40 композитног хидрогела одликује се међусобно повезаним каналима ширине од 50 до 200 nm који указују на правце раста кристала леда приликом замрзавања хидрогелова у току поступка лиофилизације (слика 59А). Оваква архитектура пора може да погодује перфузији флуида кроз структуру хидрогела у биореакторским условима и да омогући ефикасну размену материјала у случају уношења ћелија у хидрогел. Осим тога, честице калцијум-фосфатне керамике, које су у случају свих композита уметнуте у структуру матрице и истовремено изложене на површини, доприносе побољшању механичких својстава и пружају додатне хемијске и биолошке сигнале потребне за ћелијску активност (слике 59Б-Г).



Слика 59. Попречни пресеци композитних хидрогелова снимљени помоћу СЕМ под различитим увећањима: ПМКЖ/БЦП40 (А), ПМКЖ/ХАП40 (Б), ПМКЖ/ХАП/БЦП (В) и ПМКЖ/БЦП40 (Г).

4.4.11.3. Механичка својства

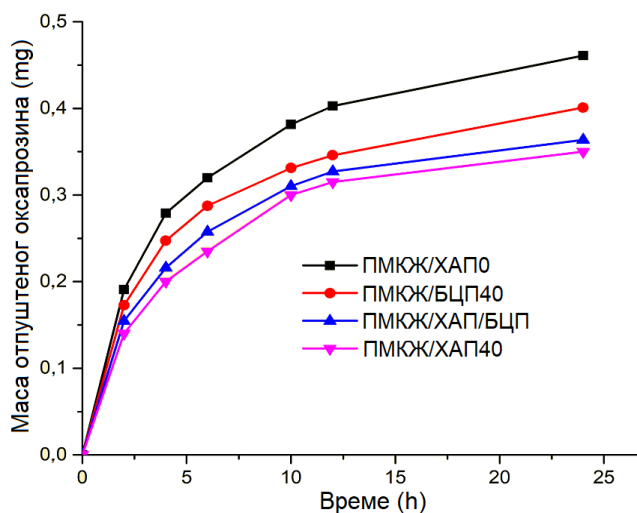
Притисна механичка својства добијених композитних хидрогелова испитивана су након 24 h бубрења у СТТ. Криве напон-деформација приказане су на слици 60А, док је на слици 60Б приказана зависност притисног модула од састава композитних хидрогелова. Криве напон-деформација имају типичан облик карактеристичан за вискоеластичне материјале, при чему до нарушавања структуре долази постепено без јасно изражене тачке лома. Због тога није било могуће одредити конкретне вредности притисне чврстоће па су механичка својства хидрогелова упоређена у односу на вредности модула. Вредности притисног модула композитних хидрогелова су у сагласности са резултатима бубрења. Додатак калцијум-фосфатних пунилаца довео је до повећања вредности модула у односу на чист ПМКЖ хидрогел, при чему је повећање било веће са повећањем садржаја ХАП у односу на БЦП. Ово је највероватније последица већег степена умрежења хидрогелова због веће специфичне површине честица ХАП у односу на БЦП, због чега су везе између пуниоца и матрице биле јаче и напрезање се ефективније преносило на чврсте керамичке честице.



Слика 60. Криве напрезање-деформација композитних хидрогелова (А). Зависност притисног модулуса од састава композитних хидрогелова (Б).

4.4.11.4. Отпуштање оксапрозина

Добијени ПМКЖ/БЦП композити испитивани су и као носачи за контролисано отпуштање лека и упоређени са ПМКЖ/ХАП композитима, при чему је као модел лека коришћен оксапрозин. Експериментни отпуштања оксапрозина у симулираним физиолошким условима показали су да је чист ПМКЖ хидрогел имао највећу брзину отпуштања, на шта указује највећи нагиб криве отпуштања (слика 61).



Слика 61. Криве отпуштања оксапрозина за различите композитне хидрогелове.

Додатком калцијум-фосфатних пунилаца, брзина отпуштања, као и количина отпушеног лека након 24 h се значајно смањују, при чему је то смањење веће у случају повећања садржаја ХАП у односу на БЦП. С обзиром да у овом случају кинетика бубрења има пресудан утицај на отпуштање оксапрозина јасно је да ће и криве отпуштања лека бити у сагласности са резултатима бубрења. Добијени резултати су показали да се варирањем не само количине, него и врсте калцијум-фосфатних пунилаца може на једноставан начин утицати на својства композита.

5. ЗАКЉУЧАК

Циљеви ове докторске дисертације били су синтеза и карактеризација интерпенетрирајућих мрежа добијених комбиновањем винилног полимера (ПМК) и природних полимера (желатина, алгината и хитозана), за потенцијалну примену у биомедицини. С обзиром да су ИПМ хидрогелови ПМК и желатина показали оптимална механичка својства, у наставку дисертације изабрани системи су детаљније окарактерисани у погледу механичких, физичко-хемијских и биолошких својстава, а затим испитани и као основа за композитне хидрогелове са честицама калцијум-фосфатних пунилаца.

Физички умрежени ПМКЖ хидрогелови показали су најбоља механичка својства и оптималну биокомпатибилност, при чему су највише вредности затезне чврстоће, жилавости, притисне чврстоће и модула еластичности износиле $1,44 \pm 0,17$ МПа, $4,91 \pm 0,51$ MJ m⁻³, $24,81 \pm 5,85$ МПа и $0,75 \pm 0,06$ МПа, редом, а удео воде у структури је био 50%. Повећање садржаја желатина и ПМК довело је до побољшања механичких својстава, повећања термичке стабилности и смањења СВ. Поред тога, синтетисани ПМКЖ хидрогелови одликовали су се својством памћења облика, што је омогућено образовањем хидрофобних интеракција које се успостављају између α -метил групе ПМК и хидрофобних аминокиселина у структури желатина, и делују као фиксне тачке умрежења.

Са додатком NaOH у реакциону смешу, добијени су ПМКЖ-Na хидрогелови са смањеним уделом хидрофобних домена, што је довело до повећаног степена бубрења и порозности. Удео воде у структури ПМКЖ-Na хидрогелова износио је од 50-80%, али су упркос повећању СВ и порозности, механичка својства ПМКЖ-Na била у рангу са другим изразито јаким хидрогеловима пријављеним у литератури. На пример, највиша вредност притисне чврстоће износила је $\approx 15,7$ МПа, што је значајно више од вредности напрезања којом се подвргава хрскавица у колелу човека од 90 kg током ходања (2,5 МПа). Такође, повећање односа желатин/ПМК у структури ПМКЖ-Na хидрогелова, као и смањење садржаја умреживача, допринело је повећању разградивости у симулираним физиолошким условима, док су се хидрогелови без умреживача скоро у потпуности разградили након 14 дана експеримента. Поред тога, синтетисани хидрогелови су значајно подстакли пролиферацију МТ и МРЦ-5 што је потврдило њихову биокомпатибилност и оправданост за даља биолошка испитивања.

Након синтезе и карактеризације ПМКЖ хидрогелова, испитана је могућност инкорпорације биоактивних керамичких честица у циљу добијања композитних хидрогелова погодних за инжењерство коштаног ткива. Синтетисани композитни хидрогелови су били високо порозни, при чему је порозност опадала са повећањем садржаја неорганске фазе. Са повећањем садржаја неорганске фазе значајно су се побољшала и механичка својства што је указало на повећање степена умрежења услед физичких интеракција честица пуниоца са полимерном матрицом. Ова претпоставка је потврђена снимањем микроструктуре узорака помоћу СЕМ где су уочене честице ХАП и β -ТЦП чврсто уметнуте у матрицу и униформно распоређене по узорку. Поред тога, додаток ХАП имао је израженији утицај на побољшање механичких својстава у поређењу са БЦП, због веће специфичне површине честица што је омогућило већи степен интеракције са матрицом и према томе већи степен умрежења. Сви композитни хидрогелови показали су задовољавајућу биокомпатибилност (вијабилност L929 ћелија је била већа од 75% код свих узорака), при чему је при растућем садржају ХАП постојао тренд благог опадања вијабилности ћелија. Композитни хидрогелови су испитани и као носачи за контролисано отпуштање лекова, при чему је кинетика отпуштања зависила од врсте лека и садржаја неорганске фазе у композитима.

У дисертацији је испитана и могућност замене *N,N'*-метиленбисакриламида као умреживача за добијање хидрогелова на бази винилних мономера, нетоксичним и биокомпатибилним поли(етилен-гликол)диакрилатом. Повећање садржаја ПЕГДА у хидрогеловима довело је до повећања степена умрежења што је евидентирано смањењем степена бубрења, побољшањем механичких својстава и повишењем температуре топлотне деградације, при чему су хидрогелови задржали својство рН-осетљивости. *In vitro* тестови отпуштања лекова, показали су да су ПМК-ПЕГДА хидрогелови погодни за контролисано отпуштање оксапрозина у дебело црево. Осим умрежавања хемијским умреживачима на бази акрилата, показано је да се ПМК хидрогелови могу додатно умрежити и јонским везама помоћу вишевалентних катјона метала, при чему су кључни утицај на степен умрежавања имали количина наелектрисања и јонски радијус катјона. Увођење јонских умрежења у структуру драстично да побољшава механичка својства хидрогелова, при чему се структура хидрогелова може циљано умрежавати јонима који су од значаја за коначну примену, при чему ће се инкорпорисани јони контролисано отпуштати (на пример, у случају примене у инжењерству коштаног ткива пожељно би било контролисано отпуштање Ca^{2+} , Mg^{2+} или Sr^{2+}). На овај начин могуће је додатно унапредити функционалност хидрогелова и побољшати биолошка и механичка својства.

