

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Maja D. Marković

**KINETIKA OSLOBAĐANJA SLABO VODORASTVORNIH
AKTIVNIH SUPSTANCI IZ NOSAČA NA BAZI
POLI(METAKRILNE KISELINE), KAZEINA I LIPOZOMA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METTALURGY

Maja D. Marković

**RELEASE KINETICS OF A POORLY WATER-SOLUBLE
SUBSTANCE FROM CARRIERS BASED ON
POLY(METHACRYLIC ACID), CASEIN AND LIPOSOMES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020.

MENTORI:

Dr Rada Pjanović, vanredni profesor Univerziteta u Beogradu,
Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Vesna Panić, viši naučni saradnik Univerziteta u Beogradu,
Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Nevenka Bošković-Vragolović, redovni profesor Univerziteta u Beogradu,
Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Pavle Spasojević, vanredni profesor Univerziteta u Kragujevcu,
Fakultet tehničkih nauka u Čačku

Dr Sanja Šešlija, naučni saradnik Univerziteta u Beogradu,
Institut za Hemiju, tehnologiju i metalurgiju

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija nastala je kao rezultat saradnje Katedre za hemijsko inženjerstvo i Katedre za organsku hemijsku tehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu kroz projekte Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja br. III 46010 i 172062.

Veliku zahvalnost dugujem svojim mentorima vanrednom profesoru dr Radi Pjanović i višem naučnom saradniku dr Vesni Panić, na ukazanom poverenju i pruženoj prilici za izradu ove doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem naučnom saradniku dr Sanji Šešliji na dragocenoj pomoći, savetima i prijatnoj radnoj atmosferi, Sanja veliko hvala! Zahvaljujem se i vanrednom profesoru dr Pavlu Spasojeviću i redovnom profesoru dr Nevenki Bošković-Vragolović, kao i kolegama na saradnji.

Zahvaljujem se tetki Vesni i baka [Rosi], kao i mojim prijateljima, koji su uvek bili uz mene i podržavali me.

Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima [Dragomiru] i Gordani i bratu Marku na podršci, razumevanju i svemu što su učinili za mene.

Kinetika oslobađanja slabo vodorastvornih aktivnih supstanci iz nosača na bazi poli(metakrilne kiseline), kazeina i lipozoma

REZIME

Hidrogelovi na bazi poli(metakrilne kiseline) - PMAA imaju veliku primenu u sistemima za ciljano otpuštanje aktivnih supstanci zato što su pH osetljivi, netoksični i biokompatibilni. Ipak zbog izrazite hidrofilnosti ovi hidrogelovi se mogu koristiti samo za kontrolisano otpuštanje hidrofilnih supstanci. U ovoj disertaciji predstavljena je modifikacija PMAA hidrogelova amfifilnim supstancama: proteinom - kazeinom i fosfolipidnim nanočesticama - lipozomima, kako bi se dobio nosač slabo vodorastvorne aktivne supstance (SVAS). Opisana je sinteza nosača, njihova karakterizacija primenom infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (FTIR) i skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) i karakterizacija lipozoma primenom dinamičkog rasipanja svetlosti (DLS) i metodom elektroforetskog rasipanja svetlosti (ELS). FTIR spektri su pokazali da su hidrofobne interakcije uspostavljene između SVAS model leka – kofeina i kazeina omogućile inkapsulaciju kofeina i njegovo kontrolisano oslobađanje, dok su prisutni lipozomi omogućili bolju kontrolu brzine oslobađanja kofeina. Ispitan je i uticaj parametara sinteze (stepen neutralizacije metakrilne kiseline, koncentracija umreživača i kofeina, prisustvo itakonske kiseline i lipozoma, udeo i oblik lipozomne formulacije) na morfološke karakteristike nosača, njihovo bubrenje i kinetiku oslobađanja kofeina u dve sredine različitih pH vrednosti koje su simulirale uslove prisutne u gastrointestinalnom traktu čoveka. Praćenje oslobađanja kofeina iz nosača u ovim sredinama izvršeno je primenom ultraljubičaste spektroskopije (UV). Izvedena je detaljna analiza dobijenih eksperimentalnih podataka otpuštanja kofeina u *in vitro* uslovima, primenom nekoliko matematičkih modela. Najbolja kinetika otpuštanja kofeina postignuta je iz nosača sa potpuno neutralizovanom metakrilnom kiselinom, 1,6mol% umreživača i inkorporiranim lipozomima u kojima je inkapsuliran kofein. Ovaj nosač je odabran za dalje analize - ispitano je njegovo ponašanje u uslovima koji su simulirali put nosača kroz gastrointestinalni trakt čoveka. Rezultati su pokazali da kofein može da se inkapsulira u izabrani nosač u koncentracijama koje su više od njegove maksimalne rastvorljivosti i da se postigne njihovo ciljano otpuštanje. Inkapsulacija kofeina u koncentracijama ovih vrednosti, postignuta je dodatkom nikotin-amida koji sa kofeinom gradi stabilni kompleks. Dobijeni rezultati pokazuju da sintetisani nosači imaju veliki potencijal za ciljanu dostavu slabo vodorastvornih supstanci.

Ključne reči: poli(metakrilna kiselina), kazein, lipozomi, slabo vodorastvorna aktivna supstanca, kontrolisano otpuštanje, ciljano otpuštanje, kinetika otpuštanja

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Hemijsko inženjerstvo

UDK broj:

Release kinetics of a poorly water-soluble substance from a carrier based on poly(methacrylic acid), casein and liposomes

ABSTRACT

Hydrogels based on poly(methacrylic acid) (PMAA) have been extensively used in systems for targeted delivery of active substances because they are pH-sensitive, non-toxic and biocompatible. However, being highly hydrophilic, these hydrogels are able to deliver only hydrophilic active substances. In this dissertation, modification of PMAA hydrogels with amphiphilic substances: protein - casein and phospholipidic nanoparticles - liposomes in order to design a hydrophilic carrier for a poorly water-soluble substance (PWSS) are presented. The synthesis of the carriers and their characterization using the Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and the Scanning Electron Microscopy (SEM) and the characterization of the liposomes using the Dynamic Light Scattering (DLS) and the method of the Electrophoretic Light Scattering (ELS) are described. The FTIR spectra showed that hydrophobic interactions were established between PWSS model drug - caffeine and casein and enabled caffeine encapsulation in the carrier and its controlled release, while the presence of the liposomes enabled better control of caffeine release rate. The morphological characteristics of the carriers, their swelling behavior and the caffeine release kinetics were investigated depending on the changes in the synthesis parameters (neutralization degree of methacrylic acid, crosslinker and caffeine concentrations, introduction of itaconic acid and liposomes, volume ratio and form of liposomal formulation) in two media with different pH values that simulated the environment in human gastrointestinal tract. Ultraviolet (UV) Spectroscopy was used to monitor caffeine release from these carriers. Data from caffeine *in vitro* release experiments were analyzed in detail using several mathematical models. The best kinetic of caffeine release was achieved from the carrier in which methacrylic acid was completely neutralized and which had 1,6mol% of crosslinker and incorporated liposomes with encapsulated caffeine. The behavior of this carrier was further investigated in the environment which simulated the conditions in the human gastrointestinal tract. Results showed that this carrier could be used for the encapsulation of caffeine in concentrations which were higher than its solubility and for targeted delivery of these concentrations. Encapsulation of caffeine in these values of concentration was achieved by adding nicotinamide, which forms stable complex with caffeine. Presented results showed that synthesized carriers have great potential for targeted delivery of poorly water-soluble substances.

Keywords: poly(methacrylic acid), casein, liposomes, poorly water-soluble substance, controlled release, targeted delivery, release kinetic

Scientific field: Technological Engineering

Scientific subfield: Chemical Engineering

UDC Number:

Spisak oznaka

D3	Jander jednačina
D4	Ginstling-Brounshtein jednačina
D_M	Koeficijent difuzije spoljšnje sredine (mm ² /min)
E	Stepen inkapsulacije kofeina u lipozomima (%)
F1	Kinetika prvog reda reakcije ili Mampel jednačina
FTIR	Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom
h	Debljina suvog uzorka hidrogela (kserogela) (mm)
k	Konstanta brzine oslobađanja aktivne supstance Ritger-Peppas modela (min ⁻¹)
k_D	Konstanta brzine oslobađanja aktivne supstance Kopcha modela (min ⁻¹)
k_{D3}	Konstanta brzine oslobađanja aktivne supstance Jander jednačine (min ⁻¹)
k_{D4}	Konstanta brzine oslobađanja aktivne supstance Ginstling-Brounshtein jednačine (min ⁻¹)
k_{F1}	Konstanta brzine oslobađanja aktivne supstance prvog reda reakcije ili Mampel jednačine (min ⁻¹)
k_M	Nagib krive bubrenja nosača u određenoj spoljašnjoj sredini (min ⁻¹)
k_R	Konstanta brzine Kopcha modela koja se odnosi na brzinu oslobađanja aktivne supstance usled relaksacije polimernih lanaca (min ⁻¹)
k_{R2}	Konstanta brzine reakcija na granici faza-kontrakcija površine (min ⁻¹)
k_{R3}	Konstanta brzine reakcija na granici faza-kontrakcija zapremine (min ⁻¹)
m₀	Masa suvog uzorka hidrogela (kserogela) (g)
m_{eq}	Masa nabubrelog hidrogela u ravnotežnom stanju (g)
m_{cfu}	Masa kofeina u supernatantu (g)
m_{cfu}	Ukupna masa kofeina u lipozomnoj suspenziji (g)
M_t	Masa otpuštene aktivne supstance u trenutku t (mg)

M_{∞}	Masa otpuštene aktivne supstance u ravnotežnom stanju (mg)
MAA	Metakrilna kiselina
MBA	N,N'-metilenbisakrilamid- umreživač
n	EkspONENT Ritger-Peppas modela koji se odnosi na tip mehanizma oslobađanja aktivne supstance
PMAA	Poli(metakrilna kiselina)
PMAC	Nosači na bazi poli(metakrilne kiseline) i kazeina
PMAC/L	Nosači na bazi poli(metakrilne kiseline), kazeina i lipozoma
R2	Reakcija kontrolisana procesima na granici faza-kontracija površine
R3	Reakcija kontrolisana procesima na granici faza-kontracija zapremine
R²	Koeficijent linearne korelacije
SD_{eq}	Ravnotežni stepen bubrenja nosača (g/g)
SEM	Skenirajuća elektronska mikroskopija
t	Vreme (min)
t_N	Normalizovano vreme procesa oslobađanja aktivne supstance
UV-Vis	Ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija
VA-044	2,2'-Azobis-[2-(2-imidazolin-2 il)propan]dihlorid- inicijator
α	Odnos otpuštene koncentracije aktivne supstance u vremenskom trenutku t i koncentracije aktivne supstance u ravnotežnom stanju
$\Delta\alpha$	Oblast primene matematičkih modela (%)

Spisak slika

Slika 1. Kontrolisano otpuštanje leka (kinetika nultog reda): MDKL-maksimalna dozvoljena koncentracija leka; MEKL-minimalna efektivna koncentracija leka [2].....	3
Slika 2. Različiti oblici nosača lekova [4],*[5]	5
Slika 3. Kontrolisano otpuštanje leka iz hidrogela koji bubri [6].....	6
Slika 4. Različite strategije za dobijanje sistema na bazi hidrogelova kao nosača slabo vodorastvornih lekova: a) kopolimerizacija hidrofobnih monomera, b) vezivanje slabo vodorastvornog leka za nosač preko hidrofobnih graftova („graftovanje” bočnih lanaca) i c) inkorporiranje amfifilne supstance [8].....	7
Slika 5. Strukturna formula kofeina	7
Slika 6. Dobijanje i primena hidrogelova u inženjerstvu tkiva [12].....	9
Slika 7. Hidrogelovi osetljivi na promenu pH za kontrolisano oslobađanje aktivnih supstanci in vivo [34].....	12
Slika 8. Mehanizam slobodno-radikalske polimerizacije [64]	14
Slika 9. Fizički i hemijski hidrogel [84].....	16
Slika 10. Šematski prikaz strukture katjonskih i anjonskih hidrogelova [85].....	17
Slika 11. Otpuštanje lekova iz hidrogelova kao odgovor na promenu pH-vrednosti spoljašnje sredine [113]	19
Slika 12. Strukturna formula metakrilne kiseline.....	20
Slika 13. Poli(metakrilna kiselina)	21
Slika 14. Strukturna formula itakonske kiseline.....	23
Slika 16. Čvrsti deo mreže nabubrelog hidrogela ili engl. „mesh”[5].....	25
Slika 17. Krive matematičkih modela korišćenih u model fitting metodi [206]	32
Slika 15. (a) Micela kazeina i (b) sastav micide kazeina [212].....	33
Slika 18. Samoorganizovanje fosfolipida u lipozom u vodenom rastvoru [224]	35
Slika 19. Samoorganizovanje fosfolipida u unilameralne i multilameralne lipozome [224]	36
Slika 20. Različite vrste modifikacija lipozoma polimerima A [261], B [262], C [263]	38
Slika 21. Kinetika oslobađanja leka iz lipozoma i mogući načini modifikacije lipozoma [264]	39
Slika 22. Mehanizam oslobađanja model-leka iz sistema polimer/lipozomi [265].....	40
Slika 23. Šematski prikaz oslobađanja model-leka iz sistema na bazi hidrogel/lipozomi [279]	42

Slika 24. FTIR spektri kofeina, PMAC nosača bez kofeina, PMAC nosača sa kofeinom i PMAC/L nosača sa kofeinom sa: a) 0% neutralizacije MAA i b) 100% neutralizacije MAA.....	50
Slika 25. Moguće formiranje interakcija među komponentama nosača: a) u PMAC nosaču i b) u PMAC/L nosaču.....	51
Slika 26. SEM mikrografi a) PMAC-0N-0.2, b) PMAC/L-0N i c) PMAC/Lc-0N nosača	52
Slika 27. SEM mikrografi a) PMAC-100N-0.2, b) PMAC/L-100N i c) PMAC/Lc-100N nosača	54
Slika 28. SEM mikrografi a) PMAC-50N-0.2 i b) PMAC/L-50N nosača	55
Slika 29. SEM mikrografi a) PMAC-100N-4M-0.2 i b) PMAC/L-100N-4M nosača	56
Slika 30. XRD spektri PMAC-0N-0.2, PMAC/L-0N, PMAC-100N-0.2 i PMAC/L-100N uzoraka.....	57
Slika 31. a) Raspodela veličine čestica lipozoma i b) z-potencijal lipozomnih čestica	57
Slika 32. Krive bubrenja PMAC nosača sa različitim stepenom neutralizacije MAA u: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl.....	59
Slika 33. Krive otpuštanja kofeina iz PMAC nosača - uticaj stepena neutralizacije MAA: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl.....	60
Slika 34. Primena R-P modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitim stepenom neutralizacije MAA u PB 6,8	61
Slika 35. Primena Higuchi modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitim stepenom neutralizacije MAA u PB 6,8	62
Slika 36. Primena Kopcha modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitim stepenom neutralizacije MAA u PB 6,8	63
Slika 37. Poklapanje normalizovanih krivih otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitim stepenom neutralizacije MAA u a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl sa modelima model fitting metoda.....	63
Slika 38. Provera odabranih modela na osnovu primene model fitting metoda na krive otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitim stepenom neutralizacije MAA u PB 6,8.....	64
Slika 39. Uticaj koncentracije umreživača na bubrenje PMAC nosača u: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl	68
Slika 40. Uticaj koncentracije umreživača na otpuštanje kofeina iz PMAC nosača u: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl.....	69

Slika 41. Primena R-P modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom umreživača u PB 6,8	70
Slika 42. Primena Higuchi modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom umreživača u PB 6,8	71
Slika 43. Primena Kopcha modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom umreživača u PB 6,8	71
Slika 44. Poklapanje normalizovanih krivih otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom umreživača u a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl sa modelima model fitting metoda.....	72
Slika 45. Provera odabranih modela na osnovu primene model fitting metoda na krive otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom umreživača u PB 6,8.....	73
Slika 46. Krive bubrenja PMAC nosača sa različitom koncentracijom kofeina u: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl.....	76
Slika 47. Krive otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom kofeina u: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl.....	77
Slika 48. Primena R-P modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom kofeina u PB 6,8.....	78
Slika 49. Primena Higuchi modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom kofeina u PB 6,8.....	79
Slika 50. Primena Kopcha modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom kofeina u PB 6,8.....	80
Slika 51. Poklapanje normalizovanih krivih otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom kofeina u a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl sa modelima model fitting metoda	80
Slika 52. Provera odabranih modela na osnovu primene model fitting metoda na krive otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom kofeina u PB 6,8	81
Slika 53. Krive bubrenja PMAC/L nosača - uticaj prisustva lipozomne suspenzije: a) PB6,8 i b) 0,1M HCl	85
Slika 54. Kumulativne krive otpuštanja kofeina - uticaj prisustva lipozomne suspenzije u: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl.....	85
Slika 55. Krive bubrenja PMAC/L nosača sa 0% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije i otpuštanja kofeina iz istih, respektivno u: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl	86

Slika 56. Primena R-P modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 0% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije u PB 6,8.....	87
Slika 57. Primena Higuchi modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 0% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije u PB 6,8.....	88
Slika 58. Primena Kopcha modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 0% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije u PB 6,8.....	88
Slika 59. Poklapanje normalizovanih krivih otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 0% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije u a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl sa modelima model fitting metoda	89
Slika 60. Provera odabranih modela na osnovu primene model fitting metoda na krive otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 0% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije u PB 6,8.....	89
Slika 61. Serije krivih bubrenja: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl i odgovarajuće serije krivih otpuštanja: a*) PB 6,8 i b*) 0,1M HCl (manji grafik predstavlja poređenje krivih otpuštanja iz sistema sa lipozomima sa odgovarajućim sistemom bez lipozoma za 24h) - uticaj količine lipozoma u sistemu sa 100% stepena neutralizacije MAA.....	91
Slika 62. Primena R-P modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 100% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije u PB 6,8.....	92
Slika 63. Primena Higuchi modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 100% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije u PB 6,8.....	93
Slika 64. Primena Kopcha modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 100% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije u PB 6,8.....	94
Slika 65. Poklapanje normalizovanih krivih otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 100% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije u a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl sa modelima model fitting metoda	94
Slika 66. Provera odabranih modela na osnovu primene model fitting metoda na krive otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 100% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije u PB 6,8.....	95
Slika 67. Krive bubrenja PMAC/L nosača u: a) PB 6,8 i b) 0.1M HCl i krive otpuštanja kofeina u: a*) PB 6,8 i b*) 0.1M HCl - uticaj oblika prisutne lipozomne formulacije: suspenzije ili	

koncentrovanih lipozoma dobijenih centrifugiranjem u PMAC/L nosaču sa 0%, 50% i 100% stepena neutralizacije MAA.....	98
Slika 68. Primena R-P modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 0%, 50% i 100% neutralizacije MAA i različitim oblikom lipozomne formulacije u PB 6,8	99
Slika 69. Primena Higuchi modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 0%, 50% i 100% neutralizacije MAA i različitim oblikom lipozomne formulacije u PB 6,8	100
Slika 70. Primena Kopcha modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 0%, 50% i 100% neutralizacije MAA i različitim oblikom lipozomne formulacije u PB 6,8	100
Slika 71. Poklapanje normalizovanih krivih otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 0%, 50% i 100% neutralizacije MAA i različitim oblikom lipozomne formulacije u a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl sa modelima model fitting metoda.....	101
Slika 72. Provera odabranih modela na osnovu primene model fitting metoda na krive otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 0%, 50% i 100% neutralizacije MAA i različitim oblikom lipozomne formulacije u PB 6,8	101
Slika 73. FTIR spektri PMAC i PMAC/L nosača sa 100% neutralizacije MAA i dodatom itakonskom kiselinom	104
Slika 74. SEM mikrofotografije: a) PMAC/IA-100N-0,2 i b) PMAC/IA-100N-L	105
Slika 75. Krive bubrenja PMAC i PMAC-L sistema sa itakonskom kiselinom u: a)PB 6,8 i b)0,1M HCl i krive otpuštanja kofeina iz istih sistema u: a*) PB 6,8 i b*)0,1M HCl.....	106
Slika 76. Primena R-P modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa itakonskom kiselinom u PB 6,8	107
Slika 77. Primena Higuchi modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa itakonskom kiselinom u PB 6,8	108
Slika 78. Primena Kopcha modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa itakonskom kiselinom u: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl	108
Slika 79. Poklapanje normalizovanih krivih otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa itakonskom kiselinom u a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl sa modelima model fitting metoda.....	109
Slika 80. Provera odabranih modela na osnovu primene model fitting metoda na krive otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa itakonskom kiselinom u PB 6,8	109

Slika 81. Krive bubrenja PMAC i PMAC-L sistema sa 1,6 mol% umreživača u odnosu na MAA: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl i krive otpuštanja kofeina iz istih sistema u: a*) PB 6,8 i b*) 0,1M HCl	113
Slika 82. Primena R-P modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa 1,6 mol% umreživača u odnosu na MAA u PB 6,8	113
Slika 83. Primena Kopcha modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa 1,6 mol% umreživača u odnosu na MAA u: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl	114
Slika 84. Poklapanje normalizovanih krivih otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa 1,6 mol% umreživača u odnosu na MAA u a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl sa modelima model fitting metoda.....	115
Slika 85. Provera odabranih modela na osnovu primene model fitting metoda na krive otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa 1,6 mol% umreživača u odnosu na MAA u PB 6,8 ..	115
Slika 86. a) i a*) Bubrenje PMAC i PMAC/L nosača na simuliranom putu nosača kroz gastrointestinalni trakt.....	118
Slika 87. b) i b*) otpuštanje kofeina iz PMAC i PMAC/L nosača na simuliranom putu nosača kroz gastrointestinalni trakt.....	119
Slika 88. Kompleks kofeina i nikotin-amida [301]	122
Slika 89. Raspodela veličine čestica lipozoma sa inkapsuliranim kofein/nikotin-amid kompleksom i z-potencijali.....	123
Slika 90. FTIR spektri PMAC/L nosača sa inkapsuliranim kompleksom kofein/nikotin-amid.	125
Slika 91. SEM mikrografi: a) PMAC-100N-4M-LC20, b) PMAC-100N-4M-LS20 i c) PMAC-100N-4M-LS100L100	126
Slika 92. a)Bubrenje PMAC/LS uzoraka sa različitom koncentracijom kofeina u PB 6,8; a*)Bubrenje PMAC/LS uzoraka sa različitim udelom lipozomne suspenzije u PB 6,8; b) Bubrenje PMAC/LS uzoraka sa različitom koncentracijom kofeina u 0,1M HCl i b*) Bubrenje PMAC/LS uzoraka sa različitim udelom lipozomne suspenzije u PB 6,8.....	127
Slika 93. Bubrenje PMAC/LC uzoraka sa različitom koncentracijom kofeina u: a)PB 6,8 i b)0,1M HCl	128
Slika 94. Krive otpuštanja kofeina iz PMAC/LS i PMAC/LC sistema sa inkapsuliranim kompleksom kofein/nikotin-amid u PB 6,8.....	130

Slika 95. Krive otpuštanja kofeina iz PMAC/LS i PMAC/LC sistema sa inkapsuliranim kompleksom kofein/nikotin-amid u 0,1M HCl.....	131
Slika 96. Kumulativne krive otpuštanja kofeina iz PMAC/LS i PMAC/LC sistema sa inkapsuliranim kompleksom kofein/nikotin-amid u: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl.....	132
Slika 97. Krive bubrenja nosača sa inkorporiranom lipozomnom suspenzijom: a) ispitivanje uticaja promene koncentracije inkapsuliranog kofeina na bubrenje i b) ispitivanje uticaja promene udela lipozomne suspenzije u nosačima	135
Slika 98. Krive bubrenja nosača sa inkorporiranom lipozomima koncentrovanih centrifugiranjem: a) ispitivanje uticaja promene koncentracije inkapsuliranog kofeina na bubrenje i b) ispitivanje uticaja promene udela lipozoma koncentrovanih centrifugiranjem u nosačima	136
Slika 99. Kumulativne krive otpuštanja kofeina iz nosača sa inkorporiranom lipozomnom suspenzijom: a) ispitivanje uticaja promene koncentracije inkapsuliranog kofeina na proces otpuštanja i b) ispitivanje uticaja promene udela lipozomne suspenzije u nosačima.....	137
Slika 100. Kumulativne krive otpuštanja kofeina iz nosača sa inkorporiranim koncentrovanim lipozomima: a) ispitivanje uticaja promene koncentracije inkapsuliranog kofeina na proces otpuštanja i b) ispitivanje uticaja promene udela koncentrovanih lipozoma u nosačima.....	138
Slika 101. Kumulativne krive otpuštanja nikotin-amida iz nosača sa inkorporiranom lipozomnom suspenzijom: a) ispitivanje uticaja promene koncentracije inkapsuliranog kofeina na proces otpuštanja i b) ispitivanje uticaja promene udela lipozomne suspenzije u nosačima.....	140
Slika 102. Kumulativne krive otpuštanja nikotin-amida iz nosača sa inkorporiranim koncentrovanim lipozomima: a) ispitivanje uticaja promene koncentracije inkapsuliranog kofeina na proces otpuštanja i b) ispitivanje uticaja promene količine koncentrovanih lipozoma u nosačima	141

Spisak tabela

Tabela 1. Određene pH-vrednosti u ljudskom organizmu [107]	18
Tabela 2. Vrste hidrogelova u zavisnosti od veličine pora i vrste odgovarajućeg mehanizma apsorpcije fluida iz spoljašnje sredine [117].....	19
Tabela 3. Mehanizmi oslobađanja aktivne supstance iz nosača na bazi hidrogela planarne geometrije (tankog filma) i odgovarajuće vrednosti eksponenta n [2]	29
Tabela 4. Najčešće korišćeni modeli za analizu kinetike otpuštanja leka iz sistema u čvrstom stanju [205]	31
Tabela 5. Kinetički parametri dobijeni primenom matematičkih modela na krive otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitim stepenom neutralizacije MAA u PB 6,8 i 0,1M HCl	65
Tabela 6. Koeficijent difuzije ispitivanih sredina u PMAC nosače sa različitim stepenom neutralizacije MAA.....	66
Tabela 7. Kinetički parametri dobijeni primenom matematičkih modela na krive otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom umreživača u PB 6,8 i 0,1M HCl	74
Tabela 8. Koeficijent difuzije ispitivanih sredina u PMAC nosače sa različitom koncentracijom umreživača	75
Tabela 9. Kinetički parametri dobijeni primenom matematičkih modela na krive otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom kofeina u PB 6,8 i 0,1M HCl.....	82
Tabela 10. Koeficijent difuzije ispitivanih sredina u PMAC nosače sa različitom koncentracijom kofeina.....	83
Tabela 11. Kinetički parametri dobijeni primenom matematičkih modela na krive otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 0% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije u PB 6,8 i 0,1M HCl	90
Tabela 12. Kinetički parametri dobijeni primenom matematičkih modela na krive otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 100% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije u PB 6,8 i 0,1M HCl.....	96
Tabela 13. Koeficijent difuzije ispitivanih sredina u PMAC/L nosača sa 100% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije	97
Tabela 14. Kinetički parametri dobijeni primenom matematičkih modela na krive otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 0%, 50% i 100% neutralizacije MAA i različitim oblikom lipozomne formulacije u PB 6,8 i 0,1M HCl.....	102

Tabela 15. Koeficijent difuzije ispitivanih sredina u PMAC/L nosača sa 0%, 50% i 100% neutralizacije MAA i različitim oblikom lipozomne formulacije.....	103
Tabela 16. Kinetički parametri dobijeni primenom matematičkih modela na krive otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa itakonskom kiselinom u PB 6,8 i 0,1M HCl	110
Tabela 17. Koeficijent difuzije ispitivanih sredina u PMAC i PMAC-L sistema sa itakonskom kiselinom.....	111
Tabela 18. Kinetički parametri dobijeni primenom matematičkih modela na krive otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa 1,6 mol% umreživača u odnosu na MAA u PB 6,8 i 0,1M HCl	116
Tabela 19. Koeficijent difuzije ispitivanih sredina u PMAC i PMAC-L sistema sa 1,6 mol% umreživača u odnosu na MAA	117
Tabela 20. Kinetički parametri dobijeni primenom Kopcha modela na krive otpuštanja kofeina iz PMAC-100N-4M-LS i PMAC-100N-4M-LC sistema u PB 6,8 i 0,1M HCl.....	133
Tabela 21. Koeficijent difuzije ispitivanih sredina u PMAC-100N-4M-LS i u PMAC-100N-4M-LS sisteme	134

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKE OSNOVE	3
2.1. Principi kontrolisanog otpuštanja aktivnih supstanci iz nosača oblika trodimenzionih polimernih mreža	3
2.2. Hidrogelovi	8
2.2.1. Definicija, karakteristike i oblasti primene	8
2.2.2. Sinteza hidrogelova za primenu u sistemima za kontrolisano otpuštanje supstanci	13
2.2.3. Klasifikacija hidrogelova	14
2.2.4. pH-osetljivi hidrogelovi	17
2.2.4.1. Poli(metakrilna kiselina)	20
2.2.4.2. Itakonska kiselina	22
2.2.5. Mehanizam bubrenja hidrogelova	24
2.2.6. Kinetika oslobađanja aktivne supstance iz nosača na bazi hidrogelova	27
2.3. Kazein	32
2.4. Lipozomi	35
2.5. Dosadašnja dostignuća na polju razvoja sistema na bazi poli(metakrilne kiseline) i hidrogel/lipozomi sistema	40
3. EKSPERIMENTALNI DEO	43
3.1. Korišćene hemikalije	43
3.2. Sinteza nosača lekova na bazi poli(metakrilne kiseline), kazeina i lipozoma	44
3.2.1. Sinteza PMAC sistema	44
3.2.2. Sinteza PMAC/L sistema	44
3.3. Korišćene metode	45
4. REZULTATI I DISKUSIJA	49
4.1. Karakterizacija PMAC i PMAC/L sistema i karakterizacija lipozoma	49
4.1.1. FTIR analiza PMAC i PMAC/L sistema	49
4.1.2. SEM analiza PMAC i PMAC/L sistema	52
4.1.3. XRD analiza PMAC i PMAC-L uzoraka	56
4.1.4. Karakterizacija lipozoma	57
4.2. Kinetika otpuštanja kofeina iz sintetisanih PMAC i PMAC/L nosača	58

4.2.1. Uticaj stepena neutralizacije.....	58
4.2.1.1. Stepen inkapsulacije kofeina.....	58
4.2.1.2. Bubrenje.....	58
4.2.1.3. Kinetika otpuštanja kofeina iz uzoraka sa različitim stepenom neutralizacije MAA	60
4.2.1.4. Koeficijent difuzije	66
4.2.2. Uticaj koncentracije umreživača	66
4.2.2.1. Stepen inkapsulacije kofeina.....	67
4.2.2.2. Bubrenje.....	67
4.2.2.3. Kinetika otpuštanja kofeina iz uzoraka sa različitom koncentracijom umreživača	68
4.2.2.4. Koeficijent difuzije	74
4.2.3. Uticaj koncentracije kofeina	75
4.2.3.1. Stepen inkapsulacije kofeina.....	75
4.2.3.2. Bubrenje.....	75
4.2.3.3. Kinetika otpuštanja kofeina iz uzoraka sa različitom koncentracijom kofeina	77
4.2.3.4. Koeficijent difuzije	83
4.2.4. Uticaj prisustva lipozoma u nosačima.....	84
4.2.4.1. Stepen inkapsulacije kofeina.....	84
4.2.4.2. Uticaj stepena neutralizacije MAA	84
4.2.4.3. Uticaj udela lipozomne suspenzije.....	86
4.2.4.3.1. Koeficijent difuzije.....	97
4.2.4.4. Poređenje otpuštanja kofeina iz nosača sa suspenzijom lipozoma i nosača sa lipozomima koncentrovanim centrifugiranjem.....	97
4.2.4.4.1. Koeficijent difuzije.....	103
4.2.5. Uticaj prisustva itakonske kiseline.....	103
4.2.5.1. Stepen inkapsulacije kofeina.....	105
4.2.5.2. Kinetika otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa itakonskom kiselinom.....	105
4.2.5.3. Koeficijent difuzije	111
4.2.6. Uticaj prisustva 1,6 mol% umreživača u odnosu na MAA	111
4.2.6.1. Stepen inkapsulacije kofeina.....	112

4.2.6.2. Kinetika otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa 1,6 mol% umreživača u odnosu na MAA	112
4.2.6.3. Koeficijent difuzije	116
4.3. Otpuštanje kofeina na simuliranom putu nosača kroz gastrointestinalni trakt čoveka.....	117
4.4. PMAC nosači sa lipozomima sa inkapsuliranim kofein/nikotin-amid kompleksom	121
4.4.1. Karakterizacija lipozoma	122
4.4.2. Stepen inkapsulacije.....	124
4.4.3. Karakterizacija PMAC-L sistem sa kompleksom kofein/nikotin-amid	124
4.4.4. Bubrenje	127
4.4.5. Kinetika otpuštanja kompleksa kofein/nikotin-amid	128
4.4.6. Koeficijent difuzije.....	133
4.5. Simulacija prolaska PMAC/L nosača sa inkapsuliranim kompleksom kofein/nikotin-amid kroz gastrointestinalni trakt čoveka	134
4.5.1. Bubrenje nosača	135
4.5.2. Kinetika oslobađanja kofeina	137
4.5.3. Kinetika oslobađanja nikotin-amida	139
5. ZAKLJUČAK	142
6. LITERATURA	144
Изјава о ауторству.....	163
Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада.....	164
Изјава о коришћењу.....	165

1. UVOD

Sistemi za kontrolisano otpuštanje aktivnih supstanci predstavljaju istraživačku oblast koja se intenzivno razvija već pet decenija. Niz prednosti koje ovi sistemi nude kao i ogromne mogućnosti za njihov razvoj, dizajn, podešavanje funkcionalnosti i slično, razlog su za veliko interesovanje i naučne i stručne zajednice. Osnovne prednosti ovih sistema u odnosu na tradicionalne su: produženo otpuštanje aktivne supstance, održavanje njene koncentracije u okviru terapijskih granica (koncentracija aktivne supstance u organizmu ne zavisi od unete količine aktivne supstance), smanjen broj unosa terapijskih doza u organizam, delovanje aktivne supstance na tačno određenom mestu u organizmu bez štetnog dejstva na okolna tkiva, mogućnost izbegavanja odgovora imunog sistema organizma, itd. Jedna grupa sistema koja ima veliki potencijal u primeni za kontrolisano i ciljano otpuštanje aktivnih supstanci je na bazi polimernih nosača u formi trodimenzionalnih mreža - hidrogelova. Ovi materijali se odlikuju jedinstvenim svojstvom da mogu da prepoznaju stimulans iz spoljašnje sredine (promena pH vrednosti, temperature, jonske jačine) i na njega reaguju promenom nekog svog svojstva.

Hidrogelovi na bazi poli(metakrilne kiseline) (PMAA) su intenzivno ispitivani pH-osetljivi hidrogelovi, dokazano biokompatibilni i netoksični, sa velikim brojem jonogenih karboksilnih grupa. Interesantni su za primenu u sistemima za kontrolisano i ciljano otpuštanje aktivnih supstanci, u kozmetici, u tretmanu oštećenja kože, u inženjerstvu tkiva i mnogim drugim oblastima. Poseban izazov u razvoju sistema za kontrolisano i ciljano otpuštanje aktivnih supstanci predstavlja transport slabo vodorastvornih i vodonerastvornih aktivnih supstanci. Iako su se hidrogelovi na bazi PMAA pokazali odličnim nosačima hidrofilnih aktivnih supstanci, ograničenje za primenu ovih materijala u sistemima za kontrolisano otpuštanje slabo vodorastvornih i vodonerastvornih aktivnih supstanci nametnuto je izrazito hidrofilnom prirodom PMAA i odnosi si se na nedovoljno dobre interakcije sa slabo vodorastvornim aktivnim supstancama. Kako bi se omogućilo vezivanje i transport slabo vodorastvornih aktivnih supstanci neophodno je prethodno izvršiti modifikaciju ovog materijala.

Predmet ove doktorske disertacije upravo se odnosi na dizajn nosača na bazi PMAA za kontrolisano i ciljano otpuštanje slabo vodorastvornih aktivnih supstanci u humanom intestinalnom traktu, kao i na analizu samog procesa otpuštanja navedenih supstanci. Sa tim ciljem modifikacija PMAA nosača izvedena je dodatkom amfifilne komponente – kazeina u formulaciju hidrogela. Kazein je biokompatibilan, biodegradabilan, netoksičan protein koji zbog svojih strukturnih karakteristika poseduje mogućnost vezivanja ovakvih aktivnih supstanci. Pored toga, upotrebna bezbednost kazeina odobrena je od strane Američke agencije za hranu i lekove (FDA). Kazein takođe poseduje 1) temperaturnu stabilnost, što omogućava sintezu hidrogelova na visokim temperaturama i 2) pH osetljivost, što ga čini dobrim kandidatom za

ciljano i kontrolisano otpuštanje aktivnih supstanci u crevima čoveka. Prilikom sinteze, u izabrane formulacije nosača na bazi PMAA i kazeina dodati su i lipozomi, kako bi se dodatno usporilo otpuštanje model leka (kofeina). Ove fosfolipidne nanočestice poseduju sposobnost istovremenog transporta i hidrofилnih i hidrofobnih aktivnih supstanci. Zbog svoje građe, koja je slična građi ćelijske membrane, biokompatibilnosti i netoksičnosti, lipozomi se veoma često mogu sresti kao komponente sistema za kontrolisano otpuštanje vakcina, genetskog materijala ili antitumornih agenasa, kao i aktivnih supstanci u kozmetičkim preparatima. Inkorporiranjem lipozoma u hidrogelove na bazi PMAA i kazeina istovremeno će se prevazići njihova ograničenja, kao što su sklonost ka oksidaciji, temperaturna osetljivost i sklonost ka formiranju agregata.

U prvom delu ove doktorske disertacije date su teorijske osnove vezane za sisteme na bazi PMAA za ciljanu dostavu i kontrolisano otpuštanje slabo vodorastvornih aktivnih supstanci. Zatim je u eksperimentalnom delu detaljno opisano na koji način su izvedeni eksperimenti: sinteza nosača na bazi PMAA i kazeina - PMAC i sinteza PMAC nosača sa lipozomima – PMAC/L, njihova karakterizacija i bubrenje, određivanje stepena inkapsulacije kofeina, praćenje otpuštanja kofeina i analiza kinetike otpuštanja kofeina. Rezultati i diskusija obuhvataju nekoliko celina. Prvi deo vezan je za karakterizaciju PMAC i PMAC/L nosača sa ciljem bližeg definisanja strukturnih karakteristika i otkrivanja uspostavljenih interakcija, kao i određivanje stepena inkapsulacije kofeina. Sledeći deo se odnosi na analizu otpuštanja kofeina iz sintetisanih PMAC nosača kao i na analizu bubrenja nosača, koje se dešava istovremeno sa otpuštanjem kofeina. Bubrenje nosača i otpuštanje kofeina praćeni su u dve sredine različitih pH vrednosti, kako bi se potvrdila pretpostavka da se dobijeni PMAC nosači mogu koristiti za ciljano otpuštanje u intestinalnom traktu. Sprovedena je i sveobuhvatna analiza uticaja udela pojedinačnih komponenti (natrijum-hidroksida, umreživača, lipozoma, kofeina) korišćenih za sintezu nosača na kinetiku otpuštanja kofeina. Poseban deo Rezultata i diskusije posvećen je ispitivanju mogućnosti otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa lipozomima u kojima je početna koncentracija kofeina bila viša od njegove maksimalne rastvorljivosti. To je postignuto dodatkom nikotin-amida u reakcionu smešu, koji poseduje mogućnost formiranja stabilnog kompleksa sa kofeinom.

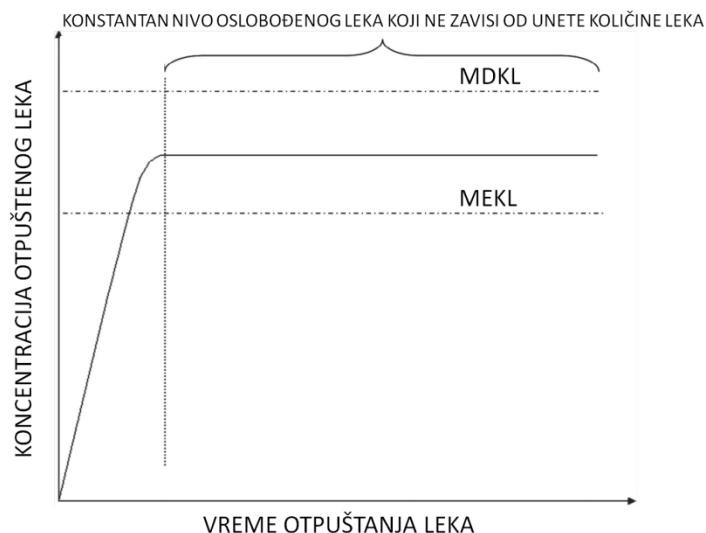
Kinetika otpuštanja kofeina iz dobijenih nosača analizirana je upotrebom više različitih matematičkih modela.

Na osnovu sveobuhvatnog pregleda literature može se zaključiti da istraživanja u okviru ove doktorske disertacije nisu bila ranije izučavana.

2. TEORIJSKE OSNOVE

2.1. Principi kontrolisanog otpuštanja aktivnih supstanci iz nosača oblika trodimenzionih polimernih mreža

Sistemi za kontrolisano otpuštanje lekova predmet su mnogih naučnih istraživanja još od 70.tih godina prošlog veka i imaju sve veću upotrebu i u kliničkoj praksi (biomedicina, farmacija, regenerativna medicina, čak i u terapiji teških oboljenja kao što je kancer) [1]. Ovi sistemi privlače veliku pažnju zbog mnogih prednosti koje poseduju u odnosu na do sada najčešće korišćene „tradicionalne oblike” lekova (tablete, kapsule itd.), a najvažnija je svakako mogućnost ređeg unosa leka u ljudski organizam sa većom efektivnošću i minimalnim neželjenim efektima. Na taj način se postiže konstantna koncentracija aktivne supstance nezavisno od njene unete količine, koja ostaje u terapijskim granicama duži vremenski period (Slika 1.[2]) za razliku od tradicionalnih oblika lekova gde otpuštena količina supstance može da varira i prelazi maksimalnu dozvoljenu koncentraciju, tj. da bude toksična ili da pada ispod minimalne efektivne terapijske koncentracije.



Slika 1. Kontrolisano otpuštanje leka (kinetika nultog reda): MDKL-maksimalna dozvoljena koncentracija leka; MEKL-minimalna efektivna koncentracija leka [2]

Nosači lekova za kontrolisano otpuštanje mogu takođe da se koriste i za „dopremanje” i otpuštanje tačno određene količine leka u svakom vremenskom trenutku do željenog mesta u ljudskom organizmu tokom određenog vremenskog perioda. Istovremeno mogu da zaštite osetljivu aktivnu supstancu od degradacije na putu kroz ljudski organizam do trenutka njenog

oslobađanja na mestu delovanja bez neželjenih efekata na okolna tkiva. Ove osobine sistema za kontrolisano otpuštanje karakterišu idealan sistem koji bi omogućio da se jednim unosom leka obezbedi efektivno delovanje aktivne supstance samo na ciljanom mestu tokom cele terapije.

Nosač može da oslobodi lek različitim mehanizmima, a jedan od najčešće prisutnih je difuzija koja predstavlja proces prelaska aktivne supstance iz sredine sa većom koncentracijom (u ovom slučaju to je prostor u nosaču) u sredinu sa nižom koncentracijom (mesto delovanja). Fenomen kontrolisanog otpuštanja supstance baziran je upravo na kontroli brzine mehanizma oslobađanja tj. difuzije zato što ona direktno utiče na doziranje željene količine te supstance kao i na vreme trajanja tog doziranja. Difuzija je prvi put opisana Fikovim jednačinama [3]:

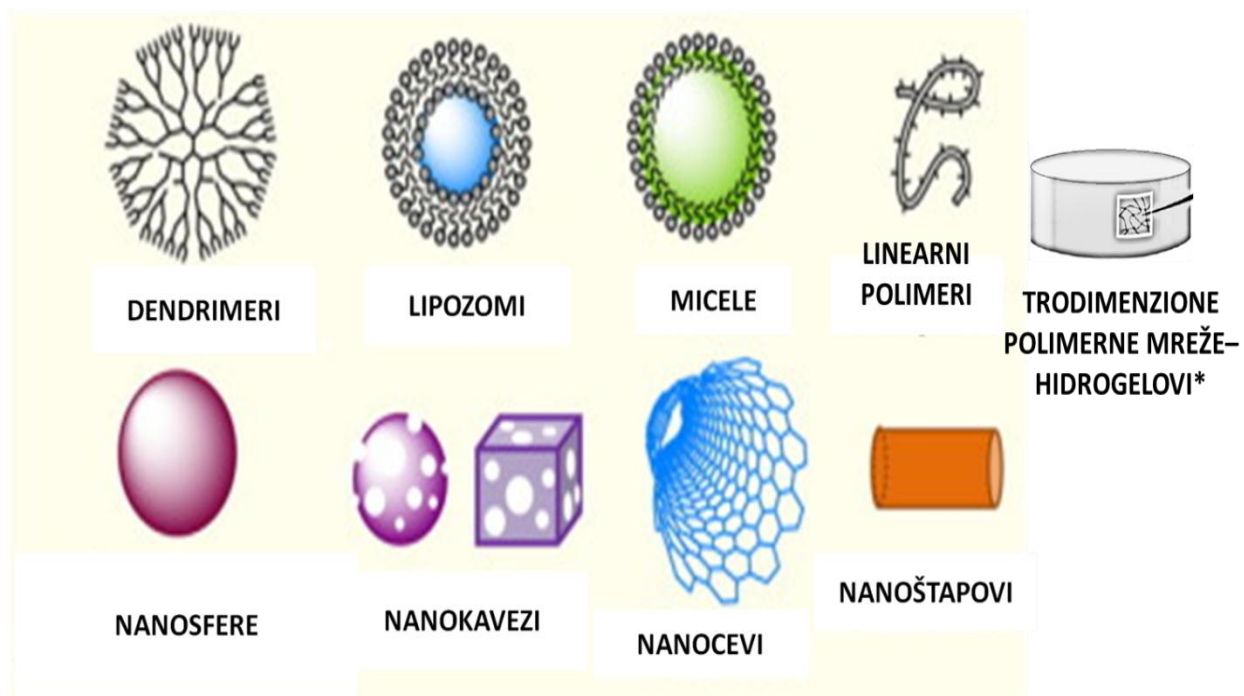
$$\frac{\partial C}{\partial t} = -D \frac{\partial C}{\partial x} \quad (1)$$

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -D \left[\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \right] \quad (2)$$

Jednačina (1) predstavlja Prvi Fikov zakon difuzije, a jednačina (2) je oblik Drugog Fikovog zakona, gde je konstanta proporcionalnosti D koeficijent difuzije i predstavlja karakteristiku sistema (m^2/s), C je koncentracija aktivne supstance koja difunduje (kg/m^3), t je vremenski period odvijanja difuzije (h), $\frac{\partial C}{\partial t}$ je promena koncentracije supstance sa vremenom, x , y i z su pravci u kojima supstanca difunduje, $\frac{dC}{dx}$ i $\left[\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \right]$ su gradijenti koncentracije, a znak minus ukazuje na činjenicu da se ostvareni fluks (Prvi Fikov zakon), tj. promena koncentracije sa vremenom (Drugi Fikov zakon) odvija u suprotnom smeru od gradijenta koncentracije.

Kod nekih sistema za kontrolisano otpuštanje lekova brzina oslobađanja leka može da se programira različitim modifikacijama zida nosača, kao što su promena debljine i sastava zida ili npr. kontrolom razgradnje zida itd. Drugi nosači mogu da otpuste lek usled dejstava različitih hemijskih, fizičkih ili bioloških stimulansa. Mehanizam povratne sprege je još jedan od načina da se utiče na oslobađanje leka, a koristi se u terapiji povišenog šećera u krvi. Poslednja grupa posebno značajnih sistema su sistemi za ciljano otpuštanje aktivne supstance u željenom organu ili tkivu u ljudskom telu čija je površina modifikovana specifičnim receptorom za određeno tkivo preko koga bi se sa njim povezivao.

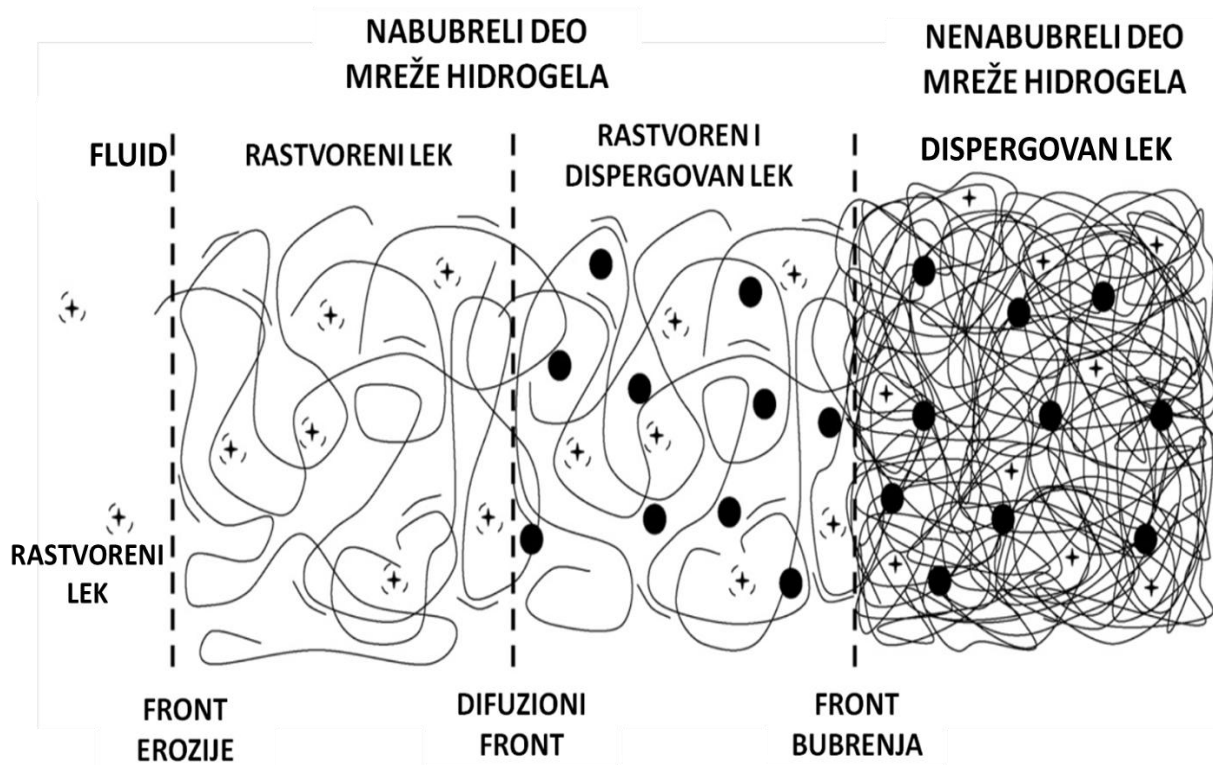
Nosači lekova mogu da budu različitih oblika i formi kao što je prikazano na Slici 2.[4], a naročito veliku pažnju privlače trodimenzione polimerne mreže - hidrogelovi i sferne fosfolipidne nanočestice - lipozomi zbog kompatibilnosti sa ljudskim tkivima.



Slika 2. Različiti oblici nosača lekova [4],*[5]

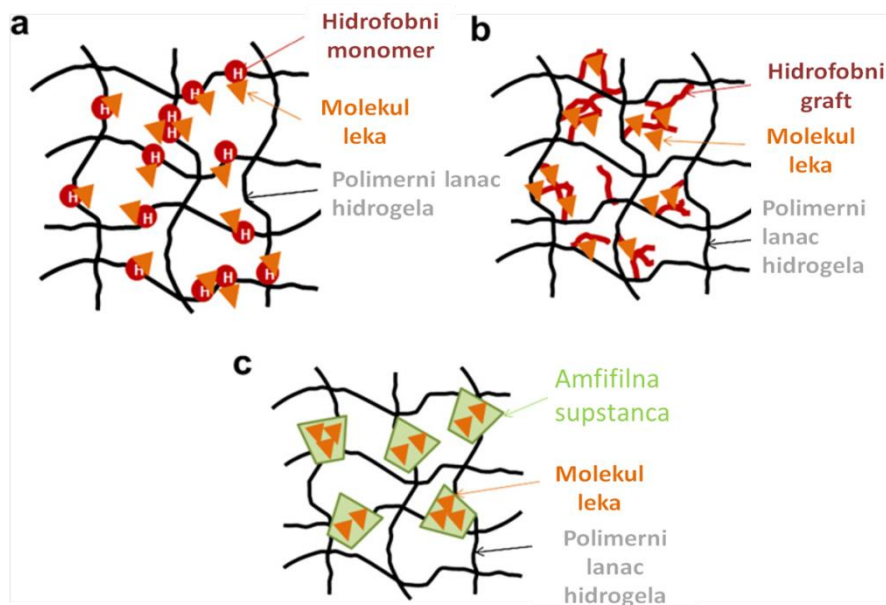
J. Siepmann i sar. su objasnili šematski (Slika 3.[6]) kako se čestice lekova oslobađaju iz nabubrelog hidrogela. Njihova početna pretpostavka bila je da ako je početna koncentracija leka u sistemu veća od rastvorljivosti leka tada su istovremeno rastvoreni i nerastvoreni oblici leka prisutni unutar matriksa nosača. Ovi autori su nosač na bazi hidrogela koji je potopljen u fluid u kome bubri, podelili na tri fronta: (1) front bubrenja - deli nenabubreli matriks (sa rastvorenim oblikom leka) od nabubrelog dela matriksa (sa rastvorenim i dispergovanim oblikom leka), (2) difuzioni front - deli nabubreli deo mreže na deo sa rastvorenim i dispergovanim oblikom leka od dela u kome je samo rastvoreni oblik leka, a na kraju je (3) front erozije - koji odvaja fluid koji okružuje hidrogel od nabubrelog matriksa koji sadrži samo rastvoreni oblik leka. Svaki od ovih frontova nije fiksiran, već pokretan. Istovremeno sa difuzijom okolnog fluida u hidrogel, čestice leka difunduju kroz matriks u spoljašnji medijum. J. Siepmann i sar. su takođe objasnili da je nenabubreli deo nosača suv i u staklastom stanju, dok se sa povećanjem količine fluida u hidrogelu povećava pokretljivost lanaca hidrogela, pa se odvija relaksacija lanaca polimera ili tranzicija iz staklastog u gumoliko stanje na frontu bubrenja.

Difuziju rastvorenih čestica leka iz polimernog nosača neki autori klasifikuju kao: (1) difuziju leka kroz pore sa vodom i (2) difuziju leka kroz polimerni matriks [7].



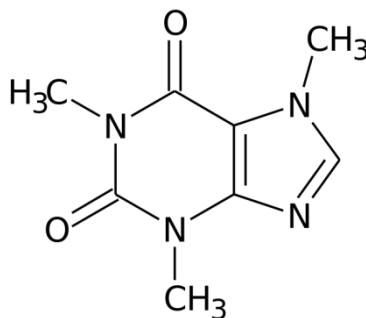
Slika 3. Kontrolisano otpuštanje leka iz hidrogela koji bubri [6]

Za razliku od rastvornih lekova, samo mala količina slabo vodorastvornih lekova difundovaće na mesto delovanja, što je često nedovoljna doza za terapiju. Zato i pored toga što poseduju optimalni oblik i imaju odgovarajuća aktivna mesta za vezivanje za mesto delovanja, ovi slabo vodorastvorni lekovi često ne mogu imati željeni terapijski efekat [7]. Takođe, tu su problemi vezani za njihovu inkapsulaciju, razna ograničenja koja proističu od stepena njihove rastvorljivosti i njihovog mogućeg naglog oslobađanja (tzv. „burst effect”), koji može da bude farmakološki opasan i ekonomski neefikasan. Dakle, kako bi se prevazišla ova ograničenja, važno je da se dizajnira odgovarajući nosač ovog tipa leka (Slika 4. [8]) koji će moći da ga zaštiti, transportuje do željenog mesta u ljudskom organizmu, kao i da oslobodi određenu željenu količinu tog leka u svakom trenutku tokom terapije. PMAA hidrogelovi modifikovani kazeinom i njihovi kompleksi sa lipozomima, koji su predmet ispitivanja ove disertacije predstavljaju takvu vrstu nosača.



Slika 4. Različite strategije za dobijanje sistema na bazi hidrogelova kao nosača slabo vodorastvornih lekova: a) kopolimerizacija hidrofobnih monomera, b) vezivanje slabo vodorastvornog leka za nosač preko hidrofobnih graftova („graftovanje“ bočnih lanaca) i c) inkorporiranje amfilne supstance [8]

Prema Farmakopeji Sjedinjenih američkih država aktivne supstance se prema rastvorljivosti mogu podeliti na aktivne supstance visoke rastvorljivosti (>1000 mg/ml), umerene rastvorljivosti (33-100 mg/ml) i na slabo vodorastvorne aktivne supstance (10-33 mg/ml) [9]. Kofein koji je u ovoj disertaciji korišćen kao model lek (Slika 5.) pripada poslednjoj grupi. Njegova maksimalna rastvorljivosti iznosi 20mg/ml na 25°C. U ovoj disertaciji uvođenjem amfilnog kazeina u formulaciju hidrofилnog PMAA hidrogela omogućena je inkapsulacija i kontrolisano otpuštanje slabo vodorastvorne aktivne supstance - kofeina iz nosača, a dodatak lipozoma omogućava dodatnu kontrolu brzine otpuštanja kofeina i sprečavanje „burst effecta“.



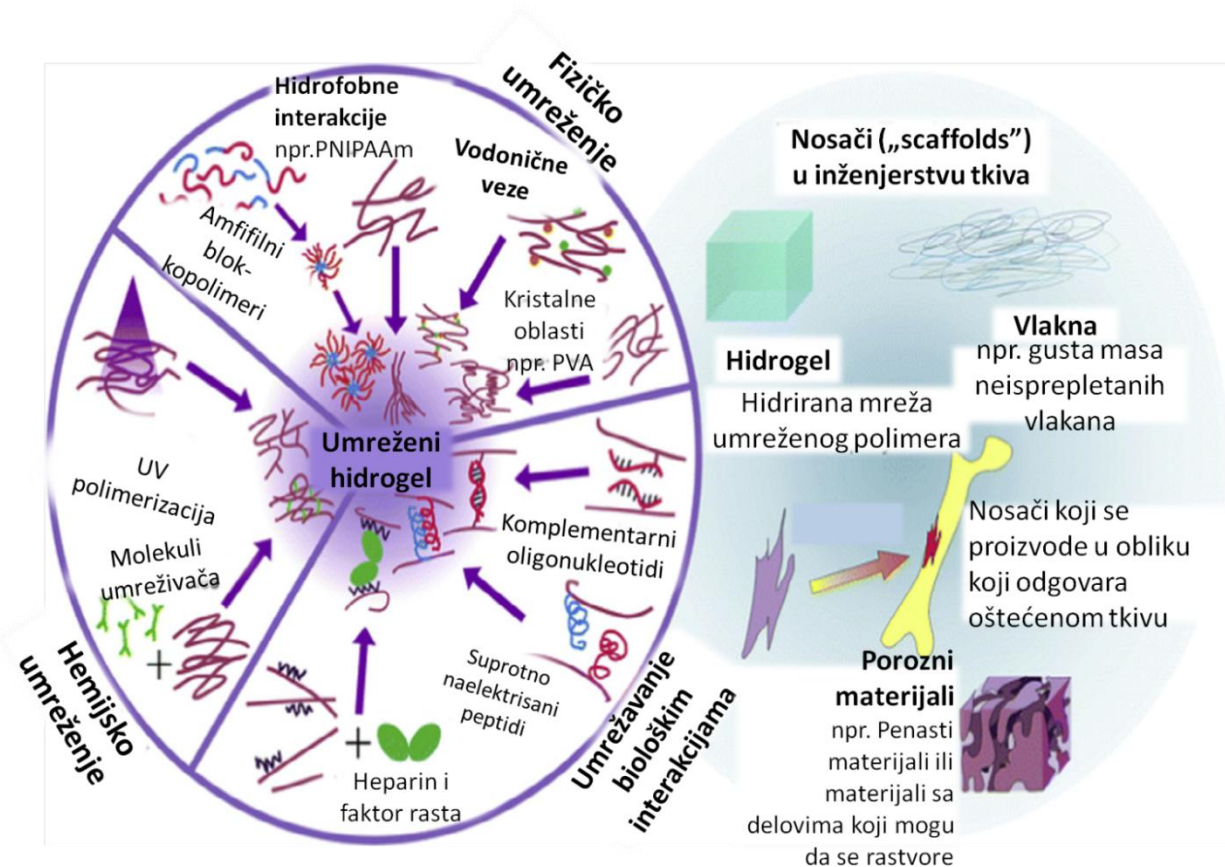
Slika 5. Strukturna formula kofeina

Dobijeni rezultati u ovoj doktorskoj disertaciji bi istovremeno mogli da se koriste kao osnova za uspešno prevazilaženje neželjenih efekata koji mogu da se jave kod upotrebe kofeina. Naime, poznato je da se kofein koristi kao psihoaktivna supstanca koja poboljšava kongitivne sposobnosti i smanjuje umor. Međutim, nakon pet časova od trenutka njegovog konzumiranja, čovek može da oseti naglu stimulaciju nervnog sistema koja je praćena osećajem iscrpljenosti [10]. Nosači sintetisani u ovoj tezi bi mogli da maskiraju gorki ukus kofeina i omoguće produženo i kontrolisano otpuštanje kofeina, čime bi se sprečila nagla stimulacija nervnog sistema čoveka. Creva čoveka imaju najveću površinu za apsorpciju aktivnih supstanci. Zidovi creva imaju veću permeabilnost u odnosu na zid želuca čoveka zbog čega mogu da relativno brzo distribuiraju aktivne supstance iz creva u sistemsku cirkulaciju [11]. Dakle, nosači ispitani u ovoj doktorskoj disertaciji bi mogli i da se koriste za ciljano dopremanje i kontrolisano otpuštanje kofeina u crevima čoveka, gde bi njegova apsorpcija bila najbrža i bez pomenutih neželjenih efekata.

2.2. Hidrogelovi

2.2.1. Definicija, karakteristike i oblasti primene

Hidrogelovi - hidrofилne trodimenzione polimerne mreže mogu da apsorbuju veliku količinu vode ili bioloških fluida bez rastvaranja. Njihova kompatibilnost sa ljudskim tkivima je mnoga bolja u odnosu na druge sintetisane biomaterijale, zbog njihove sposobnosti da apsorbuju ogromnu količinu vode, kao i zbog njihove porozne i meke teksture (Slika 6.[12]) [13-15]. Superapsorbenti su vrsta hidrogelova koji mogu da apsorbuju i zadrže hiljadama puta veća količine fluida od težine samog kserogela (suvi uzorak hidrogela) [16, 17]. Voda se apsorbuje hidrogelom zahvaljujući interakcijama koje se između njih uspostavljaju, kao što su hidratacija, kao i osmotske i kapilarne sile, kojima se suprotstavljaju lanci hidrogela pružajući otpor ekspanziji [18]. Bubrenje hidrogela je rezultat mnogih hidrofилnih funkcionalnih grupa koje ovi polimeri poseduju u svojoj strukturi, kao što su karboksilne (-COOH), amino (-NH₂), hidroksilne (-OH) i sulfatne (-SO₃H) grupe. Interakcije polimernih lanaca u matriksu hidrogela mogu biti hemijske - kovalentne veze (hemijski hidrogelovi), fizičke nekovalentne interakcije (fizički hidrogelovi) ili lanci u mreži hidrogela mogu da se povezuju kombinacijom obe vrste veza [13].



Slika 6. Dobijanje i primena hidrogelova u inženjerstvu tkiva [12]

Veoma dobra biokompatibilnost hidrogelova, njihova struktura koja je veoma slična ekstracelularnom matriksu i tkivima u ljudskom organizmu, kao i mogućnost da se u njih inkapsuliraju hidrofilni lekovi, rezultat su izuzetno velike količine apsorbirane vode. Biološka razgradnja ili rastvaranje hidrogelova može da se izazove promenama stimulansa iz njihovog okruženja kao što su pH, temperatura, jačina električnog polja itd, hidrolizom ili enzimima. Ipak, degradacija nosača leka na bazi hidrogela nije uvek poželjna i zavisi od toga kada i gde u ljudskom telu ovi sistemi moraju da dopreme svoj sadržaj, kao i od sastava sistema, proizvoda degradacije itd. [19, 20].

Vichterle i Lim bili su prvi koji su sintetisali PHEMA hidrogelove za biomedicinsku primenu u obliku kontaktnih sočiva (1960-ih) [21]. Od tada, hidrogelovi privlače sve više pažnje, a takođe raste i broj formulacija u obliku kojih se mogu pripremiti: mikro i nano-čestice, premazi, filmovi itd. Zbog svoje biokompatibilnosti [16], mogućnosti da apsorbuju i zadrže veliku količinu vode, "efektivnog prenosa mase" [22] i mogućnosti da se sintetišu u obliku različitih formulacija [23],[24-27] ovi nosači imaju širok spektar primene kao što su nosači lekova u eksperimentalnoj medicini, kao i u kliničkoj praksi za dijagnostikovanje [8], [28, 29], a

mogu da se koriste i kao materijali za: imobilizaciju ćelija, inženjerstvo tkiva, skafolde, sočiva, zarastanje rana i kao super-apsorbenti.

Hidrogelovi se mogu primeniti kao transdermalni sistemi za dopremanje lekova u procesu zarastanja rana. Oni sprečavaju gubitak telesnih tečnosti kroz ranu i mogu da se uklone bez oštećenja oblasti rane zato što ne prijanjaju čvrsto za površinu (nisu adherentni) [27, 30].

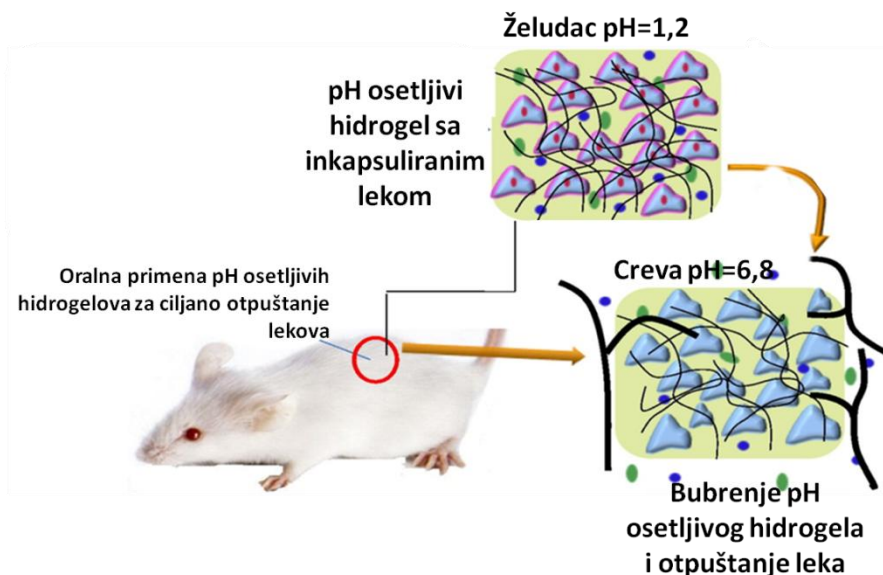
Osnovni nedostatak hidrogelova je njihova nedovoljna elastičnost i loša mehanička otpornost. Željena elastičnost i odgovarajuća mehanička otpornost sistema za otpuštanje lekova postiže se promenom fizičkih osobina hidrogelova (kao što su bubrenje, mehanička čvrstoća, površinska svojstva itd.) fizičko-hemijskim reakcijama. Odgovarajuća poroznost hidrogelova omogućava inkapsulaciju aktivne supstance u polimernu mrežu i kasnije njeno oslobađanje brzinom koja zavisi od koeficijenta difuzije čestica aktivne supstance kroz polimerni matriks. Porozna struktura hidrogelova može da se modeluje regulisanjem gustine umreženja u polimernoj mreži i povećanjem/smanjenjem afiniteta hidrogela ka medijumu u kome se nalazi. Hidrogelovi kao nosači lekova mogu da se koriste za sistemsko dopremanje lekova ili kao depoi aktivne supstance iz kojih se ona kontrolisano oslobađa, čime je dejstvo ove supstance lokalizovano, a vrednost njene koncentracije se održava na željenom nivou duži vremenski period [31, 32]. Ova vrsta nosača lekova ima niz prednosti u poređenju sa konvencionalnim oblicima nosača lekova, a to je između ostalog: 1) ciljano otpuštanje lekova na željeno mesto u ljudskom organizmu (kao što su npr. creva) i 2) produženo oslobađanje aktivne supstance čime se produžava i njeno dejstvo, poboljšavajući na taj način njenu biorasploživost sa manje neželjenih efekata [33]. Hidrogelovi mogu da imaju naelektrisanje ili da budu neutralni u zavisnosti od vrste funkcionalnih grupa koje su prisutne u njihovoj strukturi, pa ako imaju određeno naelektrisanje, oni će bubreti kao rezultat promene pH vrednosti spoljašnje sredine i menjaće svoj oblik kao odgovor na promenu električnog polja kome su izloženi (Slika 7. [34])[35]. Ova svojstva se koriste u ciljanom otpuštanju lekova na određenom mestu u ljudskom organizmu.

Hidrogelovi imaju dobre fizičke karakteristike za primenu u inženjerstvu tkiva (kao što je regeneracija tkiva [36, 37]): njihova razgradivost može da se kontroliše, imaju nisku gustinu, njihova struktura može lako da se modifikuje i imaju manje negativnih efekata na životnu sredinu u odnosu na materijale sa atomima metala ili neorganske materijale. Na primer, hidrogelovi za injektiranje [23] su odgovarajući kandidati za regeneraciju mišića [38, 39] i kosti [40-42]. Kao što je ranije rečeno, hidrogelovi poseduju osobine zbog kojih mogu da simuliraju ljudsko tkivo, tako da se mogu koristiti kao nosači faktora rasta kada je potrebna regeneracija tkiva [43].

Uprkos velikim mogućnostima, korišćenje hidrogelova je često ograničeno zbog njihovih nepoželjnih mehaničkih i termičkih osobina; u nekim slučajevima mala rastvorljivost, ograničena

biorazgradivost, visoka kristaliničnost; neproreagovali monomeri i upotreba toksičnih umreživača mogu takođe biti problemi. Stoga, dalje istraživanje treba usmeriti na razvoj ovih karakteristika, kombinujući prirodne i sintetske polimere sa unapred određenim karakteristikama kao što su rastvorljivost, biorazgradivost, adekvatna mehanička čvrstoća i elastičnost, brži odgovor na spoljašnje stimulanse i biološke procese [44-48].

Mehanička svojstva hidrogelova su jedno od njihovih važnih karakteristika, naročito kod sistema za kontrolisano otpuštanje lekova (biodegradabilnost ako je potrebno zaštititi osetljivu aktivnu supstancu ili poroznost hidrogela) i inženjerstvo tkiva (mehanička otpornost). Oni definišu ponašanje hidrogelova kada su pod dejstvom sile [23]. Hidrogelovi, generalno imaju loša mehanička svojstva (kao što su mala mehanička čvrstoća, nedovoljno brz ili delimičan povratak u stanje pre nego što je spoljašnja sila delovala) zbog krтости njihove strukture, što ograničava njihovu upotrebu u nekim oblastima. Stoga je poboljšanje mehaničkih svojstava i njihova analiza predmet mnogih istraživanja. Hemijski hidrogelovi kod kojih su polimerni lanci povezani kovalentnim vezama, nakon dejstva spoljašnje sile gotovo da ne mogu da se vrate u stanje pre njenog dejstva zato što dolazi do raskidanja ovih veza i kolapsa mreže. Zbog toga su fizički hidrogelovi kod kojih je umrežavanje postignuto uspostavljanjem različitih nekovalentnih interakcija (vodonične veze, jonske veze) [49] posebno zanimljivi istraživačima. Mnogi naučni radovi se bave razvojem hidrogelova koji bi posedovali određene željene mehaničke karakteristike kao što su mikro- ili nano-kompozitni hidrogelovi [50], hidrogelovi sa dve mreže [51] ili hidrofobni hidrogelovi [52]. Mehanička svojstva, veoma su važna kada se hidrogelovi koriste kao implantati ili ako neki oštećeni delovi ljudskog tela moraju da se zamene. Obično je ovakva upotreba hidrogelova ograničena zbog njihove meke strukture ili ograničenog povratka u stanje pre dejstva spoljašnje sile, tako da se radi na prevazilaženju ovih nedostataka razvojem novih vrsta hidrogelova kao što su npr. interpenetrirajući [53, 54] i semipenetrirajući [55, 56] hidrogelovi. Viskoelastičnost hidrogelova potiče iz njihove strukture koja ima i osobine absorbovanog fluida i karakteristike čvrstih supstanci koje potiču od mreže [23]. U zavisnosti od toga da li će sistemi za otpuštanje lekova biti korišćeni kao biorazgradivi sistemi ili su dizajnirani da zaštite osetljivu aktivnu supstancu, zavisice koje mehaničke osobine će biti poželjne. Na primer, degradacija hidrogelova je veoma važna kod biorazgradivih sistema [14, 19] [57]. Degradabilnost u nekim slučajevima nije uvek poželjna, pa čak i kod biorazgradivih hidrogelova ako do nje dođe pre nego što nosač aktivne supstance na bazi hidrogelova dopremi osetljivu aktivnu supstancu neoštećenu do željenog mesta u ljudskom organizmu. Ova vrsta nosača mora da zaštiti osetljivu aktivnu supstancu [20], što znači da mora da ima dovoljnu mehaničku otpornost koja će omogućiti sistemu da stigne neoštećen usled mnogih prepreka tokom transporta leka na putu kroz ljudsko telo do željenog mesta, a po potrebi i da istovremeno može da se razgradi na tom željenom mestu. Ovo može da se postigne upotrebom odgovarajuće količine umreživača [58] kako bi se dobila dovoljno jaka i istovremeno elastična mreža hidrogela. Povećanje mehaničke čvrstoće hidrogela takođe može da se postigne kopolimerizacijom [59].



Slika 7. Hidrogelovi osetljivi na promenu pH za kontrolisano oslobađanje aktivnih supstanci in vivo [34]

Količina rastvarača u reakcionoj smeši takođe utiče na mehaničke osobine hidrogelova. Kada je količina rastvarača veća, efikasnost umrežavanja je manja, a mogućnost da dođe do npr. ciklizacije raste što dovodi do lošijih mehaničkih svojstava [60]. Na mehaničke osobine sintetisanih hidrogelova mogu da utiču i drugi parametri, kao što su temperatura, vreme sinteze itd.

Poroznost takođe može da utiče na mehaničke osobine hidrogelova preko veličine i površinskih karakteristika pora, udela slobodnog prostora i povezanosti unutar mreže hidrogela [23]. Veća poroznost i veličina pora su poželjni kada se hidrogelovi koriste kao nosači - skafoldi zato što je lakše dopremanje neophodnih supstanci iz organizma u ćelije (koje se nalaze unutar hidrogela), za njihovo normalno funkcionisanje. Makroporoznost takođe može dovesti do smanjenja mehaničkih karakteristika nosača, zbog velikog slobodnog prostora u strukturi hidrogela [23]. Ovaj problem se može rešiti ako se koriste hidrogelovi sa većom mehaničkom snagom [61].

I. Luo i sar. [62] su sintetisali kopolimer metakrilne kiseline (MAA) i akrilonitrila (AN), hidrogel osetljiv na promenu pH-vrednosti, u cilju poboljšanja mehaničkih osobina i dobijanja odgovarajućeg nosača za kontrolisano otpuštanje. Dobili su hidrogel koji ima brz odgovor na promenu pH-vrednosti i jonske jačine spoljašnje sredine, kao i bolju mehaničku otpornost na kompresiju, što je postignuto kopolimerizacijom PMAA sa hidrofobnim AN, tj. povećanjem njegove količine u ovom kopolimeru. Ovi autori su pokazali da je ovaj kopolimer otporan na kompresiju u simuliranom crevnom okruženju, i sporije oslobađa model lek i u simuliranom crevnom okruženju i u simuliranoj želudačnoj sredini, što je posledica prisustva AN. Period

oslobađanja leka je bio duži u simuliranom crevnom okruženju od perioda oslobađanja u simuliranoj želudačnoj sredini [62].

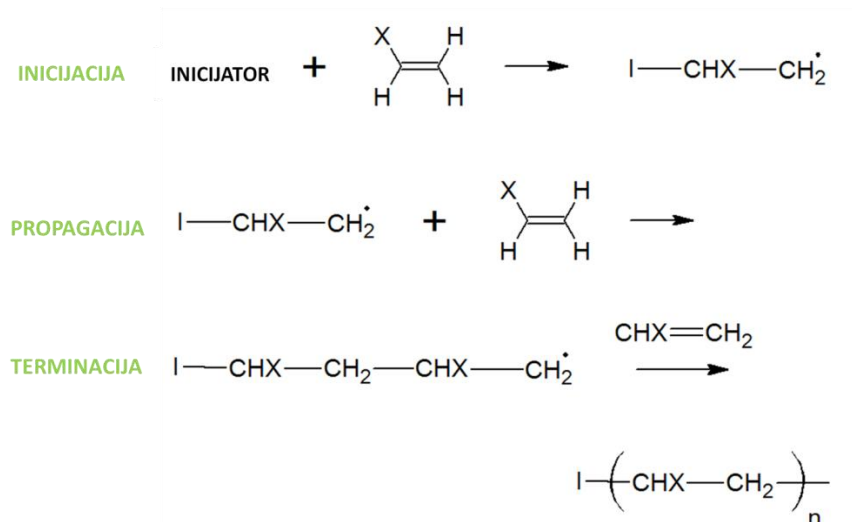
U ovoj doktorskoj disertaciji PMAA je modifikovana kazeinom koji pored toga što je omogućio inkapsulaciju i ciljano otpuštanje slabovodorastvorne supstance, poboljšao je i mehaničke karakteristike PMAA hidrogela [63].

2.2.2. Sinteza hidrogelova za primenu u sistemima za kontrolisano otpuštanje supstanci

Većina sintetskih hidrogelova se dobija slobodno-radikalnim mehanizmom iz monomera vinilnog tipa. Formiranje aktivnog centra je rezultat raskidanja dvostruke veze monomera izlaganjem toploti (upotreba termičkih inicijatora), svetlosti (korišćenje foto-inicijatora), enzimima (primena bio-inicijatora) ili elektronskim snopovima i zavisi od vrste rastvarača, reakcionih uslova i specifičnosti monomera. Aktivni centar predstavlja početni korak faze propagacije kojom se dalje formira polimerni lanac.

Slobodno radikalna polimerizacija (SRP) (Slika 8.[64]) predstavlja često korišćenu tehniku koja se lako može prilagoditi specifičnim zahtevima sinteze određenog polimera zbog svoje jednostavnosti puta polimerizacije. U SRP-u faza inicijacije, propagacije i terminacije nastajanja polimernih lanaca gotovo je trenutna u vodenim rastvorima, zbog čega upotreba organskih rastvarača može da se izbegne. Zbog mogućnosti primene velikog broja monomera i mogućnosti polimerizacije uprkos prisutnim nečistoćama (nije neophodno uklanjanje stabilizatora niti rastvarači moraju da se prečišćavaju do visokog stepena čistoće), SRP tehnika je našla veliku primenu kako u industrijskim procesima, tako i u istraživačkom radu. Inicijatori poput 2,2'-azobis-[2-(2-imidazolin-2-il)propan]dihidrohlrorid (VA-044), koji je upotrebljen u sintezi hidrogelskog nosača leka u ovoj disertaciji, omogućavaju izvođenje polimerizacije u prisustvu kiseonika, pa atmosfera azota nije bila potrebna tokom sinteze nosača.

Prirodni ili sintetski hidrogelovi koji su rastvorni u vodi mogu biti umreženi na više načina dejstvom jonizujućeg zračenja kojim se stvaraju glavni lanci slobodnih radikala, među kojima tokom procesa umrežavanja mogu da se uspostave fizičke interakcije kao što su elektrostatičke, fizičko „uplitanje” lanaca i kristalinične interakcije ili mogu da se uspostave hemijske veze između glavnih lanaca polimera.



Slika 8. Mehanizam slobodno-radikalske polimerizacije [64]

Glavne tehnike polimerizacije su tzv. „bulk” polimerizacija ili polimerizacija u masi [65], polimerizacija u rastvoru [66] i u suspenziji [67]. Osnovne tri komponente su monomer, inicijator i umreživač, koji se mogu rastvoriti u vodi ili bilo kom rastvaraču koji će kontrolisati toplotu polimerizacije. Nedostaci ovih procesa mogu da budu nečistoće koje zaostaju od procesa sinteze u obliku neproreagovanih monomera, ostataka inicijatora, umreživača i nastalih sporednih produkata polimerizacije. Hidrogelovi se obično pripremaju polimerizacijom i umrežavanjem u masi [68], formiranjem polimerne mreže u vodenoj sredini [69] i „graft” polimerizacijom [70].

