

SIMONIDA Lj. TOMIĆ¹
MAJA M. MIČIĆ²
BOJANA D. KREZOVIĆ¹
SAVA N. DOBIĆ¹
EDIN H. SULJOVRUJIĆ²
JOVANKA M. FILIPOVIĆ¹

¹Tehnološko-metalurški fakultet,
Univerzitet u Beogradu, Beograd
²Institut za nuklearne nauke Vinča,
Beograd, Srbija

NAUČNI RAD

UDK 678.06:615.454.1:547.463:
:66.253.094.32

DOI: 10.2298/HEMIND0906603T

INTELIGENTNI HIDROGELOVI NA BAZI ITAKONSKE KISELINE ZA BIOMEDICINSKU PRIMENU

pH i temperaturno osetljivi hidrogelovi na bazi kopolimera 2-hidroksietilmetakrilata (HEMA) i itakonske kiseline (IK) sintetisani su upotrebom gama zračenja i karakterisani s ciljem ispitivanja njihove potencijalne primene kao biomaterijala. Ispitivan je uticaj odnosa komonomera u ovim inteligentnim polimernim biomaterijalima na morfologiju, mehanička svojstva, biokompatibilnost i penetraciju mikroba. Mehanička svojstva kopolimera su ispitivana dinamičko-mehaničkom analizom (DMA), dok je morfologija karakterisana skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM). Pokazalo se da su morfologija i mehanička svojstva ovih hidrogelova odgovarajući za većinu biomedicinskih primena. In vitro analizom biokompatibilnosti P(HEMA/IK) hidrogelova potvrđeno je da nisu toksični za ćelije niti izazivaju značajnu hemolitičku aktivnost. Takođe, test mikrobne penetracije pokazao je da ni Staphylococcus aureus ni Escherichia coli ne prolaze kroz hidrogelne obloge; stoga se P(HEMA/IK) obloge mogu smatrati dobrom barijerom protiv mikroba, a radi održavanja sterilnosti okolne sredine. Svi rezultati pokazuju da P(HEMA/IK) hidrogelovi imaju veliku mogućnost primene u biomedicini, posebno kod tretmana kože i kao obloge za opekotine.

Hidrogelovi na bazi kopolimera 2-hidroksietilmetakrilata su od velikog interesa za biomedicinske primene zbog njihovog odgovarajućeg hemijskog sastava i trodimenzionalne strukture polimerne mreže. Oni se mogu dizajnirati tako da sadrže optimalnu količinu vode ili bioloških fluida u vodenoj sredini a da se pri tome ne rastvaraju, da imaju dobra mehanička svojstva, propustljivost za kiseonik, biokompatibilnost, stabilnost oblika i mekoću sličnu onoj koju poseduju meka tkiva. Ovi materijali su takođe interesantni i zbog dobre hemijske i biohemijske stabilnosti, izuzetne propustljivosti za vodorastvorne hranljive materije i metabolite [1-3]. Temeljno izučavanje i razumevanje interakcija fluid-polimerni hidrogel i odgovarajućih fizičko-hemijskih i biomedicinskih fenomena ovih sistema veoma je značajno za razvoj ovih materijala u biomedicinske svrhe. Inteligentni hidrogelovi se kreiraju kao materijali osetljivi na stimulanse iz spoljašnje sredine, koji menjaju zapreminu kao odgovor na promenu temperature, pH, pritiska, ili delovanjem bioloških agenasa (antigen, nutrient, faktor rasta, receptor, antitelo, enzim ili cela ćelija) [4]. Ove jedinstvene karakteristike su od velikog značaja u lečenju rana, inkapsulaciji ćelija, otpuštanju lekova i inženjerstvu tkiva [5-7]. Poli(2-hidroksietilmetakrilat) (HEMA) jedan je od najviše ispitanih gelova zbog odlične biokompatibilnosti i fizičko-hemijskih svojstava sličnih živim tkivima [8,9]. Takođe, pokazuje dobru hemijsku i hidrolitičku stabilnost i tolerantnost prema inkapsuliranim ćelijama. Korišćen je kao jedna od komponenata za sintezu hidrogelova osetljivih na različite stimulanse [10]. Do sada su izvedene brojne studije modifikovanja PHEMA sa ciljem da se poboljšaju

mehanička svojstva [10-12], osetljivost na elektro-stimulaciju [13] i unapredi biološki odgovor [14]. Kopolimeri HEMA sa metakrilnom [15,16] i akrilnom kiselinom [12,17,18], kao pH osetljivim komponentama, i određenim monoalkil estrima itakonske kiseline [19] takođe su istraživani. S druge strane, mogućnost za supstituciju akrilne i metakrilne kiseline u hidrogelovima sa itakonskom kiselinom ima veliki potencijal. Itakonska kiselina lako kopolimerizuje, dajući polimerne lance sa bočnim karboksilnim grupama, koje su hidrofilne i sposobne da formiraju vodonične veze sa odgovarajućim grupama. Za razliku od monokarboksilnih, metakrilne i akrilne kiseline, itakonska kiselina ima dve COOH grupe sa različitim vrednostima pK_a ($pK_{a1} = 3,85$ i $pK_{a2} = 5,45$), tako da vrlo male količine IK, manje nego u slučaju akrilne kiseline, obezbeđuju zadovoljavajuću pH osetljivost i povećanje stepena bubrenja hidrogelova [20-22]. Dodatno, ugradnja komonomera koji mogu doprineti stvaranju vodoničnih veza može unaprediti mehaničku jačinu hidrogelova [23]. IK je takođe vrlo hidrofilna i očekivano je da doprinosi boljoj biokompatibilnosti zbog prirodnog porekla. Kombinovanjem temperaturno- i pH-osetljivih komponenti u hidrogelovima se omogućava kontrolisanje ponašanja ovih polimernih biomaterijala, što rezultuje dobijanjem multi-funkcionalnih inteligentnih materijala, kao što su P(HEMA/IK) kopolimerni hidrogelovi.