На крају, може се закључити да су хидрогелови синтетисани у овој дисертацији, са нагласком на ПМКЖ системе, показали широк опсег својстава која се могу оптимизовати у зависности од намене, при чему су добра механичка својства, биокомпатибилност и могућност контролисаног отпуштања лекова кључни за примену ових система у биомедицини. Поред тога, испитивани материјали се добијају на брз и једноставан начин, користећи јефтине, широко доступне сировине, не захтевајући комплексне услове синтезе. Све наведено указује да су добијени материјали погодни за даља *in vitro* и *in vivo* испитивања у сврху коначне примене у биомедицини, инжењерству ткива и медицини.

ЛИТЕРАТУРА

1. Harris TR, Bransford JD, Brophy SP (2002) Roles for Learning Sciences and Learning Technologies in Biomedical Engineering Education: A Review of Recent Advances. *Annu Rev Biomed Eng* 4:29–48. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.4.091701.125502>
2. Balać I, Bugarski B, Čosić I, et al (2010) Biomaterijali. Institut tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti
3. Ratner BD, Bryant SJ (2004) Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going. *Annu Rev Biomed Eng* 6:41–75. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140027>
4. Dhand AP, Galarraga JH, Burdick JA (2021) Enhancing Biopolymer Hydrogel Functionality through Interpenetrating Networks. *Trends Biotechnol* 39:519–538. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.08.007>
5. Baroli B (2007) Hydrogels for Tissue Engineering and Delivery of Tissue-Inducing Substances. *J Pharm Sci* 96:2197–2223. <https://doi.org/10.1002/JPS.20873>
6. Drury JL, Mooney DJ (2003) Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 24:4337–4351. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00340-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00340-5)
7. Mitura S, Sionkowska A, Jaiswal A (2020) Biopolymers for hydrogels in cosmetics: review. *J Mater Sci Mater Med* 31:50. <https://doi.org/10.1007/s10856-020-06390-w>
8. Li J, Mooney DJ (2016) Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nat Rev Mater* 1:16071. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>
9. Kadimaliev DA, Devyataeva AA, Grunyshkin IP, et al (2021) Influence of Bacterial Cellulose Gel Film Modification on Its Mechanical Properties and Ability to Covalently Bind Enzymes. *Polym Sci Ser B* 63:232–238. <https://doi.org/10.1134/S1560090421030088>
10. Bogdanova LR, Rogov AM, Zueva OS, Zuev YF (2019) Lipase enzymatic microreactor in polysaccharide hydrogel: structure and properties. *Russ Chem Bull* 68:400–404. <https://doi.org/10.1007/s11172-019-2399-1>
11. Shewan HM, Stokes JR (2013) Review of techniques to manufacture micro-hydrogel particles for the food industry and their applications. *J Food Eng* 119:781–792. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.06.046>
12. Liu Y, Wang J, Chen H, Cheng D (2022) Environmentally friendly hydrogel: A review of classification, preparation and application in agriculture. *Sci Total Environ* 846:157303. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157303>
13. Van Tran V, Park D, Lee Y-C (2018) Hydrogel applications for adsorption of contaminants in water and wastewater treatment. *Environ Sci Pollut Res* 25:24569–24599. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2605-y>
14. Huang X, Wang C, Ao X, et al (2022) Preparation and Properties of Cellulose Nanofiber-Reinforced Ionic Conductive Hydrogels Sensor. *Polym Sci Ser A*. <https://doi.org/10.1134/S0965545X22700420>
15. Lee Y, Song WJ, Sun J-Y (2020) Hydrogel soft robotics. *Mater Today Phys* 15:100258. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mtphys.2020.100258>
16. Cascone S, Lamberti G (2020) Hydrogel-based commercial products for biomedical applications: A review. *Int J Pharm* 573:118803. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118803>
17. Caló E, Khutoryanskiy V V (2015) Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *Eur Polym J* 65:252–267. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024>
18. Hamman JH (2010) Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier Materials in Drug Delivery Systems. *Mar. Drugs* 8:1305–1322

19. Zhong M, Liu Y-T, Liu X-Y, et al (2016) Dually cross-linked single network poly (acrylic acid) hydrogels with superior mechanical properties and water absorbency. *Soft Matter* 12:5420–5428
20. Zhang X, Wang K, Hu J, et al (2020) Role of a high calcium ion content in extending the properties of alginate dual-crosslinked hydrogels. *J Mater Chem A* 8:25390–25401. <https://doi.org/10.1039/D0TA09315G>
21. Song G, Zhang L, He C, et al (2013) Facile Fabrication of Tough Hydrogels Physically Cross-Linked by Strong Cooperative Hydrogen Bonding. *Macromolecules* 46:7423–7435. <https://doi.org/10.1021/ma401053c>
22. Fan H, Wang J, Jin Z (2018) Tough, Swelling-Resistant, Self-Healing, and Adhesive Dual-Cross-Linked Hydrogels Based on Polymer–Tannic Acid Multiple Hydrogen Bonds. *Macromolecules* 51:1696–1705. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.7b02653>
23. Gulrez SKH, Al-Assaf S, Phillips GO (2011) Hydrogels: methods of preparation, characterisation and applications. *Prog Mol Environ Bioeng Anal Model to Technol Appl* 117–150
24. Xu L, Qiao Y, Qiu D (2023) Coordinatively Stiffen and Toughen Hydrogels with Adaptable Crystal-Domain Cross-Linking. *Adv Mater* 35:2209913. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adma.202209913>
25. Zhang HJ, Wang X, Yang Y, et al (2022) Effect of Hydrophobic Side Group on Structural Heterogeneities and Mechanical Performance of Gelatin-Based Hydrogen-Bonded Hydrogel. *Macromolecules* 55:7401–7410. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.2c01386>
26. Hu X, Vatankhah-Varnoosfaderani M, Zhou J, et al (2015) Weak Hydrogen Bonding Enables Hard, Strong, Tough, and Elastic Hydrogels. *Adv Mater* 27:6899–6905. <https://doi.org/10.1002/adma.201503724>
27. Na Niu Tingting Gao, Yudong Liu, Xiaoli Liu, Fengqi Liu* ZL Hydrophobic Association Hydrogel. *Prog. Chem.* 29:757–765
28. Панић В (2012) Синтеза и својства хидрогелова на бази метакрилне киселине модификованих зеолитима. Докторска дисертација. <https://doi.org/10.2298/BG20120612PANIC>
29. Lin C-C, Metters AT (2006) Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Adv Drug Deliv Rev* 58:1379–1408. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.004>
30. Deng Y, Hussain I, Kang M, et al (2018) Self-recoverable and mechanical-reinforced hydrogel based on hydrophobic interaction with self-healable and conductive properties. *Chem Eng J* 353:900–910. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.07.187>
31. Jiang H, Duan L, Ren X, Gao G (2019) Hydrophobic association hydrogels with excellent mechanical and self-healing properties. *Eur Polym J* 112:660–669. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.10.031>
32. Martínez-Martínez M, Rodríguez-Berna G, Gonzalez-Alvarez I, et al (2018) Ionic Hydrogel Based on Chitosan Cross-Linked with 6-Phosphogluconic Trisodium Salt as a Drug Delivery System. *Biomacromolecules* 19:1294–1304. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00108>
33. Tong R, Chen G, Pan D, et al (2019) Ulstretchable and Antifreezing Double-Cross-Linked Cellulose Ionic Hydrogels with High Strain Sensitivity under a Broad Range of Temperature. *ACS Sustain Chem Eng* 7:14256–14265. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b03555>
34. Pekař M (2015) Hydrogels with Micellar Hydrophobic (Nano)Domains. *Front Mater* 1:. <https://doi.org/10.3389/fmats.2014.00035>
35. Holloway JL, Lowman AM, Palmese GR (2013) The role of crystallization and phase separation in the formation of physically cross-linked PVA hydrogels. *Soft Matter* 9:826–833. <https://doi.org/10.1039/C2SM26763B>

