

MAJA M. MIČIĆ<sup>1</sup>  
SIMONIDA LJ. TOMIĆ<sup>2</sup>  
JOVANKA M. FILIPOVIĆ<sup>2</sup>  
EDIN H. SULJOVRUJIĆ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut za nuklearne nauke  
"Vinča", Beograd

<sup>2</sup>Tehnološko-metalurški fakultet,  
Beograd

NAUČNI RAD

547.462.3 +66.095.26:541.182.41:  
:544.722.54:57.017

## BIOKOMPATIBILNI I BIOADHEZIVNI HIDROGELOVI NA BAZI 2-HIDROKSJETIL METAKRILATA, MONOFUNKCIONALIZOVANIH POLI(ALKILEN GLIKOL)A I ITAKONSKE KISELINE\*

*Radikalnom kopolimerizacijom 2-hidroksietil metakrilata (HEMA), itakonske kiseline (IK) i četiri tipa poli(alkilen glikol) (met)akrilata (Bisomera-BIS) dobijeni su novi poli(BIS/HEMA/IK) hidrogelovi, u smeši voda/etanol kao rastvaraču. Ispitan je uticaj tipa Bisomera na bubrenje u puferima pH 2,20-7,40, u uslovima sličnim biološkim fluidima. Takođe, praćen je i uticaj na mehanička svojstva, morfologiju i termičko ponašanje dobijenih gelova. Testiranje biokompatibilnosti in vitro na poli (BIS/HEMA/IK) hidrogelovima pokazuje da nema ćelijske toksičnosti, niti hemolitičke aktivnosti. Gelovi poseduju zadovoljavajuću bioadhezivnost.*

Hidrogelovi su hidrofilne polimerne mreže koje se ne rastvaraju u vodi i biološkim fluidima, pri čemu mogu da apsorbuju manje ili veće količine fluida. Zbog svojih interesantnih svojstava privlače veliku pažnju poslednjih tridesetak godina [1-5]. Mogu se podeliti na klasične hidrogelove i hidrogelove osetljive na stimulanse iz spoljašnje sredine. Hidrogelovi osetljivi na stimulanse iz spoljašnje sredine pokazuju značajne promene zapremine sa promenom parametara, kao što su: temperatura [6-10], pH [11,12], vrsta rastvarača [13,14], jonska jačina [15,16] itd.

Jedan od važnijih faktora koji određuju osobine i primenu hidrogelova je njihova sposobnost da apsorbuju vodu. Bubrenje hidrogelova je funkcija parametara mreže, kao što su ravnotežni stepen bubrenja, difuzioni parametri, gustina umreženja itd., koji zavise od sastava hidrogela.

Poli(2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA) i srodni hidrogelovi su do sada izučavani za različite primene u medicini [17-20]. Njihova struktura omogućava sadržaj vode kao u živim tkivima. Hidrogel P(HEMA) je inertan u biološkim procesima, pokazuje otpornost ka termičkoj degradaciji, propustljiv je za metabolite, ne apsorbuje se u telu, podnosi toplotnu sterilizaciju bez oštećenja i može se dobiti u različitim oblicima.

Itakonska kiselina (IK) ima dve jonizujuće grupe sa različitim  $pK_a$  vrednostima. Dobija se iz obnovljivih izvora, fermentacijom skroba ili melase [21,22] i samim tim doprinosi većoj biokompatibilnosti zbog svog prirodnog porekla. Sa drugim komonomerima može da kopolimerizuje dajući polimerne lance sa

bočnim karboksilnim grupama, koje su vrlo hidrofilne i mogu da grade vodonične veze sa odgovarajućim grupama. Male količine itakonske kiseline u mreži gela obezbeđuje pH osetljivost i porast stepena bubrenja [23-25].

U ovom radu, hidrogelovi na bazi HEMA, IK i četiri tipa poli(etilen glikol) akrilata i poli(alkilen glikol) metakrilata (BIS), su sintetisani korišćenjem etilen glikol dimetakrilata (EGDMA) kao umreživača. Bisomerne komponente i IK su dodate kako bi se poboljšala biokompatibilnost i obezbedila pH osetljivost gelova na bazi HEMA. Ispitivan je uticaj tipa Bisomera na bubrenje i mehanička svojstva, kao i na morfologiju i termička svojstva.