Analiza bubrenja, mehaničkih svojstava, kao i morfologije je samo prvi korak u ispitivanju hidrogelova za biomedicinsku primenu. Dalje je neophodno izvesti veliki broj *in vitro* i *in vivo* ispitivanja u saglasnosti sa specifičnim biomedicinskim primenama ovih materijala. Nameću se izuzetni, jedinstveni zahtevi i karakterizacija za primenu ovih sistema u kontrolisanom otpuštanju lekova, inkapsulaciji ćelija i inženjerstvu tkiva. Dugoročni potencijal implantirane medicinske „naprave“ i njena funkcionalna efikasnost zahteva idealnu anatom-

Autor za prepisku: S.Lj. Tomić, Tehnološko-metalurški fakultet, Kariševljeva 4/V, Beograd, Srbija.

E-pošta: simonida@tmf.bg.ac.rs

Rad primljen: 29. septembar 2009.

Rad prihvaćen: 26. oktobar 2009.

sku (u nekim slučajevima čak i histološku) i funkcionalnu integraciju sa tkivom i/ili organom. Klinička primena biomaterijala ne sme prouzrokovati neželjene reakcije u organizmu i ne sme ugroziti život pacijenta; bilo koji materijal korišćen kao deo biomedicinske „naprave“ mora biti biokompatibilan. Biokompatibilnost podrazumeva da je materijal netoksičan, ne izaziva alergije, nekancerogen i nemutagen [24]. Opšte je poznato da hidrogelovi poseduju dobru biokompatibilnost [25–27], koja je potvrđena njihovom značajnom primenom u širokom opsegu biomedicinskih primena kao što su oftalmološke i vaskularne proteze [28,29], sistemi za kontrolisano otpuštanje lekova [30,31], zamena mekih tkiva [32], obloge za opekotine [33] i podloge za tkiva [34]. Interakcija hidrogelova sa tkivom i telesnim fluidima je od interesa zbog njihove izuzetne mogućnosti primene. Čelije i potepini generalno pokazuje nisku sklonost ka adheziji za površinu hidrogela zbog niske međupovršinske slobodne energije hidrogelova kada su u kontaktu sa telesnim fluidima [35]. Dobro je poznato da hidrogelovi pokazuju dobru kompatibilnost sa tkivima nakon implantacije i nisu ili su samo neznatno trombogeni u kontaktu sa krvlju. Takođe, struktura hidrogelova slična tkivima minimalizuje iritaciju tkiva izazvanu trenjem nakon implantacije. Zbog toga je *in vitro* analiza citotoksičnosti prvi test procene biokompatibilnosti biomaterijala kao medicinske „naprave“ [35]. Pored toga, ispitivanje hemolitičke aktivnosti može takođe dati važne informacije o hemokompatibilnosti.

Na osnovu ranije iznesenih svojstava, hidrogelne obloge se mogu smatrati dobrom barijerom protiv mikroba, što je značajno u zaštiti rana od dalje infekcije, i može da ubrza zarastanje rane [36,37]. Obloge za opekotine na bazi poli(*N*-vinil pirolidona), poli(etilen glikola) i agar hidrogelova je prvo patentirala grupi naučnika Rosiak-a [38]. Sprečavanje pojave raznih mikroorganizama je vrlo važno, ne samo za biomedicinske primene (bandažeri za opekotine i obloge za rane, kontaktne sočiva, veštačka koža, u sistemima za kontrolisano otpuštanje lekova), već i za primenu u kozmetici i farmaciji [2,38]. Pojava infekcije je vezana za različite bakterije koje se javljaju tokom kontakta sa tkivima ili telesnim tečnostima tokom primene biomaterijala. Većina infekcija je izazvana mikrobima kao što su *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* i *Pseudomonas aeruginosa* [39–42]. Stoga je ispitivanje antibakterijske aktivnosti jedan od važnijih testova za biomedicinsku primenu hidrogelova.

Sinteza novih kopolimernih P(HEMA/IK) hidrogelova, delovanjem gama zračenja, sa različitim sadržajem IK, kao i ispitivanje njihove temperaturne i pH osetljivosti i primene za kontrolisano otpuštanje lekova (teofilin i fenetilin), prikazani su u našem prethodnom radu [6]. U ovom radu su ispitivani inteligentni P(HEMA/IK) kopolimeri, sa sadržajem IK do 5% sa ciljem odredi-

vanja specifičnih svojstva za primenu u biomedicini. Određena su mehanička svojstva, biokompatibilnost, kao i uticaj sadržaja IK u gelovima na ova svojstva. Biokompatibilnost je ispitivana određivanjem *in vitro* citotoksičnosti i hemolitičke aktivnosti. Test penetracije mikroba kroz P(HEMA/IK) hidrogelne obloge je izveden korišćenjem gram-pozitivnih (*Staphylococcus aureus*) i gram-negativnih (*Escherichia coli*) sojeva bakterija.

EKSPERIMENTALNI DEO

Materijal

2-hidroksietil metakrilat (HEMA) (Aldrich), itakonska kiselina (IK) (Aldrich) i etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) (Aldrich) korišćeni su kao reaktanti u sintezi hidrogelova. Pre upotrebe, monomer HEMA je dvostruko destilovan pod vakuumom. Puferski rastvori su pripremani korišćenjem hlorovodonične kiseline (La Chema), kalijum-hidrogen fosfata i kalijum-dihidrogen fosfata (Fluka) i natrijum-hidroksida (Fluka). Demineralizovana voda je korišćena za sve polimerizacije, kao i za pripremu puferskih rastvora.