36. Madduma-Bandarage USK, Madihally S V (2021) Synthetic hydrogels: Synthesis, novel trends, and applications. *J Appl Polym Sci* 138:50376. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/app.50376>
37. Jenkins AD, Kratochvíl P, Stepto RFT, Suter UW (1996) Glossary of basic terms in polymer science (IUPAC Recommendations 1996). *Pure Appl Chem* 68:2287–2311. <https://doi.org/doi:10.1351/pac199668122287>
38. Silverstein MS (2020) Interpenetrating polymer networks: So happy together? *Polymer (Guildf)* 207:122929. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.122929>
39. GANJI F, VASHEGHANI FARAHANI S, VASHEGHANI FARAHAANI E (2010) THEORETICAL DESCRIPTION OF HYDROGEL SWELLING: A REVIEW. *Iran Polym J* 19:375–398
40. Mahinroosta M, Jomeh Farsangi Z, Allahverdi A, Shakoori Z (2018) Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications. *Mater Today Chem* 8:42–55. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.02.004>
41. Здравковић А (2019) Синтеза, карактеризација и примена хидрогелова на бази N-изопропилакриламида и анјонских комономера за уклањање хрома, мангана и олова из водених раствора. Докторска дисертација. Универзитет у Нишу
42. Yu Y, Cheng Y, Tong J, et al (2021) Recent advances in thermo-sensitive hydrogels for drug delivery. *J Mater Chem B* 9:2979–2992. <https://doi.org/10.1039/D0TB02877K>
43. Li M, Li W, Cai W, et al (2019) A self-healing hydrogel with pressure sensitive photoluminescence for remote force measurement and healing assessment. *Mater Horizons* 6:703–710. <https://doi.org/10.1039/C8MH01441H>
44. Zhao Y-L, Stoddart JF (2009) Azobenzene-Based Light-Responsive Hydrogel System. *Langmuir* 25:8442–8446. <https://doi.org/10.1021/la804316u>
45. Yeingst TJ, Arrizabalaga JH, Hayes DJ (2022) Ultrasound-Induced Drug Release from Stimuli-Responsive Hydrogels. *Gels* 8
46. Patil SB, Inamdar SZ, Reddy KR, et al (2020) Functionally tailored electro-sensitive poly (acrylamide)-g-pectin copolymer hydrogel for transdermal drug delivery application: synthesis, characterization, in-vitro and ex-vivo evaluation. *Drug Deliv Lett* 10:185–196. <https://doi.org/https://doi.org/10.2174/2210303110666200206114632>
47. Markovic MD, Seslija SI, Ugrinovic VD, et al (2021) Green pH- and magnetic-responsive hybrid hydrogels based on poly(methacrylic acid) and Eucalyptus wood nanocellulose for controlled release of ibuprofen. *Cellulose* 28:11109–11132. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04222-w>
48. Rizwan M, Yahya R, Hassan A, et al (2017) pH Sensitive Hydrogels in Drug Delivery: Brief History, Properties, Swelling, and Release Mechanism, Material Selection and Applications. *Polymers (Basel)* 9:. <https://doi.org/10.3390/polym9040137>
49. Xiang T, Lu T, Zhao W-F, Zhao C-S (2019) Ionic-Strength Responsive Zwitterionic Copolymer Hydrogels with Tunable Swelling and Adsorption Behaviors. *Langmuir* 35:1146–1155. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01719>
50. Markovic MD, Panic V V, Savic SI, et al (2022) Biobased thermo/pH sensitive poly(N-isopropylacrylamide-co-crotonic acid) hydrogels for targeted drug delivery. *Microporous Mesoporous Mater* 335:111817. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2022.111817>
51. Ofridam F, Tarhini M, Lebaz N, et al (2021) pH-sensitive polymers: Classification and some fine potential applications. *Polym Adv Technol* 32:1455–1484. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pat.5230>
52. Zhang J, Peppas NA (2000) Synthesis and Characterization of pH- and Temperature-Sensitive Poly(methacrylic acid)/Poly(N-isopropylacrylamide) Interpenetrating Polymeric Networks.

- Macromolecules 33:102–107. <https://doi.org/10.1021/ma991398q>
53. Xue R, Zhang W, Sun P, et al (2017) Angle-independent pH-sensitive composites with natural gyroid structure. *Sci Rep* 7:42207. <https://doi.org/10.1038/srep42207>
 54. Gulyuz U (2021) Dual Cross-Linked Polymethacrylic Acid Hydrogels with Tunable Mechanical Properties and Shape Memory Behavior. *Macromol Mater Eng* 306:2100201. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mame.202100201>
 55. Lumbreras-Aguayo A, Meléndez-Ortiz HI, Puente-Urbina B, et al (2019) Poly(methacrylic acid)-modified medical cotton gauzes with antimicrobial and drug delivery properties for their use as wound dressings. *Carbohydr Polym* 205:203–210. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.015>
 56. Caldorera-Moore M, Vela Ramirez JE, Peppas NA (2019) Transport and delivery of interferon- α through epithelial tight junctions via pH-responsive poly(methacrylic acid-grafted-ethylene glycol) nanoparticles. *J Drug Target* 27:582–589. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1547732>
 57. Pérez-Chávez NA, Nosthas Aguiar V, Allegretto JA, et al (2020) Triggering doxorubicin release from responsive hydrogel films by polyamine uptake. *Soft Matter* 16:7492–7502. <https://doi.org/10.1039/D0SM00951B>
 58. Vatankhah Z, Dehghani E, Salami-Kalajahi M, Roghani-Mamaqani H (2019) One-step fabrication of low cytotoxic anisotropic poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-methacrylic acid) particles for efficient release of DOX. *J Drug Deliv Sci Technol* 54:101332. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101332>
 59. Ugrinović VĐ, Panić V V, Veljović ĐN, et al (2018) Synthesis and properties of nano-hydroxyapatite/poly (methacrylic acid) composite hydrogels. *Tehnika* 73:613–620. <https://doi.org/10.5937/tehnika1805613U>
 60. Sperling LH, Hu R (2014) Interpenetrating Polymer Networks BT - Polymer Blends Handbook. In: Utracki LA, Wilkie CA (eds). Springer Netherlands, Dordrecht, pp 677–724
 61. Fox TG, Flory PJ (1950) Second-Order Transition Temperatures and Related Properties of Polystyrene. I. Influence of Molecular Weight. *J Appl Phys* 21:581–591. <https://doi.org/10.1063/1.1699711>
 62. Gong JP, Katsuyama Y, Kurokawa T, Osada Y (2003) Double-Network Hydrogels with Extremely High Mechanical Strength. *Adv Mater* 15:1155–1158. <https://doi.org/10.1002/adma.200304907>
 63. Tang L, Zhang D, Gong L, et al (2019) Double-Network Physical Cross-Linking Strategy To Promote Bulk Mechanical and Surface Adhesive Properties of Hydrogels. *Macromolecules* 52:9512–9525. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.9b01686>
 64. Chen Q, Yan X, Zhu L, et al (2016) Improvement of Mechanical Strength and Fatigue Resistance of Double Network Hydrogels by Ionic Coordination Interactions. *Chem Mater* 28:5710–5720. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.6b01920>
 65. Chen Q, Zhu L, Chen H, et al (2015) A Novel Design Strategy for Fully Physically Linked Double Network Hydrogels with Tough, Fatigue Resistant, and Self-Healing Properties. *Adv Funct Mater* 25:1598–1607. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adfm.201404357>
 66. Yang Q, Gao C, Zhang X, et al (2021) A Dual Physical Cross-Linking Strategy to Construct Tough Hydrogels with High Strength, Excellent Fatigue Resistance, and Stretching-Induced Strengthening Effect. *Macromol Mater Eng* 306:2100093. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mame.202100093>
 67. Sun X-F, Feng Y, Shi X, Wang Y (2016) Preparation and Property of Xylan/Poly(Methacrylic Acid) Semi-Interpenetrating Network Hydrogel. *Int J Polym Sci* 2016:8241078. <https://doi.org/10.1155/2016/8241078>

68. Li S, Chen Z, Wang J, et al (2020) Fabrication and characterization of a novel semi-interpenetrating network hydrogel based on sodium carboxymethyl cellulose and poly(methacrylic acid) for oral insulin delivery. *J Biomater Appl* 35:3–14. <https://doi.org/10.1177/0885328220912843>
69. Sharma K, Kumar V, Swart-Pistor C, et al (2016) Synthesis, characterization, and anti-microbial activity of superabsorbents based on agar–poly(methacrylic acid-glycine). *J Bioact Compat Polym* 32:74–91. <https://doi.org/10.1177/0883911516653148>
70. Li S, Liu X (2008) Synthesis, characterization and evaluation of semi-IPN hydrogels consisted of poly(methacrylic acid) and guar gum for colon-specific drug delivery. *Polym Adv Technol* 19:371–376. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pat.1018>
71. Ribeiro LNM, Alcântara ACS, Darder M, et al (2014) Pectin-coated chitosan–LDH bionanocomposite beads as potential systems for colon-targeted drug delivery. *Int J Pharm* 463:1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.035>
72. Markovic MD, Spasojevic PM, Seslija SI, et al (2019) Casein-poly(methacrylic acid) hybrid soft networks with easy tunable properties. *Eur Polym J* 113:276–288. <https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2019.01.065>
73. Markovic MD, Panic VV, Seslija SI, et al (2020) Modification of hydrophilic polymer network to design a carrier for a poorly water-soluble substance. *Polym Eng Sci*. <https://doi.org/10.1002/pen.25487>
74. Qi X, Wei W, Li J, et al (2015) Fabrication and Characterization of a Novel Anticancer Drug Delivery System: Salecan/Poly(methacrylic acid) Semi-interpenetrating Polymer Network Hydrogel. *ACS Biomater Sci Eng* 1:1287–1299. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.5b00346>
75. Qi X, Wei W, Li J, et al (2016) Development of novel hydrogels based on Salecan and poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) for controlled doxorubicin release. *RSC Adv* 6:69869–69881. <https://doi.org/10.1039/C6RA10716H>
76. Fritze A, Hens F, Kimpfler A, et al (2006) Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes* 1758:1633–1640
77. Chen S, Liu M, Jin S, Chen Y (2014) pH-/temperature-sensitive carboxymethyl chitosan/poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) IPN: preparation, characterization and sustained release of riboflavin. *Polym Bull* 71:719–734. <https://doi.org/10.1007/s00289-013-1088-8>
78. Sharma K, Kumar V, Kaith BS, et al (2015) Synthesis of Biodegradable Gum ghatti Based Poly(methacrylic acid-aniline) Conducting IPN Hydrogel for Controlled Release of Amoxicillin Trihydrate. *Ind Eng Chem Res* 54:1982–1991. <https://doi.org/10.1021/ie5044743>
79. Chen J, Liu M, Chen S (2009) Synthesis and characterization of thermo- and pH-sensitive kappa-carrageenan-g-poly(methacrylic acid)/poly(N,N-diethylacrylamide) semi-IPN hydrogel. *Mater Chem Phys* 115:339–346. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2008.12.026>
80. Saruchi , Kumar V, Rehani V, Kalra GS (2018) Synthesis and characterization of Gum tragacanth, acrylic acid–methacrylic acid based interpenetrating polymer network: its application for controlled release of agrochemicals. *J Chinese Adv Mater Soc* 6:222–233. <https://doi.org/10.1080/22243682.2018.1455155>
81. Georgopoulou A, Papadogiannis F, Batsali A, et al (2018) Chitosan/gelatin scaffolds support bone regeneration. *J Mater Sci Mater Med* 29:59. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6064-2>
82. Jaipan P, Nguyen A, Narayan RJ (2017) Gelatin-based hydrogels for biomedical applications. *MRS Commun* 7:416–426. <https://doi.org/DOI: 10.1557/mrc.2017.92>
83. Gupta NV, Satish CS, Shivakumar HG (2007) Preparation and characterization of gelatin-poly

