

Univerzitet u Beogradu
Tehnološko-metalurški fakultet

Ivana Jovanović, dipl.ing.tehnol.

**Dobijanje čistih i kompozitnih prahova od
poli-L-laktida i poli-D,L-laktida modifikovanom
precipitacionom metodom i njihova karakterizacija**

-Magistarska teza-

Beograd
Decembar 2008.

Istraživanja izvršena u okviru ove magistarske teze ostvarena su u okviru Projekta 142006 "Sinteza funkcionalnih materijala sa kontrolisanom strukturom na molekularnom i nano nivou" u Institutu tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti pod rukovodstvom prof. dr Dragana Uskokovića kome dugujem iskrenu zahvalnost za svu podršku i pomoć u mom naučnom usavršavanju. Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Radoslavu Aleksiću, redovnom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta, koji je prihvatio da bude mentor ove teze i dr Milenku Plavšiću, profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta.

Posebnu zahvalnost dugujem kolegici dr Magdaleni Stevanović, naučnom saradniku Instituta tehničkih nauka SANU, na velikoj pomoći tokom rada na mojoj tezi. Takođe se zahvaljujem dr Nenadu Ignjatoviću, višem naučnom saradniku iz Instituta tehničkih nauka SANU na značajnim sugestijama koje su doprinele boljem sagledavanju rešavanih problema. Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Branki Jordović i Bori Nedeljkoviću sa Tehničkog fakulteta iz Čačka na izuzetno velikom radu posvećenom stereološkim merenjima uzoraka. Takođe se zahvaljujem dr Svetlani Dinić, naučnom saradniku Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu na velikoj pomoći vezanoj za rad sa proteinima.

U okviru ove teze, karakterizacija uzoraka rendgeno-strukturnom analizom urađena je zahvaljujući saradnji sa dr Miodragom Mitrićem iz Instituta za nuklearne nauke Vinča, Laboratorija za teorijsku fiziku i fiziku kondenzovane materije, kome se posebno zahvaljujem na savetima i stručnoj pomoći. Veliku zahvalnost dugujem profesoru Milošu Bokorovu sa Biološkog fakulteta iz Novog Sada na karakterizaciji uzoraka skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Analiza uzoraka metodom infracrvene spektroskopije je urađena zahvaljujući pomoći Aleksandre Radulović iz Instituta za opštu i fizičku hemiju. Ispitivanje uzoraka diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom je urađeno zahvaljujući saradnji sa dipl. ing. Branislavom Božićem iz preduzeća "DUGA-Industrija boja i lakova" i Dejanom Miličevićem iz Instituta za nuklearne nauke Vinča, Laboratorija za radijacionu hemiju i fiziku. Elektroforetska merenja urađena su zahvaljujući dr Marijani Petković višem naučnom saradniku iz Instituta za nuklearne nauke Vinča, Laboratorija za fizičku hemiju i dr Zoranu Vujčiću, docentu sa Hemijskog fakulteta. Takođe se zahvaljujem kolegici mr Mariji Jevtić, istraživaču saradniku Instituta tehničkih nauka SANU, na pomoći oko sređivanja slika i svim zaposlenima iz Instituta tehničkih nauka SANU na izuzetno kolegijalnom i prijateljskom odnosu. Naravno, moja porodica je, kao i uvek do sada, bila moj najači izvor energije i podstrek.

Teza se sastoji iz devet celina. Prvo poglavlje predstavlja teorijski deo u kome je dat pregled literature koja se sastoji iz četiri glavne celine: upotreba kompozitnih čestica u kontrolisanoj dostavi lekova, biokompatibilnost kompozitnih čestica, polimeri u kompozitnim česticama i sferne kompozitne čestice. Drugo poglavlje objašnjava ukratko cilj rada. Treće poglavlje se odnosi na eksperimentalni rad kao i uslove pod kojima je rađena karakterizacija uzoraka. U četvrtom poglavlju su dati rezultati istraživanja na sistemu PLLA, u petom poglavlju su dati rezultati istraživanja na sistemu PDLLA, u šestom poglavlju su dati rezultati istraživanja na kompozitnim sistemima PDLLA+BSA i PDLLA+HRP, dok se sedmo poglavlje odnosi na diskusiju rezultata sva četiri sistema. Osmo poglavlje se odnosi na zaključke, dok je u devetom poglavlju dat pregled literature.

Abstract

A considerable care is currently paid worldwide to the development of biodegradable microspheres as systems for controlled release of medicaments. The major disadvantage of traditional medicaments administration method is the need for frequent dosage repetition. Encapsulation has been proven to be an effective vehicle for the controlled delivery of various medicaments. The encapsulation efficiency and release kinetics of the medicaments have been found to depend upon the size of the microspheres synthesized. Biodegradable micro- and nanospheres made of poly-L-lactide (PLLA) and poly-DL-lactide (PDLLA) are very potent drug or antigen delivery systems with inherent potential for controlled drug delivery and drug and antigen targeting.

The objective of this thesis was to formulate empty and composite microspheres from PLLA and PDLLA by modified precipitation method. Biodegradable microspheres such as those made of poly-DL-lactide (PDLLA) are widely investigated delivery systems for proteins. This study investigated the effects of some process variables on the morphology and size distribution of PLLA and PDLLA microspheres prepared by precipitation method. Preparation conditions were then optimized to obtain the smallest protein-loaded spheres. PDLLA microspheres can protect proteins against biological inactivation and can release them at specific moments during the prolonged period of time. For the purpose of this paper, bovine serum albumin (BSA) and horseradish peroxidase (HRP) were used as the model proteins, as they were incorporated into PDLLA spheres. The aim of this study was to optimize experimental conditions in order to produce composite microspheres with the best properties for controlled and sustained delivery of proteins (HRP and BSA). The ability to control size of spheres should facilitate investigations of their scope for drug delivery. For this purpose, the following parameters were varied: co-solvent (methanol or ethanol), the concentration of stabilizer polyvinyl alcohol (PVA), chloroform-to-water ratio as well as the speed and time of homogenization. The average size and morphology of PLLA, PDLLA and composite microspheres (PDLLA+BSA and PDLLA+HRP) vary substantially if these preparation conditions are changed. Scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), differential scanning calorimetry (DSC), infrared spectroscopy (IR), electrophoresis and stereological analysis were used to characterize the particles.

Izvod

U svetu trenutno postoji značajna potreba za otkrićem biodegradabilnih mikro i nanosfera koje se koriste kao sistemi za kontrolisanu dostavu medikamenata. Glavni, ali ne i jedini nedostatak tradicionalnog načina doziranja medikamenata se ogleda u potrebi za čestim ponavljanjem doza. Inkapsulacija je potvrđena kao efektivan način za kontrolisanu dostavu različitih aktivnih supstanci. Zbog svojih atraktivnih svojstava mikrosfere biodegradabilnih polimera poli-L-laktida (PLLA) i poli-D,L-laktida (PDLLA) su našle veliku primenu u mikroinkapsulaciji lekova i antigena sa nerazdvojnim potencijalom za kontrolisanu i ciljanu dostavu lekova i antigena.

U ovoj magistarskoj tezi je opisano procesiranje čistih i kompozitnih mikrosfera PLLA i PDLLA modifikovanom precipitacionom metodom. Biodegradabilne sfere poli-D,L-laktida su sistemi koji su dosta istraživani u cilju kontrolisane dostave proteina. U ovim istraživanjima rađeno je ispitivanje pojedinih promenljivih parametara procesa kako bi se ispitaio njihov uticaj na morfološke karakteristike i distribuciju veličina mikrosfera PLLA i PDLLA dobijenih precipitacionom metodom. Uslovi pod kojima su procesirane PLLA i PDLLA mikrosfere su dalje optimizovani kako bi se dobile najmanje sfere u kojima je inkorporiran protein. Mikrosfere od PDLLA mogu zaštititi proteine od gubitka biološke aktivnosti i obezbediti otpuštanje proteina u odgovarajućim trenucima tokom produženog vremenskog perioda. U ovom radu, kao model proteini korišćeni su bovin serum albumin (BSA) i peroksidaza iz rena (HRP), koji su inkorporirani u sferama PDLLA. Cilj ovog rada je bio i da se optimizuju eksperimentalni uslovi kako bi se dobile kompozitne mikrosfere sa najboljim karakteristikama koje su neophodne za kontrolisanu dostavu proteina (HRP i BSA) sa produženim dejstvom i izračunala efikasnost inkapsulacije. Sposobnost kontrole veličine sfera bi mogla da olakša istraživanja na polju kontrolisane dostave lekova. U ove svrhe, varirani su sledeći parametri: korastvarač (metanol ili etanol), koncentracija surfaktanta PVA, zapreminski odnos hloroforma prema vodi, kao i brzina i vreme homogenizacije. Morfologija i veličina čestica PLLA, PDLLA i kompozita (PDLLA+BSA i PDLLA +HRP), se značajno menjaju promenom ovih uslova procesiranja. Za karakterizaciju dobijenih prahova korišćene su skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM), rendgenska difrakcija (XRD), diferencijalna skanirajuća kalorimetrija (DSC), infracrvena spektroskopija (IR), elektroforeza i stereološka analiza.