Priprema hidrogelova

P(HEMA/IK) hidrogelovi su sintetisani radikalnom kopolimerizacijom iniciranom gama zračenjem [6]. Monomeri su rastvoreni u 10 ml smeše voda/etanol. Molski udeo IK je 2,0, 3,5 i 5,0 i prema tom su uzorci označeni kao P(HEMA/2IK), P(HEMA/3.5IK) i P(HEMA/5IK). Reakciona smeša je pre polimerizacije prođuvana azotom i izlivena između staklenih ploča, oivičenih PVC crevom. Rastvor monomera zračen je u radijacionom izvoru ⁶⁰Co, pri brzini od 0,5 kGy/h, do ukupne apsorbovane doze od 25 kGy (na sobnoj temperaturi). Posle toga, hidrogelovi su potapani u deionizovanu vodu, koja je menjana svakog dana (nedelju dana) radi uklanjanja neproreagovanih reaktanata. Gelovi su sečeni u obliku diskova (prečnika 5 mm i debljine 1 mm) i sušeni na sobnoj temperaturi do konstantne mase.

Dinamičko-mehanička analiza (DMA)

Test deformacije u zavisnosti od frekvencije je izveden na diskovima hidrogelova korišćenjem Rheometrics 605 mehaničkog spektrometra, sa geometrijom paralelnih ploča (25 mm u prečniku). Modul sačuvane energije, G' , u ogleđima smicanja je meren kao funkcija frekvence, ω , od 0,1 do 100 rad/s na 37 °C.

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Skenirajući elektronski mikroskop (JEOL, JSM-5300) korišćen je za posmatranje morfologije uzoraka. Svi uzorci su prvo duboko zamrzavani na -80 °C, u trajanju od 24 h, nakon čega su liofilizovani. Uzorci su liofilizovani korišćenjem Modulyo Freeze Dryer System Edwards koji se sastoji od liofilizatorske jedinice i va-

kuum pumpe E2M8 Edwards. Pre posmatranja uzorci gelova su prevučeni tankim slojem zlata.

Hemolitička aktivnost

Hemolitička aktivnost hidrogelova je određivana metodom direktnog i indirektnog kontakta, prema ISO 10 993-4 (1992) [35]. U direktnoj metodi, diskovi hidrogelova su potapani u 5 ml fiziološkog rastvora (PS) u koji je dodato 0,25 ml krvi pacova. Fiziološki rastvor i destilovana voda su korišćeni kao negativna i pozitivna kontrola. Sadržaj epruveta je blago mešan i inkubiran 1 h u vodenom kupatilu na 37 °C. Nakon toga je određivana apsorbancija supernatantne tečnosti u svakoj epruveti na 545 nm, korišćenjem Pharmacia LKB Ultrospec Plus UV/Vis spektrofotometra i računat je procenat hemolize. Srednja hemolitička vrednost iz dva testa uzorka od 5% ili manje se smatra prihvatljivom. U metodi indirektnog kontakta, 5 ml izotoničnog vodenog ekstrakta iz diskova hidrogelova korišćeno je sa 0,25 ml 10% suspenzije eritrocita pacova. Za pripremanje izotoničnog vodenog ekstrakta, komadić svakog diska držan je na 37 °C u toku 72 h u 100 ml sterilisane bidestilovane vode, a zatim je dodato 0,9 g NaCl. Negativna kontrola bio je 0,9% rastvor NaCl i 100% hemolize je postignuto u bidestilovanoj vodi. Nakon inkubacije na 37 °C u toku 24 h, merena je apsorbancija supernatanta na 545 nm i računat je procenat hemolize.

Proba citokompatibilnosti

Citokompatibilnost hidrogelova testirana je *in vitro* metodom ćelijske vijabilnosti prema Ciapetti i sar. [43,44]. Rastvor fenola (0,02 mas%) i ekstrakt polietilena visoke gustine (HDPE) korišćeni su kao pozitivna i negativna kontrola. Procenat vijabilnosti računat je u odnosu na ćelijsku kontrolu.

Studija bubrenja hidrogelova

Eksperimenti dinamičkog bubrenja izvedeni su u puferskom rastvoru pH 7,40 (simuliran fiziološki fluid) na 37 °C. Nabubreo gel je uklanjan iz puferskog rastvora u određenim vremenskim intervalima, pažljivo brisan filter papirom, meren i vraćan u isto kupatilo. Merenje je nastavljano do dostizanja konstantne mase za svaki uzorak. Količina apsorbiranog fluida je praćena gravimetrijski. Ravnotežni stepen bubrenja, q_e , je računat kao:

$$q_e = (M_e - M_0) / M_0 \quad (1)$$

gde je M_e masa nabubregog gela u ravnoteži, a M_0 masa ksero gela [45,46]. Svi eksperimenti bubrenja su izvedeni u triplikatu.

Test mikrobnе penetracije

Za određivanje mogućnosti penetracije bakterija, korišćeni su hidrogelovi u obliku ploča, površine 5×10 cm² i debljine 2 mm. Gornja površina gela kontami-

nirana je sa 100 μl inokuliranom tokom noći kulturom (10⁷ CFU/ml) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) i *Escherichia coli* (ATCC 25922). Kontaminirani gelovi smešteni su na površinu sterilne ploče agara (TSA-Tryptone soy agar) u Petri šolje (prečnika 9 cm) i zatim inkubirani na 37 °C u toku 24 h. Nakon toga, hidrogelovi su uklanjani iz agara i vršeno je prebrojavanje formiranih kolonija na površini.