- (methacrylic acid) interpenetrating polymeric network hydrogels as a pH-sensitive delivery system for glipizide. *Indian J Pharm Sci* 69:64
84. Zhang HJ, Wang L, Wang X, et al (2020) Developing super tough gelatin-based hydrogels by incorporating linear poly(methacrylic acid) to facilitate sacrificial hydrogen bonding. *Soft Matter* 16:4723–4727. <https://doi.org/10.1039/D0SM00422G>
 85. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M (2010) Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 62:83–99. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.019>
 86. Chen S, Liu M, Jin S, Chen Y (2005) Synthesis and swelling properties of pH-sensitive hydrogels based on chitosan and poly(methacrylic acid) semi-interpenetrating polymer network. *J Appl Polym Sci* 98:1720–1726. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/app.22348>
 87. Maity J, Ray SK (2014) Enhanced adsorption of methyl violet and congo red by using semi and full IPN of polymethacrylic acid and chitosan. *Carbohydr Polym* 104:8–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.086>
 88. Dragan ES, Cocarta AI, Gierszewska M (2016) Designing novel macroporous composite hydrogels based on methacrylic acid copolymers and chitosan and in vitro assessment of lysozyme controlled delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 139:33–41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.12.011>
 89. Wang H, Li W, Lu Y, Wang Z (1997) Studies on chitosan and poly(acrylic acid) interpolymer complex. I. Preparation, structure, pH-sensitivity, and salt sensitivity of complex-forming poly(acrylic acid): Chitosan semi-interpenetrating polymer network. *J Appl Polym Sci* 65:1445–1450. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19970822\)65:8<1445::AID-APP1>3.0.CO;2-G](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19970822)65:8<1445::AID-APP1>3.0.CO;2-G)
 90. Lee JW, Kim SY, Kim SS, et al (1999) Synthesis and characteristics of interpenetrating polymer network hydrogel composed of chitosan and poly(acrylic acid). *J Appl Polym Sci* 73:113–120. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19990705\)73:1<113::AID-APP13>3.0.CO;2-D](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19990705)73:1<113::AID-APP13>3.0.CO;2-D)
 91. Gümüşderelioğlu M, Erce D, Demirtaş TT (2011) Superporous polyacrylate/chitosan IPN hydrogels for protein delivery. *J Mater Sci Mater Med* 22:2467–2475. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4422-4>
 92. Zhang J, Yuan K, Wang Y-P, et al (2007) Preparation and PH Responsive Behavior of Poly(Vinyl Alcohol)—Chitosan—Poly(Acrylic acid) Full-IPN Hydrogels. *J Bioact Compat Polym* 22:207–218. <https://doi.org/10.1177/0883911506076046>
 93. Zhang M, Zhao X (2020) Alginate hydrogel dressings for advanced wound management. *Int J Biol Macromol* 162:1414–1428. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.311>
 94. Sajeesh S, Sharma CP (2004) Poly Methacrylic Acid-Alginate Semi-IPN Microparticles for Oral Delivery of Insulin: A Preliminary Investigation. *J Biomater Appl* 19:35–45. <https://doi.org/10.1177/0885328204042992>
 95. Kim SJ, Yoon SG, Kim IY, et al (2005) Swelling Characterizations of the Interpenetrating Polymer Network Hydrogels Composed of Polymethacrylic Acid and Alginate. *J Macromol Sci Part A* 42:811–820. <https://doi.org/10.1081/MA-200058669>
 96. Kim SJ, Yoon SG, Lee YH, Kim SI (2004) Bending behavior of hydrogels composed of poly(methacrylic acid) and alginate by electrical stimulus. *Polym Int* 53:1456–1460. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pi.1560>
 97. Samavedi S, Whittington AR, Goldstein AS (2013) Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater* 9:8037–8045. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2013.06.014>
 98. Müller P, Bulnheim U, Diener A, et al (2008) Calcium phosphate surfaces promote osteogenic

- differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med* 12:281–291
99. Polini A, Pisignano D, Parodi M, et al (2011) Osteoinduction of human mesenchymal stem cells by bioactive composite scaffolds without supplemental osteogenic growth factors. *PLoS One* 6:e26211
 100. Guha AK, Singh S, Kumaresan R, et al (2009) Mesenchymal cell response to nanosized biphasic calcium phosphate composites. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 73:146–151. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2009.05.009>
 101. Arinzech TL, Tran T, Mcalary J, Daculsi G (2005) A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. *Biomaterials* 26:3631–3638. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2004.09.035>
 102. García-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW (2015) Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone* 81:112–121. <https://doi.org/10.1016/J.BONE.2015.07.007>
 103. Awasthi S, Pandey SK, Arunan E, Srivastava C (2021) A review on hydroxyapatite coatings for the biomedical applications: experimental and theoretical perspectives. *J Mater Chem B* 9:228–249. <https://doi.org/10.1039/D0TB02407D>
 104. Павловић МП (2022) In situ синтеза и карактеризација танких биокompatibilних композитних превлака хидроксиапатит/пасивни оксид за потенцијалну примену у медицини. Докторска дисертација
 105. Dashevskiy I, Balueva A, Todebush P, et al (2019) On estimation of adhesive strength of implants bioactive coating with titanium by density functional theory and molecular dynamics simulations. *Mater Res* 22:
 106. Tozzi G, De Mori A, Oliveira A, et al (2016) Composite Hydrogels for Bone Regeneration. *Materials (Basel)* 9:267. <https://doi.org/10.3390/ma9040267>
 107. Monroe EA, Votava W, Bass DB, Mullen JM (1971) New Calcium Phosphate Ceramic Material for Bone and Tooth Implants. *J Dent Res* 50:860–861. <https://doi.org/10.1177/00220345710500041201>
 108. Janačković D, Petrovic-Prelevic I, Kostic-Gvozdenovic L, et al (2001) Influence of Synthesis Parameters on the Particle Sizes of Nanostructured Calcium-Hydroxyapatite. *Key Eng Mater* 192–195:203–206. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.192-195.203>
 109. Jensen SS, Aaboe M, Pinholt EM, et al (1996) Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 11:
 110. RENOOIJ W, HOOGENDOORN HA, VISSER WJ, et al (1985) Bioresorption of Ceramic Strontium-85-Labeled Calcium Phosphate Implants in Dog Femora: A Pilot Study to Quantitate Bioresorption of Ceramic Implants of Hydroxyapatite and Tricalcium Orthophosphate In Vivo. *Clin Orthop Relat Res* 197:
 111. Bohner M, Santoni BLG, Döbelin N (2020) β -tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. *Acta Biomater* 113:23–41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.06.022>
 112. Brazete D, Torres PMC, Abrantes JCC, Ferreira JMF (2018) Influence of the Ca/P ratio and cooling rate on the allotropic $\alpha \leftrightarrow \beta$ -tricalcium phosphate phase transformations. *Ceram Int* 44:8249–8256. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.02.005>
 113. Famery R, Richard N, Boch P (1994) Preparation of α - and β -tricalcium phosphate ceramics, with and without magnesium addition. *Ceram Int* 20:327–336. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0272-8842\(94\)90050-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0272-8842(94)90050-7)
 114. Vormann J (2003) Magnesium: nutrition and metabolism. *Mol Aspects Med* 24:27–37. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(02\)00089-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0098-2997(02)00089-4)
 115. Iconaru SL, Predoi MV, Motelica-Heino M, et al (2020) Dextran-Thyme Magnesium-Doped Hydroxyapatite Composite Antimicrobial Coatings. *Coatings* 10:57.