Sadržaj

UVOD	3
1. TEORIJSKI DEO	7
1.1. UPOTREBA KOMPOZITNIH ČESTICA U KONTROLISANOJ DOSTAVI LEKOVA	8
1.1.1 OTPUŠTANJE TERAPEUTSKIH AGENASA IZ KOMPOZITNIH ČESTICA	9
1.1.1.1 <i>Degradacija polimera i erozija</i>	10
1.1.2 NAČINI DOZIRANJA TERAPEUTSKIH AGENASA INKORPORIRANIH U KOMPOZITNIM ČESTICAMA	12
1.2 BOKOMPATIBILNOST KOMPOZITNIH ČESTICA	13
1.3 POLIMERI U KOMPOZITNIM ČESTICAMA	14
1.3.1 ALIFATIČNI POLIESTRI	15
1.3.1.1 <i>Poliglikolid, PGA</i>	16
1.3.1.2 <i>Polilaktid, PLA</i>	17
1.3.1.3 <i>Poli(laktid-ko-glikolid), PLGA</i>	20
1.3.2 PROTEINI	21
1.4 SFERNE KOMPOZITNE ČESTICE	23
1.4.1 METODE KOJE SE KORISTE ZA PROCESIRANJE MIKROSFERA	28
1.4.1.1 <i>Emulzija ulje-u-vodi (u/v)</i>	28
1.4.1.2 <i>Emulzija voda-u-ulju-u-vodi (v/u/v)</i>	29
1.4.1.3 <i>Emulzije ulje-u-ulju (u/u) i voda-u-ulju-u-ulju (v/u/u)</i>	30
1.4.1.4 <i>Dijaliza</i>	30
1.4.1.5 <i>Metoda raspršivanja</i>	31
1.4.2 UTICAJ RAZLIČITIH PARAMETARA NA PROCESIRANJE MIKROSFERA	32
1.4.3 INKAPSULACIJA BIOMAKROMOLEKULA U POLIMERNE MIKROSFERE OD PLLA I PDLLA	34
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	38
3. EKSPERIMENTALNI DEO I METODE KARAKTERIZACIJE	41
3.1 EKSPERIMENTALNI RAD	42
3.1.1 EKSPERIMENTALNI POSTUPAK	43
3.2 EKSPERIMENTALNE METODE	46
3.2.1 METODA CENTRIFUGALNOG PROCESIRANJA	46
3.2.2 RENDGENOSTRUKTURNA ANALIZA	46
3.2.3 INFRACRVENA SPEKTROKOPIJA	48
3.2.4 DIFERENCIJALNA SKANIRAJUĆA KALORIMetriJA	48
3.2.5 ELEKTROFOREZA- Natrijum DODECILSULFAT POLIAKRILAMID GEL ELEKTROFOREZA (SDS PAGE)	49
3.2.6 SKENIRAJUĆA ELEKTRONSKA MIKROKOPIJA	50
3.2.7 STEREOLOŠKA ANALIZA	51
3.2.8 UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIJA	51
4. REZULTATI	53
4.1 REZULTATI PRAHA POLI-L-LAKTID, PLLA	54
4.1.1 REZULTATI RENDGENSKE ANALIZE PRAHA PLLA	54
4.1.2 REZULTATI SKENIRAJUĆE ELEKTRONSKE MIKROKOPIJE (SEM) PRAHA PLLA	54
4.1.3 REZULTATI STEREOLOŠKE ANALIZE (METODA ANALIZE POVRŠINSKE PROJEKCIJE)	56

4.2 REZULTATI PRAHA POLI-D,L-LAKTID, PDLLA	61
4.2.1 REZULTATI INFRACRVENE SPEKTROSKOPIJE PRAHA PDLLA.....	61
4.2.2 REZULTATI DIFERENCIJALNE SKANIRAJUĆE KALORIMETRIJE PRAHA PDLLA.....	62
4.2.3 REZULTATI SKENIRAJUĆE ELEKTRONSKE MIKROSKOPIJE PRAHA PDLLA.....	63
4.2.4 REZULTATI STEREOLOŠKIH MERENJA ČESTICA PRAHA PDLLA.....	68
4.3 REZULTATI PRAHOVA KOMPOZITA (PDLLA+BSA I PDLLA+HRP)	79
4.3.1 REZULTATI SKENIRAJUĆE ELEKTRONSKE MIKROSKOPIJE (SEM) PRAHOVA KOMPOZITA (PDLLA+BSA I PDLLA+HRP).....	79
4.3.2 REZULTATI STEREOLOŠKE ANALIZE PRAHOVA KOMPOZITA (PDLLA+BSA I PDLLA+HRP).....	83
4.3.3 REZULTATI SDS-PAGE ELEKTROFOREZE PRAHOVA KOMPOZITA (PDLLA+BSA I PDLLA+HRP).....	93
4.3.4 REZULTATI DIFERENCIJALNE SKANIRAJUĆE KALORIMETRIJE PRAHOVA KOMPOZITA (PDLLA+BSA I PDLLA+HRP).....	95
4.3.5 ODREĐIVANJE EFIKASNOSTI INKAPSULACIJE.....	96
5. DISKUSIJA	98
5.1 UTICAJ PROCESNIH PARAMETARA NA MORFOLOGIJU ČESTICA PLLA	99
5.1.1 UTICAJ KO-RASTVARAČA NA MORFOLOGIJU ČESTICA PLLA	102
5.1.2 UTICAJ KONCENTRACIJE PVA NA MORFOLOGIJU ČESTICA PLLA	102
5.2 UTICAJ PROCESNIH PARAMETARA NA MORFOLOGIJU ČESTICA PDLLA	103
5.2.1 UTICAJ BRZINE I VREMENA HOMOGENIZACIJE NA MORFOLOGIJU ČESTICA PDLLA	105
5.2.2 UTICAJ SURFAKTANTA NA MORFOLOGIJU ČESTICA PDLLA	105
5.2.3 UTICAJ ODNOSA HLOROFORM/VODA NA MORFOLOGIJU ČESTICA PDLLA	106
5.2.4 UTICAJ KO-RASTVARAČA NA MORFOLOGIJU ČESTICA PDLLA.....	106
5.3 UTICAJ PROCESNIH PARAMETARA NA MORFOLOGIJU KOMPOZITNIH ČESTICA KOJE SE SASTOJE OD PDLLA I PROTEINA (BSA ILI HRP)	107
6. ZAKLJUČAK	11914
7. LITERATURA	119

Uvod

Biomaterijali su materijali koji se koriste za zamenu i reparaciju telesnih tkiva i organa bilo iz zdravstvenih ili estetskih razloga [1]. Prema mestu aplikacije biomaterijali se mogu podeliti na: ortopedske, dentalne, oftalmološke, kardiovaskularne, dermatološke, pomoćne itd. Prema hemijskom sastavu biomaterijali se mogu podeliti na: metalne, polimerne, keramičke, prirodne i kompozitne [2, 3, 4]. Polimerni biomaterijali najčešće podrazumevaju sintetičke polimere, jer prirodni biomaterijali, koji u većini slučajeva predstavljaju prirodne polimere, obrazuju posebnu grupu. Sintetički polimeri imaju brojne prednosti nad prirodnim materijalima, jer mogu da se sintetišu tako da imaju bolje osobine i veću uniformnost od prirodnih materijala [5]. Rađanje sintetičkih polimera predstavlja početak nove ere na polju humane terapije. U zavisnosti od ponašanja u ljudskom tkivu, polimerni biomaterijali se mogu podeliti u dve grupe; biostabilne i biodegradabilne. Biostabilni polimeri (npr. polietilen i polimetil metakrilat) bi trebalo da su fiziološki inertni u uslovima u tkivu i da decenijama zadržavaju svoja mehanička svojstva [6, 7].

Polimerni biomaterijali bi trebalo da zadovoljavaju sledeće uslove [8]:

- da poseduju mehanička svojstva koja odgovaraju aplikaciji i karakteristike se zadržavaju dok okolno tkivo ne ozdravi;
- da ne izazivaju zapaljenje ili toksičnu reakciju;
- da se izlažu metabolizmu kada ispune svoju svrhu, neostavljajući tragove u organizmu;
- da se lako prerađuju u krajnju formu;
- da su biokompatibilni;
- da se lako sterilišu.

Biomaterijali se dosta koriste za reparaciju izgubljenih funkcija tkiva. Fizička struktura biomaterijala predstavlja ključni faktor koji utiče na odgovor ćelije i od nje dosta zavisi tip biomedicinskih aplikacija [7]. Od karakteristika materijala na mikrometarskoj i nanometarskoj skali, kao što su morfologija, migracija, adhezija, proliferacija i diferencijacija *in vitro* i *in vivo*, značajno zavisi ponašanje ćelija [9].