REZULTATI I DISKUSIJA

Mehanička svojstva gelova

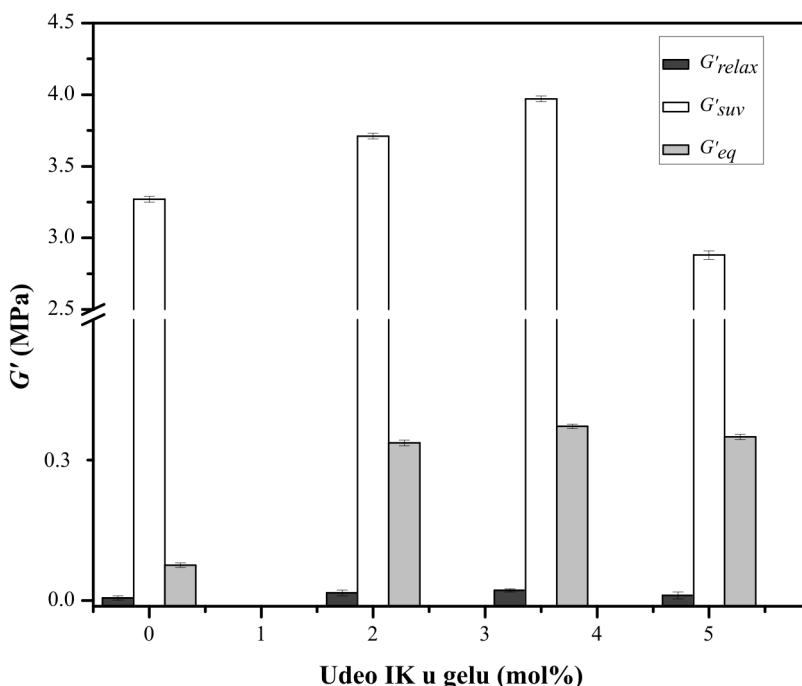
Mehanička jačina i stabilnost su vrlo važna svojstva polimernih biomaterijala, naročito za hidrogelove [47]. Izvedena dinamičko-mehanička analiza PHEMA i P(HEMA/IK) gelova pokazuje odgovarajuće vrednosti modula sačuvane energije, G' , u ogleđima smicanja, u funkciji frekvencije. Slika 1 pokazuje promenu modula smicanja u zavisnosti od udela itakonske kiseline u gelu za P(HEMA/IK) gelove, kao i za homopolimerni PHEMA gel, odmah nakon sinteze (relaksirano stanje), G'_r , u stanju ravnotežnog bubrenja, G'_{eq} , i u suvom stanju, G'_{su} . Očigledno je da sva tri tipa modula zavise od udela itakonske kiseline. U početku, moduli (u sva tri stanja) rastu kako raste sadržaj IK od 0–3,5 mol% IK, a zatim opadaju. Dodatak male količine IK, do 3,5 mol%, poboljšava mehaničku jačinu polimerne mreže. Za veći sadržaj IK (5 mol%), G' vrednosti gelova opadaju.

Suvi gelovi pokazuju najviše G' vrednosti kad se poredi sva tri stanja gelova, u opsegu od 3,27–3,97 MPa. Niže G' vrednosti su detektovane u stanju ravnotežnog bubrenja hidrogelova (63,03–310,1 KPa), u kojem bubrenje dostiže najvišu, ravnotežnu vrednost. Dodatak male količine IK, do 3,5 mol%, poboljšava mehaničku jačinu polimerne mreže, usled bubrenja u fluidu (vrednosti ravnotežnog stepena bubrenja gelova, q_e , rastu od 0,55 do 1,10) i dodatnog fizičkog umreženja vodoničnim vezama između funkcionalnih grupa HEMA i IK. Za veći sadržaj IK (5 mol%), G' vrednosti gelova opadaju, zbog preovlađujućeg efekta hidrofilnih –COOH grupa koje dovode do porasta bubrenja hidrogelova (q_e je 1,76) i može se zaključiti da je to razlog opadanja mehaničke jačine mreže.

Najniže vrednosti modula su u relaksiranom stanju (4,73–18,4 KPa), kao rezultat prisustva neporeagovalih monomera koji deluju kao plastifikatori, na taj način smanjujući jačinu gela. Kopolimeri P(HEMA/2IK) i P(HEMA/3.5IK) imaju zadovoljavajući stepen bubrenja i mehaničku jačinu za primenu u sistemima za kontrolisano otpuštanje lekova [21].

Morfologija gelova (SEM)

U cilju određivanja morfologije i poroznosti sintetisanih gelova, urađena je skenirajuća elektronska mikroskopija. Slika 2 prikazuje SEM mikrofotografije P(HEMA/



Slika 1. Zavisnost modula sačuvane energije, G' , u modu smicanja od udela IK u hidrogelu u tri stanja: relaksiranom, stanju ravnotežnog bubrenja i suvom.

Figure 1. Shear modulus, G' , dependence on IA fraction of hydrogel in three states: relaxation, equilibrium swelling and dry.

/3.5IK) hidrogela pri različitim uvećanjima. Donji deo slike 2 pokazuje SEM mikrografe neliofilizovanih uzoraka P(HEMA/3.5IK) hidrogela. Površina gela je kompaktna i ravna. S druge strane, može se uočiti heterogena raspodela pora kod liofilizovanog uzorka P(HEMA/3.5IK) gela (slika 2, gornji deo). Podešavanjem uslova sinteze i izborom komponenata u dobijanju gelova su dizajnirani hidrogelovi sa željenom morfologijom, a sve u cilju biomedicinske primene u aktivnom tretmanu kože i rana.

Analiza hemolitičke aktivnosti gelova

Test hemolize je izveden na hidrogelovima da bi se odredila hemokompatibilnost biomaterijala. U *in vitro* uslovima testiranja, PHEMA i P(HEMA/IK) hidrogelovi u kontaktu sa krvlju pokazuju srednju vrednost hemolize manju od 1,0% u metodi direktnog kontakta, i čak manje od 0,5% u metodi indirektnog kontakta (tabela 1). Prema dobijenim rezultatima, ovi hidrogelovi ne pokazuju značajnu hemolitičku aktivnost. Gelovi sa većim sadržajem IK pokazuju niži stepen hemolize, tj. bolju hemokompatibilnost. Zaključak je da itakonska kiselina, koja vodi poreklo od prirodno-obnovljivih resursa, ugrađena u gelove u maloj količini (u opsegu od 2 do 5 mol%) poboljšava hemokompatibilnost biomaterijala na bazi PHEMA.