Sve više se radi na dobijanju hibridnih materijala, dobijenih kombinovanjem prirodnih i sintetskih materijala koji imaju željene fizičke, hemijske i mehaničke osobine, koje bi nosač na bazi hidrogela trebalo da poseduje i čije ponašanje bi moglo da se predvidi, što je naročito značajno kod kontrolisanog otpuštanja. Zbog toga su u ovoj tezi sintetisani pH osetljivi hibridni PMAC i PMAC/L nosači koji imaju veću gustinu umreženja bez dodavanja veće količine umreživača[63]. Sinteza hibridnih PMAC nosača izvedena je putem konvencionalne polimerizacije preko slobodnih radikala i umrežavanja u vodenoj sredini. Ovi nosači su korišćeni za ispitivanje kinetike otpuštanja model leka kao odgovor na promenu pH-vrednosti sredine, što je predmet ove disertacije.

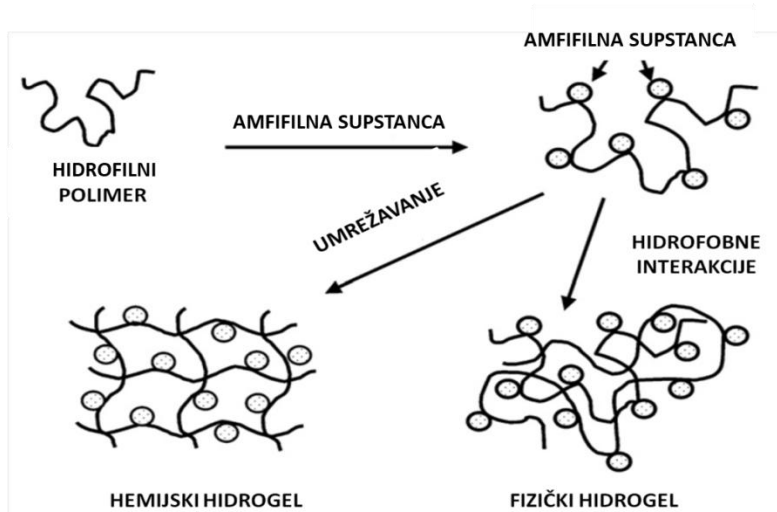
2.2.3. Klasifikacija hidrogelova

Postoji veliki broj podela hidrogelova objavljenih u literaturi u zavisnosti od toga na čemu se zasnivaju. Podela hidrogelova može da se izvede na osnovu njihovog porekla, vrste umreženja ili naelektrisanja, da li su biodegradabilni ili ne, kakve su im fizičke osobine. Takođe

se mogu podeliti na osnovu vrste spoljnih faktora koji utiču na njihovo bubrenje i vrste metode kojom su dobijeni [71].

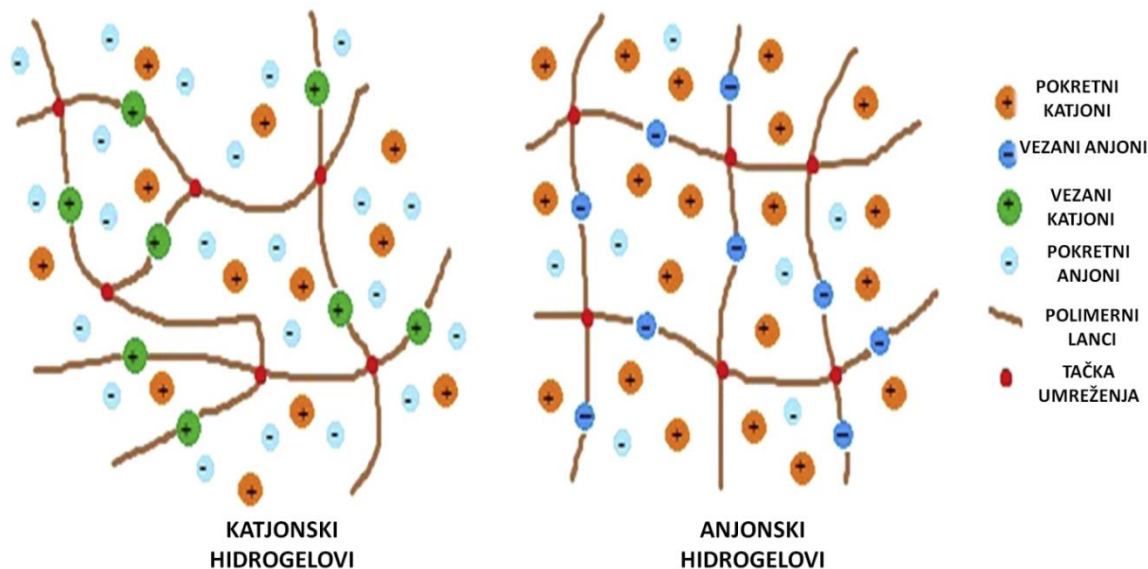
Hidrogelovi mogu da imaju prirodno poreklo ili mogu da se sintetišu; prema tome se mogu podeliti na prirodne i sintetske [72]. Pored prirodnih hidrogelova, u grupu prirodnih polimera spadaju i kazein, hitozan, skrob, alginat itd. Oni su biodegradabilni i mogu se modifikovati kako bi se poboljšale njihove osobine, u cilju vezivanja za određeno mesto u ljudskom organizmu i dobijanje boljeg ćelijskog odgovora na njih. Poli(etilenglikol) (PEG), poli(vinil alkohol) (PVA), poli(metarkilna kiselina) (PMAA) itd. su sintetski hidrogelovi koji imaju strukturu koja se lako može modifikovati, čime se postižu željene karakteristike kao što su veći apsorpcioni kapacitet i mehanička čvrstoća, i stabilnost ili biorazgradivost kao odgovor na spoljne stimulanse (promene pH vrednosti, temperature ili prisustva enzima) u zavisnosti od toga šta je potrebno za dati slučaj. Takođe, poseduju visoku čistoću i nisku imunogenost, koje sa prethodno navedenim karakteristikama hidrogelove čine multifunkcionalnim materijalima. Upravo zbog toga raste interesovanje za dobijanje hibridnih hidrogelova, polimernih materijala sa željenim karakteristikama koje su rezultat kombinacije više različitih prirodnih i/ili sintetskih polimera, koji ulaze u njihov sastav. U ovoj doktorskoj disertaciji su kombinacijom jednog sintetskog hidrogela – PMAA i jednog prirodnog polimera – kazeina dobijeni hibridni nosači koji su posedovali osobine obe komponente neophodne za inkapsulaciju i ciljanu dostavu slabo vodorastvorne aktivne supstance.

Još jedan od načina za podelu hidrogelova je na osnovu vrste umreženja. Fizički hidrogelovi se formiraju fizičkim umreženjem polimernih lanaca različitim fizičkim interakcijama kao što su hidrofobne interakcije [73], vodonične veze [74], agregacija polimernih lanaca, elektrostatičke interakcije [75], kristalizacija [76] itd. Takođe postoje i druge vrste fizičkog umrežavanja [77, 78], koje mogu da uključuju upotrebu otrovnih umreživača zbog čega nisu bezbedne za primenu. Multiblok kopolimeri (koji se sastoje od hidrofилnog glavnog polimernog lanca za koji su vezane hidrofobne jedinice), kao i graft kopolimeri [79] (koji su izgrađeni od hidrofobnog glavnog polimernog lanca sa hidrofилnim graft jedinicama) obično se koriste za dobijanje fizičkih hidrogelova. Reverzibilnost fizički umreženih hidrogelova je rezultat njihovih konformacijskih promena. Za razliku od njih hemijski umreženi hidrogelovi su nereverzibilni zbog hemijskog (kovalentnog) umrežavanja njihovih polimernih lanaca. Novije metode hemijskog umrežavanja za dobijanje hemijskih hidrogelova su: umrežavanje visoko-energetskim zračenjem, reakcijama kondenzacije i upotrebom enzima [80]. Hemijski hidrogelovi mogu da se dobiju polimerizacijom preko slobodnih radikala kombinacijom različitih vinilmonomera [81], kao i modifikovanjem hidrofилnih polimera sa grupama koje mogu da se polimerizuju. Hibridni hidrogelovi koji se sastoje od fizički i hemijski umreženih hidrogelova povezanih elektrostatičkim interakcijama, su tzv. „dual-network” hidrogelovi [79, 82]. Ova vrsta hidrogelova ima izuzetne mehaničke osobine [83]. Šematski prikaz fizičkog i hemijskog hidrogela dat je na Slici 9. [84].



Slika 9. Fizički i hemijski hidrogel [84]

Hidrogelovi se mogu podeliti na biodegradabilne i ne-biodegradabilne u zavisnosti od stepena degradabilnosti u biosistemima, a u zavisnosti od vrste naelektrisanja na grupama vezanim na polimernim lancima mogu biti katjonski, anjonski ili neutralni (Slika 10.[85]). Takođe se hidrogelovi mogu podeliti prema tipu strukture na amorfne [86], semikristalinične [87], kristalinične [88] i hidrokolidne agregate [89]. Klasifikacija hidrogelova bazirana na metodama njihove sinteze je: kopolimerni hidrogelovi [90], homopolimerni hidrogelovi [91] i hidrogelovi sa inter- [92] i semi-penetrirajućim mrežama [93]. Podela na takozvane „pametne” i konvencionalne hidrogelove je izvršena na osnovu fizičkih svojstava hidrogelova. U zavisnosti od njihovog odgovora na spoljne stimulanse, hidrogelovi mogu takođe biti fizički (ako reaguju na promene temperature, pritiska, električnog polja), hemijski (reaguju na promene pH vrednosti, količine glukoze) i biohemijski (promene spoljnih stimulansa kao što su enzimi, antigeni) [94-97].



Slika 10. Šematski prikaz strukture katjonskih i anjonskih hidrogelova [85]

Hidrogelovi osjetljivi na spoljne stimulanse (pH, jonska jačina, koncentracija jona, temperatura, električno polje, pritisak itd.) ili „inteligentni” hidrogelovi koriste se kao sistemi za kontrolisano i ciljano otpuštanje aktivnih supstanci, za imobilizaciju biomolekula, za dijagnostikovanje i snimanje, kao senzori, u inženjerstvu tkiva za reparaciju i regeneraciju ljudskih tkiva i organa, kao kontaktna sočiva, za tretiranje rana, za oblaganje drugih sistema, u kozmetici, za oslobađanje agrohemikalija [98-104]. Oni imaju veliku primenu zbog svojih dobrih karakteristika, kao što su sposobnost da apsorbuju i zadrže ogromnu količinu fluida, poseduju meku strukturu, elastičnost i poroznost. Međutim, hidrogelovi koji reaguju na spoljašnje stimulanse imaju određena ograničenja, kao što su nedostatak mehaničke snage i nedovoljno brz odgovor na spoljne stimulanse. Ovo ograničava njihovu upotrebu u nekim oblastima, tako da se dalja istraživanja usmeravaju u tom pravcu. Temperaturni i pH-osetljivi hidrogelovi i njihova primena kao sistema za kontrolisano otpuštanje lekova, u inženjerstvu tkiva ili kao biosenzora imaju posebnu pažnju istraživača zbog svog specifičnog odgovora na promenu temperature i pH vrednosti spoljne sredine, najčešćih parametara koji se menjaju u biološkim i hemijskim sistemima [95, 105, 106].

2.2.4. pH-osetljivi hidrogelovi

pH-osetljivi hidrogelovi su hidrogelovi čije se bubrenje i fazni prelaz odvija kao odgovor na promenu pH-vrednosti spoljašnje sredine. Kako bi ovi hidrogelovi mogli da se koriste u biomedicini neophodno je da se sintezom dobiju takvi pH-osetljivi hidrogelovi koji bi mogli da reaguju na tačno određeni pH interval, zato što svaki organ, tkivo ili drugi deo ljudskog tela

imaju različite pH-vrednosti (Tabela 1. [107]). pH-vrednosti mogu da variraju u ljudskom telu od kiselih u želucu (pH = 1,0-3,0) do blago kiselih i baznih u tankim crevima (pH=5,0-7,4) [108]. Ova vrsta pametnih hidrogelova zbog svoje osetljivosti na promenu pH-vrednosti, može da se koristi za ciljano otpuštanje lekova [109, 110].

Tabela 1. Određene pH-vrednosti u ljudskom organizmu [107]

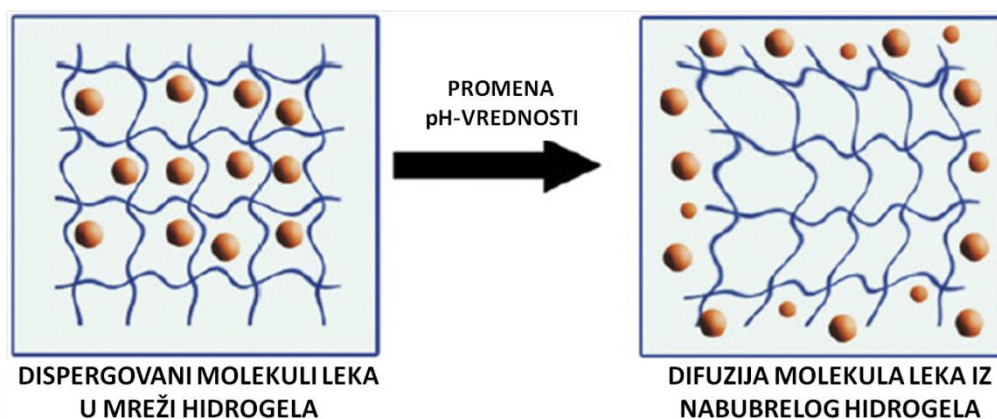
Ljudski organizam	pH-vrednost
Krvni sudovi	7.4-7.5
Želudac	1.0-3.0
Gornji deo tankih creva	4.8-8.2
Debelo crevo	7.0-7.5
Lizozomi	4.5-5.0
Goldžijev kompleks	6.4
Tumor-vanćelijska sredina	6.2-7.2

Kao odgovor na promenu pH-vrednosti ili jonske jačine spoljašnje sredine, pH-osetljivi hidrogelovi mogu da otpuste protone (ako poseduju kisele grupe) ili prime protone (ako poseduju bazne grupe), pa se mogu podeliti na anjonske (kisele) i katjonske (bazne) hidrogelove [110]. Obično pH-osetljivi hidrogelovi imaju veći broj kiselih ili baznih grupa na glavnom polimernom lancu, pa se nazivaju polianjonski (polikisele) ili polikatjonski (polialkalni) hidrogelovi. Jonogene kisele grupe na polimernom lancu, kao što su karboksilne grupe, reaguju na niže pH-vrednosti primanjem protona, a pri višim pH-vrednostima, dolazi do njihovog deprotonovanja [110]. Polianjonski hidrogelovi bubre u alkalnoj sredini usled elektrostatičkog odbijanja $-COO^-$ grupa sa generisanim fiksnim negativnim naelektrisanjem. Sa povećanjem vrednosti pH spoljne sredine povećava se i broj prethodno pomenutih negativnih naelektrisanja, kao i do jačeg odbijanja ovih grupa, što dovodi do većeg stepena bubrenja i veće hidrofilitnosti mreže [14, 111]. Jedna od grupa polianjonskih hidrogelova su hidrogelovi na bazi PMAA. Polikatjonski hidrogelovi bubre u sredini sa niskim pH-vrednostima tj. onim vrednostima koje su ispod pKb velikog broja alkalnih grupa (kao što je $-NH_2$) koje su prisutne na glavnom lancu polimera hidrogela [112]. Tada ove grupe primaju protone, a na njima se generiše fiksno pozitivno naelektrisanje. Sa smanjenjem pH-vrednosti povećava se broj prethodno pomenutih pozitivnih naelektrisanja, kao i elektrostatičko odbijanje između lanaca hidrogela, usled čega raste stepen bubrenja hidrogela kao i njegova hidrofilitnost [14].

Rastvorljivost pH-osetljivih hidrogelova, njihovo bubrenje i otpuštanje aktivnih supstanci (Slika 11.[113]), takođe zavisi od promene generisanih naelektrisanja na jonogenim grupama tj. promene pH vrednosti spoljašnje sredine. pH-osetljivi hidrogelovi mogu da postanu nerastvorni kao rezultat smanjenja pH-vrednosti koje utiče na smanjenje generisanih naelektrisanja i hidrofilitnosti hidrogela [107].

Prethodno pomenute pojave kao što su bubrenje i skupljanje zapremine hidrogelova, koje nastaju kao rezultat promene pH, dovode do deformacije strukture hidrogelova kao što su ekspanzija ili kontrakcija u svim pravcima [114], ali takođe mogu biti složenije poput savijanja, uvijanja ili preklapanja [115, 116], što se svakako mora uzeti u obzir u slučaju primene hidrogelova kao nosača aktivnih supstanci.

Za razliku od konvencionalnih, pH-osetljivi hidrogelovi kao nosači aktivnih supstanci obezbeđuju ciljano dopremanje leka do određenog mesta u ljudskom organizmu sa minimalnim neželjenim efektima. Zbog toga se može reći da su bliski konceptu idealnog sistema za dopremanje leka u kome profil njegovog otpuštanja može da isprati različite metaboličke i fiziološke promene koje se dešavaju u organizmu na putu nosača [117].



Slika 11. Otpuštanje lekova iz hidrogelova kao odgovor na promenu pH-vrednosti spoljašnje sredine [113]

Uspešnost nosača na bazi hidrogelova da ispune predviđenu funkciju usko je povezan sa njihovom strukturom polimerne mreže, čija je osnovna jedinica pora. Ona se može definisati kao prostor između polimernih lanaca hidrogela kroz koji se otpušta lek različitim mehanizmima (difuzija, relaksacija, erozija...). U Tabeli 2. [117] data je klasifikacija hidrogelova na osnovu veličine pora, kao i vrste odgovarajućeg mehanizma bubrenja.

Tabela 2. Vrste hidrogelova u zavisnosti od veličine pora i vrste odgovarajućeg mehanizma apsorpcije fluida iz spoljašnje sredine [117]

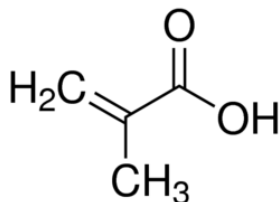
Podela hidrogelova prema veličini pora	Veličina pora	Mehanizam bubrenja
Neporozni	1-10 nm	Difuzija kroz slobodnu zapreminu
Mikro-porozni	10-100 nm	Molekulska difuzija i konvekcija kroz pore ispunjene vodom
Makro-porozni	0,1-1 μm	Difuzija kroz pore ispunjene vodom
Super-porozni	>1 μm	Kapilarne sile

Veličina čestica leka koje hidrogel nosi kao i željeni način otpuštanja istog, utićaće koji će od prethodno navedenih hidrogelova biti odabran, tj. koja veličina pora će biti potrebna.

pH-osetljivi sintetski polimeri mogu da se modifikuju tako da imaju veliki broj povoljnih osobina, zbog čega su često u prednosti u odnosu na pH-osetljive prirodne polimere kada se radi o izboru za sisteme za kontrolisano otpuštanje, ali nekada toksičnost upotrebljenih supstanci tokom njihove sinteze može da ograniči njihovu upotrebu. U ovoj tezi su opisana dva pH-osetljiva sintetska polimera koji imaju brojne poželjne karakteristike neophodne za primenu u sistemima za kontrolisano otpuštanje lekova, zbog čega su i korišćena u sintezi nosača – PMAA i itakonska kiselina (IA).

2.2.4.1. Poli(metakrilna kiselina)

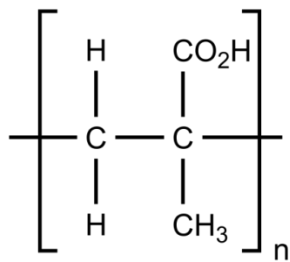
Metakrilna kiselina (MAA) je bezbojno, viskozno jedinjenje čija je strukturna formula prikazana na Slici 12. Ovaj monomer je asimetričan, vinilnog tipa, pa se sinteza poli(metakrilne kiseline) (PMAA) odvija slobodnoradikalnim mehanizmom, a tokom faze propagacije ovaj monomer može da se orijentiše ataktički i izotaktički [118]. Za ataktičku poli(metakrilnu kiselinu) (*aPMAA*) je karakteristično da duž njenog glavnog polimernog lanca nema uređene orijentacije grupa već se one orijentišu na razne načine [119]. Ataktična PMAA može da gelira u slučaju kada se povisi temperatura njenog vodenog rastvora sa visokom koncentracijom, a samim tim i malim naelektrisanjem jona *aPMAA*. Ovaj proces je reverzibilan, pa smanjenjem temperature dolazi do rastvaranja ovog gela. Za razliku od *aPMAA* izotaktična PMAA (*iPMAA*) formira konglomerat koji ne može da se rastvori ispod nekog kritičnog stepena neutralizacije, osim u slučaju kada su karboksilne grupe neutralizovane [119]. *iPMAA* ima stereo-strukturu u kojoj grupe na glavnom polimernom lancu imaju tačno određenu orijentaciju, koja može da se menja kako bi se kontrolisao proces asocijacije [119]. PMAA može da gradi vodonične veze zbog prisutnih $-COOH$ grupa koje lako mogu da jonizuju u vodenom rastvoru kao i da uspostavlja hidrofobne interakcije preko $-CH_3$ grupa, koje su takođe nalaze na glavnom polimernom lancu [120, 121].



Slika 12. Strukturna formula metakrilne kiseline

PMAA (Slika 13.) predstavlja slab polielektrolit kod koga se naelektrisanje na karboksilnim grupama menja sa promenom stepena neutralizacije [122]. Karboksilne grupe lako

jonizuju, pa su hidrogelovi na bazi *PMAA* osetljivi na spoljne stimulanse tj. pripadaju pH-osetljivim hidrogelovima, zbog čega mogu da se primene u mnogim oblastima: u sistemima za kontrolisano otpuštanje aktivnih supstanci [123], za zarastanje rana [124], kao pH-osetljivi aktuatori, u tkivnom inženjerstvu i kao skafoldi [125], u poljoprivredi [126], kao i u zaštiti životne sredine (kao absorbenti) [127] itd. Zahvaljujući mekoj strukturi, koja je rezultat čvrste faze - polimerne mreže i absorbovanog fluida (vode ili bioloških tečnosti), *PMAA* je veoma slična ljudskim tkivima i kompatibilna im je, a pored toga je i netoksična. Velika hidrofilnost *PMAA* hidrogelova rezultat je njihove pH-osetljivosti i jonizacije - *COOH* grupa. Ove grupe u zavisnosti od pH vrednosti spoljne sredine mogu da budu protonovane ili deprotonovane, što utiče na bubrenje ovog hidrogela. pH vrednosti koje su ispod pKa poli(metakrilne kiseline) (pKa(*PMAA*)=4,66) dovode do kontrahovanja *PMAA* mreže zato što se -*COOH* grupe nalaze u nejonizovanom stanju, dok više pH vrednosti ($5.5 < \text{pH}$) utiču na jonizaciju karboksilnih grupa, na kojima se generišu fiksna naelektrisanja, što dovodi do njihovog odbijanja i bubrenja *PMAA* hidrogela [128, 129]. Dakle, sistemi na bazi *PMAA* hidrogelova mogu da se koriste za kontrolisano i ciljano otpuštanje hidrofilnih aktivnih supstanci [130, 131], zbog bubrenja ovih hidrogelova pri višim pH vrednostima kao što su u intestinalnom traktu čoveka, usled čega bi došlo do oslobađanja aktivne supstance. Prema tome, hidrogelovi na bazi *PMAA* mogu da se koriste kao sistemi za ciljano otpuštanje aktivnih supstanci u crevima, pri neutralnim i baznim pH-vrednostima.



Slika 13. Poli(metakrilna kiselina)

Postoji nekoliko primera upotrebe hidrogelova na bazi *PMAA* kao sistema za kontrolisano otpuštanje aktivnih supstanci objavljenih u literaturi. Jedan od njih su *PMAA*-nanonosači za kontrolisano otpuštanje amoksicilina, koji su sintetisani sa ciljem smanjenja citotoksičnosti ovog leka i povećanja njegove aktivnosti [123]. Shi i sar. [132] su sintetisali *PMAA* nanosfere koje se koriste kao sistemi za transport i produženo oslobađanje gatifloksacina. Pan i sar. [133] su dobili biorazgradiv *PMAA* nanohidrogel koji je osetljiv na spoljne stimulanse: promene redoks potencijala i pH-vrednosti, u cilju ispitivanja njegovog dejstva u terapiji karcinoma. *PMAA* se takođe može koristiti i kao nosač genetskog materijala zbog prethodno pomenute pH osetljivosti i težnje ka jonizaciji u kiseloj ili alkalnoj sredini. Ove karakteristike *PMAA* su veoma korisne u "razvoju novih nevirálnih sistema za dopremanje i

kontrolisano otpuštanje genetskog materijala" [134] koji su sposobni da izbegnu endozome tj. odbrambeni sistem organizma [134]. Međutim, PMAA ima ograničenje kada se radi o njenoj primeni u sistemima za inkapsulaciju i kontrolisano otpuštanje slabo vodorastvornih aktivnih supstanci. Zbog svog izrazito hidrofilnog karaktera može da veže i transportuje samo hidrofilne aktivne supstance [135]. Kako bi se prevazišlo navedeno ograničenje potrebno je modifikovati PMAA hidrogel uvođenjem amfifilnih supstanci [135], kao što su proteini ili fosfolipidne čestice, što je i urađeno u okviru ove doktorske disertacije.

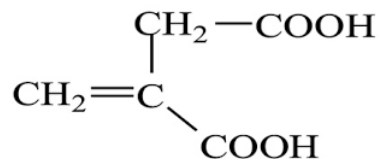
PMAA se može koristiti i kod tretmana oštećenja kože ljudi [136] ili u inženjerstvu tkiva [137]. Pобољшanje mehaničke čvrstoće PMAA mreže može se postići dodatkom hidroksiapatita (ili druge vrste biokeramike) kako bi se dobili kompoziti sa mnogo boljim mehaničkim karakteristikama, u cilju zamene nekih oštećenih tkiva (npr. reparacija kostiju u ljudskom organizmu). Na primer, A. T. Cucuruz i sar. [138] dobili su kompozite na bazi PMAA i hidroksiapatita koji imaju potencijalnu primenu u stomatologiji.

PMAA hidrogelovi takođe imaju primenu i kao adsorbent u procesu prečišćavanja vode. Joni teških metala mogu da se uklone zbog afiniteta ovog hidrogela ka metalnim jonima sa kojima gradi komplekse [127].

PMAA nanosfere mogu se potencijalno primeniti u lečenju karcinoma [139] i imaju niz dobrih osobina kao što su "biokompatibilnost, velika specifična površina, brzi odgovor na spoljne stimulanse, dobru disperzibilnost u vodi, kao i veliki broj prisutnih karboksilnih grupa, preko kojih se uspostavljaju interakcije sa polipeptidima, proteinima, bio-enzimima i sl" [140].

2.2.4.2. Itakonska kiselina

Hidrogelovi na bazi itakonske kiseline (IA) imaju niz dobrih osobina kao što su biokompatibilnost, niska toksičnost, velika hidrofilnost, dobro bubrenje i osetljivost na promenu pH-vrednosti, koje ih čine dobrim kandidatima za nosače i kontrolisano otpuštanje lekova [141]. Ova nezasićena organska kiselina nalazi se u obliku belog praha i rastvorna je u vodi, zbog čega lako gradi ko-polimere u vodenoj sredini [142]. Hidrofilnost IA i specifična svojstva bubrenja rezultat su prisustva dve karboksilne grupe (Slika 14.) sa dve različite pKa vrednosti: $pK_{a1} = 3,85$ i $pK_{a2} = 5,45$ [143], pa se dodatkom ovog monomera povećava stepen bubrenja, kao odgovor na promenu pH-vrednosti, kompleksa hidrogel/IA [14] i raste sa povećanjem dodate količine itakonske kiseline [144]. Kada se pH-vrednost vodene sredine poveća iznad pKa karboksilnih grupa, dolazi do njihove jonizacije i generisanja naelektrisanja. Povećanjem pH vrednosti spoljašnje sredine povećava se stepen jonizacije karboksilnih grupa, kao i gustina naelektrisanja. Zbog toga raste hidrofilnost mreže hidrogela, a istoimena naelektrisanja na karboksilnim grupama izazivaju odbojne elektrostatičke sile između polimernih lanaca, što dovodi do povećanja zapremine hidrogela i povećanja apsorpcije vode [145].



Slika 14. Strukturna formula itakonske kiseline

Itakonska kiselina je prvobitno dobijena destilacijom limunske kiseline, ali se sada uglavnom dobija industrijskim postupkom fermentacije (iz *Aspergillus terreus*) [146], ali i neki drugi mikroorganizmi (od kojih su neki genetski modifikovani) [147] takođe mogu da je proizvedu. Hidrolizovani skrob i melasa mogu takođe da budu izvori IA.

Itakonska kiselina ima veliku primenu u farmaciji i medicini (sistemi za kontrolisano otpuštanje lekova, kontaktna sočiva, stomatologija, lečenje rana), u industrijskoj sintezi plastike, veštačkog stakla i poliestara, u poljoprivredi [148-152].

Milašinović i sar. [153] su razvili NiPAAm/IA kompleks za potencijalnu primenu u sistemima za ciljano kontrolisano otpuštanje lekova u cilju zaštite proteina do trenutka njegove isporuke u intestinalni sistem (neutralna ili blago bazna sredina). Dodavanjem i povećanjem količine IA, ovi autori su „pomerili” donju kritičnu temperaturu rastvaranja NiPAAm/IA kompleksa do vrednosti fiziološke temperature, povećali stepen bubrenja i povećali stabilnost model leka [153].

Dobić i sar. [154] su dobili „pametni” hidrogel P(HEMA / IA / PEGDMA) čije je bubrenje osetljivo na promenu pH-vrednosti i temperature. Pokazali su da hidrogel nije citotoksičan i može da se koristi kao sistem za kontrolisano otpuštanje model leka - vitamina B3 u obliku nikotinamida i nikotinske kiseline.

Marcelo i sar. [155] su razvili polimer na bazi itakonske kiseline, etilen-glikola i dimetakrilata, kod koga oslobađanje leka zavisi od vrednosti pH sredine, a oslobođena količina model leka - metronidazola je veća pri pH=2,2 u odnosu na oslobođenu količinu model leka pri pH=7,4. Ovaj biokompatibilni hidrogel bi mogao da ima potencijalnu primenu u sistemima za kontrolisano oslobađanje lekova izazvano promenom pH vrednosti sredine.

2.2.5. Mehanizam bubrenja hidrogelova

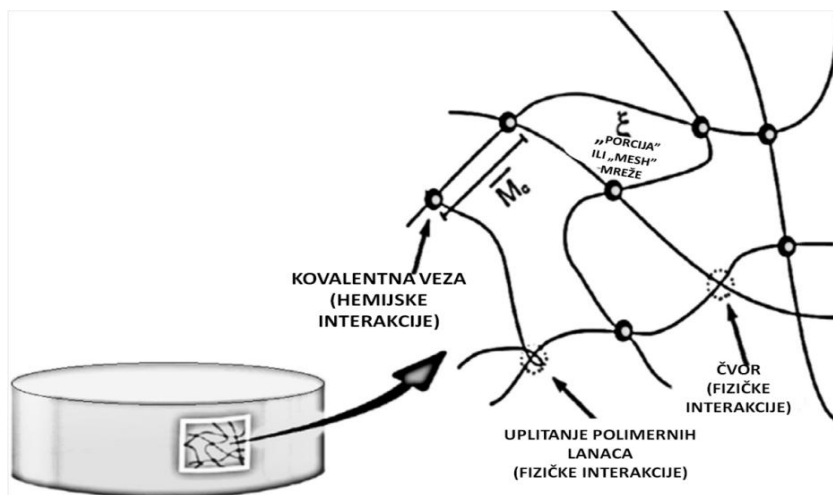
Hidrofilne grupe koje su prisutne na glavnom polimernom lancu hidrogela, imaju glavnu ulogu u apsorpciji vode i drugih bioloških fluida tj. u procesu bubrenja hidrogelova, u kome dolazi do povećanja njegove zapremine [156, 157]. Zahvaljujući činjenici da mogu da apsorbuju i zadrže veliku količinu vode, hidrogelovi imaju veoma dobra svojstva bubrenja i dobru permeabilnost, odakle potiče i njihova biorazgradivost i biokompatibilnost, kao i mogućnost lakog modifikovanja njihove viskozoelastičnosti. U hidrogelu postoje tri vrste apsorbovane vode: slobodna voda, „srednja” voda i vezana voda [158]. Proces bubrenja hidrogela je složen i sastoji se od nekoliko faza. U prvoj fazi bubrenja hidrogela dolazi do hidratacije hidrofilnih grupa molekulima vode, koji se nazivaju primarno vezana voda. Ova vrsta vode obuhvata sve molekule vode koji uspostavljaju vodonične veze ili neke druge jake interakcije sa grupama na polimernim lancima hidrogela [158]. Sledeća faza obuhvata uspostavljanje interakcija između nezaštićenih hidrofobnih grupa u strukturi hidrogela i molekula vode, koji predstavljaju sekundarno vezanu vodu. Ova vrsta vode uspostavlja slabe interakcije sa grupama na polimernim lancima hidrogela i ispunjava prostor između vezane i slobodne vode [158], koja se apsorbuje u poslednjoj fazi procesa bubrenja. U poslednjoj fazi, prema ovim autorima, dejstvu osmotskog pritiska u mreži hidrogela usmerenom ka beskonačnom razblaženju, suprotstavljaju se umreženi lanci polimerne mreže, što stvara pokretačku silu za dodatno bubrenje hidrogela sve dok se ne dostigne ravnotežno stanje. Ta količina dodatno apsorbovane vode predstavlja tzv. slobodnu vodu, koja ispunjava ostatak slobodnog prostora u mreži između polimernih lanaca hidrogela i u centrima većih pora, a interakcije koje uspostavlja sa grupama na polimernim lancima su zanemarljive [158].

Količina vode koju će hidrogel apsorbovati zavisi od interakcija koje molekuli vode uspostavljaju sa lancima hidrogela, kao i od temperature, što su zaključili i objasnili svojom teorijom Flori i Hugins [159]. Takođe, količina apsorbovane vode utiče na strukturu hidrogela kao i to kolika će količina svakog od tri prethodno navedena tipa vode biti prisutna u hidrogelu [160].

Čvrsti deo mreže nabubrelog hidrogela ili na eng. „mesh”, koji nosi apsorbovanu tečnost, prikazan je na Slici 16[5]. Ima ulogu u formiranju elastične sile koja se suprotstavlja ekspanziji i kontrakciji hidrogela i zadržava njegovu čvrstoću. Za proces bubrenja hidrogela u elektrolitičkom rastvaraču važno je prisustvo jonogenih grupa i mobilnih jona u strukturi hidrogela, kao i prisutnih kontra-jona i ko-jona koji potiču od elektrolitičkog rastvarača u kome se proces bubrenja odvija [5].

Zahvaljujući bubrenju hidrogelovi mogu da se koriste u mnogim oblastima kao što su sistemi za kontrolisano otpuštanje aktivnih supstanci, imobilizaciju enzima, kao absorbenti u prečišćavanju otpadnih voda ili drugih vrsta apsorpcija, kao senzori itd. U naučnoj literaturi se

može naći veliki broj primera različite vrste upotrebe hidrogelova. Zhang i sar. [161] su dobili sistem koji je osetljiv na promenu pH-vrednosti i temperature čime se znatno brže oslobađa model-lek kao odgovor na tu promenu, a proces dehidracije postaje brži povećanjem pH-vrednosti. Hidrogelovi se takođe mogu koristiti za adsorpciju nekih nepoželjnih supstanci u prečišćavanju otpadnih voda. Neki autori su pokazali da koeficijent difuzije ovih nepoželjnih supstanci raste sa povećanjem pH-vrednosti [162]. You i sar. [163] su dobili komplekse nanočestica hidrogela i zlata čije bubrenje je uslovljeno promenom pH-vrednosti, i nastaje kao rezultat smanjenja provodljivosti usled smanjenja pH-vrednosti. Autori su predložili da se ovi sistemi mogu koristiti za registrovanje fizioloških promena u ljudskom organizmu do kojih dolazi tokom bolesti.



Slika 15. Čvrsti deo mreže nabubrelog hidrogela ili engl. „mesh”[5]

Kinetika bubrenja i stepen bubrenja hidrogela zavise od različitih faktora kao što su gustina umreženja, pKa-vrednost i naelektrisanje prisutnih jonogenih grupa, ravnoteža hidrofilitnost-hidrofobnost hidrogela, pH vrednost, interakcija hidrogela sa kontra-jonima u spoljašnjoj sredini, koncentracija rastvora u kome se bubrenje odvija itd. [164, 165]. Pametni hidrogelovi kao odgovor na različite vrste promena koje se dešavaju u spoljnoj sredini (pH vrednost, jonska jačina, temperatura, električno polje itd.) mogu da bubre (povećanje zapremine) ili se kontrahuju (smanjenje zapremine) [166, 167]. Stepen bubrenja (SD) se može izračunati prema jednačini (3) [168]:

$$SD = \frac{(m_t - m_0)}{m_0} \quad (3)$$

gde je m_t masa nabubrelog hidrogela u svakom vremenskom trenutku t , na datoj temperaturi, a m_0 je masa kserogela.

Ravnotežni stepen bubrenja (SD_{eq}) je stepen bubrenja hidrogela u ravnotežnom stanju, a izračunava se prema jednačini (4) [169]:

$$SD_{eq} = \frac{(m_{eq}-m_0)}{m_0} \quad (4)$$

Dva glavna faktora koji utiču na bubrenje hidrogela, a samim tim i na otpuštanje aktivnih supstanci, su količina umreživača u strukturi hidrogela i hemijska struktura hidrogela. Hidrogelovi sa većom količinom umreživača imaju krutu strukturu i manji stepen bubrenja od odgovarajućih hidrogelova sa manjom količinom umreživača [14]. Kada je reč o hemijskoj strukturi hidrogela, prisustvo velikog broja hidrofilnih grupa na lancima hidrogela koje mogu da intereaguju sa molekulima vode dovodi do povećanja stepena bubrenja, dok hidrofobne grupe usled težnje da se što više udalje od molekula vode, dovode do kompresije zapremine hidrogela i smanjenja stepena bubrenja [14].

„Inteligentni” hidrogelovi reagovali na promene spoljašnje sredine bubrenjem ili će doći do komprimovanja njihove zapremine, što se može iskoristiti u sistemima za kontrolisano otpuštanje lekova. Jedan od njih je PMAA hidrogel, koji bubri kao rezultat promene pH, ukoliko ima neutralizovane karboksilne grupe. Veće pH-vrednosti koje su iznad pKa vrednosti karboksilnih grupa ovog hidrogela (pKa = 4,66), dovešće do jonizacije karboksilnih grupa i njihovog međusobnog odbijanja, a samim tim i povećanja stepena bubrenja, dok pri pH-vrednostima koje su ispod pKa, PMAA hidrogelovi neće bubreti [170].

Bubrenje hidrogelova može da bude difuziono kontrolisano (Fick-ovsko bubrenje) ili kontrolisano relaksacijom polimernih lanaca hidrogela (ne-Fick-ovsko bubrenje) u zavisnosti od toga koji se proces brže odvija. U slučaju Fick-ovskog bubrenja difuzija vode je brža, a u drugom slučaju voda difunduje u hidrogel sporije nego što dolazi do relaksacije lanaca hidrogela. Popularne matematičke modele koji se koriste za analizu kinetike procesa bubrenja hidrogela, predložili su Peppas i Colombo [171].

Flori [172] je bio prvi koji je razvio matematički model za analizu bubrenja hidrogelova. Od tada su razvijeni ili poboljšani mnogi modeli i teorije vezani za ovaj proces, koji uključuju veći broj faktora koji mogu da utiču na proces bubrenja.

Feil i sar. [173] su ispitivali uticaj vrste naelektrisanja lanaca hidrogela na proces bubrenja i došli do zaključka da sa povećanjem naelektrisanja dolazi do povećanja hidrofilnosti hidrogela i stepena bubrenja. Jonska jačina takođe je bila predmet istraživanja, i pokazalo se da niže vrednosti jonske jačine dovode do povećanja stepena bubrenja hidrogela i obratno [174]. Takođe, neki modeli [175] uključuju uticaj elektrostatičkih interakcija, koje se javljaju zbog disocijacije mreže hidrogela, pa koncentracija i pH-vrednost spoljašnje sredine mogu da utiču na bubrenje hidrogela. Drugi modeli se zasnivaju na pretpostavci da tokom procesa bubrenja dolazi do fazne transformacije hidrogela iz staklastog u gumoliko stanje, što je posledica deformacije

mreže hidrogela, koja nastaje kao rezultat interakcije molekula rastvarača i molekula polimerne mreže [176].

D. Zhi i sar. [177] su razvili model za proučavanje bubrenja hidrogelova osjetljivih na promenu pH-vrednosti i temperature, uzimajući u obzir istovremeno fazni prelaz hidrogela do koga dolazi tokom procesa bubrenja, kao uticaj mnogih faktora na ovaj proces, kao što su koncentracija i gustina naelektrisanja hidrogela i njegova interakcija sa spoljašnjom sredinom, količina upotrebljenog umreživača, razne vrste elektrostatičkih interakcija itd.

2.2.6. Kinetika oslobađanja aktivne supstance iz nosača na bazi hidrogelova

Dizajniranje odgovarajućeg nosača za kontrolisano oslobađanje aktivne supstance bazira se na poznavanju tačne koncentracije aktivne supstance koja se oslobodi na željenom mestu u ljudskom organizmu. Takođe je važno da je oslobođena količina aktivne supstance iz nosača kao što je hidrogel konstantna, čime se postižu stacionarni uslovi. Na taj način može lakše da se predvidi kako će ljudski organizam da reaguje na određenu aktivnu supstancu i da se smanje neželjeni efekti. Međutim, ovo nije jednostavno postići zato što postoji veliki broj faktora koji utiču na oslobađanje aktivne supstance iz nosača na bazi hidrogela kao što su razni procesi u ljudskom organizmu (npr. enzimska degradacija, transport leka u ćelije, mogućnost interakcije sa raznim jedinjenjima na putu do željenog mesta [6]), kao i već pomenute karakteristike samog nosača na bazi hidrogela i osobine aktivne supstance (npr. vrsta aktivne supstance i njena koncentracija u nosaču [6], da li je hidrofobna ili hidrofilna, njene interakcije sa nosačem [178], njena rastvorljivost u spoljašnjoj sredini [179], koeficijent difuzije aktivne supstance [179]).

U cilju razvoja željenog sistema za kontrolisano oslobađanje aktivne supstance razvijene su mnoge teorije i matematički modeli za opisivanje oslobađanja aktivne supstance iz hidrogelova, koji uzimaju u obzir i uslove koji utiču na to oslobađanje. Oni mogu da predvide koja geometrija, oblik, kao i sastav i tip procesa pripreme su najbolji za određeni nosač za kontrolisano otpuštanje aktivne supstance. Ovo predviđanje se zasniva na informacijama kao što su potrebna terapijska doza aktivne supstance i način njene administracije, kao i dobijene krive kontrolisanog i ciljanog oslobađanja aktivne supstance. Veoma je važno da su ovi modeli jednostavnog oblika, a da istovremeno daju precizna predviđanja načina oslobađanja aktivne supstance u ljudskom organizmu, kako bi sa manje vremena i troškova [180] mogao da se dizajnira odgovarajući nosač aktivne supstance na bazi hidrogela sa svojstvima potrebnim za određenu terapiju.

Od 1961. godine, kada je Higuchi prvi put objavio svoju jednačinu koja opisuje oslobađanje aktivne supstance iz nosača na bazi polimera [181], razvijen je veliki broj

matematičkih modela za ispitivanje kinetike kontrolisanog otpuštanja aktivne farmaceutske supstance (active pharmaceutical ingredient-API) iz nosača na bazi hidrogela. Jedna grupa ovih modela je empirijska/polu-empirijska i ona se koristi za uporednu analizu različitih profila oslobađanja API-a čime se upoređuju vrednosti izabranog parametra za svaki od ovih profila [6]. Sa druge strane, postoje mehanistički matematički modeli koji uključuju uticaj fizičko-hemijskih i bioloških procesa na kinetiku kontrolisanog otpuštanja aktivne supstance kao što su bubrenje, difuzija, degradacija itd [180].

Pored pomenutog Higuchi-jevog modela [182-184], modeli koji se često koriste za ispitivanje kinetike kontrolisanog otpuštanja *in vitro* iz hidrogelova su jednačine kinetike nultog reda reakcije [154, 184-186] i prvog reda [154, 183, 184, 187], Ritger-Peppas [184, 185, 188-190] i Weibull-ov model [154, 191]. Kinetika nultog reda bi bila idealni slučaj oslobađanja aktivne supstance iz nosača na bazi hidrogelova, zato što je koncentracija oslobođene aktivne supstance tokom vremena konstantna, pa je i proces njenog oslobađanja konstantan i nezavisan od njene koncentracije (Jednačina (5)) [2]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt \quad (5)$$

gde su M_t i M_∞ količine aktivne supstance koje se oslobode u vremenskom trenutku t i u ravnoteži, respektivno, k je konstanta brzine oslobađanja, a t je vreme procesa otpuštanja leka.

Profili otpuštanja velikog broja lekova prate kinetiku prvog reda, gde promena koncentracije u toku vremena zavisi od koncentracije aktivne supstance [2], i predstavljena je sledećom jednačinom (Jednačina (6)):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = -\ln(1 - kt) \quad (6)$$

gde članovi jednačine imaju prethodno definisano značenje.

Međutim, veliki broj nosača u čvrstom stanju koji se koriste za otpuštanje lekova, oslobađaju aktivnu supstancu brzinom koja je proporcionalna kvadratnom korenu vremena, što je prvi opisao Higuchi (Jednačina (7) [181]):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k\sqrt{t} \quad (7)$$

Poznata i dosta korišćena u naučnoj literaturi za ispitivanje otpuštanja aktivne supstance iz nosača na bazi hidrogelova je polu-empirijska jednačina - Ritger-Peppas jednačina ili Stepenni zakon (Jednačina (8) [13]):

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

gde je k kinetička konstanta karakteristična za određeni nosač na bazi hidrogela i aktivne supstance koju nosi, a uključuje geometrijske karakteristike i moguće promene u strukturi nosača i ukazuje na to da li je otpuštanje aktivne supstance brže (veće k -vrednosti) ili sporije (manje k -vrednosti) [2, 192], n je difuzioni eksponent koji pokazuje vrstu mehanizma transporta aktivne supstance kroz mrežu hidrogela [192], a njegove vrednosti i odgovarajući mehanizmi prikazani su u Tabeli 3. [2]. Ovaj matematički model može da se primeni za prvih 60% oslobođene količine aktivne supstance i pogodan je za ispitivanje transporta aktivne supstance u slučajevima kada je mehanizam oslobađanja aktivne supstance iz hidrogela nepoznat ili je istovremeno prisutno nekoliko pojava koje utiču na njegovo oslobađanje iz datog nosača [192, 193].

Tabela 3. Mehanizmi oslobađanja aktivne supstance iz nosača na bazi hidrogela planarne geometrije (tankog filma) i odgovarajuće vrednosti eksponenta n [2]

Mehanizam oslobađanja aktivne supstance iz hidrogela	Vrednost difuzionog eksponenta n
Fick-ova ili molekulska difuzija	0.50
Anomalni transport	$0.50 < n < 1.0$
Tip II transporta	1.0*
Super tip II transporta	$n > 1$

*kinetika nultog reda

Iz Tabele 3. može da se vidi da kada je $n \leq 0.5$ u Ritger-Peppas-ovom modelu, difuzija spoljašnje sredine u nosač kontroliše brzinu otpuštanja aktivne supstance zato što je to sporiji proces u odnosu na proces relaksacije polimernih lanaca hidrogela, pa se radi o Fick-ovoj ili molekulskoj difuziji. Tada se absorbuje veća količina spoljašnjeg medijuma, što dovodi do povećanja dela zapremine nosača na bazi hidrogela i njegove poroznosti što utiče na difuziju aktivne supstance iz tog dela nosača, a količina spoljašnjeg medijuma od nabubrelog dela nosača do njegovog centra eksponencijalno opada. Otpuštanje aktivne supstance koja se oslobađa Fick-ovom difuzijom zavisi od vremena.

Vrednosti eksponenta n su veće ili jednake 1 kod tipa II transporta, a brzina oslobađanja aktivne supstance je kontrolisana relaksacijom lanaca nosača na bazi hidrogela i nezavisna je od vremena, što znači da profili otpuštanja aktivne supstance prate kinetiku nultog reda. Difuzija spoljašnjeg medijuma u ovom slučaju je mnogo brža od relaksacije "staklastog" [2] dela mreže hidrogela u kojoj se nalazi veoma mala količina spoljašnjeg medijuma [2]. Super tip II transporta je podtip slučaja II i javlja se u sistemima na bazi hidrogela kada se velikom brzinom apsorbuje veća količina spoljašnjeg medijuma, što dovodi do kolapsa mreže hidrogela.

Između dva prethodno pomenuta granična slučaja je tzv. anomalni transport ($0,5 < n < 1$) u kojem je brzina otpuštanja aktivne supstance iz nosača na bazi hidrogela kontrolisana i difuzijom spoljašnjeg medijuma i relaksacijom polimernih lanaca nosača na bazi hidrogela, tj. ove dve pojave imaju istu brzinu, a oslobađanje aktivne supstance zavisi od vremena.

U naučnoj literaturi [184, 194-198] se takođe primenjuje i Jednačina (9), koju su predložili Peppas i Sahlin [199], za slučaj anomalnog transporta aktivne supstance iz hidrogelova i uključuje istovremno uticaj i molekulske difuzije (prvi deo jednačine) na oslobađanje leka i doprinos relaksacije polimernih lanaca hidrogela (drugi deo jednačine) procesu oslobađanja aktivne supstance:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^{2m} \quad (9)$$

Kopcha model predstavlja specijalni slučaj Peppas-Sahlin modela kada se eksponent m fiksira na vrednost 0,5 (Jednačina (10) [200]).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_D t^{0.5} + k_R t^1 \quad (10)$$

Weibull-ov model (Jednačina (11)) je empirijski model i pogodan je samo za grafičko poređenje profila otpuštanja aktivne supstance iz nosača na bazi hidrogelova [7, 201].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp\left(-\frac{(t-T_i)^b}{a}\right) \quad (11)$$

Parametar b se odnosi na vrstu krive otpuštanja leka, a predstavlja vreme trajanja procesa i T_i je latentno vreme procesa otpuštanja leka [7].

Poslednjih deset godina, istraživači su poboljšali postojeće ili razvili nove matematičke modele koji se mogu koristiti za dizajniranje nosača lekova na bazi hidrogelova sa željenim karakteristikama.

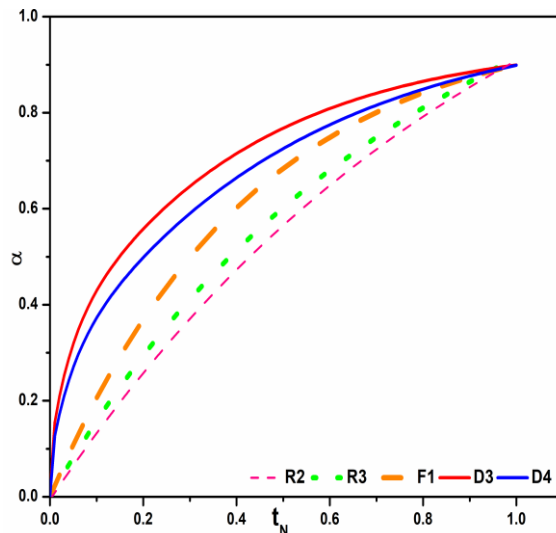
Postoji nekoliko modela kojima se dobijaju podaci korisni za dizajniranje odgovarajućeg nosača aktivnih supstanci na bazi hidrogela, tj. za dobijanje jednostavnijeg načina njihove sinteze, kao što su modeli koje je predložio Rothstein i sar. 2011.-te [202], Peppas i sar. 2014.-te [193] i Lamberti 2015. [203]. R. D. Manga i sar. [204] su 2017.-te godine razvili tri modela, koji zajedno čine dobar matematički aparat za predviđanje kinetike otpuštanja aktivne supstance *in vitro* i *in vivo* iz nosača na bazi hidrogela osetljivih na promenu pH-vrednosti. Ovi autori kombinuju tri jednačine kako bi uključili uticaje jonskih grupa na difuziju aktivne supstance, kao i deformacija do kojih dolazi u strukturi hidrogela izazvanih osmotskim pritiskom na

kontrolisano otpuštanje aktivne supstance iz nosača na bazi hidrogela, čime bi moglo istovremeno da se analizira i bubrenje hidrogela i otpuštanje aktivne supstance iz ovog nosača.

Adnađević i sar. [205] navode najčešće korišćene matematičke modele za procese kod sistema u čvrstom stanju, koji bi mogli da se koriste za istraživanje kinetike otpuštanja aktivnih supstanci iz nosača na bazi hidrogelova (Tabela 4. [205]), a na osnovu mehanizma reakcije ovi autori ih dele u nekoliko grupa: red reakcije (F1), difuziono-kontrolisane reakcije (D3, D4) i fazno-kontrolisane reakcije (R2, R3). Kod ove metode prvo se konstruišu zavisnosti (M_t/M_∞) - t od eksperimentalnih podataka dobijenih praćenjem otpuštanja aktivne supstance, koje se zatim prevode u (M_t/M_∞) - t_N zavisnosti. t_N predstavlja normalizovano vreme koje se dobija kada se vreme otpuštanja aktivne supstance podeli vremenom u kome je oslobođeno 90% te aktivne supstance ($t_N = \frac{t}{t_{0,9}}$) [205]. Tako dobijene zavisnosti grafički se porede sa krivama modela (Slika 17. [206]) čiji su integralni oblici predstavljeni u Tabeli 4. Bira se model kod koga je poređenjem dobijeno najbolje slaganje (najveća vrednost koeficijenta linearne korelacije - R^2). Izabrani model primenjen na eksperimentalne podatke dobijene praćenjem otpuštanja aktivne supstance daće linearnu zavisnost, iz čijeg nagiba može da se odredi vrednost kinetičke konstante (k_{F1} , k_{D3} , k_{D4} , k_{R2} ili k_{R3}).

Tabela 4. Najčešće korišćeni modeli za analizu kinetike otpuštanja leka iz sistema u čvrstom stanju [205]

Oznaka modela	Mehanizam procesa otpuštanja aktivne supstance	Integralni oblik modela, $g(M_t/M_\infty)$
F1	Prvi red reakcije (Mampelova jednačina)	$-\ln(1 - (Mt/M_\infty)) = k_{F1} * t$
D3	Trodimenziona difuzija (Janderova jednačina)	$[1 - (1 - (Mt/M_\infty))^{1/3}]^2 = k_{D3} * t$
D4	Trodimenziona difuzija (Ginstling-Brounshtein)	$(1 - 2(Mt/M_\infty)/3) - (1 - (Mt/M_\infty))^{2/3} = k_{D4} * t$
R2	Fazno-kontrolisane reakcije (površinska kontrakcija)	$1 - (1 - (Mt/M_\infty))^{1/2} = k_{R2} * t$
R3	Fazno-kontrolisane reakcije (zapreminska kontrakcija)	$1 - (1 - (Mt/M_\infty))^{1/3} = k_{R3} * t$



Slika 16. Krive matematičkih modela korišćenih u model fitting metodi [206]

U cilju dobijanja potpunije slike o procesu otpuštanja aktivne supstance kao posledice bubrenja nosača na bazi hidrogela, važno je odrediti i brzinu difuzije spoljašnjeg medijuma (u kome se otpuštanje aktivne supstance odvija) u nosač na bazi hidrogela. Koeficijent difuzije medijuma u nosač na bazi hidrogela može da se odredi prema jednačini (12) [207]:

$$D_M = \pi h^2 \left(\frac{k_M}{4SD_{eq}} \right)^2 \quad (12)$$

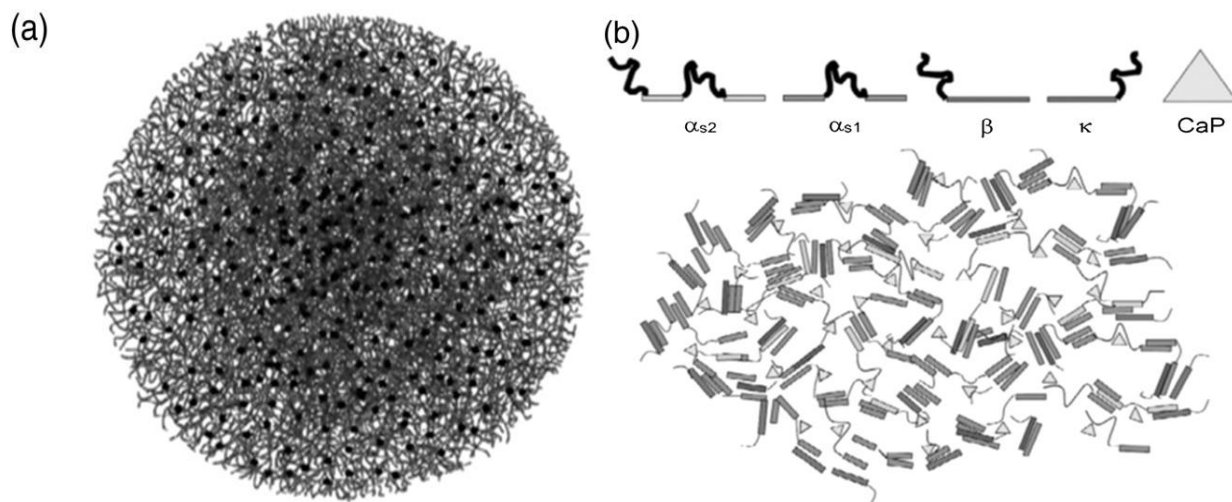
gde je h visina diskova kserogela, k_M je vrednost nagiba krive bubrenja u određenom medijumu, a SD_{eq} predstavlja vrednost ravnotežnog stepena bubrenja, koji se određuje prema jednačini (12).

2.3. Kazein

pH-osetljivi prirodni polimeri kao što su proteini, su netoksični, tako da su oni bezbedniji za upotrebu u sistemima za kontrolisano otpuštanje aktivnih supstanci u odnosu na pH-osetljive sintetske polimere. Takođe, imaju dobre fizičko-hemijske i strukturne osobine neophodne za zaštitu osetljivih aktivnih supstanci koje treba da transportuju. Zbog toga je pored navedenih pH-osetljivih prirodnih polimera (PMAA i IA) u ovoj tezi korišćen i jedan pH-osetljiv prirodni polimer – protein kazein.

Kazein čini osamdeset procenata u odnosu na sve proteine prisutne u mleku [208], a zahvaljujući svom prirodnom poreklu je biorazgradiv, netoksičan i biokompatibilan [209]. Ovaj stabilni protein čija je upotrebna bezbednost kod ljudi odobrena od strane Američke agencije za hranu i lekove (The Food and Drug Administration - FDA), nije skup i dostupan je.

94% kazeina čini proteinska struktura sastavljena od četiri podtipa kazeina: α S1-, α S2-, β -kazein (sva tri sadrže centre fosforilacije) i κ -kazein (glikoprotein) koji su amfilni sa prosečnom izoelektričnom tačkom (pI) oko 4,6 [210]. Ostatak strukture kazeina čine jedinjenja male molekulske mase koja se nazivaju koloidni kalcijum-fosfat [211].



Slika 17. (a) Micela kazeina i (b) sastav micela kazeina [212]

U vodenoj sredini dolazi do samoorganizovanja kazeina u micela (sferne čestice, prosečnog prečnika od oko 150 nm) (Slika 15. [212]). Ove micela nastaju usled uspostavljanja hidrofobnih interakcija i kalcijum-fosfatnih mostova između četiri prethodno pomenuta podtipa kazeina. Hidrofilnost ovih koloidnih čestica potiče od κ -kazeina koji se nalazi na površini micela i ima ulogu u njihovoj stabilizaciji usled međučestičnog odbijanja, dok hidrofobnost čestica potiče od β -kazeina, koja može da se koristi kada je potrebna inkapsulacija i transport hidrofobnih supstanci (hidrofobni lekovi, peptidi, proteini). Interakcije koje se uspostavljaju između hidrofobnih lekova i kazeina mogu biti hidrofobne interakcije, vodonične veze i van der Waalove sile [213]. Iako je kazein protein, on je temperaturno stabilan. Osetljiv je na promenu pH-vrednosti i koncentracije jona u spoljašnjoj sredini zbog otvorene strukture koja ima dosta prolina. U strukturi prolina može doći do raskidanja veza usled dejstva proteolitičkih enzima, kao i raskidanja kalcijum-fosfatnih mostova usled dejstva kiseline, što se može koristiti za kontrolisano i ciljano otpuštanje lekova u želucu čoveka [214].

Kazein može da bude u obliku kiseline, kada je slabo rastvoran u vodi, i u obliku natrijum-kazeinata (korišćen u ovoj tezi), koji ima veliku rastvorljivost osim u blizini svoje izoelektrične tačke [210]. U kiseloj sredini ili usled dodatka rastvarača dolazi do kolapsa strukture κ -kazeina na površini kazeinskih micela i stvaranja njihovih agregata, što dovodi do flokulacije i obrazovanja gela, ako je zapreminski udeo čestica dovoljno veliki [211]. Za rastvaranje kazeina je stoga neophodno da se doda baza i poveća temperatura na oko 60-80°C. Sposobnost kazeina da gelira, može da se koristi za inkapsulaciju i stabilizaciju osetljivih bioaktivnih supstanci, na primer, β -karotena [215].

Mnoge karakteristike kazeina čine ga pogodnim za upotrebu u sistemima za kontrolisano otpuštanje aktivnih supstanci (čak i onih osetljivih koje može da zaštiti i poboljša njihovu bioiskoristivost [213]). Pored prethodno pomenute mogućnosti zaštite osetljivih supstanci zahvaljujući svom gelirajućem svojstvu, bubrenje kazeina koje je uslovljeno promenom pH-vrednosti, pruža mogućnost za ciljano otpuštanje lekova na određenom mestu u ljudskom organizmu. J. Huang i sar. [216] su ispitivali sistem za kontrolisano otpuštanje lekova, koji sadrži nanočestice oksida gvožđa obložene kazeinom, koje su stabilne u kiseloj sredini i mogu da oslobađaju lekove u uslovima koje simuliraju sredinu u crevima čoveka. Ovi autori su pokazali da ovaj sistem može da se koristi u kontrolisanom oslobađanju lekova koji su slabo rastvorni u vodi ili osetljivi na pH-vrednost želudačne sredine.

Kazein ima vrlo dobre površinske karakteristike (stabilizuje emulzije) i može da vezuje jone i druge atome kao što su kalcijum, gvožđe, bakar, aluminijum [217]. Ove osobine su takođe od velikog značaja kada je u pitanju dizajniranje sistema za kontrolisano otpuštanje lekova.

Sposobnost ovog prirodnog proteina da gradi komplekse i konjugate sa makromolekulima ima veliku primenu u dobijanju sistema za otpuštanje lekova sa željenim karakteristikama. Ovi sistemi na bazi kazeina su do sada razvijeni u formi hidrogelova [218-220], mikročestica [221], nanočestica [222] i filmova [212].

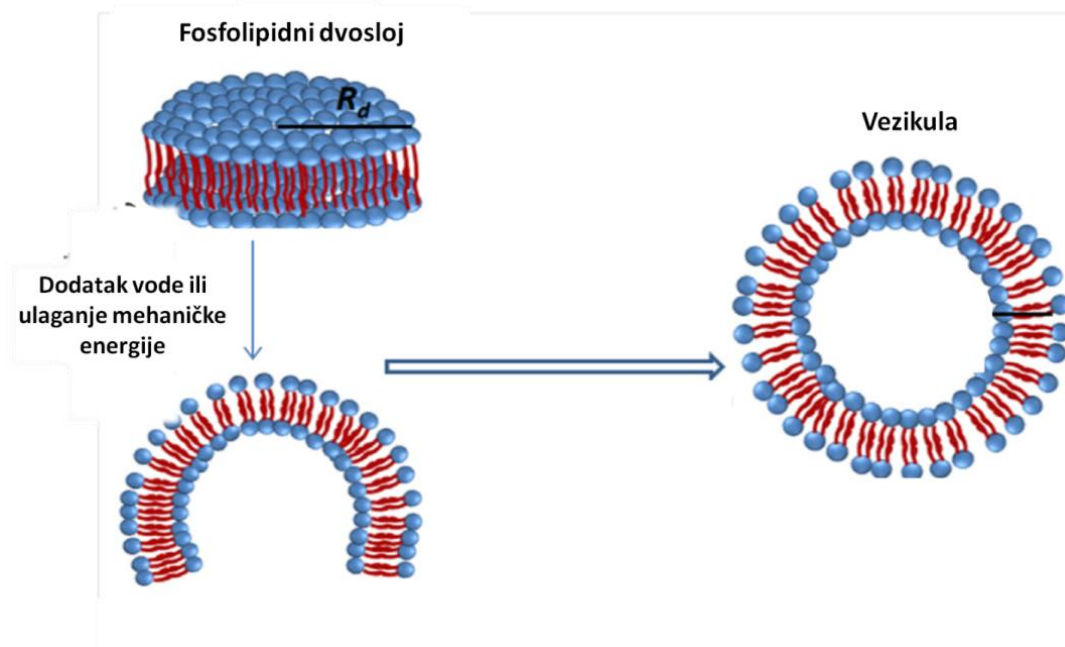
Z. Zhang i sar. [223] su razvili hidrogel, koji se sastoji od kazeina i alginata sa inkapsuliranim lipidima. Oni su ispitivali da li ovaj sistem može da se koristi za transport i inkapsulaciju lipofilne supstance, čije su oslobađanje pratili u simuliranim uslovima oralne sredine. Ovi autori su imali ideju, da kako je kazein jak antioksidans (može da stabilizuje lipide), mogu da koriste dobijeni sistem za skladištenje lipida, ali sistem je bio stabilan samo pri pH=4 do pH=5. To je bilo ograničenje za koje su autori predložili, da se može prevazići korišćenjem različite količine umreživača ili biopolimera u sistemu.

Pored svih prethodno pomenutih dobrih karakteristika kazeina, kao sistema za kontrolisano otpuštanje lekova, postoje i ograničenja kao što su vrlo retka, ali moguća pojava alergijske reakcije [212]. Takođe, micela kazeina su nestabilne pri promeni pH vrednosti i može

doći do njihove agregacije. Micele kazeina su u ovoj doktorskoj disertaciji zarobljene unutar mreže PMAA i na taj način stabilizovane, čime je sprečena njihova agregacija. Postoje i problemi vezani za inkapsulaciju hidrofobnih supstanci, zato što se hidrofobni deo micela kazeina nalazi u njenoj unutrašnjosti. Kako bi hidrofobni deo micela kazeina postao više izložen i tako ostvario interakcije sa lekom, micela bi trebalo da se „otvori” i „razmota”, što je u ovoj doktorskoj disertaciji postignuto kombinacijom sa potpuno neutralizovanom PMAA.

2.4. Lipozomi

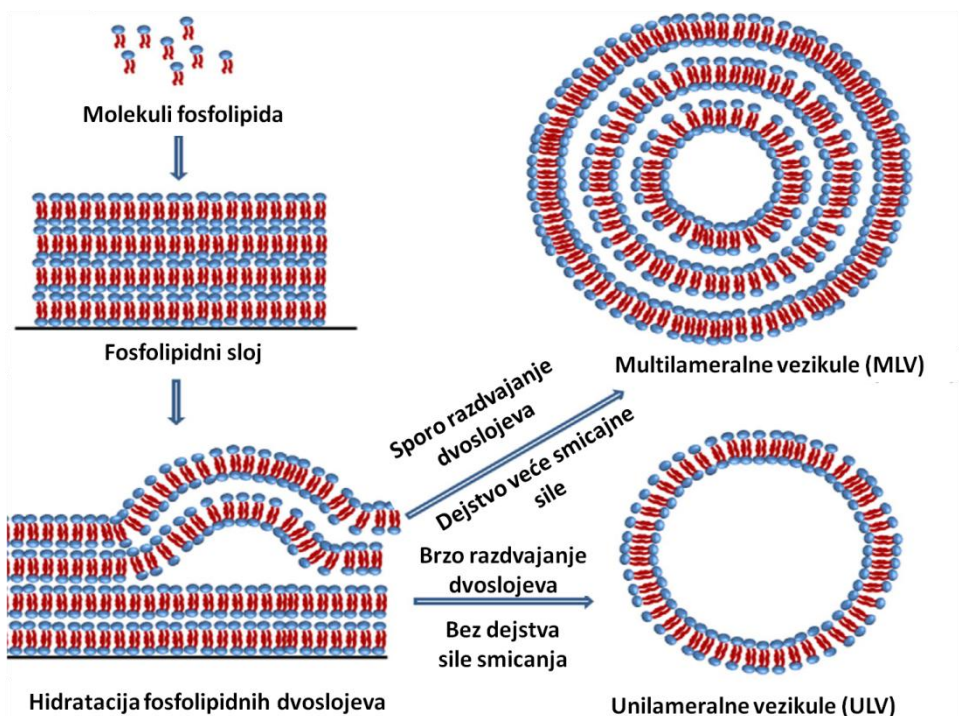
Lipozomi su sferne fosfolipidne čestice prečnika od 0,5 do 2-3 μm . U sistemima za kontrolisano otpuštanje lekova, koji se baziraju na lipozomima poželjna veličina ovih čestica bi trebalo da je između 50 i 200 nm [224]. Oni poseduju mnoge osobine koje ih čine pogodnim sistemima za kontrolisano otpuštanje aktivnih supstanci kao što su sličnost njihove strukture sa ćelijskim membranama, njihova biokompatibilnost i netoksičnost, biorazgradivost, imunogenost (tj. mogućnost da se izbegne odgovor imunog sistema) [225] i sposobnost da nose i hidrofilne [226], kao i hidrofobne (i u membrani [225], kao i u jezgru [227]) aktivne supstance.



Slika 18. Samoorganizovanje fosfolipida u lipozom u vodenom rastvoru [224]

Dodatkom fosfolipida vodi ili vodenom rastvoru, formiraće se fosfolipidni dvosloj. U ovom dvosloju u prisustvu polarnih rastvarača (kao što je voda) fosfolipidi su organizovani tako što se polarni deo molekula orijentiše prema rastvaraču štiteći nepolarni deo molekula. Dodavanjem dovoljne količine vode i ulaganjem dodatne mehaničke energije (kao što je mešanje ili pritisak) dolazi do zatvaranja fosfolipidnog dvosloja u sfernu česticu – lipozom. Obrazovani dvosloj čini membranu lipozoma i okružuje vodeno jezgro u središnjem delu lipozoma (Slika 18. [224]). Nastale male ili veće vezikule [224] mogu da imaju jedan sloj (unilameralni-UV) ili više slojeva (multilameralni-MLV) (Slika 19.[224]). Različiti tipovi fosfolipida mogu da ulaze u sastav lipozoma, a mogu da se podele na: fosfogliceride i sfingolipide.

Fosfolipidne zatvorene sisteme prvi put je opisao Bangham 1965. [228], a reč „lipozomi“ prvi put se pominje 1971. godine [229]. Od tada interesovanje za lipozome i njihovu primenu u sistemima za kontrolisano otpuštanje lekova ne prestaje [230-232].



Slika 19. Samoorganizovanje fosfolipida u unilameralne i multilameralne lipozome [224]

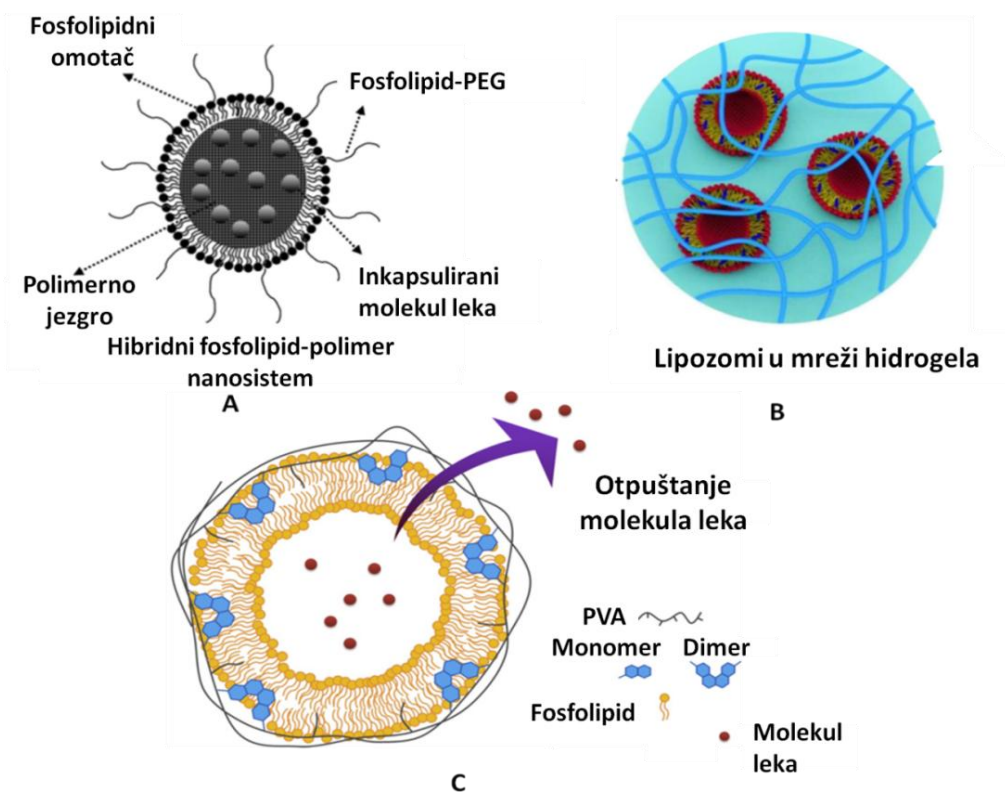
Postoji nekoliko metoda za dobijanje lipozoma i mogu da se podele u dve grupe: konvencionalne (jednostavne su za primenu i ne zahtevaju upotrebu složenih uređaja) i nove metode (pogodne su za scale-up i scale-down) [224]. Sve ove metode imaju zajednički osnovni put pripreme: pripremanje fosfolipida za hidrataciju, hidratacija i mešanje u cilju dobijanja manje

veličine čestica. Prvi korak pripreme lipozoma je rastvaranje fosfolipida u organskom rastvaraču (obično hloroformu) kako bi se dobila homogena smeša lipida. Zatim se rastvarač ukloni u rotacionom vakuum uparivaču kako bi se na zidu uparivača dobio tanki film fosfolipida, koji se zatim osuši u cilju uklanjanja ostatka rastvarača. Drugi korak je hidratacija suvog filma vodenim rastvorom koji se intenzivno meša, kako bi se dobile uniformne fosfolipidne čestice. Važno je da se temperatura rastvarača i suspenzije održava iznad temperature fazne transformacije tokom mešanja. Kao rezultat ovog koraka dobijeni su MLV lipozomi. Poslednji korak pripreme lipozoma je smanjenje veličine MLV lipozoma ekstruzijom, sonikacijom ili homogenizacijom pod visokim pritiskom [224] nakon čega se dobijaju ULV lipozomi sa malim ili srednjim prečnikom. U ovoj tezi su pripremljeni lipozomi tzv. pro-lipozomnom metodom koja se sastoji u rastvaranju model leka - kofeina u destilovanoj vodi, a zatim se doda gotova fosfolipidna smeša i intenzivno meša u cilju formiranja fosfolipidnih dvoslojeva koji će zatvaranjem inkapsulirati vodeni rastvor model leka [233].

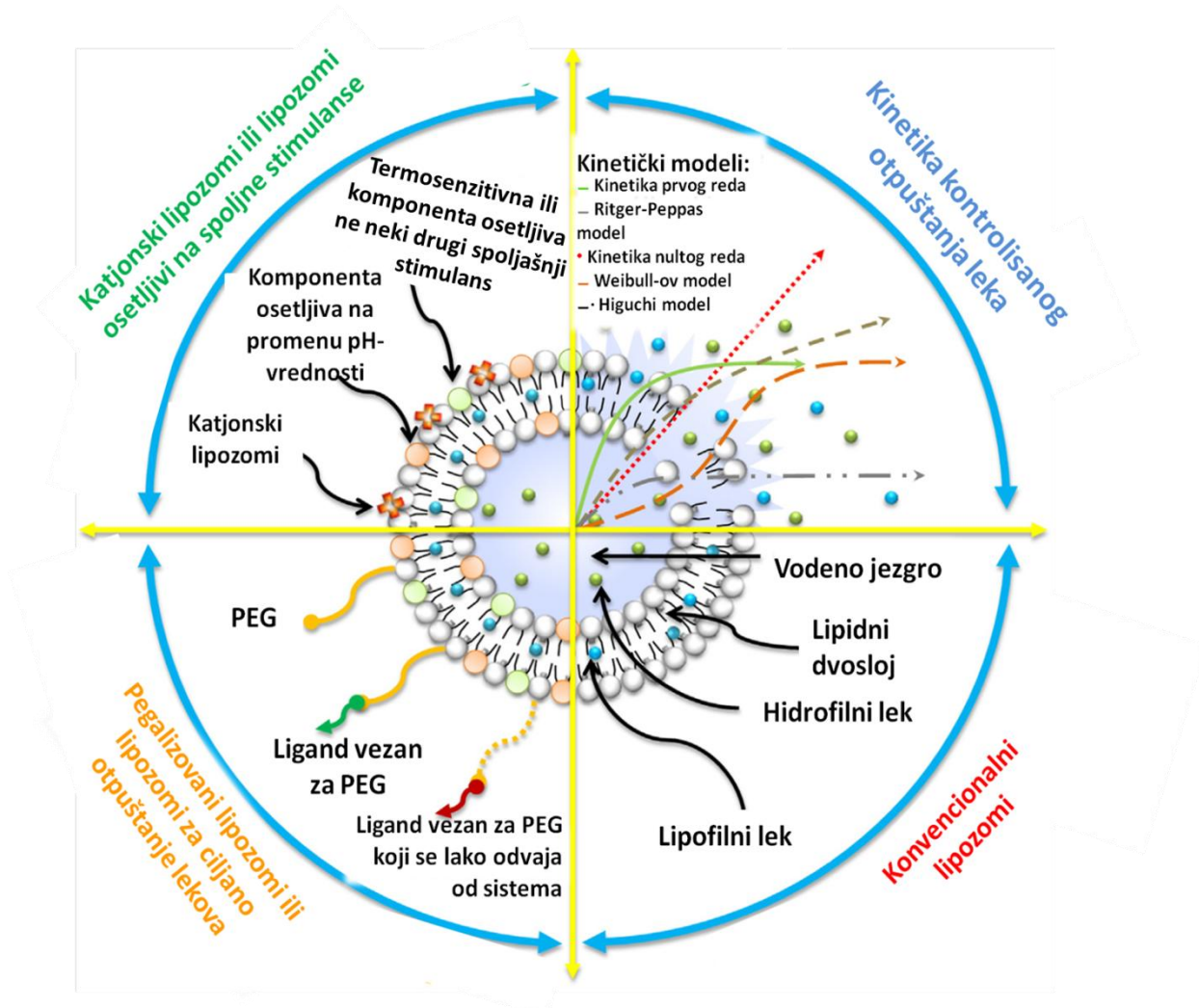
Postoje različiti tipovi lipozoma kao što su: lipozomi osetljivi na spoljašnje faktore [234], dugocirkulišući lipozomi [235], katjonski lipozomi [236] i lipozomi za ciljano otpuštanje aktivnih supstanci [237-239]. Kod dizajniranja nosača aktivnih supstanci koji se baziraju na lipozomima veoma su značajna osnovna svojstva ovih čestica, kao što su raspodela veličine čestica lipozoma i naelektrisanje njihove površine od čega zavisi stabilnost ovih čestica, a samim tim i kontrola otpuštanja aktivne supstance [240, 241]; zatim koncentracija i vrsta upotrebljenih fosfolipida u pripremi lipozomnih čestica, koji takođe mogu da utiču na otpuštanje leka iz posmatranog nosača zato što i oni utiču na stabilnost lipozoma i veličinu čestica [241-243]; kao i koliki je stepen inkapsulacije aktivne supstance u dobijenim lipozomima, od čega će zavisiti i profili otpuštanja aktivne supstance iz dobijenih nosača [244, 245].

Lipozomi su pogodni za sisteme za kontrolisano otpuštanje zato što mogu da zaštite osetljive aktivne supstance, da nose i hidrofilne i hidrofobne aktivne supstance, čak i obe istovremeno, mogu da se ponašaju kao mini depoi iz kojih se aktivna supstanca polako oslobađa (čime se smanjuje broj doza unetog leka, a samim tim se smanjuje i moguća toksičnost aktivne supstance), oni takođe mogu dopremiti aktivne supstance na određeno mesto u ljudskom organizmu tj. dalje od ljudskih organa koji bi mogli biti oštećeni lipozomnim sadržajem, mogu da intereaguju sa ćelijama što omogućava dopremanje leka u samu ćeliju, u stanju su da omogućе produženo oslobađanje leka, takođe membrana lipozoma lako može da se modifikuje kako bi se unapredio sistem za kontrolisano otpuštanje leka [246-251]. Ove fosfolipidne nanočestice se koriste u kozmetičkim preparatima [252], za ciljano oslobađanje aktivne supstance, kao nosači aktivnih supstanci u tretmanu mnogih bolesti kao što je rak [253-255], oni takođe mogu da nose nukleinske kiseline ili DNK, da se koriste u procesu snimanja itd [237, 256, 257].