Slika 1. Prikaz polimernih biomaterijala koji se koriste u medicini [3]

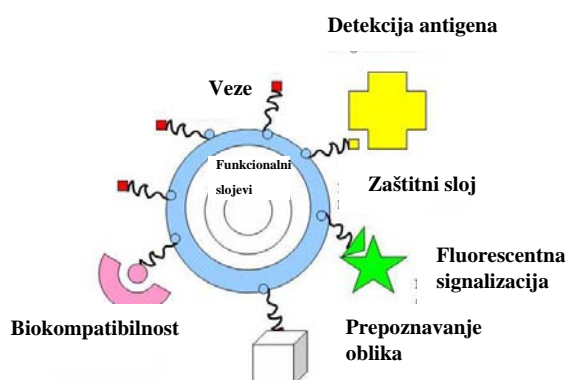
Karakteristike materijala na mikro ili nano skali se intenzivno istražuju kako bi se poboljšale performanse biomaterijala [7, 9, 10]. Biodegradabilni polimeri su od velikog interesa za istraživače jer su dosta zastupljeni u biomedicinskim aplikacijama. Generalno posmatrano polimerni biomaterijali su našli mesto među različitim medicinskim aplikacijama: resorbilni hirurški konci, proteze, veštačka koža, dentalni implantati, srčani zalisci, nervna vlakna, igle, koštani šrafovi, kao i stentovi i prevlake za privremene fiksacije unutrašnjih fraktura [1, 11, 12, 13].

Na slici 1. su prikazani polimerni materijali koji se koriste u medicini. Bioresorbilni polimeri imaju veću primenu od biostabilnih polimera, jer degradacija matrice eliminiše potrebu za hirurškim zahvatom nad iskorišćenim sredstvom. Tokom 70-tih, poliglikolna kiselina i polilaktidna kiselina su dosta korišćene u hirurgiji implantata i reparaciji tkiva [10,14]. Polimerne čestice od poli-L-laktida i poli-D,L-laktida se dosta ispituju kao konstituent kompozitnih biomaterijala [6]. Kompozitni biomaterijali se sastoje od dve jasno definisane faze, čiji sastojci mogu biti organski ili neorganski. Kao primer kompozitnih biomaterijala, može se navesti kompozit od hidroksiapatita i poli-L-laktida, koji se može primeniti za rekonstrukciju kostiju [1]. U ovom slučaju, organski deo (PLLA) može sadržati medikamente koji se vremenom otpuštaju i stimulišu regeneraciju okolnog tkiva. Polimerni deo kompozita vremenom degradira na komponente koje su kompatibilne sa tkivom i nisu toksične za ćelije. Hidroksiapatit, s druge strane služi kao matrica za regeneraciju koštanog tkiva, tj. po svom sastavu odgovara tkivu koje treba da se formira. Kompozitni materijali mogu da se formiraju i od dve polimerne (organske) komponente, od kojih je jedna nosač, dok druga može poslužiti za modifikovanje procesa u tkivima, odnosno ćelijama [6, 15, 16].

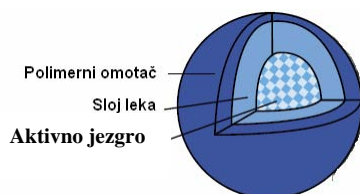
Do sada su urađena brojna istraživanja bazirana na polimernim sistemima koji se koriste za kontrolisano i/ili ciljano otpuštanje farmaceutskih agenasa [17]. Cilj ovih istraživanja je da se dobiju sredstva za dostavu lekova sa optimalnim karakteristikama [18], kao što su difuzijom-kontrolisane membrane (sistemi za deponovanje), osmotske pumpe, resorbilni implantati, hidrogelovi, materijali za razmenu jona, polimerni lekovi i slabo rastvorne matrice [19]. Prva polimerna sredstva koja su našla primenu u kontrolisanoj dostavi lekova potiču iz 70-tih godina [10]. Povezivanjem leka kovalentnim vezama sa polimernim lancem može se značajno povećati efikasnost inkorporiranog leka [12]. Polimerne mikro i nanočestice su inicijalno osmišljene kao nosači za vakcine i lekove protiv raka [20-22]. Sa idejom da se poboljša lečenje tumora korišćena je strategija ciljanog otpuštanja leka i u skladu sa tim razvijene su nove metode kako bi ćelije retikulo endotelialnog sistema zahvatile nanočestice u što manjem broju [10]. Terapeutski efekat koji je posledica otpuštenog leka iz mikročestica je relativno slab, usled brze propustljivosti čestica putem fagocitoze [23]. Poslednjih godina rešenje ovog problema se pronalazi u nanotehnologiji [24]. Nanočestice imaju prednosti nad većim mikročesticama iz razloga što su pogodnije za intravenoznu dostavu [25]. Najmanji kapilari u telu su reda veličine 5-6 μm u prečniku. Veličina čestica koje se distribuiraju u krvotok mora biti manja od 5 μm , bez prisustva aglomerata, da čestice ne bi izazvale emboliju [26].

Farmaceutska istraživanja su do sada uglavnom fokusirana na sinteze i testiranje novih molekula lekova, ali ne i na krajnju formu doziranja. Lekovi se skoro isključivo primenjuju oralno ili putem injekcija, često na mestu udaljenom od ciljanog tkiva. Komercijalni farmaceutski sistemi imaju dosta mana, kao što su: neželjeni efekti, fluktuacija nivoa leka u telu, mala efikasnost leka i loše pridržavanje pacijenta [27]. Koncentracija, trajanje i biološka aktivnost farmaceutskih agenasa se ne mogu kontrolisati. Kako bi se izbegli ovi problemi osmišljena je tehnologija kontrolisanog otpuštanja [28]. Sistemi za kontrolisanu dostavu imaju brojne prednosti u poređenju sa konvencionalnim formama doziranja. Prednosti ovih sistema se ogledaju u većoj efikasnosti, redukovanoj toksičnosti, i povećanoj komfornosti pacijenata. Ovakvi sistemi često koriste makromolekule kao nosače za lekove [10].

U poslednje vreme, značajna pažnja se posvećuje inkorporiranju terapijskih agenasa u biokompatibilne nanokompozite kao što su lipozomi, nanokapsule i micelle [20]. Ovakvi sistemi najčešće podrazumevaju polimerne čestice submikronskih veličina. Kombinovanjem leka sa različitim polimerima, moguće je modifikovati farmakokinetiku i biodistribuciju lekova i na taj način poboljšati efikasnost i bezbednost same terapije [22]. Glavna prednost sistema sa kontrolisanom dostavom lekova je što se u tim sistemima eliminišu sporedni negativni efekti. Glavne mane hemoterapije su kratak *in vivo* polu život i često ponavljanje doza [29]. Mogućnost dizajniranja različitih sistema sa kontrolisanim i kontinualnim otpuštanjem terapijskog agensa je dosta uticala na kliničku aplikaciju hemoterapije i poboljšanje kvaliteta života pacijenta [20, 21]. Jedna od glavnih mana hemoterapije je i velika toksičnost, koja je uzrok brojnih sporednih efekata koji umanjuju terapijsko dejstvo. Na slici 2. je prikazana tipična konfiguracija karakteristična za nanobiomaterijale koji se koriste u medicini. Osnovna ideja je da se terapijski aktivni materijal transportuje u odgovarajućoj koncentraciji do cilja gde je njegovo dejstvo potrebno u određeno vreme [18], što se može postići ugrađivanjem lekova u biodegradabilne polimere iz kojih će se lek oslobađati na kontrolisan način i tokom dužeg vremenskog perioda [21]. Na ovaj način je omogućeno da se specifični tretmani, koji inače ne bi bili mogući, trenutno nalaze u komercijalnoj upotrebi. Ideja je bila da se odgovarajuća terapijska koncentracija leka u telu održava tokom produženog vremenskog perioda, otpuštanjem agensa na predvidljiv i kontrolisan način [4, 29]. Pojam "mikrokapsula" se definiše kao sferična čestica, sa veličinom koja varira u opsegu od 50 nm do 2 mm i sadrži aktivnu supstancu u vidu jezgra. Na slici 3. je prikazana polimerna mikrokapsula u kojoj je inkorporiran lek. Mikrosfere su u tom smislu prazne sferne čestice. Pojmovi mikrokapsule i mikrosfere se, međutim, često koriste kao sinonimi. Zbog svojih atraktivnih svojstava mikrokapsule i mikrosfere imaju široke biomedicinske aplikacije [9].



Slika 2. Tipična konfiguracija karakteristična za nanobiomaterijale koji se koriste u medicini [27]



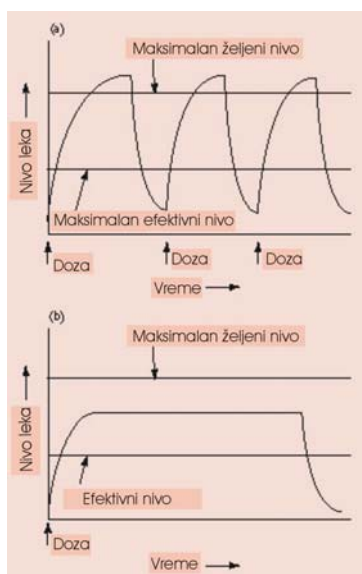
Slika 3. Polimerna mikrokapsula u kojoj je inkorporiran lek [27]

Komercijalizacija biomedicinskih sredstava je skup i dugotrajan proces. Da bi se proizvod komercijalizovao, tokom svih koraka procesa proizvodnje, pakovanja i skladištenja, moraju se održati hemijska i fizička svojstva, biokompatibilnost, čistoća i reproduktivnost proizvoda [30, 31]. U skladu sa ovim ograničenjima, samo je limitiran broj sistema za dostavu lekova baziran na biodegradabilnim polimerima uspešno komercijalizovan i priznat od strane Američka administracija za hranu i lekove (US Food and Drug Administration-FDA) [18, 19, 28, 30, 32]. Na tržištu je dostupno relativno malo proizvoda među kojima su Lupron Depot® (TAP Pharmaceutical Product Inc.), Zoladex™ (Zeneca), Decapeptyl™ (Ipsen Biotech) i Prostag SR™ (Lederle).