### EKSPERIMENTALNI RAD

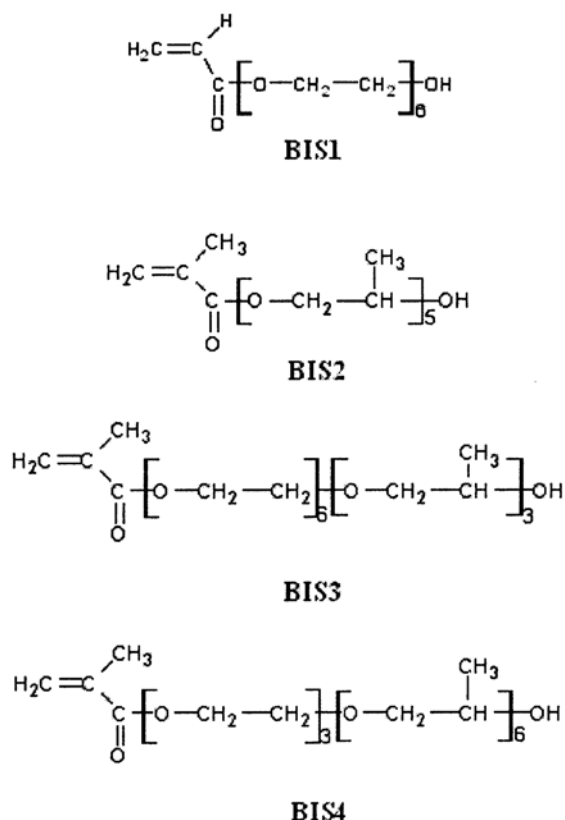
#### Pripremanje hidrogelova

Sintetisani su hidrogelovi na bazi 2-hidroksietil metakrilata (HEMA) (Aldrich), itakonske kiseline (IK) (Fluka), i poli(alkilen glikol) (met)akrilata, tj. Bisomera (BIS1-PEA6, BIS2-PPM5S, BIS3-PEM63P, BIS4-PPM63E) (Laporte Chemicals).

Kao umreživač u svim polimerizacijama je korišćen etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) (Aldrich), kao inicijator kalijum persulfat (Fluka) i tetrametiletilen diamin (TEMED) (Aldrich) kao aktivator. Smeša voda/etanol (1:1) je korišćena kao rastvarač. P(BIS/HEMA/IK) hidrogelovi su dobijeni radikalnom kopolimerizacijom. Molski odnos HEMA/BIS (1, 2, 3 ili 4)/IK bio je 70/28/2. Inicijator, aktivator i umreživač su dodati u smešu monomera u količini od 0,25, 0,25 i 0,50 mol %, u odnosu na ukupan broj molova monomera. Polimerizacija je izvedena na 60 °C u toku 24 h. Isti postupak je izveden i za pripremanje PHEMA hidrogela. Reakciona smeša je pre polimerizacije degazirana i smeštena između dve staklene ploče razdvojene PVC crevom. Po završetku reakcije, gelovi su sečeni u obliku diskova i potapani u destilovanu vodu u periodu od nedelju dana, koja je svakog

\*Rad saopšten na skupu "Peti seminar mladih istraživača", Beograd, Decembar 25-26, 2006.

Adresa autora: M. Mičić, Institut za nuklearne nauke "Vinča", Beograd  
E-mail: majamicic@vin.bg.ac.yu  
Rad primljen: Decembar 25, 2007.  
Rad prihvaćen: Januar 23, 2007.



Slika 1. Hemijska struktura Bisomera (BIS1, BIS2, BIS3 i BIS4)

Figure 1. Chemical structures of Bisomers (BIS1, BIS2, BIS3 and BIS4)

dana menjana radi uklanjanja neproreagovanih monomera. Diskovi su zatim sušeni, pri čemu su dobijeni kserogelovi.

#### Analiza bubrenja

Diskovi kserogelova su potapani u pufere različitih pH vrednosti, na 25 °C do dostizanja ravnotežnog stepena bubrenja. Proces bubrenja je praćen gravimetrijski. Stepen bubrenja,  $q$  je računat iz jednačine (1):

$$q = \frac{W_t - W_o}{W_o} \quad (1)$$

gde su  $W_o$  i  $W_t$  težine kserogela u vremenu 0 i nabubrelog gela u vremenu  $t$ . Ravnotežni stepen bubrenja ( $q_e$ ) je računat iz jednačine (2):

$$q_e = \frac{W_e - W_o}{W_o} \quad (2)$$

gde je  $W_e$  težina hidrogela u ravnoteži. Eksperimenti dinamičkog bubrenja su praćeni u puferima, u opsegu pH od 2,20 do 7,40 na 25 °C, koji odgovaraju pH vrednostima bioloških fluida.

#### Dinamičko mehanička analiza

Dinamičko mehanička merenja su izvedena na diskovima hidrogelova odmah po nastajanju, korišćenjem Rheometrics 605 mehaničkog spektrometra, sa geometrijom paralelnih ploča. Moduli smicanja su mereni u funkciji frekvencije ( $\omega$ ) od 0,1 do 100 rad/s, na 25 °C.

#### Morfologija gelova

Mikrostrukturalna karakterizacija je izvedena korišćenjem JSM 5300 skenirajućeg elektronskog mikroskopa. Uzorci su pre posmatranja napareni tankim slojem zlata pod vakuumom.

#### Termička analiza (TGA)

Termička svojstva uzoraka su analizirana preko TGA krivih. Ova merenja su izvedena na sistemu Perkin Elmer TGA-2, u opsegu temperature od 20 do 550 °C, pri brzini grejanja od 10 °C/min, u atmosferi azota.