Međutim, lipozomi imaju i neke nedostatke kao što su: mala stabilnost tokom skladištenja (mogu da formiraju agregate), moguće je spajanje membrana lipozoma, može da dođe do njihovog brzog uklanjanja iz ljudskog tela ili može da dođe do curenja aktivne supstance iz lipozomskog nosača [237, 256]. Moguće je da se ovi nedostaci otklone modifikovanjem membrane lipozoma čime se postiže stabilnost sistema i mogućnost da se izbegne imuni sistem. Istraživači predlažu da membrana lipozoma može da se modifikuje nanočesticama zlata, silikonskim česticama ili obrazovanjem kompleksa sa polimerima [258, 259]. Za pripremu sistema za kontrolisano otpuštanje polimer-lipozom mogu da se koriste i prirodni (hitozan, kazein, škrob, pektin) i sintetički (PEG, PVA, poli(metil metakrilat) (PMMA), PMAA, poli(akrilna kiselina) (PAA)) polimeri i takva vrsta lipozoma se naziva prikriveni ili „stealth” lipozomi [260]. Mogući načini modifikacije lipozomske membrane, kao i modeli koji opisuju kinetiku oslobađanja leka iz lipozoma, prikazani su na Slici 20. (A [261], B [262], C [263]) i Slici 21. [264].

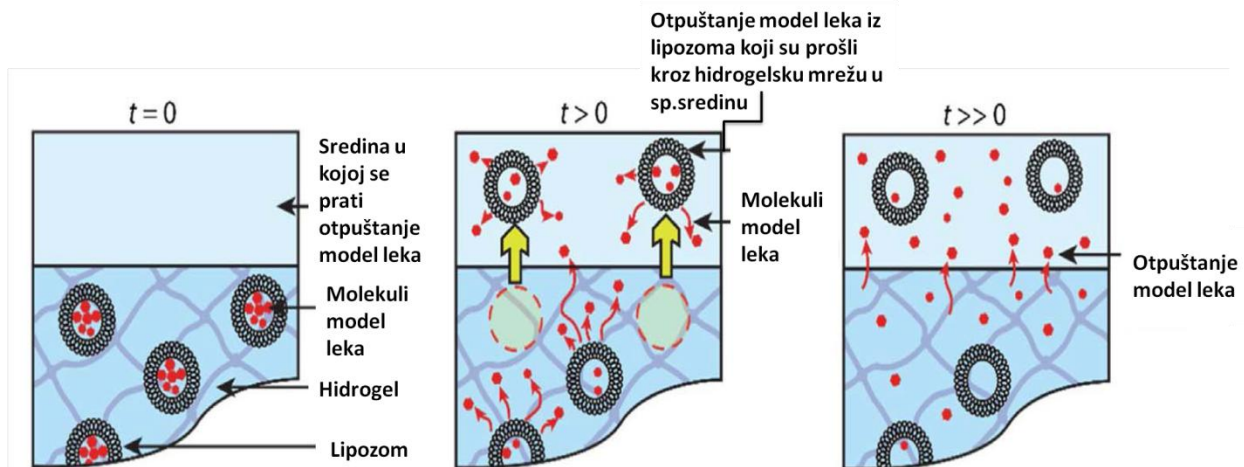


Slika 20. Različite vrste modifikacija lipozoma polimerima A [261], B [262], C [263]



Slika 21. Kinetika oslobađanja leka iz lipozoma i mogući načini modifikacije lipozoma [264]

P. Latreillea i sar. [265] analizirali su strukturu kompleksa NIPAAMcoPMAA / lipozomi kao i oslobađanje model leka iz ovog sistema i zaključili da postoje dva moguća mehanizma oslobađanja model leka koji se iz NIPAAMcoPMAA/lipozomi oslobađa tako što se prvo oslobodi "brzim (burst) difuzionim oslobađanjem", a posle "sporijim sub-difuzionim otpuštanjem" (Slika 22. [265]). Ovi autori su takođe dokazali da su lipozomi otpušteni iz hidrogela u spoljašnju sredinu gotovo odmah nakon potapanja sistema u sredinu u kojoj je analizirano oslobađanje model leka i objasnili da su lipozomi verovatno bili vrlo blizu površine sistema, a samim tim i blizu sredine u kojoj je praćeno otpuštanje model leka. Olakšanu difuziju lipozoma kroz sistem su objasnili poroznošću sistema, sa porama koje su odgovarale veličini lipozomskih čestica.



Slika 22. Mehanizam oslobađanja model-leka iz sistema polimer/lipozomi [265]

2.5. Dosadašnja dostignuća na polju razvoja sistema na bazi poli(metakrilne kiseline) i hidrogel/lipozomi sistema

Hidrogelovi na bazi poli(metakrilne kiseline) imaju veliku primenu u mnogim oblastima kao što je kontrolisano otpuštanje lekova, u kozmetičkim preparatima, za lečenje rana, kao absorbent u deterdžentima, u procesu prečišćavanja voda, u industriji za proizvodnju nafte, u poljoprivredi itd. [266] [267] [268].

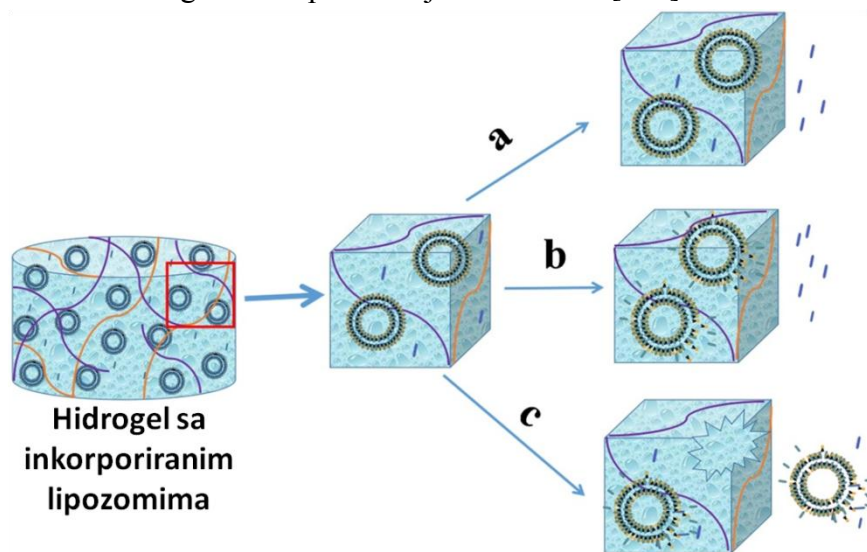
pH-osetljiv hidrogel na bazi metakrilne kiseline, hitozana i PEG ispitan je za ciljano otpuštanje lekova u ljudskom organizmu u oralnoj sredini. Takođe su *in vitro* potvrđene dobre adhezione osobine ovog sistema, a autori pretpostavljaju da se ovi polimeri vezuju za tkiva vodoničnim vezama [269]. Objavljen je i rad koji se bavi ispitivanjem sistema na bazi poli(metakrilne kiseline) i hitozana koji bi mogao da se koristi u sistemima za kontrolisano otpuštanje lekova. Ovaj kompleks je dobijen radikalskom polimerizacijom na 70°C u vodenoj sredini, a korišćen je MBA kao umreživač. Ispitivano je kako promena količine umreživača i monomera utiče na osobine ispitivanog sistema i utvrđeno je da su optimalne količine MAA 300 mg/ml, a MBA 15 mg/ml da bi sistem bio stabilan i imao željene termalne osobine [270]. S. M. H. Bukhari i sar. [207] ispitivali su bubrenje sistema baziranog na akrilnoj kiselini i želatinu i pratili oslobađanje model leka feniramin-maleata (rastvornog u vodi) tokom 12 časova u fosfatnom puferu na tri pH vrednosti (1,2; 5,5 i 7,5). Takođe je ispitivan uticaj monomera, umreživača, sol-gel prelaz i poroznost. Sa povećanjem količine upotrebljenog umreživača pokazano je da se smanjuje stepen bubrenja i količina otpuštenog leka, i obratno [207]. U naučnoj literaturi su takođe objavljeni pH osetljivi hidrogelovi na bazi alginata za ciljano otpuštanje slabovodorastvornih aktivnih supstanci. Alginat je modifikovan poli(ϵ -kapolaktonom) kako bi se dobio nosač za ciljano otpuštanje slabo vodorastvornog model leka

teofilina u medijumu koji je simulirao pH sredinu u crevima čoveka [271]. I. Colinet i sar. su u drugom radu tako modifikovanom alginatu dodali hitozansku prevlaku kako bi dodatno stabilisali nosače i usporili ciljano otpuštanje slabo vodorastvornog model leka teofilina u sredini sa pH=6,8 [272].

Kontrolisano otpuštanje podrazumave da se tačno određena količina leka određeni vremenski period oslobađa na željenom mestu u organizmu. Zbog toga se radi na razvijanju sistema na bazi hidrogelova osetljivih na promenu pH vrednosti kao što su i PMAA hidrogelovi koji mogu biti modifikovani, kako bi se aktivnoj supstanci poboljšala bioraspoloživost ili da u njih budu imobilizovani nanonosači kao što su lipozomi, kako bi se otpuštanje aktivne supstance više usporilo ili kako bi se ispitivana aktivna supstanca zaštitila. U naučnoj literaturi je objavljeno nekoliko takvih sistema hidrogel/lipozomi. Primer sistema hidrogel/lipozomi su imobilizacija lipozoma u poli(akrilnu kiselinu) ili u agarozni hidrogel koji su dobili T. Ishigami sa saradnicima [273]. Ovi autori navode da su uspeli da dobiju sistem koji ima značajno više lipozoma u odnosu na dosad razvijene sisteme i istovremeno su lipozomi zadržali svoja svojstva i oblik, tj. nije došlo do njihove degradacije. Značajnost ovog sistema ogleda se u tome što bi mogao da se upotrebi za razdvajanje racemske smeše zato što ima mogućnost hiralnog prepoznavanja. Ovi autori su uspeli da reše problem količine imobilisanih lipozoma tako što su kondenzovali lipozome centrifugiranjem i time uspeli da imobilizuju veću količinu u odnosu na imobilisanu količinu u dosad objavljenim sistemima, a istovremeno je postignuta stabilnost lipozoma bez uspostavljanja hemijskih veza između dobijenih lipozoma i mreže hidrogela ili modifikacije površine lipozoma [273]. U literaturi su takođe objavljeni sistemi na bazi hitozana sa lipozomima. A. Billard i sar. [274] su dobili sistem na bazi hidrogela hitozana u koga su inkorporirani lipozomi sa inkapsuliranim lekom, čije je kontrolisano otpuštanje praćeno. Karakteristično za pripremu ovog sistema je to što su prvo pripremljeni lipozomi sa inkapsuliranim lekom, pa dodati u rastvor hitozana, nakon čega je izveden proces polimerizacije i to bez dodatog umreživača, a prisustvo lipozoma nije sprečilo ovaj proces. Ovi autori su potvrdili prisustvo lipozoma u hidrogelu korišćenjem cryo-SEM tehnike i fluorescencije [274].

Drugi primer je injektabilni hidrogel koji bi mogao da se koristi u procesu lečenja bolesti miokarda na bazi hitozana sa lipozomima u kojima je inkapsuliran alfa tokoferol, kako bi se povećala njegova rastvorljivost i stabilnost. Ovaj polimerni sistem sa lipozomima bi mogao da se koristi u inženjerstvu tkiva kao skafold [275]. Ispitivano je i otpuštanje inkapsuliranog antitumornog leka iz sistema hidrogel-lipozomi kod koga je hidrogel osetljiv na promenu temperature [276]. Sa promenom temperature u spoljašnjoj sredini dolazi do fazne transformacije ovog hidrogela iz gela u sol, čime je omogućen novi način aplikacije i ciljano otpuštanje leka na mestu tumornog tkiva u ljudskom organizmu (u ovom slučaju lečenje kancera pankreasa) i smanjena toksičnost leka koji se koristi u terapiji, a koji bi mogao da ima negativne efekte na okolna tkiva. K. Pachis i sar. [277] su takođe razvili sistem na bazi hidrogela i lipozoma koji se aplikuje injektiranjem, a ispitivali su kako ovaj sistem utiče na povećanu bioraspoloživost i kontrolisano otpuštanje flurbiprofena za tretiranje oftalmoloških bolesti. Ispitivanja su izvršena *in vivo* na zečevima i utvrđeno je da nije bilo negativnih posledica, a istovremeno je postignuto

kontrolisano otpuštanje leka. Priprema ovih sistema hidrogel-lipozomi izvedena je takozvanom hladnom metodom, tj. mešanjem hidrogela Pluronic F127 sa pripremljenim lipozomima u koje je prethodno inkapsuliran lek [277]. N. El Kechai i saradnici [278] su razvili polimerni sistem na bazi hijaluronske kiseline sa lipozomima, koji bi imao potencijalnu primenu u sistemima za lokalno injektiranje lekova. Utvrdili su da se ispitivanom polimernom sistemu povećava viskozitet i elastičnost sa povećanjem koncentracije lipozoma nezavisno od upotrebene vrste lipozoma, tj. dobili su jaču mrežu hidrogela zbog interakcija koje su se uspostavile između hijaluronske kiseline i lipozoma. Te interakcije zavise od upotrebene vrste lipozoma, a mogu da budu hidrofobne interakcije, vodonične veze, ali takođe i neke specifične interakcije ako su na primer upotrebljeni pegalizovani lipozomi, zatim prisutna su i elektrostatička odbijanja ili privlačenja [278]. Još jedan od primera sistema na bazi hidrogelova sa lipozomima je i sistem dobijen tehnikom nadkritičnog ugljen-dioksida koji bi mogao da ima primenu kod regeneracije tkiva [279]. I kod ovog sistema hidrogel je osetljiv na promenu temperature i podleže faznoj transformaciji gel-sol, tako da se nakon injektiranja transformiše u sol na temperaturi u ljudskom organizmu. Praćeno je kontrolisano otpuštanje kurkumina iz ovog sistema i utvrđeno je da se ovaj sistem može koristiti za produženo otpuštanje leka i do 12 dana, a šematski prikaz oslobađanja kurkumina iz ovog sistema prikazan je na Slici 23. [279].



Slika 23. Šematski prikaz oslobađanja model-leka iz sistema na bazi hidrogel/lipozomi [279]

Razvijen je i sistem na bazi alginata i lipozoma za kontrolisano otpuštanje doksorubicina za tretman kancera grla. Dobijene su tri forme ovog sistema: hidrogelska pasta u kojoj su dispergovani lipozomi (dobre ahezivne osobine, ali brzo oslobađanje), hidrogelska mreža (loše adhezivne osobine, ali kontrolisano oslobađanje) i umrežena pasta (kako bi se dobile dobre i adhezivne osobine (80% paste je ostalo zadržano na jeziku) i kontrolisano oslobađanje). Pasta sa inkorporiranim lipozomima se pokazala kao najbolji sistem za kontrolisano oslobađanje antitumornog leka doksorubicina u tretmanu kancera jezika i imala je takođe dobre mukoadhezivne osobine u odnosu na ostala dva ispitivana sistema [232].

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Korišćene hemikalije

Sintetisani su nosači slabo vodorastvorne aktivne supstance - kofeina na bazi poli(metakrilne kiseline), kazeina, itakonske kiseline i lipozoma. U obliku u kome su dobijeni od proizvođača i bez dodatnog prečišćavanja korišćeni su sledeći reagensi:

-metakrilna kiselina (MAA) ($\geq 99.5\%$) firme Merck (Nemačka);

-natrijum-kazeinat (C) (88,9% proteina) firme Lactoprot Deutschland GmbH (Nemačka);

-itakonska kiselina (IA) ($\geq 99\%$) firme Aldrich Chemical Co. (SAD);

-gotova fosfolipidna smeša Natipide® II sastavljena od nezasićenih fosfolipida (sa 3-sn-fosfatidilholina 76+3%) iz semena soje (>20%) firme Lipoid (Nemačka);

-natrijum-hidroksid (NaOH) (p.a.) firme Aldrich Chemical Co. (SAD);

-N,N'-metilenbisakrilamid (MBA) (p.a.) firme Aldrich Chemical Co. (SAD);

-2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-il)propan]dihidrohlorid (VA-044) (99.8%) firme Wako Pure Chemical Industries (Japan);

-kofein (maksimalna rastvorljivost 20 mg/ml na 25°C) firme Merck (Nemačka) i

-nikotin-amid firme DSM (Holandija).

Za pripremu sredina u kojima se izvode eksperimenti otpuštanja kofeina i bubrenja nosača, korišćeni su natrijum-dihidrogenfosfat (NaH_2PO_4) i natrijum-hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) firme Centrohem (Srbija) za pripremu 0,2 M fosfatnog pufera pH=6,8 (PB) i 0,2 M fosfatnog pufera pH=7,4 (PB), a HCl (37%) firme Zorka Pharma (Srbija) za pripremu 0,1M HCl. U svim eksperimentima korišćena je destilovana voda.

3.2. Sinteza nosača lekova na bazi poli(metakrilne kiseline), kazeina i lipozoma

PMAC i PMAC/L nosači sintetisani su slobodnoradikalском polimerizacijom u vodenoj sredini i korišćeni za izvođenje predviđenih eksperimenata.

3.2.1. Sinteza PMAC sistema

Sinteza PMAC nosača izvedena je radikalском polimerizacijom u vodenoj sredini na sledeći način. Prvo je razblaženo 4 ml metakrilne kiseline (20% u odnosu na reakcionu smešu) ili 3 ml MAA i 1 ml IA u uzorcima kod kojih je planirano da sadrže itakonsku kiselinu, sa odgovarajućom količinom destilovane vode. Zatim je dodata odgovarajuća količina kofeina. Nakon njegovog rastvaranja, dodata je odgovarajuća količina NaOH u odnosu na željeni stepen neutralizacije metakrilne kiseline. Po završetku neutralizacije (nestanak mehurića u reakcionoj smeši) temperatura reakcione smeše se podigne na 60°C i uz intenzivno mešanje doda se 4 g kazeina (20% u odnosu na reakcionu smešu). S mešanjem se nastavlja sve do njegovog rastvaranja. Sledeći korak je dodavanje umreživača MBA: 0,4 mol% u odnosu na MAA u obliku 1% rastvora, a u određenoj seriji uzoraka ova količina je varirana u cilju ispitivanja uticaja promene količine umreživača, pa su sintetisani uzorci sa 2, 4 i 8 puta većom količinom umreživača, tj. sa 0,8mol%, 1,6mol% i 3,2mol%, respektivno. Nakon njegovog rastvaranja doda se inicijator VA-044 (0,06 mol% u odnosu na MAA u obliku 1% rastvora). Smeša se odmah izliva u kalupe napravljene od dve staklene ploče razdvojene PVC crevom. Kalupi se ostavljaju u sušnici na 60°C tokom 5 h, kako bi se završio proces polimerizacije. Kada se kalupi izvade iz sušnice, uzorci se iseku u obliku diska prečnika 7 mm i debljine 2 mm i ostave u eksikatoru do izvođenja eksperimenata.

Sintetisani uzorci su označeni sledećim oznakama PMAC-xN-y, PMAC/IA-xN-y, PMAC-xN-zM-y. xN predstavlja stepen neutralizacije MAA (0%, 50% i 100%), y je masa kofeina u nosačima (g), PMAC/IA su sistemi sa itakonskom kiselinom, a zM predstavlja koliko je puta više umreživača MBA (2, 4 ili 8) u odnosu na osnovni uzorak (0,4 mol% u odnosu na MAA) dodato u sistemima u seriji u kojoj je ispitivan uticaj umreživača na otpuštanje kofeina i bubrenje nosača.

3.2.2. Sinteza PMAC/L sistema

Sintezi PMAC/L nosača prethodila je priprema lipozomne suspenzije sa inkapsuliranim kofeinom pro-lipozomnom metodom koja se odvija na sledeći način. Napravi se 1% rastvor kofeina (20 mg/ml) i doda se 10% fosfolipidne smeše Natipide® II u odnosu na ukupnu količinu sistema uz intenzivno mešanje, tokom koga se formiraju lipozomne čestice sa inkapsuliranim kofeinom. Deo suspenzije je koncentrovan centrifugiranjem kako bi se uporedilo otpuštanje

kofeina iz nosača sa ovakvim oblikom lipozoma sa otpuštanjem kofeina iz nosača sa lipozomnom suspenzijom. Dobijeni supernatant posle centrifugiranja lipozomne suspenzije, korišćen je za određivanje stepena inkapsulacije kofeina u lipozomima.

PMAC/L sistemi sintetisani su na sličan način kao i prethodno opisani PMAC i PMAC/IA sistemi. Nakon rastvaranja 4 ml MAA u odgovarajućoj količini destilovane vode doda se lipozomna suspenzija sa inkapsuliranim kofeinom. Odnos lipozomne suspenzije i destilovane vode variran je u cilju ispitivanja uticaja količine inkapsuliranog kofeina u lipozomima na otpuštanje, pa su napravljeni uzorci u kojima je dodato 15%, 25%, 35% i 50% lipozomne suspenzije u odnosu na destilovanu vodu, a količina dodatih lipozoma koncentrovanih centrifugiranjem bila je 50% u odnosu na destilovanu vodu. Zatim se dodaje odgovarajuća količina NaOH da bi se dobio željeni stepen neutralizacije MAA. Nakon završene neutralizacije povisi se temperatura na 50°C (kako ne bi došlo do razgradnje lipozoma na 60°C) i uz konstantno i intenzivno mešanje doda se 4 g kazeina. Kada se kazein rastvori, sledi dodavanje odgovarajuće količine umreživača (MBA) i inicijatora (VA-044), nakon čega se uzorci odmah izlivaju u kalupe i ostavljaju u sušnicu na 60°C tokom 5 h kako bi se proces i polimerizacije i umrežavanja završio. Uzorci se iseku u obliku diska prečnika 7 mm i debljine 2 mm nakon što se izvade iz sušnice.

Dobijeni uzorci su obeleženi sa PMAC-yN-Lx i PMAC-yN-Lc, gde je Lx procenat dodate lipozomne suspenzije u odnosu na količinu destilovane vode u sistemu, sa Lc su obeleženi koncentrovani lipozomi dobijeni centrifugiranjem (udeo ovih lipozoma je bio 50% u odnosu na destilovanu vodu), sa yN je označen stepen neutralizacije MAA (%).

Postupak dobijanja PMAC nosača sa lipozomima sa inkapsuliranim kompleksom kofein/nikotin-amid isti je kao i već opisani postupak za dobijanje PMAC-L sistema sa 1,6mol% umreživača u odnosu na MAA [280]. Lipozomna suspenzija je takođe dobijena pro-lipozomnom metodom, a jedina razlika je u dodatku nikotin-amida tokom sinteze lipozoma sa inkapsuliranim kofeinom. Odnos nikotin-amid:kofein bio je 1:1 u svim sintetisanim sistemima. Uzorci su označeni oznakama PMAC-100N-4M-LSx, PMAC-100N-4M-LCx, PMAC-100N-4M-LS100Ly ili PMAC-100N-4M-LC100Ly, gde x označava koncentraciju kofeina inkapsuliranog u lipozome (mg/ml), LS je simbol za lipozomnu suspenziju, LC je oznaka za koncentrovane lipozome dobijene centrifugiranjem, a Ly označava procenat lipozoma u odnosu na ukupnu masu destilovane vode koju bi trebalo dodati tokom sinteze nosača. U slučaju da nema Ly oznake podrazumeva se da je dodato 50% lipozoma u odnosu na destilovanu vodu.

3.3. Korišćene metode

U cilju dobijanja bližih informacija o hemijskoj strukturi polimernih nosača, kao i otkrivanju interakcija koje bi mogle da se uspostave između polimernih nosača i model leka korišćena je infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR). Ispitivani su

FTIR spektri kserogelova uzoraka u obliku diskova u opsegu vrednosti talasnog broja od 400-4000 cm^{-1} pri rezoluciji 4 cm^{-1} upotrebom Nicolet™ iS10 FTIR spektrometra.

Morfologija nosača slabo vodorastvornih aktivnih supstanci na bazi poli(metakrilne kiseline), kazeina i lipozoma analizirana je skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM). Kako bi se snimili SEM mikrografi, uzorci su prethodno pripremljeni na sledeći način. Nakon bubrenja u destilovanoj vodi do ulaska u ravnotežno stanje, uzorci su liofilizovani, a zatim prekriveni tankim slojem Au-Pd u POLARON SC502 neparivaču kako bi se dobila odgovarajuća električna provodljivost, zato što ovi materijali nisu po svojoj prirodi provodnici. Zatim su snimljeni SEM mikrografi reprezentativnih uzoraka određenih serija na aparatu Tescan MIRA 3 XMU skenirajućem elektronskom mikroskopu (field-emission gun scanning electron microscope -FEG-SEM) naponom ubrzanja od 20 kV.

Strukturalna svojstva sintetisanih uzoraka takođe su karakterisana X-ray difraktometrom (XRD). Ispitivani uzorci su prvo ostavljeni u destilovanoj vodi do dostizanja ravnotežnog stepena bubrenja, zatim su liofilizovani i sprašeni. Difrakcija X zraka na ovako pripremljenim uzorcima merena je korišćenjem Bruker D8 Advance AXS difraktometra sa Bragg-Brentanovom geometrijom i primenom Cu-K α radijacije ($\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$). Podaci su mereni u rasponu 2θ od 2 do 25° sa korakom od 0,0204° i vremenom akumulacije od 0,8 s po koraku.

Raspodela veličine čestica lipozoma sa inkapsuliranim kofeinom koji su korišćeni u sintezi PMAC-L nosača, srednja vrednost prečnika veličine čestica i indeks polidisperzibilnosti (PDI) određene su fotonskom korelacionom spektroskopijom, dok je z-potencijal čestica lipozoma određen elektroforetskim rasipanjem svetlosti na aparatu Zetasizer Nano series Nano-ZS Malvern. Merenja su izvedena na 25°C, a uzorak je prethodno razblažen destilovanom vodom hiljadu puta. Odrađena su tri merenja, a dobijeni rezultat je dat kao srednja vrednost.

Bubrenje sintetisanih PMAC i PMAC/L uzoraka praćeno je na 37°C tokom 24h u dve sredine: 0,1M HCl pH=1,2 (simulacija pH sredine u želucu čoveka) i 0,2M fosfatnom puferu pH=6,8 (PB 6,8) (simulacija pH sredine u tankim crevima čoveka) [281]. Kserogel uzoraka u obliku diskova početne mase (m_0) potpuno su potopljeni u svaku od ispitivanih sredina i ostavljeni da bubre. U određenim vremenskim intervalima vađeni su iz sredina i merena im je masa do dostizanja ravnotežnog stanja (m_{eq}). Vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja izračunate su prema jednačini (3). Koeficijenti difuzije spoljašnje sredine u nosače određeni su prema jednačini (12).

Stepeni inkapsulacije kofeina u PMAC nosačima određeni su takozvanom ekstrakcionom metodom [207]. Svaki kserogel nosača potopljen je u destilovanu vodu i kofein je ekstrahovan sa 50 ml sveže destilovane vode, sve do trenutka kada se više nije mogla registrovati količina kofeina otpuštenog u destilovanu vodu. Koncentracija kofeina u dobijenim rastvorima

određivana je spektrofotometrijski na UV-Vis Shimadzu UV-1800 spektrofotometru na 273 nm talasne dužine.

Stepen inkapsulacije kofeina u lipozomima koji su korišćeni za sintezu PMAC/L nosača određen je sledećim postupkom. Koncentracija kofeina u supernatantu, dobijenom posle centrifugiranja lipozomne suspenzije sa kofeinom, određena je spektrofotometrijski. Zatim je određena masa kofeina u supernatantu preko dobijene vrednosti koncentracije kofeina, pa kako je početna masa kofeina u lipozomnoj suspenziji poznata, stepen inkapsulacije kofeina u lipozomima se može odrediti prema jednačini (13):

$$E = \frac{m_{cfu} - m_{cfn}}{m_{cfu}} 100 \quad (13)$$

gde je E stepen inkapsulacije kofeina (%) u lipozomima, m_{cfu} (g) ukupna početna masa kofeina u lipozomnoj suspenziji, a m_{cfn} (g) je izračunata masa kofeina u supernatantu.

Stepeni inkapsulacije kofeina i nikotin-amida u uzorcima sa inkapsuliranim kompleksom kofein/nikotin-amid određeni su tečnom hromatografijom visokih performansi (High Performance Liquid Chromatography - HPLC). Lipozomna suspenzija sa inkapsuliranim kompleksom kofein/nikotin-amid je koncentrovana centrifugiranjem, a dobijeni supernatant je korišćen za određivanje stepena inkapsulacije prema prethodno opisanom postupku za određivanje stepena inkapsulacije kofeina u lipozomima (Jednačina (13)).

Kontrolisano otpuštanje kofeina iz PMAC i PMAC/L nosača praćeno je pod istim eksperimentalnim uslovima kao i bubrenje nosača. Absorbance uzoraka merene su na 273 nm u određenim vremenskim trenucima na UV-Vis Shimadzu UV-1800 spektrofotometru. Kako se uzimanje ekvimolarnog dela zapremine sredine za otpuštanje za spektrofotometrijsku analizu ne bi odrazilo na tačnost, svaki kserogel polimernog nosača ubačen je u 100 ml pripremljenih sredina za eksperimente otpuštanja, zatim je po 3 ml rastvora sa otpuštenim kofeinom u određenoj sredini u prethodno definisanim vremenskim trenucima, uzimano za merenje absorbance i vraćano u sredine u kojima je praćeno otpuštanje. Svaki eksperiment je ponovljen tri puta i uzeta je srednja vrednost absorbanci za dalje proračune.

Kontrolisano otpuštanje kofeina i nikotin-amida iz nosača sa inkapsuliranim kompleksom kofein/nikotin-amida praćeno je pod istim eksperimentalnim uslovima kao i bubrenje ovih nosača, kako se procesi otpuštanja i bubrenja odvijaju istovremeno. 0,5 ml uzoraka je uzimano u određenim vremenskim intervalima, zatim su propušteni kroz sirindž filter sa porama od 0,45 μm i analizirani tečnom hromatografijom visokih performansi. Eksperimentalni podaci su korišćeni za konstruisanje kumulativne krive otpuštanja koja predstavlja zavisnost M_t/M_∞ od t, gde je M_t masa aktivne supstance u vremenskom trenutku t (mg), M_∞ je masa otpuštene aktivne supstance u trenutku dostizanja ravnotežnog stanja (mg), a t je vreme trajanja procesa oslobađanja aktivne supstance (h). Kvantitativna analiza uzoraka izvedena je na Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific HPLC sistemu i reverzno-faznoj koloni (Perkin Elmer C18, 150 mm \times 4,6 mm, čestice

stacionarne faze prečnika 5 μm). Mobilna faza se sastojala od rastvarača (A) $\text{H}_2\text{O}:\text{HCOOH}=100:0,1\%$ i rastvarač (B) $\text{MeOH}:\text{HCOOH}=100:0,1\%$. Korišćenjem dve pomenute faze elucija je izvedena na sledeći način: 0-5 min gradijent od 10 do 100% B, 5-7 min izokratski 100 % B, 7-7,1 min gradijent od 100 do 10 % B, 7,1-11 min izokratski 10% B. U toku analiza zapremina uzoraka nanošenih na kolonu bila je u opsegu od 5 do 50 μl . Protok mobilne faze je bio konstantan (1 ml/min), a kolona je bila termostatirana na 30 $^\circ\text{C}$. Retenciona vremena i površine pikova, u vidu hromatograma, dobijeni su UV detekcijom na 260 nm za nikotinamid i 273 nm za kofein. Koncentracije uzoraka u receptorskom rastvoru su određene korišćenjem jednačine (14):

$$C_{uzorak}(\text{mg/ml}) = \frac{A_{uzorka} * V_{standarda}}{\text{nagib} * V_{uzorak}} \quad (14)$$

u kojoj A ($\text{mAU} * \text{min}$) predstavlja površinu pika jedinjenja na HPLC hromatogramu, V_{uzorka} i $V_{standarda}$ su injekcione zapremine uzorka i standarda, redom. Standardne prave za kofein i nikotinamid su konstruisane korišćenjem različitih koncentracija pomenutih jedinjenja (0,1 do 0,5 mg/ml) i dobijeni nagibi korišćeni su u jednačini (14).

Postupak praćenja bubrenja nosača i otpuštanja kofeina u sredinama koje simuliraju put prolaska nosača kroz gastrointestinalni trakt čoveka izveden je na sledeći način. Ispitivani nosači su prva 2 h bili uronjeni u 0,1 M HCl (simulacija vremena koje bi nosač proveo u želucu) u kojoj su u unapred određenim vremenskim trenucima praćene promena koncentracije kofeina i promena stepena bubrenja nosača, a potom su nosači premešteni u fosfatni pufer $\text{pH}=6,8$ (PB 6,8) gde su nastavljani eksperimenti bubrenja nosača i otpuštanja kofeina tokom naredna tri sata (simulacija vremena koje bi nosač proveo u tankom crevu čoveka) nakon čega su nosači premešteni u fosfatni pufer $\text{pH}=7,4$ (PB 7,4) do isteka šesnaestog sata kao simulacija vremena koje bi nosač proveo u debelom crevu čoveka [281, 282]. Svi eksperimenti su izvedeni na 37 $^\circ\text{C}$.

U cilju dobijanja kompletnije slike o kinetici otpuštanja inkapsuliranog slabo vodorastvornog model leka – kofeina, eksperimentalni podaci dobijeni praćenjem otpuštanja kofeina analizirani su primenom najčešće korišćenih matematičkih modela (R-P, Higuchi, Kopcha i model fitting metod) opisanih u Odeljku 2.6. Jednačine Higuchi i R-P modela prevedene su u oblike $\frac{M_t}{M_\infty} = k_H t^{0,5}$ i $\ln\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = \ln(kt^n)$, respektivno. Konstruisane su odgovarajuće prave, a iz njihovih nagiba određene su vrednosti kinetičkih konstanti ovih modela. Oblik Kopcha modela predstavljen u Odeljku 2.6., dodat je u program OriginPro 8.5, primenjen na kumulativne krive otpuštanja kofeina $\left(\frac{M_t}{M_\infty} - t\right)$ i dobijene su vrednosti kinetičkih konstanti. Opis primene model fitting metode predstavljen je u Odeljku 2.2.6. Oblasti primene za sve modele obeleženi su sa $\Delta\alpha$ i izraženi u procentima (%).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Karakterizacija PMAC i PMAC/L sistema i karakterizacija lipozoma

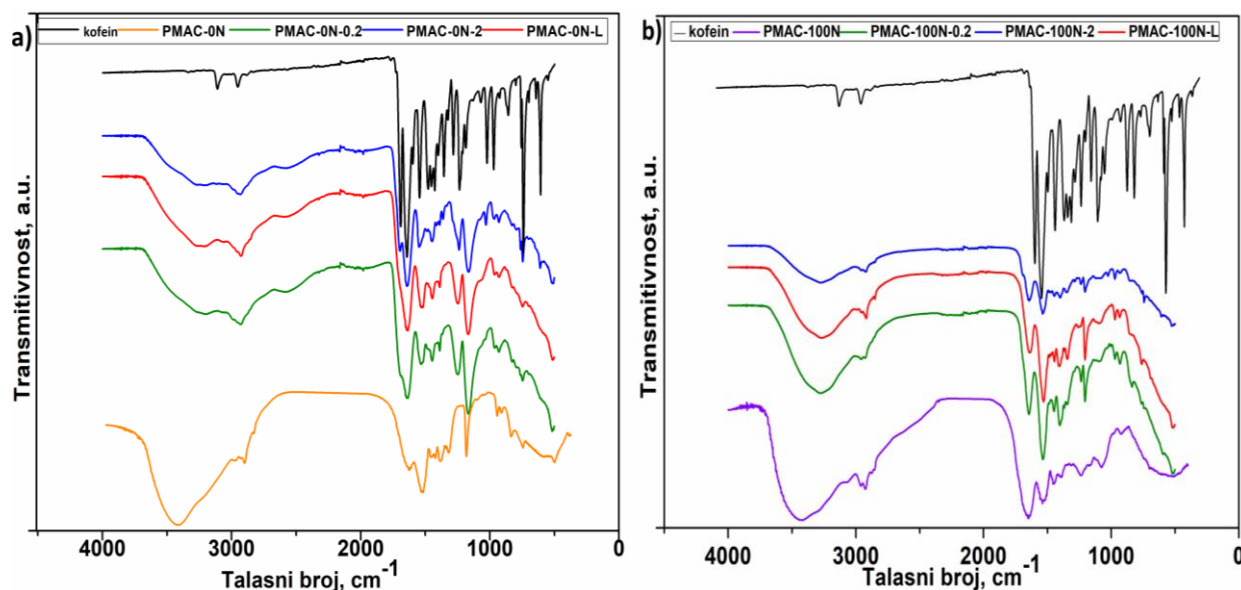
Kako bi se ispitale interakcije između komponenti sintetisanih sistema i utvrdile njihove morfološke karakteristike, urađene su FTIR i SEM analiza, a karakterizacija lipozoma koji su korišćeni za sintezu PMAC/L sistema, urađena je primenom fotonske korelacione spektroskopije i elektroforetskog rasipanja svetlosti.

4.1.1. FTIR analiza PMAC i PMAC/L sistema

Kako bi se utvrdilo da li je došlo do uspostavljanja interakcija i koji je tip interakcija uspostavljen između komponenti sintetisanih nosača, urađena je FTIR analiza kofeina, PMAC-0N, PMAC-0N-0.2, PMAC-0N-2, PMAC-0N-L, PMAC-100N, PMAC-100N-0.2, PMAC-100N-2 i PMAC-100N-L nosača.

FTIR spektri čistog kofeina, PMAC uzoraka sa 0% i 100% neutralizacije MAA bez kofeina i PMAC uzoraka sa inkapsuliranim kofeinom ili sa lipozomima u koje je inkapsuliran kofein, prikazani su na Slici 24. a) i b). Svi FTIR spektri PMAC uzoraka poseduju iste karakteristične pikove koji potiču od poli(metakrilne kiseline) i kazeina. Karakteristični pikovi koji potiču od poli(metakrilne kiseline) nalaze se na 2930 cm^{-1} i 3060 cm^{-1} (C-H vibracije rastezanja), 1391 cm^{-1} (vibracije savijanja metilnih grupa), 1645 cm^{-1} (C(=O)-OH simetrične vibracije savijanja) i 1540 cm^{-1} (simetrične vibracije rastezanja C(=O)-O⁻) (Slika 24. a) i b)) [283]. Karakteristični pikovi kazeina se mogu videti na 1450 cm^{-1} (rastezanje C-C veza aromatičnog prstena), 1393 cm^{-1} (C=O rastezanje grupa asparaginske kiseline i glutaminske kiseline) i 1240 cm^{-1} (rastezanje C-C nezasićene veze) (Slika 24. a) i b)) [284]. M. Markovic i sar. su analizom FTIR spektara PMAA, kazeina i PMAC uzoraka, utvrdili da se između karboksilnih grupa poli(metakrilne kiseline) i amidnih grupa amino kiselina u strukturi kazeina uspostavljaju vodonične interakcije [63]. Kao rezultat neutralizacije MAA na FTIR spektrima PMAC uzoraka sa 100% neutralizacije (Slika 24. b)) može se primetiti odsustvo dva pika karakteristična za kazein (na 925 cm^{-1} – vibracije rastezanja P-OH veza [285] i na 1078 cm^{-1} - vibracije rastezanja veza u HPO_4^{2-} jonu [286]) kao posledica disocijacije kazeinskih micela u baznoj sredini (Slika 24. b)) [63]. Prisustvo kofeina u ispitivanim PMAC sistemima (i sa 0% i 100% stepena neutralizacije) potvrđeno je prisustvom karakterističnih pikova za kofein na Slici 24. a) i b): na 973 cm^{-1} (C-C rastezanje), na 1357 cm^{-1} (C-H rastezanje) i na 1700 cm^{-1} (rastezanje C=O)[287]. Pomeranje određenih karakterističnih pikova kazeina ukazuje na ostvarene interakcije između kazeina i kofeina (Slika 24. a) i b)). Naime, pomeranje karakterističnog pika kazeina na 1235 cm^{-1} (istezanje zasićene C-C veze) za deset jedinica ka višim vrednostima

talasnih brojeva i pika na 1452 cm^{-1} (rastezanje C-C veza aromatičnog prstena) za deset jedinica ka nižim vrednostima talasnih brojeva, može da ukazuje na ostvarene hidrofobne interakcije između kazeina i kofeina. Pomeranje karakterističnog pika kazeina sa 1398 cm^{-1} (istezanje C=O grupa asparaginske kiseline i glutaminske kiseline) na 1408 cm^{-1} mogu da izazovu uspostavljene vodonične veze između kazeina i kofeina. Uspostavljene interakcije kao što su vodonične veze i hidrofobne interakcije između slabo vodorastvornog model leka i proteina takođe su objavili i N. Chen i sar. [288]. Povećanje početne mase kofeina u polimernim nosačima i sa 0% i sa 100% neutralizacije MAA, nije uticalo na izgled FTIR spektara, a dobijeni spektri su identični uzorcima sa početnom masom kofeina od 0,2 g, kao što se može videti na Slici 24. a) i b).



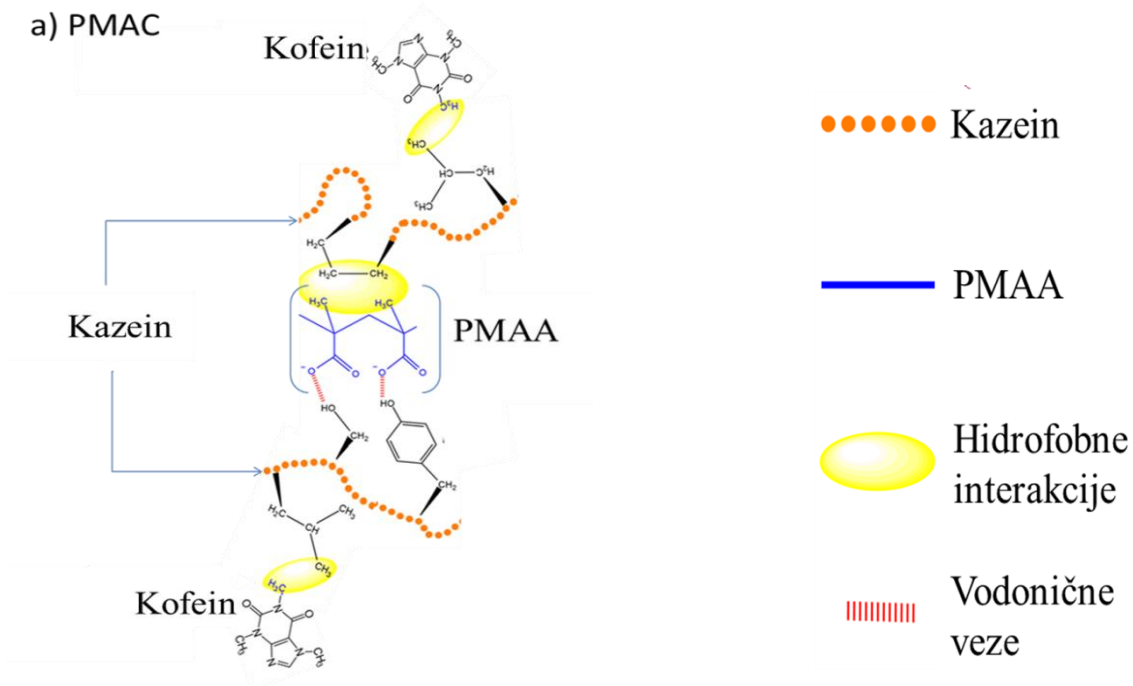
Slika 24. FTIR spektri kofeina, PMAC nosača bez kofeina, PMAC nosača sa kofeinom i PMAC/L nosača sa kofeinom sa: a) 0% neutralizacije MAA i b) 100% neutralizacije MAA

Inkorporacija lipozoma u PMAC uzorke uticala je na pomeranje karakterističnih pikova kazeina: 1235 cm^{-1} , 1398 cm^{-1} i 1452 cm^{-1} na 1245 cm^{-1} , 1388 cm^{-1} i 1444 cm^{-1} , respektivno (Slika 24. a) i b)). Ova pomeranja mogu da ukazuju na uspostavljanje određenih interakcija u PMAC/L uzorku. Naime, pikovi na 1388 cm^{-1} (Slika 24. a) i 1386 cm^{-1} (Slika 24. b) mogu da ukazuju na uspostavljene vodonične veze između lipozoma i kazeina (karbonilna ili -NH grupa amida II proteina i kiseonik iz grupa koje čine hidrofilnu glavu fosfolipidnih nanočestica), dok pikovi na 1244 cm^{-1} , 1446 cm^{-1} (Slika 24. a) i 1245 cm^{-1} i 1444 cm^{-1} (Slika 24. b) mogu da ukazuju na slabe, fizičke interakcije koje su se uspostavile između kazeina i fosfolipida [289].

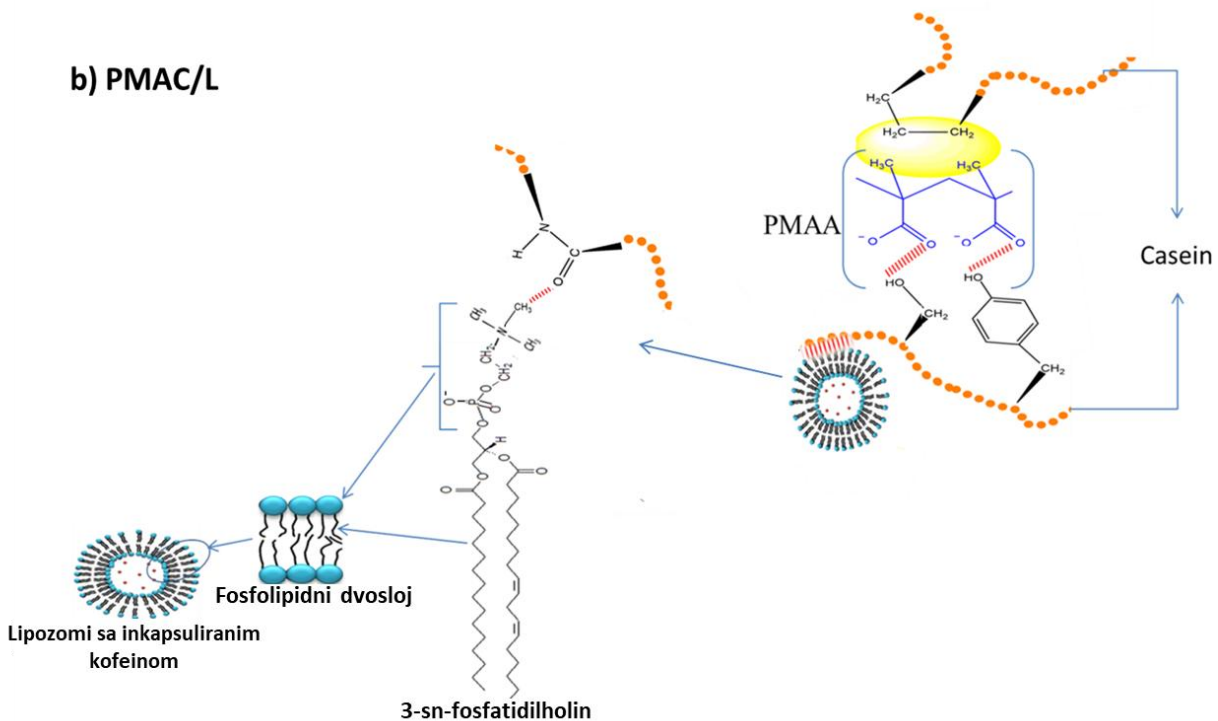
Povećanjem stepena neutralizacije MAA, pik na 1540 cm^{-1} postaje intenzivniji, dok se pik na 1645 cm^{-1} smanjuje zbog prisutnog većeg broja $-\text{COO}^-$ grupa u odnosu na $-\text{COOH}$ grupe [290]. FTIR spektri polimernih nosača sa različitom količinom umreživača, kao i različitom količinom lipozoma izgledaju identično kao i FTIR spektri PMAC-100N i PMAC/L,

respektivno. Na Slici 25. prikazano je moguće formiranje interakcija među komponentama nosača: a) u PMAC nosaču i b) u PMAC/L nosaču.

a) PMAC



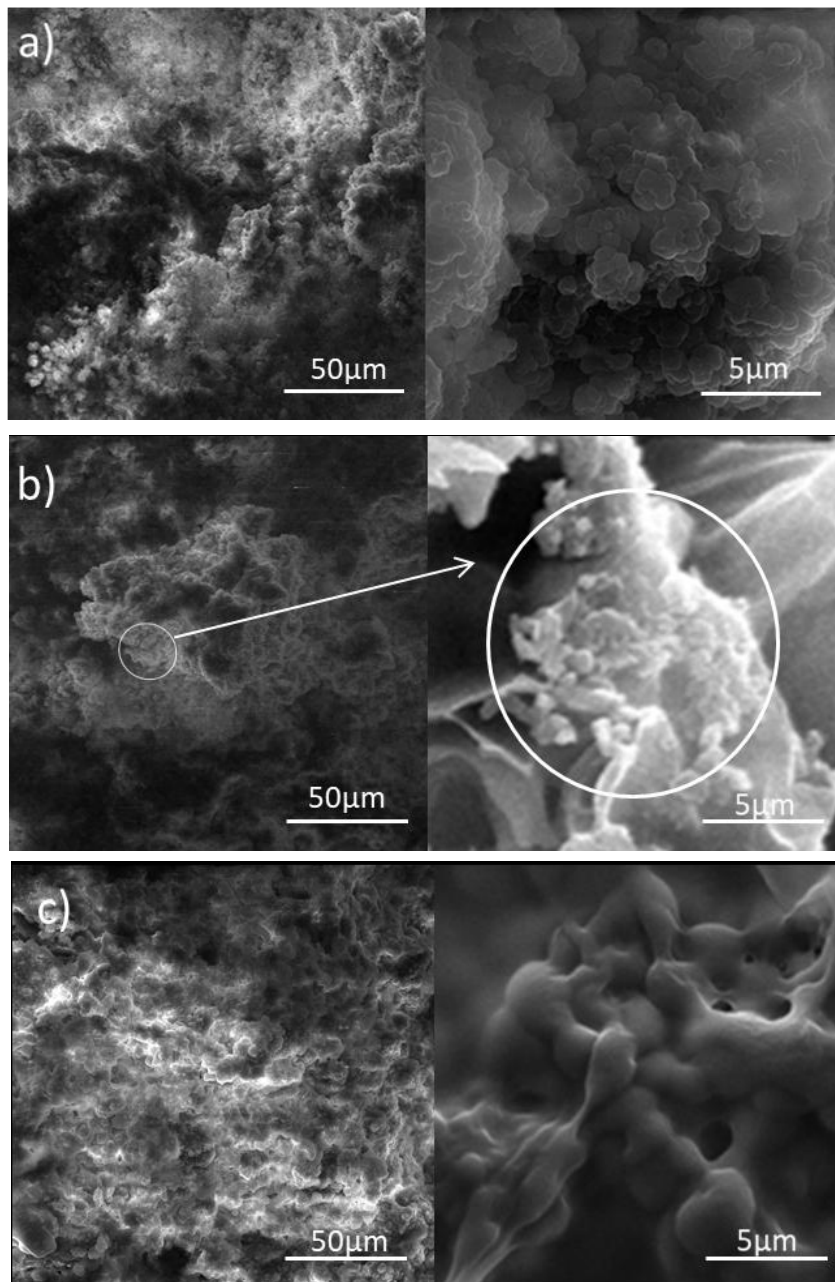
b) PMAC/L



Slika 25. Moguće formiranje interakcija među komponentama nosača: a) u PMAC nosaču i b) u PMAC/L nosaču

4.1.2. SEM analiza PMAC i PMAC/L sistema

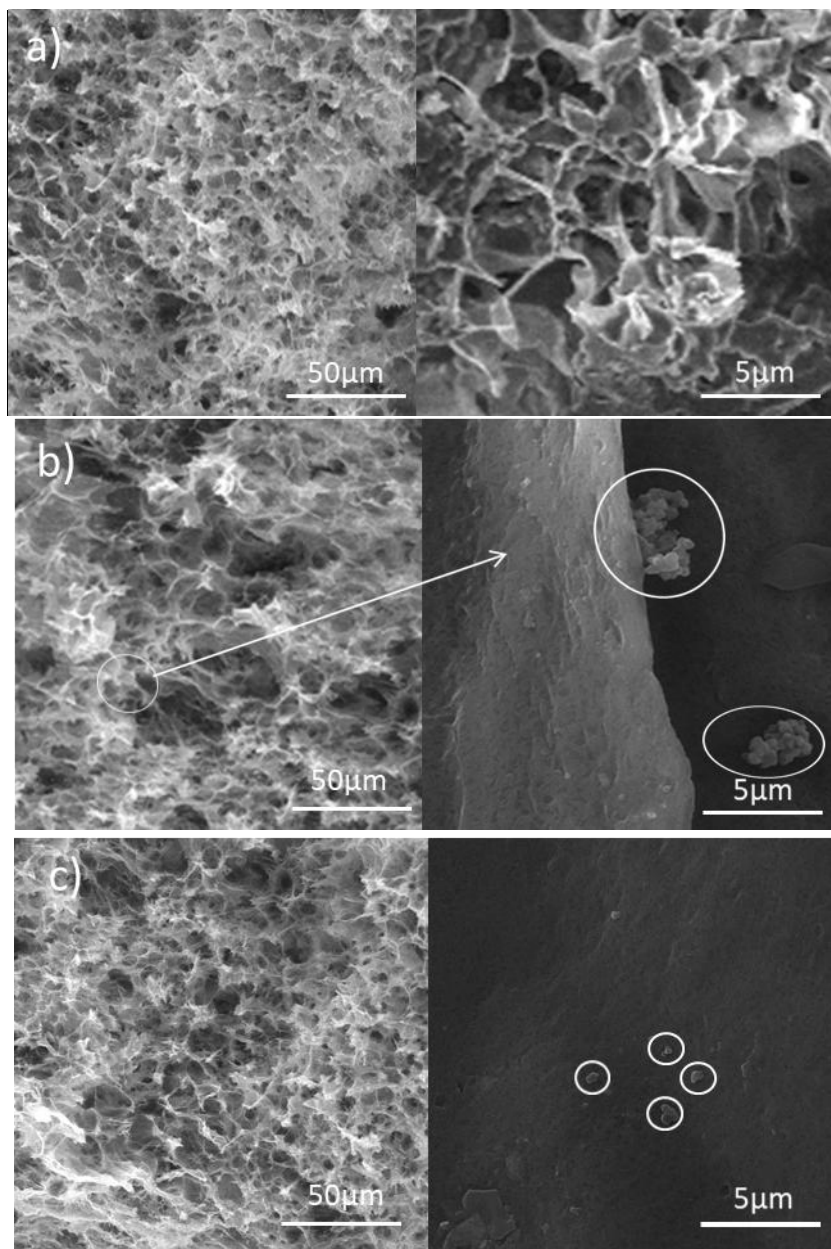
Kako bi se ispitala morfologija sintetisanih PMAC i PMAC/L nosača urađena je SEM analiza reprezentativnih uzoraka. SEM mikrografi liofilizovanih poprečnih preseka PMAC i PMAC/L uzoraka prikazani su na Slikama 26, 27. i 28.



Slika 26. SEM mikrografi a) PMAC-0N-0.2, b) PMAC/L-0N i c) PMAC/Lc-0N nosača

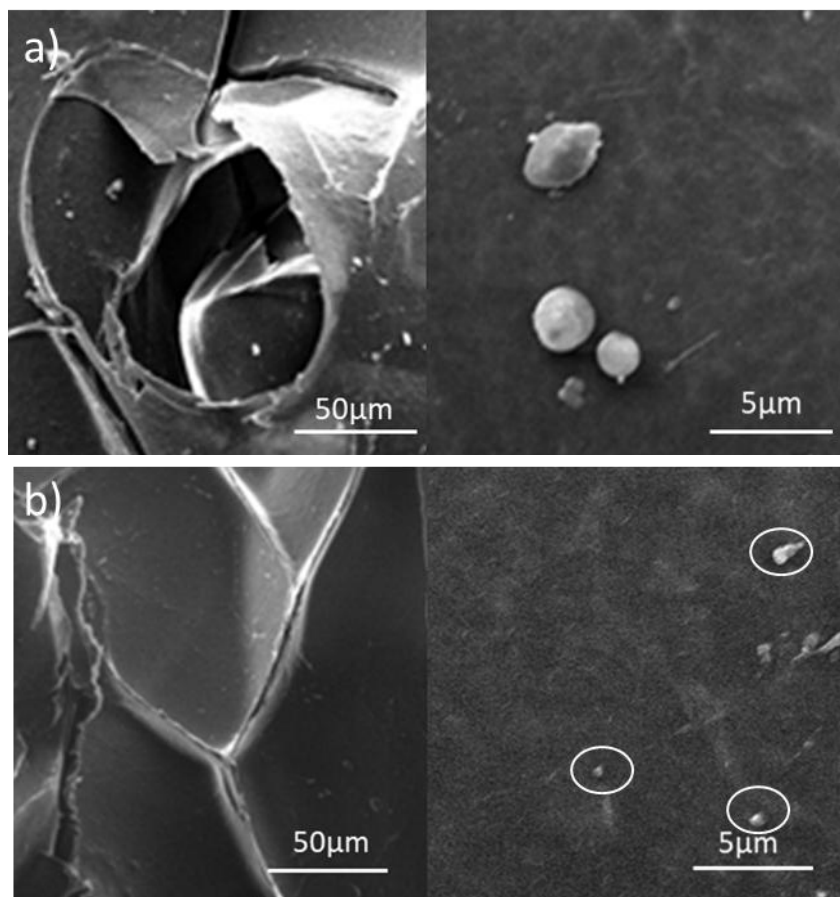
SEM mikrografi PMAC i PMAC/L uzoraka sa 0% neutralizacije MAA (Slika 26. a), b) i c)) pokazali su zrnastu strukturu mreže nosača sa većim micelama kazeina do oko $2\mu\text{m}$ grupisanim u agregate oko kojih se nalazi PMAA. Slika 26. a), za razliku od uzorka sa 100% neutralizacije MAA kod kojih je došlo do disocijacije ovih micela u baznoj sredini tokom sinteze nosača (Slika 26. a), b) i c)). Takođe se može primetiti da PMAC i PMAC/L uzorci sa 0% neutralizacije MAA imaju homogenu strukturu u kojoj nije došlo do izdvajanja domena bogatih kazeinom ili domena bogatih PMAA. Kristale kofeina nije moguće videti, verovatno zato što su okruženi i skriveni kazeinskim micelama. Kod ovog uzorka sa dodatom suspenzijom lipozoma mogu se videti klasteri lipozoma grupisani pored micela kazeina Slika 26. b). Na SEM mikrografu uzorka sa dodatim lipozomima koncentrovanim centrifugiranjem se mogu videti lipozomne čestice ugrađene u samu strukturu nosača zajedno sa kazeinom (Slika 26. c)).

Potpuna neutralizacija MAA je dovela do disocijacije kazeinskih micela što je rezultovalo regularnom poroznom strukturom nosača, koja je i očekivana za hidrogelove (Slika 27. a), b) i c)). Na Slici 27. a), b) i c)) se može uočiti da ovi uzorci imaju 3D mrežu sa nepravilnim rasporedom pora veličine oko $3\mu\text{m}$, što je u skladu sa činjenicom da ovi uzorci brzo bubre i imaju velike stepene bubrenja. Prisustvo lipozoma kod PMAC/L-100N i PMAC/Lc-100N uzoraka potvrđeno je SEM analizom (Slika 27. b) i c)). Lipozomi su uniformno raspoređeni po mreži ovih nosača, a struktura lipozoma je očuvana i nije došlo do njihove fizičke degradacije tokom sinteze nosača i izlaganja lipozoma relativno visokim temperaturama [291]. Kao što se može videti, SEM mikrografi uzorka sa lipozomnom suspenzijom (Slika 27. b)) pokazali su da su lipozomi grupisani u klasterne (dužine oko $5\mu\text{m}$), koji su označeni belim krugovima [274]. Kod uzorka sa lipozomima koncentrovanim centrifugiranjem – PMAC/Lc-100N, mogu se uočiti pojedinačne čestice (prečnika oko 250 nm) u mreži nosača (Slika 27. c)). Ovo bi moglo da bude posledica većeg elektrostatičkog odbijanja između dobijenih pojedinačnih čestica, zbog čega su one stabilnije u odnosu na lipozomnu suspenziju.



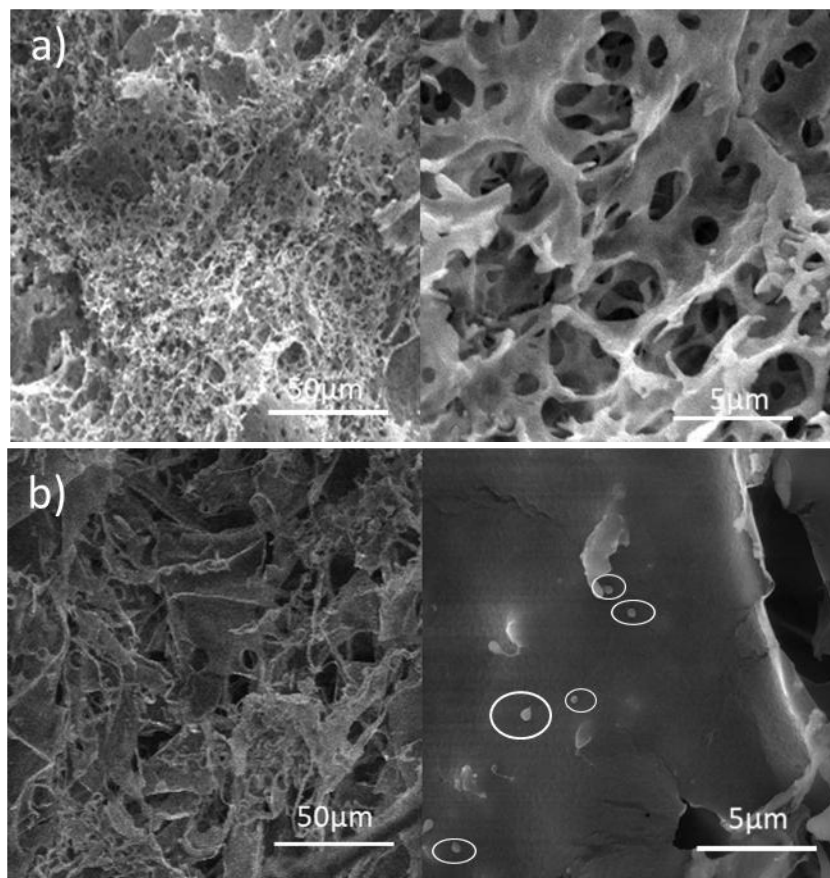
Slika 27. SEM mikrografi a) PMAC-100N-0.2, b) PMAC/L-100N i c) PMAC/Lc-100N nosača

Na Slici 28. a) i b) prikazani su SEM mikrografi uzoraka sa 50% neutralizacije metakrilne kiseline - PMAC-50N-0.2 i PMAC/L-50N. Kod ovog uzorka (Slika 28. a)) se vidi da za razliku od uzorka sa 0% neutralizacije MAA ne postoje veliki agregati micela kazeina, ali ima pojedinačnih micela koje nisu postojale kod uzorka sa 100% neutralizacije MAA (gde su podlele disocijaciji tokom procesa sinteze). Kod uzorka sa 50% neutralizacije MAA gde je dodata lipozomna suspenzija - PMAC/L-50N mogu da se vide pojedinačne čestice lipozoma označene na Slici 28. b).



Slika 28. SEM mikrografi a) PMAC-50N-0.2 i b) PMAC/L-50N nosača

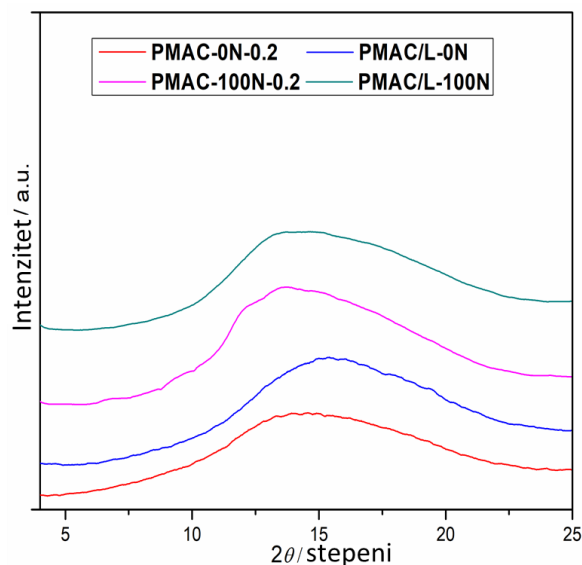
Povećanje koncentracije umreživača (uzorak PMAC-100N-4M-0.2) rezultiralo je umreženom strukturom sa gušćim porama (Slika 29. a)). Kada se ovakvom sistemu doda lipozomna suspenzija, na SEM mikrografu mogu da se uoče fosfolipidne nanočestice raspoređene po mreži PMAC/L-100N-4M-0.2 nosača (Slika 29. b)). Ovim je potvrđeno njihovo prisustvo u nosaču, tj. jasno je da nije došlo do njihove razgradnje tokom procesa sinteze.



Slika 29. SEM mikrografi a) PMAC-100N-4M-0.2 i b) PMAC/L-100N-4M nosača

4.1.3. XRD analiza PMAC i PMAC-L uzoraka

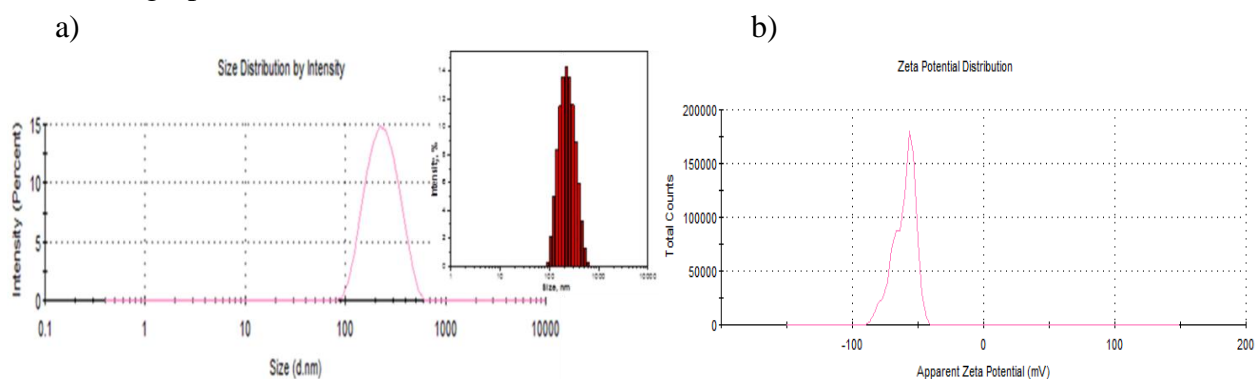
Strukturne osobine PMAC-0N-0.2, PMAC/L-0N, PMAC-100N-0.2 i PMAC/L-100N uzoraka su ispitane i korišćenjem difraktometrije X-zraka. XRD spektri uzoraka prikazani su na Slici 30. Kako dobijeni spektri ne prikazuju pikove koji odgovaraju kristalnoj srukturi, zaključuje se da uzorci imaju amorfnu prirodu. Iz dobijenih spektara se ne mogu izvesti nikakvi dodatni zaključci o strukturi ispitivanih uzoraka.



Slika 30. XRD spektri PMAC-0N-0.2, PMAC/L-0N, PMAC-100N-0.2 i PMAC/L-100N uzoraka

4.1.4. Karakterizacija lipozoma

Dobijena raspodela veličine čestica lipozoma sa inkapsuliranim kofeinom (koncentracija 20 mg/ml), koji su korišćeni za sintezu PMAC/L nosača, predstavljena je na Slici 31. a). Sa grafika se vidi da je dobijena uniformna raspodela čestica sa srednjim prečnikom čestica od 210,8 nm. Ova veličina čestica je bila i čekivana zato što se pro-lipozomnom metodom dobijaju manje čestice usled intenzivnijeg mešanja tokom pripreme lipozomne suspenzije, što dokazuje i mala vrednost indeksa polidisperzibilnosti (PDI=0,149). Određen je i z-potencijal za dobijene lipozome kako bi se utvrdilo koliko su stabilni. Visoka apsolutna vrednost određenog z-potencijala (-61,1 mV) ukazuje da su lipozomi stabilni i da njihova površina ima veliko naelektrisanje. Stoga će i odbijanje između čestica biti veće [292]. Negativna vrednost površinskog z-potencijala ukazuje da je fosfatna grupa bila prisutna na spoljašnjoj strani u odnosu na grupe holina [292].



Slika 31. a) Raspodela veličine čestica lipozoma i b) z-potencijal lipozomnih čestica

4.2. Kinetika otpuštanja kofeina iz sintetisanih PMAC i PMAC/L nosača

Sintetisane su serije PMAC i PMAC/L nosača u kojima je variran neki od parametara sinteze kako bi se ispitao njegov uticaj na stepen inkapsulacije kofeina, bubrenje nosača i kinetiku otpuštanja kofeina.

4.2.1. Uticaj stepena neutralizacije

Variran je stepen neutralizacije MAA (0%, 50% i 100%) u PMAC nosačima kako bi se ispitao njegov uticaj na stepen inkapsulacije kofeina, bubrenje PMAC nosača i kinetiku otpuštanja kofeina. U daljem tekstu prikazana je detaljna analiza uticaja stepena neutralizacije na karakteristike PMAC nosača.

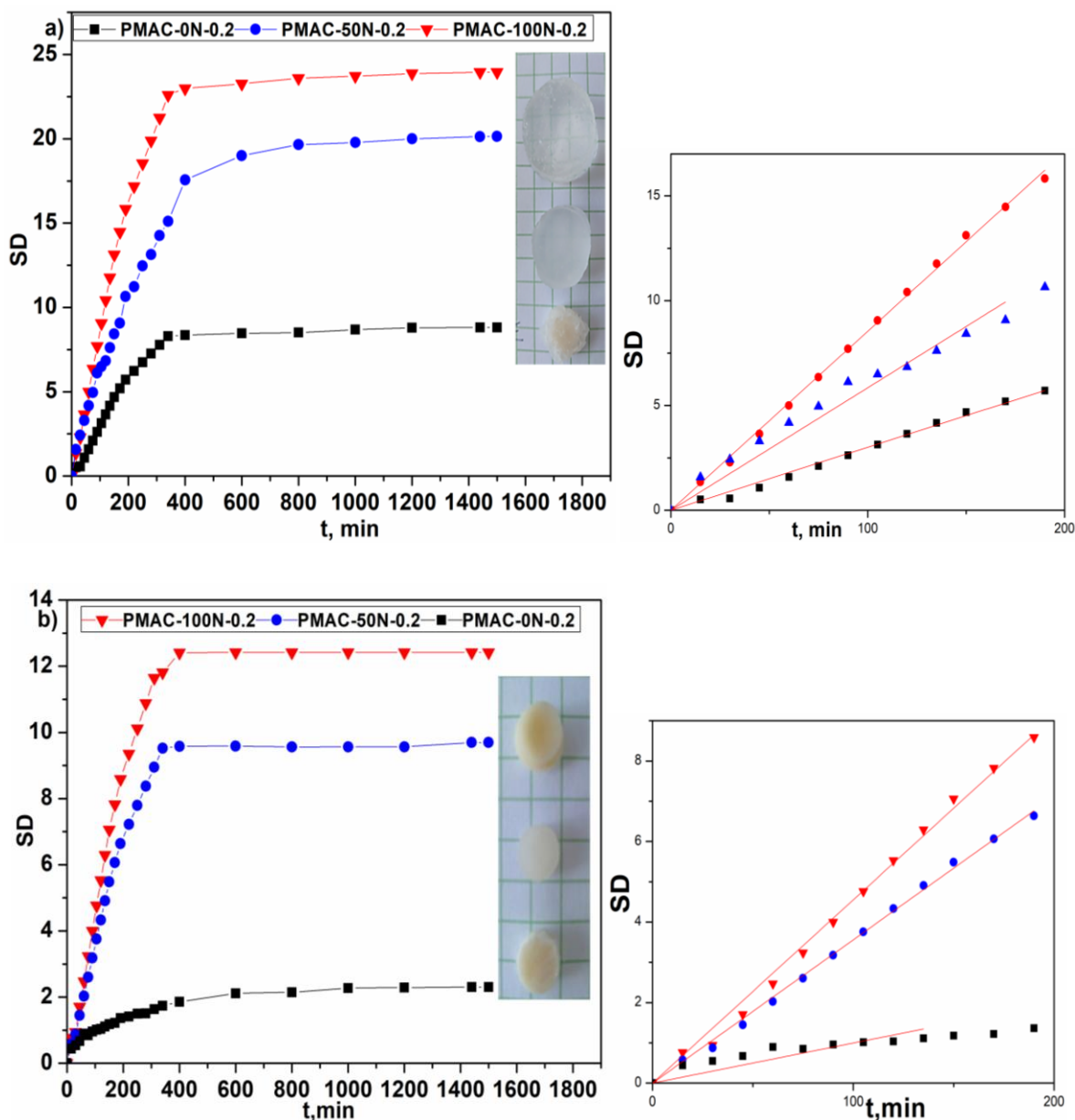
4.2.1.1. Stepen inkapsulacije kofeina

Jedan od osnovnih parametara sistema za kontrolisano otpuštanje aktivnih supstanci predstavlja stepen inkapsulacije te aktivne supstance, zbog čega su određeni stepeni inkapsulacije kofeina u PMAC uzorcima sa različitim stepenom neutralizacije MAA. Uzorci sa 0% neutralizacije MAA i sa 100% neutralizacije MAA imaju 98% i 92% stepena inkapsulacije kofeina, respektivno, a uzorak sa 50% neutralizacije ima 95% stepena inkapsulacije kofeina. Vidi se da sa porastom stepena neutralizacije MAA raste stepen inkapsulacije kofeina što može biti posledica disocijacije kazeinskih micela usled čega hidrofobni delovi kazeina postaju pristupačni za interakciju sa molekulima kofeina.

4.2.1.2. Bubrenje

Proces bubrenja nosača tipa hidrogela odvija se istovremeno sa njegovim putovanjem kroz gastrointestinalni trakt čoveka i otpuštanjem inkapsulirane aktivne supstance, zbog čega je važno ispitati proces bubrenja sintetisanih PMAC nosača. Krive bubrenja PMAC nosača koji su korišćeni za ispitivanje uticaja stepena neutralizacije MAA na bubrenje u obe ispitivane sredine, prikazane su na Slici 32. a) i b) (manji grafici predstavljaju određene nagibe pravih delova odgovarajućih krivih bubrenja korišćenih za izračunavanje vrednosti D_M). Sa grafika se može videti da sa porastom stepena neutralizacije MAA rastu i ravnotežni stepeni bubrenja. Ovo je posledica porasta broja jonizovanog oblika karboksilnih grupa PMAA. Usled toga dolazi i do

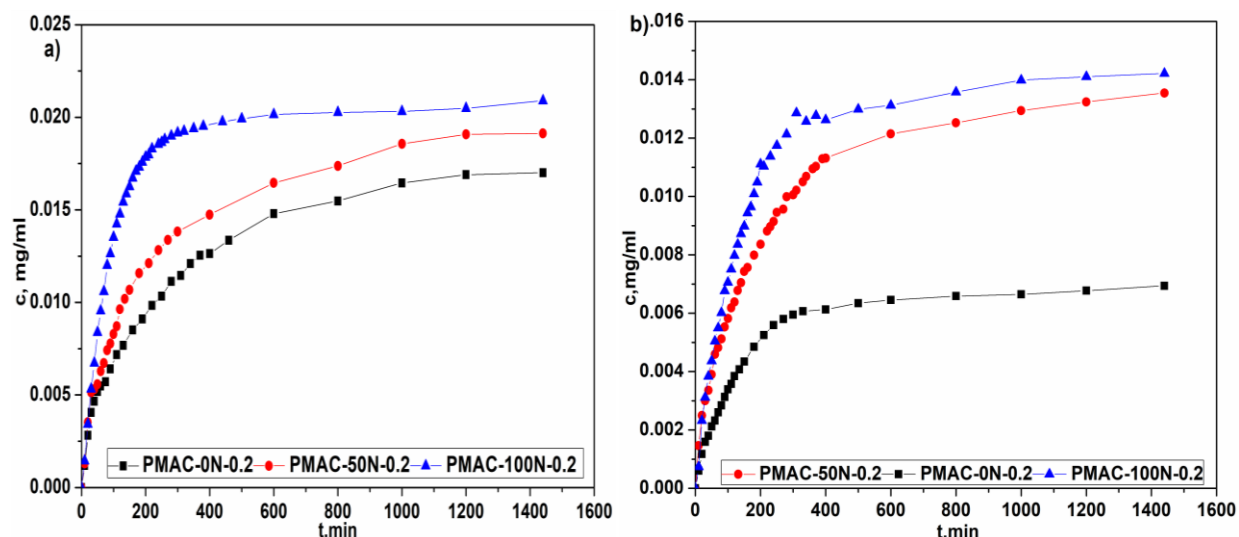
povećanja hidrofilitnosti PMAA mreže i jačeg odbijanja između polimernih lanaca i posledično do većeg bubrenja. Ravnotežni stepeni bubrenja su duplo veći u PB 6,8 nego u 0,1M HCl zato što je pH vrednost PB 6,8 veća od pKa poli(metakrilne kiseline) i pI kazeina, pa obe ove komponente imaju negativno naelektrisanje. Ovo naelektrisanje dovodi do prethodno pomenutog odbijanja polimernih lanaca i povećanog bubrenja PMAC nosača, usled čega rastu i vrednosti ravnotežnog stepena bubrenja u PB 6,8 u odnosu na odgovarajuće vrednosti SDeq u 0,1M HCl.



Slika 32. Krive bubrenja PMAC nosača sa različitim stepenom neutralizacije MAA u: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl

4.2.1.3. Kinetika otpuštanja kofeina iz uzoraka sa različitim stepenom neutralizacije MAA

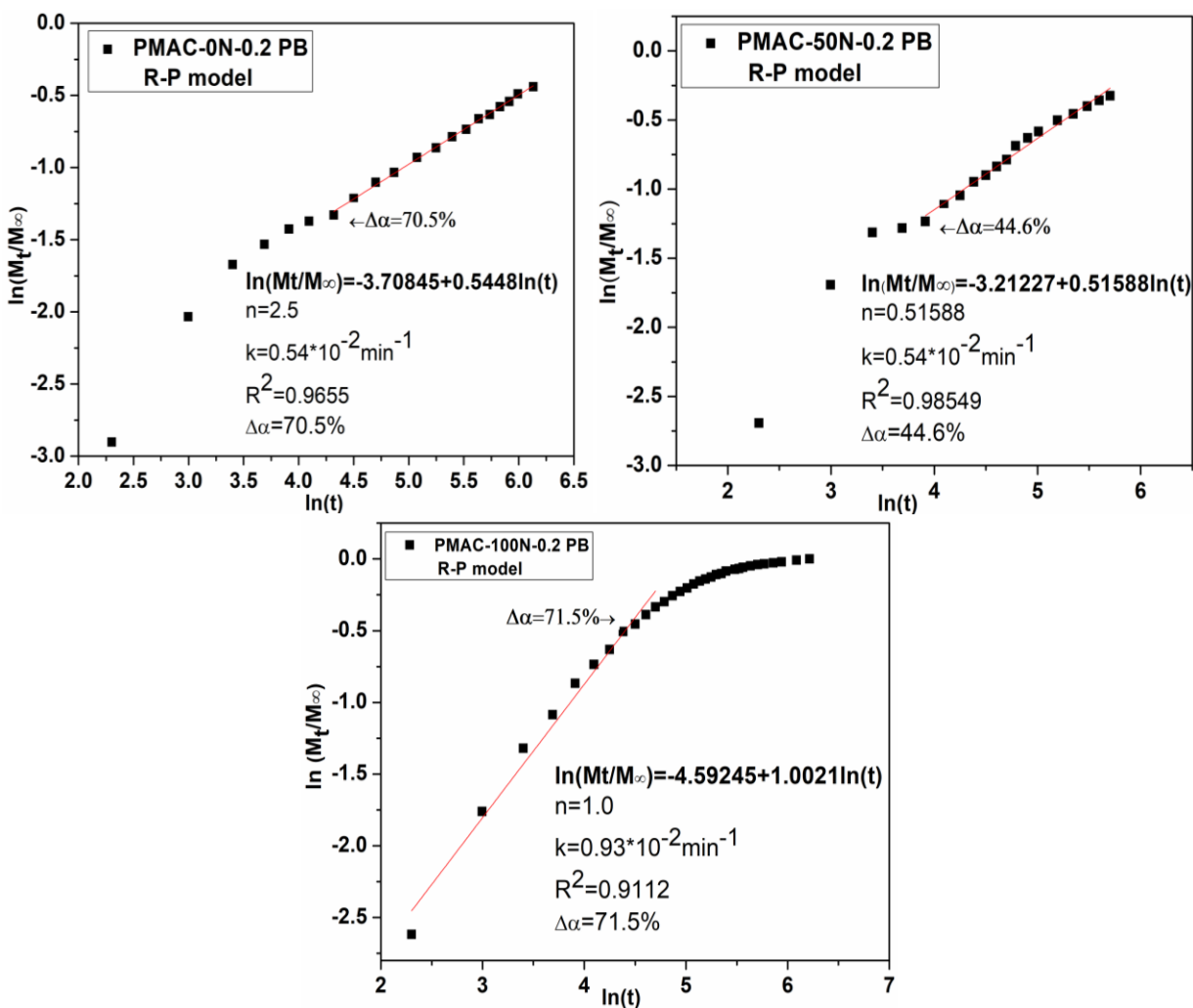
Ispitivanje kinetike otpuštanja aktivne supstance od velike je važnosti u procesu dizajniranja nosača optimalnih karakteristika. Zato je ispitan uticaj jednog od strukturnih parametara - stepen neutralizacije na kinetiku otpuštanja kofeina iz PMAC nosača. Na Slici 33. a) i b) prikazane su krive otpuštanja kofeina iz serije PMAC nosača sa različitim stepenom neutralizacije MAA, u PB 6,8 i 0,1M HCl, respektivno. Može se primetiti da količina otpuštenog kofeina u PB 6,8 raste sa porastom stepena neutralizacije MAA. Dobijeni rezultati su u skladu sa činjenicom da sa porastom stepena neutralizacije dolazi do povećanja količine jonizovanog oblika MAA. U PB 6,8 kome je pH veća od pKa metakrilne kiseline dolazi do generisanja permanentnog negativnog naelektrisanja na kraboksilnim grupama poli(metakrilne kiseline), pa se nastale $-\text{COO}^-$ grupe međusobno odbijaju. Usled toga dolazi do razdvajanja polimernih lanaca, bržeg bubrenja i porasta stepena bubrenja PMAC nosača. Sa porastom stepena bubrenja dolazi i do bržeg otpuštanja kofeina iz sistema.