1. Teorijski deo

1.1. Upotreba kompozitnih čestica u kontrolisanoj dostavi lekova

Tradicionalni sistemi za dostavu lekova, kao što su tablete ili injekcije, obezbeđuju unetu dozu leka u jednoj porciji. Kao rezultat, dobijaju se visoke, ponekad vrlo toksične, koncentracije leka u plazmi koje su često uzrok raznih neželjenih reakcija [33].

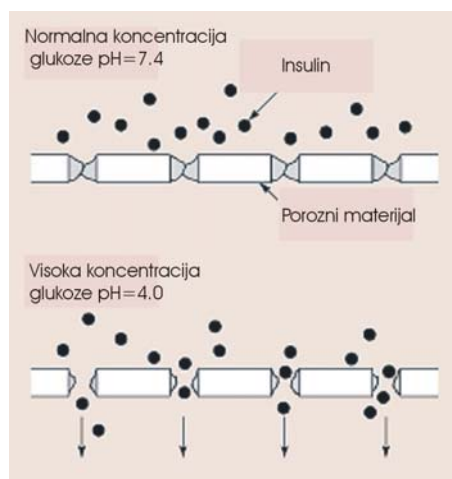


Slika 1.1 Uporedni prikaz konvencionalnog i idealnog profila farmakokinetike [33]

Kratko vreme dejstva zahteva ponavljanje doza, što nije prijatno za pacijenta i kao posledica se javljaju velike fluktuacije koncentracije leka u plazmi. Konvencionalno doziranje terapeutskog agensa predstavlja način administracije aktivne supstance koji nije efikasan jer su često potrebne velike doze leka da bi se osiguralo da odgovarajuća koncentracija eventualno dostiže granicu aktivnosti. Terapeutski efekat se ne postiže jednim doziranjem, već održavanjem dugotrajne poželjne koncentracije leka u plazmi [4, 29]. Na slici 1.1 dat je uporedni prikaz konvencionalnog i idealnog profila farmakokinetike. Za sistem sa produženim dejstvom leka je karakteristično otpuštanje aktivne supstance na kontrolisan način; terapeutska koncentracija leka u plazmi se održava tokom produženog vremenskog perioda i lek obezbeđuje samo na mestu na kom je potreban u odgovarajućem trenutku [19, 34].

Sistemi za kontrolisanu dostavu mogu odžati terapeutski efekat tokom dužeg vremenskog perioda samim tim redukovati neželjene sporedne efekte [21]. Tehnologija bazirana na kontrolisanom otpuštanju lekova ima dosta prednosti i može unaprediti mnoge tretmane [35]. Forme za doziranje leka mogu obezbediti veću efikasnost nestabilnih lekova i na taj način smanjiti neophodnu količinu leka koja se unosi u organizam [17, 36]. Uneta doza leka mora proći kroz više fizioloških barijera pre nego što stigne do mesta dejstva. Nestabilni lekovi, najčešće peptidi, proteini i enzimi, mogu izgubiti aktivnost usled lokalne sredine u tkivu, na primer kiselosti u stomaku [37, 38]. Biodegradabilni polimer može imati ulogu privremenog zaštitnog omotača i jedna od uloga bi mu bila da zaštiti terapeutski agens od fiziološke degradacije na putu do željenog tkiva [38].

Degradabilni polimeri se, na primer, mogu upotrebiti kako bi zaštitili insulin i otpustili ga na produžen i kontrolisan način [33]. Na slici 1.2. je prikazano kontrolisano otpuštanje insulina koje predstavlja veliki izazov. U industrijskim zemljama problem dijabetesa je u velikom porastu, a tretman je vrlo zahtevan za pacijenta jer zahteva subkutane injekcije. Oralna primena slobodnog insulina ne predstavlja opciju zbog njegove kratke biološke postojanosti i nestabilnosti usled prisustva enzima u gastro intestinalnom traktu [21].



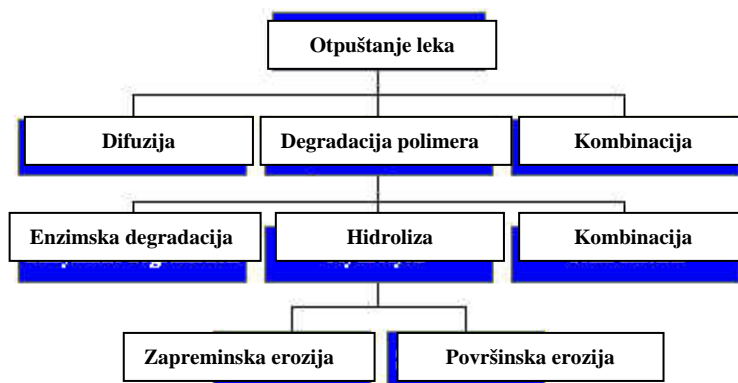
Slika 1.2 Kontrolisano otpuštanje insulina [33]

Ugrađivanjem polimernog implantata u okolinu hirurškog zahvata može se povećati doza leka na odgovarajućim tkivima i na taj način poboljšati dejstvo terapijskog agensa [21, 39]. Potencijalno toksični lekovi, najčešće antikancerogeni agensi, se mogu u visokim koncentracijama dozirati do mesta tumora, povećavajući svoju efikasnost i istovremeno minimizirajući sistematične gubitke i česte sporedne efekte [18, 20].

1.1.1 Otpuštanje terapijskih agenasa iz kompozitnih čestica

Uspešno otpuštanje terapijskog agensa dispergovanog u degradabilnoj polimernoj matrici se može odigrati preko sledećih mehanizama [39]: a) erozijom polimera, b) difuzijom čestica leka kroz polimernu matricu, c) rastvaranjem leka u okolnom medijumu.

Na slici 1.3 dat je šematski prikaz mogućih mehanizama otpuštanja leka.

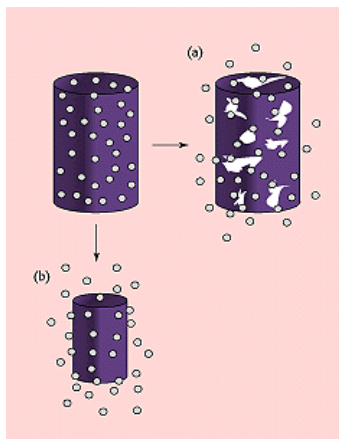


Slika 1.3 Mogući mehanizmi otpuštanja leka iz polimerne matrice [39]

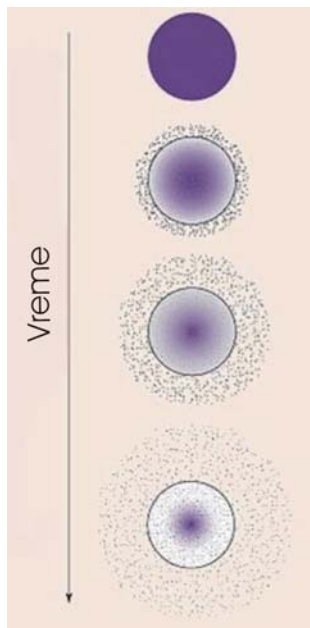
Na slici 1.4 je prikazano otpuštanje leka erozijom iz mase¹ polimera i površinskom erozijom polimera. Difuzija molekula leka iz matrice u okružujući medijum se odigrava kada gradijent koncentracije predstavlja pokretačku silu. Na slici 1.5 je prikazana difuzija leka iz polimerne matrice. Treći mehanizam, koji se javlja usled rastvaranja leka u okružujućem medijumu, je najznačajniji u početnom stadijumu inkubacije, kada su molekuli leka deponovani na matrici ili blizu površine matrice i mogu se rastvoriti u okružujućem medijumu. Na slici 1.6 je prikazano otpuštanje leka do kog dolazi usled uticaja lokalne sredine. Mehanizmi za uspešno otpuštanje aktivnih supstanci značajno variraju

¹ "bulk" erozija-erozija iz mase ili zapreminska erozija

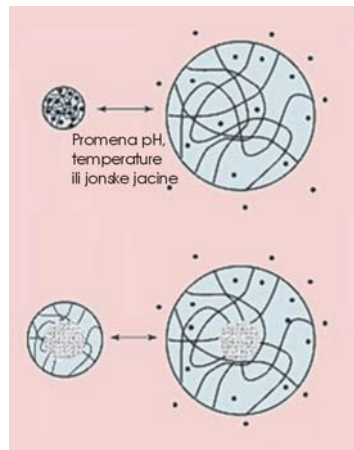
od sistema do sistema, u zavisnosti od hidrofilitnosti polimera, fleksibilnosti polimernog lanca, brzine degradacije, molekulske mase, kristaliničnosti, veličine, oblika i poroznosti matrice [19]. Kinetika otpuštanja leka takođe zavisi od fizičkih svojstava leka, naročito od njegove molekulske mase i rastvorljivosti u vodi. Difuzija leka kroz polimernu matricu zavisi od rastvorljivosti leka u polimeru, veličine molekula leka i njegove distribucije u okviru matrice. Uslovi sredine (npr., pH i temperatura okolnog medijuma) se moraju takođe uzeti u obzir [37, 39-45].