#### Hemolitička aktivnost

Hemolitička aktivnost hidrogelova je određena metodama direktnog i indirektnog kontakta, prema ISO 10 993-4 (1992) [26]. U direktnoj metodi, diskovi hidrogelova su potapani u 5 ml fiziološkog rastvora (PS) u koji je dodato 0,25 ml pune krvi pacova. PS je korišćen kao negativna, a destilovana voda kao pozitivna kontrola. Epruvete sa sadržajem su nežno mešane i inkubirane u vodenom kupatilu 1 h na 37 °C. Merena je apsorbanca supernatantne tečnosti u svakoj epruveti na 545 nm korišćenjem Ultrospec III Spectrophotometer (Pharmacia LKB) i računat je procenat hemolize. Srednje vrednosti hemolize od 5% ili manje, za dva testa uzoraka, bile su unutar prihvatljivih. Kod metode indirektnog kontakta korišćeno je 5 ml izotoničnog rastvora ekstrahovanog iz diska hidrogela sa 0,25 ml 10% suspenzije eritrocita pacova. Za pripremanje izotoničnog vodenog ekstrakta, svaki disk je držan 72 h na 37 °C u 100 ml sterilizovane dvostruko destilovane vode, u kojoj je rastvoreno 0,9 g NaCl. Negativna kontrola bio je 0,9% rastvor NaCl. Posle inkubacije na 37 °C u trajanju od 24 h, merena je apsorbanca supernatanta na 540 nm i izračunat procenat hemolize.

#### Test citotoksičnosti

Citotoksičnost hidrogelova je testirana *in vitro* metodom ćelijske vijabilnosti [27]. Test je izveden u razblaženom ekstraktu gelova, na ćelijama subvezivnog tkiva miša, iz NCTC Clone 929 line (ATCC-CCL1). Inkubacija je izvedena u vodenom kupatilu, u trajanju od 2 h na 37 °C. Rastvor fenola (0,02 mas %) i polietilen visoke gustine (PEVG) korišćeni su kao pozitivna i negativna kontrola. Procenat preživljavanja

nja ćelija je računat u odnosu na ćelijsku kontrolu i prikazan kao indeks citotoksičnosti,  $IC_{50\%}$ .  $IC_{50\%}$  je definisan kao koncentracija ekstrakta koja izaziva oštećenje ili smrt 50% ćelijske populacije.

### Bioadhezivnost hidrogelova

Adheziometar 525 MC (Erichsen GmbH&Co KG) je korišćen za merenje sile adhezije uzoraka hidrogelova za polipropilensku ploču. Polipropilenska ploča korišćena je kao zamena za mukusno tkivo, što je potvrđeno ranijim ekperimentima za sistem poli(akrilna kiselina)/polietilen glikol (PAK/PEG) [28]. Diskovi hidrogelova su 60 s pre testiranja nakvašeni fosfatnim puferom pH 7,40 na sobnoj temperaturi. Ploče su zatim izložene pritisku od 20,0 N/cm<sup>2</sup> 60 s pre merenja. Merena je sila potrebna za odvajanje diska sa polipropilenskih ploča.

### PRIKAZ REZULTATA I DISKUSIJA

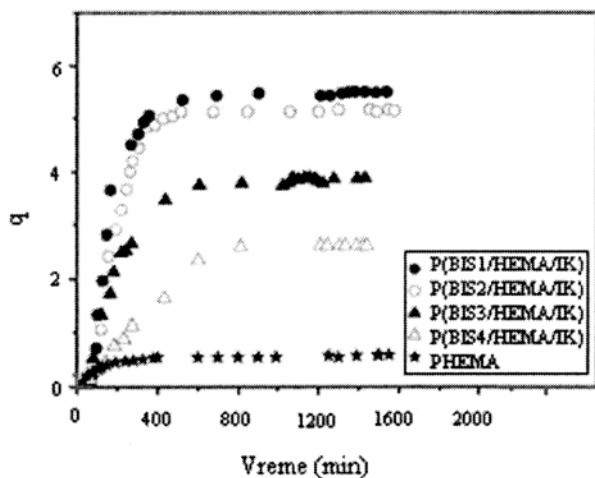
#### Analiza bubrenja

Praćenje i analiza bubrenja gelova u puferima sličnih pH vrednosti kao biološki fluidi su važne za primenu hidrogelova kao biomaterijala. Krive bubrenja PHEMA i kopolimernih hidrogelova u vodi prikazane su na slici 2.

Kinetički parametri bubrenja su računati iz prvog dela krive bubrenja korišćenjem jednačine (3) [29]:

$$\frac{M_t}{M_e} = kt^n \quad (3)$$

gde su  $M_t$  i  $M_e$ , računate iz jednačina 1 i 2, količine fluida apsorbovane u vremenu  $t$  i u ravnoteži,  $k$  je kinetička konstanta i  $n$  je difuzioni eksponent. Logaritamski oblik jednačine 3 korišćen je za izračunavanje  $n$  i  $k$ , iz nagiba i odsečka krive.



Slika 2. Krive bubrenja hidrogelova u vodi na 25 °C  
Figure 2. Swelling curves of the hydrogels in water at 25 °C

Tabela 1. Vrednost  $q_e$ ,  $k$  i  $n$  za sve uzorke hidrogelova, u vodi i u puferkim rastvorima pH vrednosti 2,20, 4,50 i 7,40 na 25 °C  
Table 1.  $q_e$ ,  $k$  and  $n$  for all the hydrogel samples, in water at pH 2,20, 4.50 and 7.40 in buffer solutions at 25 °C

Uzorak	pH	$q_e$	$k$	$n$
P(BIS1/HEMA/IK)	2,20	4,24	0,31	0,50
	4,50	4,67	0,42	0,54
	7,40	5,66	0,47	0,72
	voda	5,50	0,47	0,72
P(BIS2/HEMA/IK)	2,20	3,67	0,30	0,49
	4,50	4,22	0,39	0,53
	7,40	5,15	0,46	0,68
	voda	5,11	0,46	0,70
P(BIS3/HEMA/IK)	2,20	2,69	0,28	0,48
	4,50	3,30	0,37	0,51
	7,40	3,86	0,42	0,65
	voda	3,80	0,42	0,65
P(BIS4/HEMA/IK)	2,20	1,26	0,27	0,48
	4,50	1,92	0,36	0,52
	7,40	2,63	0,40	0,64
	voda	2,60	0,40	0,64
PHEMA	2,20	0,56	0,23	0,47
	4,50	0,57	0,24	0,50
	7,40	0,58	0,25	0,51
	voda	0,58	0,25	0,52

Vrednosti  $q_e$  (u vodi i puferima na 25 °C),  $n$  i  $k$  za sve uzorke su prikazani u tabeli 1.