Slika 33. Krive otpuštanja kofeina iz PMAC nosača - uticaj stepena neutralizacije MAA: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl

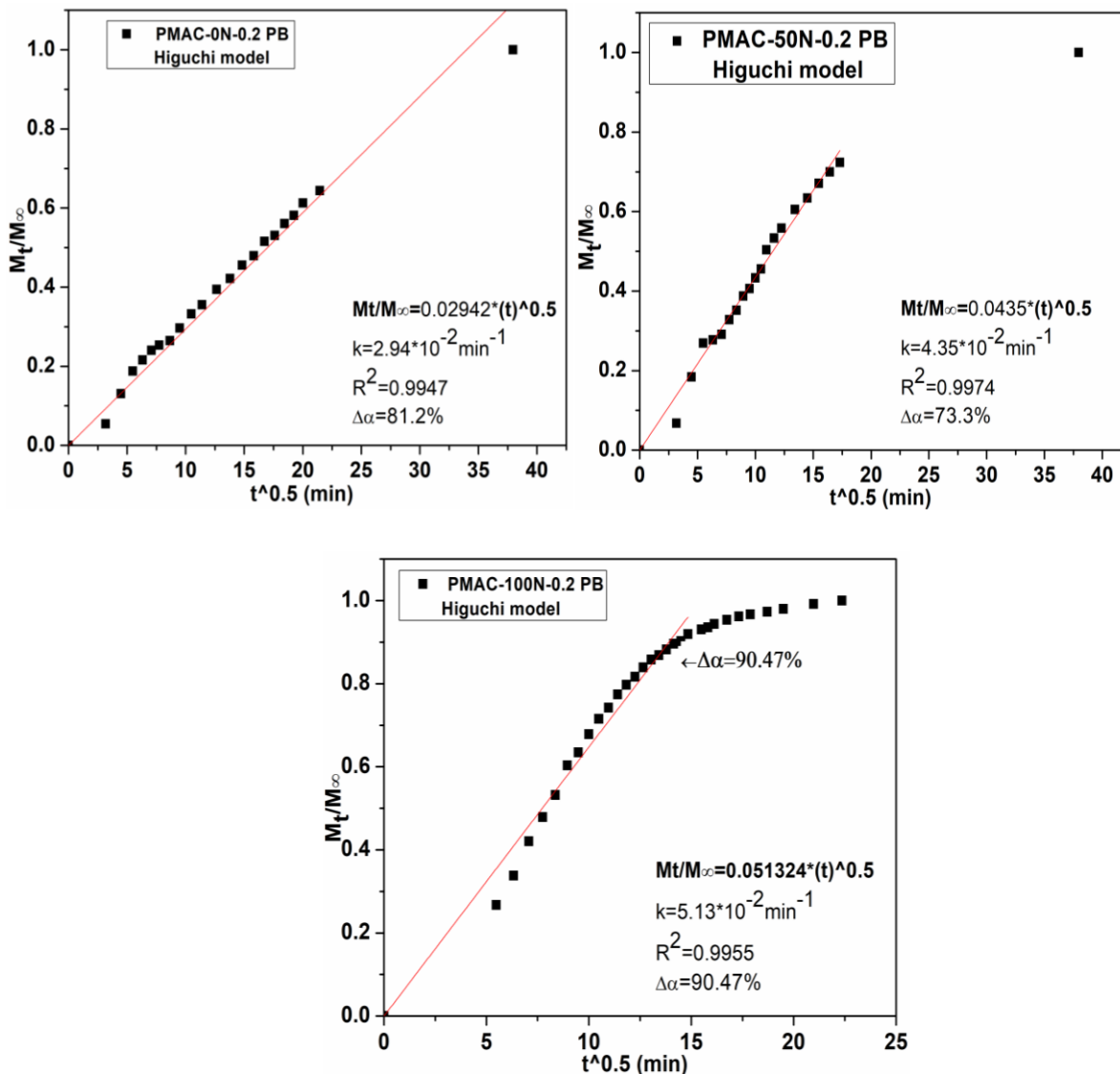
Za analizu kinetike otpuštanja kofeina iz sintetisanih uzoraka za ispitivanje uticaja stepena neutralizacije primenjeni su Rittger-Peppas (R-P) [13], Higuchi [181] i Kopcha model [200], kao i tzv. fitovanje podataka modelima koje su objavili Adnađević i sar [205]. Primena modela prikazana je za otpuštanje kofeina iz svih uzoraka iz ove grupe, zato što su ispitivani uzorci korišćeni za poređenje otpuštanja kofeina sa uzorcima i u drugim serijama za analizu kinetike. Dobijene zavisnosti prikazane su za otpuštanje kofeina u PB 6,8, a zavisnosti koje se odnose na 0,1M HCl su dobijene na isti način i imaju sličan oblik. Primena R-P modela na

podatke dobijene za ove uzorke zasniva se na linearizaciji jednačine (8) i konstrukcije grafika zavisnosti $\ln(M_t/M_\infty)$ - $\ln(t)$ koje su prikazane na Slici 34.



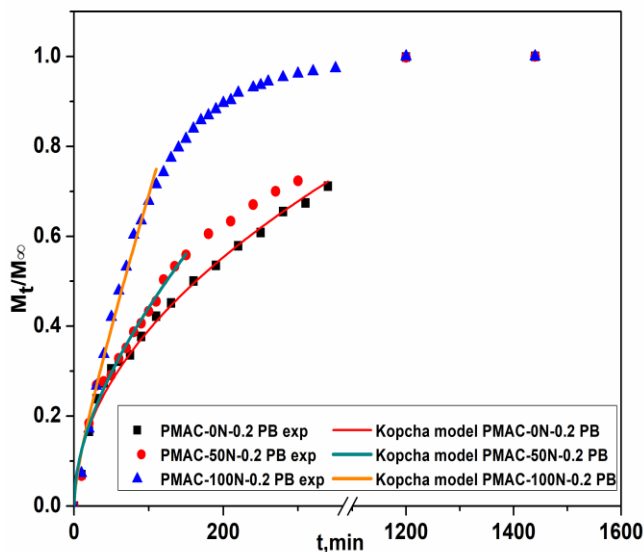
Slika 34. Primena R-P modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitim stepenom neutralizacije MAA u PB 6,8

Higuchi model pretpostavlja da je otpuštanje supstance direktno proporcionalno kvadratnom korenu vremena, pa su prema tome i konstruisane odgovarajuće zavisnosti $(M_t/M_\infty) - (t)^{0.5}$ za otpuštanje kofeina iz svih uzoraka iz ove grupe u PB 6,8 (Slika 35.).



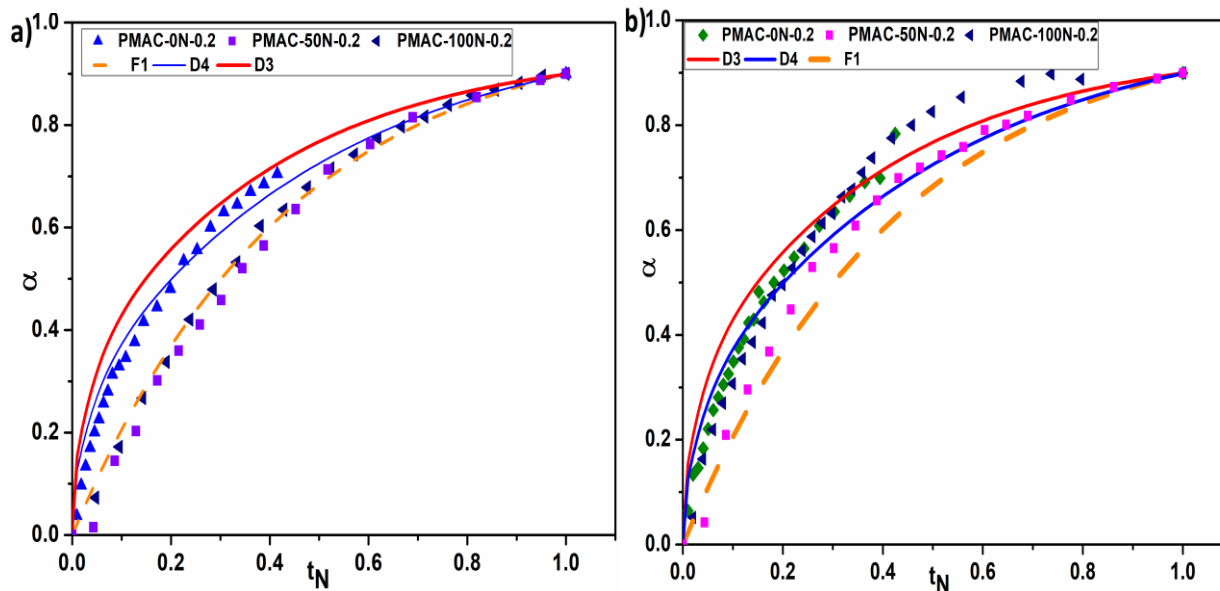
Slika 35. Primena Higuchi modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitim stepenom neutralizacije MAA u PB 6,8

Poklapanje kumulativnih krivih sa Kopcha modelom za uzorke koji su korišćeni za ispitivanje uticaja stepena neutralizacije na otpuštanje kofeina u PB 6,8 prikazani su na Slici 36.

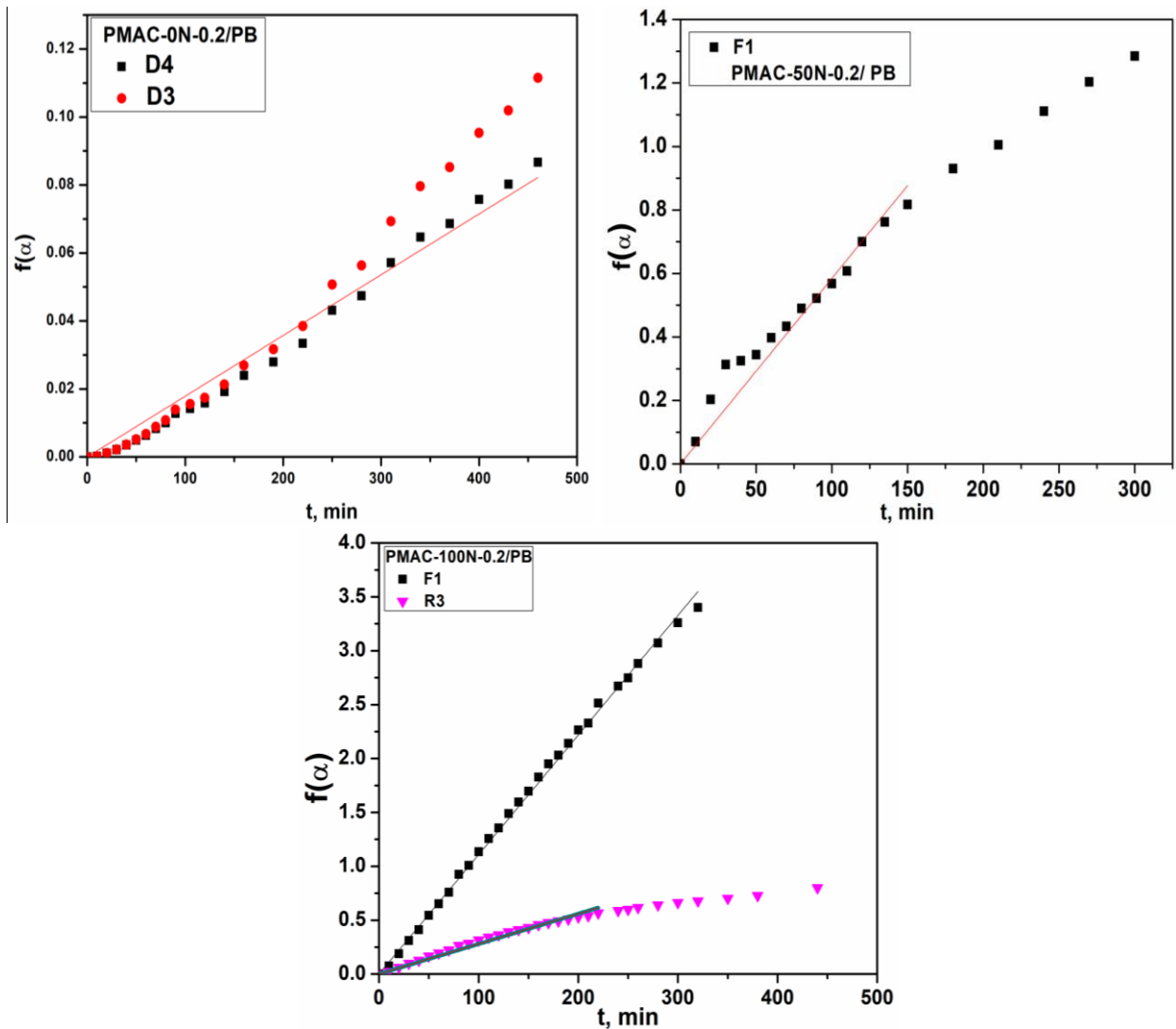


Slika 36. Primena Kopcha modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitim stepenom neutralizacije MAA u PB 6,8

Sa Slika 37. a) i b) se vidi da se primenom model fitting metoda dobijene eksperimentalne krive otpuštanja kofeina poklapaju sa F1 modelom i D modelima. Prema tome treba konstruisati odgovarajuće prave (Slika 38.) na osnovu Tabele 4, pa ukoliko se zaista dobiju pravolinijske zavisnosti onda se otpuštanje kofeina može opisati redom reakcije prvog reda, tj. difuzionim modelima, respektivno.



Slika 37. Poklapanje normalizovanih krivih otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitim stepenom neutralizacije MAA u a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl sa modelima model fitting metoda



Slika 38. Provera odabranih modela na osnovu primene model fitting metoda na krive otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitim stepenom neutralizacije MAA u PB 6,8

Na osnovu prethodno konstruisanih grafika određeni su kinetički parametri i prikazani u Tabeli 5.

Tabela 5. Kinetički parametri dobijeni primenom matematičkih modela na krive otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitim stepenom neutralizacije MAA u PB 6,8 i 0,1M HCl

Model	Uzorak	PMAC-0N-0.2		PMAC-50N-0.2		PMAC-100N-0.2	
		0,1M HCl	PB 6,8	0,1M HCl	PB 6,8	0,1M HCl	PB 6,8
R-P	n	3,0	2,5	0,54	0,52	2,6	1,0
	$k \cdot 10^2$ (min^{-1})	0,540	0,540	3,48	4,03	0,630	0,930
	$\Delta\alpha$ (%)	69,2	70,5	80,8	44,6	90,4	71,5
	R^2	0,940	0,966	0,994	0,986	0,958	0,911
Higuchi	$k_H \cdot 10^2$	3,68	2,94	4,31	4,35	0,402	5,13
	$\Delta\alpha$ (%)	71,1	81,2	83,3	73,3	82,6	90,5
	R^2	0,989	0,985	0,989	0,988	0,976	0,985
Kopcha	$k_1 \cdot 10^2$	3,26	2,81	2,97	2,61	2,62	2,40
	$k_2 \cdot 10^3$	0,24	0,28	1,83	3,87	2,34	4,52
	$\Delta\alpha$ (%)	69,9	70,5	62,6	58,6	58,8	71,5
	R^2	0,989	0,992	0,997	0,998	0,990	0,989
F1	$k_{F1} \cdot 10^2$ (min^{-1})	-	-	0,480	0,585	-	1,10
	$\Delta\alpha$ (%)	-	-	83,3	55,8	-	90,5
	R^2	-	-	0,992	0,986	-	0,998
R3	$k_{R3} \cdot 10^3$ (min^{-1})	-	-	-	-	-	2,80
	$\Delta\alpha$ (%)	-	-	-	-	-	91,9
	R^2	-	-	-	-	-	0,994
D3	$k_{D3} \cdot 10^4$ (min^{-1})	2,50	0,220	-	-	0,710	-
	$\Delta\alpha$ (%)	52,3	44,5	-	-	63,2	-
	R^2	0,916	0,891	-	-	0,923	-
D4	$k_{D4} \cdot 10^4$ (min^{-1})	2,20	1,80	2,92	-	4,90	-
	$\Delta\alpha$ (%)	69,2	44,5	65,1	-	80,0	-
	R^2	0,956	0,959	0,992	-	0,920	-

Iz vrednosti prikazanih u Tabeli 5. vidi se da su koeficijenti koji se odnose na difuziju kofeina iz PMAC-0N-0.2 u obe sredine dobijenih primenom modela Higuchi i Kopcha sličnih vrednosti i istog reda veličine. Vrednosti koeficijenata koje predviđaju difuzioni modeli D3 i D4 su čak za dva reda veličine manje, ali je i slaganje sa ovim modelima takođe manje (R^2 ima manje vrednosti). Kada se radi o uzorcima sa 50% i 100% neutralizacije MAA javlja se razlika u vrednostima koeficijenata, verovatno zato što je prisutna i relaksacija polimernih lanaca, što bi model takođe trebalo da uzme u obzir. Samo su vrednosti koeficijenta R-P i Higuchi modela za uzorak PMAC-50N-0.2 slične kada se radi o procesu difuzije. Vidi se da najbolje slaganje sa eksperimentalnim podacima pokazuje Kopcha model ($R^2 \sim 0.990$), a oblast primene ovog modela je oko 60%. Kopcha model pokazuje da se relaksacija polimernih lanaca jako sporo odvija, pa je njen uticaj na otpuštanje kofeina zanemarljiv, dok su koeficijenti koji se odnose na brzinu relaksacije za jedan red veličine manji od koeficijenata koji se odnose na brzinu odvijanja

difuzije. Kada je reč o ostalim modelima samo podaci dobijeni praćenjem otpuštanja kofeina iz uzorka PMAC-100N-0.2 prate prvi red reakcije, što znači da promena koncentracije kofeina zavisi od njegove početne koncentracije u sistemu [2]. Otpuštanje kofeina iz ovog uzorka se takođe može opisati i modelom R3, koji se odnosi na trodimenziono pomeranje granice faza, tj. kako medijum dolazi do središta diska hidrogela, tako je i sporije otpuštanje kofeina u spoljašnju sredinu. R modeli i F1 model su karakteristični za takozvane deceleratorske procese [293].

Mogućnost primene određenih modela (u prikazanom opsegu) na kinetiku otpuštanja kofeina iz jednog uzorka i nemogućnost primene na kinetiku otpuštanja kofeina iz drugog ispitivanog uzorka, posledica je složenosti ispitivanih sistema, ostvarenih interakcija i uticaja promene ispitivanih parametara sinteze na svojstva sintetisanih nosača.

4.2.1.4. Koeficijent difuzije

Vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja su veće u PB 6,8 i rastu sa porastom stepena neutralizacije MAA (Tabela 6.), što je u skladu sa već pomenutom činjenicom da hidrogelovi na bazi metakrilne kiseline više bubre u ovoj sredini. Takođe, sa porastom stepena neutralizacije opadaju vrednosti koeficijenta difuzije medijuma u nosače. Ovo može biti posledica smanjenja brzine relaksacije polimernih lanaca i transport medijuma u disk hidrogela postaje više „ne-Fikovski” [294, 295]. Vrednosti parametra Kopcha modela koji se odnosi na brzinu difuzije kofeina blago rastu sa smanjenjem stepena neutralizacije MAA i u kiselj sredini i u PB 6,8, a brzina difuzije kofeina u PB 6,8 je nešto manja od brzine difuzije kofeina u kiselu sredinu zbog interakcija koje se uspostavljaju između kofeina i jonizovanih grupa poli(metakrilne kiseline).

Tabela 6. Koeficijent difuzije ispitivanih sredina u PMAC nosače sa različitim stepenom neutralizacije MAA

Uzorak	0,1M HCl			PB 6,8		
	$k_D \cdot 10^2$ (min^{-1})	SDeq	$D_h \cdot 10^6$ (mm^2/min)	$k_D \cdot 10^2$ (min^{-1})	SDeq	$D_h \cdot 10^6$ (mm^2/min)
PMAC-0N-0.2	3,26	2,30	9,79	2,81	8,80	9,38
PMAC-50N-0.2	2,97	9,0	9,12	2,61	20,1	8,29
PMAC-100N-0.2	2,62	12,4	8,74	2,40	23,9	7,30

4.2.2. Uticaj koncentracije umreživača

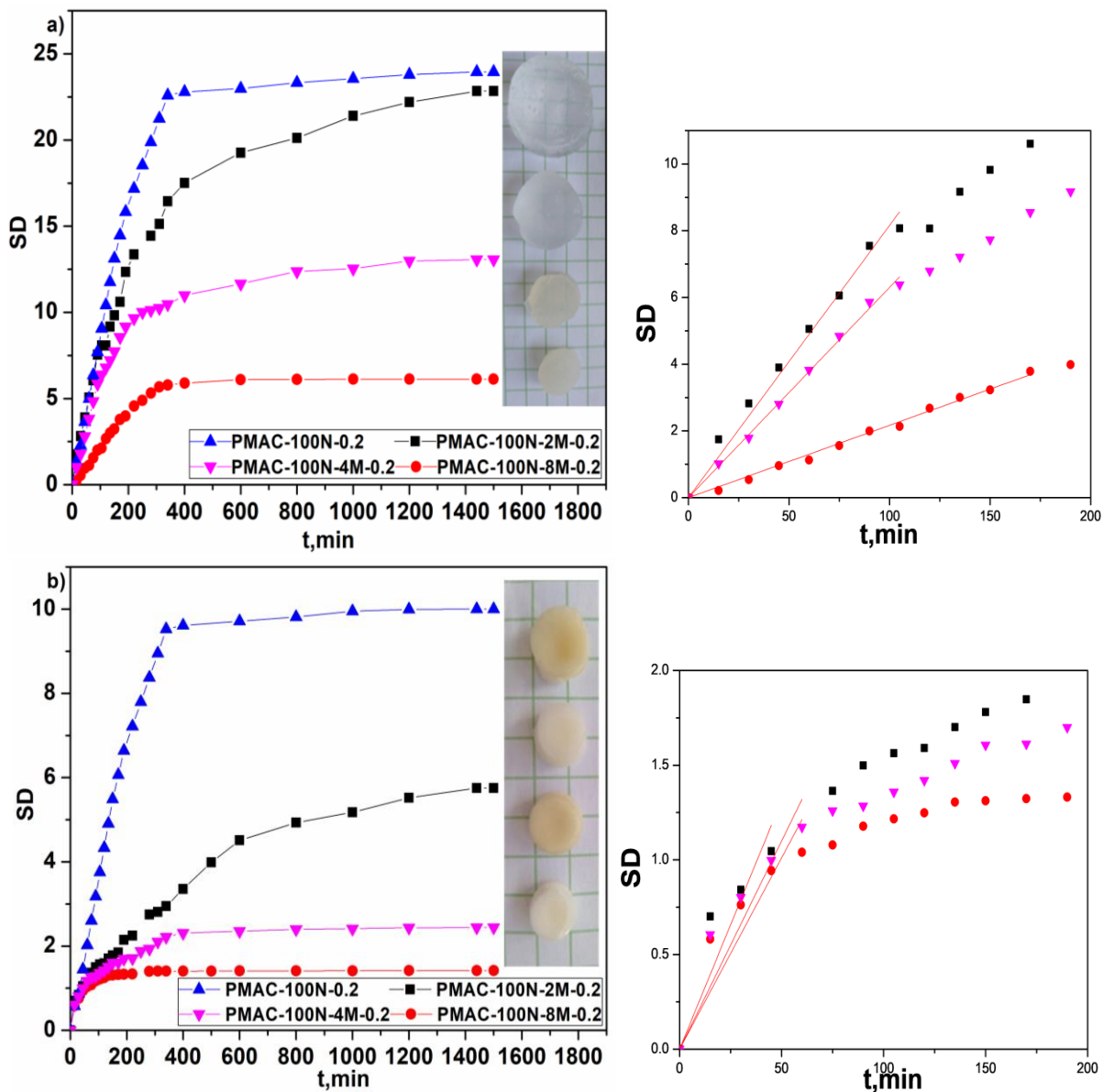
Varirana je količina umreživača u PMAC nosačima (0,4mol%, 0,8mol%, 1,6mol% i 3,2mol% u odnosu na MAA) kako bi se ispitao njegov uticaj na stepen inkapsulacije kofeina, bubrenje PMAC nosača i kinetiku otpuštanja kofeina. U daljem tekstu prikazana je detaljna analiza uticaja koncentracije umreživača na karakteristike PMAC nosača. Podaci za osnovni uzorak - PMAC-100N-0,2, prikazani su u Odeljku 4.2.1.3. i Tabelama 5. i 6.

4.2.2.1. Stepen inkapsulacije kofeina

Određeni su stepeni inkapsulacije za sintetisane nosače sa različitom količinom umreživača. Uzorci PMAC-100N-2M-0,2, PMAC-100N-4M-0,2 i PMAC-100N-8M-0,2 (sa 0,4mol%, 0,8mol%, 1,6mol% i 3,2mol% u odnosu na MAA) imaju 90%, 80% i 50% inkapsulirane količine kofeina, respektivno. Stepeni inkapsulacije opadaju sa porastom stepena umreženja. Sa porastom stepena umreženja polimernog nosača raste i gustina mreže, pa je difuzija kofeina iz nosača otežana zbog čega se ekstrakcionom metodom dobijaju manje vrednosti otpuštenog kofeina u destilovanoj vodi, tj. iz njih određene vrednosti stepena inkapsulacije. Takođe, sa porastom količine inkapsuliranog kofeina u nosaču koji ima 1,6mol% umreživača, opadaju stepeni inkapsulacije: za uzorke PMAC-100N-4M-1 i PMAC-100N-4M-2 iznose 59,5% i 51%, respektivno. Na osnovu dobijenih podataka može se zaključiti da povećanje koncentracije umreživača usporava difuziju kofeina iz PMAC nosača, a na koji način to utiče na bubrenje nosača i kinetiku procesa otpuštanja kofeina u odabranim sredinama detaljno je ispitano u Odeljcima 4.2.2.2. i 4.2.2.3.

4.2.2.2. Bubrenje

Ispitivano je bubrenje sintetisanih polimernih nosača sa različitom koncentracijom umreživača u cilju ispitivanja uticaja stepena umreženja mreže nosača na bubrenje. Sa Slike 39. se vidi da se sa porastom količine umreživača u polimernim nosačima smanjuju ravnotežni stepeni bubrenja, tj. polimerni nosači manje bubre, što je u skladu sa činjenicom da više umreženi sistemi imaju manje pore i manju pokretljivost polimernih lanaca. Takođe se iz krivih bubrenja može videti da su vrednosti stepena bubrenja duplo manje kada polimerni nosači bubre u 0,1M HCl (Slika 39. b)) u odnosu na vrednosti stepena bubrenja kada isti uzorci bubre u PB 6,8 (Slika 39. a)). To je u skladu sa već navedenom činjenicom da ispitivani sistemi više bubre u PB 6,8 zbog većeg odbijanja polimernih lanaca polimerne mreže nosača. Prisustvo 3,2mol% umreživača dovodi do smanjenja vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja PMAC nosača do oko pet puta. Na manjim graficima prikazanim na Slici 39. a) i b) predstavljeni su određeni nagibi odgovarajućih krivih bubrenja.

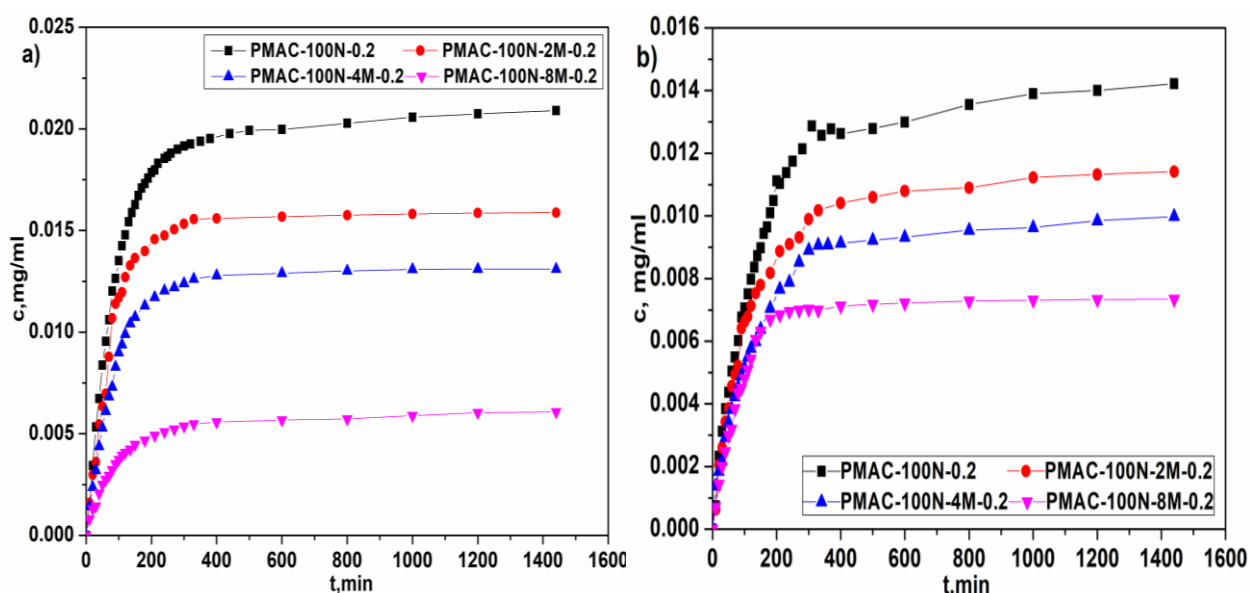


Slika 39. Uticaj koncentracije umreživača na bubrenje PMAC nosača u: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl

4.2.2.3. Kinetika otpuštanja kofeina iz uzoraka sa različitom koncentracijom umreživača

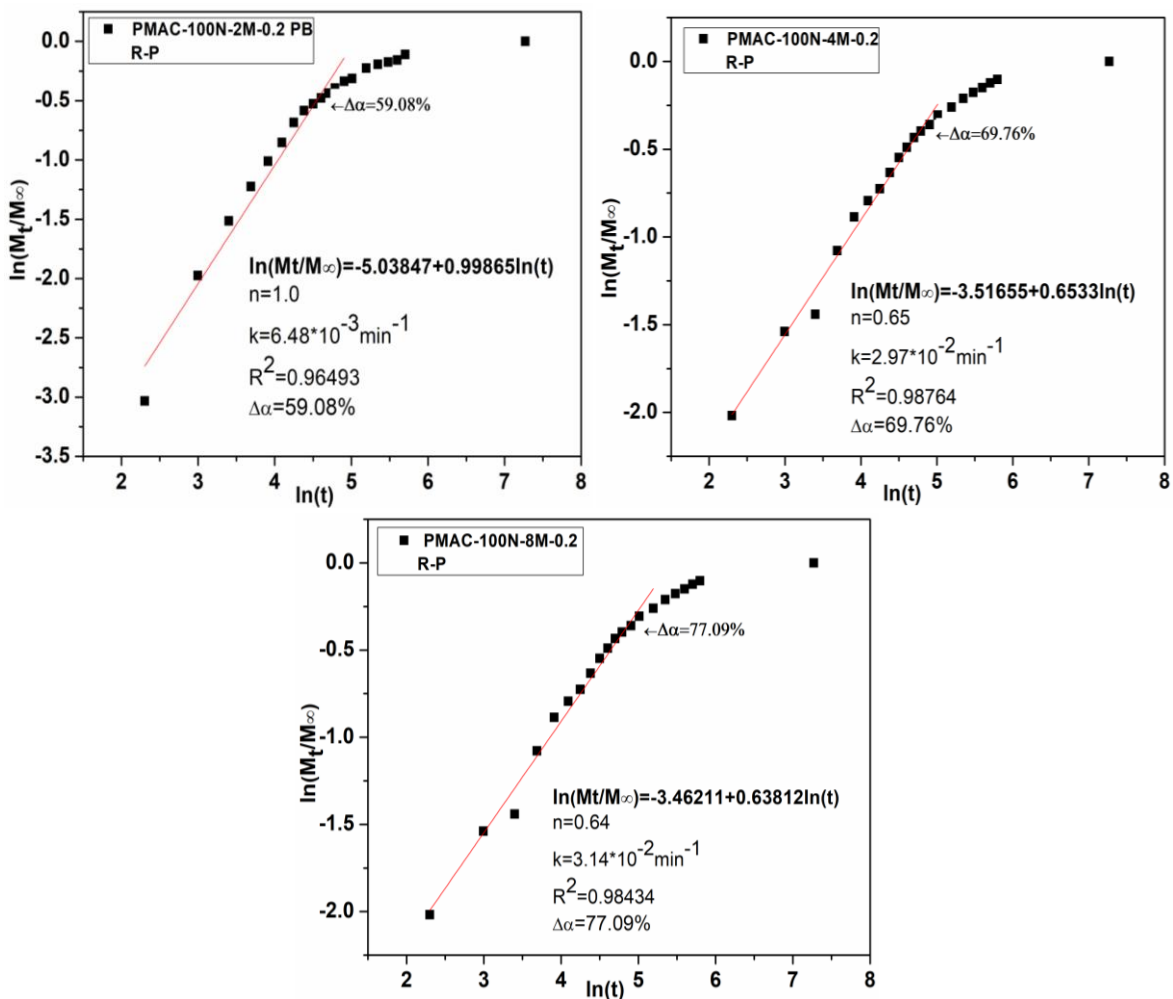
Na Slici 40. prikazane su krive otpuštanja kofeina iz serije uzoraka sa 100% neutralizacije MAA i različitom količinom umreživača (0,4mol%, 0,8mol%, 1,6mol% i 3,2mol% u odnosu na MAA), kako bi se ispitaio uticaj stepena umreženja na otpuštenu količinu i brzinu

otpuštanja model-leka iz posmatranih sistema. Krive otpuštanja su pokazale da se sa porastom količine umreživača u sistemu, usporava otpuštanje kofeina i u PB 6,8 (Slika 40. a)) i u 0,1M HCl (Slika 40. b)). Ponašanje sistema je očekivano s obzirom da se sa porastom stepena umreženja, smanjuje i veličina pora, zbog čega se smanjuje i stepen bubrenja, pa je oslobađanje model-leka otežano. Prisustvo 1,6mol% umreživača dovelo je do oslobađanja oko četiri puta manje količine leka u PB 6,8, dok je u 0,1M HCl oslobođena oko dva i po puta manja količina leka iz ovog nosača u odnosu na osnovni nosač sa 0,4mol% umreživača (PMAC-100N-0,2). Veća količina model-leka otpuštena je u PB 6,8 u odnosu na otpuštenu količinu leka u 0,1M HCl.



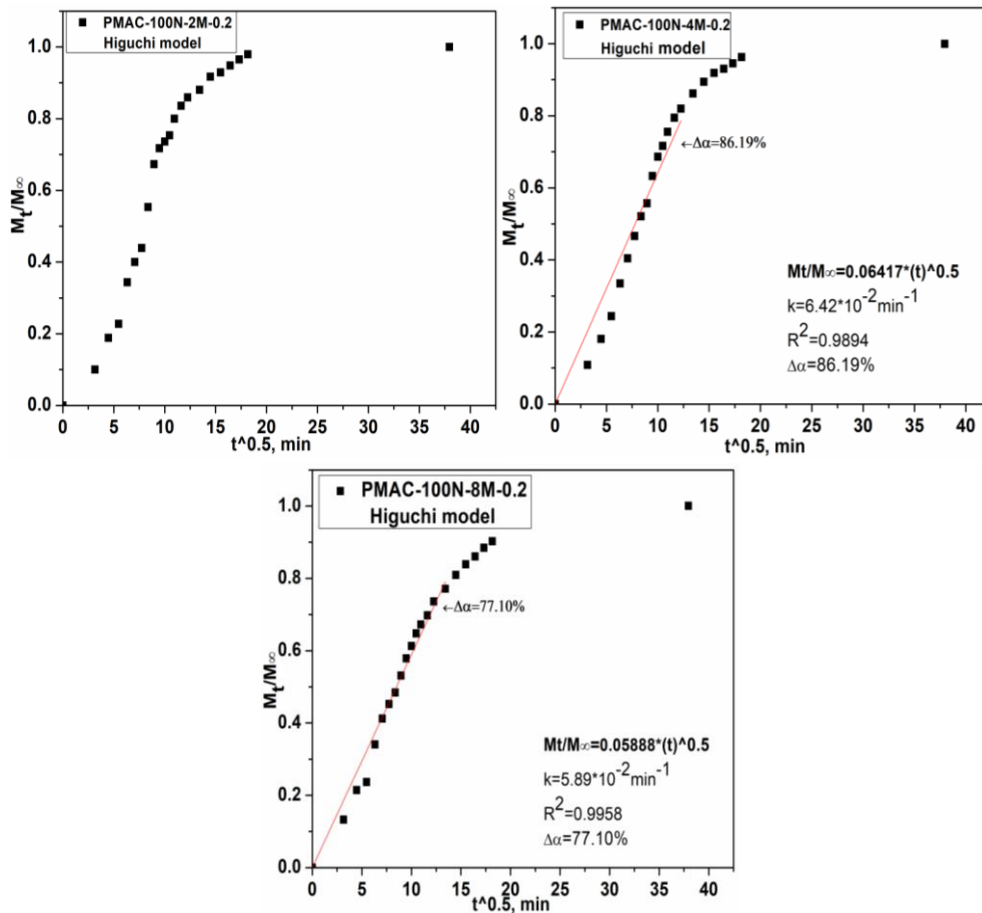
Slika 40. Uticaj koncentracije umreživača na otpuštanje kofeina iz PMAC nosača u: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl

Kinetika otpuštanja kofeina ispitivana je izabranim matematičkim modelima. Grafici svakog modela prikazani su samo za otpuštanje kofeina iz ove grupe uzoraka u PB 6,8, zato što grafici koji se odnose na otpuštanje kofeina u 0,1M HCl imaju sličan oblik. R-P model prikazan je na Slici 41.

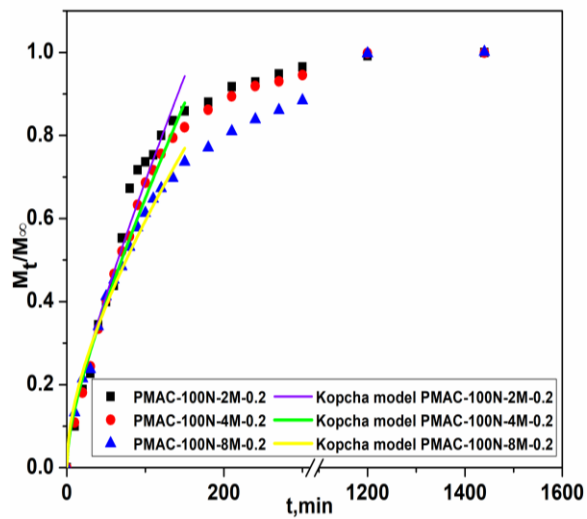


Slika 41. Primena R-P modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom umreživača u PB 6,8

Konstruisani grafici Higuchi modela nalaze se na Slici 42, a Kopcha model primenjen na eksperimentalne podatke koji se odnose na otpuštanje kofeina u PB 6,8 iz svih uzoraka iz ove serije prikazan je na Slici 43.

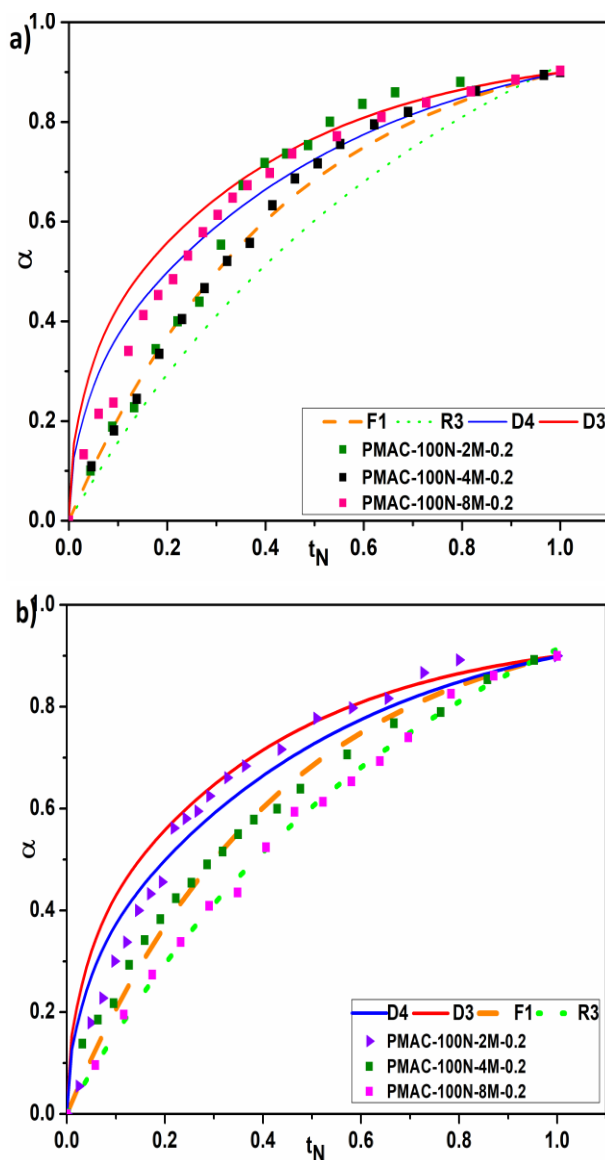


Slika 42. Primena Higuchi modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom umreživača u PB 6,8



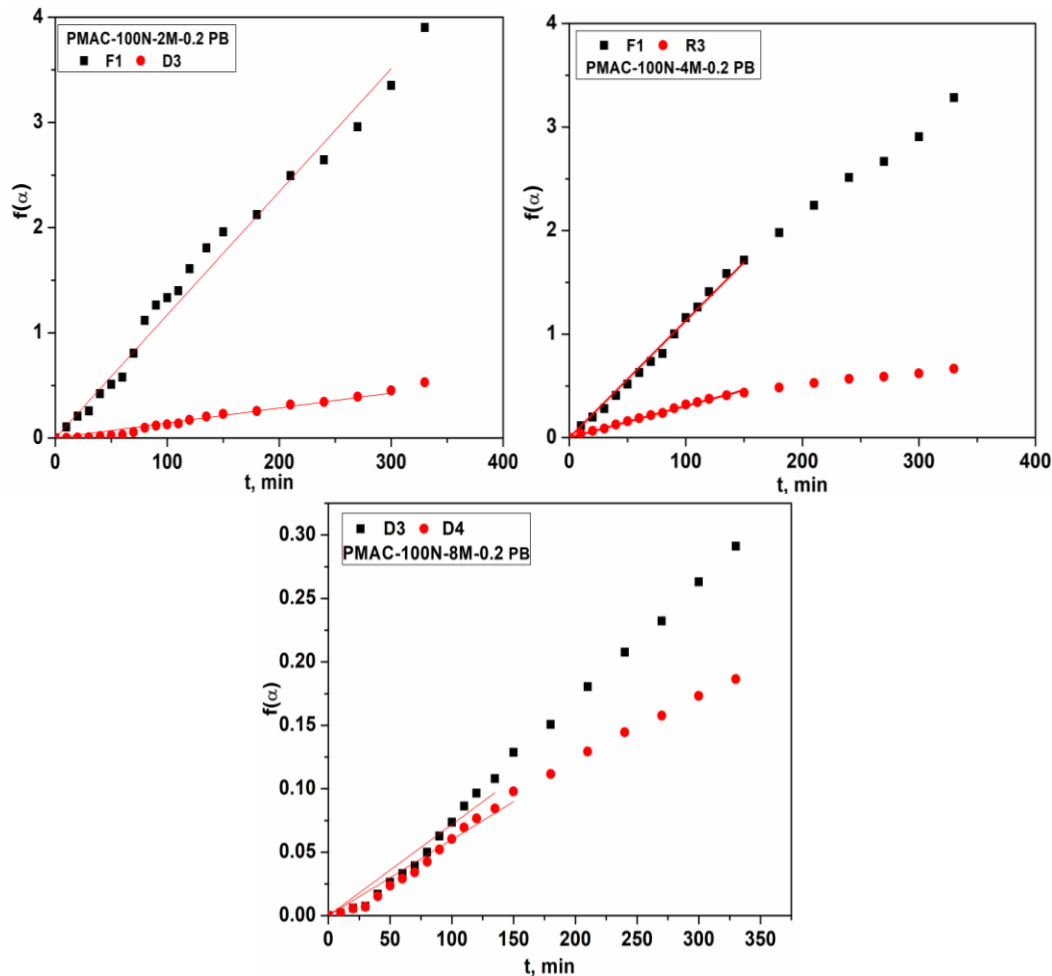
Slika 43. Primena Kopcha modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom umreživača u PB 6,8

Fitovanje podataka metodom koju su objavili Adnađević i sar. prikazano je na Slici 44. a) i b) za otpuštanje kofeina u PB 6,8 i u 0,1M HCl. Sa grafika se vidi poklapanje krivih za uzorke PMAC-100N-2M-0.2 i PMAC-100N-8M-0.2 sa F1 i D modelima, pa bi trebalo proveriti da li ovi modeli opisuju otpuštanje kofeina iz posmatranih uzoraka, dok bi za uzorak PMAC-100N-4M-0.2 trebalo proveriti modele F1 i R3.



Slika 44. Poklapanje normalizovanih krivih otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom umreživača u a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl sa modelima model fitting metoda

Iz dobijenih grafika (Slika 45.) i izračunatih parametara se vidi da je poklapanje sa modelima dobro za prvih 60% otpuštene količine kofeina.



Slika 45. Provera odabranih modela na osnovu primene model fitting metoda na krive otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom umreživača u PB 6,8

Izračunati parametri, kao i oblasti primene primenjenih modela prikazani su u Tabeli 7. Kinetika otpuštanja kofeina u oba medijuma iz uzorka sa 1,6mol% umreživača u odnosu na MAA, može da se opiše modelima R3 i prvim redom reakcije što znači da nije došlo do promene modela u odnosu na modele koji opisuju otpuštanje kofeina iz osnovnog uzorka (PMAC-100N-0,2). Eksperimentalni podaci dobijeni za ostale uzorke iz posmatrane serije mogu da se opišu potpuno drugačijim modelima - difuzionim modelima D3 i D4. R-P model predviđa da se otpuštanje kofeina iz uzorka sa 0,8mol% umreživača odvija samo usled relaksacije polimernih lanaca, međutim slaganje sa prethodnim modelima ukazuje da i difuzija ima uticaja na proces otpuštanja aktivne supstance. Kod ostala dva uzorka predviđanja koje daju R-P model i modeli koje su predložili Adnađević i sar. o mehanizmu oslobađanja kofeina se slažu. Koeficijenti koji su dobijeni Higuchi modelom su viši od odgovarajućih koeficijenata Kopcha modelom koji se odnose na difuziju, a oblasti primene su slične. Iako su vrednosti koeficijenta linearne korelacije - R^2 Higuchi modela nešto veće, ovaj model ne uzima u obzir uticaj relaksacije na otpuštanje kofeina, prema tome kako je slaganje sa Kopcha modelom zadovoljavajuće, i kod ove grupe

posmatranih uzoraka uzeće se vrednosti koeficijenta ovog modela za analizu brzine difuzije kofeina iz posmatrane serije uzoraka.

Tabela 7. Kinetički parametri dobijeni primenom matematičkih modela na krive otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom umreživača u PB 6,8 i 0,1M HCl

Model	Uzorak	PMAC-100N-2M-0.2		PMAC-100N-4M-0.2		PMAC-100N-8M-0.2	
		0,1M HCl	PB 6,8	0,1M HCl	PB 6,8	0,1M HCl	PB 6,8
R-P	n	0.83	1.0	0.57	0.65	0.77	0.64
	$k \cdot 10^2$ (min^{-1})	1,23	0,648	3,60	2,97	1,88	3,14
	$\Delta\alpha(\%)$	62,5	59,1	89,2	69,8	91,4	77,1
	R^2	0,943	0,965	0,991	0,988	0,989	0,984
Higuchi	$k_H \cdot 10^2$	5,22	6,48	5,12	6,42	6,50	5,89
	$\Delta\alpha(\%)$	95,3	55,3	89,2	86,2	77,7	77,1
	R^2	0,993	0,965	0,998	0,989	0,991	0,996
Kopcha	$k_1 \cdot 10^2$	3,89	3,35	4,51	4,30	3,93	4,21
	$k_2 \cdot 10^3$	1,47	3,55	0,530	2,07	2,49	1,81
	$\Delta\alpha$	68,4	83,6	78,9	81,9	91,4	69,8
	R^2	0,971	0,969	0,993	0,977	0,989	0,990
F1	$k_{F1} \cdot 10^2$ (min^{-1})	0,820	1,20	0,723	1,13	1,08	-
	$\Delta\alpha$ (%)	68,4	97,9	69,4	81,9	73,9	-
	R^2	0,997	0,994	0,994	0,998	0,998	-
R3	$k_{R3} \cdot 10^3$ (min^{-1})	-	-	2,12	3,06	3,04	-
	$\Delta\alpha$ (%)	-	-	63,9	81,9	93,2	-
	R^2	-	-	0,988	0,999	0,997	-
D3	$k_{D3} \cdot 10^3$ (min^{-1})	0,615	1,47	-	-	-	0,718
	$\Delta\alpha$ (%)	71,7	96,5	-	-	-	69,8
	R^2	0,972	0,985	-	-	-	0,973
D4	$k_{D4} \cdot 10^4$ (min^{-1})	-	-	-	-	-	5,99
	$\Delta\alpha$ (%)	-	-	-	-	-	69,8
	R^2	-	-	-	-	-	0,985

4.2.2.4. Koeficijent difuzije

Iz Tabele 8. se može videti da vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja opadaju sa porastom količine umreživača u sistemu, tj. sa porastom stepena umreženja, zato što se smanjuju i pore u hidrogelu, pa je i bubrenje otežano [296]. Koeficijenti difuzije medijuma u nosače opadaju sa porastom stepena umreženja, zato što veći stepen umreženja sprečava širenje mreže. Vrednosti koeficijenta difuzije kofeina iz nosača i u kiseljoj sredini i u PB 6,8 opadaju sa porastom stepena umreženja.

Tabela 8. Koeficijent difuzije ispitivanih sredina u PMAC nosače sa različitom koncentracijom umreživača

Uzorak	0,1M HCl			PB 6,8		
	$k_D \cdot 10^2$ (min^{-1})	SDeq	$Dh \cdot 10^5$ (mm^2/min)	$k_D \cdot 10^2$ (min^{-1})	SDeq	$Dh \cdot 10^5$ (mm^2/min)
PMAC-100N-2M-0.2	3,89	5,75	1,65	3,35	22,8	1,00
PMAC-100N-4M-0.2	3,64	2,44	6,38	4,30	13,1	1,83
PMAC-100N-8M-0.2	3,23	1,42	15,9	4,21	6,12	1,98

Može se zaključiti da sa porastom količine umreživača dolazi do usporavanja difuzije kofeina iz nosača i do usporavanja difuzije spoljašnjeg medijuma u nosače.

4.2.3. Uticaj koncentracije kofeina

Varirana je masa kofeina u PMAC nosačima kako bi se ispitao uticaj promene koncentracije inkapsuliranog kofeina na stepen inkapsulacije kofeina, bubrenje PMAC nosača i kinetiku otpuštanja kofeina. U daljem tekstu prikazana je detaljna analiza uticaja koncentracije kofeina na karakteristike PMAC nosača. Podaci za osnovni uzorak – PMAC-100N-0,2 prikazani su u Odeljku 4.2.1.3. i Tabelama 5. i 6.

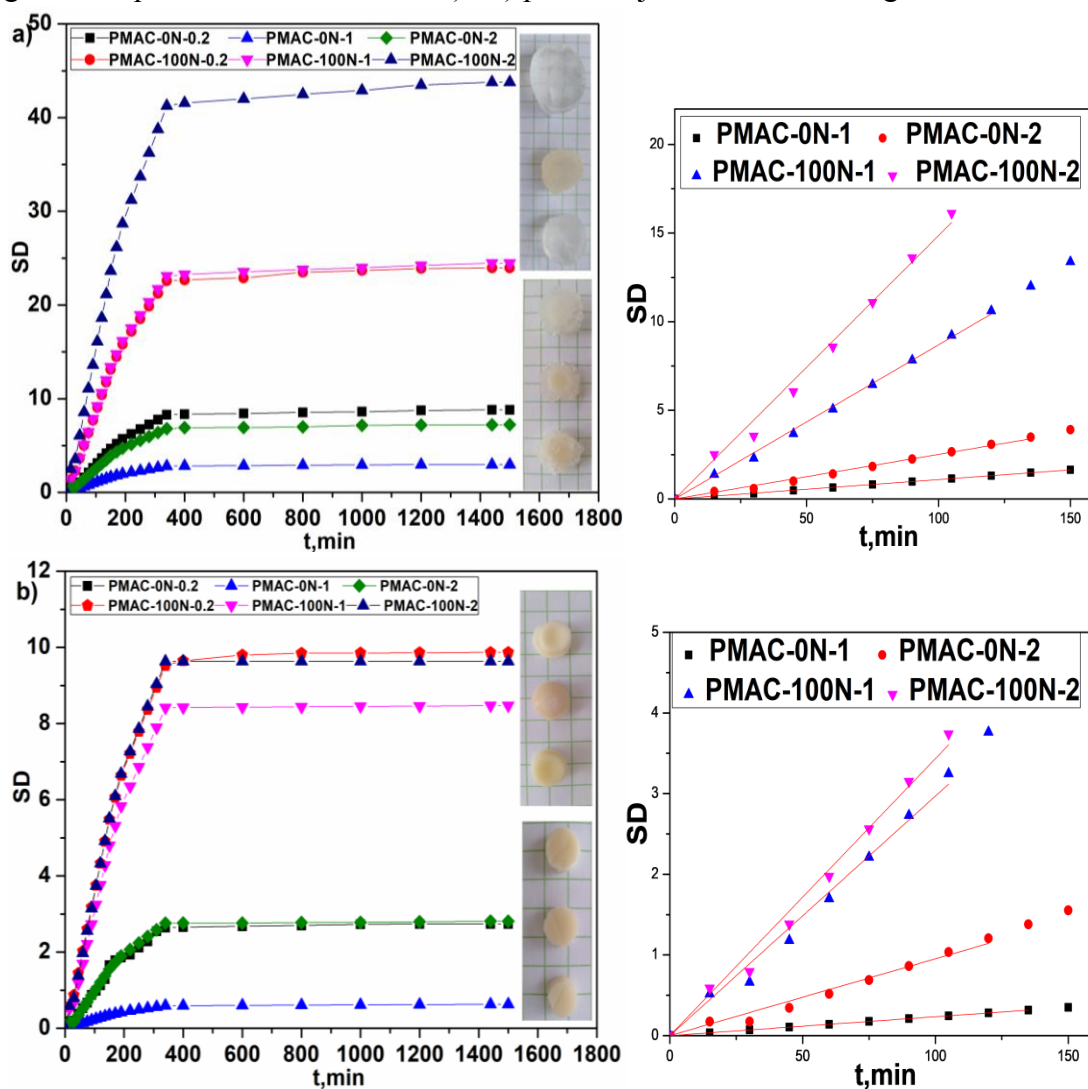
4.2.3.1. Stepen inkapsulacije kofeina

Stepeni inkapsulacije kofeina za uzorke PMAC-0N-1 i PMAC-0N-2 iznose 57,3% i 47%, respektivno, a za uzorke PMAC-100N-1 i PMAC-100N-2 iznose 81,1% i 65%, respektivno. Može se zaključiti da sa porastom količine kofeina u oba sistema (i sa neneutralizovanom i sa potpuno neutralizovanom MAA) opadaju stepeni inkapsulacije verovatno zbog izdvajanja određene količine kofeina blizu površine nosača tokom sinteze, i da verovatno ta količina predstavlja najveći deo oslobođene količine kofeina. Trend opadanja stepena inkapsulacije kofeina sa porastom količine kofeina vezanog za protein, takođe su objavili Y. Guo i sar [297].

4.2.3.2. Bubrenje

Na Slici 46. a) i b) su prikazane krive bubrenja nosača sa neneutralisanom i sa potpuno neutralisanom MAA sa različitim količinama kofeina. Sa grafika se vidi da u PB 6,8 sistemi kod kojih je MAA neneutralisana, PMAC-0N-1 znatno manje bubri u odnosu na osnovni uzorak sa 0,2 g kofeina – PMAC-100N-0,2 (Slika 46. a)). Ovo je verovatno posledica uspostavljanja određenih interakcija između kofeina i metakrilne kiseline, usled čega je difuzija spoljašnjeg medijuma u mrežu polimernog nosača otežana. Sa daljim porastom količine kofeina u sistemu ne

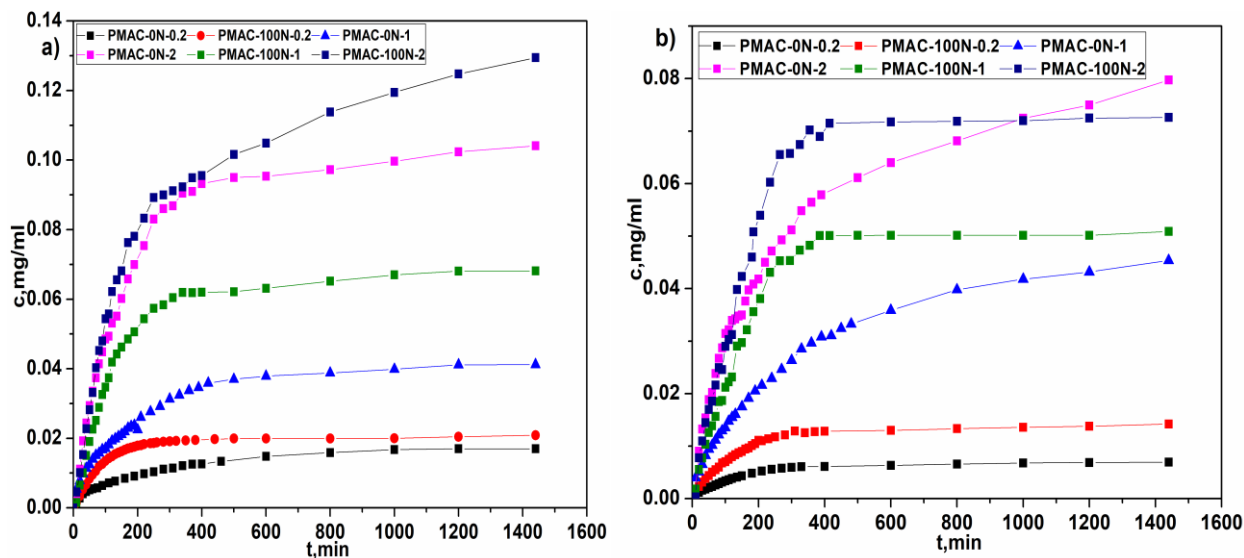
uočava se promena u bubrenju, krive bubrenja PMAC-0N-2 i osnovnog uzorka PMAC-0N-0.2 su slične (Slika 46. a)). Moguće da je ova količina model-leka u sistemu prevelika i da je veliki deo kofeina blizu površine, pa ne usporava difuziju spoljašnjeg medijuma u polimernu mrežu. Isti trend bubrenja se javlja i u 0,1M HCl kod sistema sa 0% i sa 100% neutralizacije (Slika 46. b)). Sistemi sa 100% neutralizacije MAA u PB 6,8 imaju visoke vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja zbog odbijanja polimernih lanaca mreže, a samim tim i lakše difuzije spoljašnjeg medijuma u polimerni nosač. Sa povećanjem količine kofeina u ovom sistemu ne dolazi do promene bubrenja, međutim kada se u sistemu nalazi najveća količina kofeina - 2g ovaj sistem najviše bubri u PB 6,8. Razlog za ovakvo ponašanje je već pomenuta pretpostavka da se izdvaja određena količina kofeina blizu površine [297], a usled odbijanja lanaca i manje količine leka u samoj mreži nosača olakšana je difuzija spoljašnjeg medijuma u unutrašnjost nosača. Na manjim graficima prikazanim na Slici 46. a) i b) predstavljeni su određeni nagibi krivih bubrenja.



Slika 46. Krive bubrenja PMAC nosača sa različitom koncentracijom kofeina u: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl

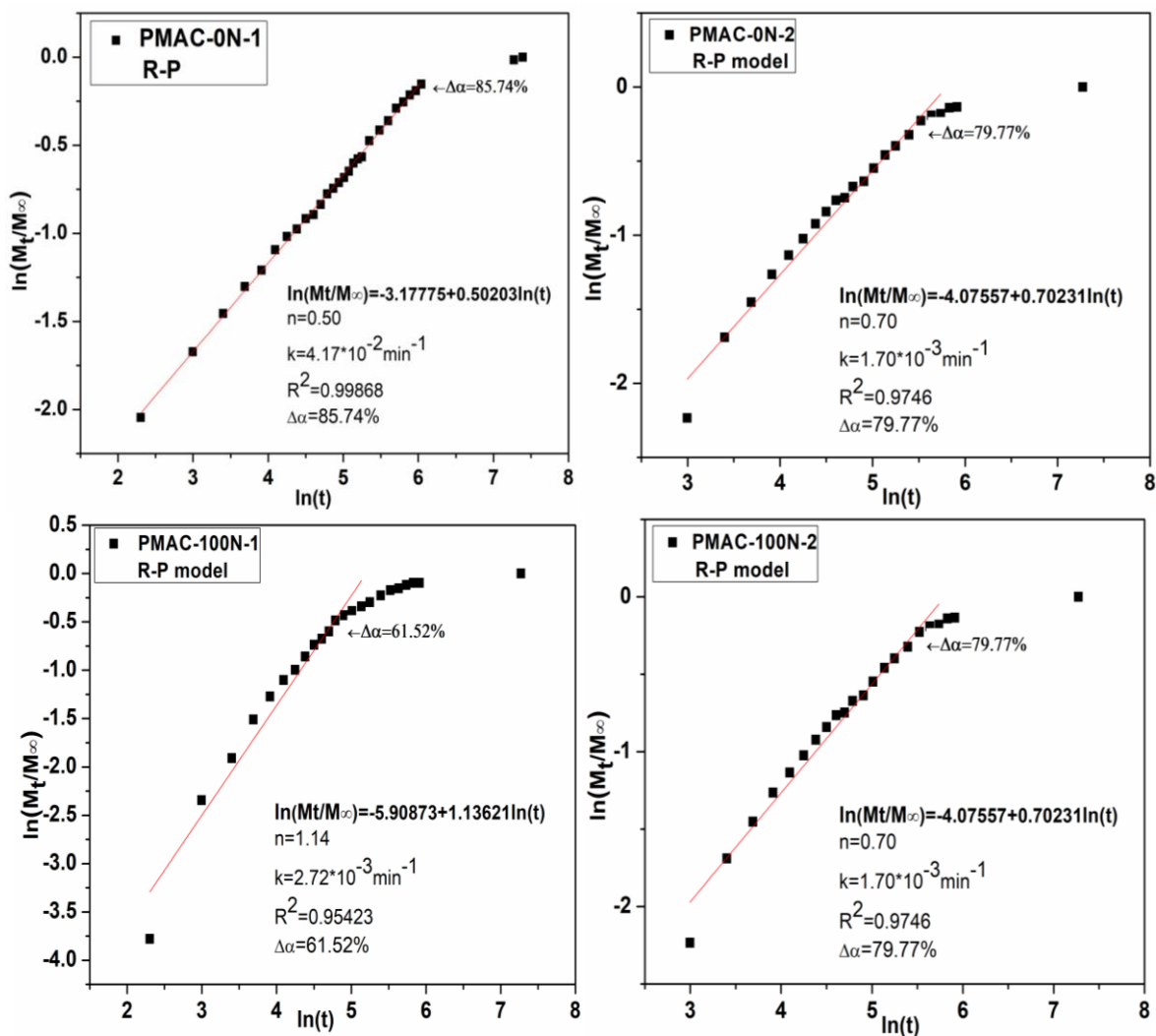
4.2.3.3. Kinetika otpuštanja kofeina iz uzoraka sa različitom koncentracijom kofeina

Dobijene krive otpuštanja model-leka (Slika 47.) iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom kofeina pokazuju očekivano ponašanje nosača - sa porastom koncentracije kofeina u sistemu dolazi i do njegovog bržeg otpuštanja i u PB 6,8 (Slika 47. a)) i u 0,1M HCl (Slika 47. b)).



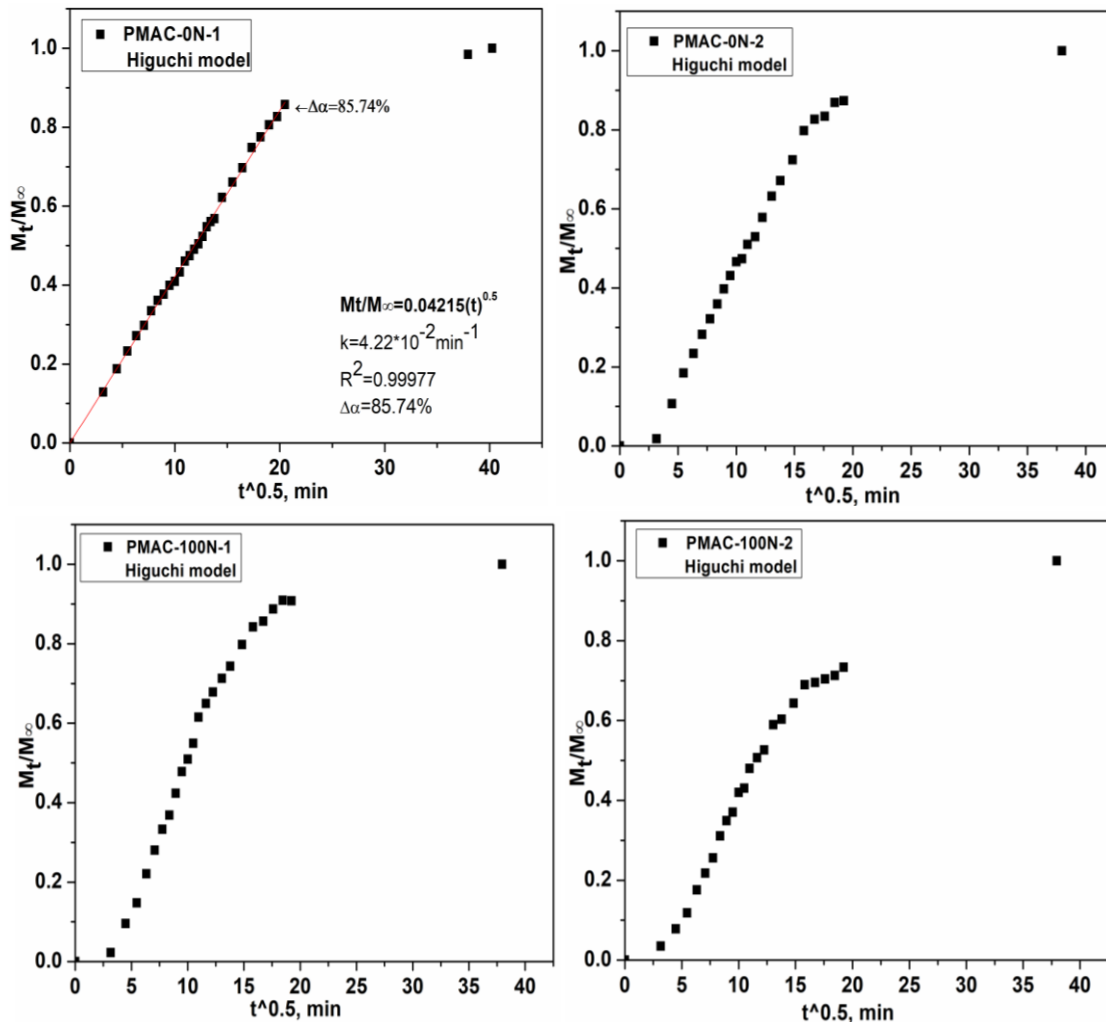
Slika 47. Krive otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom kofeina u: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl

Kada se u sistemu nalazi deset puta veća količina kofeina, na početku otpuštanja dolazi do naglog oslobađanja aktivne supstance, tzv. „burst” efekta koji je još izraženiji u kiseloj sredini (Slika 47. b)). U kiseloj sredini dolazi do taloženja kazeina, usled čega nosač postaje kompaktniji, pa bi se očekivalo da otpuštanje kofeina bude oteženo, međutim moguće je da usled micelarizacije kazeina u pojedinim oblastima u nosaču dolazi do slabljenja veza sa kofeinom, pa se on lakše oslobađa. Takođe je objavljeno u naučnoj literaturi da u kiseloj sredini može doći i do raskidanja veza u prolinu i kalcijum-fosfatnih mostova u kazeinskoj strukturi, tako da bi to mogao biti razlog za slabljenje interakcija između kazeina i kofeina [214]. Naglo oslobađanje kofeina u obe sredine se može objasniti time da je najveća količina leka tokom sinteze dospela blizu površine polimernih nosača sa 0% i 100% neutralizacije MAA, pa se ta količina prvo i oslobodila na početku procesa otpuštanja. Takođe se može videti da se oslobađa oko tri puta veća količina kofeina u PB 6,8 (Slika 47. a)).



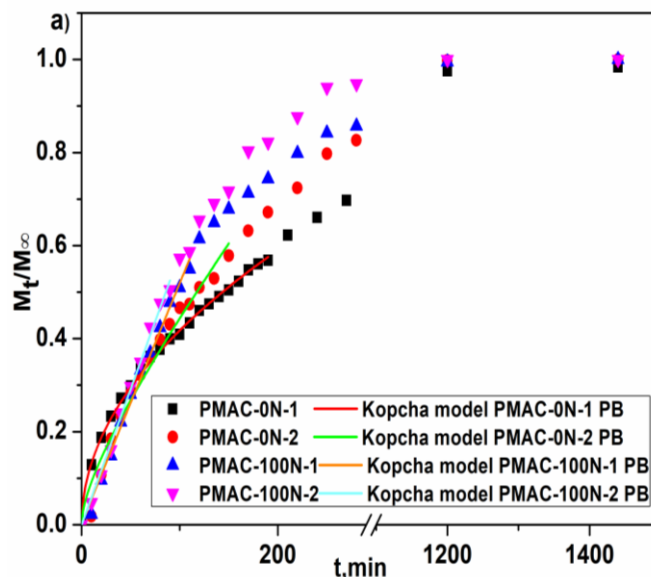
Slika 48. Primena R-P modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom kofeina u PB 6,8

R-P model je kao i u prethodnim serijama uzoraka prikazan samo za otpuštanje kofeina u fosfatni pufer (Slika 48.), kao i Higuchi model (Slika 49.).



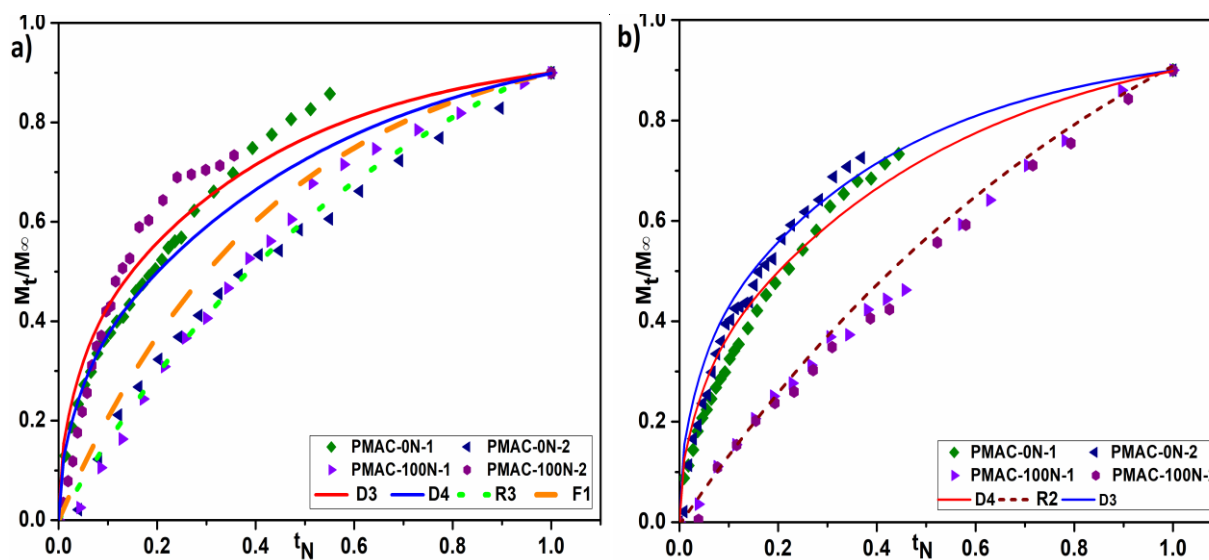
Slika 49. Primena Higuchi modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom kofeina u PB 6,8

Kopcha model za uzorke sa 0% i 100% neutralizacije MAA i različitim koncentracijama kofeina predstavljen je na Slici 50.



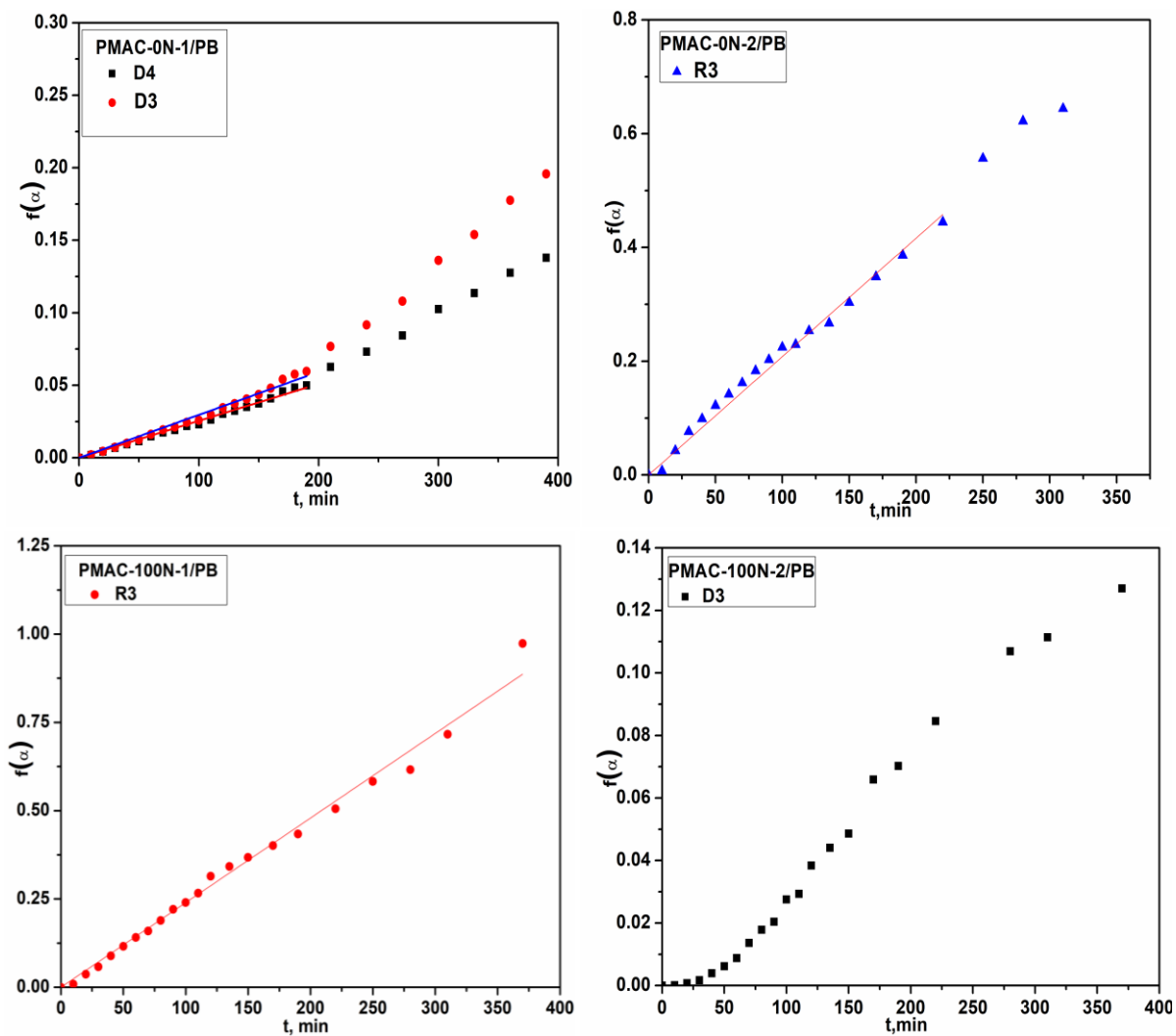
Slika 50. Primena Kopcha modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom kofeina u PB 6,8

Na Slici 51. su prikazane zavisnosti M_t/M_∞ od t_N , tj. primenjena je metoda normalizovanog vremena koju su predložili Adnađević i sar. kako bi se ispitala kinetika otpuštanja kofeina i u PB 6,8 i u 0,1 M HCl. Sa grafika se može videti da treba proveriti da li se dobijaju pravolinijske zavisnosti za D modele kod uzoraka PMAC-0N-1 (oba medijuma) i PMAC-0N-2 (0,1M HCl), dok bi u ostalim slučajevima trebalo proveriti slaganje sa R modelima.



Slika 51. Poklapanje normalizovanih krivih otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom kofeina u a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl sa modelima model fitting metoda

Iz dobijenih zavisnosti (Slika 52.) se može videti da provereni modeli dobro opisuju kinetiku otpuštanja kofeina.



Slika 52. Provera odabranih modela na osnovu primene model fitting metoda na krive otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom kofeina u PB 6,8

Tabela 9. Kinetički parametri dobijeni primenom matematičkih modela na krive otpuštanja kofeina iz PMAC nosača sa različitom koncentracijom kofeina u PB 6,8 i 0,1M HCl

Model	Uzorak	PMAC-0N-1		PMAC-0N-2		PMAC-100N-1		PMAC-100N-2	
		HCl	PB	HCl	PB	HCl	PB	HCl	PB
R-P	n	0,58	0,50	0,53	0,70	0,91	1,14	0,79	0,95
	$k \cdot 10^2$ (min ⁻¹)	2,13	4,17	2,99	1,70	0,623	0,272	1,04	0,485
	$\Delta\alpha$ (%)	73,3	85,7	88,7	79,8	89,0	61,5	92,9	50,7
	R ²	0,998	0,999	0,948	0,975	0,979	0,954	0,992	0,979
Higuchi model	$k_H \cdot 10^2$	3,28	4,22	3,71	-	4,68	-	4,58	-
	$\Delta\alpha$ (%)	73,3	85,7	72,6	-	74,8	-	63,4	-
	R ²	0,997	0,999	0,996	-	0,972	-	0,965	-
Kopcha	$k_1 \cdot 10^2$	2,54	4,18	3,19	2,27	1,39	0	1,23	5,80
	$k_2 \cdot 10^3$	0,491	0	0,399	2,87	2,76	5,81	2,71	3,46
	$\Delta\alpha$	62,9	56,8	64,2	60,6	46,2	56,1	43,7	50,7
	R ²	0,999	0,998	0,979	0,975	0,989	0,993	0,976	0,991
R2	$k_{R2} \cdot 10^3$ (min ⁻¹)	-	-	-	-	2,40	-	2,40	-
	$\Delta\alpha$ (%)	-	-	-	-	46,2	-	43,7	-
	R ²	-	-	-	-	0,989	-	0,985	-
R3	$k_{R3} \cdot 10^3$ (min ⁻¹)	-	-	-	2,10	2,00	2,40	1,80	-
	$\Delta\alpha$ (%)	-	-	-	58,4	46,2	60,5	43,7	-
	R ²	-	-	-	0,992	0,959	0,990	0,952	-
D3	$k_{D3} \cdot 10^3$ (min ⁻¹)	-	4,28	2,79	-	-	-	-	3,46
	$\Delta\alpha$ (%)	-	56,8	52,4	-	-	-	-	50,7
	R ²	-	0,956	0,943	-	-	-	-	0,919
D4	$k_{D4} \cdot 10^4$ (min ⁻¹)	1,84	3,24	2,26	-	-	-	-	-
	$\Delta\alpha$ (%)	45,2	56,8	52,4	-	-	-	-	-
	R ²	0,955	0,948	0,934	-	-	-	-	-

Vrednosti koeficijenta koji se odnose na otpuštanje kofeina u PB 6,8 difuzijom kao glavnim mehanizmom prenosa dobijene R-P modelom, Higuchi (za uzorak PMAC-0N-1, PB 6,8) i Kopcha modelom, približno su iste za uzorak PMAC-0N-1 i za uzorak PMAC-0N-2 kada se kofein otpušta u 0,1M HCl. Vrednosti ovih koeficijenta dobijene difuzionim modelima manje su za jedan red veličine kod modela D3 i dva reda veličine kod modela D4 (Tabela 9.). U ostalim slučajevima R-P model predviđa da relaksacija ima veliki uticaj na otpuštanje aktivne supstance, što je i potvrđeno dobrim slaganjem sa R modelima. R-P model predviđa brže otpuštanje model-leka u 0,1M HCl u svim slučajevima osim kod uzorka PMAC-0N-1 gde se oslobađanje kofeina

iz nosača odvija većom brzinom u PB 6,8. Maksimalna količina kofeina od 2 g u uzorcima sa 0% neutralizacije dovela je do promene modela kojima se opisuje otpuštanje kofeina u PB 6,8. Naime, na podatke koji se odnose na otpuštanje kofeina u PB 6,8 se može primeniti R3 model, dok je kod osnovnog uzorka sa 0,2 g kofeina, otpuštanje kofeina moglo da se opiše D modelima. Takođe može da se vidi da je došlo do promene modela kojima se opisuje otpuštanje kofeina i iz uzoraka sa 100% neutralizacije MAA sa većom količinom inkapsuliranog kofeina u 0,1M HCl. I u ovoj sredini se otpuštanje kofeina može opisati R modelima, dok je kod osnovnog uzorka sa 0,2g kofeina otpuštanje kofeina u istoj sredini moglo da se opiše D modelima. Može se zaključiti da sa povećanjem koncentracije kofeina dolazi do promene mehanizma njegovog oslobađanja što bi moglo da bude posledica uspostavljanja većeg broja interakcija sa nosačem ili mogućnost izdvajanja jedne količine kofeina na površini nosača tokom sinteze.