Slika 1.4 Otpuštanje leka iz polimerne matrice erozijom (degradacijom) polimera: a) zapreminska (bulk) erozija, b) površinska erozija [37]



Slika 1.5 Otpuštanje leka iz polimerne matrice difuzijom [37]



Slika 1.6 Otpuštanje leka iz polimerne matrice pod uticajem okolne sredine [37]

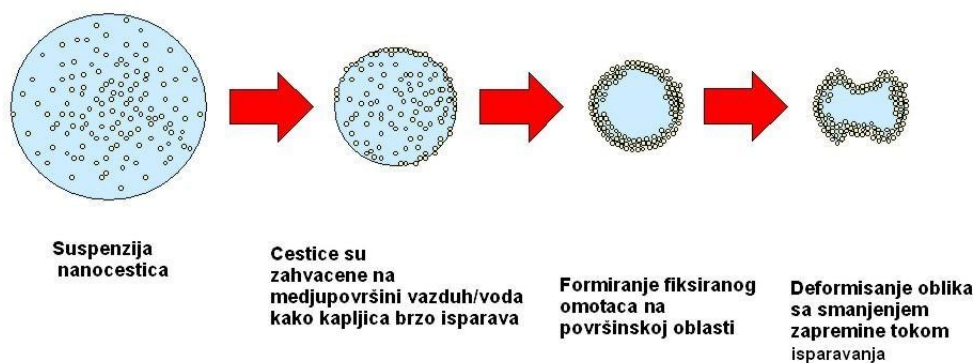
Higuči je postavio kinetički model za otpuštanje leka iz polimernog sredstva posredstvom čiste difuzije, koji je izveden iz drugog Fikovog zakona difuzije. Prema tom modelu, udeo otpuštenog leka je proporcionalan kvadratnom korenu vremena [46]. Prema Higučijevoj teoriji, brzina otpuštanja leka će se smanjivati tokom vremena iz razloga što se gradijent koncentracije kontinualno smanjuje. Ovaj fenomen se u mnogim slučajevima može zanemariti jer se smatra da ne predstavlja optimalno ponašanje otpuštenog leka [42]. Umesto toga, poželjno je otpuštanje 'prvog-reda' gde se tokom procesa brzina otpuštanja održava konstantnom. Potpuno otpuštanje prvog-reda je skoro nemoguće postići, ali se može pretpostaviti da polimerna matrica koja površinski erodira obezbeđuje otpuštanje leka prvog reda [46].

1.1.1.1 Degradacija polimera i erozija

Degradacija polimera se definiše kao hemijska reakcija koja rezultuje kidanjem veza glavnog lanca pri čemu se kao produkti degradacije stvaraju kraći oligomeri, monomeri i ostali molekuli manjih molekulske mase [37]. Polimer se smatra biodegradabilnim ako do degradacije dolazi usled uticaja okoline, ili posredstvom biokatalitičkih procesa (uključujući bakterije, gljive, enzime i dr.) ili pod uticajem hemijskih procesa i procesa samih radikala (hidroliza, oksidacija, UV

zračenje) [43]. Biodegradabilni polimeri, koji se koriste u kontrolisanoj dostavi lekova, uglavnom degradiraju hidrolizom. Neki biomedicinski polimeri degradiraju enzimski [43]. Brzina degradacije polimera najviše zavisi od sledećih faktora: strukture polimernog lanca, molekulske mase i morfologije [19, 29]. Uslovi same sredine (npr. pH i temperatura) su ostali bitni faktori koji imaju uticaj na degradaciju polimera [7]. Tokom procesa degradacije polimera dolazi do promena samih karakteristika polimera, a najvažniji parametar za praćenje degradacije je molekulska masa. Gubitak mehaničke jačine, kristalizacija, stvaranje monomera i promene pH su ostali bitni faktori koji se mogu koristiti za praćenje degradacije [5]. Hidrolitička degradacija je posledica reakcije vode sa labilnim vezama, tipičnim estarskim vezama u polimernom lancu [19]. Brzina reakcije je usko povezana sa sposobnošću polimera da apsorbuje vodu, pri čemu hidrofilni polimeri upijaju veliku količinu vode i degradiraju brže od hidrofobnih matrica.

Šematski prikaz mehanizma degradacije



Slika 1.7 Šematski prikaz mehanizma degradacije polimernih mikrosfera [44]

Na slici 1.7. je dat šematski prikaz degradacije polimernih mikrosfera. Nakon inkubacije, voda prodire u polimernu matricu, aktivira centar u amorfnim zonama pri čemu dolazi do kidanja lanaca. Kada se dostigne značajno mala molekulska masa, stvoreni produkti degradacije difunduju i rastvaraju se u degradacionom medijumu i nakon toga se transportuju iz polimerne matrice, npr. erozijom. Erozijska polimerne matrice može biti zapreminska ili površinska [37]. Ako se prodiranje vode odigrava brže od erozije matrice, degradacija će se odigrati kroz matricu i materijal će biti oslobođen iz unutrašnje zapremine polimera. Ovo ponašanje je karakteristično za heterogenu eroziju, ali se ponekad može odnositi i na homogenu eroziju zbog toga što se gubitak mase odvija manje ili više uniformnom brzinom kroz matricu. Veličina matrice ostaje konstantna čak i u kasnijim stadijumima degradacije, ali se mikrostruktura unutar glavnog dela značajno menja. Nakon kritičnog stepena erozije, matrica se eventualno narušava [37]. Šematski prikaz zapreminske erozije je dat na slici 1.4a. Ako se prodiranje vode odvija sporije od erozije matrice, gubitak mase je ograničen samo na površinski sloj matrice. Veličina matrice se postepeno smanjuje ali dominantna faza ostaje u nedegradiranom obliku [33]. Za idealnu površinsku eroziju, brzina erozije je direktno proporcionalna

promeni površine matrice. Šematski prikaz površinske erozije je dat na slici 1.4b. U kontrolisanoj dostavi lekova poželjnije su polimerne matrice koje degradiraju površinskom erozijom [33]. Kod polimera koji nisu dovoljno hidrofobni da bi sprečili prodiranje vode, degradacija unutrašnjeg materijala se odvija brže od erozije površinskog sloja.

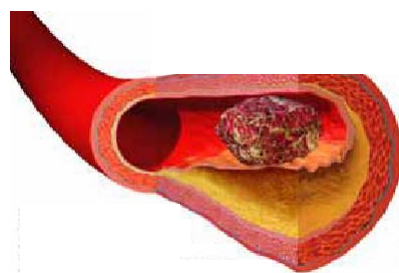
1.1.2 Načini doziranja terapeutskih agenasa inkorporiranih u kompozitnim česticama

U farmaceutskoj industriji prvo je razvijeno doziranje leka oralnim putem. Lokalna sredina tkiva u telu se razlikuje u zavisnosti od same pH vrednosti i enzimske aktivnosti, tako da samo mesto administracije može značajno uticati na performanse bioaktivnog sredstva. Karakteristike polimera se moraju prilagoditi samom načinu aplikacije. Da bi se ostvario specifični profil otpuštanja aktivne supstance i zahtevani način administracije neophodni uslov je najčešće specifična veličina sfera [32, 39]. U tabeli 1.1 navedeni su najčešći načini administracije terapeutski aktivne supstance [39]. Poslednjih desetak godina interesovanje za procesiranjem sredstava za kontrolisanu dostavu lekova je u velikom porastu. Korišćenjem injektibilnih mikrosfera se može izbeći unošenje velikih implantata.