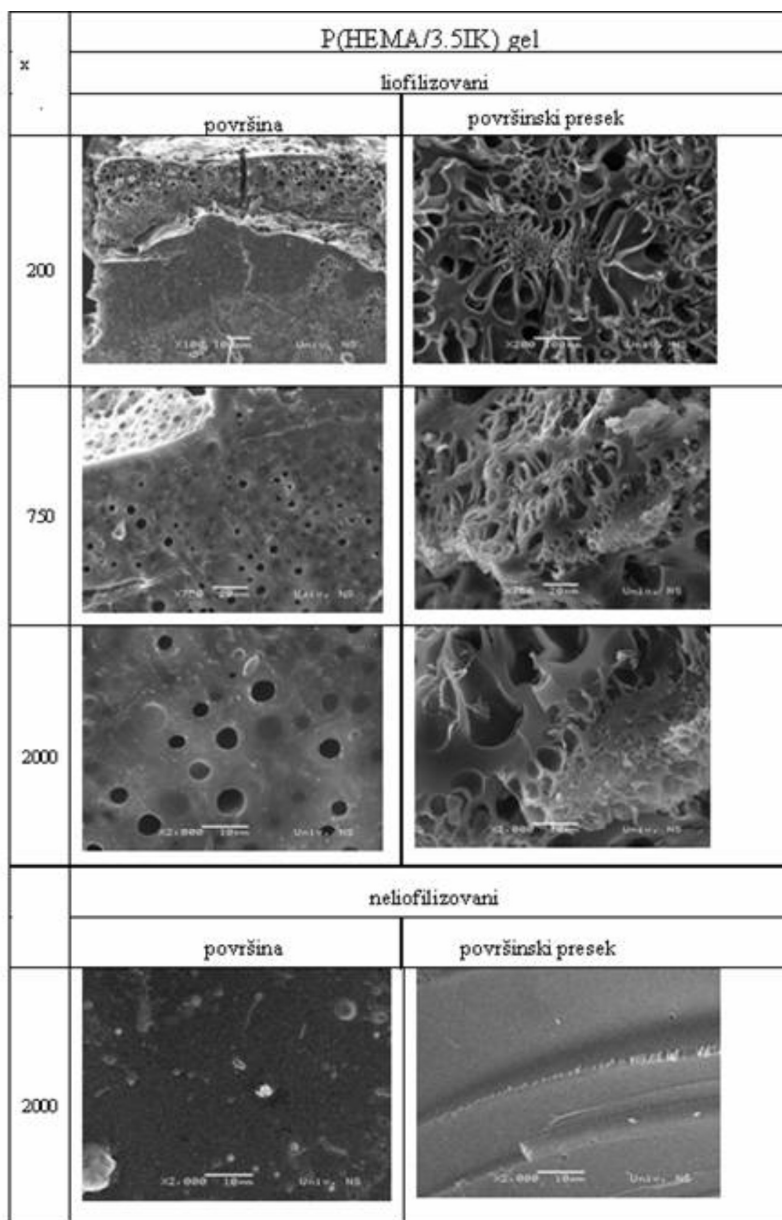
Studija citokompatibilnosti gelova

U *in vitro* analizi citokompatibilnosti preko probe citotoksičnosti, računat je relativni procenat broja vijabilnih kolonija na različitim koncentracijama ekstrakata,

kao proizvod interakcije ćelija i hidrogela i predstavljen na slici 3. Koncentracija ekstrakta koja uništava 50% ćelijske populacije ($IC_{50\%}$) poznata je kao indeks citotoksičnosti. Kako je vijabilnost ćelija za sve uzorke bila mnogo veća od 50%, nijedan hidrogel se ne može smatrati citotoksičnim. Najbolji rezultati dobijeni su u slučaju uzorka P(HEMA/3.5IK) sa 3,5 mol% IK. Kopolimerni uzorci pokazuju bolju ćelijsku vijabilnost od PHEMA, što ukazuje na to da ugradnja itakonske kiseline poboljšava citokompatibilnost hidrogelova, u zavisnosti od količine IK u gelu.

Studija bubrenja gelova

Analiza bubrenja PHEMA i P(HEMA/IK) gelova u funkciji pH i temperature predstavljena je u našem prethodnom radu [6]. Ukratko, pH osetljivost je ispitivana u seriji puferskih rastvora (2,20, 3,85, 4,50, 5,45 i 7,40) na 37 °C. Naši rezultati potvrđuju da je PHEMA praktično neosetljiva na promenu pH [48,49]. S druge strane, kopolimeri sa IK pokazuju pH osetljivost, što je karakteristično za anjonske hidrogelove. Ravnotežni stepen bubrenja, q_e , kopolimernih hidrogelova je niži na nižim pH vrednostima. Sa porastom pH vrednosti iznad prve i druge konstante disocijacije IK ($pK_{a1} = 3,85$, $pK_{a2} = 5,45$), q_e vrednosti pokazuju značajan rast. Analiza temperaturne zavisnosti bubrenja izvedena je u opsegu temperatura 25–60 °C (opseg koji uključuje telesnu temperaturu i patološke temperature) u puferskom rastvoru pH 7,40 (pH vrednost telesnih fluida i kože). Ravnotežni stepen bubrenja PHEMA i P(HEMA/IK) ge-



Slika 2. SEM mikrofotografije P(HEMA/3.5IK) hidrogela pri različitim uvećanjima (površina i poprečni presek).

Figure 2. The SEM micrographs of the P(HEMA/3.5IA) hydrogel under various magnifications (surface and cross-section).