4.2.3.4. Koeficijent difuzije

U Tabeli 10. su predstavljene vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja u dve sredine u kojima je praćeno otpuštanje aktivne supstance. Vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja i kod uzoraka sa 0% i sa 100% neutralizacije MAA prvo opadaju sa porastom količine kofeina, da bi potom porasle u slučaju sa najvećom količinom kofeina. Ovo može biti posledica izdvajanje jednog dela leka na površini sistema tokom sinteze, pa je olakšana difuzija medijuma u nosače. Koeficijenti difuzije medijuma u nosače prvo rastu sa porastom koncentracije kofeina u nosačima, da bi se kod nosača sa najvećom koncentracijom kofeina vrednosti koeficijenata difuzije pale. Difuzija kofeina iz nosača sa 0% neutralizacije MAA raste sa porastom koncentracije kofeina zato što je i veća pogonska sila, međutim kod uzoraka sa 100% neutralizacije MAA difuzija kofeina prvo postaje brža, da bi kod uzorka sa najvećom koncentracijom kofeina usporila. Usporavanje difuzije kofeina iz nosača verovatno se dešava zbog uspostavljanja većeg broja interakcija između kofeina i jonizovanih karboksilnih grupa PMAA i kazeina. Zanimljivo je primetiti da je Kopcha model predvideo da se otpuštanje kofeina iz PMAC-100N-1 u PB 6,8 odvijalo isključivo kao posledica relaksacije polimernih lanaca ($k_D=0 \text{ min}^{-1}$).

Tabela 10. Koeficijent difuzije ispitivanih sredina u PMAC nosače sa različitom koncentracijom kofeina

Uzorak	0,1M HCl			PB 6,8		
	$k_D \cdot 10^2$ (min^{-1})	SDeq	$Dh \cdot 10^5$ (mm^2/min)	$k_D \cdot 10^2$ (min^{-1})	SDeq	$Dh \cdot 10^5$ (mm^2/min)
PMAC-0N-1	2,54	0,63	1,06	4,18	2,98	1,05
PMAC-0N-2	3,19	2,81	0,813	2,27	7,22	0,970
PMAC-100N-1	1,39	8,48	1,07	0	24,5	0,980
PMAC-100N-2	1,23	9,64	0,813	5,80	43,8	0,730

4.2.4. Uticaj prisustva lipozoma u nosačima

Kako bi se dodatno zaštitio model lek i usporilo njegovo otpuštanje, u PMAC nosače dodati su lipozomi. Sintetisana je serija nosača sa lipozomima, kod kojih je model lek inkapsuliran direktno u liposome tokom njihove sinteze. Ispitan je uticaj njihovog prisustva na stepen inkapsulacije kofeina, bubrenje PMAC/L nosača i kinetiku otpuštanja kofeina.

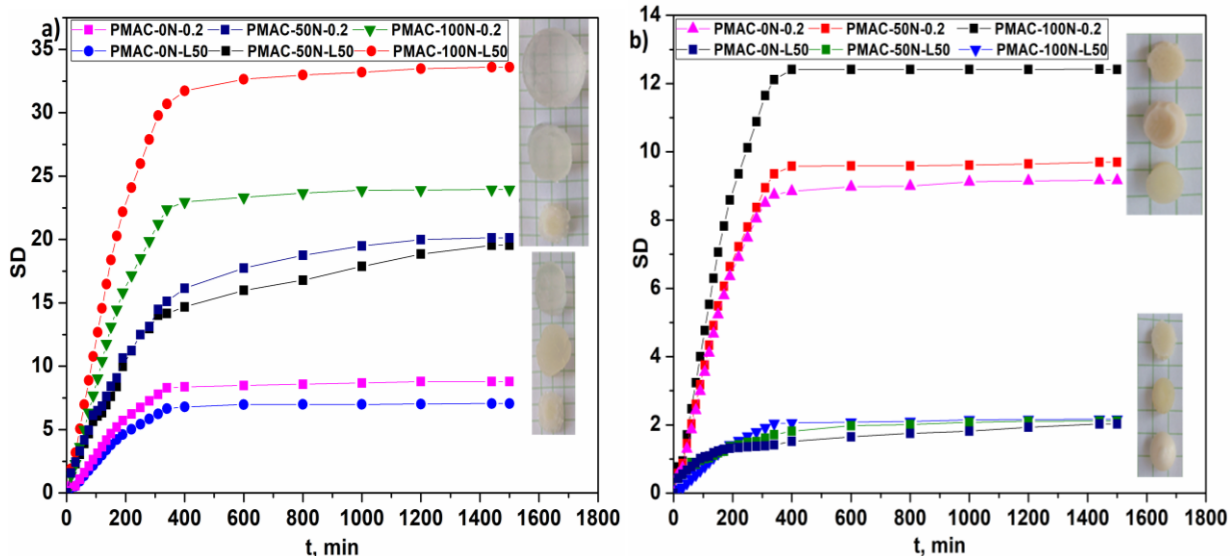
4.2.4.1. Stepenn inkapsulacije kofeina

Stepenn inkapsulacije kofeina u lipozomima pripremljenim sa kofeinom u koncentraciji od 20 mg/ml kofeina, koji su inkorporirani u polimerni nosač, bio je $84,8 \pm 2,58\%$ što je visoka vrednost u poređenju sa postignutim stepenom inkapsulacije u objavljenoj naučnoj literaturi [298].

4.2.4.2. Uticaj stepena neutralizacije MAA

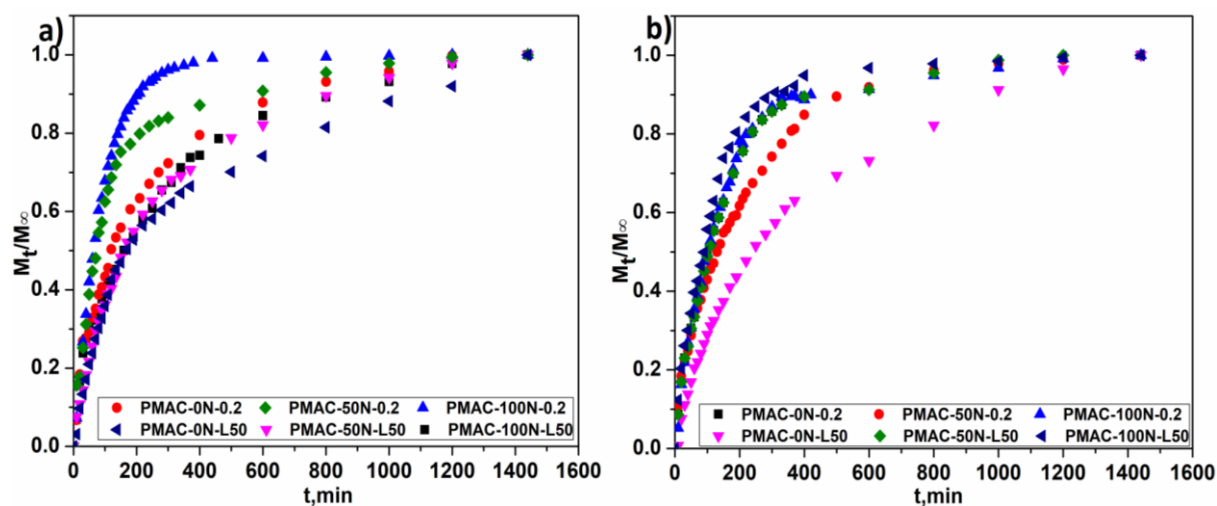
Sintetisani su PMAC/L nosači sa 0%, 50% i 100% neutralizacije MAA u cilju analize uticaja prisustva lipozoma u nosačima sa različitim stepenom neutralizacije MAA na otpuštanje kofeina, kao i uticaja na bubrenje ovih nosača u dve sredine: PB 6,8 i 0,1M HCl.

Dobijene krive bubrenja PMAC/L nosača, zajedno sa krivim bubrenja osnovnih sistema bez lipozoma, u PB 6,8 i u 0,1M HCl prikazane su na Slici 53. a) i b), respektivno. Prisustvo lipozoma u nosačima značajno je smanjilo vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja u obe sredine. Difuzija spoljašnjeg medijuma u mrežu hidrogela sporije se odvijala usled prisustva lipozoma u porama hidrogela. Takođe se može primetiti da PMAC-100N-L50 ima najviše vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja u obe sredine, dok sistemi sa 0% i 50% neutralizacije MAA slično bubre, što je posledica generisanog negativnog naelektrisanja na karboksilnim grupama i jačeg odbijanja polimernih lanaca u sistemu sa 100% neutralisanom MAA. Sa Slike 53. se može videti da su vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja duplo manje u 0,1M HCl u odnosu na PB 6,8, što je u skladu sa činjenicom da PMAC sistemi više bubre u PB 6,8 i da prisustvo lipozoma nije uticalo na promenu ponašanja ovih sistema, tj. na njihovu pH osetljivost.



Slika 53. Krive bubrenja PMAC/L nosača - uticaj prisustva lipozomne suspenzije: a) PB6,8 i b) 0,1M HCl

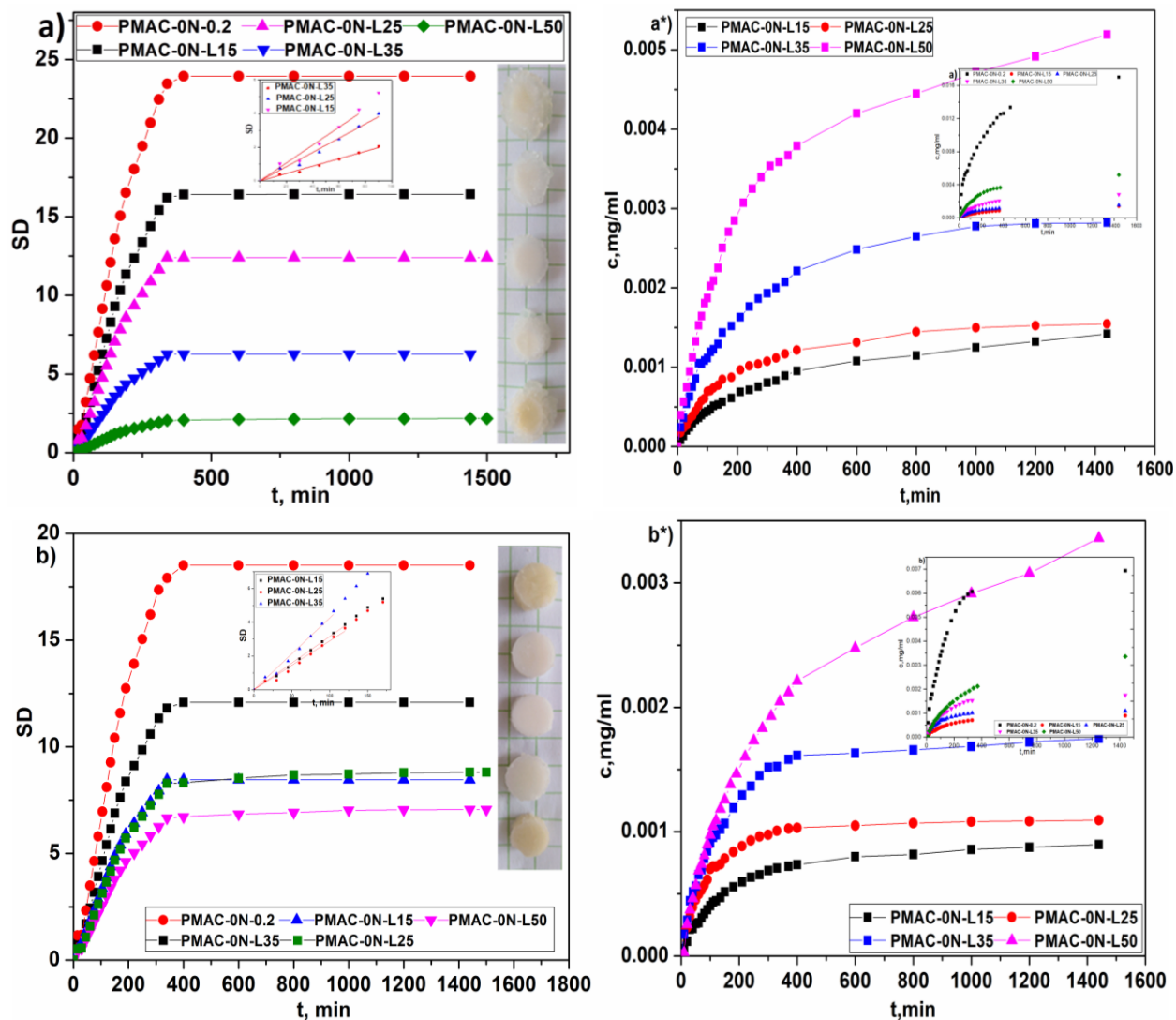
Na graficima (Slika 54.) je predstavljeno poređenje kumulativnih krivih otpuštanja kofeina za sisteme sa različitim stepenom neutralizacije MAA sa osnovnim nosačima u kojima se nalazi suspenzija lipozoma (50% u odnosu na destilovanu vodu u reakcionoj smeši). Konstruisane su kumulativne krive umesto krivih otpuštanja radi bolje preglednosti dobijenih eksperimentalnih podataka. Primena matematičkih modela, određeni parametri, kao i tumačenje dobijenih rezultata prikazani su zajedno sa podacima ostalih sintetisanih serija nosača koji sadrže različitu količinu lipozoma. Kako se sa grafika (Slika 54.) vidi da prisustvo lipozoma usporava otpuštanje kofeina, u nastavku je ispitano kako udeo lipozomne suspenzije prisutne u nosačima sa 0% i 100% neutralizacije MAA (izabrana su dva granična slučaja) utiče na otpuštanje kofeina.



Slika 54. Kumulativne krive otpuštanja kofeina - uticaj prisustva lipozomne suspenzije u: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl

4.2.4.3. Uticaj udela lipozomne suspenzije

Na Slici 55. a) i b) prikazane su krive bubrenja nosača sa 0% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozoma: 15%, 25%, 35%, 50% u odnosu na ukupnu količinu destilovane vode koja je dodata u reakcionu smešu, u dve sredine različitih pH vrednosti (manji grafici prikazuju određene nagibe krivih bubrenja ispitivanih uzoraka).

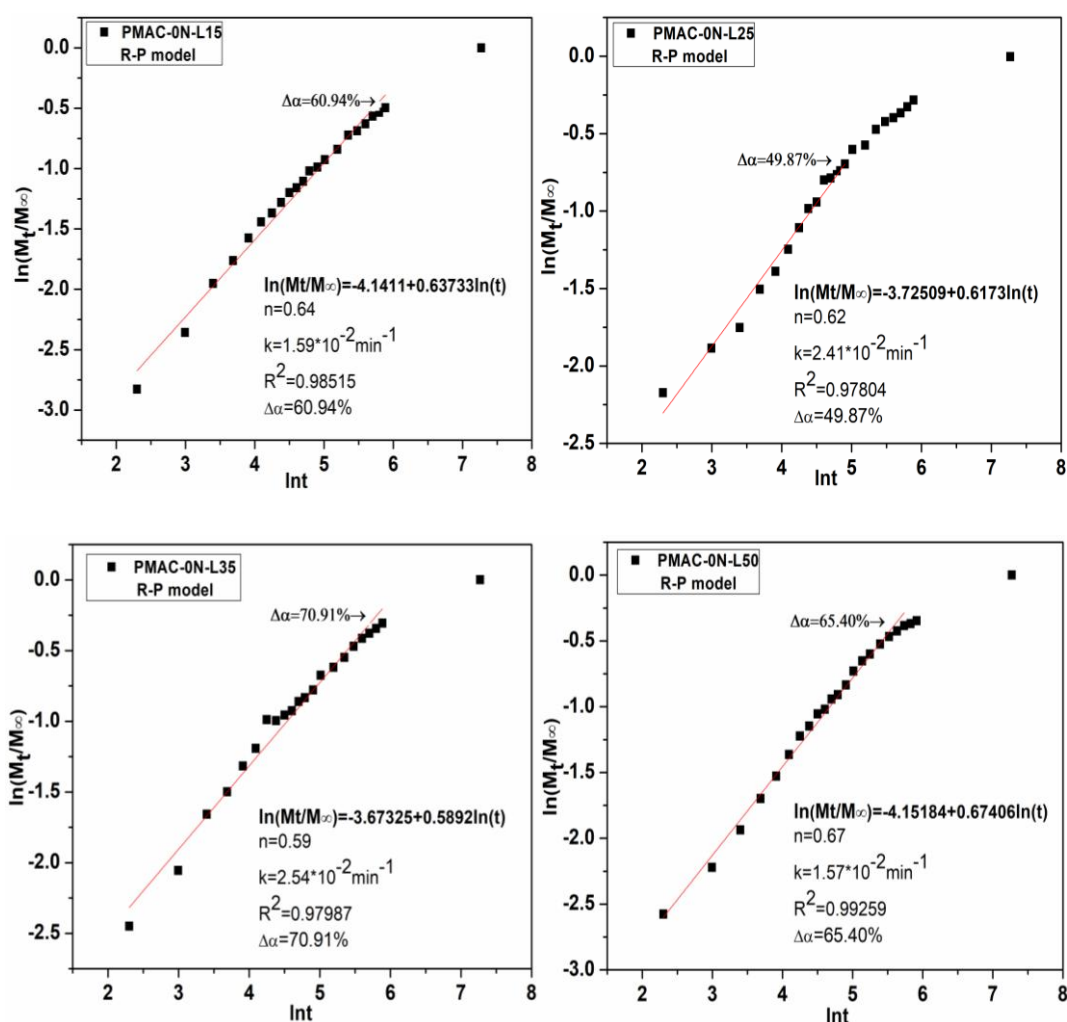


Slika 55. Krive bubrenja PMAC/L nosača sa 0% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije i otpuštanja kofeina iz istih, respektivno u: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl

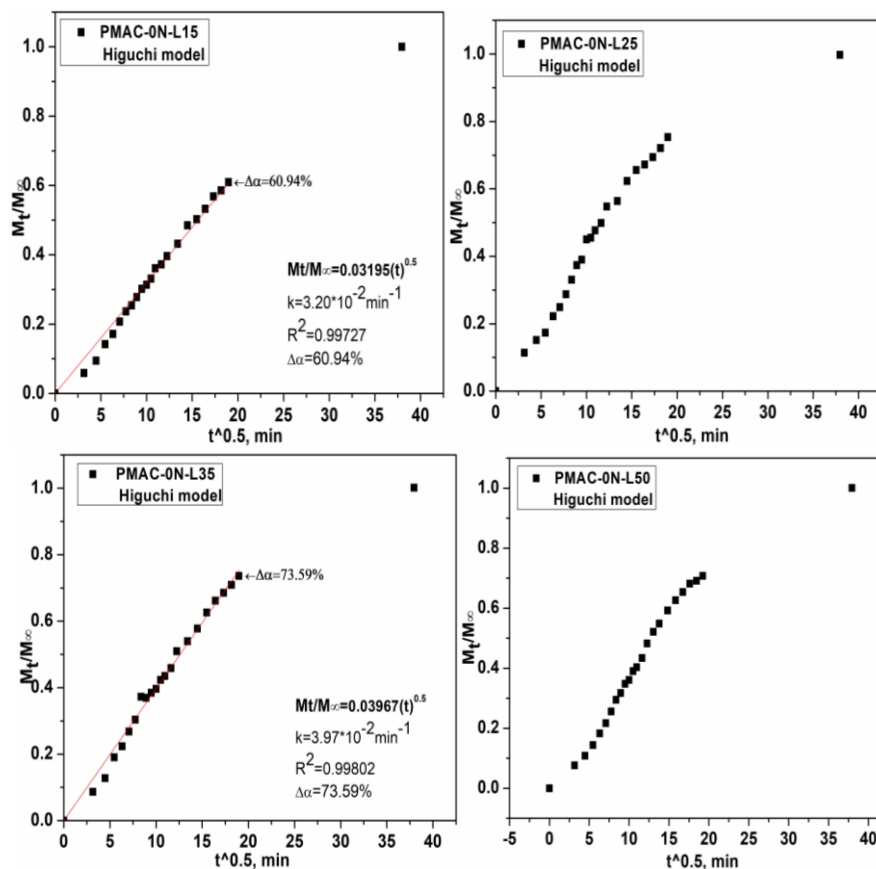
Sa Slike 55. a) i b) se vidi da uzorci više bubre u PB 6,8 u odnosu na 0,1M HCl i vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja su više u PB 6,8 u odnosu na kiselu sredinu. Uzorci sa 25% i 35% lipozoma slično bubre u 0,1M HCl, dok je veći udeo lipozoma prisutnih u sistemu usporio bubrenje i smanjio vrednost ravnotežnog stepena bubrenja. Usporavanje bubrenja se može objasniti ispunjenošću pora hidrogela lipozomima usled čega se usporava i difuzija

spoljašnjeg medijuma u matriks hidrogela, kao i ostvarenim interakcijama i njihovoj gustini. Na Slici 55. a*) i b*) su prikazane krive otpuštanja kofeina iz ispitivanih uzoraka u istim sredinama (manji grafici prikazuju poređenje profila otpuštanja kofeina iz ispitivane serije uzoraka sa osnovnim uzorkom bez lipozoma – crna kriva, tokom 24h). Može se zaključiti da se sa porastom udela lipozoma u sistemima brže otpušta veća količina kofeina u PB 6,8 u odnosu na 0,1M HCl. Takođe, značajno je usporeno otpuštanje kofeina u odnosu na osnovni uzorak bez lipozoma.

Na graficima Slika 56. i Slika 57. prikazani su R-P model i Higuchi model, respektivno, primenjeni na eksperimentalne podatke otpuštanja kofeina u fosfatni pufer iz nosača sa 0% neutralizacije MAA i lipozomima, dok su grafici koji se odnose na 0,1M HCl izostavljeni zbog oblika koji je sličan prikazanim graficima.

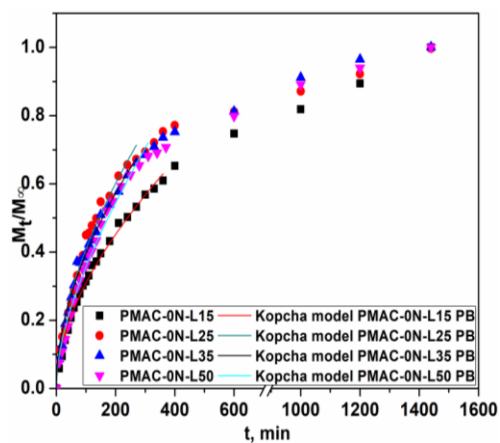


Slika 56. Primena R-P modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 0% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije u PB 6,8



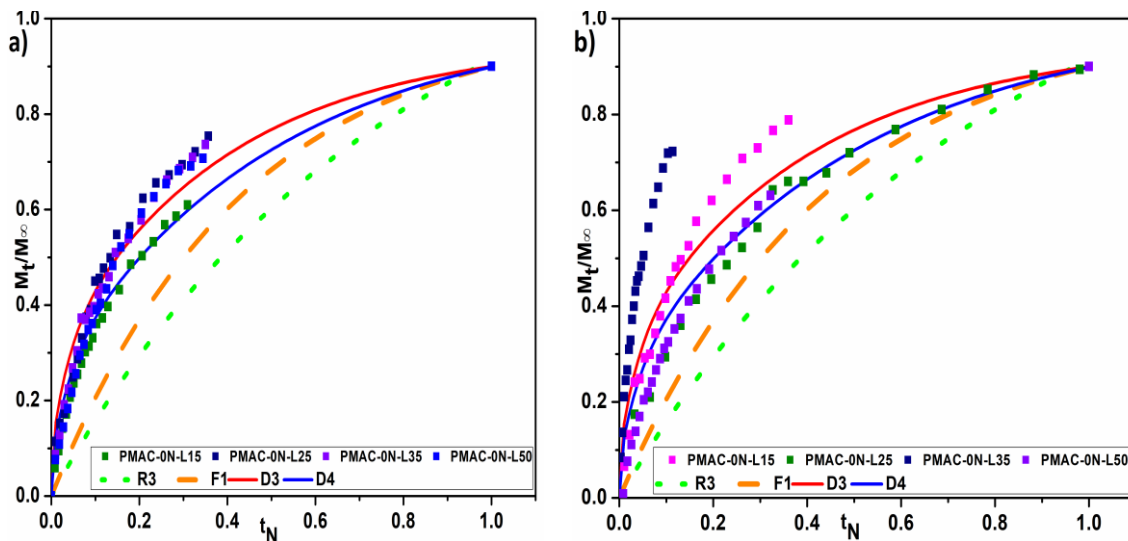
Slika 57. Primena Higuchi modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 0% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije u PB 6,8

Zavisnosti M_t/M_∞ -t i Kopcha model za fosfatni pufer pH=6,8 prikazani su na Slici 58, a za 0,1M HCl Kopcha model nije prikazan zato što su dobijeni slični oblici grafika.

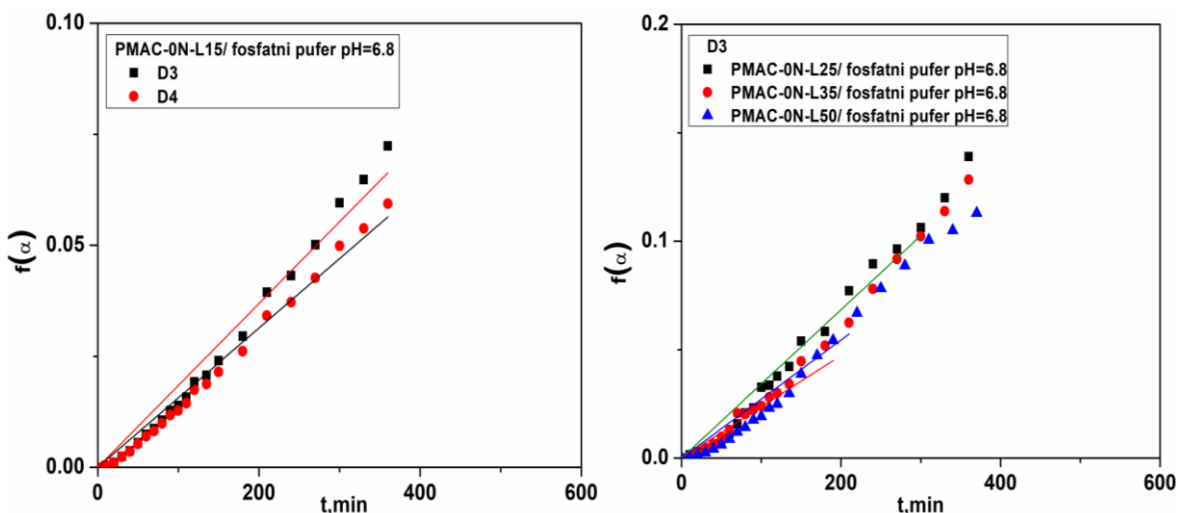


Slika 58. Primena Kopcha modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 0% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije u PB 6,8

Poklapanje normalizovanih krivih sa modelima prikazano je na Slici 59. Normalizovane krive otpuštanja kofeina i u fosfatnom puferu pH=6,8 i u 0,1M HCl poklapaju se sa D modelima, pa treba proveriti da li se dobijaju pravolinijske zavisnosti kada se ovi modeli primene. Normalizovana kriva PMAC-0N-L35 koja se odnosi na 0,1M HCl ne poklapa se ni sa jednim modelom, prema tome na podatke dobijene praćenjem otpuštanja kofeina iz ovog uzorka u kiseljoj sredini ne može da se primeni metoda koju su predložili Adnađević i sar.



Slika 59. Poklapanje normalizovanih krivih otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 0% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije u a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl sa modelima model fitting metoda



Slika 60. Provera odabranih modela na osnovu primene model fitting metoda na krive otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 0% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije u PB 6,8

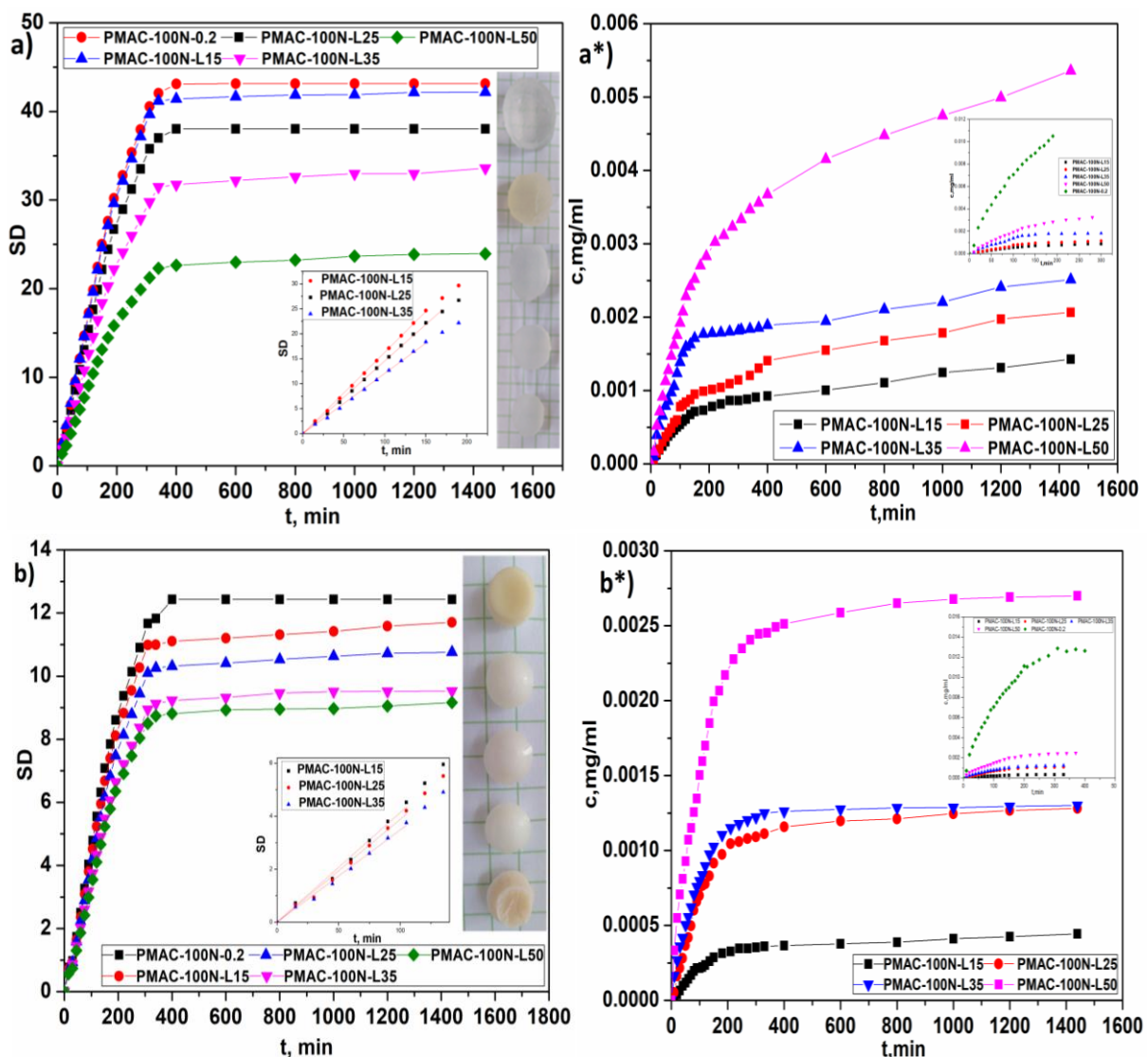
Tabela 11. Kinetički parametri dobijeni primenom matematičkih modela na krive otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 0% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije u PB 6,8 i 0,1M HCl

Model	Uzorak	PMAC-0N-L15		PMAC-0N-L25		PMAC-0N-L35		PMAC-0N-L50	
		HCl	PB	HCl	PB	HCl	PB	HCl	PB
R-P	n	0,66	0,64	0,51	0,62	0,60	0,59	0,63	0,67
	$k \cdot 10^2$ (min^{-1})	1,99	1,59	5,51	2,41	2,48	2,54	1,46	1,57
	$\Delta\alpha(\%)$	78,8	60,9	92,4	49,9	72,2	70,9	62,9	65,4
	R^2	0,962	0,985	0,975	0,978	0,982	0,980	0,962	0,993
Higuchi model	$k_H \cdot 10^2$	4,43	3,20	5,60	-	4,15	3,97	3,10	-
	$\Delta\alpha(\%)$	78,8	60,9	91,4	-	71,9	73,6	63,1	-
	R^2	0,996	0,997	0,995	-	0,998	0,998	0,989	-
Kopcha	$k_1 \cdot 10^2$	5,60	2,84	3,53	3,69	3,65	3,70	2,10	2,87
	$k_2 \cdot 10^4$	2,92	2,52	7,96	3,95	4,26	2,45	6,93	6,95
	$\Delta\alpha$	76,8	60,9	70,8	67,2	64,8	66,1	63,1	68,2
	R^2		0,992	0,986	0,983	0,991	0,988	0,987	0,989
D3	$k_{D3} \cdot 10^4$ (min^{-1})	3,17	1,84	-	3,42	-	2,72	-	2,37
	$\Delta\alpha(\%)$	49,6	60,9	-	69,4	-	50,9	-	54,9
	R^2	0,974	0,987	-	0,986	-	0,988	-	0,960
D4	$k_{D4} \cdot 10^4$ (min^{-1})	-	1,57	6,07	-	-	-	1,16	-
	$\Delta\alpha(\%)$	-	60,9	85,2	-	-	-	43,6	-
	R^2	-	0,993	0,994	-	-	-	0,971	-

U Tabeli 11. prikazani su određeni parametri upotrebljenih modela primenjenih na dobijene eksperimentalne podatke PMAC-0N-L hidrogelova (podaci za osnovni uzorak bez lipozoma – PMAC-0N-0,2 prikazani su u Tabeli 5.). Dobijeni rezultati pokazuju da je slaganje eksperimentalnih podata sa R-P, Higuchi i Kopcha modelima dobro, sa oblašću primene do 60-70% otpuštene količine kofeina. Dodatak lipozoma nije uticao na promenu modela, pa se otpuštanje kofeina iz posmatranih uzoraka takođe može opisati sa D modelima. Međutim, R-P model je za PMAC-0N-0,2 pokazao da relaksacija ima veći uticaj na otpuštanje, dok je ovaj model za sistem sa dodatim lipozomima pokazao da difuzija ima veći uticaj na otpuštanje kofeina. Ovo potvrđuje i dobro slaganje eksperimentalnih podataka dobijenih za uzorak PMAC-0N-L sa Higuchi modelom koji predviđa da se otpuštanje odvija difuzijom kao glavnim mehanizmom otpuštanja. Koeficijenti Kopcha modela koji se odnose na brzinu difuzije su veći od koeficijenata ovog modela koji se odnose na brzinu relaksacije, prema tome i Kopcha model predviđa da se oslobađanje kofeina odvija difuzijom kao glavnim mehanizmom transporta.

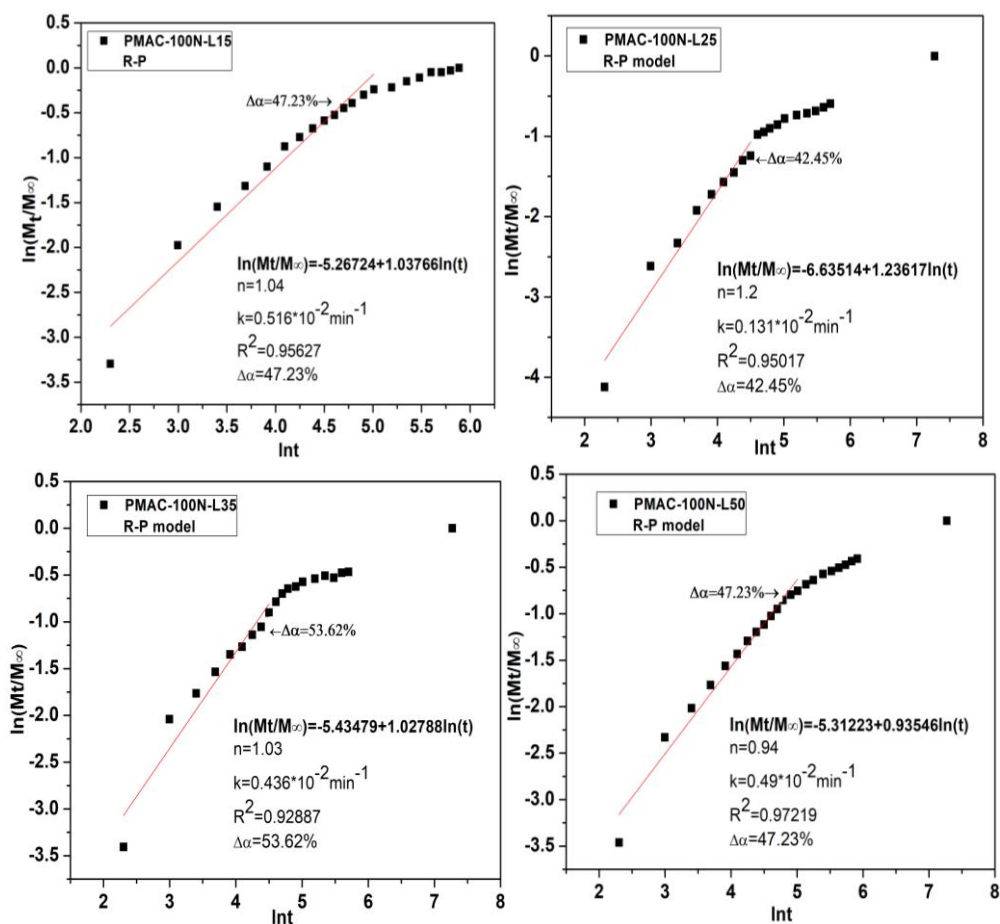
Sintetisana je i serija uzoraka sa 100% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozoma, kako bi se ispitaio uticaj prisustva lipozoma na bubrenje i na otpuštanje kofeina iz posmatranih nosača. Udeo lipozoma je i u ovoj seriji variran u odnosu na ukupnu količinu destilovane vode koju treba dodati u reakcionu smešu, pa su sintetisani uzorci sa lipozomnom suspenzijom koja čini 15%, 25%, 35% i 50% od ukupne količine destilovane vode koja je dodata pri sintezi

osnovnog uzorka bez lipozoma (PMAC-100N-0,2). Na Slici 61. a) i b) prikazane su krive bubrenja uzoraka u obe sredine (manji grafici prikazuju određene nagibe krivih bubrenja ispitivanih uzoraka). Sa grafika se vidi da su vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja duplo više kada uzorci bubre u PB 6,8 (Slika 61. a)) u odnosu na vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja u 0,1M HCl (Slika 61. b)). Ovakvo ponašanje nosača je posledica generisanja negativnog naelektrisanja na karboksilnim grupama i odbijanja polimernih lanaca u PB 6,8. Takođe, sa porastom udela inkorporiranih lipozoma u mrežu nosača, opadaju vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja. Difuzija spoljašnjeg medijuma u hidrogel bila je otežana verovatno zbog fizičkog prisustva lipozoma u porama hidrogela.



Slika 61. Serije krivih bubrenja: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl i odgovarajuće serije krivih otpuštanja: a*) PB 6,8 i b*) 0,1M HCl (manji grafik predstavlja poređenje krivih otpuštanja iz sistema sa lipozomima sa odgovarajućim sistemom bez lipozoma za 24h) - uticaj količine lipozoma u sistemu sa 100% stepena neutralizacije MAA

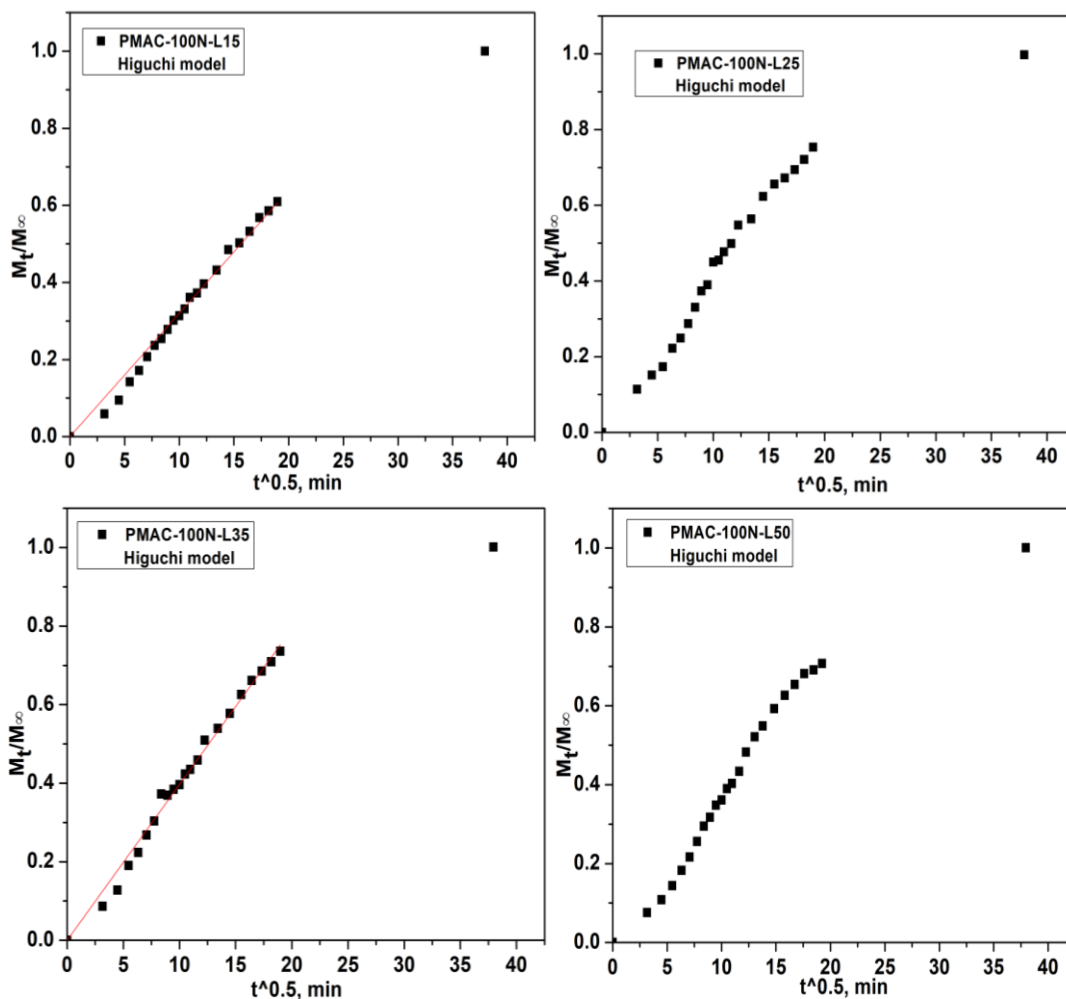
Na Slici 61. a*) i b*) prikazano je otpuštanje kofeina iz serije uzoraka sa 100% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije, kako bi se ispitaio uticaj ovih fosfolipidnih čestica na kontrolisano otpuštanje kofeina u dve sredine različitih pH vrednosti (manji grafici prikazuju poređenje profila otpuštanja kofeina iz ove serije uzoraka sa osnovnim uzorkom bez lipozoma – zelena kriva). Na manjim graficima se vidi da prisustvo lipozoma u sistemu značajno usporava otpuštanje aktivne supstance u odnosu na osnovni nosač bez lipozoma – PMAC-100N-0,2 (zelena kriva). Na glavnim graficima se vidi da je sa porastom udela lipozoma u sistemu, brže i oslobađanje, što je i očekivano s obzirom da je u sistem uneta i veća količina model-leka inkapsuliranog u lipozome. Poređenjem krivih otpuštanja u dve sredine može da se vidi da su veći nagibi krivih otpuštanja u PB 6,8 u odnosu na one koji se odnose na 0,1M HCl i zaključi da je brže oslobađanje i da je oslobođena veća količina kofeina u PB 6,8.



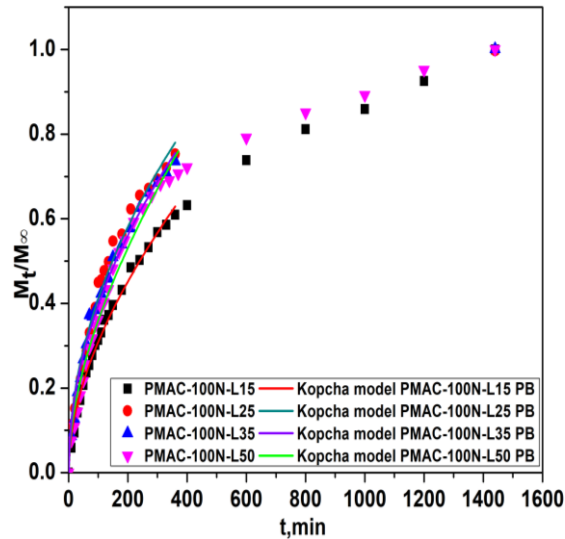
Slika 62. Primena R-P modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 100% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije u PB 6,8

Na graficima prikazanim na Slici 62. Predstavljen je R-P model primenjen na krive otpuštanja kofeina u PB 6,8 iz nosača sa različitim udelom lipozoma. Određeni parametri ovog

modela za sve uzorke predstavljeni su u Tabeli 12. Higuchi model, Kopcha model, kao i metoda normalizovanog vremena predstavljeni su na graficma Slika 63, Slika 64, Slika 65. i 66, respektivno, a izračunati parametri se nalaze u Tabeli 12, u kojoj se nalaze i parametri R-P modela. Podaci za osnovni uzorak bez lipozoma – PMAC-100N-0,2 prikazane su u Tabeli 5.

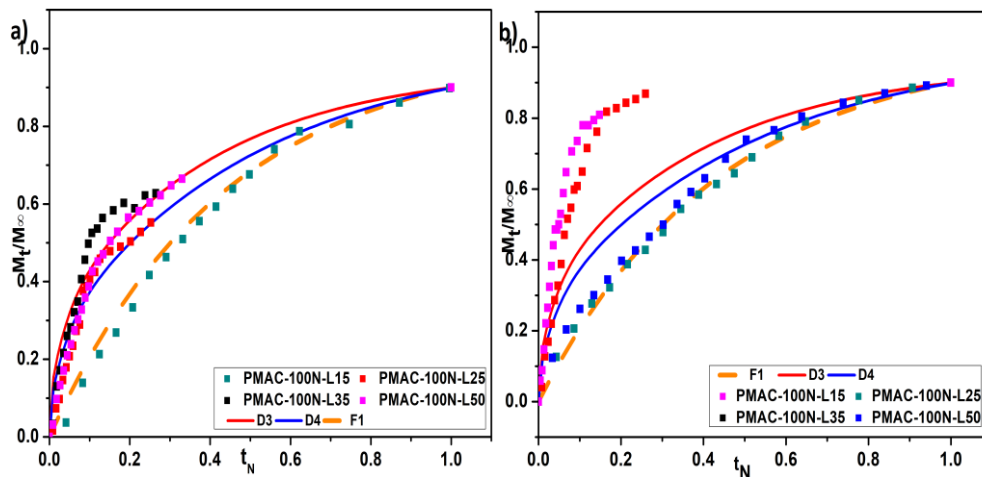


Slika 63. Primena Higuchi modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 100% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije u PB 6,8



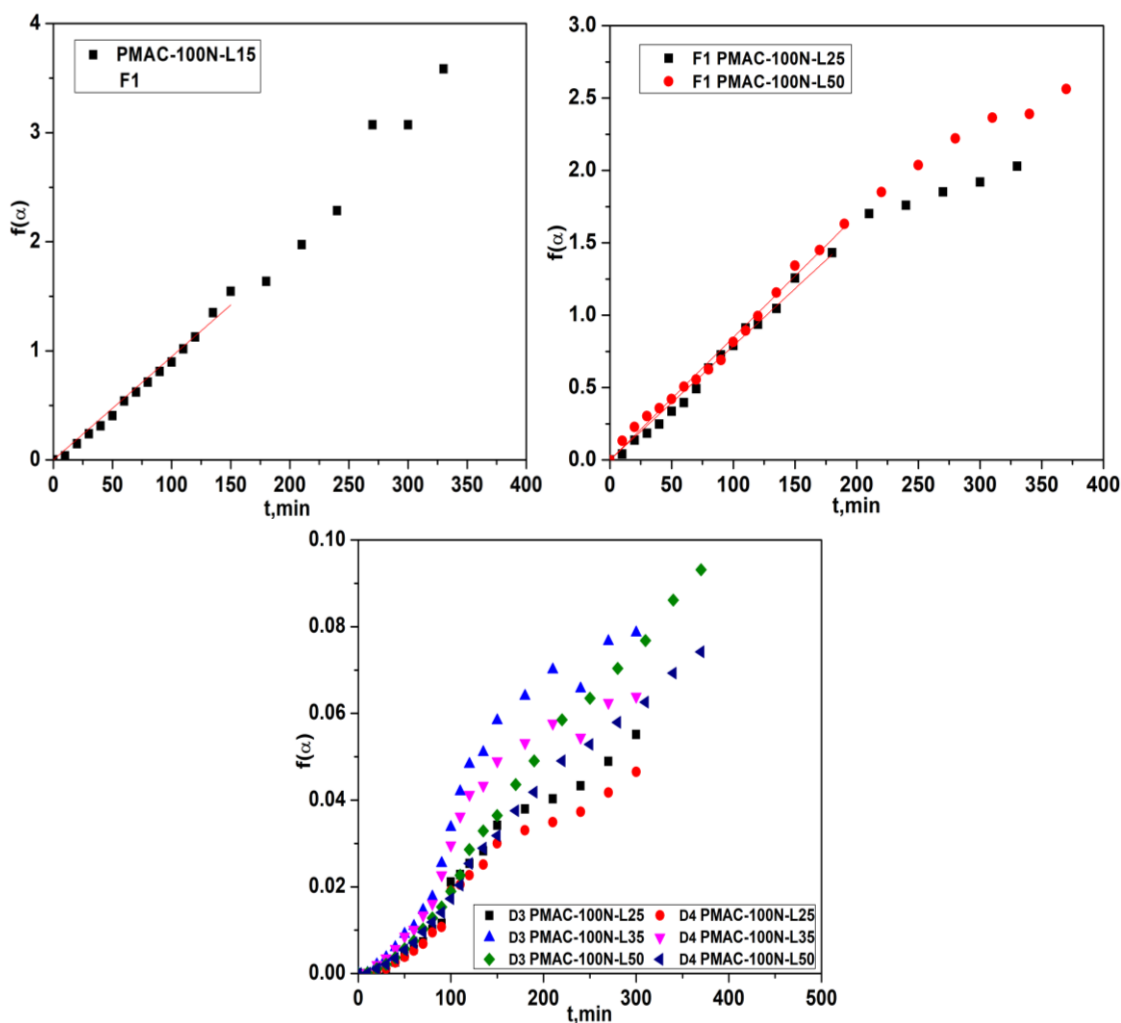
Slika 64. Primena Kopcha modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 100% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije u PB 6,8

Metoda normalizovanog vremena korišćena za ispitivanje kinetike otpuštanja kofeina iz ispitivanih PMAC/L nosača sa 100% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije (Slika 65. a)), pokazala je da bi kinetika otpuštanja kofeina u PB 6,8 mogla da odgovara prvom redu reakcije, dok bi za ostale sisteme trebalo proveriti da li bi D modeli mogli da se koriste za analizu kinetike, tj. da li se dobijaju pravolinijske zavisnosti. Kada se radi o praćenju otpuštanja slabo vodorastvorne aktivne supstance u 0,1M HCl normalizovane krive otpuštanja uzoraka PMAC-100N-25 i PMAC-100N-50 prate krivu prvog reda reakcije, dok se ostali uzorci ne poklapaju ni sa jednim od posmatranih modela kod metode normalizovanog vremena (Slika 65. b)).



Slika 65. Poklapanje normalizovanih krivih otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 100% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije u a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl sa modelima model fitting metoda

Dobijeni grafici prikazani na Slici 66. pokazuju da otpuštanje kofeina iz PMAC-100N-L15 (PB 6,8), PMAC-100N-L25 (0,1M HCl) i PMAC-100N-L50 (0,1M HCl) odgovara prvom redu reakcije, tj. da otpuštena količina kofeina direktno zavisi od vremena oslobađanja. Slaganje sa ostalim modelima je prilično loše, pa su grafički predstavljeni samo podaci koji se odnose na otpuštanje za PB 6,8, gde se vidi poklapanje sa F1 modelom i da D modeli ne odgovaraju kinetici otpuštanja kofeina.



Slika 66. Provera odabranih modela na osnovu primene model fitting metoda na krive otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 100% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije u PB 6,8

Tabela 12. Kinetički parametri dobijeni primenom matematičkih modela na krive otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 100% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije u PB 6,8 i 0,1M HCl

Model	Uzorak	PMAC-100N-L15		PMAC-100N-L25		PMAC-100N-L35		PMAC-100N-L50	
		0,1MHCl	PB 6,8	0,1MHCl	PB 6,8	0,1MHCl	PB 6,8	0,1MHCl	PB 6,8
R-P	n	0,92	1,04	0,98	1,24	0,67	1,03	0,64	0,94
	$k \cdot 10^2$ (min^{-1})	0,699	0,516	0,568	0,131	2,75	0,436	2,88	0,490
	$\Delta\alpha(\%)$	64,7	63,9	71,5	42,5	85,0	53,6	73,8	47,2
	R^2	0,981	0,956	0,975	0,950	0,998	0,929	0,998	0,972
Higuchi model	$k_H \cdot 10^2$	-	3,20	6,10	-	-	0,110	5,12	-
	$\Delta\alpha(\%)$	-	60,9	79,0	-	-	73,6	85,4	-
	R^2	-	0,997	0,994	-	-	0,998	0,995	-
Kopcha	$k_1 \cdot 10^2$	1E-16	2,83	0,510	4,11	3,40	3,90	3,65	3,22
	$k_2 \cdot 10^3$	5,40	0,252	4,92	1,95	2,12	27,5	2,46	0,380
	$\Delta\alpha$	48,3	60,9	60,8	75,3	73,9	73,6	74,9	70,7
	R^2	0,997	0,992	0,992	0,983	0,999	0,999	0,998	0,983
F1	$k_{F1} \cdot 10^3$ (min^{-1})	-	9,46	7,89	-	-	-	8,46	-
	$\Delta\alpha (\%)$	-	78,70	76,1	-	-	-	80,4	-
	R^2	-	0,995	0,996	-	-	-	0,998	-

Iako su sintetisani nosači sa lipozomima izuzetno složeni, R-P model za ispitivanje kinetike otpuštanja model leka se pokazao pogodan skoro za sve nosače (vrednosti R^2 su oko 0,95-0,99, što je za polimerne sisteme zadovoljavajuće). Oblast primene ovog modela je oko 60% (osim za uzorak PMAC-100N-L25 gde je oko 42%). Kopcha model je i za ovu seriju uzoraka bio najbolji za opisivanje kinetike otpuštanja, a oblasti primene su visoke oko 70% (osim PMAC-100N-L15 oko 48%), kao i koeficijenti korelacije (oko 0,990). Slaganje sa ostalim modelima (osim F1) iz grupe modela za primenu metode normalizovanog vremena je loše. Kod osnovnog uzorka bez lipozoma (PMAC-100N-0,2) otpuštanje kofeina moglo je pored F1 modela da se opiše i R modelom za PB 6,8, odnosno sa D modelima za 0,1M HCl. Prema tome može se zaključiti da je dodatak lipozoma u sistem sa 100% neutralizacije MAA doveo do promene modela kojima se opisuje otpuštanje kofeina u obe sredine.

Može se zaključiti da su oba transportna mehanizma i difuzija i relaksacija polimernih lanaca kontrolisala otpuštanje kofeina iz posmatranih sistema. Kod krivih otpuštanja kao i kod svih modela postoji blagi plato, pa verovatno dolazi do promene mehanizma oslobađanja kofeina. Postoji nekoliko mogućnosti kako je teklo oslobađanje kofeina iz ovih sistema: moguće je da se kofein oslobodi iz lipozoma u sam nosač, pa tek iz njega u sredinu u kojoj se prati otpuštanje. Takođe je moguće i da je deo lipozoma prošao kroz pore polimernog nosača, pa se otpuštanje model-leka odvijalo i iz ovih lipozoma istovremeno sa otpuštanjem kofeina iz lipozoma u nosaču [265]. SEM mikrografi su potvrdili da nije došlo do razgradnje lipozoma tokom sinteze nosača, pa je prema tome postojala slobodna količina kofeina samo u suspenziji lipozoma, tj. ona količina kofeina koja se nije inkapsulirala u lipozomne čestice, tako da iako je

ova količina mala i ona se takođe oslobađala iz polimernih nosača, pored već pomenutih mogućih načina oslobađanja.

4.2.4.3.1. Koeficijent difuzije

Vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja dve serije uzoraka sa 0% i sa 100% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije, opadaju sa porastom udela lipozoma u nosačima i u PB 6,8 i u 0,1M HCl. Istovremeno koeficijenti difuzije medijuma u nosače rastu, što znači da raste brzina difuzije medijuma u nosače (Tabela 13.). Vrednosti SDeq su više u PB 6,8 u odnosu na vrednosti u kiseljoj sredini, osim kod uzoraka PMAC-0N-L35 i PMAC-0N-L50 gde su vrednosti SDeq nešto manje u PB 6,8 (Tabela 13.). Ovo može biti posledica uspostavljanja većeg broja određenih interakcija između lipozoma i nosača kako raste udeo lipozomne suspenzije prisutne u nosačima. Podaci za osnovni uzorak PMAC-100N-0,2 prikazani su u Tabeli 6.

Tabela 13. Koeficijent difuzije ispitivanih sredina u PMAC/L nosača sa 100% neutralizacije MAA i različitim udelom lipozomne suspenzije

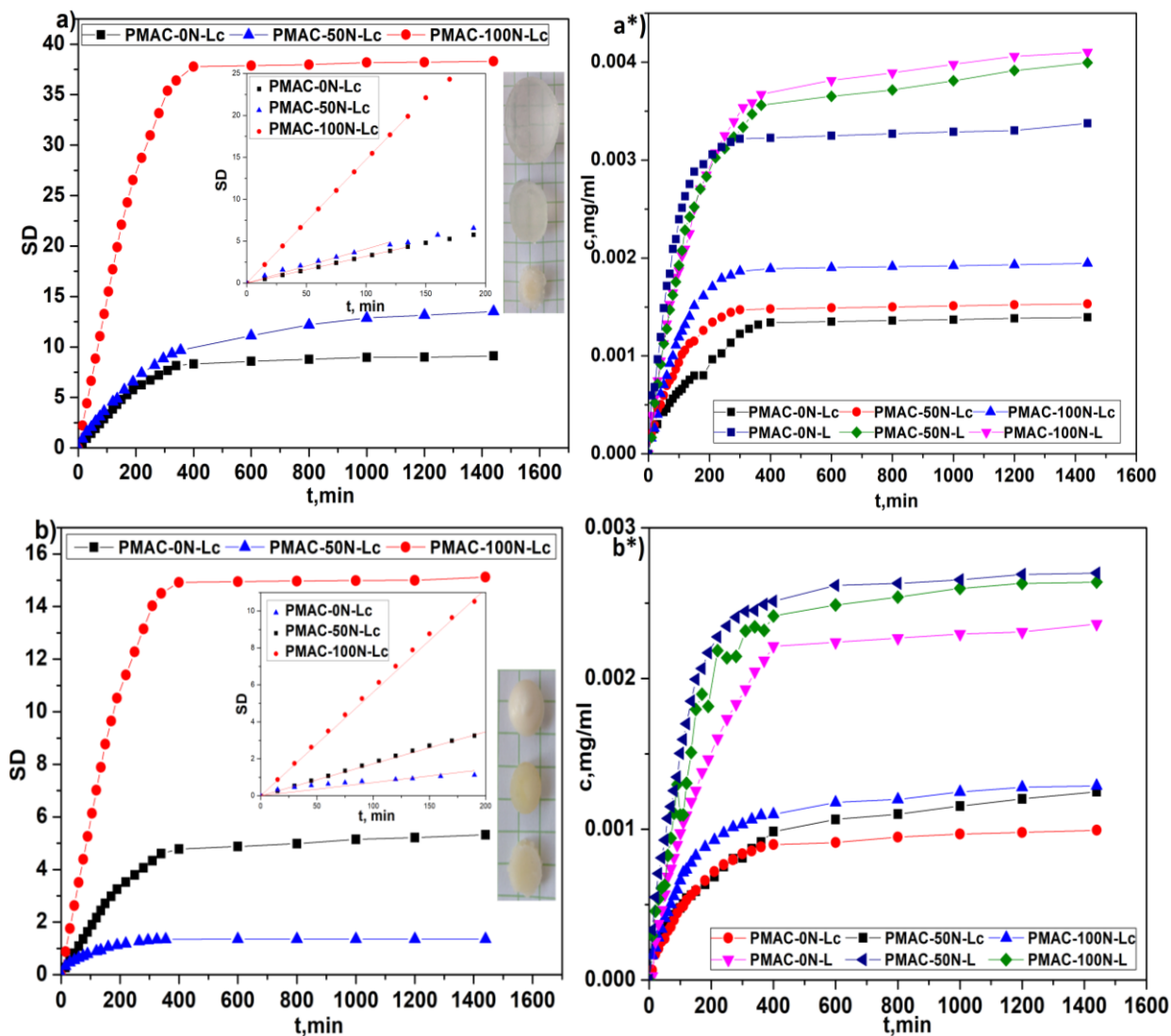
Uzorak	0,1 M HCl			PB 6,8		
	$k_D \cdot 10^2$ (min^{-1})	SDeq	$D_h \cdot 10^5$ (mm^2/min)	$k_D \cdot 10^2$ (min^{-1})	SDeq	$D_h \cdot 10^5$ (mm^2/min)
PMAC-0N-L15	5,60	12,1	0,842	2,83	16,4	0,816
PMAC-0N-L25	3,53	8,83	0,980	4,11	12,4	0,917
PMAC-0N-L35	3,65	8,45	1,09	3,90	6,25	1,00
PMAC-0N-L50	2,10	7,06	1,10	3,22	4,17	2,58
PMAC-100N-L15	0,966	11,7	0,980	2,10	42,2	0,922
PMAC-100N-L25	0,966	10,8	0,990	2,70	38,0	1,02
PMAC-100N-L35	3,50	9,53	1,02	1,35	33,6	1,16
PMAC-100N-L50	3,91	9,16	1,06	1,53	23,9	1,17

Kod obe serije uzoraka (i sa neneutralisanom i sa potpuno neutralisanom MAA) brzina difuzije kofeina u PB 6,8 slična je kod uzoraka sa 15% i 25% lipozomne suspenzije, a međusobno slične vrednosti parametara k_D takođe imaju uzorci sa 35% i 50% lipozomne suspenzije (Tabela 13). Sličan trend se može uočiti i kod difuzije kofeina u 0,1M HCl kada se radi o seriji uzoraka sa 100% neutralizacije MAA, dok je kod serije sa 0% neutralizacije MAA brzina difuzije kofeina je slična kod uzoraka sa 25% i 35% neutralizacije MAA.

4.2.4.4. Poređenje otpuštanja kofeina iz nosača sa suspenzijom lipozoma i nosača sa lipozomima koncentrovanim centrifugiranjem

U cilju dobijanja sistema sa pojedinačnim fosfolipidnim nanočesticama uniformno raspoređenim u unutrašnjosti nosača (Odeljak 4.1.2.), lipozomna suspenzija sa inkapsuliranim

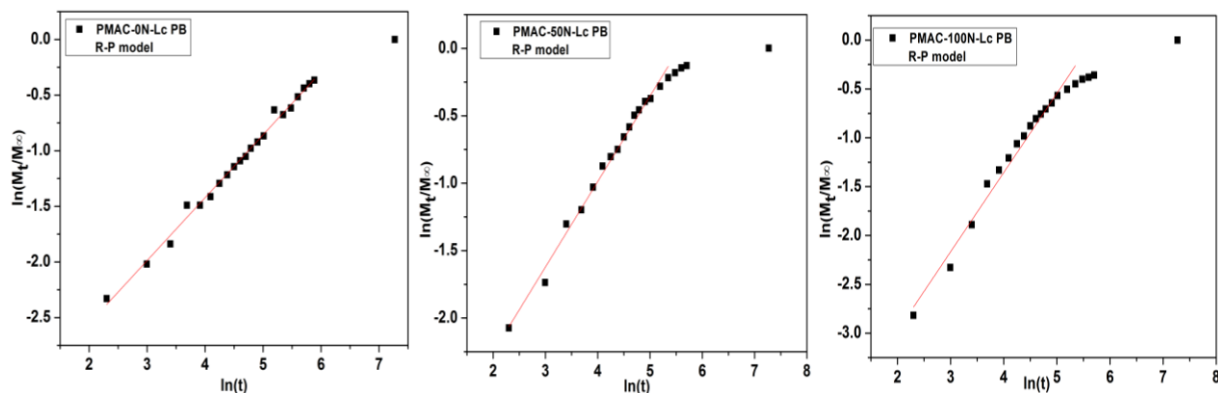
kofeinom je iscentrifugirana i korišćena za sinteze nosača sa različitim stepenom neutralizacije MAA. Praćeno je bubrenje nosača u dve sredine Pb 6,8 i 0,1M HCl i dobijene krive bubrenja prikazane su na Slici 67. a) i b) (manji grafik prikazuje određivanje nagiba krivih bubrenja ispitivanih uzorka). Uticaj stepena neutralizacije jasno se može videti na ovom grafiku: sa porastom stepena neutralizacije i pH vrednosti spoljašnje sredine rastu i vrednosti ravnotežnog stepena bubrenja. Takođe je praćeno i otpuštanje kofeina iz ovih uzoraka i upoređeno sa otpuštanjem iz polimernog nosača kada se u njemu nalazi lipozomna suspenzija. Dobijene krive otpuštanja u PB 6,8 i 0,1M HCl prikazane su na Slici 67. a*) i b*).



Slika 67. Krive bubrenja PMAC/L nosača u: a) PB 6,8 i b) 0.1M HCl i krive otpuštanja kofeina u: a*) PB 6,8 i b*) 0.1M HCl - uticaj oblika prisutne lipozomne formulacije: suspenzije ili koncentrovanih lipozoma dobijenih centrifugiranjem u PMAC/L nosaču sa 0%, 50% i 100% stepena neutralizacije MAA

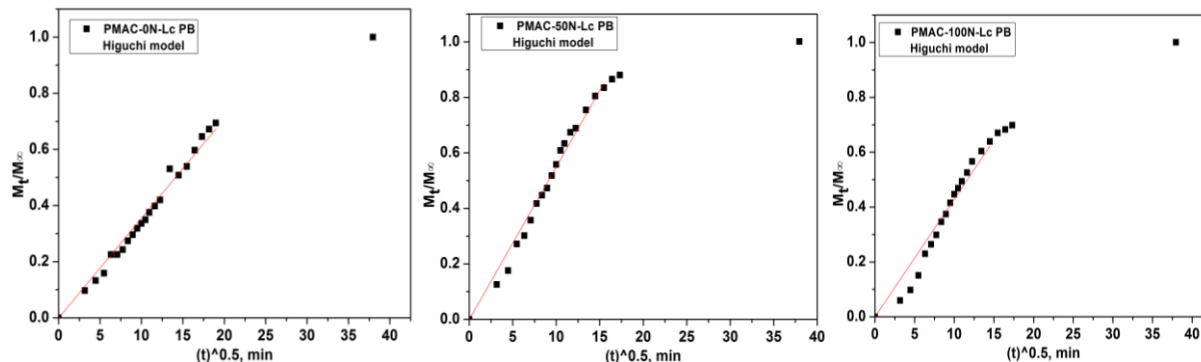
Otpuštanje kofeina u PB 6,8 sporije je iz sistema sa koncentrovanim lipozomima dobijenim centrifugiranjem u odnosu na sistem sa lipozomnom suspenzijom. Ovo može biti posledica veće kontaktne površine između lipozomnih čestica i mreže nosača, zbog čega je olakšano uspostavljanje interakcija između koncentrovanih lipozoma i polimernog nosača. Prolazak lipozomnih čestica kroz polimernu mrežu je zbog toga sporiji, tj. manji broj lipozoma se nalazi u spoljašnjem medijumu. Zbog toga se otpuštanje kofeina odvija kroz lipozomni omotač i mrežu nosača, za razliku od otpuštanja kofeina iz nosača sa lipozomnom suspenzijom gde se kofein istovremeno otpušta i iz nosača sa lipozomima i iz lipozoma koji su prošli kroz mrežu nosača. Takođe se može videti značajniji uticaj stepena neutralizacije na otpuštanje kofeina kod sistema u kome se nalaze koncentrovani lipozomi dobijeni centrifugiranjem, dok je uticaj stepena neutralizacije MAA na otpuštanje kod sistema sa lipozomnom suspenzijom neznatan. Posmatrani sistemi brže otpuštaju kofein u PB 6,8, osim uzorka sa 100% neutralizacije MAA koji neznatno sporije otpušta kofein u kiseljoj sredini. Na graficima se vidi da je otpuštanje model leka u 0,1M HCl iz polimernih nosača sa koncentrovanim lipozomima dobijenim centrifugiranjem slično za sva tri stepena neutralizacije, dok je uticaj stepena neutralizacije na otpuštanje u ovom medijumu jasno uočljiv za sisteme sa lipozomnom suspenzijom, za razliku od otpuštanja kofeina u PB 6,8.

Kako bi se ispitala kinetika otpuštanja u oba medijuma primenjeni su ranije korišćeni modeli. R-P model primenjen na eksperimentalne podatke nosača dobijene praćenjem otpuštanja kofeina u PB 6,8, prikazani su na Slici 68, a ostali grafici nisu prikazani zato što imaju isti oblik.



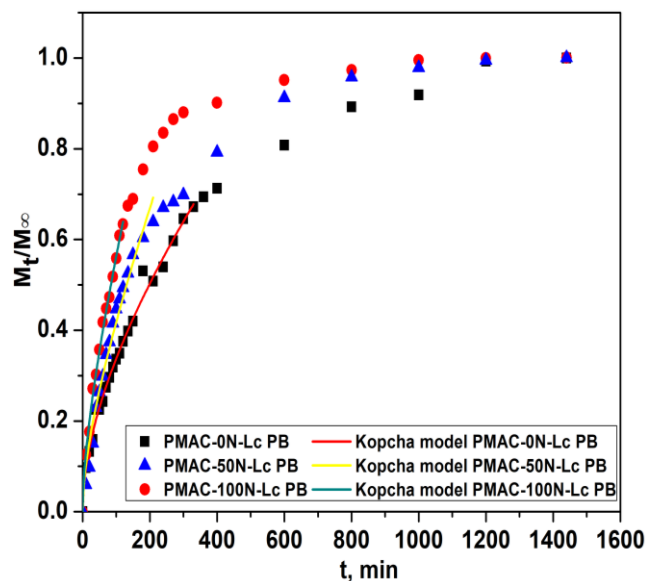
Slika 68. Primena R-P modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 0%, 50% i 100% neutralizacije MAA i različitim oblikom lipozomne formulacije u PB 6,8

Na graficima na Slici 69. prikazan je Higuchi model primenjen na dobijene krive otpuštanja kofeina u PB 6,8. Za ostale uzorke prikazane su samo vrednosti parametra u Tabeli 14.



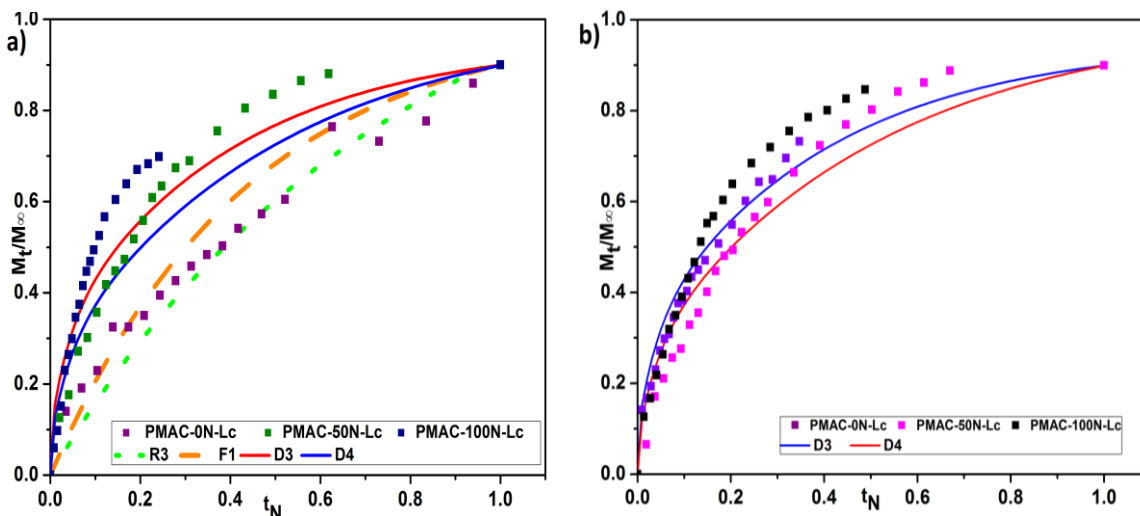
Slika 69. Primena Higuchi modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 0%, 50% i 100% neutralizacije MAA i različitim oblikom lipozomne formulacije u PB 6,8

Kumulativne krive otpuštanja kofeina u PB 6,8 i primenjen Kopcha model grafički su predstavljeni na Slici 70.



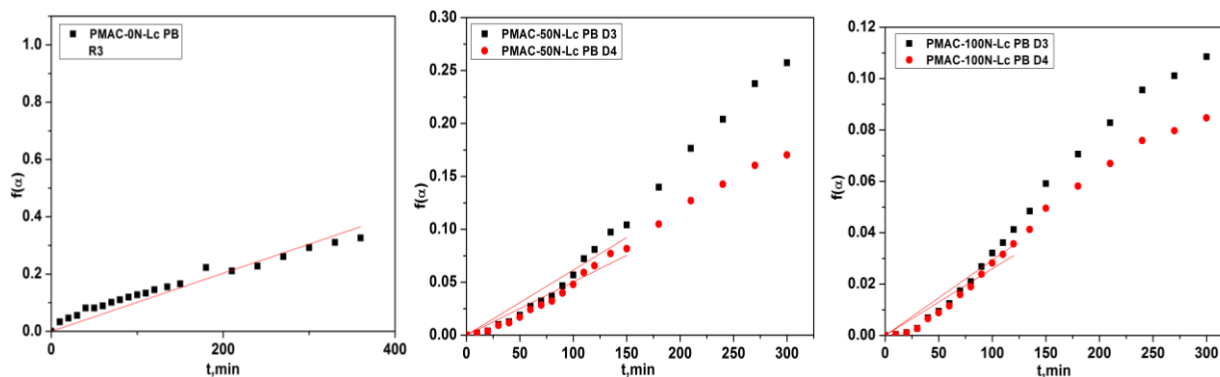
Slika 70. Primena Kopcha modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 0%, 50% i 100% neutralizacije MAA i različitim oblikom lipozomne formulacije u PB 6,8

Normalizovane krive otpuštanja kofeina u oba medijuma za sva tri sistema sa iscentrifugiranim lipozomima nalaze se na Slici 71. Može se videti da za otpuštanje kofeina u fosfatni pufer krive uzoraka sa 50% i 100% neutralizacije MAA prate D modele, dok bi uzorak sa 0% neutralizacije MAA mogao da se opiše R modelom.



Slika 71. Poklapanje normalizovanih krivih otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 0%, 50% i 100% neutralizacije MAA i različitim oblikom lipozomne formulacije u a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl sa modelima model fitting metoda

Na dobijenim graficima (Slika 72.) se vidi da nema poklapanja sa modelima, prema tome ovi modeli ne mogu dobro da opišu proces otpuštanja kofeina iz posmatranih nosača.



Slika 72. Provera odabranih modela na osnovu primene model fitting metoda na krive otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 0%, 50% i 100% neutralizacije MAA i različitim oblikom lipozomne formulacije u PB 6,8

Vrednosti parametara koji se odnose na brzinu otpuštanja kofeina iz uzorka PMAC-0N-Lc u 0,1M HCl slične su za R-P, Higuchi i Kopcha model, dok se one vrednosti koje se odnose na otpuštanje u PB 6,8 značajno razlikuju, što ukazuje da i relaksacija polimernih lanaca ima uticaj na proces otpuštanja kofeina (Tabela 14.). U ostalim slučajevima R-P model je predvideo da i difuzija i relaksacija imaju uticaj na otpuštanje model-leka, a slaganje sa D modelima je loše što je u skladu sa rezultatima koje je dao R-P model. Oblasti primene za prva tri modela su velike - do 80%, s obzirom da su ovi modeli inače primenjivi na prvih 60% otpuštene količine aktivne supstance. Slaganje sa ovim modelima je takođe zadovoljavajuće $R^2 \sim 0.990$. Slaganje

eksperimentalnih podataka sa ostalim modelima je nešto lošije. Dodatak kocentrovanih lipozoma dobijenih centrifugiranjem, uticao je na promenu modela kojima se može opisati otpuštanje kofeina iz sistema sa 0% neutralizacije MAA u PB 6,8. Naime, otpuštanje se može opisati R3 modelom, a kod osnovnog uzorka je moglo da se opiše D modelima. Takođe, kod uzorka sa 100% neutralizacije MAA i kocentrovanim lipozomima dobijenim centrifugiranjem otpuštanje kofeina u obe sredine može da se opiše D modelima, dok se kod osnovnog uzorka sa suspenzijom lipozoma otpuštanje kofeina u PB 6,8 poklapa sa F1 i R3 modelima. Podaci za osnovne uzorke bez prisutnih lipozoma prikazani su u Tabeli 5.

Tabela 14. Kinetički parametri dobijeni primenom matematičkih modela na krive otpuštanja kofeina iz PMAC/L nosača sa 0%, 50% i 100% neutralizacije MAA i različitim oblikom lipozomne formulacije u PB 6,8 i 0,1M HCl

Model	Uzorak	PMAC-0N-Lc		PMAC-50N-Lc		PMAC-100N-Lc	
		0,1 M HCl	PB 6,8	0,1 M HCl	PB 6,8	0,1 M HCl	PB 6,8
R-P	n	0,49	0,57	0,67	0,63	0,64	0,81
	$k \cdot 10^2$ (min^{-1})	3,99	2,51	2,05	2,94	2,64	1,01
	$\Delta\alpha$ (%)	73,3	69,4	86,2	75,5	63,9	56,6
	R^2	0,991	0,993	0,970	0,991	0,992	0,979
Higuchi	$k_H \cdot 10^2$	3,84	3,55	4,75	5,50	4,76	4,30
	$\Delta\alpha$ (%)	73,3	69,4	88,8	83,5	55,3	60,4
	R^2	0,999	0,997	0,996	0,997	0,992	0,988
Kopcha	$k_1 \cdot 10^2$	3,82	4,14	3,00	3,50	4,30	3,21
	$k_2 \cdot 10^3$	0,007	0,690	1,58	2,14	0,590	0,945
	$\Delta\alpha$	73,3	57,3	66,5	63,4	75,6	67,0
	R^2	0,997	0,994	0,992	0,996	0,985	0,972
R3	$k_{R3} \cdot 10^3$ (min^{-1})	-	1,01	-	-	-	-
	$\Delta\alpha$ (%)	-	69,4	-	-	-	-
	R^2	-	0,978	-	-	-	-
D3	$k_{D3} \cdot 10^4$ (min^{-1})	2,40	-	4,17	6,10	5,60	2,90
	$\Delta\alpha$ (%)	54,9	-	63,9	63,4	82,3	49,4
	R^2	0,994	-	0,959	0,966	0,987	0,960
D4	$k_{D4} \cdot 10^4$ (min^{-1})	2,10	-	3,31	0,500	3,92	2,59
	$\Delta\alpha$ (%)	54,9	-	59,9	63,4	63,9	49,4
	R^2	0,997	-	0,974	0,978	0,974	0,967

4.2.4.4.1. Koeficijent difuzije

Uticaj stepena neutralizacije jasno se odražava kroz vrednosti ravnotežnog stepena bubrenja uzoraka sa koncentrovanim lipozomima dobijenim centrifugiranjem: sa porastom stepena neutralizacije rastu i vrednosti S_{Deq} , a istovremeno opadaju vrednosti koeficijenta difuzije medijuma u nosače. Brzina difuzije kofeina iz nosača opada sa porastom stepena neutralizacije u PB 6,8. U kiseloj sredini prvo pada, da bi kod uzorka sa 100% neutralizacije porasla, kako se može videti po vrednostima parametara k_D u Tabeli 14. Isti trend je postojao i kod odgovarajućih uzoraka sa suspenzijom lipozoma, što znači da koncentrovanje lipozomne suspenzije centrifugiranjem nije imalo uticaj na difuziju kofeina iz nosača.