Tabela 1.1 Načini administracije leka inkorporiranog u kompozitnim česticama [39]

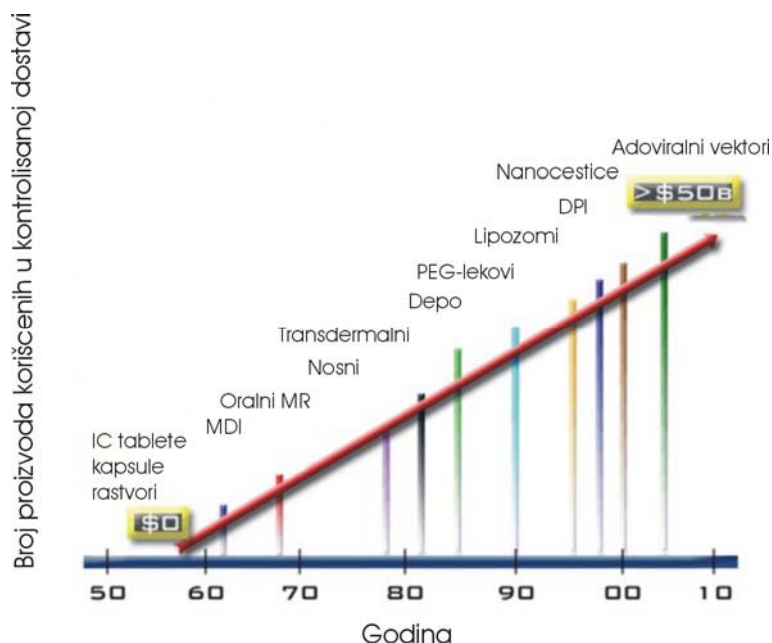
Način administracije leka	Mesto administracije
Intraokularno	Oko
Intravenozno	Vena
Intra-arterijalno	Arterija
Inramuskularno	Mišić
Intraspinalno	Kičma
Intrakoštano	Kost
Intra-artikularno	Koleno/tečnost u kolenu
Površinski	Površina kože
Subkutano	Pod kožu
Transdermalno	Kroz kožu
Nazalno	Nos
Auralno	Uho
Intrarespiratorno	Pluća
Vaginalno	Vagina

Mikrosfere veće od 6 μm ne bi trebalo da se primenjuju intravenozno, pošto mogu izazvati kritične toksične reakcije koje su povezane sa zapušavanjem kapilara [20, 26]. Mikrosfere su primarno namenjene za intramuskularnu ili potkožnu implantaciju. Na slici 1.8 je prikazano formiranje tromba. Živi organizmi su izgrađeni iz ćelija čiji je tipični poprečni presek oko 10 μm .



Slika 1.8 Formiranje tromba [41]

Delovi ćelija su, međutim, dosta manji i nalaze se u submikronskom domenu. Proteini predstavljaju još manje delove sa tipičnom veličinom oko 5 nm. Nanočestice, kao veoma male probe, bi mogle direktno da uđu u ćeliju. Poznavanje bioloških procesa na nanoskali predstavlja jaku pokretačku silu iza koje stoji razvoj nanotehnologije. Brojne kompanije su uspešno komercijalizovale nanomaterijale za biološke i medicinske aplikacije [30]. Na slici 1.9 je dat hronološki dijagram zavisnosti različitih produkata sa kontrolisanim dejstvom od nastanka do danas.



Slika 1.9 Hronološki prikaz porasta produkata za dostavu lekova sa kontrolisanim dejstvom [41]

1.2 Biokompatibilnost kompozitnih čestica

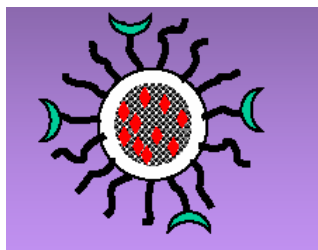
Jedan od problema koji se može javiti prilikom unošenja biomaterijala u organizam je negativna reakcija domaćina na strani materijal koji zaostaje u telu tokom dužeg vremenskog perioda. Polimerni materijal koji treba da se integriše u takav delikatni sistem kao što je ljudsko telo, mora biti biokompatibilan [5]. Biokompatibilnost se definiše kao sposobnost materijala da deluje u skladu sa adekvatnim odgovorom domaćina u specifičnim aplikacijama. Aspekt uključuje sve reakcije do kojih dolazi u telu između materijala i tkiva: početne promene na površini, promene materijala tokom vremena, kao i sudbinu produkata degradacije polimera. Da bi se polimer smatrao biokompatibilnim, biodegradabilni polimer mora zadovoljavati brojne zahteve koji su navedeni u tabeli 1.2 [45, 46].

Tabela 1.2 Opšti zahtevi za biokompatibilni polimer [45]**Preduslovi za biokompatibilnost**

Netoksičnost
 Nekancerogenost
 Nemutagenost
 Ne izaziva alergiju
 Oslobođen prisustva kontaminiranosti
 (npr., aditivi, rastvarači i ostaci sinteze)
 Biokompatibilnost produkata degradacije
 Bioresorbilnost
 Bez sporednih imunoloških odgovora

Izraz 'bioresorbilan' se odnosi na polimere koji degradiraju na produkte koji se iz tela mogu eliminisati na prirodne načine odnosno, u nekim slučajevima, na produkte koji su uključeni u normalne metaboličke procese [10]. Pored toga što toksičnost može poticati od samih polimera ili njihovih fragmenata, može nastati i zbog prisustva ostataka sinteze kao što su rastvarači, katalizatori, monomeri i stabilizatori [47, 48]. Sa stanovišta biokompatibilnosti, postoje različiti standardi i procedure za procenu biološkog i imunotoksičnog odgovora implantata. Proveravanje akutne toksičnosti i testovi implantacije *in vivo* su fundamentalni za odgovore ovog tipa. Prvi korak za procenjivanje biokompatibilnosti polimernog sredstva je test citotoksičnosti na biološku aktivnost materijala na jednoslojnim ćelijama sisara. Prvi internacionalni standard biološke ocene medicinskih sredstava, ISO 10993, je izdat 1992. godine od strane Internacionalne organizacije za standarde (ISO). FDA je usvojila modifikovanu verziju 1995. godine. Ovi standardi služe kao smernice za adekvatnu procenu biokompatibilnosti. Senzitivnost na iritaciju je različita za različita tkiva u telu. Iz tog razloga je biokompatibilnost usko vezana za mesto injekcije. Na primer, zečje oko predstavlja visoko senzibilan životinjski model za studije biokompatibilnosti. Površinska morfologija je drugi bitan parametar biokompatibilnosti. Oštre ivice inkorporiranog polimernog sredstva mogu izazvati iritaciju i povećati lokalni odgovor tkiva. Zbog svojih atraktivnih svojstava mikrosfere polimera su našle veliku primenu u mikroinkapsulaciji lekova i antigena [49].

1.3 Polimeri u kompozitnim česticama



Polimerni biomaterijali prema strukturi, osobinama i nameni obrazuju široku grupu biomaterijala. U zavisnosti od ponašanja *in vitro* i *in vivo*, polimerni biomaterijali se mogu podeliti u dve grupe: biostabilne i biodegradabilne. Na slici 1.10 je prikazana polimerna čestica u kojoj je inkorporirana aktivna supstanca.

Slika 1.10 Polimerna čestica u kojoj je inkorporirana aktivna supstanca [41]

Biodegradabilni polimeri zadržavaju svoje karakteristike ograničen vremenski period i zatim postepeno degradiraju, a kao krajnji produkti degradacije nastaju CO₂ i H₂O koji se iz tela oslobađaju normalnim metaboličkim procesima [13]. Kao što je prethodno pomenuto biokompatibilnost polimera i netoksičnost produkata degradacije su preduslovi za bilo koji materijal koji će biti u kontaktu sa ljudskim tkivom. Biodegradabilni polimeri su najviše zastupljeni u formama za kontrolisanu dostavu lekova i samo ograničen broj polimera ima primenu u kontrolisanoj dostavi lekova [10, 18, 29]. Poželjni kandidati pored toga što moraju biti biodegradabilni, moraju takođe strogo zadovoljavati preduslove biokompatibilnosti. Polimeri koji se koriste u kontrolisanoj dostavi lekova bi trebalo da budu idealno procesibilni, sterilizovani i stabilni za skladištenje, a mogu biti prirodnog ili sintetičkog porekla.

U prirodne polimere se ubrajaju [41, 50]:

- Polisaharidi, npr., dekstran ili celuloza
- Hitin
- Hitozan
- Proteini (npr. kolagen, fibrin, želatin, albumin).

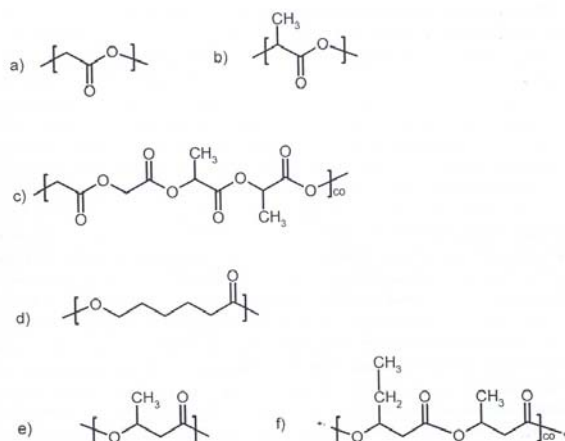
U sintetičke degradabilne polimere koji se primenjuju u kontrolisanoj dostavi lekova se ubrajaju [18]:

- Alifatični poliestri
- Poli(glikolid), PGA
- Poli(laktid), PLA
- Poli(laktid-ko-glikolid), PLGA
- Poli (-kaprolakton), PCL
- Poli (3-hidroksibutirat), PHB
- Poli (3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat), P(HB-ko-HV)
- Polianhidridi
- Alifatični polikarbonati
- Poli (ortoestri)
- Poli (amino kiseline)
- Poli (etilen oksid)
- Polifosfazeni

Istraživačka nastojanja su u poslednje vreme usmerena ka dobijanju novih polimernih sistema koji imaju karakteristična mehanička i fizičko-hemijska svojstva neophodna za specifičnu medicinsku aplikaciju.