Vrednosti  $q_e$  za kopolimere pokazuju rast sa porastom pH. Bisomerne komponente sadrže bočne, višeće lance različite dužine, koji utiču na bubrenje. Bisomeri sa kraćim visećim lancima dovode do većeg rasta  $q_e$  vrednosti kopolimera, tj. uzorci P(BIS1/HEMA/IK) i P(BIS2/HEMA/IK) bubre više nego kopolimeri sa dužim bočnim lancima P(BIS3/HEMA/IK) i P(BIS4/HEMA/IK). Hidrofilnost Bisomernih ostataka u glavnom lancu i visećim lancima je drugi faktor koji utiče na bubrenje kopolimera. Hidrogelovi koji sadrže samo etilen glikol (EG) monoakrilat (P(BIS1/HEMA/IK)), sa akrilatnim ostacima u glavnom lancu i kratkim EG visećim lancima, pokazuju najveće bubrenje u celom opsegu pH, usled najveće hidrofilnosti. Isto tako, za kopolimere sa metakrilatnim Bisomerima, veći stepen bubrenja je dobijen za uzorke koji sadrže samo propilen glikol (PG) jedinice i kraće viseće lance (P(BIS2/HEMA/IK)), nego za one sa mešanim EG/PG jedinicama u dužim visećim lancima (P(BIS3/HEMA/IK) i P(BIS4/HEMA/IK)). P(BIS3/HEMA/IK) bubri više nego P(BIS4/HEMA/IK), zbog drugačijeg odnosa EG i PG jedinica u bočnim lancima (6/3). Kod P(BIS4/HEMA/IK) ovaj odnos EG i PG jedinica je obrnut (3/6).

Maksimalni stepen bubrenja dostignut je na pH 7,40 za sve kopolimerne uzorke, usled vrlo visokog stepena jonizacije karboksilnih grupa IK, pKa vrednosti za IK su: pK<sub>a1</sub> = 3,85, pK<sub>a2</sub> = 5,44 [30]. Slične vrednosti  $q_e$  dobijene su i za vodu. Pošto su  $q_e$  vre-

dnosti za PHEMA niže nego za kopolimere, može se zaključiti da uvođenje Bisomera i IK u HEMA hidrogel dovodi do porasta stepena bubrenja. Pokazalo se da PHEMA praktično ne pokazuje pH osetljivost, dok  $q_e$  vrednosti kopolimernih hidrogelova rastu sa porastom pH. Elektrostatičko odbijanje lanaca, usled visokog stepena jonizacije kiselih grupa IK, dovodi do širenja polimerne mreže gela, što za rezultat ima dostizanje većih vrednosti stepena bubrenja.

Tip difuzije fluida se može odrediti iz vrednosti difuzionog eksponenta,  $n$ . U slučaju cilindrične geometrije, mehanizam transporta može biti Fick-ov ( $n < 0.5$ ), ne-Fick-ov ili anomalan ( $0.5 < n < 1$ ), slučaj II transport ( $n = 1$ ) i super slučaj II transport ( $n > 1$ ). Mehanizam transporta fluida je Fick-ov za PHEMA u svim korišćenim puferima i za kopolimere u pH 2,20 i 4,50. Mehanizam je ne-Fick-ov (anomalan) za sve kopolimere u vodi i na pH 7,40 (tabela 1), što znači da i difuzija i relaksacija polimera kontrolišu transport fluida [31].

### Parametri mreže

Primena hidrogelova za otpuštanje lekova i druge namene u medicini zavisi u velikom stepenu od njegove strukture. Struktura mreže zavisi od mnogo faktora, kao što su sastav kopolimera, količina umreživača, korišćeni rastvarač, temperatura, metode pripremanja gela i drugi faktori. Parametri korišćeni za karakterizaciju strukture mreže hidrogelova su: efektivna gustina umreženja,  $v_e$  i molska masa polimernog lanca između dve susedne tačke umreženja,  $M_c$ .

Modul smicanja,  $G$ , dobijen iz dinamičko mehaničke analize za mrežu u nastajanju, je korišćen za izračunavanje parametara mreže, prema jednačini (4) [32]:

$$G = v_e RT \phi_2^{1/3} (V_u / V_f)^{2/3} \quad (4)$$

gde je  $v_e$  efektivna gustina umreženja,  $\phi$  je zapreminski udeo polimera,  $V_u$  je zapremina suvog gela,  $V_f$  je zapremina gela u nastajanju,  $R$  je gasna konstanta i  $T$  je apsolutna temperatura. Molska masa između čvorova mreže,  $M_c$ , je računata iz jednačine (5):

$$M_c = \frac{\rho_2}{v_e} \quad (5)$$

gde je  $\rho_2$  gustina xerogela. Gustine xerogelova su određivane piknometrijski. Parametri mreže hidrogelova su predstavljeni u tabeli 2.