Tabela 15. Koeficijent difuzije ispitivanih sredina u PMAC/L nosača sa 0%, 50% i 100% neutralizacije MAA i različitim oblikom lipozomne formulacije

Uzorak	0,1M HCl			PB 6,8		
	$k_D \cdot 10^2$ (min^{-1})	S_{Deq}	$D_h \cdot 10^5$ (mm^2/min)	$k_D \cdot 10^2$ (min^{-1})	S_{Deq}	$D_h \cdot 10^5$ (mm^2/min)
PMAC-0N-Lc	3,82	1,36	2,19	4,14	9,11	1,17
PMAC-50N-Lc	3,01	5,32	1,08	3,50	13,5	0,967
PMAC-100N-Lc	4,30	15,1	0,830	3,20	38,3	0,716

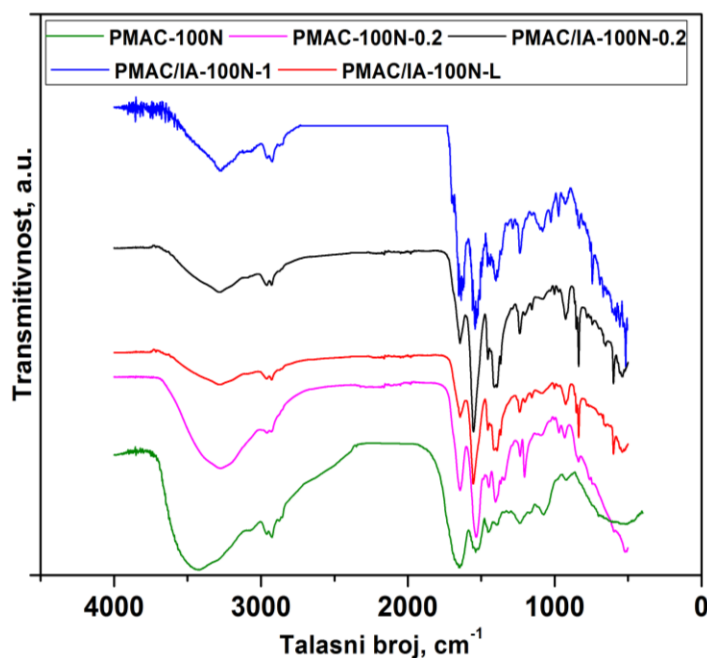
Koncentrovanje lipozoma centrifugiranjem rezultiralo je u ravnomerno raspoređenim pojedinačnim fosfolipidnim česticama po mreži nosača i većom kontaktnom površinom između lipozoma i mreže nosača, kao i veće ispunjenosti pora nosača lipozomnim česticama. To je dovelo do manjeg bubrenja nosača, a samim tim i sprečavanja mogućeg prolaska lipozoma kroz pore mreže nosača. Kao rezultat postignuta je bolja kontrola brzine otpuštanja kofeina, pa je to usmerilo dalji put analize ponašanja nosača.

4.2.5. Uticaj prisustva itakonske kiseline

Kako bi se ispitala mogućnost zamene dela MAA itakonskom kiselinom (IA), koja se dobija iz bioobnovljivih izvora i poseduje dve karboksilne grupe, pa tako povećava funkcionalnost mreže nosača, sintetisana je i karakterisana posebna serija uzoraka sa IA. U sintetisanoj seriji PMAC sistema sa IA ostali parametri sinteze su: 100% neutralisana MAA, tri različite koncentracije kofeina (inicijalne mase kofeina bile su 0,2g; 1g i 2g) i jedan sistem u kome su prisutni i lipozomi (50% lipozomne suspenzije u odnosu na količinu destilovane vode dodate u reakcionu smešu).

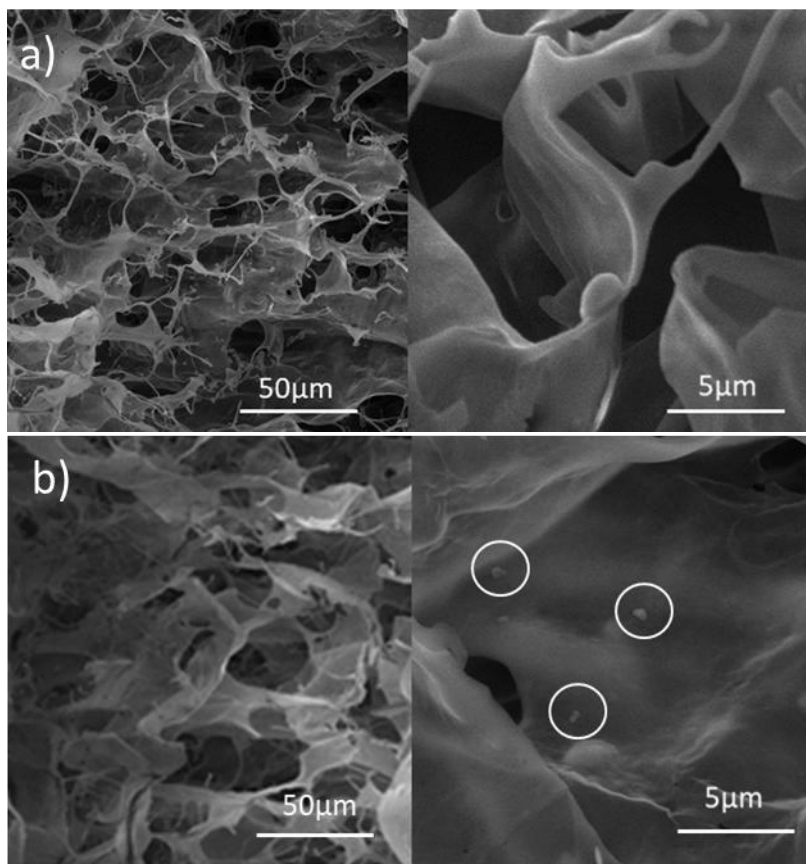
Dobijeni FTIR spektri uzoraka sa itakonskom kiselinom predstavljeni su zajedno sa FTIR spektrima PMAC uzoraka bez (PMAC-100N) i sa kofeinom (PMAC-100N-0,2), radi poređenja (Slika 73.). FTIR spektri uzoraka sa itakonskom kiselinom poseduju iste karakteristične pikove komponenti kao i FTIR spektri odgovarajućih uzoraka bez itakonske kiseline. Ipak, može se uočiti da FTIR spektri uzoraka sa IA imaju izraženije pikove na 1540 cm^{-1} (simetrične vibracije

rastezanja C(=O)-O⁻) i 1645 cm⁻¹ (C(=O)-OH simetrične vibracije savijanja) zbog prisutnog većeg broja -COO⁻ i -COOH grupa, jer IA ima dve karboksilne grupe u svojoj strukturi [299].



Slika 73. FTIR spektri PMAC i PMAC/L nosača sa 100% neutralizacije MAA i dodatom itakonskom kiselinom

Dobijeni SEM mikrografi polimernih nosača sa dodatom itakonskom kiselinom bez i sa lipozoma prikazani su na Slici 74. a) i b) respektivno. Može se videti da je dodatak IA doveo do promene strukture u odnosu na odgovarajući polimerni nosač sa 100% neutralizacije bez itakonske kiseline. Struktura polimernog nosača je neregularna, „iscepkana” sa velikim šupljinama, što je u skladu sa činjenicom da se dodatkom itakonske kiseline povećava i ravnotežni stepen bubrenja ovih hidrogelova (Slika 74. a) i b)). Micele kazeina se ne vide zbog prethodno pomenute činjenice da je došlo do njihove disocijacije u baznoj sredini tokom sinteze nosača (Slika 74. a) i b)). SEM mikrografi polimernih nosača sa dodatom itakonskom kiselinom i lipozomima u kojima je inkapsuliran kofein, prikazani su na Slika 74. b) gde se može videti ista struktura kao i kod uzorka bez lipozoma (Slika 74. a)), a lipozomi se nalaze u obliku pojedinačnih čestica raspoređenih po zidovima matrice nosača.



Slika 74. SEM mikrografi: a) PMAC/IA-100N-0,2 i b) PMAC/IA-100N-L

4.2.5.1. Stepen inkapsulacije kofeina

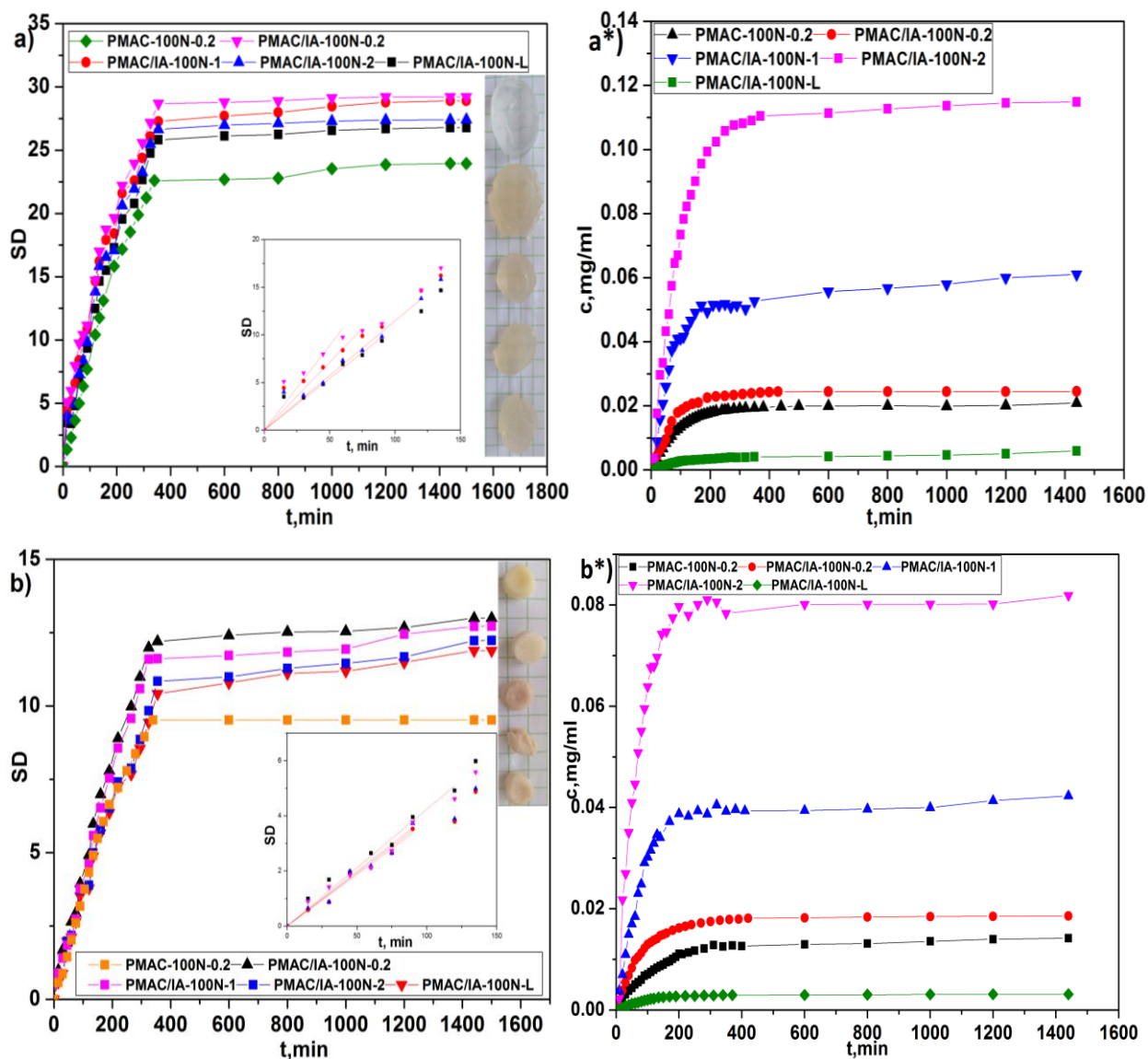
Stepeni inkapsulacije kofeina u uzorcima sa itakonskom kiselinom PMAC/IA-100N-0,2, PMAC/IA-100N-1 i PMAC/IA-100N-2 iznosili su 100%, 81% i 65%, respektivno. Može se zaključiti da sa porastom početne količine kofeina opadaju stepeni inkapsulacije. Isti trend je bio prisutan i kod osnovnih uzoraka bez itakonske kiseline (Odeljci 4.2.1.3. i 6.2.3.3.).

Stepen inkapsulacije kofeina u lipozomima pripremljenim sa kofeinom u koncentraciji od 20 mg/ml kofeina, koji su inkorporirani u polimerni nosač, bio je $84,8 \pm 2,58\%$.

4.2.5.2. Kinetika otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa itakonskom kiselinom

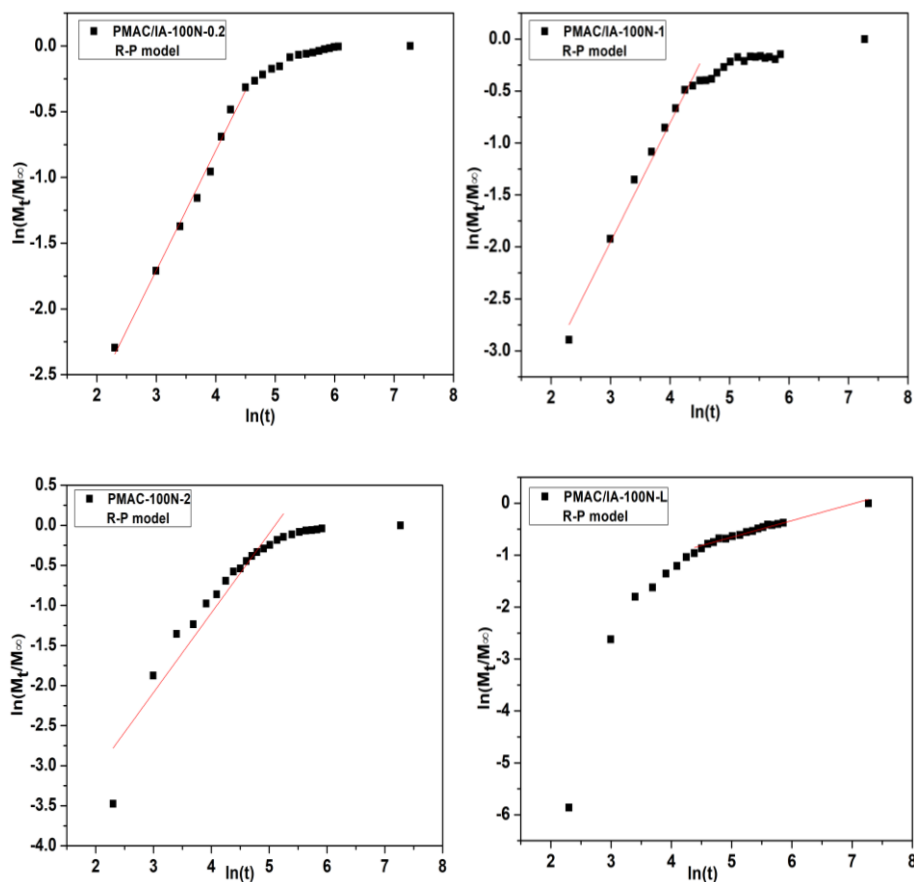
Ispitan je uticaj prisustva IA na otpuštanje model-leka i bubrenje nosača. Na Slici 75. a) i b) su prikazane krive bubrenja u dve sredine različitih pH vrednosti. Serija uzoraka sa IA ima veće vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja i brže bubri u odnosu na osnovne uzorke bez itakonske kiseline. Razlog za ovakvo ponašanje je prisustvo većeg broja karboksilnih grupa u

sistemu (IA ima dve karboksilne grupe) na kojima se generiše negativno naelektrisanje, pa je i jače odbijanje polimernih lanaca i brže bubrenje. Serija uzoraka sa IA više bubri u PB 6,8 (Slika 75. a)) u odnosu na kiselu sredinu gde su vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja duplo manje (Slika 75. b)). Takođe, sa porastom količine kofeina u ovim sistemima dolazi do smanjenja vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja i smanjenja brzine bubrenja. Interakcije kofeina sa metakrilnom i itakonskom kiselinom koje se mogu uspostaviti, mogu uticati na manje odbijanje polimernih lanaca, a samim tim i sporije bubrenje. Inkorporiranje lipozoma u sistem sa IA utiče na smanjenje stepena bubrenja i takvi sistemi imaju najmanje vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja u odnosu na ostale uzorke iz ove grupe. Difuzija spoljašnjeg medijuma u nosač verovatno je usporena zbog fizičkog prisustva lipozoma u porama mreže nosača, kao i uspostavljenih interakcija između lipozoma i kazeina.



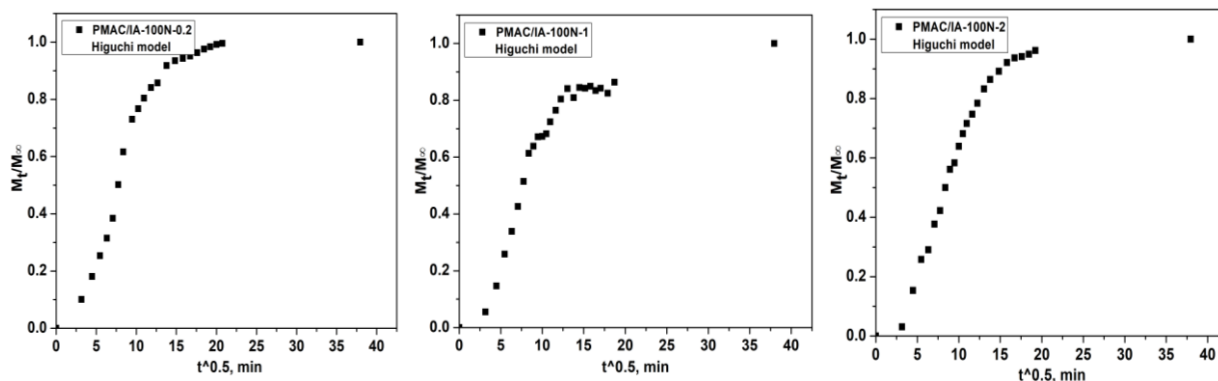
Slika 75. Krive bubrenja PMAC i PMAC-L sistema sa itakonskom kiselinom u: a)PB 6,8 i b)0,1M HCl i krive otpuštanja kofeina iz istih sistema u: a*) PB 6,8 i b*)0,1M HCl

Sa grafika na kome su prikazane krive otpuštanja u obe sredine (Slika 75. a*) i b*)), može da se vidi da prisustvo itakonske kiseline ubrzava otpuštanje kofeina u odnosu na osnovni uzorak bez IA - PMAC-100N-0,2. Brže otpuštanje model leka je i očekivano s obzirom da ova kiselina ima dve karboksilne grupe. Naime, deprotonovanjem karboksilnih grupa dolazi do generisanja negativnog naboja, usled čega je i jače odbijanje polimernih lanaca. Ovo dalje utiče na povećanje hidrofилnosti mreže nosača i veće vrednosti stepena bubrenja. Sa povećanjem veličine pora u ovom hidrogelskom nosaču lakše se i oslobađa inkapsulirana aktivna supstanca. Brže otpuštanje kofeina u kiseloj sredini može biti posledica već pomenute degradacije kazeina u kiseloj sredini. Takođe je moguće da je u kiseloj sredini došlo do lokalizovane micelarizacije kazeina u određenim oblastima u mreži nosača, usled čega je došlo do slabljenja interakcija između kazeina i kofeina. Postoji mogućnost i da su se prilikom otpuštanja u PB 6,8 ostvarile neke jače interakcije između kofeina i itakonske kiseline, s obzirom na prisustvo većeg broja deprotonovanih karboksilnih grupa, pa je i oslobađanje kofeina otežano. U cilju ispitivanja kinetike otpuštanja model leka primenjeni su odgovarajući matematički modeli na dobijene eksperimentalne podatke.



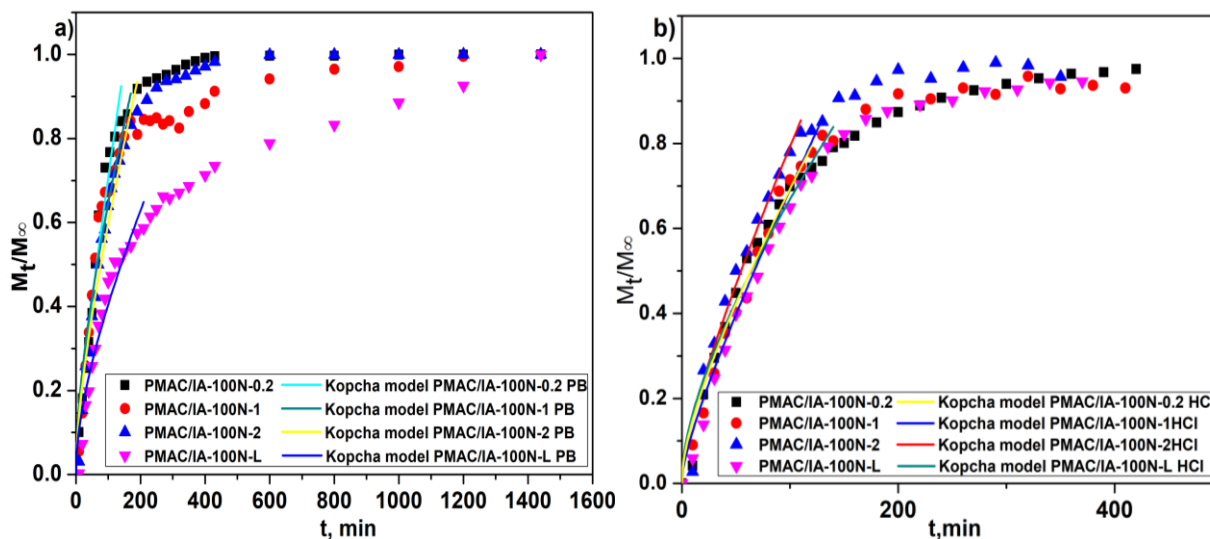
Slika 76. Primena R-P modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa itakonskom kiselinom u PB 6,8

Na graficima na Slici 76. su prikazane $\ln(M_t/M_\infty)$ - $\ln(t)$ zavisnosti R-P modela primenjene na eksperimentalne podatke dobijene praćenjem otpuštanja kofeina iz posmatranih uzoraka u PB 6,8. Za ostale uzorke su prikazane samo dobijene vrednosti parametara ovog modela (Tabela 16.), zato što su zavisnosti sličnog oblika kao i one prikazane na Slici 76.



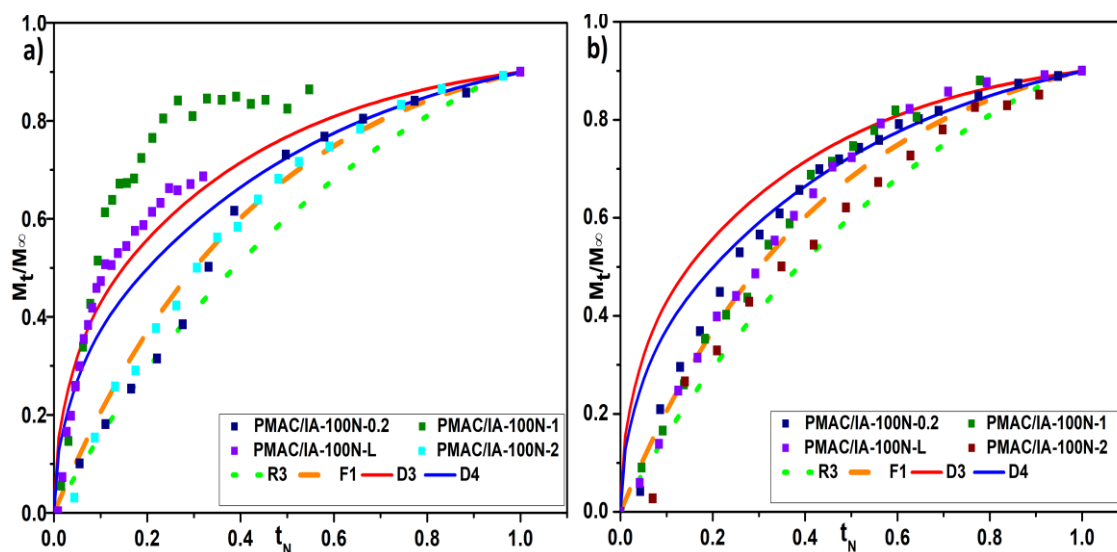
Slika 77. Primena Higuchi modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa itakonskom kiselinom u PB 6,8

Slaganje podataka, koji su dobijeni praćenjem otpuštanja kofeina iz nosača sa itakonskom kiselinom, sa Higuchi modelom je loše, što se može videti iz priloženih grafika (Slika 77.). Slaganje sa Kopcha modelom prilično je dobro (Slika 78.) i sa velikom oblašću primene ovog modela.

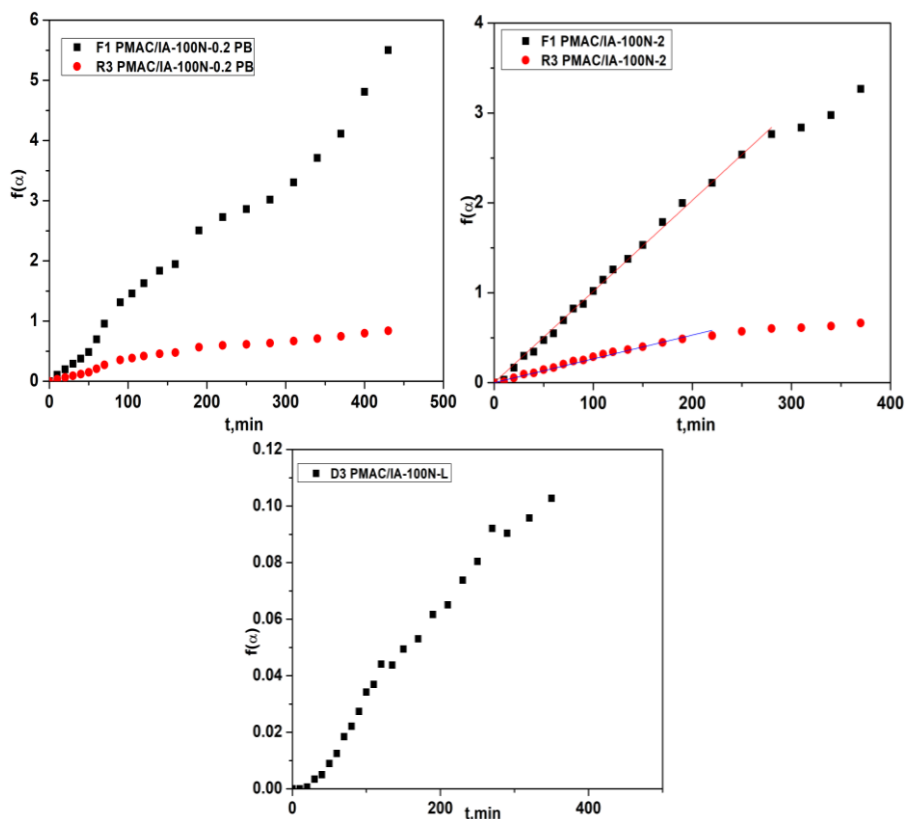


Slika 78. Primena Kopcha modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa itakonskom kiselinom u: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl

Normalizovane kumulativne krive otpuštenog model-leka iz posmatranih sistema u obe sredine prikazane su na Slici 79.



Slika 79. Poklapanje normalizovanih krivih otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa itakonskom kiselinom u a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl sa modelima model fitting metoda



Slika 80. Provera odabranih modela na osnovu primene model fitting metoda na krive otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa itakonskom kiselinom u PB 6,8

Tabela 16. Kinetički parametri dobijeni primenom matematičkih modela na krive otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa itakonskom kiselinom u PB 6,8 i 0,1M HCl

Model	Uzorak	PMAC/IA-100N-0,2		PMAC/IA-100N-1		PMAC/IA-100N-2		PMAC/IA-100N-L	
		0,1MHCl	PB 6,8	0,1MHCl	PB 6,8	0,1MHCl	PB 6,8	0,1MHCl	PB 6,8
R-P	n	0,68	0,91	0,83	1,14	0,64	0,99	0,92	0,32
	$k \cdot 10^2$ (min^{-1})	3,02	1,18	1,49	0,460	3,97	0,63	0,920	10,4
	$\Delta\alpha$ (%)	75,9	67,2	80,6	56,1	90,7	74,8	82,2	58,1
	R^2	0,979	0,991	0,980	0,982	0,991	0,907	0,969	0,964
Kopcha	$k_1 \cdot 10^2$	3,67	2,96	2,50	4,80	3,44	3,82	2,65	3,09
	$k_2 \cdot 10^3$	3,26	4,10	4,41	1,65	4,48	2,15	3,65	0,960
	$\Delta\alpha$	74,3	84,1	81,9	84,1	82,6	86,5	79,2	57,5
	R^2	0,972	0,968	0,989	0,947	0,974	0,971	0,986	0,939
R3	$k_{R3} \cdot 10^3$ (min^{-1})	-	-	-	-	3,66	2,65	-	-
	$\Delta\alpha$ (%)	-	-	-	-	97,3	89,2	-	-
	R^2	-	-	-	-	0,996	0,995	-	-
F1	$k_{F1} \cdot 10^2$ (min^{-1})	1,50	-	1,23	-	-	1,01	1,10	-
	$\Delta\alpha$ (%)	81,8	-	91,7	-	-	93,7	87,6	-
	R^2	0,996	-	0,961	-	-	0,999	0,946	-

R-P model je pokazao da i difuzija i relaksacija polimernih lanaca imaju uticaj na otpuštanje kofeina, osim kod otpuštanja kofeina iz uzorka PMAC/IA-100N-1 gde je u pitanju super tip II transporta, tj. da je oslobađanje kofeina vođeno isključivo relaksacijom polimernih lanaca. Konstante k imaju veće vrednosti za 0,1M HCl što znači da je u ovoj sredini i otpuštanje bilo brže. Oblasti primene ovog modela na eksperimentalne podatke su velike čak do 90%, kao i kod Kopcha modela, kod koga su takođe visoke i vrednosti koeficijenata korelacije što znači da je dobro i poklapanje ovog modela sa eksperimentalnim podacima. Kopcha model je dao značajno veće vrednosti (čak za jedan red veličine) koeficijenata koji se odnose na brzinu difuzije u odnosu na koeficijente koji pokazuju brzinu relaksacije polimernih lanaca, pa bi se prema ovom modelu moglo zaključiti da je difuzija dominant tip transporta kofeina. Kod svih uzoraka kinetika otpuštanja kofeina u 0,1M HCl bi mogla da se opiše prvim redom reakcije, osim kod uzorka PMAC/IA-100N-2 kod koga otpuštanje kofeina u PB 6,8 može opisati i R3 modelom, tj. otpuštanje je kontrolisano reakcijama na granici faza. R3 model dobro opisuje otpuštanje kofeina iz ovog uzorka i u 0,1M HCl. Iz svega prikazanog može da se zaključi da otpuštanje kofeina iz uzoraka sa IA opisuju isti modeli koji opisuju i otpuštanje kofeina iz osnovnog uzorka bez IA. U Tabeli 5. prikazani su podaci za osnovni uzorak PMAC-100N-0,2; u Tabeli 9. za osnovne uzorke PMAC-100N-1 i PMAC-100N-2; a u Tabeli 12. za osnovni uzorak PMAC-100N-L50.

4.2.5.3. Koeficijent difuzije

Vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja uzoraka sa dodatom itakonskom kiselinom su više od vrednosti osnovnog uzorka PMAC/IA-100N-0,2 i u PB 6,8 i u 0,1M HCl. Takođe, vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja opadaju sa porastom koncentracije kofeina u nosačima kao i kada se doda lipozomna suspenzija (Tabela 17.). Moguće da je slabije bubrenje uzrok uspostavljenog većeg broja interakcija između kofeina i polimernog nosača, pa je manji broj jonizovanih grupa koje se odbijaju, usled čega nosači manje bubre. Slabije bubrenja uzoraka sa lipozomima može da bude posledica prisustva lipozoma u porama polimernog nosača i uspostavljenih interakcija između ovih fosfolipidnih nanočestica i polimernog sistema. Isti trend se može videti i za bubrenje uzoraka u 0,1M HCl, samo su vrednosti SDeq manje zbog već objašnjene činjenice da ovi sistemi na bazi metakrilne kiseline i kazeina slabije bubre u kiseloj sredini. Takođe, sa porastom stepena bubrenja opadaju vrednosti koeficijenata difuzije medijuma u nosače (Tabela 17.). Brzina difuzije kofeina iz nosača prvo opada sa dodatkom itakonske kiseline i porastom koncentracije kofeina u ovakvom sistemu, da bi kod uzorka sa najvećom koncentracijom kofeina porasla, verovatno zbog veće pogonske sile. Difuzija kofeina je najsporija kada se kofein otpušta iz nosača sa lipozomima što je bilo i poželjno i očekivano zbog otpora difuziji koji pružaju lipozomi i matriks nosača. Vrednosti ispitivanih parametara osnovnih uzoraka prikazani su Tabelama 6, 10. i 13.

Tabela 17. Koeficijent difuzije ispitivanih sredina u PMAC i PMAC-L sistema sa itakonskom kiselinom

Uzorak	0,1M HCl			PB 6,8		
	$k_D \cdot 10^2$ (min^{-1})	SDeq	$D_h \cdot 10^6$ (mm^2/min)	$k_D \cdot 10^2$ (min^{-1})	SDeq	$D_h \cdot 10^5$ (mm^2/min)
PMAC/IA-100N-0,2	4,14	13,0	0,766	1,11	29,2	2,90
PMAC/IA-100N-1	1,77	12,7	0,779	0,580	28,9	1,91
PMAC/IA-100N-2	3,12	12,2	0,776	3,26	27,4	1,37
PMAC/IA-100N-L	1,46	11,9	0,829	0,360	26,8	1,28

Prisustvo itakonske kiseline uticalo je na povećanje vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja i brzine difuzije spoljašnjeg medijuma u ispitivane nosače sa IA. Takođe, prisustvo IA je uticalo na povećanje brzine otpuštanja slabovodorastvorne supstance (povećenje vrednosti k_D).

4.2.6. Uticaj prisustva 1,6 mol% umreživača u odnosu na MAA

Na osnovu svih prethodno dobijenih podataka i njihove detaljne analize, može se zaključiti da se uzorak sa 1,6mol% umreživača u odnosu na MAA - PMAC-100N-4M-0,2 pokazao kao najbolji, tj. kontrola otpuštanja kofeina je bila najbolja. Zato je sintetisana serija nosača sa 1,6mol% umreživača i 100% neutralisanom MAA, kako bi se ispitala kinetika

otpuštanja kofeina kada se kod ovakvih sistema varira koncentracija kofeina i kada se u sistem doda suspenzija lipozoma (50% lipozomne suspenzije u odnosu na destilovanu vodu).

4.2.6.1. Stepen inkapsulacije kofeina

Stepeni inkapsulacije kofeina u seriji uzoraka sa 1,6mol% umreživača u odnosu na MAA: PMAC-100N-4M-0,2; PMAC-100N-4M-1 i PMAC-100N-4M-2 iznosili su 95%; 70% i 61%, respektivno. Može se primetiti da kao i kod prethodnih serija stepen inkapsulacije kofeina opada sa porastom početne koncentracije kofeina.

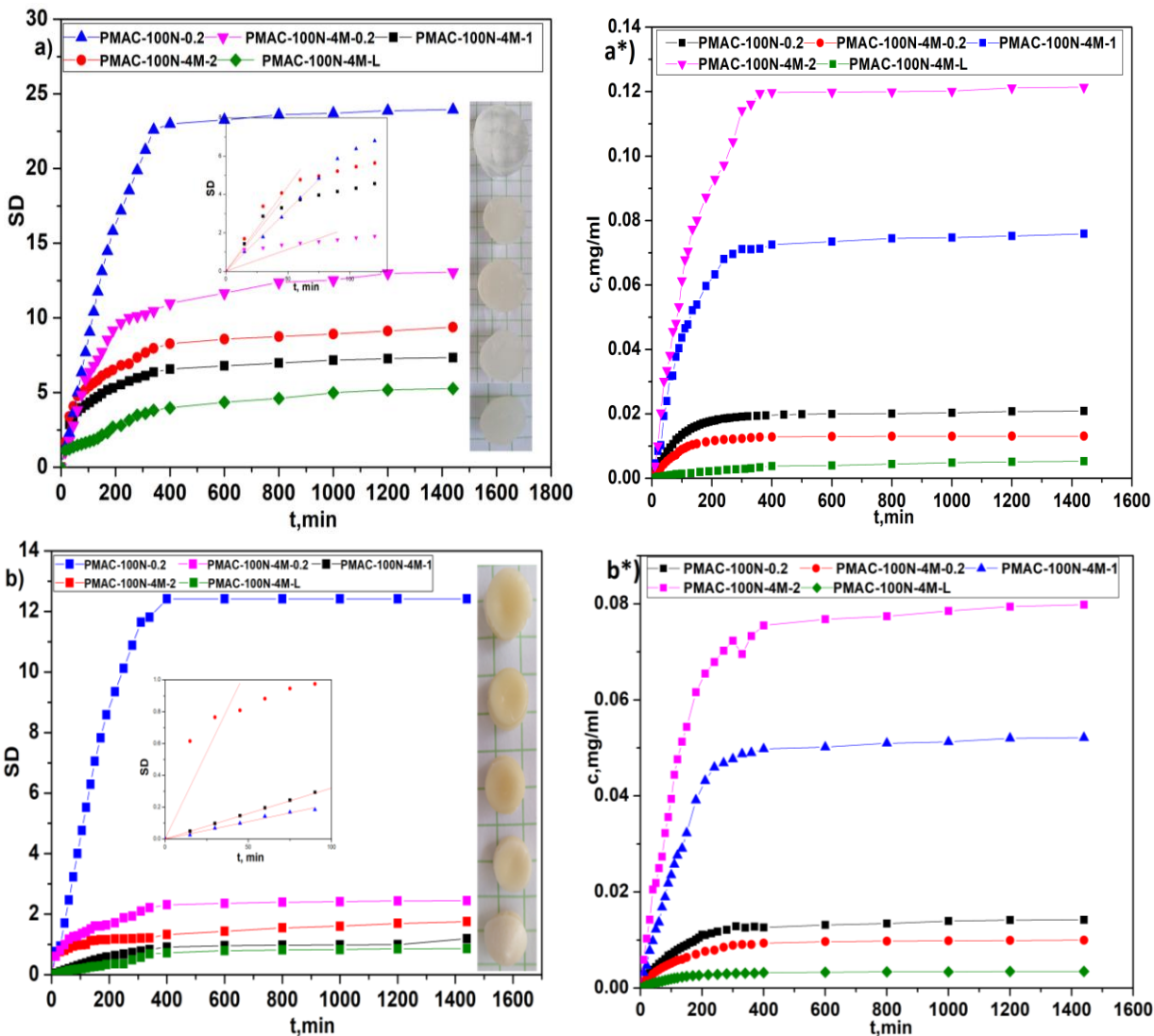
Stepen inkapsulacije kofeina u lipozomima pripremljenim sa kofeinom u koncentraciji od 20 mg/ml kofeina, koji su inkorporirani u polimerni nosač, bio je $84,8 \pm 2,58\%$.

4.2.6.2. Kinetika otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa 1,6 mol% umreživača u odnosu na MAA

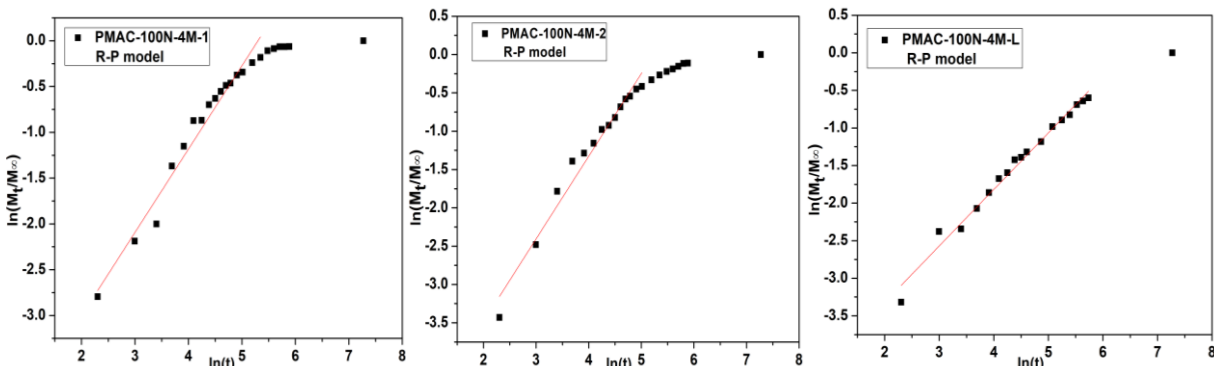
Krive bubrenja ispitivanih sistema u dve sredine: PB 6,8 i 0,1M HCl prikazane su na Slici 81. a) i b). Može se videti da bubrenje prati isti trend kao i kod ostalih ispitanih uzoraka: sa povećanjem pH vrednosti spoljašnje sredine nosači više bubre i sa povećanjem koncentracije umreživača vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja opadaju.

Na Slici 81. a*) i b*) su prikazane krive otpuštanja kofeina u istim sredinama u kojima je praćeno i bubrenje i može se videti da je povećanje koncentracije umreživača značajno usporilo oslobađanje aktivne supstance u odnosu na osnovni uzorak sa 0,4 mol% umreživača.

U kiseloj sredini oslobađanje kofeina je sporije (krive otpuštanja imaju blaže nagibe), a ukupna oslobođena količina je manja u odnosu na oslobođenu količinu kofeina u PB 6,8. Takođe se može videti da dodatak suspenzije lipozoma ovakvom sistemu dodatno usporava oslobađanje model leka, dok je oslobađanje kofeina iz uzorka sa većom početnom količinom model leka sporije od oslobađanja kofeina iz osnovnog nosača koji je manje umrežen (0,4 mol% u odnosu na MAA). Ovo je ukazalo na mogućnost da se dalje istraži kontrolisano i produženo oslobađanje većih koncentracije kofeina iz ovakvih sistema.

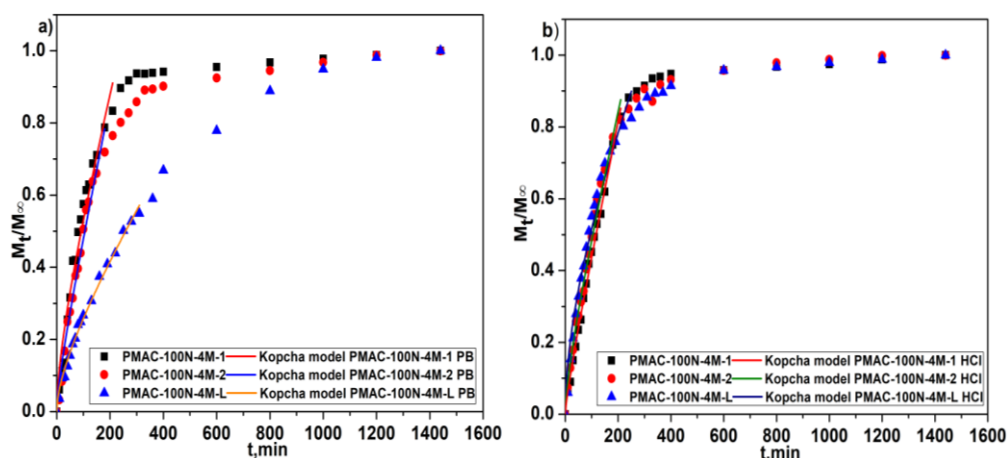


Slika 81. Krive bubrenja PMAC i PMAC-L sistema sa 1,6 mol% umreživača u odnosu na MAA: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl i krive otpuštanja kofeina iz istih sistema u: a*) PB 6,8 i b*) 0,1M HCl



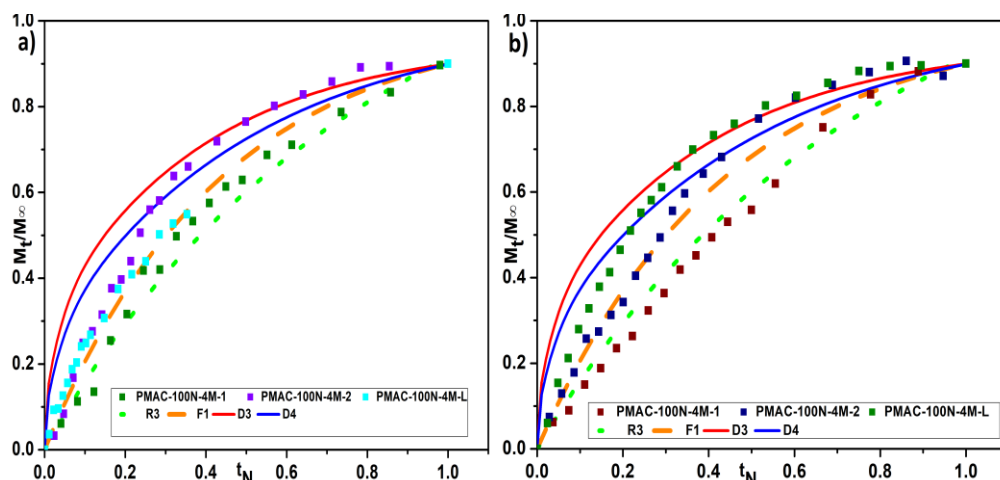
Slika 82. Primena R-P modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa 1,6 mol% umreživača u odnosu na MAA u PB 6,8

Na Slici 82. su predstavljeni R-P modeli primenjeni na podatke koji se odnose na otpuštanje kofeina u PB 6,8, dok su za ostale slučajeve parametri ovog modela prikazani tabelarno (Tabela 18.). Kopcha model primenjen na kumulativnim krivim u oba medijuma u kojima je praćeno otpuštanje kofeina prikazan je na Slici 83.



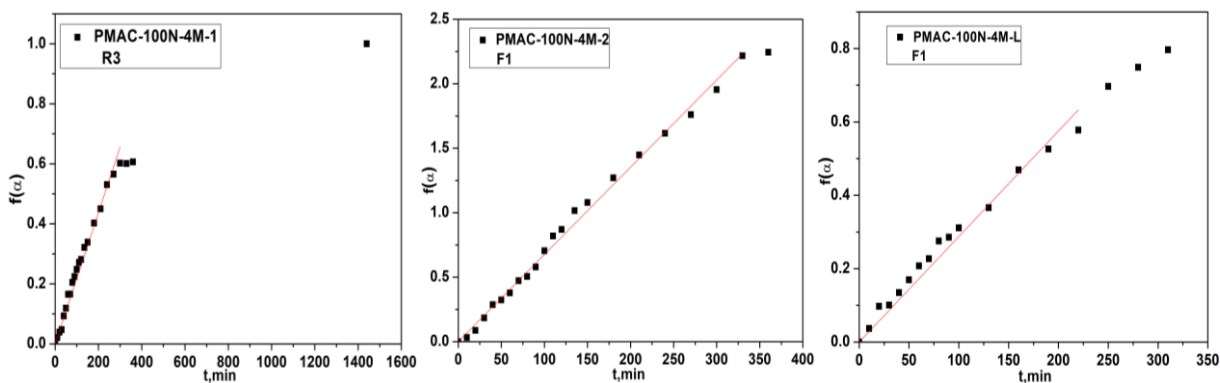
Slika 83. Primena Kopcha modela na profile otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa 1,6 mol% umreživača u odnosu na MAA u: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl

Sa grafika kumulativnih krivih (Slika 83. a) i b)) se vidi da je 60% kofeina od njegove ukupne otpuštene količine oslobođeno za prvih 6 sati iz PMAC-100N-4M-L u PB 6,8, dok je kod ostalih uzoraka ta količina model leka oslobođena za 4 sata. Jasno je da je nosač koji sadrži liposome otpustio manju količinu model leka u prvih par sati u odnosu na ostale uzorke iz ove grupe. Kada se radi o otpuštanju u kiseljoj sredini, otpuštena je najveća količina model leka od ukupno otpuštene (koja je manja od ukupno otpuštene količine kofeina u PB 6,8) za prvih 3 sata kod svih uzoraka. Konstruisane su i normalizovane kumulativne krive kako bi se utvrdilo koji model iz grupe modela koje su predložili Adnađević i sar. bi mogao da opiše kinetiku otpuštanja kofeina (Slika 84. a) i b)).



Slika 84. Poklapanje normalizovanih krivih otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa 1,6 mol% umreživača u odnosu na MAA u a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl sa modelima model fitting metoda

Iz grafički predstavljenih normalizovanih krivih se vidi da bi otpuštanje kofeina iz uzorka PMAC-100N-4M-1 u PB 6,8 moglo da se opiše R3 modelom, dok bi F1 model mogao da odgovara podacima dobijenim za ostale uzorke iz ove grupe (Slika 84. a)). Kada se radi o otpuštanju model-leka u kiseljoj sredini treba proveriti da li se dobijaju pravolinijske zavisnosti za R3 model primenjen na podatke koji su dobijeni za uzorak PMAC-100N-4M-L i F1 model za ostale uzorke (Slika 84. b)). Dobijene pravolinijske zavisnosti za PB 6,8 prikazane su na Slici 85.



Slika 85. Provera odabranih modela na osnovu primene model fitting metoda na krive otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa 1,6 mol% umreživača u odnosu na MAA u PB 6,8

Tabelarno su predstavljene određene vrednosti parametara primenjenih modela i može se videti iz priložene tabele (Tabela 18.) da je R-P model predvideo da otpuštanje kofeina kontrolišu oba transportna mehanizma i difuzija i relaksacija polimernih lanaca. Samo se oslobađanje kofeina iz uzorka PMAC-100N-4M-2 u PB 6,8 odvija super II tipom transporta, tj. otpuštanje je isključivo kontrolisano relaksacijom polimernih lanaca. Vrednost koeficijenta koji pokazuje brzinu otpuštanja kofeina za ovaj slučaj ima sličnu vrednost kao i dobijeni koeficijent

koji se odnosi na deo jednačine koji odgovara relaksaciji polimernih lanaca, kada se na eksperimentalne podatke primeni Kopcha model. Slaganje podataka sa oba ova modela je dobro (visoke vrednosti R^2). Oblasti primene su takođe velike - mogu se primeniti i do 80% otpuštene količine model leka. Kada je reč o slaganju eksperimentalnih podataka sa ostalim modelima, otpuštanje kofeina iz PMAC-100N-4M-1 u obe sredine fazno je kontrolisano i može se opisati R3 modelom (isti tip modela kao i kod osnovnog uzorka sa 0,4mol% umreživača u odnosu na MAA). U ostalim slučajevima oslobađenje model-leka u obe sredine prati prvi red reakcije, tj. može se opisati F1 modelom (dok je kod osnovnog uzorka 0,4mol% umreživača i 2 g kofeina otpuštanje u PB 6,8 moglo da se opiše D modelom). Oblasti primene i stepeni korelacije za ove modele su takođe veliki. Podaci za osnovni uzorak PMAC-100N-0,2 prikazani su u Tabeli 5; za osnovne uzorke PMAC-100N-1 i PMAC-100N-2 u Tabeli 9; a za osnovni uzorak PMAC-100N-L50 u Tabeli 12.

Tabela 18. Kinetički parametri dobijeni primenom matematičkih modela na krive otpuštanja kofeina iz PMAC i PMAC-L sistema sa 1,6 mol% umreživača u odnosu na MAA u PB 6,8 i 0,1M HCl

Model	Uzorak	PMAC-100N-4M-1		PMAC-100N-4M-2		PMAC-100N-4M-L	
		0,1M HCl	PB 6,8	0,1M HCl	PB 6,8	0,1M HCl	PB 6,8
R-P	n	0,89	0,91	0,81	1,1	0,80	0,75
	$k \cdot 10^2$ (min^{-1})	0,734	0,810	1,20	0,360	1,31	0,800
	$\Delta\alpha$ (%)	88,2	68,7	82,0	66,0	80,2	54,9
	R^2	0,994	0,966	0,995	0,97	0,968	0,984
Kopcha	$k_1 \cdot 10^2$	1,41	3,11	2,15	1,71	1,26	1,70
	$k_2 \cdot 10^3$	3,36	2,19	2,68	3,08	0,900	0,880
	$\Delta\alpha$	82,8	83,4	82,2	71,9	80,2	54,9
	R^2	0,996	0,963	0,989	0,980	0,974	0,993
R3	$k_{R3} \cdot 10^3$ (min^{-1})	1,80	2,19	-	-	-	-
	$\Delta\alpha$ (%)	61,9	93,7	-	-	-	-
	R^2	0,999	0,995	-	-	-	-
F1	$k_{F1} \cdot 10^3$ (min^{-1})	-	-	7,76	6,76	7,71	2,88
	$\Delta\alpha$ (%)	-	-	90,6	89,1	80,2	57,8
	R^2	-	-	0,997	0,998	0,999	0,991

4.2.6.3. Koeficijent difuzije

Vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja u oba medijuma u kojima se prati otpuštanje prvo opadaju sa porastom koncentracije kofeina u nosačima, a zatim kod najviše koncentracije kofeina rastu, dok najmanje vrednosti SDeq imaju uzorci sa inkorporiranim lipozomima (Tabela

19.). Ovakav trend je postojao i kod odgovarajuće referentne serije uzoraka (Tabele 6, 10. i 13). Vrednosti SDeq više su i u ovom slučaju u PB 6,8 nego u kiseloj sredini. Ovo je u vezi sa već pomenutim odbijanjem polimernih lanaca nosača leka, usled povećanja broja jonizovanog oblika karboksilnih grupa u sredini u kojoj je pH vrednost veća od pKa poli(metakrilne kiseline) i pI kazeina. Koeficijenti difuzije medijuma u nosače opadaju sa porastom vrednosti SDeq.

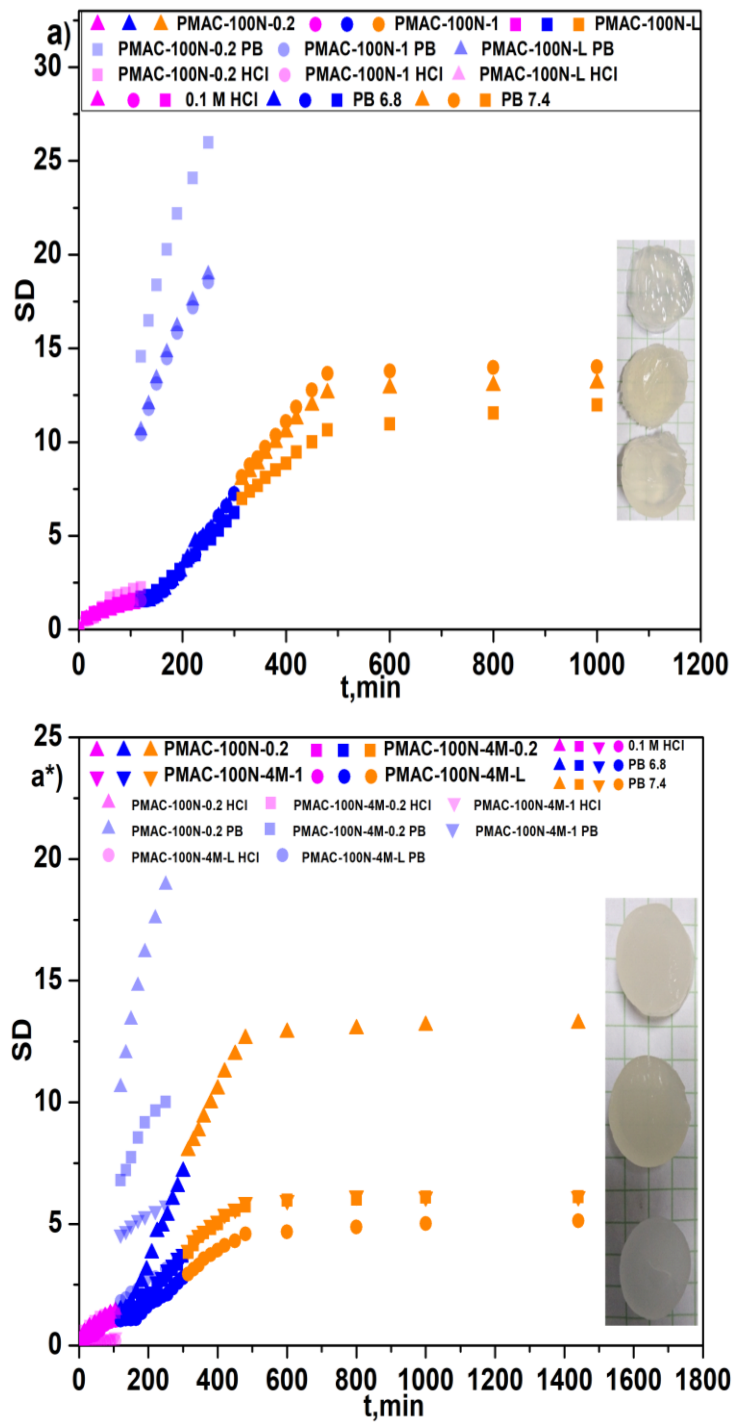
Tabela 19. Koeficijent difuzije ispitivanih sredina u PMAC i PMAC-L sistema sa 1,6 mol% umreživača u odnosu na MAA

Uzorak	0,1M HCl			PB 6,8		
	$k_D \cdot 10^2$ (min^{-1})	SDeq	$D_h \cdot 10^5$ (m/min)	$k_D \cdot 10^2$ (min^{-1})	SDeq	$D_h \cdot 10^5$ (m/min)
PMAC-100N-4M-1	1,41	1,19	2,65	3,11	7,35	9,60
PMAC-100N-4M-2	2,15	1,75	1,21	1,71	9,39	6,96
PMAC-100N-4M-L	1,26	0,860	5,28	1,70	5,27	10,5

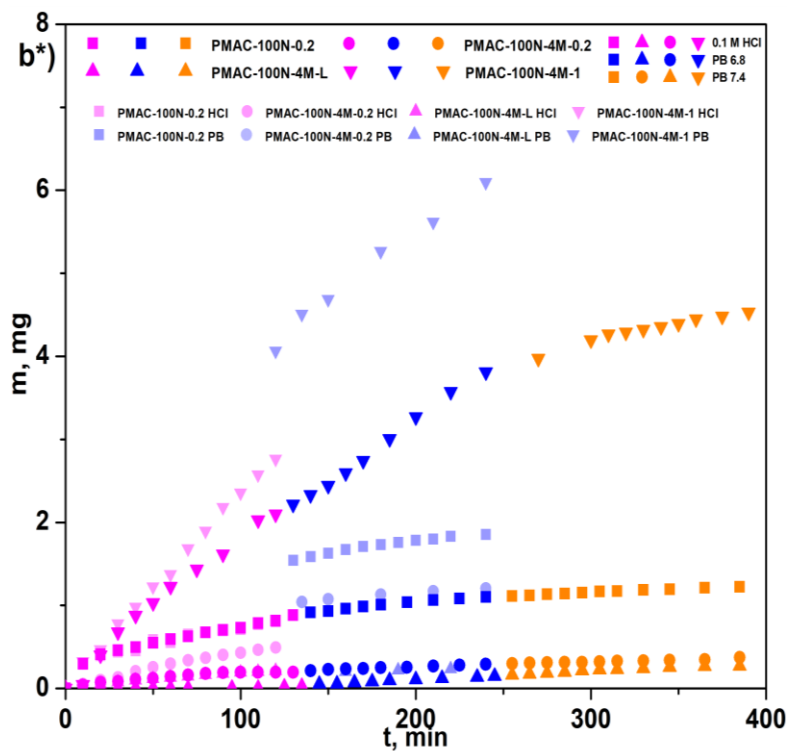
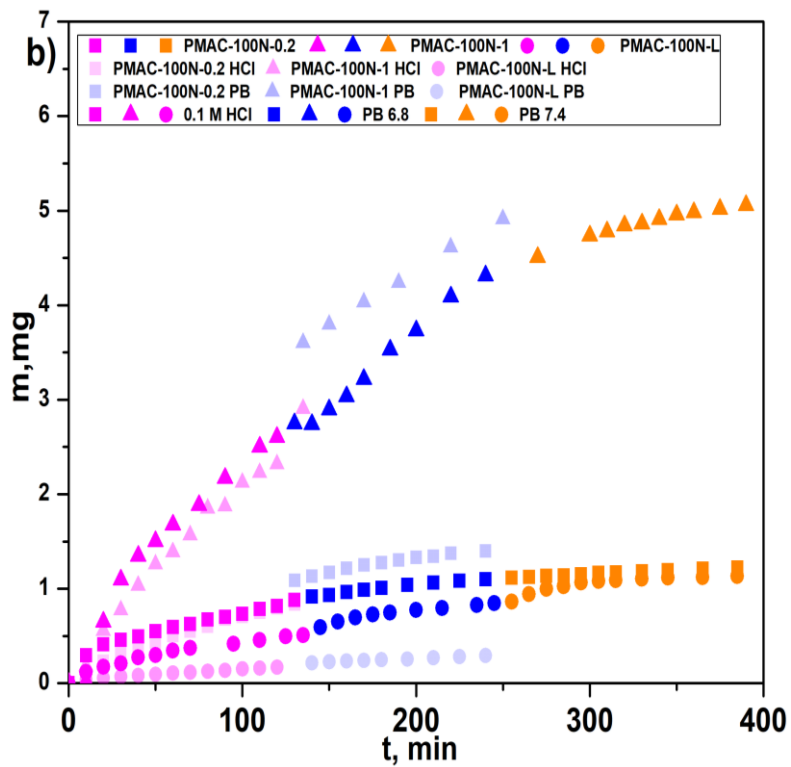
Vrednosti parametra k_D Kopcha modela u PB 6,8 opadaju za ispitivanu seriju uzoraka, dok u kiseloj sredini rastu sa porastom koncentracije kofeina, da bi kod uzorka sa inkorporiranim lipozomima k_D vrednost pala. Brzina difuzije kofeina iz nosača u PB 6,8 opada sa porastom koncentracije što može biti posledica uspostavljanja interakcija između jonizovanih karboksilnih grupa poli(metakrilne kiseline) i kofeina. Prisustvo lipozoma pruža dodatni otpor difuziji, pa je i difuzija kofeina iz nosača sporija i u PB 6,8 i u kiseloj sredini.

4.3. Otpuštanje kofeina na simuliranom putu nosača kroz gastrointestinalni trakt čoveka

Na osnovu prethodno sprovedene detaljne analize strukture i bubrenja dobijenih nosača kao i stepena inkapsulacije i kinetike otpuštanja kofeina, izabrana je serija nosača sa optimalnim osobinama i željenom kinetikom otpuštanja kofeina - PMAC-100N-4M-0,2, PMAC-100N-4M-1 i PMAC-100N-4M-L za ispitivanje kinetike otpuštanja kofeina, kao i bubrenja nosača u tri sredine različitih pH vrednosti koje simuliraju put nosača kroz gastrointestinalni trakt čoveka 0,1M HCl (prva dva časa), PB 6,8 (naredna tri časa) i PB 7,4 (od petog do šesnaestog časa). Takođe je praćeno bubrenje nosača i otpuštanje kofeina iz osnovne serije uzoraka sa 0,4 mol% umreživača u odnosu na MAA, kako bi se dobijeni podaci uporedili sa podacima dobijenim analizom serije nosača sa optimalnim osobinama i dobile kompletne informacije o načinu otpuštanja kofeina iz te serije. Dobijene krive bubrenja nosača su prikazane na Slici 86. a) i a*), a krive otpuštanja kofeina iz analiziranih nosača nalaze se na Slici 87. b) i b*).



Slika 86. a) i a*) Bubrenje PMAC i PMAC/L nosača na simuliranom putu nosača kroz gastrointestinalni trakt



Slika 87. b) i b*) otpuštanje kofeina iz PMAC i PMAC/L nosača na simuliranom putu nosača kroz gastrointestinalni trakt

Analiza bubrenja nosača kao pratećeg procesa otpuštanja aktivne supstance može da pruži informacije koje su značajne za predviđanje stepena inkapsulacije aktivne supstance i načina njenog otpuštanja [300]. Na osnovu dobijenih krivih bubrenja za obe serije uzoraka može se videti da nosači sa većim stepenom umreženja imaju manje vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja i da manje bubre u odnosu na osnovnu seriju. Nosači sa više umreženom mrežom imaju manju pokretljivost polimernih lanaca, zbog čega nosač može da apsorbuje manju količinu spoljašnjeg medijuma i difuzija spoljašnjeg medijuma u mrežu nosača je sporija. Može se primetiti i da vrednosti stepena bubrenja nosača rastu sa porastom pH vrednosti spoljašnje sredine. Vrednosti SDeq su najmanje u 0,1M HCl i nosači veoma malo bubre u kiselj sredini, dok u neutralnoj PB 6,8 i blago baznoj PB 7,4 znatno više bubre. Kada se nosači premeste iz kisele sredine u neutralnu potrebno je vreme da dođe do deprotonovanja karboksilnih grupa polimernih lanca PMAA u mreži nosača i da proces bubrenja počne, što se na krivim bubrenja manifestuje kao mali plato. Promena pH vrednosti kada se nosači premeste u PB 7,4 ne dovodi do velike promene u načinu bubrenja zato što je promena pH vrednosti mala, pa neće doći do značajnog povećanja količine negativnog naelektrisanja i jačeg odbijanja polimernih lanaca. U ispitivanim serijama sa porastom koncentracije kofeina u mreži nosača dolazi do smanjenja stepena bubrenja. Ovakvo ponašanje nosača može biti posledica toga što sa porastom koncentracije kofeina u mreži nosača dolazi do uspostavljanja jačih interakcija između kofeina i kazeina zbog čega mreža nosača postaje kruća i nosač manje bubri. Prisustvo lipozoma u porama mreže je takođe izazvalo smanjenje stepena bubrenja zato što su čestice lipozoma mogle da „ometaju” difuziju spoljašnjeg medijuma u nosač ili je došlo do uspostavljanja interakcija između jonizovanih karboksilnih grupa PMAA i lipozoma. Na graficima (Slika 86. a) i a*) su pored krivih bubrenja ispitivanih nosača prikazani i delovi krivih bubrenja dobijenih kada je bubrenje nosača ispitivano posebno u dve sredine 0,1M HCl i PB 6,8 (svetliji simboli). Kada je praćeno bubrenje nosača samo u PB 6,8 vrednosti ravnotežnog stepena bubrenja bile su znatno više u odnosu na vrednosti dobijene za isti vremenski period, ali kada je nosač pre boravka u PB 6,8 bio u kiselj sredini. Ovo se može objasniti time da je nosač u kiselj sredini apsorbovao jednu manju količinu spoljašnjeg medijuma, tako da kada je bio premešten u PB 6,8 jonizovanje karboksilnih grupa je prvo bilo sprećeno zbog prisustva 0,1M HCl u mreži nosača, pa je apsorbovanje PB 6,8 teklo sporije u odnosu kada je bubrenje nosača praćeno samo u PB 6,8, gde je jonizacija karboksilnih grupa bila slobodna. Veće vrednosti ravnotežnog stepena bubrenja nosača dobijene su u neutralnoj i blago kiselj sredini u odnosu na vrednosti u kiselj sredini. Nosači sa većom koncentracijom umreživača su manje bubrili u odnosu na osnovnu seriju uzoraka, što znači da bi mogli da se koriste za ciljano i kontrolisano otpuštanje viših koncentracija kofeina prisutnih u mreži nosača u intestinalnom traktu čoveka.

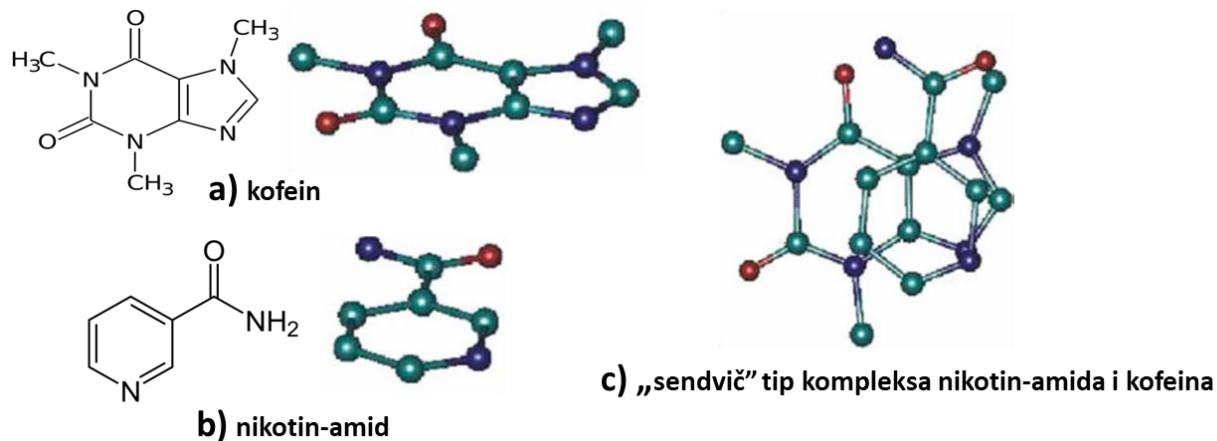
Na Slici 87. b) i b*) su prikazane krive otpuštanja kofeina iz ispitivanih serija uzoraka na osnovu kojih se može zaključiti da je najmanja količina kofeina oslobođena u kiselj sredini i da sa porastom pH vrednosti raste i oslobođena količina kofeina zato što rastu i ravnotežni stepeni bubrenja, pa je i oslobađanje kofeina brže. Kod serije uzoraka sa 0,4 mol% umreživača u odnosu na MAA oslobođena količina kofeina u kiselj sredini nije bila drastićno manja u odnosu na

oslobođenu količinu kofeina u blago kiseloj i neutralnoj sredini iako je bilo očekivano, zato što je na početku i najveća pogonska sila (velika razlika koncentracija kofeina u nosaču i spoljašnjoj sredini) (Slika 87. b*)). Kontrola oslobađanja kofeina bila je znatno bolja iz serije uzoraka sa 1,6mol%, gde je u kiseloj sredini znatno manje kofeina bilo oslobođeno, a razlike u oslobađanju kofeina u tri sredine su bile jasno uočljive. Može se videti da se iz više umreženog nosača može kontrolisano i ciljano oslobađati i viša koncentracija kofeina (PMAC-100N-4M-1), a da je kontrola oslobađanja kofeina bila najbolja iz nosača sa inkorporiranim lipozomima PMAC-100N-4M-L iz koga je u kiseloj sredini (simuliranoj sredini želuca čoveka) oslobođena neznatna količina u odnosu na oslobođenu količinu kofeina u PB 6,8 i 7,4. Prenos nosača u sredine sa višom pH vrednošću jasno je uočljiv na krivoj otpuštanja kofeina iz nosača sa lipozomima - PMAC-100N-4M-L. Može se zaključiti da kod ovog nosača sa porastom pH vrednosti sredine rastu i pore polimerne mreže. Zbog toga je olakšan prolazak lipozoma u spoljašnju sredinu, pa je i oslobađanje kofeina više s obzirom da se odvija i iz oslobođenih lipozoma u spoljašnjoj sredini i iz lipozoma koji su ostali u mreži nosača. Ova promena mehanizma oslobađanja kofeina jasno je uočljiva na krivoj otpuštanja kofeina iz PMAC-100N-4M-L (Slika 87. b*). Zanimljivo je primetiti da su oslobođene količine kofeina u PB 6,8 iz obe serije nosača bile znatno veće kada je oslobađanje kofeina praćeno posebno u dve sredine 0,1M HCl i PB 6,8 (svetliji simboli) u odnosu na oslobođenu količinu kofeina za isti vremenski period u PB 6,8 nakon što je nosač prethodno otpuštao kofein u 0,1M HCl. Ovo može biti razlog većih ravnotežnih stepena bubrenja nosača kada su se nalazili samo u PB 6,8 u odnosu na stepene bubrenja nosača kada je simuliran put nosača kroz gastrointestinalni trakt. Na osnovu prethodne analize može se zaključiti da nosač sa 1,6mol% umreživača i inkorporiranim lipozomima - PMAC-100N-4M-L ima najoptimalnije osobine za ciljano i kontrolisano oslobađanje kofeina sa željenom kinetikom otpuštanja u intestinalnom traktu čoveka. Ovaj uzorak je zato izabran za praćenje otpuštanja koncentracija kofeina koje su više od njegove maksimalne rastvorljivosti, kako bi se ispitala mogućnost upotrebe ovog nosača za ciljano i kontrolisano otpuštanje znatno viših koncentracija slabo vodorastvorne aktivne supstance.

4.4. PMAC nosači sa lipozomima sa inkapsuliranim kofein/nikotin-amid kompleksom

Sintetisana je serija PMAC/L uzoraka sa različitim koncentracijama kofeina koje su više od njegove maksimalne rastvorljivosti koja na 25°C iznosi 20 mg/ml. Cilj je bio da se viša koncentracija model-leka kontrolisano otpušta duži vremenski period. Kako bi se inkapsulirao kofein sa koncentracijama koje su više od vrednosti njegove maksimalne rastvorljivosti, neophodno je da se u sisteme doda nikotin-amid koji gradi stabilan kompleks sa kofeinom i sprečava njegovu kristalizaciju. Nagrađeni kompleks, prikazan je na Slici 88. Ovaj kompleks ima koplanarnu strukturu tzv. „sendvič“ tip kompleksa aromatičnih jedinjenja sa uspostavljenim π - π

interakcijama između aromatičnih prstenova, hidrofobnim interakcijama i Londonovim disperzionim silama odakle potiče njegova stabilnost [301].



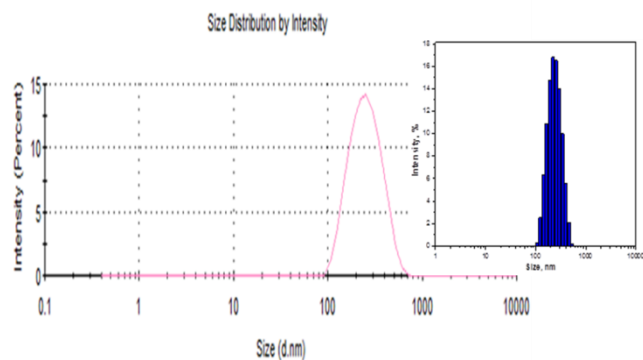
Slika 88. Kompleks kofeina i nikotin-amida [301]

Sintetisana su četiri uzorka sa koncentracijama kofeina od 20 mg/ml, 50 mg/ml, 70 mg/ml i 100 mg/ml. Uzorak sa kompleksom kofein/nikotin-amid u kome je koncentracija kofeina jednaka njegovoj maksimalnoj rastvorljivosti, a time i maksimalnoj koncentraciji koju je moguće inkapsulirati bez dodatka nikotin-amida, sintetisan je kako bi otpuštanje kofeina moglo da se uporedi sa otpuštanjem znatno viših koncentracija u PMAC sistemima, kada je neophodno dodati nikotin-amid. U ovim sistemima odnos količine lipozoma prema količini destilovane vode u reakcionoj smeši bio je 1:1, tj. 50% lipozoma i 50% destilovane vode. Sintetisana su i dva uzorka sa najvećom koncentracijom kofeina - 100 mg/ml: jedan nosač sa 85% udela lipozoma i drugi sa 100% udela lipozoma. Cilj je bio ispitati kako udeo prisutnih lipozoma u nosačima utiče na otpuštanje najveće količine kofeina i da li je moguće dobiti nosač u kome je prisutna samo lipozomna suspenzija, bez dodatka destilovane vode u reakcionu smešu.

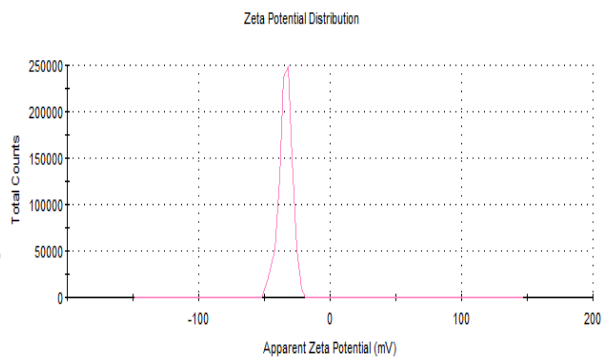
4.4.1. Karakterizacija lipozoma

Raspodela veličine čestica lipozoma sa inkapsuliranim kofeinom i nikotin-amidom različitih koncentracija: 20 mg/ml, 50 mg/ml, 70 mg/ml i 100 mg/ml prikazane su na Slici 89. a1), b1), c1) i d1), respektivno. Dobijene su uniformne raspodele sa prosečnim veličinama čestica od 226,8 nm, 217,2 nm, 236,21 nm i 270,9 nm, respektivno. Čestice su bile negativno naelektrisane sa sledećim vrednostima z-potencijala: -31,5 mV, -45,2 mV, -50,6 mV i -56,8 mV, Slika 90. a2), b2), c2) i d2), respektivno. Može se zaključiti na osnovu visoke apsolutne vrednosti z-potencijala da su fosfolipidne nanočestice stabilne.