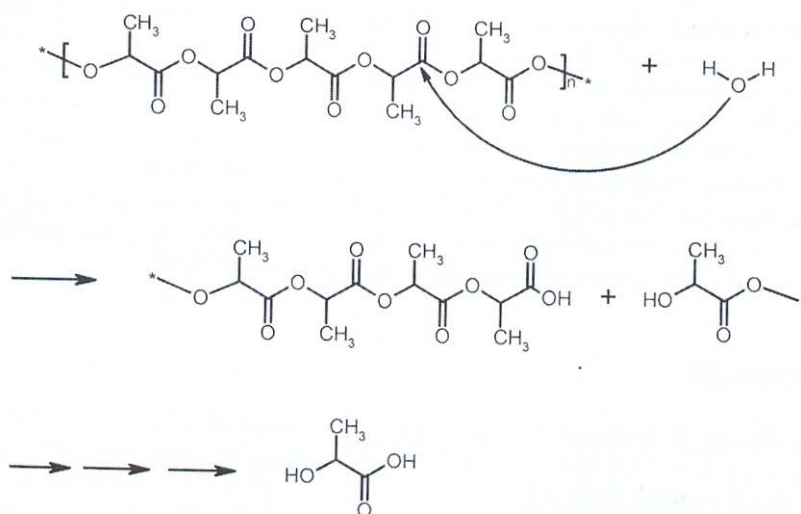
1.3.1 Alifatični poliestri

Familija alifatičnih poliestara predstavlja dominantni izbor materijala među degradabilnim polimernim sistemima za dostavu lekova. Posebna pažnja se posvećuje homopolimerima i kopolimerima glikolne kiseline i glikolida, laktidne kiseline i laktida, -kaprolaktonu i 3-hidroksibutiratu [18]. Strukture ovih sistema su prikazane na slici 1.11.



Slika 1.11 Molekulske strukture pojedinih alifatičnih estara: a) Poli(glikolid), PGA; b) Poli(laktid), PLA; c) Poli(laktid-ko-glikolid), PLGA; d) Poli(ε-kaprolakton), PCL; e) Poli(3-hidroksibutirat), PHB; f) Poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat), P(HB-ko-HV) [51]

Alifatični poliestri degradiraju ili hidrolitičkim cepanjem estarskih veza u lancu ili pod uticajem enzima. Hidroliza može biti katalizovana bilo kiselinama ili bazama. Poliestarska hidroliza na primeru PLA je šematski prikazana na slici 1.12.



Slika 1.12 Šematski prikaz hidrolitičke degradacije PLA, alifatičnog poliestra [51]

Tokom cepanja lanaca, na krajevima dolazi do formiranja karboksilnih grupa što ubrzava dalju hidrolizu. Ovaj mehanizam se označava kao "autokataliza" i doprinosi tome da poliestarske matrice zaista degradiraju zapreminskom (bulk) erozijom. Produkti degradacije se u telu resorbuju sa minimalnim reakcijama na tkivima.

1.3.1.1 Poliglikolid, PGA

Poliglikolid, PGA se najčešće dobija polimerizacijom otvorenog prstena cikličnog diestra glikolne kiseline, glikolida. PGA je jak, žilav, kristalan polimer sa temperaturom topljenja od 225 °C i

temperaturom staklastog prelaza, T_g , od 36 °C [5]. Za razliku od bliskih poliestara kao što je PLA, PGA se ne rastvara u većini poznatih polimernih rastvarača. PGA ima odlične karakteristike za formiranje vlakana i prvi put je komercijalno predstavljen tokom 70-tih. pod imenom Dexon™, kao prvi sintetički biodegradabilni konac. Slaba rastvorljivost i visoka tačka topljenja PGA, ograničavaju njegovu upotrebu u aplikacijama za dostavu lekova jer se ne može napraviti u vidu filmova, štapića, kapsula ili mikrosfera upotrebom tehnika pomoću rastvarača ili topljenja.

1.3.1.2 Polilaktid, PLA

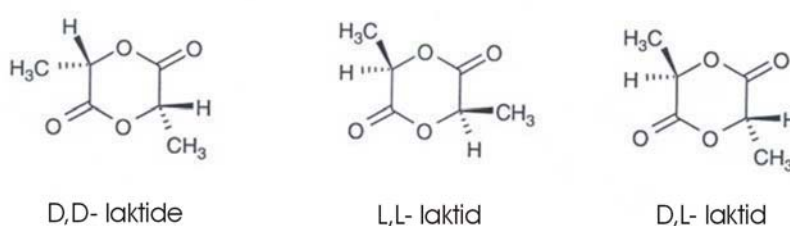
Prva saznanja o biomedicinskoj upotrebi polilaktidne kiseline potiču iz 60-tih. Od tada, PLA je stekao široko rasprostranjene aplikacije na polju medicine, primenjuje se u hirurškim koncima, sredstvima za kontrolisanu dostavu lekova, protezama, skafoldima, srčanim zaliscima, koštanim šrafovim, iglama i nosačima za privremenu unutrašnju fiksaciju frakture [5]. Polilaktid je poznat po svojoj dobroj procesibilnosti, biokompatibilnosti i biodegradabilnosti [10]. PLA može imati prilično različita fizička i hemijska svojstva zbog prisustva metil grupe na alfa ugljeniku. Mogući izomeri su L, D, i DL izomeri. Poli(L-laktidna kiselina), poli(D-laktidna kiselina) i poli (DL-laktidna kiselina) se sintetišu iz L(-), D(+) i DL- monomera laktidne kiseline, respektivno. Variranjem molekulske mase i sastava kopolimera, može se dobiti širok opseg brzina degradacije, kao i fizičkih i mehaničkih svojstava. Što je takođe bitno, PLA je prihvaćen od strane FDA za medicinsku upotrebu i komercijalno je dostupan u različitim oblicima. Brojne studije potvrđuju da je PLA potpuno resorbilan i da ili ne izaziva ili izaziva veoma blag prolazan negativni odgovor tkiva. Biodegradabilnost se ogleda u hidrolizi na temperaturama do 50°C (na primer u kompozitima) tokom perioda od nekoliko meseci do dve godine. Netoksični produkti degradacije su, naravno, još jedna bitna karakteristika za bilo kakvu potencijalnu aplikaciju [51]. Hidrolitička degradacija polilaktidne kiseline kao proizvod daje monomere laktidne kiseline, koji su podložni metabolizmu preko ciklusa trikarboksilne kiseline i eliminišu se u vidu CO₂ preko respiratornog sistema [10]. Mnogi alifatični poliestri poseduju ovakve karakteristike, a među dosadašnjim brojnim studijama polilaktid se pokazao kao najatraktivnija i najkorisnija klasa biodegradabilnih poliestara. Laktidna kiselina se lako dobija biotehnološkim procesom iz sirovina koje nisu skupe. Za proizvodnju na velikoj skali, polimer mora posedovati adekvatnu termalnu stabilnost da bi se zaštitio od degradacije i održao molekulska masu i svojstva. Degradacija PLA zavisi od molekulske mase, temperature, nečistoća, koncentracije katalizatora, itd. [51]. Za PLA, koji se koristi u ortopedskoj i oralnoj hirurgiji kao pomoćno sredstvo u fiksaciji, neophodni uslov je velika molekulska masa, da bi mogla da se postigne velika mehanička jačina. Nasuprot tome, za PLA koji se koristi kao nosač u sistemima za dostavu lekova, generalno je poželjnije da ima manju molekulska masu, jer kraće vreme degradacije polimera pokazuje bolje karakteristike kontrolisanog otpuštanja aktivne supstance. PLA degradira prostom hidrolizom estarskih veza i da bi se katalizovala hidroliza nije neophodno prisustvo enzima. Najveći proizvođači PLA u svetu su navedeni u tabeli 1.3 [51]. Hidrolitičko cepanje lanaca PLA se dešava sporije od cepanja lanaca hidrofilnijeg PGA. Degradacija PLA se može ubrzati pod dejstvom različitih enzima, kao što je proteinaza K. Mnoge studije su pokazale da, ako se isključi efekat enzima, ne postoji bitna

razlika u degradaciji *in vitro* i *in vivo*. Mnogi autori su potvrdili da se razlike između *in vivo* i *in vitro* degradacije mogu objasniti preko porasta pokretljivosti polimernih lanaca u prisustvu lipidnih komponenti prisutnih u ljudskom tkivu [51].