- <https://doi.org/10.3390/coatings10010057>
116. Landi E, Logroscino G, Proietti L, et al (2008) Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: from synthesis to in vivo behaviour. *J Mater Sci Mater Med* 19:239–247. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0032-y>
 117. Tao Z-S, Zhou W-S, He X-W, et al (2016) A comparative study of zinc, magnesium, strontium-incorporated hydroxyapatite-coated titanium implants for osseointegration of osteopenic rats. *Mater Sci Eng C* 62:226–232. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.034>
 118. Bernardini D, Nasulewicz A, Mazur A, Maier JA (2005) Magnesium and microvascular endothelial cells: a role in inflammation and angiogenesis. *Front Biosci* 10:1177–1182
 119. Wang M, Yu Y, Dai K, et al (2016) Improved osteogenesis and angiogenesis of magnesium-doped calcium phosphate cement via macrophage immunomodulation. *Biomater Sci* 4:1574–1583. <https://doi.org/10.1039/C6BM00290K>
 120. Bigi A, Falini G, Foresti E, et al (1993) Magnesium influence on hydroxyapatite crystallization. *J Inorg Biochem* 49:69–78. [https://doi.org/10.1016/0162-0134\(93\)80049-F](https://doi.org/10.1016/0162-0134(93)80049-F)
 121. Veljovic D, Matic T, Stamenic T, et al (2019) Mg/Cu co-substituted hydroxyapatite – Biocompatibility, mechanical properties and antimicrobial activity. *Ceram Int* 45:22029–22039. <https://doi.org/10.1016/J.CERAMINT.2019.07.219>
 122. Daculsi G, Layrolle P (2004) Osteoinductive Properties of Micro Macroporous Biphasic Calcium Phosphate Bioceramics . *Key Eng Mater* 254–256:1005–1008. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.254-256.1005>
 123. Wang L, Barbieri D, Zhou H, et al (2015) Effect of particle size on osteoinductive potential of microstructured biphasic calcium phosphate ceramic. *J Biomed Mater Res Part A* 103:1919–1929. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35325>
 124. Xue K, Wang X, Yong PW, et al (2019) Hydrogels as Emerging Materials for Translational Biomedicine. *Adv Ther* 2:1800088. <https://doi.org/10.1002/adtp.201800088>
 125. Fu K, Pack DW, Klibanov AM, Langer R (2000) Visual evidence of acidic environment within degrading poly (lactic-co-glycolic acid)(PLGA) microspheres. *Pharm Res* 17:100–106
 126. Briquez PS, Clegg LE, Martino MM, et al (2016) Design principles for therapeutic angiogenic materials. *Nat Rev Mater* 1:1–15
 127. Naahidi S, Jafari M, Logan M, et al (2017) Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *Biotechnol Adv* 35:530–544
 128. Benoit DSW, Schwartz MP, Durney AR, Anseth KS (2008) Small functional groups for controlled differentiation of hydrogel-encapsulated human mesenchymal stem cells. *Nat Mater* 7:816–823
 129. Wang T, Wang D, Yu H, et al (2018) A cancer vaccine-mediated postoperative immunotherapy for recurrent and metastatic tumors. *Nat Commun* 9:1532
 130. Vong LB, Bui TQ, Tomita T, et al (2018) Novel angiogenesis therapeutics by redox injectable hydrogel-Regulation of local nitric oxide generation for effective cardiovascular therapy. *Biomaterials* 167:143–152
 131. Sadtler K, Singh A, Wolf MT, et al (2016) Design, clinical translation and immunological response of biomaterials in regenerative medicine. *Nat Rev Mater* 1:1–17
 132. Dang TT, Thai A V, Cohen J, et al (2013) Enhanced function of immuno-isolated islets in diabetes therapy by co-encapsulation with an anti-inflammatory drug. *Biomaterials* 34:5792–5801
 133. Wang W, Tan B, Chen J, et al (2018) An injectable conductive hydrogel encapsulating plasmid DNA-eNOs and ADSCs for treating myocardial infarction. *Biomaterials* 160:69–81
 134. Wei C, Dong X, Zhang Y, et al (2018) Simultaneous fluorescence imaging monitoring of the programmed release of dual drugs from a hydrogel-carbon nanotube delivery system. *Sensors*

Actuators B Chem 273:264–275

135. Vega SL, Kwon MY, Burdick JA (2017) Recent advances in hydrogels for cartilage tissue engineering. *Eur Cell Mater* 33:59–75. <https://doi.org/10.22203/eCM.v033a05>
136. Ahmed TAE, Hincke MT (2010) Strategies for articular cartilage lesion repair and functional restoration. *Tissue Eng Part B Rev* 16:305–329
137. Oliveira Silva M, Gregory JL, Ansari N, Stok KS (2020) Molecular Signaling Interactions and Transport at the Osteochondral Interface: A Review. *Front Cell Dev Biol* 8:. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00750>
138. Goldring MB (2006) Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20:1003–1025
139. Peterson L, Vasiliadis HS, Brittberg M, Lindahl A (2010) Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *Am J Sports Med* 38:1117–1124
140. Harada S, Rodan GA (2003) Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423:349–355
141. Stolzing A, Jones E, Mcgonagle D, Scutt A (2008) Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev* 129:163–173
142. Taneja K, Pareek A, Verma P, et al (2012) Nanocomposite: An emerging tool for bone tissue transplantation and drug delivery. *Indian J Transplant* 6:88–96. <https://doi.org/10.1016/J.IJT.2012.07.002>
143. Liu Y, Luo D, Wang T (2016) Hierarchical Structures of Bone and Bioinspired Bone Tissue Engineering. *Small* 12:4611–4632. <https://doi.org/10.1002/sml.201600626>
144. Weiner S, Wagner HD (1998) The material bone: structure-mechanical function relations. *Annu Rev Mater Sci* 28:271–298
145. Israelowitz M, Rizvi SWH, Kramer J, von Schroeder HP (2005) Computational modeling of type I collagen fibers to determine the extracellular matrix structure of connective tissues. *Protein Eng Des Sel* 18:329–335
146. Porter JR, Ruckh TT, Popat KC (2009) Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol Prog*. <https://doi.org/10.1002/btpr.246>
147. Rezwani K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR (2006) Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27:3413–3431. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.01.039>
148. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS (2011) Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. *Int J Polym Sci* 2011:
149. Civantos A, Martínez-Campos E, Ramos V, et al (2017) Titanium Coatings and Surface Modifications: Toward Clinically Useful Bioactive Implants. *ACS Biomater Sci Eng* 3:1245–1261. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00604>
150. Ingavle G, Avadhanam V, Zheng Y, et al (2016) Biomineralised interpenetrating network hydrogels for bone tissue engineering. *Bioinspired, Biomim Nanobiomaterials* 5:12–23
151. Fang J, Li P, Lu X, et al (2019) A strong, tough, and osteoconductive hydroxyapatite mineralized polyacrylamide/dextran hydrogel for bone tissue regeneration. *Acta Biomater* 88:503–513. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.02.019>
152. Li Z, Mi W, Wang H, et al (2014) Nano-hydroxyapatite/polyacrylamide composite hydrogels with high mechanical strengths and cell adhesion properties. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 123:959–964. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2014.10.050>
153. Hu J, Zhu Y, Tong H, et al (2016) A detailed study of homogeneous agarose/hydroxyapatite nanocomposites for load-bearing bone tissue. *Int J Biol Macromol* 82:134–143. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2015.09.077>

154. Sarker A, Amirian J, Min YK, Lee BT (2015) HAp granules encapsulated oxidized alginate–gelatin–biphasic calcium phosphate hydrogel for bone regeneration. *Int J Biol Macromol* 81:898–911. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2015.09.029>
155. Chang C, Peng N, He M, et al (2013) Fabrication and properties of chitin/hydroxyapatite hybrid hydrogels as scaffold nano-materials. *Carbohydr Polym* 91:7–13. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2012.07.070>
156. Arun Kumar R, Sivashanmugam A, Deepthi S, et al (2015) Injectable Chitin-Poly(ϵ -caprolactone)/Nanohydroxyapatite Composite Microgels Prepared by Simple Regeneration Technique for Bone Tissue Engineering. *ACS Appl Mater Interfaces* 7:9399–9409. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b02685>
157. Parameswaran-Thankam A, Al-Anbaky Q, Al-karakooly Z, et al (2018) Fabrication and characterization of hydroxypropyl guar-poly (vinyl alcohol)-nano hydroxyapatite composite hydrogels for bone tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed* 29:2083–2105. <https://doi.org/10.1080/09205063.2018.1494437>
158. Stojkowska J, Zvicser J, Andrejevic M, et al (2021) Novel composite scaffolds based on alginate and Mg-doped calcium phosphate fillers: Enhanced hydroxyapatite formation under biomimetic conditions. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 109:2079–2090. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jbm.b.34856>
159. Wang S, Zhang Z, Zhang Q, et al (2018) In-situ Synthesis and Characterization of Poly(vinyl alcohol)/Hydroxyapatite Composite Hydrogel by Freezing-thawing Method. *Int J Biol Macromol* 35:2083–2105. <https://doi.org/10.1007/s10904-018-0893-9>
160. Meng D, Zhou X, Zheng K, et al (2019) In-situ Synthesis and Characterization of Poly(vinyl alcohol)/Hydroxyapatite Composite Hydrogel by Freezing-thawing Method. *Chem Res Chinese Univ* 35:521–529. <https://doi.org/10.1007/s40242-019-8341-0>
161. Suvarnapathaki S, Wu X, Lantigua D, et al (2020) Hydroxyapatite-Incorporated Composite Gels Improve Mechanical Properties and Bioactivity of Bone Scaffolds. *Macromol Biosci* 20:2000176. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mabi.202000176>
162. Singh S, Brocker C, Koppaka V, et al (2013) Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free Radic Biol Med* 56:89–101. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.010>
163. Ferracini R, Martínez Herreros I, Russo A, et al (2018) Scaffolds as Structural Tools for Bone-Targeted Drug Delivery. *Pharmaceutics* 10
164. Cobb LH, McCabe EM, Priddy LB (2020) Therapeutics and delivery vehicles for local treatment of osteomyelitis. *J Orthop Res* 38:2091–2103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jor.24689>
165. Bagde AD, Kuthe AM, Quazi S, et al (2019) State of the Art Technology for Bone Tissue Engineering and Drug Delivery. *IRBM* 40:133–144. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.irbm.2019.03.001>
166. Das D, Pal S (2015) Dextrin/poly (HEMA): pH responsive porous hydrogel for controlled release of ciprofloxacin. *Int J Biol Macromol* 72:171–178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.007>
167. You YC, Dong LY, Dong K, et al (2015) In vitro and in vivo application of pH-sensitive colon-targeting polysaccharide hydrogel used for ulcerative colitis therapy. *Carbohydr Polym* 130:243–253. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.075>
168. Abbasi M, Sohail M, Minhas MU, et al (2019) Novel biodegradable pH-sensitive hydrogels: An efficient controlled release system to manage ulcerative colitis. *Int J Biol Macromol* 136:83–96. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.046>
169. Sheng Y, Gao J, Yin Z-Z, et al (2021) Dual-drug delivery system based on the hydrogels of alginate and sodium carboxymethyl cellulose for colorectal cancer treatment. *Carbohydr Polym*