PHEMA gel ima najveću  $G$  vrednost i najniži ravnotežni stepen bubrenja. Vrednosti  $G$  za kopolimere su niže i neznatno se menjaju sa tipom Bisomera. Može se primetiti da kopolimeri sa neznatno višim vrednostima  $G$  više bubre. Ovo anomalno ponašanje može se objasniti činjenicom da tip Bisomera, koji se razlikuju po sastavu glavnog lanca, dužinama visećih lanaca i hidrofilitnosti, ima znatno veći uticaj na stepen bubrenja kopolimera nego na njegova mehanička svojstva.

Tabela 2. Parametri mreže hidrogelova  
Table 2. Network parameters of the hydrogels

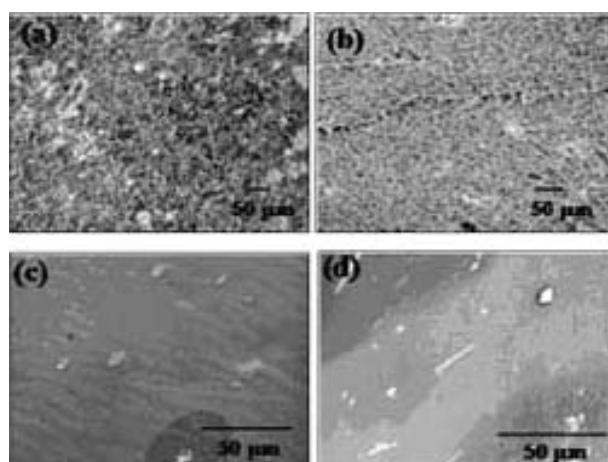
Uzorak	$G$ (kPa)	$v_e \times 10^3$ (mol/dm <sup>3</sup> )	$M_c$ (kg/mol)
P(BIS1/HEMA/IK)	2,40	4,60	241,8
P(BIS2/HEMA/IK)	2,15	3,51	287,5
P(BIS3/HEMA/IK)	1,94	3,05	327,0
P(BIS4/HEMA/IK)	1,90	2,92	331,6
PHEMA	3,94	5,31	166,1

Najniža vrednost  $M_c$  dobijena je za PHEMA i za kopolimer sa čistom EG akrilatnom komponentom (P(BIS1/HEMA/IK)); gel koji sadrži metakrilatni Bisomer i duže bočne lance ima više  $M_c$  vrednosti (tabela 2). Gustina umreženja ima znatan uticaj na bubrenje i mehanička svojstva hidrogelova i kod P(BIS/HEMA/IK) gelova kreću se u opsegu od 2,92 do  $4,60 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>. Efikasnost umreženja je niska zbog postojanja većeg broja visećih lanaca u Bisomerima.

### Morfologija gelova (SEM)

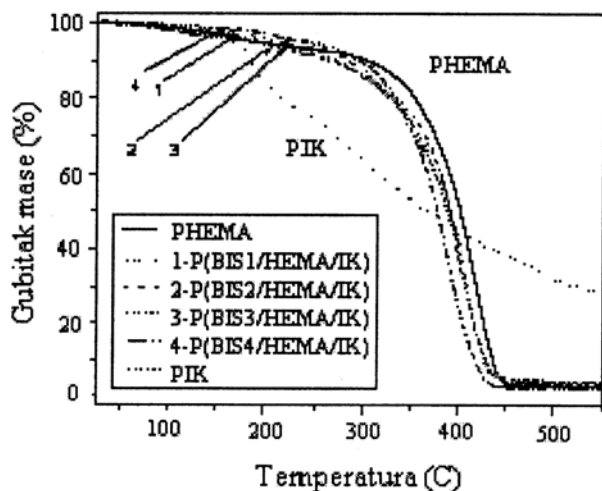
Analiza SEM snimaka uzoraka suvih gelova pokazuje da površine uzoraka P(BIS1/HEMA/IK) i P(BIS2/HEMA/IK) imaju karakterističnu teksturu koja sadrži mikrokanaale.

Pretpostavka je da morfologija sa mikrokanalima omogućava molekulima fluida da lakše prodiru u unutrašnjost hidrogela (slika 3a i 3b), što je u saglasnosti sa višim  $q_e$  vrednostima gelova P(BIS1/HEMA/IK) i P(BIS2/HEMA/IK). Kompaktna, ravna površina P(BIS3/HEMA/IK) i P(BIS4/HEMA/IK) uzoraka (slika 3c i 3d) pokazuje ravnu teksturu, sa osenčenim sfernim i elipsoidnim površinama.



Slika 3. SEM snimci hidrogelova: (a) P(BIS1/HEMA/IK), (b) P(BIS2/HEMA/IK), (c) P(BIS3/HEMA/IK) i (d) P(BIS4/HEMA/IK)

Figure 3. SEM micrographs of hydrogels: (a) BIS1/HEMA/LA, (b) BIS2/HEMA/LA (c) BIS3/HEMA/LA and (d) BIS4/HEMA/LA



Slika 4. TG krive PHEMA i kopolimernih hidrogelova  
Figure 4. TG curves of PHEMA and the copolymeric hydrogels

### TG analiza

Termička stabilnost hidrogelova ispitivana je TG analizom. Slika 4 pokazuje krive gubitka mase kopolimernih hidrogelova kao i PHEMA i PIK, radi poredjenja.