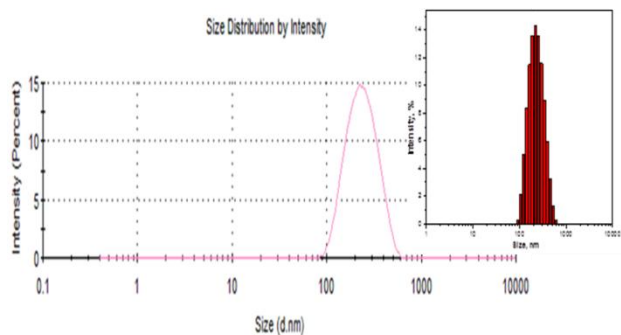
a1)



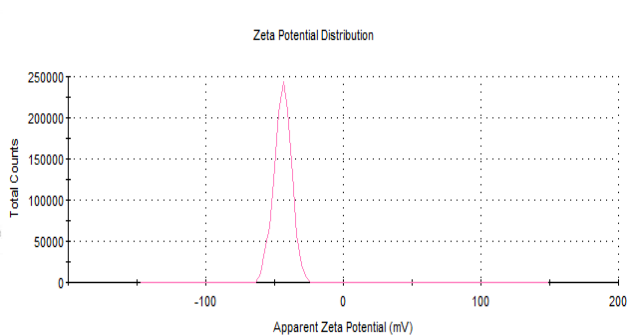
a2)



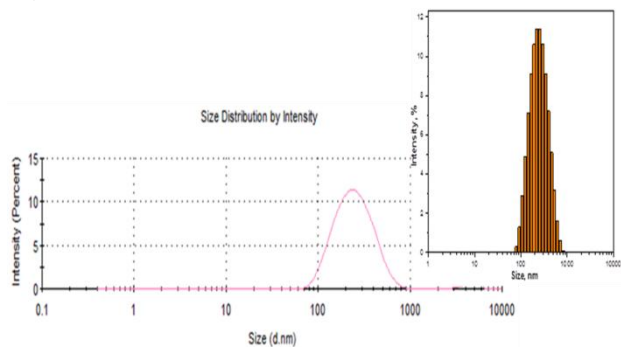
b1)



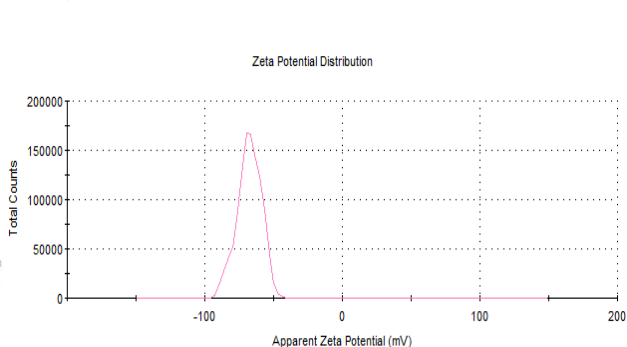
b2)



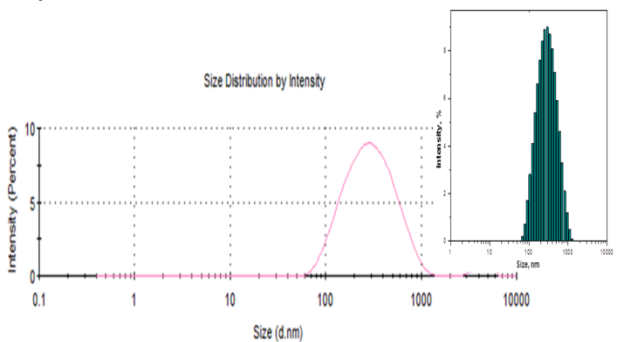
c1)



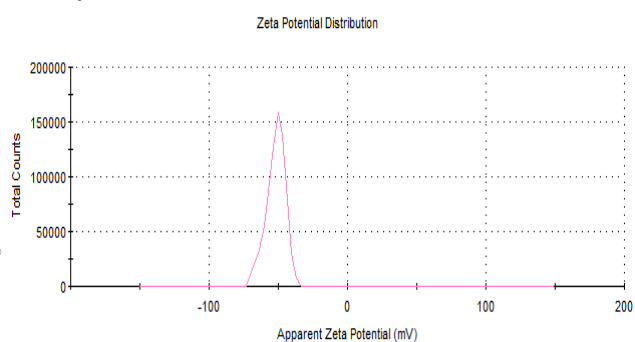
c2)



d1)



d2)



Slika 89. Raspodela veličine čestica lipozoma sa inkapsuliranim kofein/nikotin-amid kompleksom i z-potencijali

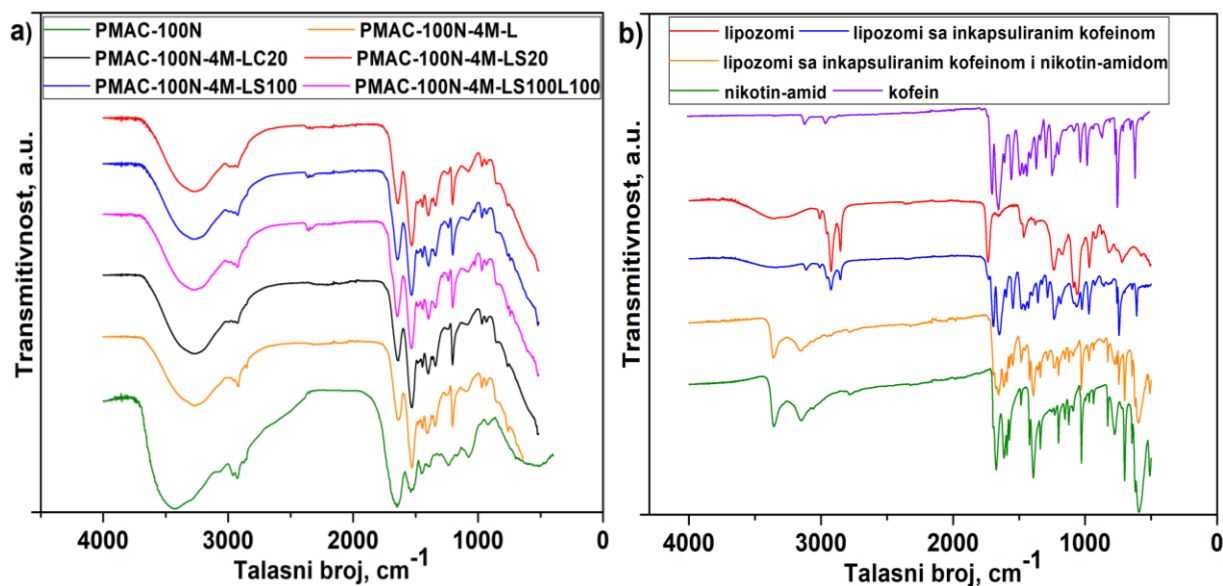
Najmanju stabilnost od svih pripremljenih lipozomnih suspenzija, imali su lipozomi sa najmanjom koncentracijom inkapsuliranog kofeina, kako se može zaključiti prema najmanjoj apsolutnoj vrednosti z-potencijala (Slika 89.). Takođe se može primetiti da sa porastom koncentracije kofeina u nosačima raste i vrednost indeksa polidisperzibilnosti - PDI (0,145; 0,154; 0,234 i 0,275, respektivno) što znači da sa porastom koncentracije kofeina u lipozomima raste i veličina čestica, kao i broj lipozomnih čestica sa različitom veličinom.

4.4.2. Step en inkapsulacije

Stepeni inkapsulacije kofeina u lipozomima sa inkapsuliranim kompleksom kofein/nikotin-amid gde su koncentracije kofeina bile 20 mg/ml; 50 mg/ml; 70 mg/ml i 100 mg/ml, bili su $83,2 \pm 2,49\%$, $82,9 \pm 1,38\%$, $81,78 \pm 2,26\%$ i $80,93 \pm 2,42\%$, respektivno. Vrednosti stepena inkapsulacije nikotin-amida bile su $83,25 \pm 3,33\%$, $82,82 \pm 2,39\%$, $81,8 \pm 1,45\%$ i $80,88 \pm 3,24\%$, respektivno. Prema dostupnim vrednostima stepena inkapsulacije u literaturi, dobijene vrednosti stepena inkapsulacije kofeina i nikotin-amida su zadovoljavajuće visoke [280, 302]. I ovde je primećen trend opadanja stepena inkapsulacije sa porastom koncentracije kofeina u lipozomima. Isti trend su objavili i B. Guldiken i sar. [303] i K. Suktham i sar. [304].

4.4.3. Karakterizacija PMAC-L sistem sa kompleksom kofein/nikotin-amid

Dobijeni FTIR spektri uzoraka sa inkapsuliranim kompleksom kofein/nikotin-amid prikazani su na Slici 90. a). Dodatak nikotin-amida tokom inkapsulacije kofeina nije uticao na promenu FTIR spektara, kao ni to da li je PMAC nosačima dodata lipozomna suspenzija ili koncentrovani lipozomi dobijeni centrifugiranjem. Takođe je zanimljivo primetiti da je FTIR spektar polimernog nosača u koji su tokom sinteze dodati samo lipozomi bez destilovne vode (PMAC-100N-4M-LS100L100) identičan spektru uzorka sa 50% lipozoma u odnosu na destilovanu vodu (PMAC-100N-4M-LS100). Ovo znači da su uspostavljene interakcije između nosača i lipozoma ostale iste i da ne zavise od količine prisutnih lipozoma u nosačima. Na FTIR spektrima su prisutni isti karakteristični pikovi kao i kod FTIR spektra osnovnog uzorka bez inkapsuliranog nikotin-amida.

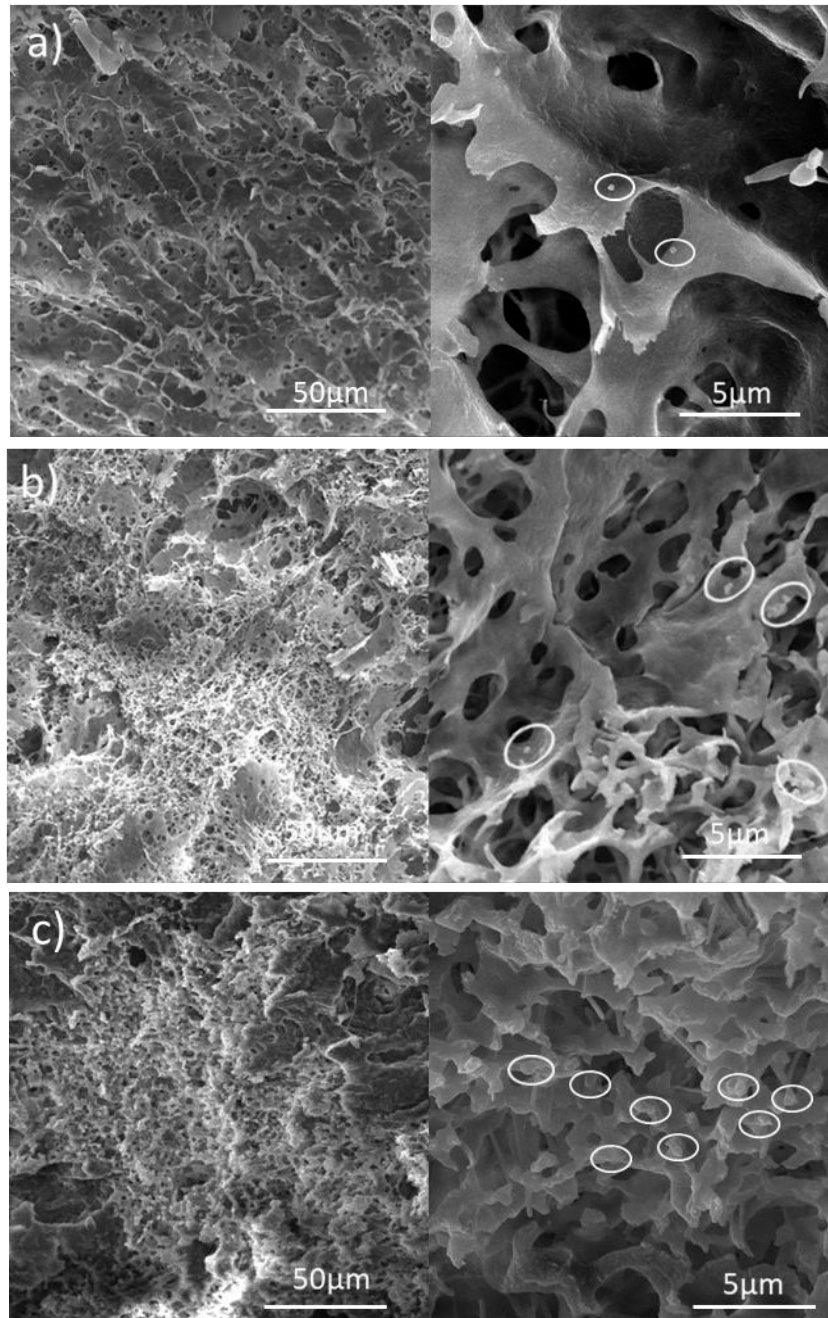


Slika 90. FTIR spektri PMAC/L nosača sa inkapsuliranim kompleksom kofein/nikotin-amid

FTIR spektri lipozoma, lipozoma sa inkapsuliranim kofeinom, lipozoma sa inkapsuliranim kompleksom kofein/nikotin-amid i FTIR spektri kofeina i nikotin-amida prikazani su na Slici 90. b). Na FTIR spektru lipozoma sa inkapsuliranim kompleksom kofein/nikotin-amid prisutni su karakteristični pikovi kofeina: na 1654 cm^{-1} (vibracije asimetričnog i simetričnog istezanja veze C=O u pirimidinskom prstenu), na 1544 cm^{-1} (amida II), na 1359 cm^{-1} (istezanje C-H veze) i na 744 cm^{-1} ($\text{N}_2\text{-CH}_3$ vibracija u ravni imidazolovog prstena)[287, 305, 306] i nikotin-amida: na 3363 cm^{-1} (vibracija asimetričnog istezanja NH_2 grupe), na 3160 cm^{-1} (vibracije simetričnog istezanja NH_2 grupe), na 1615 cm^{-1} (vibracije savijanja NH_2 veza slične „sečenju makazama”) i na 700 cm^{-1} (ugaona deformacija van ravni C=O veze)[307-309]. Prisutni karakteristični pikovi kofeina i nikotin-amida potvrdili su uspešnu inkapsulaciju kompleksa kofein/nikotin-amid u liposome. Kada se uporede FTIR spektri lipozoma sa inkapsuliranim kompleksom kofein/nikotin-amid sa FTIR spektrima svake od komponenti ovog sistema (Slika 90. b)) ne uočavaju se razlike koje bi mogle da ukazuju na uspostavljanje interakcija između lipozoma i kompleksa kofein/nikotin-amid, pa se može zaključiti da je do inkapsulacije kompleksa kofein/nikotin-amid došlo zbog fizičkog zatvaranja ovog kompleksa u jezgro lipozoma tokoma pripreme lipozoma.

SEM mikrografi nosača sa inkorporiranim lipozomima u koje je inkapsuliran kompleks kofein/nikotin-amid predstavljeni su na Slici 91. Svi uzorci imaju poroznu strukturu sa ravnomerno raspoređenim gustim porama. Tokom sinteze nosača nije došlo do degradacije lipozoma, što je potvrđeno SEM mikrografima [274]. Lipozomi koncentrovani centrifugiranjem prisutni su kao pojedinačne čestice raspoređene po mreži nosača (Slika 91. a)), dok su u mreži nosača sa inkorporiranom lipozomnom suspenzijom prisutni klasteri lipozoma (Slika 91. b)). Ovakva forma lipozoma prisutnih u mreži nosača mogla bi da bude posledica veće stabilnosti

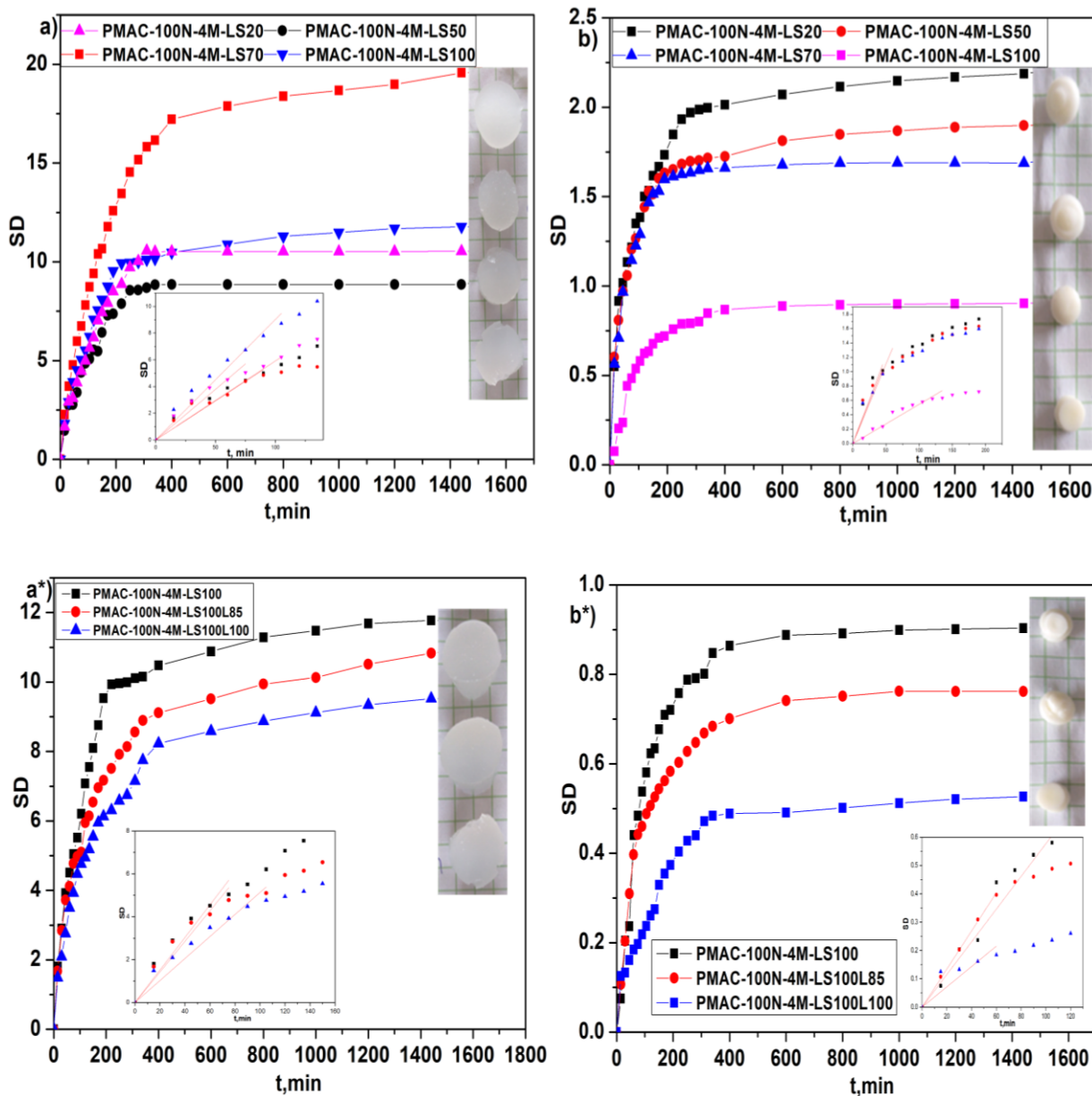
lipozoma koncentrovanih centrifugiranjem koja potiče od intezivnijeg odbijanja ovih čestica. Mreža nosača PMAC-100N-4M-LS100L100 ima manje pore u odnosu na ostale nosače (Slika 91. b)). Manje pore bi mogle da nastanu kao posledica prisustva lipozoma u porama nosača, koji sprečavaju potpunu relaksaciju polimernih lanaca i širenje mreže nosača, zbog čega mreža ima manje pore i manje bubri u odnosu na nosače koji su sintetisani sa destilovanom vodom kao rastvaračem (kako je i pokazano u Odeljku 4.4.4.).



Slika 91. SEM mikrografi: a) PMAC-100N-4M-LC20, b) PMAC-100N-4M-LS20 i c) PMAC-100N-4M-LS100L100

4.4.4. Bubrenje

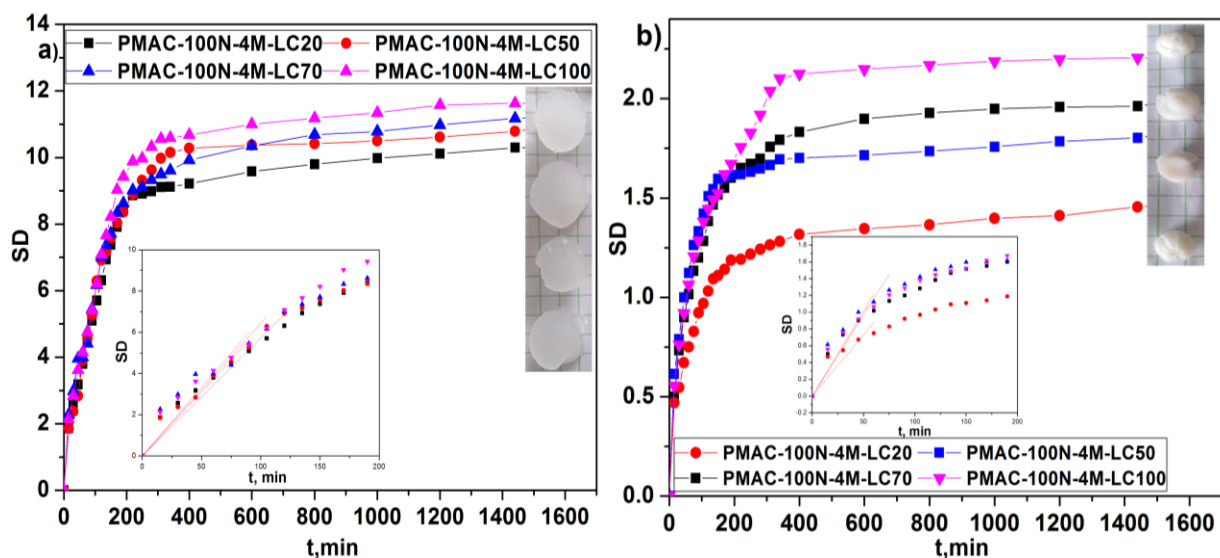
Krive bubrenja ispitivanih sistema sa lipozomnom suspenzijom u oba korišćena medijuma prikazani su na Slici 92. a), a*), b) i b*) (manji grafici predstavljaju određene nagibe krivih bubrenja).



Slika 92. a) Bubrenje PMAC/LS uzoraka sa različitom koncentracijom kofeina u PB 6,8; a*) Bubrenje PMAC/LS uzoraka sa različitim udelom lipozomne suspenzije u PB 6,8; b) Bubrenje PMAC/LS uzoraka sa različitom koncentracijom kofeina u 0,1M HCl i b*) Bubrenje PMAC/LS uzoraka sa različitim udelom lipozomne suspenzije u PB 6,8

Sa grafika na Slici 92. a), a*), b) i b*) se vidi da su vrednosti stepena bubrenja u fosfatnom puferu deset puta više, što je i očekivano s obzirom da sistemi na bazi metakrilne kiseline više bubre u sredinama sa višom pH vrednošću, i u neutralnoj i u kiseljoj sredini ravnotežni stepeni bubrenja opadaju sa porastom koncentracije kofeina u sistemu zbog mogućih vodoničnih veza koje se uspostavljaju između jonizovanih karboksilnih grupa ($-\text{COO}^-$ grupa) PMAA, odnosno kazeina, i nikotin-amida. Ravnotežne vrednosti stepena bubrenja se dostižu nakon 24 h, i prikazane su tabelarno zajedno sa vrednostima koeficijenta difuzije (Tabela 20.).

Na Slici 93. a) i b) su prikazane krive bubrenja uzoraka sa inkorporiranim koncentrovanim lipozomima dobijenim centrifugiranjem u kojima je inkapsuliran kofein sa nikotin-amidom za obe sredine: PB 6,8 i 0,1M HCl (manji grafici predstavljaju određene nagibe krivih bubrenja). Ravnotežni stepeni bubrenja ovih uzoraka duplo su manji u PB 6,8 u odnosu na uzorke sa lipozomnom suspenzijom. Razlog za ovo može biti olakšano uspostavljanje većeg broja interakcija između lipozomnih čestica i nosača s obzirom da tečni deo lipozomne suspenzije nije bio prisutan u polimernim nosačima.



Slika 93. Bubrenje PMAC/LC uzoraka sa različitom koncentracijom kofeina u: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl

4.4.5. Kinetika otpuštanja kompleksa kofein/nikotin-amid

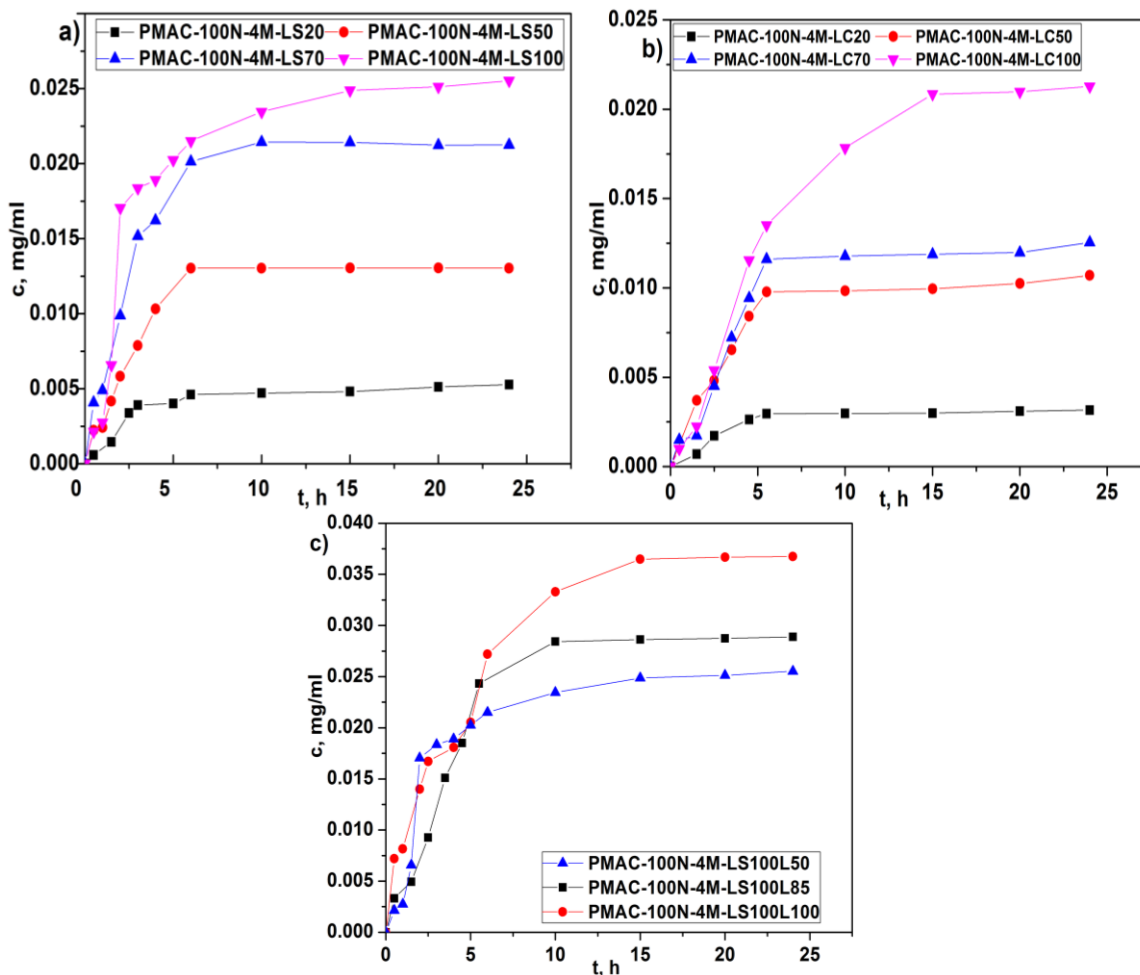
Sintetisani su polimerni sistemi na bazi poli(metakrilne kiseline) i kazeina sa 100% neutralizacije MAA i 1,6mol% umreživača u odnosu na MAA, u koje su inkorporirani lipozomi sa inkapsuliranim kompleksom kofein/nikotin-amid (50% lipozomne suspenzije u odnosu na

ukupnu količinu destilovane vode koju bi trebalo dodati u nosače tokom sinteze). Iz sintetisanih nosača praćeno je otpuštanje kofeina i nikotin-amida u dve sredine: PB 6,8 i 0,1M HCl.

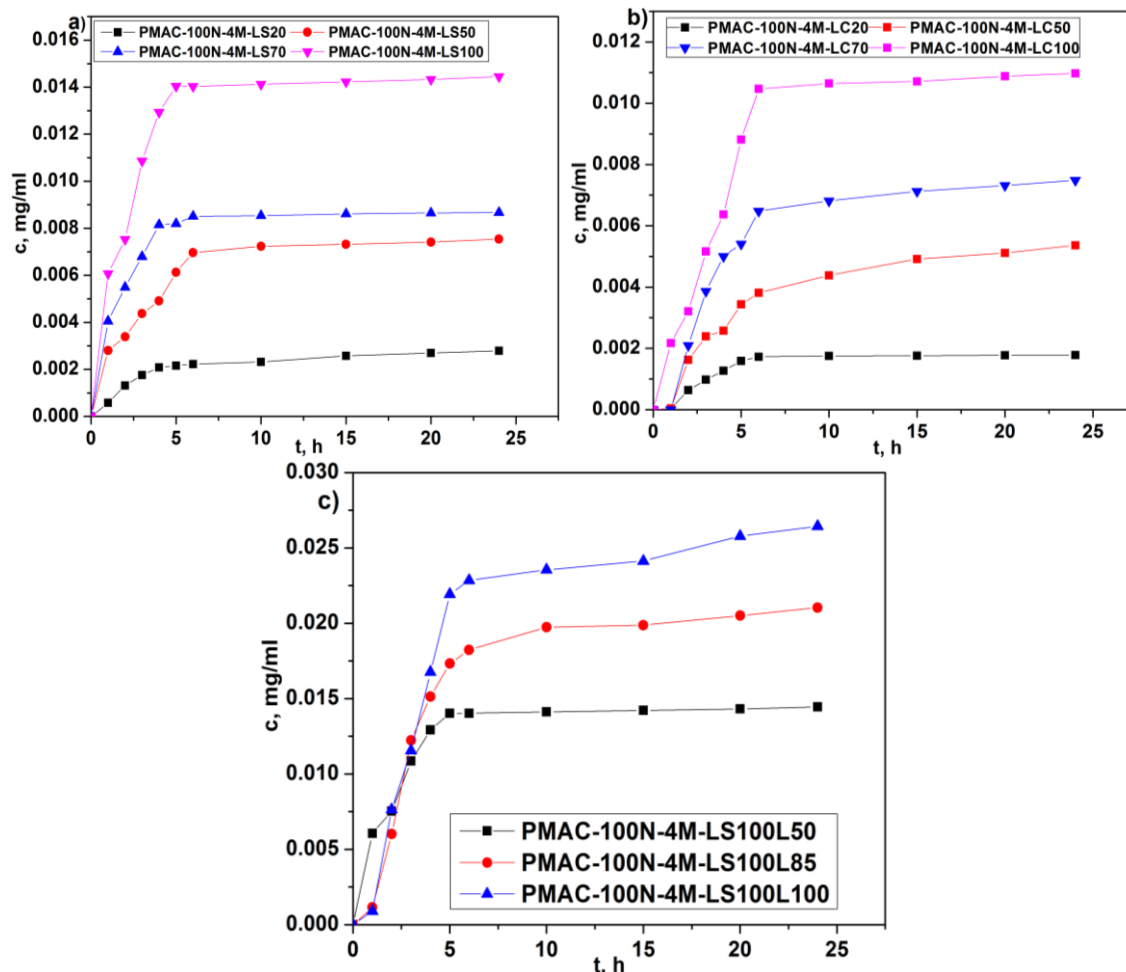
Konstruisane su krive otpuštanja kofeina u PB 6,8 i prikazane su na Slici 94, a krive otpuštanja kofeina u 0,1M HCl prikazane su na Slici 95 (a) iz nosača sa inkorporiranom lipozomnom suspenzijom u kojoj je varirana koncentracija kofeina; b) iz nosača sa lipozomima koncentrovanim centrifugiranjem u kojima je varirana koncentracija kofeina i c) iz nosača u kojima je variran udeo lipozomne suspenzije). Ova količina umreživača izabrana je zato što je kod serije uzoraka sa ovom količinom umreživača postignuto kontrolisano otpuštanje kofeina i zadovoljavajuća količina otpuštenog kofeina. Glavni cilj je bio postići duže otpuštanje veće količine slabo vodorastvorne aktivne supstance - kofeina iz sintetisanih nosača, što je i postignuto - otpuštanje je trajalo 24h kako se može videti na Slici 94. Svi dobijeni nosači otpuštaju znatno veću količinu kofeina u fosfatnom puferu u odnosu na 0,1M HCl, što je u skladu sa već objašnjenom činjenicom da hidrogelovi na bazi PMAA i kazeina znatno više bubre u sredini čija je pH vrednost viša od pKa PMAA i pI kazeina. Sa povećanjem količine kofeina u sistemu, veće su i otpuštene ravnotežne količine kofeina u PB 6,8. Polimerni nosač sa koncentracijom kofeina od 70 mg/ml ima dva pika u PB 6,8 - prvi manji na pola sata od početka otpuštanja i drugi izraženiji nakon 4,5 sata od početka otpuštanja. Zanimljivo je primetiti da nosač sa koncentracijom kofeina 100 mg/ml ima tri pika što bi moglo da bude posledica promene mehanizma otpuštanja model-leka, kako je već objašnjeno kod sistema sa lipozomima u kojima je inkapsuliran samo kofein. Prvi pik je najmanji, javlja se u prvih pola sata otpuštanja, dok su druga dva znatno izraženija i javljaju se nakon tri i šest sati od početka otpuštanja. Moguće je da se neka količina lipozoma oslobodila iz nosača tokom njegovog bubrenja, pa tada istovremeno postoji oslobađanje kofeina iz tih oslobođenih lipozoma i iz nosača sa lipozomima, što se manifestuje pojavom pika na krivoj otpuštanja. Takođe se može videti da na krivoj otpuštanja iz sistema sa istom koncentracijom kofeina, ali sa prisutnim koncentrovanim lipozomima dobijenim centrifugiranjem, postoji samo jedan pik u prvih pola sata otpuštanja, na istom mestu kao i kod nosača sa suspenzijom lipozoma i inkapsuliranom koncentracijom kofeina od 100 mg/ml. Taj blagi pik nakon prvih pola sata otpuštanja prisutan je kod svih krivih otpuštanja, dok ostala dva pika postaju izraženija sa povećanjem koncentracije kofeina u sistemu. Sve krive otpuštanja imaju na početku lag fazu, koja traje prvih pola sata otpuštanja i u kojoj se oslobodi jako mala količina kofeina. Tokom prvih pola sata istovremeno počinje i oslobađanje kofeina inkapsuliranog u lipozomima u nosač, koja se zatim otpušta u spoljašnju sredinu.

Sintetisana su i dva uzorka sa najvišom koncentracijom kofeina (100 mg/ml) kod kojih je variran udeo lipozomne suspenzije prisutne u polimernom nosaču: 85% i 100% lipozomne suspenzije u odnosu na količinu destilovane vode korišćene u sintezi nosača. Ovi uzorci su obeleženi sa PMAC-100N-4M-LS100L85 i PMAC-100N-4M-LS100L100, respektivno. Otpuštanje kofeina iz ovih uzoraka poređeno je sa otpuštanjem kofeina iz odgovarajućeg uzorka PMAC-100N-4M-LS100 iz serije sa 50% lipozomne suspenzije sa istom koncentracijom kofeina (100 mg/ml). Dobijene krive otpuštanja u obe sredine pokazuju da je znatno veća količina

kofeina otpuštena u PB 6,8 u odnosu na količinu kofeina otpuštenu u 0,1M HCl i da sa porastom udela lipozomne suspenzije prisutne u nosačima, raste i oslobođena količina kofeina. Kriva otpuštanja kofeina iz nosača sintetisanog samo sa lipozomnom suspenzijom, bez destilovane vode poseduje tri pika koji ukazuju na promenu mehanizma otpuštanja kofeina, kao što je već objašnjeno.

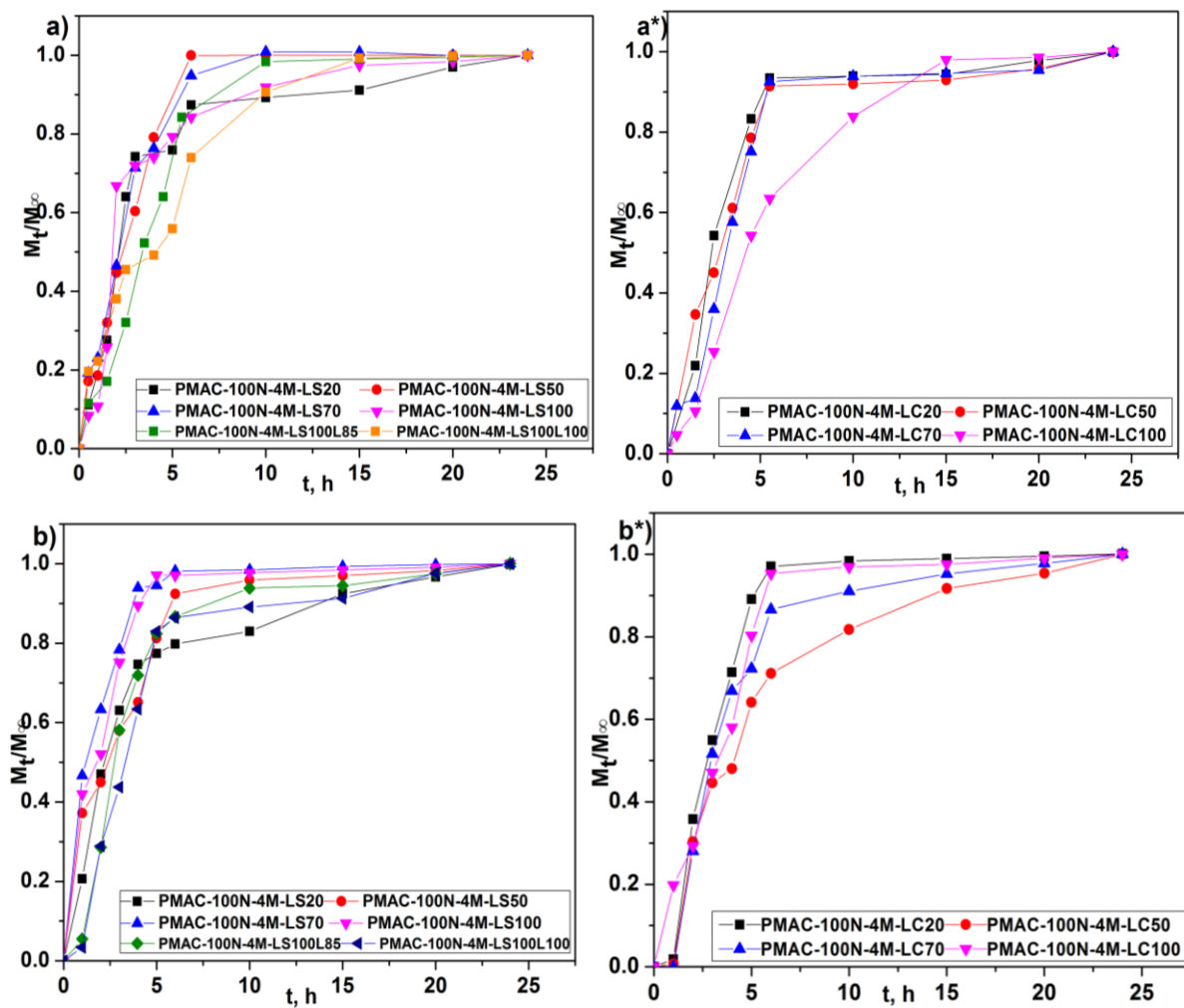


Slika 94. Krive otpuštanja kofeina iz PMAC/LS i PMAC/LC sistema sa inkapsuliranim kompleksom kofein/nikotin-amid u PB 6,8



Slika 95. Krive otpuštanja kofeina iz PMAC/LS i PMAC/LC sistema sa inkapsuliranim kompleksom kofein/nikotin-amid u 0,1M HCl

Dobijeni eksperimentalni podaci mogu da se opišu samo pomoću Kopcha modela, slaganje sa ostalim modelima je loše. Konstruisani su grafici zavisnosti $Mt/M_{\infty}-t$ (Slika 96.) i primenjen je Kopcha model, a dobijene vrednosti parametara ovog model predstavljene su tabelarno (Tabela 20). Slaganje sa ovim modelom je dobro ($R^2 \approx 0,97$), a oblast primene $\Delta\alpha$ je velika, vrednosti za neke uzorke su čak i 90%. Najlošije slaganje sa ovim modelom je za podatke dobijene praćenjem otpuštanja kofeina iz PMAC-100N-4M-LC70 u PB 6,8 ($R^2 \approx 0,764$). Na osnovu dobijenih vrednosti parametara Kopcha modela za seriju uzoraka sa suspenzijom lipozoma za obe sredine u kojima se prati otpuštanje, može se zaključiti da je brzina difuzije veća od procesa relaksacije polimernih lanaca za koncentracije kofeina veće od 20 mg/ml, dok je glavni mehanizam oslobađanja kofeina koncentracije 20 mg/ml iz nosača, relaksacija polimernih lanaca. Takođe se može primetiti da sa porastom udela lipozomne suspenzije u nosačima na 85%, kofein oslobađa usled relaksacije polimernih lanaca. U slučaju kada je u nosačima prisutno 100% lipozomne suspenzije dolazi do promene mehanizma oslobađanja kofeina i difuzija postaje glavni mehanizam oslobađanja kofeina.



Slika 96. Kumulativne krive otpuštanja kofeina iz PMAC/LS i PMAC/LC sistema sa inkapsuliranim kompleksom kofein/nikotin-amid u: a) PB 6,8 i b) 0,1M HCl

Vrednosti parametara Kopcha modela dobijeni za seriju uzoraka sa lipozomima koncentrovanim centrifugiranjem pokazuju da se kofein oslobađa difuzijom kao glavnim mehanizmom transporta iz uzoraka sa koncentracijama kofeina od 20 mg/ml i 70 mg/ml u obe sredine u kojima se prati otpuštanje. Relaksacija polimernih lanaca predstavlja glavni mehanizam transporta kofeina i u PB 6,8 i u kiseloj sredini u slučaju kada su koncentracije kofeina u nosačima iznosile 20 mg/ml i 70 mg/ml. Podaci dobijeni praćenjem otpuštanja kofeina iz nosača sa kompleksom kofein/nikotin-amid mogu da se opišu samo Kopcha modelom, dok su podaci kod osnovnog uzorka, pored ovog modela mogli da se opišu i R-P i F1 modelima (Tabela 18.). Može se zaključiti da prisustvo nikotin-amida ili veća koncentracija kofeina utiču na promenu mehanizma otpuštanja kofeina.

Tabela 20. Kinetički parametri dobijeni primenom Kopcha modela na krive otpuštanja kofeina iz PMAC-100N-4M-LS i PMAC-100N-4M-LC sistema u PB 6,8 i 0,1M HCl

Uzorak	Model		Kopcha		
	Medijum	k_1	k_2	$\Delta\alpha$	R^2
PMAC-100N-4M-LS20	PB 6,8	0	0,301	74,2	0,778
	0,1M HCl	0,284	0,0274	79,8	0,952
PMAC-100N-4M-LS50	PB 6,8	0,0691	0,163	79,1	0,988
	0,1M HCl	0,343	0	65,1	0,982
PMAC-100N-4M-LS70	PB 6,8	0,157	0,123	76,3	0,973
	0,1M HCl	0,438	0,0127	93,9	0,998
PMAC-100N-4M-LS100	PB 6,8	0,214	0,0679	79,3	0,839
	0,1M HCl	0,351	0,0411	97,1	0,989
PMAC-100N-4M-LS100L85	PB 6,8	0	0,152	84,2	0,978
	0,1M HCl	0,00296	0,159	86,7	0,942
PMAC-100N-4M-LS100L100	PB 6,8	0,257	0	55,9	0,976
	0,1M HCl	0	0,182	86,4	0,833
PMAC-100N-4M-LC20	PB 6,8	0,0515	0,155	93,5	0,972
	0,1M HCl	0	0,175	79,8	0,916
PMAC-100N-4M-LC50	PB 6,8	0,120	0,115	91,4	0,996
	0,1M HCl	0,163	0,0386	81,8	0,893
PMAC-100N-4M-LC70	PB 6,8	0	0,186	57,7	0,764
	0,1M HCl	0	0,149	86,6	0,945
PMAC-100N-4M-LC100	PB 6,8	0,0767	0,0660	83,8	0,944
	0,1M HCl	0,015	0,147	80,3	0,987

4.4.6. Koeficijent difuzije

Određene vrednosti koeficijenta difuzije oba medijuma u nosače, ravnotežni stepeni bubrenja, kao i parametar Kopcha modela koji se odnosi na brzinu difuzije kofeina iz nosača u određeni medijum predstavljeni su tabelarno (Tabela 21), kako bi se dobio kompletan uvid u proces otpuštanja kofeina iz nosača tokom bubrenja u dve sredine različitih pH vrednosti, tj. kako bi se utvrdio uticaj pH vrednosti sredine u kojoj se nalaze nosači, na brzinu bubrenja nosača i brzinu otpuštanja kofeina.

Na osnovu određenih vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja nosača sa kompleksom kofein/nikotin-amid, može se zaključiti da nosači imaju slične vrednosti $SDeq$ u kiseloj sredini oko 0,80, tj. da slično bubre, osim uzorka PMAC-100N-4M-LS100L100 čija je vrednost $SDeq$ 0,52. Prisustvo lipozomne suspenzije bez destilovane vode u nosačima usporava bubrenje u kiseloj sredini, verovatno zato što je lakše uspostavljanje interakcija između lipozomnih čestica i nosača u odnosu na to kada je prisutna i destilovana voda. Koeficijenti difuzije 0,1M HCl u nosače imaju slične vrednosti, tj. brzine difuzije ovog medijuma u nosače je slična kod svih uzoraka, osim kod uzorka PMAC-100N-4M-LS100L100 kod koga je difuzija spoljašnjeg medijuma u nosač najbrža zato što najsporije bubri. Zanimljivo je primetiti da su kod ovog i još nekih uzoraka vrednosti parametara k_D Kopcha modela jednake nuli, što znači da se kofein

isključivo oslobađa usled relaksacije polimernih lanaca. Isti trend se može uočiti i za PB 6,8: svi nosači slično bubre u fosfatnom puferu (vrednosti SDeq se kreću između 10-15) i imaju više vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja u odnosu na one određene za 0,1M HCl. Brzine difuzije PB 6,8 u nosače su oko $2 \cdot 10^{-5}$ (mm²/min) i manje su od brzina difuzije 0,1M HCl u iste nosače, zato što su i vrednosti SDeq više kao posledica boljeg bubrenja uzoraka u PB 6,8. Prisustvo lipozoma bez destilovane vode nije uticalo na bubrenje uzorka PMAC-100N-4M-LS100L100 u PB 6,8, ali se može primetiti da je otpuštanje kofeina difuzijom znatno brže u odnosu na difuziju kofeina u kiseloj sredini, gde je vrednost k_D bila jednaka nuli. Međutim, kada je u uzorku prisutno 85% lipozomne suspenzije u odnosu na destilovanu vodu, situacija je obrnuta: kofein se u PB 6,8 isključivo oslobađa usled relaksacije polimernih lanaca. Iz uzorka sa istom koncentracijom kofeina kao i kod prethodno pomenuta dva uzorka, ali sa 50% lipozomne suspenzije, difuzija kofeina je brža u kiseljoj sredini od difuzije kofeina u PB 6,8.

Tabela 21. Koeficijent difuzije ispitivanih sredina u PMAC-100N-4M-LS i u PMAC-100N-4M-LS sisteme

Uzorak	0,1M HCl			PB 6,8		
	k_D (min ⁻¹)	SDeq	$Dh \cdot 10^4$ (mm ² /min)	k_D (min ⁻¹)	SDeq	$Dh \cdot 10^5$ (mm ² /min)
PMAC-100N-4M-LS20	0,284	0,800	2,35	0	10,5	1,75
PMAC-100N-4M-LS50	0,343	0,740	2,260	0,069	9	2,00
PMAC-100N-4M-LS70	0,438	0,740	2,39	0,157	19,6	1,01
PMAC-100N-4M-LS100	0,351	0,710	2,42	0,214	11,8	1,72
PMAC-100N-4M-LS100L85	0,00296	0,800	1,51	0	15,9	1,01
PMAC-100N-4M-LS100L100	0	0,520	9,40	0,257	11,2	0,909
PMAC-100N-4M-LC20	0	0,680	2,44	0,0515	10,3	1,86
PMAC-100N-4M-LC50	0,163	0,630	1,82	0,120	9,37	2,77
PMAC-100N-4M-LC70	0	0,770	3,44	0	9,42	2,56
PMAC-100N-4M-LC100	0,0150	0,830	2,39	0,077	11,6	1,85

Na osnovu svih dobijenih podataka može se zaključiti da se ispitivani nosači mogu koristiti za ciljanu dostavu i kontrolisano otpuštanje slabo vodorastvorne aktivne supstance, koja je inkapsulirana u koncentracijama koje su više od njene maksimalne rastvorljivosti.

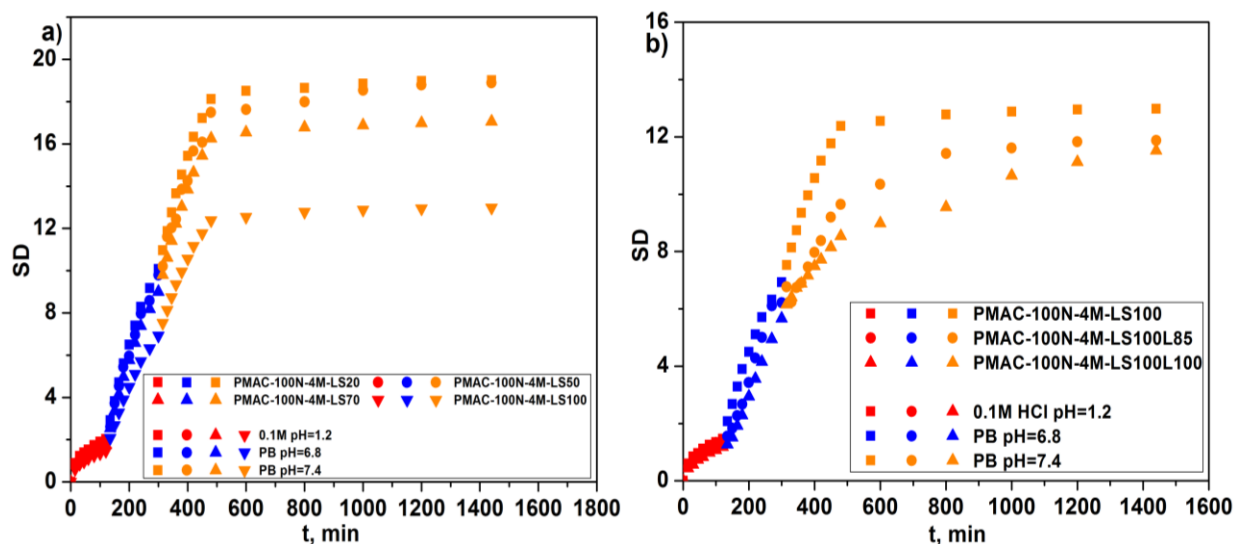
4.5. Simulacija prolaska PMAC/L nosača sa inkapsuliranim kompleksom kofein/nikotin-amid kroz gastrointestinalni trakt čoveka

Bubrenja sintetisanih nosača sa inkapsuliranim kompleksom kofein/nikotin-amid i otpuštanje kofeina i nikotin-amida, praćeno je u sredinama koje će simulirati put sintetisanih nosača kroz gastrointestinalni trakt čoveka u cilju analize ponašanja nosača i načina oslobađanja

slabo vodorastvorne aktivne supstance koja je inkapsulirana u koncentracijama koje su više od njene maksimalne rastvorljivosti u posmatranim uslovima.

4.5.1. Bubrenje nosača

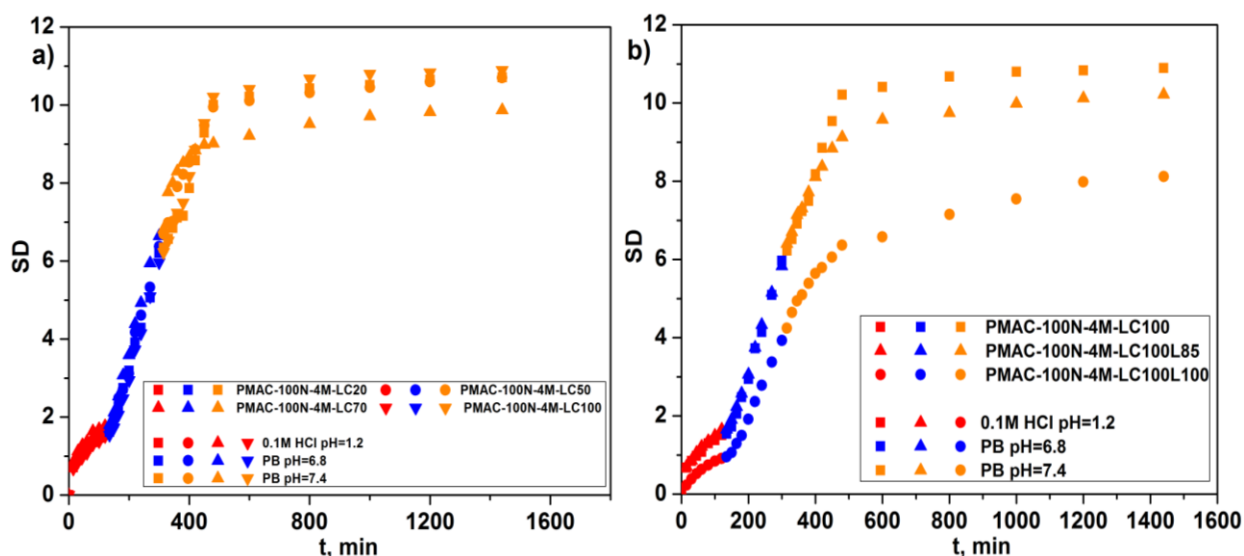
Praćenjem bubrenja ispitivanih nosača dobijeni su podaci na osnovu kojih su sintetisane krive bubrenja prikazane na Slici 97. a) (bubrenje nosača sa inkorporiranom lipozomnom suspenzijom) i Slici 97. b) (bubrenje nosača sa inkorporiranim lipozomima koncentrovanih centrifugiranjem). Krive bubrenja svih uzoraka pokazuju da sa porastom pH vrednosti sredine dolazi do porasta stepena bubrenja i da sintetisani nosači znatno više bubre u fosfatnim puferima pH=6,8 i pH=7,4 nego u 0,1M HCl.



Slika 97. Krive bubrenja nosača sa inkorporiranom lipozomnom suspenzijom: a) ispitivanje uticaja promene koncentracije inkapsuliranog kofeina na bubrenje i b) ispitivanje uticaja promene udela lipozomne suspenzije u nosačima

Na osnovu konstruisanih grafika na Slici 97. a) vidi se da sa porastom koncentracije inkapsuliranog kofeina opada vrednost ravnotežnog stepena bubrenja. Sa porastom inkapsulirane koncentracije kofeina dolazi do porasta veličine lipozomnih čestica (kako je pokazano u delu 4.4.1. Karakterizacija lipozoma). Interakcije (kao što su hidrofobne interakcije, vodonične veze, elektrostatička odbijanja ili privlačenja) i preplitanja koji su uspostavljeni između lipozomnih čestica većih dimenzija i mreže nosača [278], kao i veći procenat zauzete zapremine u mreži nosača mogao bi da poveća krutost mreže PMAC-LS nosača, zbog čega će doći i do opadanja vrednosti ravnotežnog stepena bubrenja. Krive bubrenja nosača sa inkapsuliranim kofeinom u koncentracijama od 20mg/ml i 50mg/ml su slične što potvrđuje prethodnu pretpostavku, zato što su i dobijeni lipozomi bili slične veličine. Najmanji stepen bubrenja ima nosač sa inkapsuliranom

najvećom koncentracijom kofeina, u kome je inkorporirana najveća veličina lipozomnih čestica, pa je i pokretljivost polimernih lanaca bila najmanja. Takođe se pokazalo da sa porastom udela inkorporirane lipozomne suspenzije opadaju vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja (Slika 97. b)). Ovakav trend bi mogao da bude posledica povećanja broja interakcija između čestica lipozomne suspenzije i kazeina, što dovodi do manje pokretljivosti polimernih lanaca, pa je relaksacija lanaca ograničena i nosač manje bubri. Povećanje udela lipozomne suspenzije takođe može da se posmatra i kao smanjenje zapremine rastvarača (vode) ili povećanje udela monomera (MAA) u reakcionoj smeši tokom sinteze nosača [310]. To bi moglo da utiče na smanjenje pokretljivosti polimernih lanaca, što bi dalje izazvalo smanjenje vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja PMAC-LS nosača (Slika 97.).



Slika 98. Krive bubrenja nosača sa inkorporiranim lipozomima koncentrovanih centrifugiranjem: a) ispitivanje uticaja promene koncentracije inkapsuliranog kofeina na bubrenje i b) ispitivanje uticaja promene udela lipozoma koncentrovanih centrifugiranjem u nosačima

Analizom krivih bubrenja prikazanih na Slici 98. utvrđeno je da povećanje koncentracije inkapsuliranog kofeina u PMAC-LC nosačima nije uticalo na promenu vrednosti ravnotežnog stepena bubrenja PMAC-LC nosača. Povećanje udela inkorporiranih lipozoma koncentrovanih centrifugiranjem uticalo je na smanjenje SDeq vrednosti: PMAC-4M-LC100 > PMAC-4M-LC100L85 > PMAC-4M-LC100L100. Isti trend je dobijen i kod PMAC-LS nosača.

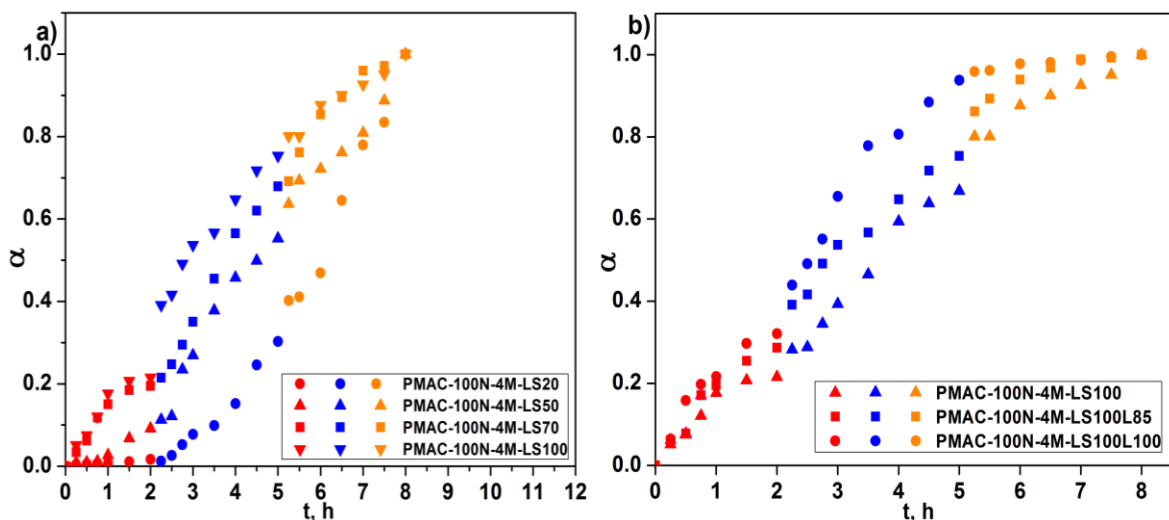
Takođe, nosači sa inkorporiranim lipozomima koncentrovanim centrifugiranjem imaju manje vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja od nosača u kojima je bila inkorporirana lipozomna suspenzija. Broj uspostavljenih interakcija između koncentrovanih lipozoma i nosača je bio veći u odnosu na broj interakcija koje su bile uspostavljene u nosačima sa inkorporiranom lipozomnom suspenzijom. Mogućnost uspostavljanja većeg broja interakcija sa polimernom mrežom i kazeinom, u slučaju lipozoma koncentrovanih centrifugiranjem, potiče od veće dodirne

površine koja je dobijena odvajanjem lipozoma na pojedinačne čestice centrifugiranjem. Uspostavljene interakcije smanjile su fleksibilnost mreže nosača, a samim tim i stepen bubrenja nosača.

4.5.2. Kinetika oslobađanja kofeina

Kako bi se ispitaio uticaj povećanja koncentracije inkapsuliranog kofeina u lipozomima i povećanje udela lipozomne suspenzije/lipozoma koncentrovanih centrifugiranjem u PMAC nosačima na kinetiku otpuštanja kofeina, konstruisane su kumulativne krive otpuštanja i prikazane na Slici 99. a) i b) i Slici 100. a) i b), respektivno.

Kumulativne krive otpuštanja kofeina iz PMAC-LS nosača prikazane su na Slici 99. Najmanja koncentracija kofeina je otpuštena u 0,1 M HCl (Slici 99. a) i b)). Generalno se može zaključiti da je kao rezultat specifične pH osetljivosti nosača najveća koncentracija kofeina otpuštena u sredinama čija je pH vrednost viša od $pK_a(\text{PMAA})$ i pI kazeina. Naime, proces otpuštanja kofeina se odvija simultano sa procesom bubrenja nosača zbog čega sa porastom vrednosti stepena bubrenja nosača raste i koncentracija otpuštenog kofeina.



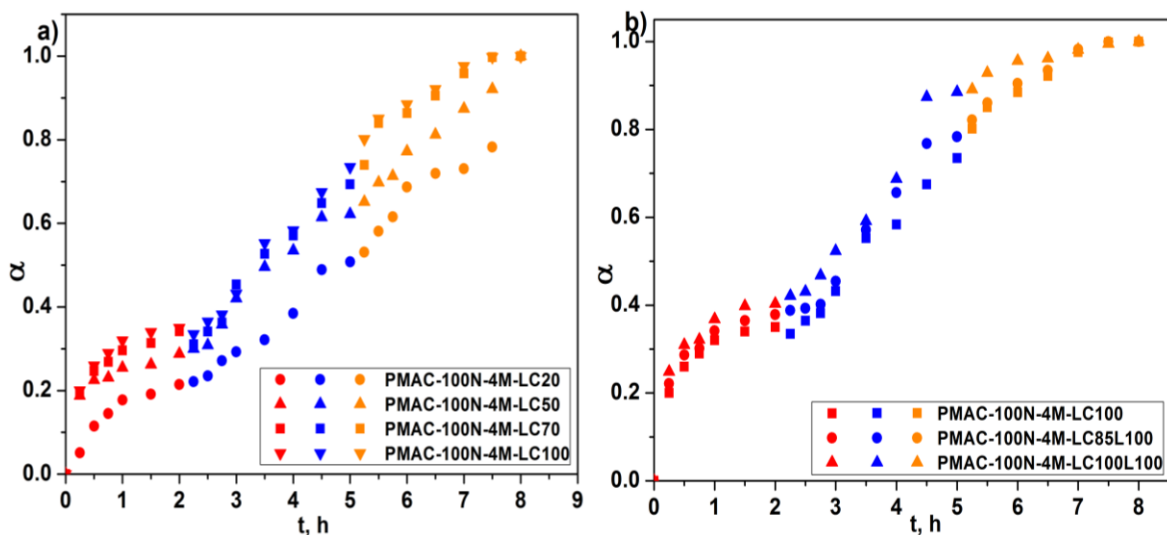
Slika 99. Kumulativne krive otpuštanja kofeina iz nosača sa inkorporiranom lipozomnom suspenzijom: a) ispitivanje uticaja promene koncentracije inkapsuliranog kofeina na proces otpuštanja i b) ispitivanje uticaja promene udela lipozomne suspenzije u nosačima

Analizom kumulativnih krivih otpuštanja kofeina mogu se uočiti blagi platoi na delovima kumulativnih krivih koji su dobijeni praćenjem otpuštanje kofeina u PB 6,8 i PB 7,4 (Slika 99. a) i b)). Pojava ovih platoa bi mogla da bude rezultat promene mehanizma otpuštanja kofeina [265]. Naime, određena količina lipozomnih čestica je verovatno prošla kroz pore PMAC-LS nosača u spoljašnju sredinu tokom procesa bubrenja nosača. Kao posledica toga, proces otpuštanja kofeina

je mogao simultano da se odvija iz PMAC-LS nosača i iz oslobođenih lipozomnih čestica koje se nalaze u spoljašnjoj sredini.

U svakoj ispitivanoj sredini povećanje koncentracije inkapsuliranog kofeina uticalo je na povećanje koncentracije oslobođenog kofeina u sledećem poretku: PMAC-4M-LS20 < PMAC-4M-LS50 < PMAC-4M-LS70 < PMAC-4M-LS100 (Slika 99. a)). U cilju poređenja stepena ciljane dostave i otpuštanja kofeina iz sintetisanih nosača, procenat oslobođenog kofeina predstavljen je kao $(M_t/M_\infty) \cdot 100$. Bolja kontrola otpuštanja kofeina u 0,1M HCl postignuta je iz PMAC-LS nosača sa inkapsuliranom manjom koncentracijom kofeina. Naime, PMAC-4M-LS20 i PMAC-4M-LS50 su oslobodili 0,2% i 0,9% kofeina u ovoj sredini, dok su PMAC-4M-LS70 i PMAC-4M-LS100 oslobodili 2,1% i 2,9% kofeina, respektivno. Procenti oslobođenog kofeina u PB 6,8 i PB 7,4 bili su pet i šest puta viši od procenta kofeina oslobođenog u 0,1M HCl. Brzine oslobađanja kofeina iz PMAC-4M-LS50, PMAC-4M-LS70 i PMAC-4M-LS100 nosača u PB 6,8 i PB 7,4 bile su slične: oko 20 % po času.

Ekperimentalni podaci dobijeni praćenjem otpuštanja kofeina iz nosača sa inkorporiranim različitim udelima lipozomne suspenzije (Slika 99. b)) pokazali su da povećanje zapreminskog udela lipozomne suspenzije dovodi do povećanja oslobođene koncentracije kofena (PMAC-LS100L50 < PMAC-LS100L85 < PMAC-LS100L100), ali ne utiče na brzinu oslobađanja kofeina (oko 14% po času).



Slika 100. Kumulativne krive otpuštanja kofeina iz nosača sa inkorporiranim koncentrovanim lipozomima: a) ispitivanje uticaja promene koncentracije inkapsuliranog kofeina na proces otpuštanja i b) ispitivanje uticaja promene udela koncentrovanih lipozoma u nosačima

Kumulativne krive oslobađanja kofeina iz PMAC-LC nosača prikazane su na Slici 100. Zavisnost procesa oslobađanja kofeina od pH vrednosti spoljašnje sredine bila je ista kao i kod PMAC-LS nosača: sa povećanjem pH vrednosti sredine raste i vrednost stepena bubrenja PMAC-LC nosača, a kao posledica toga raste i koncentracija oslobođenog kofeina. Kao posledica nižih S_{Deq} vrednosti PMAC-LC nosača od S_{Deq} vrednosti PMAC-LS nosača, koncentracija oslobođenog kofeina iz PMAC-LC bila je 20% niža od koncentracije kofeina

oslobođenog iz PMAC-LS nosača. Pomenute interakcije koje su mogle da se uspostave između lipozoma koncentrovanih centrifugiranjem i mreže nosača, smanjile su fleksibilnost mreže što je dovelo do smanjenja stepena bubrenja PMAC-LC nosača, a samim tim i do smanjenja koncentracije oslobođenog kofeina.

Takođe, povećanje koncentracije inkapsuliranog kofeina u PMAC-LC nosačima dovelo je do povećanja oslobođene koncentracije kofeina u svakoj ispitivanoj sredini, ali nije uticalo na brzinu otpuštanja kofeina (oko 15% po času) (Slika 100. a)). Može se zaključiti da je povećanje udela lipozoma koncentrovanih centrifugiranjem takođe uticao na proces otpuštanja kofeina (Slika 100. b)). Povećanje udela inkorporiranih lipozoma koncentrovanih centrifugiranjem dovelo je do povećanja koncentracije oslobođenog kofeina u svakoj ispitivanoj sredini, ali nije uticalo na brzinu oslobađanja kofeina (oko 14% po času).

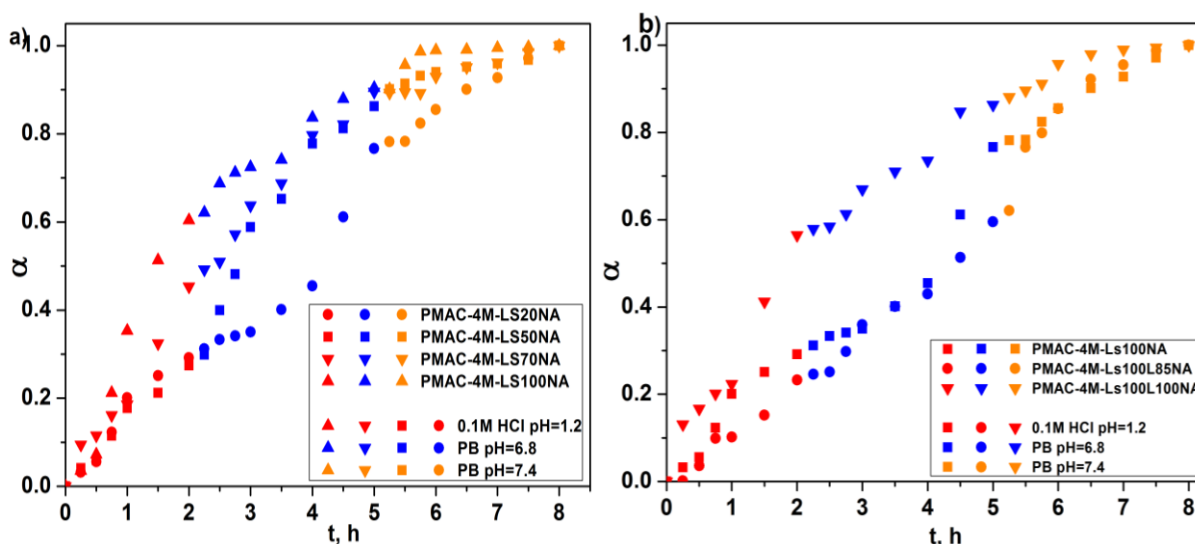
Brzina oslobađanja kofeina iz PMAC-LC nosača bila je manja od brzina oslobađanja kofeina iz PMAC-LS nosača. Ovo bi moglo da bude posledica prethodno pomenutih interakcija uspostavljenih između lipozomnih čestica koncentrovanih centrifugiranjem i kazeina koje su bile brojnije od interakcije koje su se uspostavile između čestica lipozomne suspenzije i kazeina (u PMAC-LS nosačima). Dakle, kao posledica toga količina lipozomnih čestica koncentrovanih centrifugiranjem koja je prošla kroz pore mreže PMAC-LC nosača verovatno je bila manja od količine čestica lipozomne suspenzije koja je prošla kroz pore mreže osnovnih PMAC-LS nosača. Kao posledica toga, oslobađanje kofeina se dešava uglavnom iz PMAC-LC nosača, dok se iz PMAC-LS nosača kofein oslobađao simultano iz nosača i iz slobodnih lipozomnih čestica koje su prošle kroz pore nosača u spoljašnju sredinu.

4.5.3. Kinetika oslobađanja nikotin-amida

Kinetika oslobađanja nikotin-amida iz PMAC-LS nosača analizirana je na osnovu kumulativnih krivih oslobađanja nikotin-amida (Slika 101. a) i b)). Oznakama PMAC-4M-LS20, PMAC-4M-LS50, PMAC-4M-LS70, PMAC-4M-LS100, PMAC-4M-LS100, PMAC-4M-LS100L85 and PMAC-4M-LS100L100 uzoraka dodat je nastavak NA kako bi se istaklo da je nikotin-amid komponenta čije je oslobađanje praćeno (Slika 101. a) i b)). Kako bi se uporedili stepeni ciljane dostave i oslobađanja nikotin-amida iz sintetisanih nosača, procenat oslobođenog nikotin-amida predstavljen je kao $(M_t/M_\infty) \cdot 100$. Može se zaključiti da je veća koncentracija nikotin-amida oslobođena iz svih PMAC-LS nosača u neutralnoj i baznoj sredini (Slika 101. a) i b)). Za svaku ispitivanu sredinu, povećanje stepena inkapsulacije nikotin-amida dovelo je povećanja koncentracije oslobođenog nikotin-amida u sledećem poretku: PMAC-4M-LS20NA < PMAC-4M-LS50NA < PMAC-4M-LS70NA < PMAC-4M-LS100NA (Slika 101. a)), ali nije uticalo na brzinu oslobađanja nikotin-amida (oko 18% po času).

Koncentracija oslobođenog kofeina iz PMAC-4M-LS70 i PMAC-4M-LS100 nosača u PB 6,8 i PB 7,4 bila je slična koncentraciji oslobođenog nikotin-amida. Koncentracija nikotin-amida oslobođena iz PMAC-4M-LS20NA i PMAC-4M-LS50NA nosača u PB 6,8 i PB 7,4 bila je blago viša od koncentracije oslobođenog kofeina iz istih uzoraka. To bi mogao da bude rezultat potencijalno jačih interakcija uspostavljenih između kofeina i jonizovanih karboksilnih grupa PMAA od interakcija uspostavljenih između kofeina i nikotin-amida.

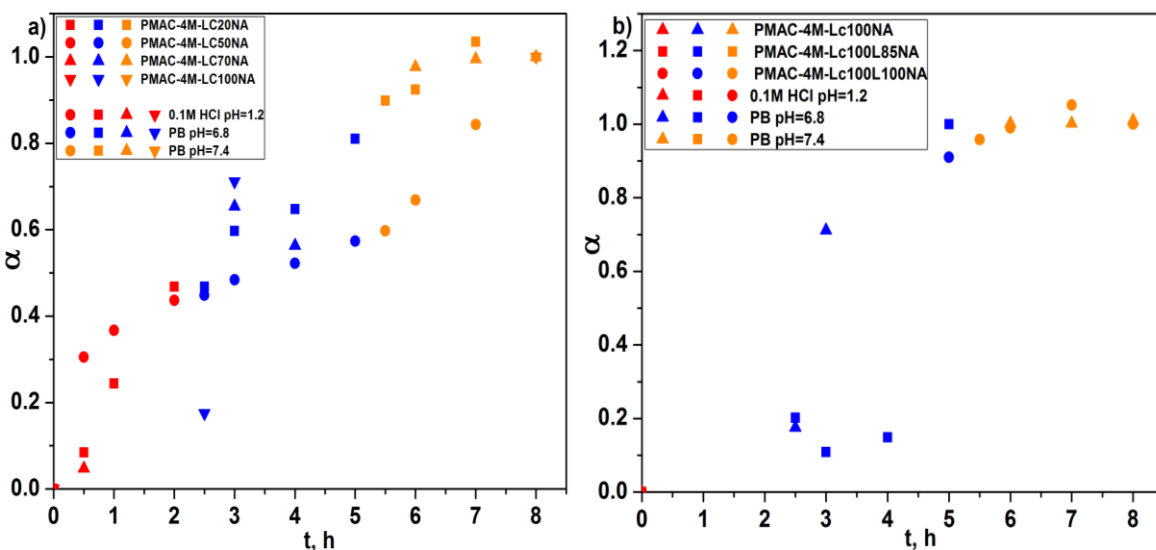
Kumulativne krive otpuštanja nikotin-amida iz PMAC-LS nosača sa inkorporiranom različitim udelima lipozomne suspenzije predstavljene su na Slici 101. b). Može se zaključiti da je koncentracija nikotin-amida oslobođenog iz svih uzoraka bila slična u svakoj sredini (osim uzorka PMAC-4M-LS100L100 koji je oslobodio veću koncentraciju nikotin-amida u PB 6,8 u odnosu na ostale uzorke), što nije bio slučaj kod otpuštanja kofeina (Slika 99. b)). Takođe se može zaključiti da je koncentracija oslobođenog nikotin-amida iz ove serije nosača u PB 6,8 (oko 16% po času) bila viša od koncentracije oslobođenog kofeina. Ovo bi mogao da bude rezultat pomenutih interakcija između kofeina i jonizovanih karboksilnih grupa PMAA. Koncentracije oslobođenog nikotin-amida i kofeina u PB 7,4 su bile slične. Verovatno interakcije između kofeina i PMAA u sredini sa ovom pH vrednošću nisu bile dovoljno jake da uspore oslobađanje kofeina kroz pore PMAC-LS nosača. Naime, kao posledica specifičnog bubrenja, pore PMAC-LS nosača bile su veće u ovoj sredini u odnosu kada se ovi nosači nalaze u PB 6,8 (Odeljak 8.5.2.).



Slika 101. Kumulativne krive otpuštanja nikotin-amida iz nosača sa inkorporiranom lipozomnom suspenzijom: a) ispitivanje uticaja promene koncentracije inkapsuliranog kofeina na proces otpuštanja i b) ispitivanje uticaja promene udela lipozomne suspenzije u nosačima

Oznakama uzoraka PMAC-4M-LC20, PMAC-4M-LC50, PMAC-4M-LC70, PMAC-4M-LC100, PMAC-4M-LC100L50, PMAC-4M-LC100L85 i PMAC-4M-LC100L100 dodata je oznaka NA kako bi se istaklo da je nikotin-amid supstanca čije je otpuštanje praćeno (Slika 102).

a) i b)). Kumulativne krive otpuštanja nikotin-amida iz PMAC-LC nosača (Slika 102. a)) pokazale su da su otpuštene koncentracije nikotin-amida iz PMAC-4M-LC20NA i PMAC-4M-LC50NA nosača bile slične otpuštenim koncentracijama kofeina iz istih uzoraka (Slika 102. a)). PMAC-LC nosači sa inkapsuliranim većim koncentracijama nikotin-amida oslobađali su slabo ovu aktivnu supstancu (Slika 102. a)). Nakon što je kompleks kofein/nikotin-amid bio otpušten iz lipozoma u mrežu PMAC-LC nosača, između nikotin-amida i poli(metakriline kiseline) su mogle da uspostave jake interakcije (kao što su vodonične veze) [311-313]. Kao posledica ovih interakcija nikotin-amid ostaje zarobljen u mreži nosača, dok se kofein oslobađa u spoljašnju sredinu. Kumulativne krive otpuštanja nikotin-amida iz PMAC-LC nosača sa različitim udelima lipozoma koncentrovanih centrifugiranjem (Slika 102. b)) pokazale su da se nikotin-amid iz uzorka PMAC-4M-Lc100L100NA oslobađa samo u jednoj sredini - PB 7,4. Dakle, nosač PMAC-4M-Lc100L100NA bi mogao da se koristi za kontrolisano otpuštanje slabo vodorastvorne aktivne supstance (kao što je kofein) koja je inkapsulirana u koncentracijama znatno višim od njene maksimalne rastvorljivosti, u sredini koja ima pH vrednost 6,8 (kao što je tanko crevo čoveka). Ovaj nosač bi oslobađao nikotin-amid kasnije u sredini čija je pH vrednost 7,4 (kao što je debelo crevo čoveka).



Slika 102. Kumulativne krive otpuštanja nikotin-amida iz nosača sa inkorporiranim koncentrovanim lipozomima: a) ispitivanje uticaja promene koncentracije inkapsuliranog kofeina na proces otpuštanja i b) ispitivanje uticaja promene količine koncentrovanih lipozoma u nosačima

Na osnovu dobijenih podataka može se zaključiti da sintetisani nosači sa dodatim nikotin-amidom imaju veliki potencijal za inkapsulaciju slabo vodorastvornih aktivnih supstanci u koncentracijama koje su više od njihove maksimalne rastvorljivosti, kao i za ciljanu dostavu i kontrolisano otpuštanje tih koncentracija.

5. ZAKLJUČAK

U ovoj tezi sintetisani su pH osetljivi nosači slabo vodorastvorne aktivne supstance- kofeina na bazi poli(metakrilne kiseline), kazeina i lipozoma. Analiziran je uticaj promene udela pojedinih komponenti nosača na strukturu nosača, bubrenje nosača i kinetiku otpuštanja kofeina u dve sredine različitih pH vrednosti: 0,1M HCl (pH=1,2) i fosfatnom puferu (pH=6,8) na 37°C koje su simulirale sredinu u želucu i tankom crevu čoveka. Dobijeni rezultati pokazuju da nosači sa neneutralisanom MAA imaju zrnastu strukturu sačinjenu od gusto raspoređenih micela kazeina i da čestice kofeina nisu vidljive zato što su zaklonjene velikim micelama kazeina. Sa porastom stepena neutralizacije MAA dolazi do disocijacije micela kazeina i njihov broj se smanjuje, da bi kod uzorka sa 100% stepena neutralizacije MAA one bile potpuno disosovane i ovi nosači imaju regularnu poroznu strukturu sa pravilno raspoređenim porama. FTIR spektri su pokazali da su se između kazeina i kofeina uspostavile hidrofobne interakcije i vodonične veze. Kao posledica dobijenih struktura nosača sa porastom stepena neutralizacije dolazi do porasta vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja i vrednosti su znatno više u PB 6,8 u odnosu na 0,1 M HCl. Dakle, uzorci sa većim stepenom neutralizacije MAA više bubre što opet za posledicu ima i otpuštanje veće količine kofeina u PB 6,8 u odnosu na otpuštanje kofeina u 0,1M HCl. Povećanjem stepena umreženja mreže nosača dobijene su strukture nosača sa manjim gustim porama, što je uticalo na smanjenje ravnotežnog stepena bubrenja i sporijeg otpuštanja kofeina. Bubrenje nosača sa većom koncentracijom kofeina u odnosu na osnovne uzorke je manje, što se objašnjava uspostavljanjem većeg broja interakcija između kofeina i kazeina. Dalje povećanje koncentracije kofeina dovodi do povećanja stepena bubrenja nosača zbog izdvajanja dela kofeina na površini nosača, pa se difuzija spoljašnjeg medijuma u pore mreže nosača laše odvija. Koncentracija kofeina može da se povećava do određenog stepena da bi otpuštanje kofeina imalo zadovoljavajuću kinetiku, a kada se ta granica pređe deo kofeina počne da se izdvaja na površini nosača što izaziva brže oslobađanje kofeina na početku procesa. Nosač koji se pokazao kao najbolji za ciljano i kontrolisano otpuštanje većih koncentracija kofeina bio je PMAC-4M-100N-1 (nosač sa 1,6mol% umreživača u odnosu na MAA). Prisustvo inkorporirane lipozomne suspenzije sa kofeinom u nosačima dokazano je SEM analizom koja je pokazala da se oni nalaze raspoređeni po mreži nosača u obliku klastera. Inkorporirani koncentrovani lipozomi sa kofeinom su se na SEM mikrografu mogli videti u obliku pojedinačnih čestica ravnomerno raspoređenih po matriksu nosača. FTIR spektri su pokazali da su između lipozoma i kazeina bile uspostavljene slabe fizičke interakcije i vodonične veze. Lipozomi su dodatno usporili otpuštanje kofeina u obe sredine i postignuta je bolja kontrola oslobađanja. Sa povećanjem udela prisutnih lipozoma u mreži nosača dolazi do smanjenja stepena bubrenja nosača, ali se oslobađa veća količina kofeina zato što sa porastom inkorporiranog udela lipozoma raste i količina kofeina koja će biti inkapsulirana zajedno sa lipozomima u nosač. Može se takođe zaključiti da nosači sa inkorporiranim koncentrovanim lipozomima bubre neznatno manje zbog mogućih jačih interakcija između lipozoma i nosača, usled čega je difuzija spoljašnjeg medijuma u nosač usporena. Takođe je i otpuštena količina kofeina iz ovih nosača nešto manja u odnosu na nosače

sa inkorporiranom lipozomnom suspenzijom zato što je kod lipozomne suspenzije postojala određena količina slobodnog kofeina koji nije inkapsuliran u lipozomima, a koja je takođe mogla da bude otpuštena iz nosača sa inkorporiranom lipozomnom suspenzijom. Ispitan je i uticaj prisustva itakonske kiseline u nosačima i rezultati su pokazali da ovi nosači imaju neregularnu strukturu sa velikim šupljinama, što je za posledicu imalo veće vrednosti ravnotežnih stepena bubrenja i brže otpuštanje kofeina u odnosu na nosače bez prisutne itakonske kiseline. Ovi nosači bi mogli da budu primenjeni kod sistema za ciljano otpuštanje kod kojih je bitno da se otpusti odjednom veća količina slabo vodorastvorne aktivne supstance u intestinalnom traktu čoveka. Nosači sa 1,6mol% umreživača i potpuno neutralisanom MAA u kojima su inkorporirani lipozomi sa inkapsuliranim kofeinom, imali su najoptimalnije osobine za ciljano i kontrolisano otpuštanje većih koncentracija slabo vodorastvorne aktivne supstance, zbog čega su izabrani za praćenje otpuštanja kofeina u uslovima koji simuliraju put nosača kroz gastrointestinalni trakt čoveka. Dobijeni rezultati potvrđuju da bi nosač PMAC-100N-4M-L mogao da se koristi za ciljano otpuštanje većih koncentracija slabo vodorastvorne aktivne supstance u gastrointestinalnom traktu čoveka i dalja istraživanja bi trebalo usmeriti na ispitivanje otpuštanja slabo vodorastvorne aktivne supstance iz ovog nosača u *in vivo* uslovima. Kako bi se postigle koncentracije kofeina koje su više od njegove maksimalne rastvorljivosti u PMAC-100N-4M-L nosač je inkapsuliran i nikotin-amid koji gradi stabilan kompleks sa kofeinom, a eksperimenti otpuštanja kofeina pokazuju da je postignuta željena kinetika. Ovaj nosač ima najveći potencijal za ciljano otpuštanje inkapsuliranih koncentracija slabo vodorastvorne aktivne supstance.