- 269:118325. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118325>
170. Rao P, Knaus EE (2008) Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J Pharm Pharm Sci* 11:81-110s
 171. Rainsford KD, Omar H, Ashraf A, et al (2002) Recent pharmacodynamic and pharmacokinetic findings on oxaprozin. *Inflammopharmacology* 10:185–239
 172. Jamar R, Dequeker J (1978) Oxaprozin versus aspirin in rheumatoid arthritis: a double-blind trial. *Curr Med Res Opin* 5:433–438. <https://doi.org/10.1185/03007997809111911>
 173. Masi L, Recenti R, Silvestri S, et al (2007) Expression of cyclooxygenase-2 in osteosarcoma of bone. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 15:70–76
 174. Mullins MN, Lana SE, Dernell WS, et al (2004) Cyclooxygenase-2 expression in canine appendicular osteosarcomas. *J Vet Intern Med* 18:859–865
 175. Urakawa H, Nishida Y, Naruse T, et al (2009) Cyclooxygenase-2 overexpression predicts poor survival in patients with high-grade extremity osteosarcoma: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res* 467:2932
 176. Lee EJ, Choi EM, Kim SR, et al (2007) Cyclooxygenase-2 promotes cell proliferation, migration and invasion in U2OS human osteosarcoma cells. *Exp Mol Med* 39:469
 177. Liu B, Shi Z, Feng J, Tao H (2008) Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in human osteosarcoma cell line MG-63 via down-regulation of PI3K/Akt. *Cell Biol Int* 32:494–501
 178. Wolfesberger B, Walter I, Hoelzl C, et al (2006) Antineoplastic effect of the cyclooxygenase inhibitor meloxicam on canine osteosarcoma cells. *Res Vet Sci* 80:308–316. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2005.07.013>
 179. Zhang Y, Zhang M (2002) Calcium phosphate/chitosan composite scaffolds for controlled in vitro antibiotic drug release. *J Biomed Mater Res* 62:378–386. <https://doi.org/10.1002/jbm.10312>
 180. Witzler M, Ottensmeyer PF, Gericke M, et al (2019) Non-Cytotoxic Agarose/Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Drug Release. *Int J Mol Sci* 20:3565
 181. Yan J, Miao Y, Tan H, et al (2016) Injectable alginate/hydroxyapatite gel scaffold combined with gelatin microspheres for drug delivery and bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C* 63:274–284. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2016.02.071>
 182. Paris JL, Román J, Manzano M, et al (2015) Tuning dual-drug release from composite scaffolds for bone regeneration. *Int J Pharm* 486:30–37. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2015.03.048>
 183. Božić BD (2013) Sinteza, struktura i svojstva potencijalno biološki aktivnih derivata propanske kiseline
 184. Janačković D, Jankovic-Castvan I, Petrović R, et al (2003) Surface Properties of HA_p Particles Obtained by Hydrothermal Decomposition of Urea and Calcium-EDTA Chelates. *Key Eng Mater* 240–242:437–440. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.240-242.437>
 185. Вељовић Ђ (2020) Биокерамички материјали на бази калцијум-фосфата: процесирање, својства и примена. Монографија. Технолошко-Металуршки факултет, Универзитет у Београду
 186. Ugrinovic V, Panic V, Spasojevic P, et al (2022) Strong and tough, pH sensible, interpenetrating network hydrogels based on gelatin and poly(methacrylic acid). *Polym Eng Sci* 62:622–636. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pen.25870>
 187. Shao C, Chang H, Wang M, et al (2017) High-Strength, Tough, and Self-Healing Nanocomposite Physical Hydrogels Based on the Synergistic Effects of Dynamic Hydrogen Bond and Dual Coordination Bonds. *ACS Appl Mater Interfaces* 9:28305–28318. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b09614>
 188. Yasin A, Li H, Lu Z, et al (2014) A shape memory hydrogel induced by the interactions between

- metal ions and phosphate. *Soft Matter* 10:972–977
189. Asadian-Ardakani V, Saber-Samandari S, Saber-Samandari S (2016) The effect of hydroxyapatite in biopolymer-based scaffolds on release of naproxen sodium. *J Biomed Mater Res Part A* 104:2992–3003. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35838>
 190. Higuchi T (1963) Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J Pharm Sci* 52:1145–1149. <https://doi.org/10.1002/jps.2600521210>
 191. Ritger PL, Peppas NA (1987) A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J Control Release* 5:23–36. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(87\)90034-4](https://doi.org/10.1016/0168-3659(87)90034-4)
 192. Chenite A, Chaput C, Wang D, et al (2000) Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials* 21:2155–2161. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00116-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00116-2)
 193. Pezzoli D, Cauli E, Chevallier P, et al (2017) Biomimetic coating of cross-linked gelatin to improve mechanical and biological properties of electrospun PET: A promising approach for small caliber vascular graft applications. *J Biomed Mater Res Part A* 105:2405–2415. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jbm.a.36098>
 194. Mhd Sarbon N, Badii F, Howell NK (2013) Preparation and characterisation of chicken skin gelatin as an alternative to mammalian gelatin. *Food Hydrocoll* 30:143–151. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.009>
 195. Faldi A, Tirrell M, Lodge TP, von Meerwall E (1994) Monomer Diffusion and the Kinetics of Methyl Methacrylate Radical Polymerization at Intermediate to High Conversion. *Macromolecules* 27:4184–4192. <https://doi.org/10.1021/ma00093a020>
 196. Tajiri T, Morita S, Ozaki Y (2009) Hydration mechanism on a poly(methacrylic acid) film studied by in situ attenuated total reflection infrared spectroscopy. *Polymer (Guildf)* 50:5765–5770. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymer.2009.09.060>
 197. Derkach SR, Voron'ko NG, Sokolan NI, et al (2020) Interactions between gelatin and sodium alginate: UV and FTIR studies. *J Dispers Sci Technol* 41:690–698. <https://doi.org/10.1080/01932691.2019.1611437>
 198. Zhang HJ, Sun TL, Zhang AK, et al (2016) Tough Physical Double-Network Hydrogels Based on Amphiphilic Triblock Copolymers. *Adv Mater* 28:4884–4890. <https://doi.org/10.1002/adma.201600466>
 199. Han M-H, Kim J-W, Kim J, et al (2003) Temperature-dependent transparency of poly(HPMA-co-DMA) hydrogels: effect of synthesis parameters. *Polymer (Guildf)* 44:4541–4546. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(03\)00387-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-3861(03)00387-2)
 200. Gehrke SH, Palasis M, Akhtar MK (1992) Effect of synthesis conditions on properties of poly(N-isopropylacrylamide) gels. *Polym Int* 29:29–36. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pi.4990290107>
 201. Ooi SY, Ahmad I, Amin MCIM (2016) Cellulose nanocrystals extracted from rice husks as a reinforcing material in gelatin hydrogels for use in controlled drug delivery systems. *Ind Crops Prod* 93:227–234. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.082>
 202. Panic V V, Jovanovic JD, Popovic IG, et al (2023) The study of composition-properties relationships for composite hydrogels based on poly (methacrylic acid) and high concentrations of MFI zeolite. *Polymer (Guildf)* 269:125750
 203. Fyfe CA, McKinnon MS (1986) Investigation of the thermal degradation of poly(acrylic acid) and poly(methacrylic acid) by high-resolution carbon-13 CP/MAS NMR spectroscopy. *Macromolecules* 19:1909–1912. <https://doi.org/10.1021/ma00161a021>
 204. Schild HG (1993) Thermal degradation of poly(methacrylic acid): Further studies applying