Krive kopolimernih hidrogelova pokazuju sličnost sa PHEMA krivom u ispitivanim intervalu temperature (20–550 °C). U intervalu temperature od 300–550 °C PHEMA je termički malo stabilniji od kopolimera. Svi uzorci pokazuju znatno bolju termičku stabilnost od PIK. Temperature glavne razgradnje su na 410, 403, 398 i 388 °C za P(BIS1/HEMA/IK), P(BIS2/HEMA/IK), P(BIS3/HEMA/IK) i P(BIS4/HEMA/IK) hidrogelove. Može se zaključiti da prisustvo IK i Bisomera neznatno smanjuje termičku stabilnost HEMA kopolimera u odnosu na čist PHEMA.

Kako su ispitivani hidrogelovi namenjeni za primenu u sistemima za kontrolisano otpuštanja lekova, koje se odvija na fiziološkoj temperaturi od 37 °C, pokazano je da su termički stabilni u okolini ove temperature i na višim, do 150 °C, tako da se mogu i termički sterilisati.

### Hemolitička aktivnost

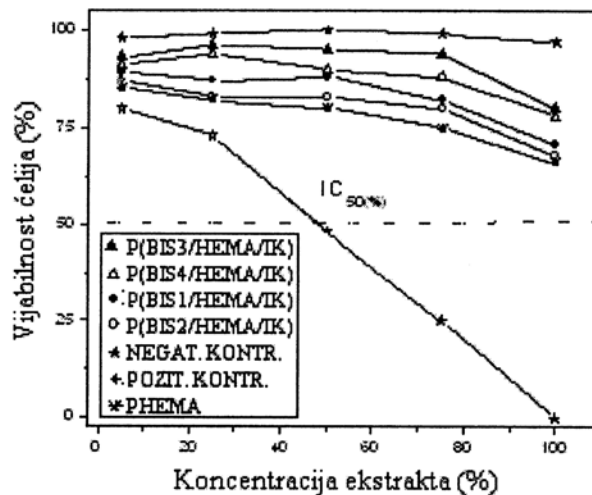
U testu hemolitičke aktivnosti, u *in vitro* uslovima, P(BIS/HEMA/IK) hidrogelovi u kontaktu sa krvi, pokazuju srednju hemolitičku vrednost manju od 1,2% u probi direktnog kontakta, i čak manje od 0,5% u probi indirektnog kontakta (tabela 3). Na osnovu dobijenih rezultata, ovi hidrogelovi se mogu smatrati hemolitički neaktivnim.

### Proba citotoksičnosti

U *in vitro* analizi biokompatibilnosti, na osnovu probe citotoksičnosti, izračunat je relativni procenat

Tabela 3. Hemolitička aktivnost hidrogelova  
Table 3. Hemolytic activity of the hydrogels

Uzorak	Stepen hemolize (%)	
	Direktni kontakt	Indirektni kontakt
P(BIS3/HEMA/IK)	0,2	0,1
P(BIS4/HEMA/IK)	0,5	0,2
P(BIS1/HEMA/IK)	0,9	0,3
P(BIS2/HEMA/IK)	1,2	0,5



Slika 5. Krive vijabilnosti ćelija na uzorcima hidrogelova u probi citotoksičnosti  
Figure 5. Cell viability curves of the hydrogel samples in the cytotoxicity assay

broja vidljivih kolonija pri različitim koncentracijama ekstrakta, kao rezultat interakcije ćelija i hidrogela, i prikazan na slici 5.

Pošto je ćelijska vijabilnost za sve uzorke veća od 50%, hidrogelovi se ne smatraju citotoksičnim. Kopolimerni hidrogelovi pokazuju veću ćelijsku vijabilnost od homopolimernog PHEMA uzorka, ukazujući da se ugradnjom Bisomera poboljšava biokompatibilnost hidrogelova, proporcionalno dužini poli(alkilen glikolnih) lanaca. Najbolji rezultati su dobijeni u slučaju P(BIS3/HEMA/IK) i P(BIS4/HEMA/IK) uzoraka sa dužim visećim lancima.

### Bioadhezivnost hidrogelova

Vrednosti sila adhezije za uzorke hidrogelova i komercijalni Carbopol 971 P adheziv su predstavljene u tabeli 4.

Sila adhezije je merena određivanjem sile potrebne za razdvajanje primenjenog polimera od polipropilenske ploče. Za hidrogelove koji sadrže Bisomere sa dužim poli(alkilen glikolnim) lancima (P(BIS3/HEMA/IK) i P(BIS4/HEMA/IK)), sila adhezije je neznatno veća nego u slučaju hidrogelova sa kraćim lancima (P(BIS1/HEMA/IK) i P(BIS2/HEMA/IK)).