Eksperimentalni podaci PMAC i PMAC/L nosača slabo vodorastvorne aktivne supstance poređeni su sa matematičim modelima koji se najčešće koriste u naučnoj literaturi za opisivanje procesa otpuštanja aktivnih supstanci iz nosača na bazi polimera. Ritger-Peppas model i Kopcha model su se pokazali kao modeli koji najbolje opisuju otpuštanje kofeina iz ispitivanih nosača u svim slučajevima, a kod nosača sa inkapsuliranim kompleksom kofein/nikotin-amid, otpuštanje kofeina moglo je da se opiše samo Kopcha modelom. Kod metode normalizovanog vremena u nekim slučajevima dolazi do promene modela kojima bi moglo da se opiše otpuštanje kofeina kada se promeni neki od reakcionih parametara. Ova metoda nije mogla da se primeni na podatke dobijene praćenjem otpuštanja kofeina iz nosača sa inkapsuliranim kompleksom kofein/nikotin-amid.

Doprinos ove doktorske disertacije ogleda se u mogućnosti kontrole i jednostavnog podešavanja karakteristika hidrofilnog nosača u cilju dobijanja željenog načina i kinetike ciljanog otpuštanja slabo vodorastvorne supstance. Takođe je učinjen iskorak u ciljanom dostavi i kontrolisanom otpuštanju slabovodorastvorne supstance iz hidrofilnog nosača. Pružena je i kompletna slika o ponašanju hidrofilnog nosača slabo vodorastvorne aktivne supstance: njegovom bubrenju i otpuštanju slabovodorastvorne supstance (kao što je kofein) u simuliranom gastrointestinalnom traktu čoveka. Ispitivani nosači bi mogli da imaju primenu i za ciljano dopremanje i kontrolisano otpuštanje kofeina u crevima čoveka, gde bi njegova apsorpcija bila najbrža i bez mogućih neželjenih efekata njegove primene. Dakle, ova doktorska disertacija pruža osnovu i smernice za dalja istraživanja i razvoj nosača slabovodorastvornih supstanci.

6. LITERATURA

- [1] S.J.P. McInnes, T.D. Michl, B. Delalat, S.A. Al-Bataineh, B.R. Coad, K. Vasilev, H.J. Griesser, N.H. Voelcker, "Thunderstruck": Plasma-Polymer-Coated Porous Silicon Microparticles As a Controlled Drug Delivery System, *ACS Applied Materials & Interfaces* 8(7) (2016) 4467-4476.
- [2] 5 - Mathematical models of drug release, in: M.L. Bruschi (Ed.), *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*, Woodhead Publishing 2015, pp. 63-86.
- [3] A. Fick, Ueber Diffusion, *Annalen der Physik* 170(1) (1855) 59-86.
- [4] C. Ding, Z. Li, A review of drug release mechanisms from nanocarrier systems, *Materials Science and Engineering: C* 76 (2017) 1440-1453.
- [5] F. Ullah, M.B.H. Othman, F. Javed, Z. Ahmad, H.M. Akil, Classification, processing and application of hydrogels: A review, *Materials Science and Engineering: C* 57 (2015) 414-433.
- [6] J. Siepmann, F. Siepmann, Mathematical modeling of drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics* 364(2) (2008) 328-343.
- [7] A. Parmar, S. Sharma, Engineering design and mechanistic mathematical models: Standpoint on cutting edge drug delivery, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 100 (2018) 15-35.
- [8] T.R. Hoare, D.S. Kohane, Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges, *Polymer* 49(8) (2008) 1993-2007.
- [9] J.O. Eloy, M. Claro de Souza, R. Petrilli, J.P.A. Barcellos, R.J. Lee, J.M. Marchetti, Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 123 (2014) 345-363.
- [10] E. De Valck, R. Cluydts, Slow-release caffeine as a countermeasure to driver sleepiness induced by partial sleep deprivation, *Journal of Sleep Research* 10(3) (2001) 203-209.
- [11] <https://www.merckmanuals.com/professional/clinical-pharmacology/pharmacokinetics/drug-absorption>.
- [12] E. Caló, V.V. Khutoryanskiy, Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products, *European Polymer Journal* 65 (2015) 252-267.
- [13] P.L. Ritger, N.A. Peppas, A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices, *Journal of Controlled Release* 5(1) (1987) 37-42.
- [14] N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa, Hydrogels in pharmaceutical formulations, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50(1) (2000) 27-46.
- [15] K. Deligkaris, T.S. Tadele, W. Olthuis, A. van den Berg, Hydrogel-based devices for biomedical applications, *Sensors and Actuators B: Chemical* 147(2) (2010) 765-774.
- [16] J. Zhang, H. Xiao, N. Li, Q. Ping, Y. Zhang, Synthesis and characterization of super-absorbent hydrogels based on hemicellulose, *Journal of Applied Polymer Science* 132(34) (2015).
- [17] S. Fang, G. Wang, P. Li, R. Xing, S. Liu, Y. Qin, H. Yu, X. Chen, K. Li, Synthesis of chitosan derivative graft acrylic acid superabsorbent polymers and its application as water retaining agent, *Int J Biol Macromol* 115 (2018) 754-761.
- [18] W.E. Roorda, H.E. Bodde, A.G. De Boer, J.A. Bouwstra, H.E. Junginer, Synthetic hydrogels as drug delivery systems, *Pharm Weekbl Sci* 8(3) (1986) 165-89.
- [19] S. Xue, D. Pei, W. Jiang, Y. Mu, X. Wan, A simple and fast formation of biodegradable poly(urethane-urea) hydrogel with high water content and good mechanical property, *Polymer* 99 (2016) 340-348.
- [20] X. Ma, T. Xu, W. Chen, H. Qin, B. Chi, Z. Ye, Injectable hydrogels based on the hyaluronic acid and poly (gamma-glutamic acid) for controlled protein delivery, *Carbohydr Polym* 179 (2018) 100-109.
- [21] R.A. Kyle, D.P. Steensma, M.A. Shampo, Otto Wichterle—Inventor of the First Soft Contact Lenses, *Mayo Clinic Proceedings* 91(3) (2016) e45-e46.

- [22] M.P. Cuchiara, A.C.B. Allen, T.M. Chen, J.S. Miller, J.L. West, Multilayer microfluidic PEGDA hydrogels, *Biomaterials* 31(21) (2010) 5491-5497.
- [23] A. Vedadghavami, F. Minooei, M.H. Mohammadi, S. Khetani, A. Rezaei Kolahchi, S. Mashayekhan, A. Sanati-Nezhad, Manufacturing of hydrogel biomaterials with controlled mechanical properties for tissue engineering applications, *Acta Biomater* 62 (2017) 42-63.
- [24] D.Y. Ko, U. Shinde, B. Yeon, B. Jeong, Recent progress of in situ formed gels for biomedical applications, 2013.
- [25] T.S. Anirudhan, A.M. Mohan, Novel pH sensitive dual drug loaded-gelatin methacrylate/methacrylic acid hydrogel for the controlled release of antibiotics, *International Journal of Biological Macromolecules* 110 (2018) 167-178.
- [26] Z. Shariatinia, A.M. Jalali, Chitosan-based hydrogels: Preparation, properties and applications, *International Journal of Biological Macromolecules* 115 (2018) 194-220.
- [27] G. Lokhande, J.K. Carrow, T. Thakur, J.R. Xavier, M. Parani, K.J. Bayless, A.K. Gaharwar, Nanoengineered injectable hydrogels for wound healing application, *Acta Biomaterialia* 70 (2018) 35-47.
- [28] T. Thambi, Y. Li, D.S. Lee, Injectable hydrogels for sustained release of therapeutic agents, *Journal of Controlled Release* 267 (2017) 57-66.
- [29] J.R. Xavier, T. Thakur, P. Desai, M.K. Jaiswal, N. Sears, E. Cosgriff-Hernandez, R. Kaunas, A.K. Gaharwar, Bioactive nanoengineered hydrogels for bone tissue engineering: a growth-factor-free approach, *ACS Nano* 9(3) (2015) 3109-18.
- [30] P. Kakkar, B. Madhan, Fabrication of keratin-silica hydrogel for biomedical applications, *Materials Science and Engineering: C* 66 (2016) 178-184.
- [31] M.R. Amiryousefi, M. Mohebbi, S. Golmohammadzadeh, A. Koocheki, F. Baghbani, Fuzzy logic application to model caffeine release from hydrogel colloidosomes, *Journal of Food Engineering* 212 (2017) 181-189.
- [32] Z. Cong, Y. Shi, Y. Wang, Y. Wang, J.e. Niu, N. Chen, H. Xue, A novel controlled drug delivery system based on alginate hydrogel/chitosan micelle composites, *International Journal of Biological Macromolecules* 107 (2018) 855-864.
- [33] C. Siangsano, S. Ummartyotin, K. Sathirakul, P. Rojanapanthu, W. Treesuppharat, Fabrication and characterization of triple-responsive composite hydrogel for targeted and controlled drug delivery system, *Journal of Molecular Liquids* 256 (2018) 90-99.
- [34] N.K. Singh, D.S. Lee, In situ gelling pH- and temperature-sensitive biodegradable block copolymer hydrogels for drug delivery, *Journal of Controlled Release* 193 (2014) 214-227.
- [35] J.M. Rosiak, F. Yoshii, Hydrogels and their medical applications, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 151(1) (1999) 56-64.
- [36] J. Wu, Q. Ding, A. Dutta, Y. Wang, Y.-h. Huang, H. Weng, L. Tang, Y. Hong, An injectable extracellular matrix derived hydrogel for meniscus repair and regeneration, *Acta Biomaterialia* 16 (2015) 49-59.
- [37] J. Leijten, J. Seo, K. Yue, G. Trujillo-de Santiago, A. Tamayol, G.U. Ruiz-Esparza, S.R. Shin, R. Sharifi, I. Noshadi, M.M. Álvarez, Y.S. Zhang, A. Khademhosseini, Spatially and temporally controlled hydrogels for tissue engineering, *Materials Science and Engineering: R: Reports* 119 (2017) 1-35.
- [38] C. Fuoco, E. Sangalli, R. Vono, S. Testa, B. Sacchetti, M.V.G. Latronico, S. Bernardini, P. Madeddu, G. Cesareni, D. Seliktar, R. Rizzi, C. Bearzi, S.M. Cannata, G. Spinetti, C. Gargioli, 3D hydrogel environment rejuvenates aged pericytes for skeletal muscle tissue engineering, *Frontiers in Physiology* 5(203) (2014).
- [39] J.H. Hwang, I.G. Kim, S. Piao, A.R. Jung, J.Y. Lee, K.D. Park, J.Y. Lee, Combination therapy of human adipose-derived stem cells and basic fibroblast growth factor hydrogel in muscle regeneration, *Biomaterials* 34(25) (2013) 6037-6045.
- [40] M.S. Bae, J.-Y. Ohe, J.B. Lee, D.N. Heo, W. Byun, H. Bae, Y.-D. Kwon, I.K. Kwon, Photo-cured hyaluronic acid-based hydrogels containing growth and differentiation factor 5 (GDF-5) for bone tissue regeneration, *Bone* 59 (2014) 189-198.

- [41] I. Roohaniesfahani, J. Wang, Y.J. No, C. de Candia, X. Miao, Z. Lu, J. Shi, D.L. Kaplan, X. Jiang, H. Zreiqat, Modulatory effect of simultaneously released magnesium, strontium, and silicon ions on injectable silk hydrogels for bone regeneration, *Materials Science and Engineering: C* 94 (2019) 976-987.
- [42] M.A. Lopez-Heredia, A. Łapa, A.C. Mendes, L. Balcaen, S.K. Samal, F. Chai, P. Van der Voort, C.V. Stevens, B.V. Parakhonskiy, I.S. Chronakis, F. Vanhaecke, N. Blanchemain, E. Pamuła, A.G. Skirtach, T.E.L. Douglas, Bioinspired, biomimetic, double-enzymatic mineralization of hydrogels for bone regeneration with calcium carbonate, *Materials Letters* 190 (2017) 13-16.
- [43] L.S. Moreira Teixeira, J. Patterson, F.P. Luyten, Skeletal tissue regeneration: where can hydrogels play a role?, *International Orthopaedics* 38(9) (2014) 1861-1876.
- [44] I.S. Cho, M.O. Cho, Z. Li, M. Nurunnabi, S.Y. Park, S.-W. Kang, K.M. Huh, Synthesis and characterization of a new photo-crosslinkable glycol chitosan thermogel for biomedical applications, *Carbohydrate Polymers* 144 (2016) 59-67.
- [45] C.-D. Vlad, I. Poinescu, E. Costea, Comments on the porous structure of poly(methyl methacrylate esters) networks, *European Polymer Journal* 32(9) (1996) 1067-1071.
- [46] Z. Wang, H. Zhang, A.J. Chu, J. Jackson, K. Lin, C.J. Lim, D. Lange, M. Chiao, Mechanically enhanced nested-network hydrogels as a coating material for biomedical devices, *Acta Biomaterialia* 70 (2018) 98-109.
- [47] J. Zimoch, J.S. Padial, A.S. Klar, Q. Vallmajo-Martin, M. Meuli, T. Biedermann, C.J. Wilson, A. Rowan, E. Reichmann, Polyisocyanopeptide hydrogels: A novel thermo-responsive hydrogel supporting pre-vascularization and the development of organotypic structures, *Acta Biomaterialia* 70 (2018) 129-139.
- [48] M. Sepantafar, R. Maheronnaghsh, H. Mohammadi, F. Radmanesh, M.M. Hasani-sadrabadi, M. Ebrahimi, H. Baharvand, Engineered Hydrogels in Cancer Therapy and Diagnosis, *Trends in Biotechnology* 35(11) (2017) 1074-1087.
- [49] Q. Chen, X. Yan, L. Zhu, H. Chen, B. Jiang, D. Wei, L. Huang, J. Yang, B. Liu, J. Zheng, Improvement of Mechanical Strength and Fatigue Resistance of Double Network Hydrogels by Ionic Coordination Interactions, *Chemistry of Materials* 28(16) (2016) 5710-5720.
- [50] V. Can, Z. Kochovski, V. Reiter, N. Severin, M. Siebenbürger, B. Kent, J. Just, J.P. Rabe, M. Ballauff, O. Okay, Nanostructural Evolution and Self-Healing Mechanism of Micellar Hydrogels, *Macromolecules* 49(6) (2016) 2281-2287.
- [51] W. Zhang, X. Liu, J. Wang, J. Tang, J. Hu, T. Lu, Z. Suo, Fatigue of double-network hydrogels, *Engineering Fracture Mechanics* 187 (2018) 74-93.
- [52] N.M. Oliveira, Y.S. Zhang, J. Ju, A.-Z. Chen, Y. Chen, S.R. Sonkusale, M.R. Dokmeci, R.L. Reis, J.F. Mano, A. Khademhosseini, Hydrophobic Hydrogels: Toward Construction of Floating (Bio)microdevices, *Chemistry of Materials* 28(11) (2016) 3641-3648.
- [53] L.E. Nita, A.P. Chiriac, A.G. Rusu, M. Bercea, A. Diaconu, N. Tudorachi, Interpenetrating polymer network systems based on poly(dimethylaminoethyl methacrylate) and a copolymer containing pendant spiroacetal moieties, *Materials Science and Engineering: C* 87 (2018) 22-31.
- [54] F. Ardeshiri, A. Akbari, M. Peyravi, M. Jahanshahi, PDADMAC/PAA semi-IPN hydrogel-coated PVDF membrane for robust anti-wetting in membrane distillation, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 74 (2019) 14-25.
- [55] B.D. Krezović, M.G. Miljković, S.T. Stojanović, S.J. Najman, J.M. Filipović, S.L. Tomić, Structural, thermal, mechanical, swelling, drug release, antibacterial and cytotoxic properties of P(HEA/IA)/PVP semi-IPN hydrogels, *Chemical Engineering Research and Design* 121 (2017) 368-380.
- [56] T. Jayaramudu, K. Varaprasad, E.R. Sadiku, J. Amalraj, Temperature-sensitive semi-IPN composite hydrogels for antibacterial applications, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 572 (2019) 307-316.
- [57] P.M. Kharkar, K.L. Kiick, A.M. Kloxin, Designing degradable hydrogels for orthogonal control of cell microenvironments, *Chemical Society Reviews* 42(17) (2013) 7335-7372.

- [58] Y. Piao, B. Chen, Synthesis and mechanical properties of double cross-linked gelatin-graphene oxide hydrogels, *International Journal of Biological Macromolecules* 101 (2017) 791-798.
- [59] F.G. Thankam, J. Muthu, Influence of physical and mechanical properties of amphiphilic biosynthetic hydrogels on long-term cell viability, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 35 (2014) 111-122.
- [60] D. Žugić, P. Spasojević, Z. Petrović, J. Djonlagić, Semi-interpenetrating networks based on poly(N-isopropyl acrylamide) and poly(N-vinylpyrrolidone), *Journal of Applied Polymer Science* 113(3) (2009) 1593-1603.
- [61] Q.L. Loh, C. Choong, Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size, *Tissue Eng Part B Rev* 19(6) (2013) 485-502.
- [62] Y. Luo, K. Zhang, Q. Wei, Z. Liu, Y. Chen, Poly(MAA-co-AN) hydrogels with improved mechanical properties for theophylline controlled delivery, *Acta Biomaterialia* 5(1) (2009) 316-327.
- [63] M.D. Markovic, P.M. Spasojevic, S.I. Seslija, I.G. Popovic, D.N. Veljovic, R.V. Pjanovic, V.V. Panic, Casein-poly(methacrylic acid) hybrid soft networks with easy tunable properties, *European Polymer Journal* 113 (2019) 276-288.
- [64] <https://polymerdatabase.com/polymer%20chemistry/radical%20polymerization.html>.
- [65] W. Wang, J. Fang, X. Pan, M. Hua, J. Jiang, L. Ni, J. Jiang, Thermal research on the uncontrolled behavior of styrene bulk polymerization, *Journal of Loss Prevention in the Process Industries* 57 (2019) 239-244.
- [66] L. Chen, K. Zhao, X. Cao, J. Liu, X. Yu, Y. Han, Nanowires of conjugated polymer prepared by tuning the interaction between the solvent and polymer, *Polymer* 149 (2018) 23-29.
- [67] C.K. Melo, M. Soares, P.A. Melo, J.C. Pinto, In Situ Incorporation of Recycled Polymer in Suspension Polymerizations, in: R.M. de Brito Alves, C.A.O. do Nascimento, E.C. Biscaia (Eds.), *Computer Aided Chemical Engineering*, Elsevier 2009, pp. 1125-1130.
- [68] W. Wongjajkham, D. Wongsawaeng, P. Hosemann, C. Kanokworakan, V. Ratnitsai, Enhancement of uranium recovery from seawater using amidoximated polymer gel synthesized from radiation-polymerization and crosslinking of acrylonitrile and methacrylic acid monomers, *Journal of Environmental Chemical Engineering* 6(2) (2018) 2768-2777.
- [69] N. Wang, T. Wu, L. Wang, X. Li, C. Zhao, J. Li, S. Ji, Hyperbranched polymer composite membrane using water as solvent for separating aromatic/aliphatic hydrocarbon mixtures, *Separation and Purification Technology* 179 (2017) 225-235.
- [70] W. Wang, Y. Yu, P. Wang, Q. Wang, Y. Li, J. Yuan, X. Fan, Controlled graft polymerization on the surface of filter paper via enzyme-initiated RAFT polymerization, *Carbohydrate Polymers* 207 (2019) 239-245.
- [71] Y. Qiu, K. Park, Environment-sensitive hydrogels for drug delivery, *Adv Drug Deliv Rev* 53(3) (2001) 321-39.
- [72] J. Zhu, R.E. Marchant, Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds, *Expert Review of Medical Devices* 8(5) (2011) 607-626.
- [73] I. Jeon, J. Cui, W.R.K. Illeperuma, J. Aizenberg, J.J. Vlassak, Extremely Stretchable and Fast Self-Healing Hydrogels, *Advanced Materials* 28(23) (2016) 4678-4683.
- [74] M. Zhong, Y.-T. Liu, X.-M. Xie, Self-healable, super tough graphene oxide-poly(acrylic acid) nanocomposite hydrogels facilitated by dual cross-linking effects through dynamic ionic interactions, *Journal of Materials Chemistry B* 3(19) (2015) 4001-4008.
- [75] J.-Y. Sun, X. Zhao, W.R.K. Illeperuma, O. Chaudhuri, K.H. Oh, D.J. Mooney, J.J. Vlassak, Z. Suo, Highly stretchable and tough hydrogels, *Nature* 489 (2012) 133.
- [76] M. Zhong, Y.-T. Liu, X.-Y. Liu, F.-K. Shi, L.-Q. Zhang, M.-F. Zhu, X.-M. Xie, Dually cross-linked single network poly(acrylic acid) hydrogels with superior mechanical properties and water absorbency, *Soft Matter* 12(24) (2016) 5420-5428.

- [77] Y. Zhang, F. Wu, M. Li, E. Wang, pH switching on-off semi-IPN hydrogel based on cross-linked poly(acrylamide-co-acrylic acid) and linear polyallylamine, *Polymer* 46(18) (2005) 7695-7700.
- [78] Y. Garcia, R. Collighan, M. Griffin, A. Pandit, Assessment of cell viability in a three-dimensional enzymatically cross-linked collagen scaffold, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 18(10) (2007) 1991-2001.
- [79] H.-P. Cong, P. Wang, S.-H. Yu, Stretchable and Self-Healing Graphene Oxide–Polymer Composite Hydrogels: A Dual-Network Design, *Chemistry of Materials* 25(16) (2013) 3357-3362.
- [80] M. McGill, J.M. Coburn, B.P. Partlow, X. Mu, D.L. Kaplan, Molecular and macro-scale analysis of enzyme-crosslinked silk hydrogels for rational biomaterial design, *Acta Biomaterialia* 63 (2017) 76-84.
- [81] M.L. Hallensleben, Copolymers from disulphide polymers and vinyl monomers by radical chain transfer, *European Polymer Journal* 13(6) (1977) 437-440.
- [82] B. Kettlitz, M. Yalpani: Polysaccharides, Syntheses, Modifications and Structure/Property Relations (Studies in Organic Chemistry 36). 499 Seiten, zahlr. Abb. und Tab. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo 1988. Preis: 171,- US \$; 325,- Dfl, *Food / Nahrung* 33(10) (1989) 934-934.
- [83] J. Xu, X. Liu, X. Ren, G. Gao, The role of chemical and physical crosslinking in different deformation stages of hybrid hydrogels, *European Polymer Journal* 100 (2018) 86-95.
- [84] A.S. Hoffman, Hydrogels for biomedical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (2012) 18-23.
- [85] M. Mahinroosta, Z. Jomeh Farsangi, A. Allahverdi, Z. Shakoori, Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications, *Materials Today Chemistry* 8 (2018) 42-55.
- [86] A. Das, A. Kumar, N.B. Patil, C. Viswanathan, D. Ghosh, Preparation and characterization of silver nanoparticle loaded amorphous hydrogel of carboxymethylcellulose for infected wounds, *Carbohydrate Polymers* 130 (2015) 254-261.
- [87] C. Bilici, D. Karaarslan, S. Ide, O. Okay, Toughness improvement and anisotropy in semicrystalline physical hydrogels, *Polymer* 151 (2018) 208-217.
- [88] M.E. McNeill, N.B. Graham, Vaginal pessaries from crystalline/rubbery hydrogels for the delivery of prostaglandin E2, *Journal of Controlled Release* 1(2) (1984) 99-117.
- [89] C. Li, L. Zhao, J. Han, R. Wang, C. Xiong, X. Xie, Synthesis of citrate-stabilized hydrocolloids of hydroxyapatite through a novel two-stage method: A possible aggregates–breakdown mechanism of colloid formation, *Journal of Colloid and Interface Science* 360(2) (2011) 341-349.
- [90] T.N. Nekrasova, O.V. Nazarova, A.A. Lezov, M.A. Bezrukova, Y.I. Zolotova, V.D. Pautov, E.F. Panarin, pH- and thermosensitive copolymers of 4-acryloylmorpholine and 2-dialkylaminoethyl methacrylates and silver-containing nanocomposites based on these copolymers, *Materials Today Communications* 19 (2019) 196-203.
- [91] M. Ballauff, O.V. Borisov, Phase transitions in brushes of homopolymers, *Polymer* 98 (2016) 402-408.
- [92] J. Sano, S. Habaue, Synthesis of interpenetrating polymer networks using silicone polymer with silanol residue, *Reactive and Functional Polymers* 137 (2019) 21-26.
- [93] S.K. Ghosh, A. Das, A. Basu, A. Halder, S. Das, S. Basu, M.F. Abdullah, A. Mukherjee, S. Kundu, Semi-interpenetrating hydrogels from carboxymethyl guar gum and gelatin for ciprofloxacin sustained release, *International Journal of Biological Macromolecules* 120 (2018) 1823-1833.
- [94] R. Zhang, M. Tang, A. Bowyer, R. Eienthal, J. Hubble, A novel pH- and ionic-strength-sensitive carboxy methyl dextran hydrogel, *Biomaterials* 26(22) (2005) 4677-4683.
- [95] M. Constantin, S. Bucatariu, V. Harabagiu, I. Popescu, P. Ascenzi, G. Fundueanu, Poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) pH/thermo-responsive porous hydrogels as self-regulated drug delivery system, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 62 (2014) 86-95.

- [96] Y.-E. Moon, G. Jung, J. Yun, H.-I. Kim, Poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic acid)/TiO₂/graphene oxide nanocomposite hydrogels for pH-sensitive photocatalytic degradation of organic pollutants, *Materials Science and Engineering: B* 178(17) (2013) 1097-1103.
- [97] N. Milašinović, N. Milosavljević, J. Filipović, Z. Knežević-Jugović, M.K. Krušić, Synthesis, characterization and application of poly(N-isopropylacrylamide-co-itaconic acid) hydrogels as supports for lipase immobilization, *Reactive and Functional Polymers* 70(10) (2010) 807-814.
- [98] L. Zhu, K.M. Bratlie, pH sensitive methacrylated chitosan hydrogels with tunable physical and chemical properties, *Biochemical Engineering Journal* 132 (2018) 38-46.
- [99] Q. Zhou, L. Zhang, T. Yang, H. Wu, Stimuli-responsive polymeric micelles for drug delivery and cancer therapy, *International journal of nanomedicine* 13 (2018) 2921-2942.
- [100] X. Yan, D. Xu, X. Chi, J. Chen, S. Dong, X. Ding, Y. Yu, F. Huang, A Multiresponsive, Shape-Persistent, and Elastic Supramolecular Polymer Network Gel Constructed by Orthogonal Self-Assembly, *Advanced Materials* 24(3) (2012) 362-369.
- [101] V. Sundaresan, J.U. Menon, M. Rahimi, K.T. Nguyen, A.S. Wadajkar, Dual-responsive polymer-coated iron oxide nanoparticles for drug delivery and imaging applications, *International Journal of Pharmaceutics* 466(1) (2014) 1-7.
- [102] Y. Zhao, M. Lei, S.-X. Liu, Q. Zhao, Smart hydrogel-based optical fiber SPR sensor for pH measurements, *Sensors and Actuators B: Chemical* 261 (2018) 226-232.
- [103] S.L. Tomić, M.M. Mičić, S.N. Dobić, J.M. Filipović, E.H. Suljovrujić, Smart poly(2-hydroxyethyl methacrylate/itaconic acid) hydrogels for biomedical application, *Radiation Physics and Chemistry* 79(5) (2010) 643-649.
- [104] S. Tavazzi, A. Rossi, S. Picarazzi, M. Ascagni, S. Farris, A. Borghesi, Polymer-interaction driven diffusion of eyeshadow in soft contact lenses, *Contact Lens and Anterior Eye* 40(5) (2017) 335-339.
- [105] M.R. Huglin, *Hydrogels in medicine and pharmacy* Edited by N. A. Peppas, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1986 (Vol. I), 1987 (Vols 2 and 3). Vol. 1 Fundamentals, pp. vii + 180, £72.00, ISBN 0-8493-5546-X; Vol. 2 Polymers, pp. vii + 171, £72.00, ISBN 0-8493-5547-8; Vol. 3 Properties and Applications, pp. vii + 195, £8000, ISBN 0-8493-5548-6, *British Polymer Journal* 21(2) (1989) 184-184.
- [106] P. Bawa, V. Pillay, Y.E. Choonara, L.C. du Toit, Stimuli-responsive polymers and their applications in drug delivery, *Biomedical Materials* 4(2) (2009) 022001.
- [107] B. Hilmi, Z.A.A. Hamid, H.M. Akil, B.H. Yahaya, The Characteristics of the Smart Polymer as Temperature or pH-responsive Hydrogel, *Procedia Chemistry* 19 (2016) 406-409.
- [108] J. Fallingborg, Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract, *Dan Med Bull* 46(3) (1999) 183-96.
- [109] D.S. Lima, E.T. Tenório-Neto, M.K. Lima-Tenório, M.R. Guilherme, D.B. Scariot, C.V. Nakamura, E.C. Muniz, A.F. Rubira, pH-responsive alginate-based hydrogels for protein delivery, *Journal of Molecular Liquids* 262 (2018) 29-36.
- [110] N. Tao, G. Li, M. Liu, W. Gao, H. Wu, Preparation of dual responsive low-molecular-weight hydrogel for long-lasting drug delivery, *Tetrahedron* 73(22) (2017) 3173-3180.
- [111] K. Gawel, M. Gao, B.T. Stokke, Impregnation of weakly charged anionic microhydrogels with cationic polyelectrolytes and their swelling properties monitored by a high resolution interferometric technique. Transformation from a polyelectrolyte to polyampholyte hydrogel, *European Polymer Journal* 48(11) (2012) 1949-1959.
- [112] J. Varshosaz, M. Falamarzian, Drug diffusion mechanism through pH-sensitive hydrophobic/polyelectrolyte hydrogel membranes, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 51(3) (2001) 235-240.
- [113] A. Vashist, S. Ahmad, *Smart Materials for Drug Delivery*, 2013.

- [114] K. Makino, J. Hiyoshi, H. Ohshima, Kinetics of swelling and shrinking of poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels at different temperatures, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 19(2) (2000) 197-204.
- [115] L. Ionov, Hydrogel-based actuators: possibilities and limitations, *Materials Today* 17(10) (2014) 494-503.
- [116] R. Liang, L. Wang, H. Yu, A. Khan, B. Ul Amin, R.U. Khan, Molecular design, synthesis and biomedical applications of stimuli-responsive shape memory hydrogels, *European Polymer Journal* 114 (2019) 380-396.
- [117] A. Hebeish, S. Farag, S. Sharaf, T.I. Shaheen, Radically new cellulose nanocomposite hydrogels: Temperature and pH responsive characters, *International Journal of Biological Macromolecules* 81 (2015) 356-361.
- [118] S. Sitar, V. Aseyev, E. Žagar, K. Kogej, Chain dynamics and intermolecular association in dilute aqueous solutions of isotactic and atactic Poly(Methacrylic acid): Effect of NaCl concentration, *Polymer* 174 (2019) 1-10.
- [119] S. Sitar, V. Aseyev, K. Kogej, Differences in association behavior of isotactic and atactic poly(methacrylic acid), *Polymer* 55(3) (2014) 848-854.
- [120] P. Liu, R. Zhang, M. Pei, Design of pH/reduction dual-responsive nanoparticles as drug delivery system for DOX: Modulating controlled release behavior with bimodal drug-loading, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 160 (2017) 455-461.
- [121] J. Breitzkreutz, Leakage of enteric (Eudragit® L)-coated dosage forms in simulated gastric juice in the presence of poly(ethylene glycol), *Journal of Controlled Release* 67(1) (2000) 79-88.
- [122] S. Jabbari, A. Ghamkhari, Y. Javadzadeh, R. Salehi, S. Davaran, Doxorubicin and chrysin combination chemotherapy with novel pH-responsive poly [(lactide-co-glycolic acid)-block-methacrylic acid] nanoparticle, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 46 (2018) 129-137.
- [123] T. Liu, H. Liu, Z. Wu, T. Chen, L. Zhou, Y. Liang, B. Ke, H. Huang, Z. Jiang, M. Xie, T. Wu, The use of poly(methacrylic acid) nanogel to control the release of amoxicillin with lower cytotoxicity, *Materials Science and Engineering: C* 43 (2014) 622-629.
- [124] S. Anjum, A. Gupta, D. Sharma, D. Gautam, S. Bhan, A. Sharma, A. Kapil, B. Gupta, Development of novel wound care systems based on nanosilver nanohydrogels of polymethacrylic acid with Aloe vera and curcumin, *Materials Science and Engineering: C* 64 (2016) 157-166.
- [125] Z. Ma, C. Gao, Y. Gong, J. Shen, Cartilage tissue engineering PLLA scaffold with surface immobilized collagen and basic fibroblast growth factor, *Biomaterials* 26(11) (2005) 1253-1259.
- [126] m.n. Hasaneen, H. Abdel-Aziz, D. M A El-Bialy, A. M Omer, Preparation of chitosan nanoparticles for loading with NPK fertilizer, 2014.
- [127] Y. Tian, M. Wu, R. Liu, Y. Li, D. Wang, J. Tan, R. Wu, Y. Huang, Electrospun membrane of cellulose acetate for heavy metal ion adsorption in water treatment, *Carbohydrate Polymers* 83(2) (2011) 743-748.
- [128] C. Zhang, H.M. Han, P. Qu, J. Xu, Y. Zhou, J. Wang, N. Zhao, J. Xu, Initiator Concentration Effect on Rheological Properties of a pH-Sensitive Semi-IPN Hydrogel Based on Konjac Glucomannan and Methacrylic Acid, *Advanced Materials Research* 627 (2013) 730-733.
- [129] A. Nešić, V. Panic, S. Ostojic, D. Micić, I. Pajić-Lijaković, A. Onjia, S. Velickovic, Physical-chemical behavior of novel copolymers composed of methacrylic acid and 2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid, 2016.
- [130] L.C. du Toit, V. Pillay, M.P. Danckwerts, C. Penny, Formulation and Statistical Optimization of a Novel Crosslinked Polymeric Anti-Tuberculosis Drug Delivery System, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97(6) (2008) 2176-2207.

- [131] M. Caldorera-Moore, K. Maass, R. Hegab, G. Fletcher, N. Peppas, Hybrid responsive hydrogel carriers for oral delivery of low molecular weight therapeutic agents, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 30 (2015) 352-359.
- [132] Y. Shi, Y. Fu, H. Lv, J. Zhong, Z. Liu, D. Ma, W. Xue, Poly(methacrylic acid) microparticles coated with nanolayered chitosan and carbon nanotubes via electrostatic self-assembly for gatifloxacin delivery, *Materials Letters* 125 (2014) 198-201.
- [133] Y.-J. Pan, Y.-Y. Chen, D.-R. Wang, C. Wei, J. Guo, D.-R. Lu, C.-C. Chu, C.-C. Wang, Redox/pH dual stimuli-responsive biodegradable nanohydrogels with varying responses to dithiothreitol and glutathione for controlled drug release, *Biomaterials* 33(27) (2012) 6570-6579.
- [134] P. Zhang, W. Liu, ZnO QD@PMAA-co-PDMAEMA nonviral vector for plasmid DNA delivery and bioimaging, *Biomaterials* 31(11) (2010) 3087-3094.
- [135] E. Larrañeta, L. Barturen, M. Ervine, R.F. Donnelly, Hydrogels based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic acid) and Tween 85 for sustained delivery of hydrophobic drugs, *International Journal of Pharmaceutics* 538(1-2) (2018) 147-158.
- [136] M. Morey, A. Pandit, Responsive triggering systems for delivery in chronic wound healing, *Advanced Drug Delivery Reviews* 129 (2018) 169-193.
- [137] M.R. Saboktakin, R.M. Tabatabaie, A. Maharramov, M.A. Ramazanov, Synthesis and rheological properties of poly(methyl methacrylate)/polymethacrylic acid nanocomposites as denture resins, *Composites Part B: Engineering* 42(4) (2011) 851-855.
- [138] A.T. Cucuruz, E. Andronescu, A. Fikai, A. Ilie, F. Iordache, Synthesis and characterization of new composite materials based on poly(methacrylic acid) and hydroxyapatite with applications in dentistry, *International Journal of Pharmaceutics* 510(2) (2016) 516-523.
- [139] Y. Chen, J. Nan, Y. Lu, C. Wang, F. Chu, Z. Gu, Hybrid Fe₃O₄-Poly(acrylic acid) Nanogels for Theranostic Cancer Treatment, *Journal of Biomedical Nanotechnology* 11(5) (2015) 771-779.
- [140] Y. Zhang, W. Gu, J. Zhao, Z. Qin, A facile, efficient and "green" route to pH-responsive crosslinked poly(methacrylic acid) nanoparticles, 2017.
- [141] D. Pathania, C. Verma, P. Negi, I. Tyagi, M. Asif, N.S. Kumar, E.H. Al-Ghurabi, S. Agarwal, V.K. Gupta, Novel nanohydrogel based on itaconic acid grafted tragacanth gum for controlled release of ampicillin, *Carbohydrate Polymers* 196 (2018) 262-271.
- [142] S.J. Veličković, E.S. Džunuzović, P.C. Griffiths, I. Lacik, J. Filipović, I.G. Popović, Polymerization of itaconic acid initiated by a potassium persulfate/N,N-dimethylethanolamine system, *Journal of Applied Polymer Science* 110(5) (2008) 3275-3282.
- [143] H. Gr̃unewald, *Handbook of Chemistry and Physics*. Von R. C. Weast. The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio/USA 1972. 52. Aufl., XXVII, 2313 S., geb. DM 99.80, *Angewandte Chemie* 84(9) (1972) 445-446.
- [144] B. Taşdelen, N. Kayaman-Apohan, O. Güven, B.M. Baysal, Anticancer drug release from poly(N-isopropylacrylamide/itaconic acid) copolymeric hydrogels, *Radiation Physics and Chemistry* 73(6) (2005) 340-345.
- [145] A. Pourjavadi, Z.M. Tehrani, Mesoporous silica nanoparticles with bilayer coating of poly(acrylic acid-co-itaconic acid) and human serum albumin (HSA): A pH-sensitive carrier for gemcitabine delivery, *Materials Science and Engineering: C* 61 (2016) 782-790.
- [146] B.C. Saha, G.J. Kennedy, Phosphate limitation alleviates the inhibitory effect of manganese on itaconic acid production by *Aspergillus terreus*, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 18 (2019) 101016.
- [147] J.C. da Cruz, E.F. Camporese S̃ervulo, A.M. de Castro, Chapter 10 - Microbial Production of Itaconic Acid, in: A.M. Holban, A.M. Grumezescu (Eds.), *Microbial Production of Food Ingredients and Additives*, Academic Press 2017, pp. 291-316.

- [148] S. Okamoto, T. Chin, K. Nagata, T. Takahashi, H. Ohara, Y. Aso, Production of itaconic acid in *Escherichia coli* expressing recombinant α -amylase using starch as substrate, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 119(5) (2015) 548-553.
- [149] S. Krull, L. Eidt, A. Hevekerl, A. Kuenz, U. Prüße, Itaconic acid production from wheat chaff by *Aspergillus terreus*, *Process Biochemistry* 63 (2017) 169-176.
- [150] W. Guo, Z. Shen, B. Guo, L. Zhang, D. Jia, Synthesis of bio-based copolyester and its reinforcement with zinc diacrylate for shape memory application, *Polymer* 55(16) (2014) 4324-4331.
- [151] A. Moshaverinia, N. Roohpour, J.A. Darr, I.U. Rehman, Synthesis of a proline-modified acrylic acid copolymer in supercritical CO₂ for glass-ionomer dental cement applications, *Acta Biomaterialia* 5(5) (2009) 1656-1662.
- [152] W. Lei, X. Yang, H. Qiao, D. Shi, R. Wang, L. Zhang, Renewable resource-based elastomer nanocomposite derived from myrcene, ethanol, itaconic acid and nanosilica: Design, preparation and properties, *European Polymer Journal* 106 (2018) 1-8.
- [153] N. Milašinović, M. Kalagasidis Krušić, Z. Knežević-Jugović, J. Filipović, Hydrogels of N-isopropylacrylamide copolymers with controlled release of a model protein, *International Journal of Pharmaceutics* 383(1) (2010) 53-61.
- [154] S.N. Dobić, J.M. Filipović, S.L. Tomić, Synthesis and characterization of poly(2-hydroxyethyl methacrylate/itaconic acid/poly(ethylene glycol) dimethacrylate) hydrogels, *Chemical Engineering Journal* 179 (2012) 372-380.
- [155] G. Marcelo, I.C. Ferreira, R. Viveiros, T. Casimiro, Development of itaconic acid-based molecular imprinted polymers using supercritical fluid technology for pH-triggered drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics* 542(1) (2018) 125-131.
- [156] C. Chang, B. Duan, J. Cai, L. Zhang, Superabsorbent hydrogels based on cellulose for smart swelling and controllable delivery, *European Polymer Journal* 46(1) (2010) 92-100.
- [157] H. Niu, F. Wang, R.A. Weiss, Hydrophobic/Hydrophilic Triblock Copolymers: Synthesis and Properties of Physically Cross-Linked Hydrogels, *Macromolecules* 48(3) (2015) 645-654.
- [158] Y. Sekine, H. Takagi, S. Sudo, Y. Kajiwara, H. Fukazawa, T. Ikeda-Fukazawa, Dependence of structure of polymer side chain on water structure in hydrogels, *Polymer* 55(24) (2014) 6320-6324.
- [159] F. Ganji, S. Vasheghani Farahani, E. Vasheghani-Farahani, *Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review*, 2010.
- [160] T. Ikeda-Fukazawa, N. Ikeda, M. Tabata, M. Hattori, M. Aizawa, S. Yunoki, Y. Sekine, Effects of crosslinker density on the polymer network structure in poly-N,N-dimethylacrylamide hydrogels, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 51(13) (2013) 1017-1027.
- [161] J. Zhang, R. Xie, S.-B. Zhang, C.-J. Cheng, X.-J. Ju, L.-Y. Chu, Rapid pH/temperature-responsive cationic hydrogels with dual stimuli-sensitive grafted side chains, *Polymer* 50(11) (2009) 2516-2525.
- [162] D.R. Kioussis, P. Kofinas, Characterization of anion diffusion in polymer hydrogels used for wastewater remediation, *Polymer* 46(22) (2005) 9342-9347.
- [163] J.-O. You, D.T. Auguste, Conductive, Physiologically Responsive Hydrogels, *Langmuir* 26(7) (2010) 4607-4612.
- [164] G.R. Mahdavinia, H. Etemadi, F. Soleymani, Magnetic/pH-responsive beads based on carboxymethyl chitosan and κ -carrageenan and controlled drug release, *Carbohydrate Polymers* 128 (2015) 112-121.
- [165] K. Sunitha, R. Sadhana, D. Mathew, C.P. Reghunadhan Nair, Novel superabsorbent copolymers of partially neutralized methacrylic acid and acrylonitrile: synthesis, characterization and swelling characteristics, *Designed Monomers and Polymers* 18(6) (2015) 512-523.
- [166] A. Pourjavadi, M. Doroudian, Synthesis and characterization of semi-conductive nanocomposite based on hydrolyzed collagen and in vitro electrically controlled drug release study, *Polymer* 76 (2015) 287-294.

- [167] O. Ozay, N. Aktas, N. Sahiner, Hydrogels as a Potential Chromatographic System: Absorption, Speciation, and Separation of Chromium Species from Aqueous Media, *Separation Science and Technology* 46(9) (2011) 1450-1461.
- [168] W.S. Wan Ngah, C.S. Endud, R. Mayanar, Removal of copper(II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan beads, *Reactive and Functional Polymers* 50(2) (2002) 181-190.
- [169] Q. Xu, W. Huang, L. Jiang, Z. Lei, X. Li, H. Deng, KGM and PMAA based pH-sensitive interpenetrating polymer network hydrogel for controlled drug release, *Carbohydr Polym* 97(2) (2013) 565-70.
- [170] A. Nestic, V. Panic, S. Ostojic, D. Micic, I. Pajic-Lijakovic, A. Onjia, S. Velickovic, Physical-chemical behavior of novel copolymers composed of methacrylic acid and 2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid, *Materials Chemistry and Physics* 174 (2016) 156-163.
- [171] N.A. Peppas, P. Colombo, Analysis of drug release behavior from swellable polymer carriers using the dimensionality index, *Journal of Controlled Release* 45(1) (1997) 35-40.
- [172] P.J. Flory, Thermodynamics of High Polymer Solutions, *The Journal of Chemical Physics* 10(1) (1942) 51-61.
- [173] H. Feil, Y.H. Bae, J. Feijen, S.W. Kim, Effect of comonomer hydrophilicity and ionization on the lower critical solution temperature of N-isopropylacrylamide copolymers, *Macromolecules* 26(10) (1993) 2496-2500.
- [174] D.-W. Yin, F. Horkay, J.F. Douglas, J.J. de Pablo, Molecular simulation of the swelling of polyelectrolyte gels by monovalent and divalent counterions, *The Journal of Chemical Physics* 129(15) (2008) 154902.
- [175] É.D. Oliveira, A.F.S. Silva, R.F.S. Freitas, Contributions to the thermodynamics of polymer hydrogel systems, *Polymer* 45(4) (2004) 1287-1293.
- [176] B. Adnadjevic, J. Jovanovic, Novel approach in investigation of the poly(acrylic acid) hydrogel swelling kinetics in water, *Journal of Applied Polymer Science* 107(6) (2008) 3579-3587.
- [177] D. Zhi, Y. Huang, S. Xu, H. Liu, Y. Hu, Molecular thermodynamic model for swelling behavior and volume phase transition of multi-responsive hydrogels, *Fluid Phase Equilibria* 312 (2011) 106-115.
- [178] S. Sharma, A. Parmar, S. Kori, R. Sandhir, PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 80 (2016) 30-40.
- [179] D.C. Bibby, N.M. Davies, I.G. Tucker, Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems, *International Journal of Pharmaceutics* 197(1) (2000) 1-11.
- [180] N. Kamaly, B. Yameen, J. Wu, O.C. Farokhzad, Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release, *Chemical Reviews* 116(4) (2016) 2602-2663.
- [181] T. Higuchi, Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 50(10) (1961) 874-875.
- [182] A. Raval, J. Parikh, C. Engineer, Mechanism and in Vitro Release Kinetic Study of Sirolimus from a Biodegradable Polymeric Matrix Coated Cardiovascular Stent, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 50(16) (2011) 9539-9549.
- [183] F.M. Carbinatto, A.D. de Castro, R.C. Evangelista, B.S.F. Cury, Insights into the swelling process and drug release mechanisms from cross-linked pectin/high amylose starch matrices, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 9(1) (2014) 27-34.
- [184] J.M. Unagolla, A.C. Jayasuriya, Drug transport mechanisms and in vitro release kinetics of vancomycin encapsulated chitosan-alginate polyelectrolyte microparticles as a controlled drug delivery system, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 114 (2018) 199-209.
- [185] P. Li, Y.N. Dai, J.P. Zhang, A.Q. Wang, Q. Wei, Chitosan-alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine, *Int J Biomed Sci* 4(3) (2008) 221-8.

- [186] Y. Fu, W.J. Kao, Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems, *Expert Opinion on Drug Delivery* 7(4) (2010) 429-444.
- [187] X. Yan, Z. Tong, Y. Chen, Y. Mo, H. Feng, P. Li, X. Qu, S. Jin, Bioresponsive Materials for Drug Delivery Based on Carboxymethyl Chitosan/Poly(γ -Glutamic Acid) Composite Microparticles, *Marine Drugs* 15(5) (2017).
- [188] U. Gbureck, E. Vorndran, J.E. Barralet, Modeling vancomycin release kinetics from microporous calcium phosphate ceramics comparing static and dynamic immersion conditions, *Acta Biomaterialia* 4(5) (2008) 1480-1486.
- [189] M. Shi, J.D. Kretlow, P.P. Spicer, Y. Tabata, N. Demian, M.E. Wong, F.K. Kasper, A.G. Mikos, Antibiotic-releasing porous polymethylmethacrylate/gelatin/antibiotic constructs for craniofacial tissue engineering, *Journal of Controlled Release* 152(1) (2011) 196-205.
- [190] A. Raval, J. Parikh, C. Engineer, Mechanism and in Vitro Release Kinetic Study of Sirolimus from a Biodegradable Polymeric Matrix Coated Cardiovascular Stent, 2011.
- [191] K. Kosmidis, P. Macheras, On the dilemma of fractal or fractional kinetics in drug release studies: A comparison between Weibull and Mittag-Leffler functions, *International Journal of Pharmaceutics* 543(1) (2018) 269-273.
- [192] R.W. Korsmeyer, R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, N.A. Peppas, Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers, *International Journal of Pharmaceutics* 15(1) (1983) 25-35.
- [193] N.A. Peppas, B. Narasimhan, Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems, *Journal of Controlled Release* 190 (2014) 75-81.
- [194] Y. Farrag, W. Ide, B. Montero, M. Rico, S. Rodríguez-Llamazares, L. Barral, R. Bouza, Starch films loaded with donut-shaped starch-quercetin microparticles: Characterization and release kinetics, *International Journal of Biological Macromolecules* 118 (2018) 2201-2207.
- [195] A. Fahami, M. Fathi, Development of cress seed mucilage/PVA nanofibers as a novel carrier for vitamin A delivery, *Food Hydrocolloids* 81 (2018) 31-38.
- [196] J. Supramaniam, R. Adnan, N.H. Mohd Kaus, R. Bushra, Magnetic nanocellulose alginate hydrogel beads as potential drug delivery system, *International Journal of Biological Macromolecules* 118 (2018) 640-648.
- [197] A.A. Rafati, A. Ebadi, S. Bavafa, A. Nowroozi, Kinetic study, structural analysis and computational investigation of novel xerogel based on drug-PEG/SiO₂ for controlled release of enrofloxacin, *Journal of Molecular Liquids* 266 (2018) 733-742.
- [198] Y. Farrag, W. Ide, B. Montero, M. Rico, S. Rodríguez-Llamazares, L. Barral, R. Bouza, Preparation of starch nanoparticles loaded with quercetin using nanoprecipitation technique, *International Journal of Biological Macromolecules* 114 (2018) 426-433.
- [199] N.A. Peppas, J.J. Sahlin, A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation, *International Journal of Pharmaceutics* 57(2) (1989) 169-172.
- [200] M. Kopcha, K.J. Tojo, N.G. Lordi, Evaluation of Methodology for Assessing Release Characteristics of Thermosoftening Vehicles, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 42(11) (1990) 745-751.
- [201] S. Dash, P.N. Murthy, L. Nath, P. Chowdhury, Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems, *Acta Pol Pharm* 67(3) (2010) 217-23.
- [202] S.N. Rothstein, S.R. Little, A "tool box" for rational design of degradable controlled release formulations, *Journal of Materials Chemistry* 21(1) (2011) 29-39.
- [203] G. Lamberti, How mathematical modeling tools are helping the pharmaceutical sciences, *International Journal of Pharmaceutics* 496(2) (2015) 157-158.
- [204] R.D. Manga, P.K. Jha, Mathematical Models for Controlled Drug Release Through pH-Responsive Polymeric Hydrogels, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 106(2) (2017) 629-638.

- [205] B. Adnadjevic, J. Jovanovic, A comparative kinetics study of isothermal drug release from poly(acrylic acid) and poly(acrylic-co-methacrylic acid) hydrogels, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 69(1) (2009) 31-42.
- [206] S. Vyazovkin, C.A. Wight, Model-free and model-fitting approaches to kinetic analysis of isothermal and nonisothermal data, *Thermochimica Acta* 340-341 (1999) 53-68.
- [207] S.M.H. Bukhari, S. Khan, M. Rehanullah, N.M. Ranjha, Synthesis and Characterization of Chemically Cross-Linked Acrylic Acid/Gelatin Hydrogels: Effect of pH and Composition on Swelling and Drug Release, *International Journal of Polymer Science* 2015 (2015) 15.
- [208] M. Cheema, A.N. Hristov, F.M. Harte, The binding of orally dosed hydrophobic active pharmaceutical ingredients to casein micelles in milk, *Journal of Dairy Science* 100(11) (2017) 8670-8679.
- [209] Y. Katz, N. Rajuan, M. Goldberg, A. Cohen, E. Heyman, M. Leshno, Avoidance Of Early Regular Exposure To Cow's Milk Protein Is A Major Risk Factor For Development Of Ige Mediated Cow's Milk Allergy (cma), *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123(2, Supplement) (2009) S211.
- [210] Y. Zhang, Q. Zhong, Encapsulation of bixin in sodium caseinate to deliver the colorant in transparent dispersions, 2013.
- [211] T. Huppertz, P.F. Fox, A.L. Kelly, 3 - The caseins: Structure, stability, and functionality, in: R.Y. Yada (Ed.), *Proteins in Food Processing (Second Edition)*, Woodhead Publishing 2018, pp. 49-92.
- [212] A.O. Elzoghby, W.S. Abo El-Fotoh, N.A. Elgindy, Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems, *Journal of Controlled Release* 153(3) (2011) 206-216.
- [213] C.S. Ranadheera, W.S. Liyanaarachchi, J. Chandrapala, M. Dissanayake, T. Vasiljevic, Utilizing unique properties of caseins and the casein micelle for delivery of sensitive food ingredients and bioactives, *Trends in Food Science & Technology* 57 (2016) 178-187.
- [214] A. Shapira, I. Davidson, N. Avni, Y.G. Assaraf, Y.D. Livney, β -Casein nanoparticle-based oral drug delivery system for potential treatment of gastric carcinoma: Stability, target-activated release and cytotoxicity, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 80(2) (2012) 298-305.
- [215] T. Jarungrumlert, K. Nakagawa, S. Adachi, Influence of aggregate structure of casein on the encapsulation efficiency of β -carotene entrapped via hydrophobic interaction, *Food Structure* 5 (2015) 42-50.
- [216] J. Huang, Q. Shu, L. Wang, H. Wu, A.Y. Wang, H. Mao, Layer-by-layer assembled milk protein coated magnetic nanoparticle enabled oral drug delivery with high stability in stomach and enzyme-responsive release in small intestine, *Biomaterials* 39 (2015) 105-113.
- [217] Y.D. Livney, Milk proteins as vehicles for bioactives, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 15(1) (2010) 73-83.
- [218] C.G.d. Kruijff, S.G. Anema, C. Zhu, P. Havea, C. Coker, Water holding capacity and swelling of casein hydrogels, *Food Hydrocolloids* 44 (2015) 372-379.
- [219] F. Song, L.-M. Zhang, J.-F. Shi, N.-N. Li, Novel casein hydrogels: Formation, structure and controlled drug release, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 79(1) (2010) 142-148.
- [220] N.-N. Li, C.-P. Fu, L.-M. Zhang, Using casein and oxidized hyaluronic acid to form biocompatible composite hydrogels for controlled drug release, *Materials Science and Engineering: C* 36 (2014) 287-293.
- [221] A. Jain, D. Thakur, G. Ghoshal, O.P. Katore, B. Singh, U.S. Shivhare, Formation and functional attributes of electrostatic complexes involving casein and anionic polysaccharides: An approach to enhance oral absorption of lycopene in rats in vivo, *International Journal of Biological Macromolecules* 93 (2016) 746-756.
- [222] J. Sangeetha, J. Philip, The interaction, stability and response to an external stimulus of iron oxide nanoparticle-casein nanocomplexes, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 406 (2012) 52-60.

- [223] Z. Zhang, R. Zhang, E.A. Decker, D.J. McClements, Development of food-grade filled hydrogels for oral delivery of lipophilic active ingredients: pH-triggered release, *Food Hydrocolloids* 44 (2015) 345-352.
- [224] Y.P. Patil, S. Jadhav, Novel methods for liposome preparation, *Chemistry and Physics of Lipids* 177 (2014) 8-18.
- [225] N. Dan, Chapter 1 - Vesicle-based drug carriers: Liposomes, polymersomes, and niosomes, in: A.M. Grumezescu (Ed.), *Design and Development of New Nanocarriers*, William Andrew Publishing 2018, pp. 1-55.
- [226] P. Trucillo, R. Campardelli, E. Reverchon, Supercritical CO₂ assisted liposomes formation: Optimization of the lipidic layer for an efficient hydrophilic drug loading, *Journal of CO₂ Utilization* 18 (2017) 181-188.
- [227] Y. Okamoto, K. Taguchi, K. Yamasaki, M. Sakuragi, S.i. Kuroda, M. Otagiri, Albumin-Encapsulated Liposomes: A Novel Drug Delivery Carrier With Hydrophobic Drugs Encapsulated in the Inner Aqueous Core, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 107(1) (2018) 436-445.
- [228] A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *Journal of Molecular Biology* 13(1) (1965) 238-277.
- [229] G. Gregoriadis, B.E. Ryman, Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases, *The Biochemical journal* 124(5) (1971) 58P-58P.
- [230] B.M. Davis, E.M. Normando, L. Guo, L.A. Turner, S. Nizari, P. O'Shea, S.E. Moss, S. Somavarapu, M.F. Cordeiro, Topical Delivery of Avastin to the Posterior Segment of the Eye In Vivo Using Annexin A5-associated Liposomes, *Small* 10(8) (2014) 1575-1584.
- [231] V.D. Nguyen, S. Zheng, J. Han, V.H. Le, J.-O. Park, S. Park, Nanohybrid magnetic liposome functionalized with hyaluronic acid for enhanced cellular uptake and near-infrared-triggered drug release, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 154 (2017) 104-114.
- [232] Y. Shtenberg, M. Goldfeder, H. Prinz, J. Shainsky, Y. Ghantous, I. Abu El-Naaj, A. Schroeder, H. Bianco-Peled, Mucoadhesive alginate pastes with embedded liposomes for local oral drug delivery, *International Journal of Biological Macromolecules* 111 (2018) 62-69.
- [233] R. Pjanovic, R. Stojanovic, Š. M, J. Veljkovic, B.-V. N, S. Pejanovic, Diffusion of lidocaine hydrochloride from lipid microparticles, 2009.
- [234] L. Tavano, R. Muzzalupo, Multi-functional vesicles for cancer therapy: The ultimate magic bullet, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 147 (2016) 161-171.
- [235] H. Li, F. Chen, Preparation and quality evaluation of coenzyme Q10 long-circulating liposomes, *Saudi Journal of Biological Sciences* 24(4) (2017) 797-802.
- [236] H. Ichihara, M. Motomura, Y. Matsumoto, Therapeutic effects and anti-metastasis effects of cationic liposomes against pancreatic cancer metastasis in vitro and in vivo, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 511(3) (2019) 504-509.
- [237] R.P. Singh, H.V. Gangadharappa, K. Mruthunjaya, Phospholipids: Unique carriers for drug delivery systems, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 39 (2017) 166-179.
- [238] G. Jose, Y.-J. Lu, H.-A. Chen, H.-L. Hsu, J.-T. Hung, T.S. Anilkumar, J.-P. Chen, Hyaluronic acid modified bubble-generating magnetic liposomes for targeted delivery of doxorubicin, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 474 (2019) 355-364.
- [239] F. Ravar, E. Saadat, M. Gholami, P. Dehghankelishadi, M. Mahdavi, S. Azami, F.A. Dorkoosh, Hyaluronic acid-coated liposomes for targeted delivery of paclitaxel, in-vitro characterization and in-vivo evaluation, *Journal of Controlled Release* 229 (2016) 10-22.
- [240] I.E. Santo, R. Campardelli, E.C. Albuquerque, S.A.B. Vieira De Melo, E. Reverchon, G.D. Porta, Liposomes Size Engineering by Combination of Ethanol Injection and Supercritical Processing, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 104(11) (2015) 3842-3850.

- [241] J. Hurler, S. Žakelj, J. Mravljak, S. Pajk, A. Kristl, R. Schubert, N. Škalko-Basnet, The effect of lipid composition and liposome size on the release properties of liposomes-in-hydrogel, *International Journal of Pharmaceutics* 456(1) (2013) 49-57.
- [242] L. Zhao, F. Temelli, J.M. Curtis, L. Chen, Preparation of liposomes using supercritical carbon dioxide technology: Effects of phospholipids and sterols, *Food Research International* 77 (2015) 63-72.
- [243] P.C. Soema, G.-J. Willems, W. Jiskoot, J.-P. Amorij, G.F. Kersten, Predicting the influence of liposomal lipid composition on liposome size, zeta potential and liposome-induced dendritic cell maturation using a design of experiments approach, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 94 (2015) 427-435.
- [244] D. Cosco, D. Paolino, F. Cilurzo, F. Casale, M. Fresta, Gemcitabine and tamoxifen-loaded liposomes as multidrug carriers for the treatment of breast cancer diseases, *International Journal of Pharmaceutics* 422(1) (2012) 229-237.
- [245] P. Ringhieri, C. Avitabile, M. Saviano, G. Morelli, A. Romanelli, A. Accardo, The influence of liposomal formulation on the incorporation and retention of PNA oligomers, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 145 (2016) 462-469.
- [246] A.D. Bangham, R.W. Horne, Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope, *Journal of Molecular Biology* 8(5) (1964) 660-670.
- [247] S. Joshi, M.T. Hussain, C.B. Roces, G. Anderluzzi, E. Kastner, S. Salmaso, D.J. Kirby, Y. Perrie, Microfluidics based manufacture of liposomes simultaneously entrapping hydrophilic and lipophilic drugs, *International Journal of Pharmaceutics* 514(1) (2016) 160-168.
- [248] Y. Liu, D. Gao, X. Zhang, Z. Liu, K. Dai, B. Ji, Q. Wang, L. Luo, Antitumor drug effect of betulinic acid mediated by polyethylene glycol modified liposomes, *Materials Science and Engineering: C* 64 (2016) 124-132.
- [249] N. Düzgüneş, S. Nir, Mechanisms and kinetics of liposome–cell interactions, *Advanced Drug Delivery Reviews* 40(1) (1999) 3-18.
- [250] K. Hong, D.S. Friend, C.G. Glabe, D. Papahadjopoulos, Liposomes containing colloidal gold are a useful probe of liposome–cell interactions, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 732(1) (1983) 320-323.
- [251] K.X. Ngo, H. Umakoshi, T. Shimanouchi, H.T. Bui, R. Kuboi, Enhanced Release of Chitosanase from *Streptomyces griseus* through Direct Interaction of Liposome with Cell Membrane under Heat Stress, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106(6) (2008) 602-605.
- [252] G. Betz, A. Aeppli, N. Menshutina, H. Leuenberger, In vivo comparison of various liposome formulations for cosmetic application, *International Journal of Pharmaceutics* 296(1) (2005) 44-54.
- [253] N.A. Mazied, S.A. Ismail, M.F. Abou Taleb, Radiation synthesis of poly[(dimethylaminoethyl methacrylate)-co-(ethyleneglycol dimethacrylate)] hydrogels and its application as a carrier for anticancer delivery, *Radiation Physics and Chemistry* 78(11) (2009) 899-905.
- [254] A.G. Assanhou, W. Li, L. Zhang, L. Xue, L. Kong, H. Sun, R. Mo, C. Zhang, Reversal of multidrug resistance by co-delivery of paclitaxel and lonidamine using a TPGS and hyaluronic acid dual-functionalized liposome for cancer treatment, *Biomaterials* 73 (2015) 284-295.
- [255] Y. Liu, K. Wu, J. Wang, Y. Le, L. Zhang, Continuous production of antioxidant liposome for synergistic cancer treatment using high-gravity rotating packed bed, *Chemical Engineering Journal* 334 (2018) 1766-1774.
- [256] T.M. Allen, P.R. Cullis, Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews* 65(1) (2013) 36-48.
- [257] R. Suzuki, T. Takizawa, Y. Negishi, N. Utoguchi, K. Sawamura, K. Tanaka, E. Namai, Y. Oda, Y. Matsumura, K. Maruyama, Tumor specific ultrasound enhanced gene transfer in vivo with novel liposomal bubbles, *Journal of Controlled Release* 125(2) (2008) 137-144.

- [258] R. Liang, J. Xie, J. Li, K. Wang, L. Liu, Y. Gao, M. Hussain, G. Shen, J. Zhu, J. Tao, Liposomes-coated gold nanocages with antigens and adjuvants targeted delivery to dendritic cells for enhancing antitumor immune response, *Biomaterials* 149 (2017) 41-50.
- [259] V. DiTizio, G.W. Ferguson, M.W. Mittelman, A.E. Houry, A.W. Bruce, F. DiCosmo, A liposomal hydrogel for the prevention of bacterial adhesion to catheters, *Biomaterials* 19(20) (1998) 1877-1884.
- [260] D. Luo, K.A. Carter, A. Razi, J. Geng, S. Shao, D. Giraldo, U. Sunar, J. Ortega, J.F. Lovell, Doxorubicin encapsulated in stealth liposomes conferred with light-triggered drug release, *Biomaterials* 75 (2016) 193-202.
- [261] K. Hadinoto, A. Sundaresan, W.S. Cheow, Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 85(3, Part A) (2013) 427-443.
- [262] E.S. Jeong, H.A. Son, M.K. Kim, K.-H. Park, S. Kay, P.S. Chae, J.W. Kim, Fabrication of monodisperse liposomes-in-microgel hybrid microparticles in capillary-based microfluidic devices, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 123 (2014) 339-344.
- [263] H.J. Seo, H.J. Cha, T.S. Kim, J.-C. Kim, Photo-responsive liposomes decorated with hydrophobically modified poly(vinyl alcohol)-coumarin conjugate, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 19(1) (2013) 310-315.
- [264] A. Jain, S.K. Jain, In vitro release kinetics model fitting of liposomes: An insight, *Chemistry and Physics of Lipids* 201 (2016) 28-40.
- [265] P.-L. Latreille, S. Alsharif, O. Gourgas, S.F. Tehrani, V.G. Roullin, X. Banquy, Release kinetics from nano-inclusion-based and affinity-based hydrogels: A comparative study, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 529 (2017) 739-749.
- [266] Z.H. Asadov, K.A. Huseynova, R.A. Rahimov, G.A. Ahmadova, F.I. Zubkov, Alkyl chain and head-group effect of mono- and diisopropylolalkylamine-polymethacrylic acid complexes in aqueous solution, *Journal of Molecular Liquids* 244 (2017) 533-539.
- [267] S. Chibowski, J. Patkowski, E. Grządka, Adsorption of polyethyleneimine and polymethacrylic acid onto synthesized hematite, *Journal of Colloid and Interface Science* 329(1) (2009) 1-10.
- [268] M. Bonyani, A. Mirzaei, S.G. Leonardi, G. Neri, Silver nanoparticles/polymethacrylic acid (AgNPs/PMA) hybrid nanocomposites-modified electrodes for the electrochemical detection of nitrate ions, *Measurement* 84 (2016) 83-90.
- [269] H. Pawar, D. Douroumis, J.S. Boateng, Preparation and optimization of PMAA-chitosan-PEG nanoparticles for oral drug delivery, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 90 (2012) 102-108.
- [270] M.B.H. Othman, H. Md Akil, S.Z. Md Rasib, A. Khan, Z. Ahmad, Thermal properties and kinetic investigation of chitosan-PMAA based dual-responsive hydrogels, *Industrial Crops and Products* 66 (2015) 178-187.
- [271] I. Colinet, V. Dulong, G. Mocanu, L. Picton, D. Le Cerf, New amphiphilic and pH-sensitive hydrogel for controlled release of a model poorly water-soluble drug, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 73(3) (2009) 345-350.
- [272] I. Colinet, V. Dulong, G. Mocanu, L. Picton, D. Le Cerf, Effect of chitosan coating on the swelling and controlled release of a poorly water-soluble drug from an amphiphilic and pH-sensitive hydrogel, *International Journal of Biological Macromolecules* 47(2) (2010) 120-125.
- [273] T. Ishigami, K. Sugita, K. Suga, Y. Okamoto, H. Umakoshi, High performance optical resolution with liposome immobilized hydrogel, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 136 (2015) 256-261.
- [274] A. Billard, L. Pourchet, S. Malaise, P. Alcouffe, A. Montembault, C. Ladavière, Liposome-loaded chitosan physical hydrogel: Toward a promising delayed-release biosystem, *Carbohydrate Polymers* 115 (2015) 651-657.

- [275] Y. Qu, J. Tang, L. Liu, L. Song, S. Chen, Y. Gao, α -Tocopherol liposome loaded chitosan hydrogel to suppress oxidative stress injury in cardiomyocytes, *International Journal of Biological Macromolecules* 125 (2019) 1192-1202.
- [276] Y. Mao, X. Li, G. Chen, S. Wang, Thermosensitive Hydrogel System With Paclitaxel Liposomes Used in Localized Drug Delivery System for In Situ Treatment of Tumor: Better Antitumor Efficacy and Lower Toxicity, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 105(1) (2016) 194-204.
- [277] K. Pachis, S. Blazaki, M. Tzatzarakis, P. Klepetsanis, E. Naoumidi, M. Tsilimbaris, S.G. Antimisariis, Sustained release of intravitreal flurbiprofen from a novel drug-in-liposome-in-hydrogel formulation, *Eur J Pharm Sci* 109 (2017) 324-333.
- [278] N. El Kechai, A. Bochot, N. Huang, Y. Nguyen, E. Ferrary, F. Agnely, Effect of liposomes on rheological and syringeability properties of hyaluronic acid hydrogels intended for local injection of drugs, *International Journal of Pharmaceutics* 487(1) (2015) 187-196.
- [279] S. Xu, X. An, Preparation, microstructure and function for injectable liposome-hydrogels, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 560 (2019) 20-25.
- [280] M.D. Markovic, V.V. Panic, S.I. Seslija, A.D. Milivojevic, P.M. Spasojevic, N.M. Boskovic-Vragolovic, R.V. Pjanovic, Novel strategy for encapsulation and targeted delivery of poorly water-soluble active substances, *Polymer Engineering & Science* n/a(n/a).
- [281] G.P. Asnani, J. Bahekar, C.R. Kokare, Development of novel pH-responsive dual crosslinked hydrogel beads based on *Portulaca oleracea* polysaccharide-alginate-borax for colon specific delivery of 5-fluorouracil, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 48 (2018) 200-208.
- [282] N.G. Kotla, M. Gulati, S.K. Singh, A. Shivapooja, Facts, fallacies and future of dissolution testing of polysaccharide based colon-specific drug delivery, *Journal of Controlled Release* 178 (2014) 55-62.
- [283] V.V. Panic, P.M. Spasojevic, T.S. Radoman, E.S. Dzunuzovic, I.G. Popovic, S.J. Velickovic, Methacrylic Acid Based Polymer Networks with a High Content of Unfunctionalized Nanosilica: Particle Distribution, Swelling, and Rheological Properties, *The Journal of Physical Chemistry C* 119(1) (2015) 610-622.
- [284] K.K. Lai, R. Renneberg, W.C. Mak, High efficiency single-step biomaterial-based microparticle fabrication via template-directed supramolecular coordination chemistry, *Green Chemistry* 18(6) (2016) 1715-1723.
- [285] I.F. Amaral, P.L. Granja, M.A. Barbosa, Chemical modification of chitosan by phosphorylation: an XPS, FT-IR and SEM study, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 16(12) (2005) 1575-1593.
- [286] E.J. Elzinga, D.L. Sparks, Phosphate adsorption onto hematite: An in situ ATR-FTIR investigation of the effects of pH and loading level on the mode of phosphate surface complexation, *Journal of Colloid and Interface Science* 308(1) (2007) 53-70.
- [287] N. Noor, A. Shah, A. Gani, A. Gani, F.A. Masoodi, Microencapsulation of caffeine loaded in polysaccharide based delivery systems, *Food Hydrocolloids* 82 (2018) 312-321.
- [288] N. Chen, P. Di, S. Ning, W. Jiang, Q. Jing, G. Ren, Y. Liu, Y. Tang, Z. Xu, G. Liu, F. Ren, Modified rivaroxaban microparticles for solid state properties improvement based on drug-protein/polymer supramolecular interactions, *Powder Technology* 344 (2019) 819-829.
- [289] A. Mohan, D.J. McClements, C.C. Udenigwe, Encapsulation of bioactive whey peptides in soy lecithin-derived nanoliposomes: Influence of peptide molecular weight, *Food Chemistry* 213 (2016) 143-148.
- [290] E.S. Rufino, E.E.C. Monteiro, Characterisation of lithium and sodium salts of poly(methacrylic acid) by FTIR and thermal analyses, *Polymer* 41(11) (2000) 4213-4222.
- [291] M. Grit, D.J.A. Crommelin, Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability, *Chemistry and Physics of Lipids* 64(1) (1993) 3-18.

- [292] A.A. Jovanović, B.D. Balanč, A. Ota, P. Ahlin Grabnar, V.B. Djordjević, K.P. Šavikin, B.M. Bugarski, V.A. Nedović, N. Poklar Ulrih, Comparative Effects of Cholesterol and β -Sitosterol on the Liposome Membrane Characteristics, *European Journal of Lipid Science and Technology* 120(9) (2018) 1800039.
- [293] V.V. Panic, Z.P. Madzarevic, T. Volkov-Husovic, S.J. Velickovic, Poly(methacrylic acid) based hydrogels as sorbents for removal of cationic dye basic yellow 28: Kinetics, equilibrium study and image analysis, *Chemical Engineering Journal* 217 (2013) 192-204.
- [294] S. Khan, N.M. Ranjha, Effect of degree of cross-linking on swelling and on drug release of low viscous chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogels, *Polymer Bulletin* 71(8) (2014) 2133-2158.
- [295] D. Şolpan, S. Duran, D. Saraydin, O. Güven, Adsorption of methyl violet in aqueous solutions by poly(acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels, *Radiation Physics and Chemistry* 66(2) (2003) 117-127.
- [296] S. Pairatwachapun, N. Paradee, A. Sirivat, Controlled release of acetylsalicylic acid from polythiophene/carrageenan hydrogel via electrical stimulation, *Carbohydrate Polymers* 137 (2016) 214-221.
- [297] Y. Guo, P. Harris, A. Kaur, L. Pastrana, P. Jauregi, Characterisation of β -lactoglobulin nanoparticles and their binding to caffeine, *Food Hydrocolloids* 71 (2017) 85-93.
- [298] D. Pentak, M. Maciążek-Jurczyk, Z.H. Zawada, The role of nanoparticles in the albumin-cytarabine and albumin-methotrexate interactions, *Materials Science and Engineering: C* 73 (2017) 388-397.
- [299] M. Sakthivel, D.S. Franklin, S. Sudarsan, G. Chitra, T.B. Sridharan, S. Guhanathan, Investigation on pH/salt-responsive multifunctional itaconic acid based polymeric biocompatible, antimicrobial and biodegradable hydrogels, *Reactive and Functional Polymers* 122 (2018) 9-21.
- [300] M.P. Kesavan, S. Ayyanaar, N. Lenin, M. Sankarganesh, J. Dhavethu Raja, J. Rajesh, One pot synthesis of new poly(vinyl alcohol) blended natural polymer based magnetic hydrogel beads: Controlled natural anticancer alkaloid delivery system, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 106(2) (2018) 543-551.
- [301] M.P. Evstigneev, V.P. Evstigneev, A.A.H. Santiago, D.B. Davies, Effect of a mixture of caffeine and nicotinamide on the solubility of vitamin (B2) in aqueous solution, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 28(1) (2006) 59-66.
- [302] T. Nii, F. Ishii, Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method, *International Journal of Pharmaceutics* 298(1) (2005) 198-205.
- [303] B. Guldiken, M. Gibis, D. Boyacioglu, E. Capanoglu, J. Weiss, Physical and chemical stability of anthocyanin-rich black carrot extract-loaded liposomes during storage, *Food Research International* 108 (2018) 491-497.
- [304] K. Suktham, T. Koobkokkrud, S. Saesoo, N. Saengkrit, S. Surassmo, Physical and biological characterization of sericin-loaded copolymer liposomes stabilized by polyvinyl alcohol, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 148 (2016) 487-495.
- [305] R. Verma, L. Kumar, Characterization of caffeine isolated from camellia sinensis leaves of sikkim himalayan region, 2010.
- [306] H. El Hamdani, M. El Amame, C. Duhayon, Studies on the syntheses, structural Characterization, antimicrobial of the CO-CRYSTAL 1,10-phenanthroline-1-IUM(1,10-phenH⁺)-caffeine(caf)-hexafluorophosphate, *Journal of Molecular Structure* 1155 (2018) 789-796.
- [307] S. Bayar, A. Ataç, Ş. Yurdakul, Coordination behaviour of nicotinamide: an infrared spectroscopic study, *Journal of Molecular Structure* 655(1) (2003) 163-170.
- [308] A.C. Tella, S.O. Owalude, P.A. Ajibade, N. Simon, S.J. Olatunji, M.S.M. Abdelbaky, S. Garcia-Granda, Synthesis, characterization, crystal structure and antimicrobial studies of a novel Cu(II) complex based on itaconic acid and nicotinamide, *Journal of Molecular Structure* 1125 (2016) 570-575.

- [309] A.S. Pessoa, G.P.S. Aguiar, J. Vladimir Oliveira, A.J. Bortoluzzi, A. Paulino, M. Lanza, Precipitation of resveratrol-isoniazid and resveratrol-nicotinamide cocrystals by gas antisolvent, *The Journal of Supercritical Fluids* 145 (2019) 93-102.
- [310] V. Panic, B. Adnadjevic, S. Velickovic, J. Jovanovic, The effects of the synthesis parameters on the xerogels structures and on the swelling parameters of the poly(methacrylic acid) hydrogels, *Chemical Engineering Journal* 156(1) (2010) 206-214.
- [311] L. Wu, B. Sun, Y. Li, W. Chang, Study properties of molecular imprinting polymer using a computational approach, *Analyst* 128(7) (2003) 944-949.
- [312] L. Wu, Y. Li, Study on the recognition of templates and their analogues on molecularly imprinted polymer using computational and conformational analysis approaches, *Journal of Molecular Recognition* 17(6) (2004) 567-574.
- [313] Y. Işıkver, T. Ecevit, Preparation and characterization of nicotine-selective hydrogels, *Polymer Engineering & Science* 56(9) (2016) 1004-1011.

BIOGRAFIJA AUTORA

Maja D. Marković, master inženjer tehnologije, rođena je 12.04.1989. godine u Kragujevcu, gde je završila osnovnu školu i Prvu kragujevačku gimnaziju, kao nosilac Vukove diploma. Osnovne akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2008/2009. godine, a završila je u julu 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,29. Tokom osnovnih studija bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, dva puta je dobila nagradu „Panta S, Tutundžić”, kao i nagradu Srpskog-hemijskog društva za ukupan uspeh na osnovnim studijama. Master akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 2012/2013. godine, a završila 2013. godine na studijskom programu Hemijsko inženjerstvo sa prosečnom ocenom 9,75. Školske 2013/2014. godine upisala je doktorske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Hemijsko inženjerstvo. Ispite doktorskih studija položila je sa ocenom 10 uključujući i završni ispit. Član je Srpskog hemijskog društva. Od aprila do novembra 2014. godine bila je na stručnoj praksi u firmi Herba svet d.o.o. Beograd, koja se bavi proizvodnjom dijetetskih kapi na biljnoj bazi i kapsula. Od novembra 2014. godine do jula 2018. godine bila je i stalno zaposlena u istoj firmi, na poziciji tehnologa. Privredna komora Srbije i SGS, dodelili su joj diplomu za pohađanje seminara GMP - Dobra proizvođačka praksa (april 2016). Od jula 2018. godine zaposlena je u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije - III 46010.

Autor je 2 rada u međunarodnim časopisima (1 M21 i 1 M22), 2 saopštenja na međunarodnim i domaćim skupovima (jedan M33 i jedan M64), a treći rad je u trenutku pisanja Referata bio u procesu dodele DOI broja u časopisu M22 kategorije.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Маја Марковић**

Број индекса **4005/2013**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Кинетика ослобађања слабо водорастворних активних супстанци из носача на бази поли(метакрилне киселине), казеина и липозома”

- 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, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Маја Марковић**

Број индекса **4005/2013**

Студијски програм **Хемијско инжењерство**

Наслов рада „**Кинетика ослобађања слабо водорастворних активних супстанци из носача на бази поли(метакрилне киселине), казеина и липозома**”

Ментор **проф. др Рада Пјановић и др Весна Панић**

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, _____

Изјава о коришћењу

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

„Кинетика ослобађања слабо водорастворних активних супстанци из носача на бази поли(метакрилне киселине), казеина и липозома”

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла 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/ла.

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, _____

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