- TGA/FTIR. *J Polym Sci Part A Polym Chem* 31:2403–2405.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pola.1993.080310925>
205. McCluskey PH, Snyder RL, Condrate RA (1989) Infrared spectral studies of various metal polyacrylates. *J Solid State Chem* 83:332–339. [https://doi.org/10.1016/0022-4596\(89\)90183-7](https://doi.org/10.1016/0022-4596(89)90183-7)
 206. Lei J, Mayer C, Freger V, Ulbricht M (2013) Synthesis and Characterization of Poly(ethylene glycol) Methacrylate Based Hydrogel Networks for Anti-Biofouling Applications. *Macromol Mater Eng* 298:967–980. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mame.201200297>
 207. Yanagishita M (1993) Function of proteoglycans in the extracellular matrix. *Acta Pathol Jpn* 43:283–293. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.1993.tb02569.x>
 208. Temenoff JS, Mikos AG (2000) Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 21:431–440. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00213-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00213-6)
 209. Soltz MA, Ateshian GA (1998) Experimental verification and theoretical prediction of cartilage interstitial fluid pressurization at an impermeable contact interface in confined compression. *J Biomech* 31:927–934. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(98\)00105-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9290(98)00105-5)
 210. Ateshian GA, Lai WM, Zhu WB, Mow VC (1994) An asymptotic solution for the contact of two biphasic cartilage layers. *J Biomech* 27:1347–1360. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0021-9290\(94\)90044-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0021-9290(94)90044-2)
 211. Ateshian GA, Wang H (1995) A theoretical solution for the frictionless rolling contact of cylindrical biphasic articular cartilage layers. *J Biomech* 28:1341–1355. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0021-9290\(95\)00008-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0021-9290(95)00008-6)
 212. Panic V, Adnadjevic B, Velickovic S, Jovanovic J (2010) The effects of the synthesis parameters on the xerogels structures and on the swelling parameters of the poly(methacrylic acid) hydrogels. *Chem Eng J* 156:206–214. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2009.10.040>
 213. Im G-I, Ko J-Y, Lee JH (2012) Chondrogenesis of Adipose Stem Cells in a Porous Polymer Scaffold: Influence of the Pore Size. *Cell Transplant* 21:2397–2405. <https://doi.org/10.3727/096368912X638865>
 214. Yamane S, Iwasaki N, Kasahara Y, et al (2007) Effect of pore size on in vitro cartilage formation using chitosan-based hyaluronic acid hybrid polymer fibers. *J Biomed Mater Res Part A* 81A:586–593. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31095>
 215. Oh SH, Kim TH, Im G Il, Lee JH (2010) Investigation of Pore Size Effect on Chondrogenic Differentiation of Adipose Stem Cells Using a Pore Size Gradient Scaffold. *Biomacromolecules* 11:1948–1955. <https://doi.org/10.1021/bm100199m>
 216. Lien S-M, Ko L-Y, Huang T-J (2009) Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomater* 5:670–679. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.09.020>
 217. Gupte MJ, Swanson WB, Hu J, et al (2018) Pore size directs bone marrow stromal cell fate and tissue regeneration in nanofibrous macroporous scaffolds by mediating vascularization. *Acta Biomater* 82:1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.10.016>
 218. Zhang Q, Lu H, Kawazoe N, Chen G (2014) Pore size effect of collagen scaffolds on cartilage regeneration. *Acta Biomater* 10:2005–2013. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.042>
 219. Griffon DJ, Sedighi MR, Schaeffer D V, et al (2006) Chitosan scaffolds: Interconnective pore size and cartilage engineering. *Acta Biomater* 2:313–320. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2005.12.007>
 220. Wu K-H, Mei C, Lin C-W, et al (2018) The influence of bubble size on chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells in gelatin microbubble scaffolds. *J Mater Chem B* 6:125–132. <https://doi.org/10.1039/C7TB02244A>

221. Kemppainen JM, Hollister SJ (2010) Differential effects of designed scaffold permeability on chondrogenesis by chondrocytes and bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 31:279–287. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.041>
222. Means AK, Shrode CS, Whitney L V, et al (2019) Double Network Hydrogels that Mimic the Modulus, Strength, and Lubricity of Cartilage. *Biomacromolecules* 20:2034–2042. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00237>
223. Xiang S, Qian W, Li T, et al (2017) Hierarchical structural double network hydrogel with high strength, toughness, and good recoverability. *New J Chem* 41:14397–14402. <https://doi.org/10.1039/C7NJ03263C>
224. Du G, Gao G, Hou R, et al (2014) Tough and Fatigue Resistant Biomimetic Hydrogels of Interlaced Self-Assembled Conjugated Polymer Belts with a Polyelectrolyte Network. *Chem Mater* 26:3522–3529. <https://doi.org/10.1021/cm501095s>
225. Li H, Wang H, Zhang D, et al (2018) A highly tough and stiff supramolecular polymer double network hydrogel. *Polymer (Guildf)* 153:193–200. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymer.2018.08.029>
226. Li T, Song X, Weng C, et al (2019) Silk fibroin/carboxymethyl chitosan hydrogel with tunable biomechanical properties has application potential as cartilage scaffold. *Int J Biol Macromol* 137:382–391. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.245>
227. O'Brien S, Brannigan RP, Ibanez R, et al (2020) Biocompatible polypeptide-based interpenetrating network (IPN) hydrogels with enhanced mechanical properties. *J Mater Chem B* 8:7785–7791. <https://doi.org/10.1039/D0TB01422B>
228. Huang T, Xu HG, Jiao KX, et al (2007) A Novel Hydrogel with High Mechanical Strength: A Macromolecular Microsphere Composite Hydrogel. *Adv Mater* 19:1622–1626. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adma.200602533>
229. Dong W, Huang C, Wang Y, et al (2013) Superior Mechanical Properties of Double-Network Hydrogels Reinforced by Carbon Nanotubes without Organic Modification. *Int J Mol Sci* 14:22380–22394. <https://doi.org/10.3390/ijms141122380>
230. Wang J, Lou L, Qiu J (2019) Super-tough hydrogels using ionically crosslinked networks. *J Appl Polym Sci* 136:48182. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/app.48182>
231. Wang J, Zhang F, Tsang WP, et al (2017) Fabrication of injectable high strength hydrogel based on 4-arm star PEG for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 120:11–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.12.015>
232. Zhao Y, Li M, Liu B, et al (2018) Ultra-tough injectable cytocompatible hydrogel for 3D cell culture and cartilage repair. *J Mater Chem B* 6:1351–1358. <https://doi.org/10.1039/C7TB03177G>
233. He Q, Huang Y, Wang S (2018) Hofmeister Effect-Assisted One Step Fabrication of Ductile and Strong Gelatin Hydrogels. *Adv Funct Mater* 28:1705069. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adfm.201705069>
234. Fathi A, Lee S, Zhong X, et al (2013) Fabrication of interpenetrating polymer network to enhance the biological activity of synthetic hydrogels. *Polymer (Guildf)* 54:5534–5542. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymer.2013.08.052>
235. Thiele J, Ma Y, Bruekers SMC, et al (2014) 25th Anniversary Article: Designer Hydrogels for Cell Cultures: A Materials Selection Guide. *Adv Mater* 26:125–148. <https://doi.org/10.1002/adma.201302958>
236. Han L, Xu J, Lu X, et al (2017) Biohybrid methacrylated gelatin/polyacrylamide hydrogels for cartilage repair. *J Mater Chem B* 5:731–741. <https://doi.org/10.1039/C6TB02348G>
237. Wallin RF, Arscott EF (1998) A practical guide to ISO 10993-5: Cytotoxicity. *Med Device Diagnostic Ind* 20:96–98