Tabela 1. Hemolitička aktivnost PHEMA i P(HEMA/IK) hidrogelova

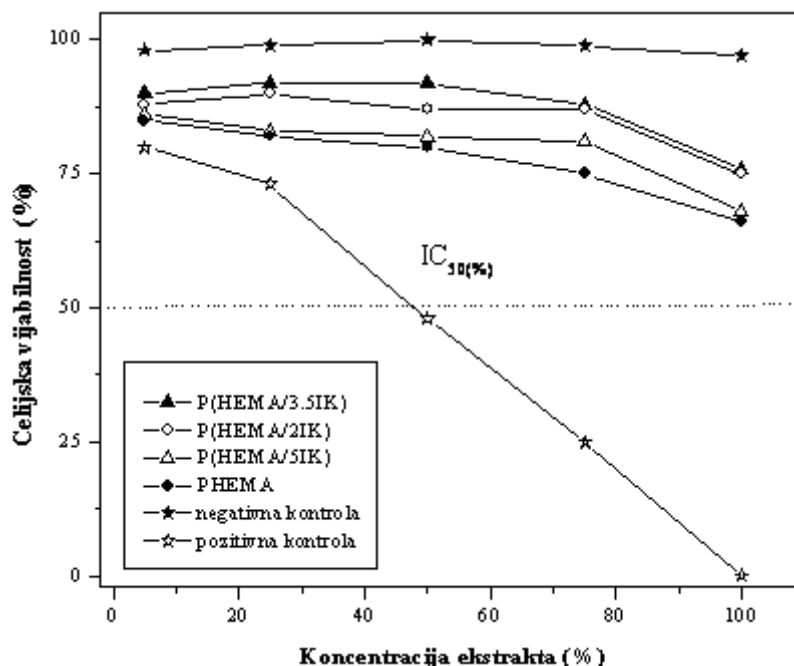
Table 1. Hemolytic activity of PHEMA and P(HEMA/IA) hydrogels

Gel	Hemoliza (%)	
	Direktni kontakt	Indirektni kontakt
PHEMA	1,0	0,5
P(HEMA/2IK)	0,5	0,3
P(HEMA/3.5IK)	0,4	0,3
P(HEMA/5IK)	0,2	0,2

lova pokazuje značajne promene sa temperaturom u temperaturnom intervalu 37–55 °C, sa maksimalnom vrednošću na 40 °C. Ovakvo ponašanje može se pripri-

sati porastu količine fluida vezane u hidrogelu. Iznad 40 °C jačina vodonične veze je smanjena i kao posledica, vezani fluid postaje nevezani, slobodan fluid, koji uzlazi iz polimerne mreže, dovodeći do opadanja u q_e vrednostima. Skok q_e vrednosti na 40 °C raste sa porastom sadržaja IK u uzorku. Homopolimerni PHEMA hidrogel pokazuje neznatne promene q_e sa temperaturom, sa minimumom bubrenja na 55 °C [50].

Parametri mreže računati su iz rezultata kinetike bubrenja, prema teoriji ravnotežnog bubrenja. Najvažniji parametri koji karakterišu strukturu mreže hidrogela su molarna masa polimernog lanca između dve susedne tačke umreženja, M_c , efektivna gustina umreženja, ν_e , i parametar interakcije polimer–rastvarač, χ . Caykara i



Slika 3. Čelijska vijabilnost uzoraka hidrogelova u probi citokompatibilnosti.
Figure 3. Cell viability of the hydrogel samples in the cytocompatibility assay.

saradnici su dali relaciju za proračun molarne mase polimernog lanca između dva susedna čvora mreže za jon-ske polimerne mreže [51]:

$$\frac{V_1 X^2 \phi_{2s}^2}{4IV_r^2} \left(\frac{2K_{a1}K_{a2} + 10^{-pH} K_{a1}}{2(10^{-pH})^2 + 10^{-pH} K_{a1} + K_{a1}K_{a2}} \right)^2 = \quad (2)$$

$$= [\ln(1 - \phi_{2s}) + \phi_{2s} + \chi \phi_{2s}^2] + \left(\frac{V_1 \rho}{M_c} \right) \phi_{2,r}^{2/3} \phi_{2,s}^{1/3}$$

gde su K_{a1} i K_{a2} prva i druga konstanta disocijacije diprotonske kiseline, X maseni udeo jonizabilnog polimera u sistemu, I jonska jačina medijuma u kome polimer bubri, ϕ_{2s} zapreminski udeo polimera u nabubreloom gelu, ϕ_{2r} zapreminski udeo polimera u relaksiranom stanju (nakon umrežavanja, ali pre bubrenja), V_1 molar-na zapremina vode, V_r srednja molska zapremina ponovljene jedinice polimera i χ Flory parametar interakcije polimer–rastvarač [20]:

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

Efektivna gustina umreženja, v_e , računata je kao $v_e = \rho/M_c$, gde je ρ gustina polimera. Proračun parametara je dat za rezultate dobijene na pH 7,40 i 37 °C (tabela 2), s obzirom na potencijalnu primenu u dermo-kozmetici.

Budući da uvođenje IK povećava hidrofilnost kopolimernih uzoraka, sa porastom sadržaja IK u kopolimerima χ vrednosti rastu. Za sistem polimer–fluid, niža vrednost χ ukazuje na jaču interakciju između polimera i fluida (tabela 2). Kada se analizira M_c , za homopolimer PHEMA dobijena je najniža vrednost, dok sa porastom sadržaja IK u kopolimerima M_c vrednosti rastu (tabela 2). Vrednosti gustine umreženja, v_e , opadaju sa porastom sadržaja IK u kopolimernim hidrogelovima, u opsegu 30,99–2,37 mol/dm³ (tabela 2). PHEMA gel pokazuje najvišu vrednost gustine umreženja.

Test penetracije mikroba kroz hidrogelove

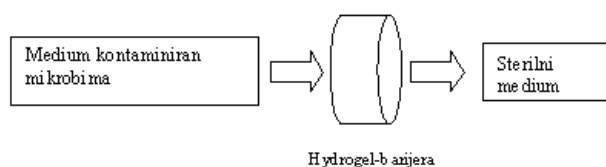
Hidrogelovi poseduju potencijal da oponašaju ekstracelularni matriks, što može dovesti do regeneracije tkiva neophodne u toku zarastanja rana i zaceljivanju oštećenog tkiva [52]. U dizajniranju matriksa koji podstiče zarastanje tkiva, važno je obezbediti odgovarajuću

Tabela 2. Parametri mreže P(HEMA/IK) hidrogelova na pH 7,40 i 37 °C
Table 2. Network parameters of the P(HEMA/IA) hydrogels at pH 7.40 and 37 °C