Tabela 4. Sile bioadhezije za uzorke hidrogelova i Carbopol 971 P na polipropilenskoj ploči

Table 4. Bioadhesive forces of the hydrogel samples and Carbopol 971 P to a polypropylene plate

Uzorak	Sila adhezije (N cm <sup>-2</sup> )
P(BIS3/HEMA/IK)	39,4
P(BIS4/HEMA/IK)	37,6
P(BIS1/HEMA/IK)	36,6
P(BIS2/HEMA/IK)	34,3
Carbopol 971 P	28,4

Vodonične veze koje su se formirale između karboksilne grupe IK i etarske grupe poli(alkilen glikola) doprinose boljim bioadhezivnim osobinama hidrogelova. Sintetisani hidrogelovi pokazuju bolju bioadhezivnost od komercijalnog bioadheziva Carbopol 971 P.

## ZAKLJUČAK

U ovom radu sintetisani su novi tipovi hidrogelova na bazi HEMA, IK i Bisomera. Svi kopolimerni hidrogelovi pokazuju pH osetljivost u puferima u opsegu pH od 2,20 do 7,40. Prisustvo komonomera, koji su dodati HEMA, dovode do porasta stepena bubrenja hidrogelova i daju gelove bolje elastičnosti. Hidrogelovi su termički stabilni u okolini fiziološke temperature (37 °C). Kopolimer koji sadrži čiste poli(etilen glikol) akrilatne jedinice ima najoptimalnija svojstva.

Testovi izvedeni sa hidrogelovima potvrđuju da nisu hemolitički aktivni i citotoksični. Kopolimerni uzorci pokazuju bolju ćelijsku vijabilnost i manju hemolitičku aktivnost od uzoraka PHEMA, potvrđujući pretpostavku da poli(alkilen glikoli) poboljšavaju biokompatibilnost hidrogelova.

Zahvaljujući njihovoj sposobnosti da bubre i dobrim mehaničkim svojstvima, kao i dobroj biokompatibilnosti i bioadhezivnim karakteristikama, poli(BIS/HEMA/IK) hidrogelovi su potencijalni biomaterijali za primenu u medicini i farmaciji, posebno u sistemu za kontrolisano otpuštanje lekova.

## LITERATURA

- [1] A.S. Hoffman, Hydrogels for biomedical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54** (2002) 3–12.
- [2] Y. Qiu, K. Park, Environment-sensitive hydrogels for drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **53** (2001) 321–339.
- [3] N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa, Hydrogels in pharmaceutical formulations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50** (2000) 27–46.
- [4] J. Chen, H. Park, K. Park, Synthesis of superporous hydrogels: Hydrogels with fast swelling and superabsorbent properties, *J. Biomed. Mater. Res.* **44** (1999) 53–62.
- [5] M.E. Byrne, K. Park, N.A. Peppas, Molecular imprinting within hydrogels, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54** (2002) 149–161.
- [6] X.-Z. Zhang, Y.-Y. Yang, F.-J. Wang, T.-S. Chung, Thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) hydrogels with expanded network structures and improved oscillating swelling-deswelling properties, *Langmuir* **18** (2002) 2013–2018.
- [7] M. Shibayama, S. Mizutani, S. Nomura, Thermal properties of copolymer gels containing N-isopropylacrylamide, *Macromolecules* **29** (1996) 2019–2024.
- [8] H.G. Schild, Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application, *Prog., Polym. Sci.* **17** (1992) 163–249.
- [9] Y. Kaneko, S. Nakamura, K. Sakai, T. Aoyagi, A. Kikuchi, Y. Sakurai, T. Okano, Rapid deswelling response of poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels by the formation of water release channels using poly(ethylene oxide) graft chains, *Macromolecules* **31** (1998) 6099–6105.
- [10] E.C. Muniz, G. Geuskens, Compressive elastic modulus of polyacrylamide hydrogels and semi-IPNs with poly(N-isopropylacrylamide), *Macromolecules* **34** (2001) 4480–4484.
- [11] J.Q. Fei, Z.P. Zhang, L.L. Zhong, L.X. Gu, PVA/PAA thermo-induced hydrogel fiber: Preparation and pH-sensitive behavior in electrolyte solution, *J. Appl. Polym. Sci.* **85** (2002) 2423–2430.
- [12] K.L. Shantha, D.R.K. Harding, Preparation and in-vitro evaluation of poly[N-vinyl-2-pyrrolidone-polyethylene glycol diacrylate]-chitosan interpolymeric pH-responsive hydrogels for oral drug delivery, *Int. J. Pharm.* **207** (2000) 65–70.
- [13] T. Tanaka, Phase transitions in gels and a single polymer, *Polymer* **20** (1979) 1404–1412.
- [14] T. Ishida, Y. Hashimoto, Y. Iwai, Y. Arai, Solvent concentrations of dimethylsulfoxide-water and 1-propanol-water solutions inside and outside poly(N-isopropylacrylamide) gel, *Colloid Polym. Sci.* **272** (1994) 1313–1316.
- [15] R. Rodriguez, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, Cationic cellulose hydrogels: kinetics of the cross-linking process and characterization as pH/ion-sensitive drug delivery systems, *J. Control Release* **86** (2003) 253–265.
- [16] X. Chen, W.J. Li, Y.H. Lu, T.Y. Yu, pH sensitivity and ion sensitivity of hydrogels based on complex-forming chitosan/silk fibroin interpenetrating polymer network, *J. Appl. Polym. Sci.* **65** (1997) 2257–2262.
- [17] C.-D. Young, J.-R. Wu, T.-L. Tsou, Fabrication and characteristics of poly HEMA artificial skin with improved tensile properties, *J. Membrane Sci.* **146** (1998) 83–93.
- [18] O. García, M.D. Blanco, J.A. Martín, J.M. Teijón, 5-Fluorouracil trapping in poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-acrylamide) hydrogels: in vitro drug delivery studies, *Eur. Polym. J.* **36** (2000) 111–122.
- [19] O. Moradi, H. Modarress, M.J. Noroozi, Experimental study of albumin and lysozyme adsorption onto acrylic acid (AA) and 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) surfaces, *Colloid Interf. Sci.* **271** (2004) 16–19.
- [20] P.D. Dalton, L. Flynn, M.S. Shoichet, Manufacture of poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate) hydrogel tubes for use as nerve guidance channels, *Biomaterials* **23** (2002) 3843–3851.