238. Das D, Ghosh P, Dhara S, et al (2015) Dextrin and Poly(acrylic acid)-Based Biodegradable, Non-Cytotoxic, Chemically Cross-Linked Hydrogel for Sustained Release of Ornidazole and Ciprofloxacin. *ACS Appl Mater Interfaces* 7:4791–4803. <https://doi.org/10.1021/am508712e>
239. Fan W, Zhang Z, Liu Y, et al (2021) Shape memory polyacrylamide/gelatin hydrogel with controllable mechanical and drug release properties potential for wound dressing application. *Polymer (Guildf)* 226:123786. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymer.2021.123786>
240. Tu C-W, Tsai F-C, Chen J-K, et al (2020) Preparations of Tough and Conductive PAMPS/PAA Double Network Hydrogels Containing Cellulose Nanofibers and Polypyrroles. *Polymers (Basel)* 12:. <https://doi.org/10.3390/polym12122835>
241. Chapin RE, Fail PA, George JD, et al (1995) The Reproductive and Neural Toxicities of Acrylamide and Three Analogues in Swiss Mice, Evaluated Using the Continuous Breeding Protocol. *Fundam Appl Toxicol* 27:9–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/faat.1995.1104>
242. D'souza AA, Shegokar R (2016) Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. *Expert Opin Drug Deliv* 13:1257–1275. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1182485>
243. Kucharski M, Lubczak R (1997) Copolymerization of hydroxyalkyl methacrylates with acrylamide and methacrylamide I. Determination of reactivity ratios. *J Appl Polym Sci* 64:1259–1265. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19970516\)64:7<1259::AID-APP3>3.0.CO;2-I](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19970516)64:7<1259::AID-APP3>3.0.CO;2-I)
244. Yang F, Zhao J, Koshut WJ, et al (2020) A Synthetic Hydrogel Composite with the Mechanical Behavior and Durability of Cartilage. *Adv Funct Mater* 30:2003451. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adfm.202003451>
245. Czyrski A (2022) The spectrophotometric determination of lipophilicity and dissociation constants of ciprofloxacin and levofloxacin. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 265:120343. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120343>
246. Cao H, Wang Q, Li M, Chen Z (2015) Synthesis of stimuli-responsive poly(ethylene glycol) diacrylate/methacrylic acid-based nanogels and their application as drug delivery vehicle. *Colloid Polym Sci* 293:441–451. <https://doi.org/10.1007/s00396-014-3422-6>
247. Hennink WE, van Nostrum CF (2002) Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev* 54:13–36. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00240-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00240-X)
248. Liang Y, Ye L, Sun X, et al (2020) Tough and Stretchable Dual Ionically Cross-Linked Hydrogel with High Conductivity and Fast Recovery Property for High-Performance Flexible Sensors. *ACS Appl Mater Interfaces* 12:1577–1587. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b18796>
249. Cao J, Wang Y, He C, et al (2020) Ionically crosslinked chitosan/poly (acrylic acid) hydrogels with high strength, toughness and antifreezing capability. *Carbohydr Polym* 242:116420
250. Chou J, Valenzuela SM, Santos J, et al (2014) Strontium- and magnesium-enriched biomimetic β -TCP microspheres with potential for bone tissue morphogenesis. *J Tissue Eng Regen Med* 8:771–778. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/term.1576>
251. Hassan RM (2020) Prospective and comparative Novel technique for evaluation the affinity of alginate for binding the alkaline-earth metal ions during formation the coordination biopolymer hydrogel complexes. *Int J Biol Macromol* 165:1022–1028. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.155>
252. Suchanek WL, Byrappa K, Shuk P, et al (2004) Preparation of magnesium-substituted hydroxyapatite powders by the mechanochemical–hydrothermal method. *Biomaterials* 25:4647–4657
253. Fadeev I V, Shvorneva LI, Barinov SM, Orlovskii VP (2003) Synthesis and Structure of Magnesium-Substituted Hydroxyapatite. *Inorg Mater* 39:947–950. <https://doi.org/10.1023/A:1025509305805>

254. Cacciotti I, Bianco A, Lombardi M, Montanaro L (2009) Mg-substituted hydroxyapatite nanopowders: Synthesis, thermal stability and sintering behaviour. *J Eur Ceram Soc* 29:2969–2978. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2009.04.038>
255. Kim SR, Lee JH, Kim YT, et al (2003) Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors. *Biomaterials* 24:1389–1398
256. Mahdavinia GR, Karimi MH, Soltaniniya M, Massoumi B (2019) In vitro evaluation of sustained ciprofloxacin release from κ -carrageenan-crosslinked chitosan/hydroxyapatite hydrogel nanocomposites. *Int J Biol Macromol* 126:443–453. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.240>
257. Mow VC, Ratcliffe A, Robin Poole A (1992) Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials* 13:67–97. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0142-9612\(92\)90001-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0142-9612(92)90001-5)
258. Warner RR, Myers MC, Taylor DA (1988) Electron Probe Analysis of Human Skin: Determination of the Water Concentration Profile. *J Invest Dermatol* 90:218–224. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12462252>
259. Cho YS, Hong MW, Jeong H-J, et al (2017) The fabrication of well-interconnected polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds, enhancing the exposure of hydroxyapatite using the wire-network molding technique. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 105:2315–2325. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jbm.b.33769>
260. Asmarandei I, Fundueanu G, Cristea M, et al (2013) Thermo- and pH-sensitive interpenetrating poly(N-isopropylacrylamide)/carboxymethyl pullulan network for drug delivery. *J Polym Res* 20:293. <https://doi.org/10.1007/s10965-013-0293-3>
261. Raho R, Paladini F, Lombardi FA, et al (2015) In-situ photo-assisted deposition of silver particles on hydrogel fibers for antibacterial applications. *Mater Sci Eng C* 55:42–49. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.05.050>
262. Lezaja M, Veljovic DN, Jokic BM, et al (2013) Effect of hydroxyapatite spheres, whiskers, and nanoparticles on mechanical properties of a model BisGMA/TEGDMA composite initially and after storage. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 101:1469–1476. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32967>
263. Valdés L, Pérez I, de Ménorval LC, et al (2017) A simple way for targeted delivery of an antibiotic: In vitro evaluation of a nanoclay-based composite. *PLoS One* 12:e0187879
264. Alinavaz S, Mahdavinia GR, Jafari H, et al (2021) Hydroxyapatite (HA)-based hybrid bionanocomposite hydrogels: Ciprofloxacin delivery, release kinetics and antibacterial activity. *J Mol Struct* 1225:129095. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129095>
265. Khalil IA, Saleh B, Ibrahim DM, et al (2020) Ciprofloxacin-loaded bioadhesive hydrogels for ocular applications. *Biomater Sci* 8:5196–5209. <https://doi.org/10.1039/D0BM00935K>
266. Oliveira IM, Borges A, Borges F, Simões M (2019) Repurposing ibuprofen to control *Staphylococcus aureus* biofilms. *Eur J Med Chem* 166:197–205. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.046>
267. Singh BR (2021) Mitigating antimicrobial resistance with aspirin (acetylsalicylic acid) and paracetamol (acetaminophen): Conversion of doxycycline and minocycline resistant bacteria into sensitive in presence of aspirin and paracetamol. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.05.21.445232>
268. Rabbani MG, Islam MR (2020) Synthesis and Characterization of Some NH-Analogues of Ciprofloxacin on Antibacterial, Antifungal, and Cytotoxic Activities. *J Sci Res* 12:349–362. <https://doi.org/10.3329/jsr.v12i3.42804>
269. Sultana N, Arayne MS, Rizvi SBS, Haroon U (2011) Synthesis, characterization and biological evaluations of ciprofloxacin carboxamide analogues. *Bull Korean Chem Soc* 32:483–488

БИОГРАФИЈА АУТОРА

Вукашин (Ђорђе) Угриновић, мастер инжењер технологије, рођен је 07.05.1992. године у Крагујевцу, где је завршио основну школу и гимназију. Основне студије на Технолошко – металуршком факултету, смер Инжењерство материјала, завршио је 2015. године са просечном оценом 8,94, а мастер студије 2017. године, такође на студијском програму Инжењерство материјала. Научно и стручно искуство стицао је током праксе на Ћулалонгхорн универзитету на Тајланду и раду у компанијама Роберт Бош и Велестрој. Школске 2017/2018. године уписао је докторске студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, на студијском програму Инжењерство материјала. Од септембра 2018. године запослен је у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије „Синтеза, развој технологије добијања и примена наноструктурних мултифункционалних материјала дефинисаних својстава“ бр. ИИИ45019.

Коаутор је 11 радова, од којих су два у међународном часопису изузетне вредности (M21a), два у врхунском међународном часопису (M21), четири у истакнутом међународном часопису (M22), два у међународном часопису (M23) и један у врхунском часопису националног значаја (M51), неколико саопштења са међународног скупа (M34) и једног патента (M90). Укупан број цитата научних радова износи 59. Хиршов индекс је $h = 6$.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Вукашин Ђ. Угриновић
Број индекса 4008/2017

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Композитни хидрогелови на бази интерпенетрирајућих мрежа винилних и природних полимера и наночестица калцијум-фосфата: Синтеза, својства и примена у биомедицини

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 08.11.2023.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Вукашин Ђ. Угриновић

Број индекса 4008/2017

Студијски програм Инжењерство материјала

Наслов рада Композитни хидрогелови на бази интерпенетрирајућих мрежа винилних и природних полимера и наночестица калцијум-фосфата: Синтеза, својства и примена у биомедицини

Ментор др Ђорђе Вељовић, ванредни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет; др Весна Панић, виши научни сарадник Универзитета у Београду, Иновациони центар Технолошко-металуршког факултета

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 08.11.2023.

Изјава о коришћењу

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

Композитни хидрогелови на бази интерпенетрирајућих мрежа винилних и природних полимера и наночестица калцијум-фосфата: Синтеза, својства и примена у биомедицини

која је моје ауторско дело.

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

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

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 08.11.2023.

ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „**Композитни хидрогелови на бази интерпенетрирајућих мрежа винилних и природних полимера и наночестица калцијум-фосфата: синтеза, својства и примена у биомедицини**“, аутора **Вукашина Угриновић, мастер инж. технологије**, констатујемо да утврђено подудараре текста износи **2%**. Овај степен подударности претежно је последица употребљених личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, назива коришћених аналитичких метода, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације што је у складу са чланом 9. Правилника.

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

08.11.2023. године

Ментори

Др Ђорђе Вељовић, ванредни професор
Универзитета у Београду, Технолошко-
металуршки факултет

Др Весна Панић, виши научни сарадник
Универзитета у Београду, Иновациони центар
Технолошко-металуршког факултета