Gel	q_e	χ	$M_c \times 10^{-3}$ (g/mol)	v_e (mol/dm ³)
PHEMA	0,55	0,73	0,032	30,99
P(HEMA/2IK)	0,86	0,66	0,074	13,33
P(HEMA/3.5IK)	1,10	0,61	0,129	7,54
P(HEMA/5IK)	1,76	0,58	0,405	2,37

antimikrobnu zaštitu, a da pri tome antimikrobna svojstva biomaterijala ne ometaju fiziološko zaceljivanje, uključujući hemostazu i imunu funkciju, kao i fizičko-hemijske aspekte obnavljanja matriksa [53]. Da bi bio blagotvoran, biomaterijal mora da ima povoljan antimikrobni efekat tokom određenog vremenskog perioda, a da pri tom na njega nemaju uticaj tkivni fluidi, kao i enzimski aktivnost [53]. Rana predstavlja biosintetičko okruženje u kojem su brojni ćelijski procesi usko povezani u procesu obnavljanja. Moderne obloge su kreirane tako da potpomažu zarastanje rana. Hidrogelne obloge mogu zaštititi ozleđenu kožu i sačuvati odgovarajuću vlažnost, ubrzati proces ozdravljenja apsorbovanjem izlučenja i potpomažući proces obnove tkiva, uključujući faktore rasta i lizosome [47]. Cilj u tretmanu rana je da se nivo mikroorganizama u rani održi što je moguće niži, u zaštiti od infekcije, i dalje, stimulisati proces obnavljanja tkiva.

Gram-pozitivne i gram-negativne bakterije su korišćene pri izvođenju testa penetracije mikroba (šema 1). Test je pokazao da nakon inkubacije na 37 °C u trajanju od 24 h kolonije bakterija *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* ne prolaze kroz P(HEMA/IK) hidrogelne obloge, tako da je u okolini hidrogela obezbeđeno postojanje sterilne sredine. Prema tome, hidrogelne obloge se mogu smatrati dobrom zaštitom protiv mikroba i kao dalja prevencija od infekcije.



Šema 1. Prevlaka od hidrogela kao barijera u testu penetracije mikroba.

Scheme 1. Hydrogel dressing as barrier in microbe penetration test.

ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je razvijanje multifunkcionalnih biokompatibilnih polimernih biomaterijala baziranih na P(HEMA/IK) hidrogelovima koji poseduju značajan biomedicinski potencijal. Karakterizacija P(HEMA/IK) hidrogelova je otkrila da njihova porozna morfologija i odgovarajuće mehaničke karakteristike, kao i zadovoljavajuća biokompatibilnost i moćna antimikrobna svojstva, ove hidrogelove kandiduje za primenu u biomedicini, posebno u tretmanu kože i rana. Kopolimerni uzorci pokazuju bolja svojstva, naročito bolju ćelijsku vijabilnost i manju hemolitičku aktivnost nego homopolimerni PHEMA gel, što potvrđuje pretpostavku da ugradnja IK u PHEMA mrežu unapređuje biomedicinski potencijal ovih hidrogelova.

Zahvalnica

Ovaj rad je podržan od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (projekti No. 145072, 141013 i TR 19027).

LITERATURA

- [1] A. Safrany, Nucl. Instr. Meth. B **131** (1997) 376–381.
- [2] J.M. Rosiak, F. Yoshii, Nucl. Instr. Meth. B **151** (1999) 56–64.
- [3] T. Yu, C.K. Ober, Biomacromolecules **4** (2003) 1126–1131.
- [4] X.-Z. Zhang, Y.-Y. Yang, T.-S. Chung, K.-X. Ma, Langmuir **17** (2001) 6094–6099.
- [5] M. Sen, O. Guven, Radiat. Phys. Chem. **55** (1999) 113–120.
- [6] S.Lj. Tomić, M.M. Mičić, J.M. Filipović, E.H. Suljovrujić, Radiat. Phys. Chem. **76** (2007) 1390–1394.
- [7] C.D.L. Alarcon, S. Pennadam, C. Alexander, Chem. Soc. Rev **34** (2005) 276–285.
- [8] S. Brahim, D. Narinesingh, A.G. Elie, Biomacromolecules **4** (2003) 497–503.
- [9] S. Lahooti, M.V. Sefton, Tissue Eng. **6** (2000) 139–149.
- [10] C.D. Young, J.-R. Wu, T.-L. Tsou, Biomaterials **19** (1998) 1745–1752.
- [11] I. Gursel, C. Balcik, Y. Arica, O. Akkus, N. Akkas, V. Hasirci, Biomaterials **19** (1998) 1137–1143.
- [12] B.D. Johnson, D.J. Beebe, W.C. Crone, Mater. Sci. Eng. C **24** (2004) 575–581.
- [13] A. Guiseppi-Elie, M.J. Lesko, Jr. N.F. Sheppard, in: D.L. Wise, G.E. Wnek, D.J. Trantolo, T.M. Cooper, J.D. Gresser (Eds.), Electrical and optical polymer systems, Marcel Dekker Inc., New York, 1998, pp. 1187–1211.
- [14] B. Kabra, S.H. Gehrke, S.T. Hwang, W. Ritschel, J. Appl. Polym. Sci. **42** (1991) 2409–2416.
- [15] D.M. Garcia, J.L. Escobar, Y. Noa, N. Bada, E. Hernaez, I. Katime, Eur. Polym. J. **40** (2004) 1683–1690.
- [16] C.S. Brazel, N.A. Peppas, Polymer **40** (1999) 3383–3398.
- [17] H. Basan, M. Gumusderelioglu, T. Orbey, Int. J. Pharm. **245** (2002) 191–198.
- [18] M.T. am Ende, N.A. Peppas, J. Control. Release **48** (1997) 47–56.
- [19] I.O. Barcellos, A.T.N. Pires, I. Katime, Polym. Int. **49** (2000) 825–830.
- [20] B. Tasdelen, N. Kayaman-Apohan, O. Guven, B.M. Bay-sal, Int. J. Pharm. **278** (2004) 343–351.
- [21] M. Sen, A. Yakar, Int. J. Pharm. **228** (2001) 33–41.
- [22] S.Lj. Tomić, M.M. Mičić, J.M. Filipović, E.H. Suljovrujić, Mat. Sci. Forum. **494** (2005) 199–204.
- [23] N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa, Eur. J. Pharm. Biopharm. **50** (2000) 27–46.
- [24] D.F. Williams, in: Progress in biomedical engineering, Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, 1986.
- [25] J.P. Montheard, M. Chatzopoulos, D. Chappard, J. Macromol. Sci. Macromol. Rev. **32** (1992) 1–34.
- [26] H. Park, K. Park, Pharm. Res. **13** (1996) 1770–1776.