- [21] K. Kirimura, T. Sato, N. Nakanishi, M. Terada, S. Usami, Breeding of starch-utilizing and itaconic-acid-producing koji molds by interspecific protoplast fusion between *Aspergillus terreus* and *Aspergillus usami*, *Appl. Microbiol. Biot.* **47** (1997) 127–131.
- [22] T. Willke, K.D. Vorlop, Biotechnological production of itaconic acid, *Appl. Microbiol. Biot.* **56** (2001) 289–295.
- [23] B. Tasdelen, N. Kayaman–Apoohan, O. Guven, B. M. Baysal, Preparation of poly(N-isopropylacrylamide/itaconic acid) copolymeric hydrogels and their drug release behavior, *Int. J. Pharm.* **278** (2004) 343–351.
- [24] M. Sen, A. Yakar, Controlled release of antifungal drug terbinafine hydrochloride from poly(N-vinyl 2-pyrrolidone/itaconic acid) hydrogels, *Int. J. Pharm.* **228** (2001) 33–41.
- [25] S.Lj. Tomic, M.M. Micic, J.M. Filipovic, E.H. Suljovrujic, Hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate obtained by gamma irradiation, *Mat. Sci. Forum.* **494** (2005) 199–204.
- [26] ISO document 10:993–5: Part 4, 1992.
- [27] G. Ciapetti, D. Granchi, E. Verri, L. Savarino, D. Cavedagna, A. Pizzoferrato, Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials, *Biomaterials* **17** (1996) 1259–1264.
- [28] H.-K. Choi., O.-J. Kim, C.-K. Chung, C.-S. Cho, A novel mucoadhesive polymer prepared by template polymerization of acrylic acid in the presence of poly(ethylene glycol), *J. Appl. Polym. Sci.* **73** (1999) 2749–2754.
- [29] P.L. Ritger, N.A. Peppas, A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs, *J. Control. Release* **5** (1987) 23–36.
- [30] R.C. Weast, *CRC Handbook of chemistry and physics*, CRC Press, Cleveland, 1974, D–129.
- [31] T. Alfrey, E.F. Gurnee, W.G. Lloyd, Diffusion in glassy polymers, *J. Polym. Sci., Part C, Polym. Symp.* **12** (1966) 249–261.
- [32] P.J. Flory, *Principles of polymer chemistry*, Cornell University Press, New York, 1953, Chapter 11.

## SUMMARY

### BIOCOMPATIBLE AND BIOADHESIVE HYDROGELS BASED ON 2-HYDROXYETHYL METHACRYLATE, MONOFUNCTIONAL POLY(ALKYLENE GLYCOL)S AND ITACONIC ACID

(Scientific paper)

Maja M. Mičić<sup>1</sup>, Simonida Lj. Tomić<sup>2</sup>, Jovanka M. Filipović<sup>2</sup>, Edin H. Suljovrujić<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Nuclear Sciences "Vinča", Belgrade

<sup>2</sup>Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade

New types of hydrogels were prepared by the radical copolymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate, itaconic acid and four different poly(alkylene glycol) (meth)acrylate components (Bisomers) in a water/ethanol mixture as solvent. The polymers swell in water at 25 °C to yield homogeneous transparent hydrogels. All the hydrogels displayed pH sensitive behavior in buffers of the pH range from 2.20 to 7.40, under conditions similar to those of biological fluids. The presence of these two comonomers, which were added to HEMA, increased the swelling degree of the hydrogels and gave gels with better elasticity. The hydrogels were thermally stable in the vicinity of the physiological temperature (37 °C). The copolymer containing pure poly(ethylene glycol) acrylate units generally had the best properties. The tests performed on the hydrogels confirmed that they were neither hemolytic nor cytotoxic. The copolymer samples showed better cell viability and less hemolytic activity than the PHEMA sample, confirming the assumption that poly(alkylene glycols) improve the biocompatibility of hydrogels. Due to their swelling and mechanical characteristics, as well as the very good biocompatibility and bioadhesive properties, poly(Bisomer/HEMA/IA) hydrogels are promising for utilization in the field of biomedical, especially for the controlled release of drugs.

Key words: 2-Hydroxyethyl methacrylate • Itaconic acid • Poly(alkylene glycol) (meth)acrylates • Hydrogels • Hemolytic activity •

Ključne reči: 2-Hidroksietil metakrilat • Itakonska kiselina • Poli(alkilen glikol) (met)akrilati • Hidrogelovi • Hemolitička aktivnost •