- [27] D.L. Coleman, D.E. Gregonis, J.D. Andrade, J. Biomed. Mater. Res. **16** (1982) 381–398.
- [28] R. Arora, S. Jain, S. Monga, R. Narayanan, U.K. Raina, D.K. Mehta, Cont. Lens Anterior Eye **27** (2004) 39–43.
- [29] J.L. West, J.A. Hubbell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 13188–13193.
- [30] G.W. Bos, J.J.L. Jacobs, J.W. Korten, S.V. Tomme, T. Veldhuis, C.F. van Nostrum, W.D. Otter, W.E. Hennink, Eur. J. Pharm. Sci. **21** (2004) 561–567.
- [31] K. Nam, J. Watanabe, K. Ishihara, Int. J. Pharm. **275** (2004) 259–269.
- [32] S. Woerly, G.W. Plant, A.R. Harvey, Neurosci. Lett. **205** (1996) 197–201.
- [33] A. Jones, D. Vaughan, J. Orthopaed. Nurs. **9** Suppl. 1 (2005) S1–S11.
- [34] K.T. Nguyen, J.L. West, Biomaterials **23** (2002) 4307–4314.
- [35] ISO document 10 993-4, Biological evaluation of medical devices, Part 4, 1992.
- [36] Y.C. Nho, K.R. Park, J. Appl. Polym. Sci. **85** (2002) 1787–1794.
- [37] H. Yu, X. Xu, X. Chen, T. Lu, P. Zhang, X. Jing, J. Appl. Polym. Sci. **103** (2007) 125–133.
- [38] J.M. Rosiak, R. Rucinska, W. Pekala, U.S. Patent No. 4 871 490, 1989.
- [39] W.R. Wilson, G.K. Danielson, E.R. Giuliani, J.E. Geraci, Mayo Clin. Proc. **57** (1982) 155–161.
- [40] G. De Gevigney, C. Pop, J.P. Delahaye, Eur. Heart J. **16** (1995) 7–14.
- [41] J. Chastre, J.L. Trouillet, Eur. Heart J. **16** (1995) 32–38.
- [42] C. Potera, Science **283** (1999) 1837–1839.
- [43] ISO document 10 993-5, Biological evaluation of medical devices, Part 5, 1992.
- [44] G. Ciapetti, D. Granchi, E. Verri, L. Savarino, D. Cavagnagna, A. Pizzoferrato, Biomaterials **17** (1996) 1259–1264.
- [45] C.L. Bell, N.A. Peppas, J. Control. Release **37** (1995) 277–280.
- [46] N.A. Peppas, Pharm. Acta Helv. **60** (1985) 110–111.
- [47] S. Dumitriu, Polymeric Biomaterials, Marcel Dekker, New York, Basel, 2002.
- [48] O. Wichterle, D. Lim, Nature **185** (1960) 117–118.
- [49] S.Lj. Tomić, E.H. Suljovrujić, J.M. Filipović, Polymer Bulletin **57** (2006) 691–702.
- [50] T.C. Warren, W. Prins, Macromolecules **5** (1972) 506–512.
- [51] T. Caykara, M. Dogmus, O. Kantoglu, J. Polym. Sci. Part B, Pol. Phys. **42** (2004) 2586–2594.
- [52] B. Balakrishnan, M. Mohanty, P.R. Umashankar, A. Jayakrishnan, Biomaterials **26** (2005) 6335–6342.
- [53] L. Ovington, Ostomy Wound Manage **49** (2003) 8–12.

SUMMARY

SMART HYDROGELS BASED ON ITACONIC ACID FOR BIOMEDICAL APPLICATION

Simonida Lj. Tomić¹, Maja M. Mičić², Bojana D. Krezović¹, Sava N. Dobić¹, Edin H. Suljovrujić², Jovanka M. Filipović¹

¹Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Serbia

²Vinča Institute of Nuclear Sciences, Belgrade, Serbia

(Scientific paper)

pH and temperature sensitive hydrogels, based on 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and itaconic acid (IA) copolymers, were prepared by gamma irradiation and characterized in order to examine their potential use in biomedical applications. The influence of comonomer ratio in these smart copolymers on their morphology, mechanical properties, biocompatibility and microbe penetration capability was investigated. The mechanical properties of copolymers were investigated using the dynamic mechanical analysis (DMA), while their morphology was examined by scanning electron microscopy (SEM). The morphology and mechanical properties of these hydrogels were found to be suitable for most requirements of biomedical applications. The *in vitro* study of P(HEMA/IA) biocompatibility showed no evidence of cell toxicity nor any considerable hemolytic activity. Furthermore, the microbe penetration test showed that neither *Staphylococcus aureus* nor *Escherichia coli* passed through the hydrogel dressing; thus the P(HEMA/IA) dressing could be considered a good barrier against microbes. All results indicate that stimuli-responsive P(HEMA/IA) hydrogels have great potential for biomedical applications, especially for skin treatment and wound dressings.

Ključne reči: Hidrogelovi • Zračenje • 2-Hidroksietil metakrilat • Itakonska kiselina • Mehanička svojstva • Inteligentni hidrogelovi • Biokompatibilnost • Mikrobna penetracija
Key words: Hydrogels • Radiation • 2-Hydroxyethyl methacrylate • Itaconic acid • Mechanical properties • Smart hydrogels • Biocompatibility • Microbe penetration