Tabela 1.3 Tekući proizvođači PLA [51]

Naziv kompanije	Lokacija
Apack AG	Nemačka
BASF Aktiengesellschaft	Nemačka
Bio Invigor	Tajvan
Birmingham Polymers	Amerika
Boeringer Ingelheim	Nemačka
Dow Cargill	Amerika
Hycail B. V.	Holandija
Mitsui Chemicals	Japan
Phusis	Francuska
Polysciences Inc.	Amerika
Purac Biochem	Holandija
Shimadzu Corporation	Japan

Monomer, laktidna kiselina, se može sintetisati biološkim ili hemijskim metodama. Biološka metoda je generalno poželjnija jer se bazira na fermentaciji skroba i ostalih polisaharida koji su dostupni u žitaricama, šećernoj repi, šećernoj trsci, krompiru i ostalim biomasama. Većina svetskih komercijalnih laktidnih kiselina se dobija bakteriološkom fermentacijom. PLA se najčešće sintetiše preko ROP laktida, diestra laktidne kiseline. Laktid ima dva asimetrična ugljenika i zbog toga se javlja u dva optički aktivna izomera L- i D-izomer ili sintetički D,L-izomer. Čisti enantiomeri poli-L-laktid (PLLA) i poli-D-laktid (PDLA) se dobijaju u bakteriološkim sistemima izborom odgovarajućeg mikroorganizma, kao što se laktidna kiselina može dobiti procesom fermentacije. PLLA je semikristalan zbog svoje stereoregularne strukture. Laktidna kiselina, koja se dobija hemijskim procesom, predstavlja smešu D- i L- izomera. Na slici 1.13 su prikazani različiti izomeri laktida.

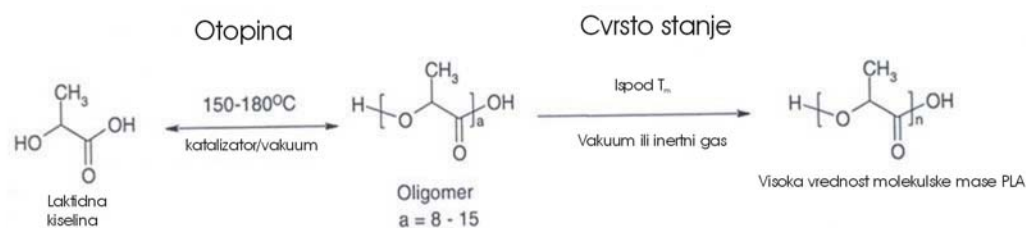


Slika 1.13 Različiti izomeri laktida [50]

PLLA je relativno čvrst materijal sa kristalnom temperaturom topljenja u opsegu 170-183 °C i T_g oko ~55-65 °C, dok PDLA ima T_g u opsegu 50-60°C. Period degradacije PDLA je do godinu dana, a PLLA je do dve godine. Rastvorljivost polimera na bazi laktidne kiseline dosta zavisi od molekulske mase, stepena kristaliničnosti i ko-monomera prisutnih u polimeru. Poželjni rastvarači za čist poli(L-laktid) su hlorisani i fluorisani organski rastvarači, dioksan, dioksolan, furan; a za poli(DL-laktid), pored prethodno pomenutih, i mnogi drugi rastvarači kao što su aceton, piridin, etil laktat, tetrahidrofuran, ksilen, etil acetat, dimetilsulfoksid, *N, N*-dimetilformamid i metil etil keton. Tipični

nerastvarači za polimere bazirane na laktidnoj kiselini su voda, alkoholi kao što su metanol, etanol, propilen glikol i nesupstituisani ugljovodonici kao što su heksan, heptan i dr. PLLA je semikristalan dok je PDLLA amorfan biodegradabilan polimer. Zbog veće kristaliničnosti, poli(L-laktid) iste molekulske mase ima bolja mehanička svojstva od poli(DL-laktida). PLLA ima uređeniju i kompaktniju strukturu i samim tim bolje mehaničke karakteristike i duži period degradacije. Stepem kristaliničnosti zavisi od mnogih faktora, kao što su molekulska masa, termalna svojstva i uslovi procesiranja. Mehanička svojstva PLA mogu varirati u širokom opsegu. Sa povećanjem molekulske mase, mehanička svojstva se takođe mogu poboljšati.

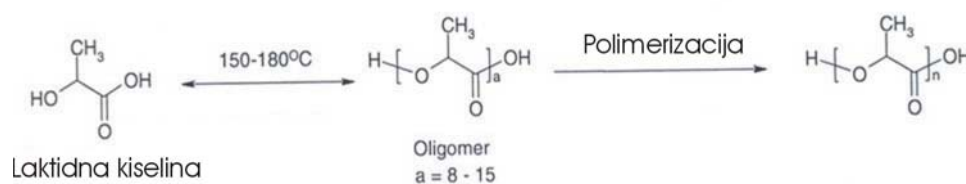
Za sintezu PLA se mogu koristiti četiri metode. **Direktna polikondenzaciona polimerizacija** predstavlja metodu u kojoj se polimerizacija laktidne kiseline vrši u prisustvu katalizatora na sniženom pritisku. Polimer koji se dobija ovom metodom ima malu molekulsku masu, reda veličine do nekoliko desetina hiljada g/mol. Tokom ovog procesa polimerizacije stereoregularnost se ne može kontrolisati, zbog čega polimer poseduje lošije mehaničke karakteristike. **Azeotropna kondenzaciona polimerizacija** se koristi za sintetisanje polimera velikih molekulskih masa. To je tehnika polimerizacije iz rastvora u kojoj se koristi katalizator velike aktivnosti i organski rastvarač sa niskom tačkom ključanja. Ovom metodom se može dobiti PLA visoke čistoće sa molekulskom masom do 300 000 g/mol. **Polimerizacija u čvrstom stanju (SSP²)** se odvija na sniženom pritisku ili u prisustvu inertnog gasa na temperaturi iznad temperature staklastog prelaza i ispod temperature topljenja, i koristi se za dobijanje polimera velikih molekulskih masa. Šematski prikaz polimerizacije u čvrstom stanju je dat na slici 1.14. Prednosti ove metode se ogledaju u niskoj temperaturi procesiranja, unapređenim karakteristikama polimera usled ograničenih cikliranja monomera i sporednih reakcija, i praktično odsustvu nečistoća zbog toga što se ne koriste rastvarači. **Polimerizacija otvorenog prstena (ROP³)** je najzastupljenija tehnika za dobijanje PLA, zbog mogućnosti precizne kontrole strukture i mogućnosti variranja karakteristika rezultujućih polimera sa boljom kontrolom, što proširuje aplikacije. Šematski prikaz polimerizacije otvorenog prstena je dat na slici 1.15. Ova metoda se najčešće koristi za sintezu polimera velikih molekulskih masa sa visokim stepenom stereoregulacije [51].



Slika 1.14 Polimerizacija u čvrstom stanju [51]

² Solid state polymerization (SSP)

³ Ring opening polymerization (ROP)



Slika 1.15 Sinteza PLA polimerizacijom otvorenog prstena [51]

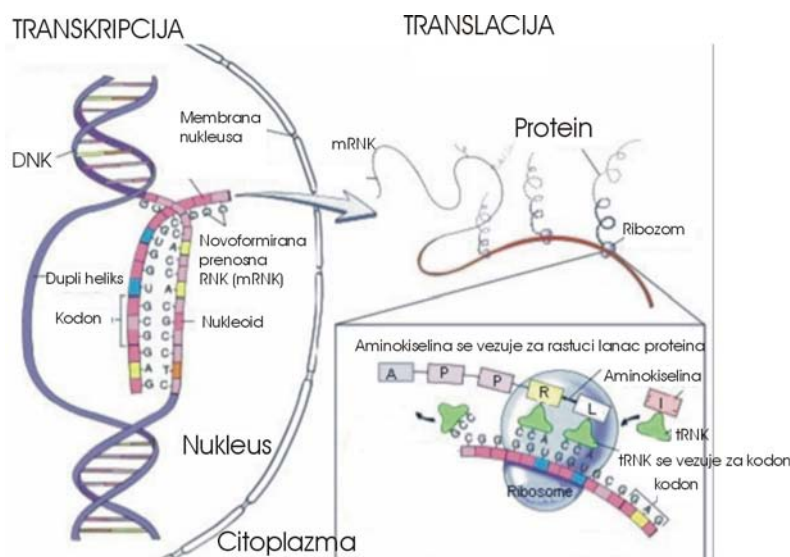
PLA značajno velike molekulske mase se ne rastvara u vodi. Kada se PLA izloži degradaciji, voda prolazi u najveći deo polimerne matrice i hidroliza na estarskim vezama počinje prvenstveno napadom na hemijske veze u amorfnim zonama, konvertujući dugačke polimerne lance na kraće. Kao rezultat se javljaju oligomeri i monomeri malih molekulskih masa, koji su rastvorni u vodi. Oligomeri rastvoreni u vodi, zatim, organizovano izlaze iz matrice u okružujućem vodenom medijumu. Degradacija izaziva porast u broju karboksilnih grupa na krajevima lanaca, koje su poznate po tome što autokatalizuju estarsku hidrolizu. Sa porastom vremena starenja, rastvorni oligomeri koji su blizu površine se mogu rastvoriti pre totalne degradacije, dok oni koji su locirani duboko unutar matrice ostaju zarobljeni i doprinose autokatalitičkom efektu. Mehanizam hidrolize i ponašanje PLA zavise od brojnih faktora, uključujući i medijum za hidrolizu. Kod polilaktida, koeficijent difuzije rastvorenih oligomera zavisi primarno od faktora kao što su stepen bubrenja matrice, makromolekulska konformacija, krutost, hemijska struktura, molekulska masa, distribucija molekulskih masa, nečistoće/ostaci monomera, stereochemija, pokretljivost lanaca i kristaliničnost. Kristalni domen je rezistentniji na degradaciju od amorfno. Hidrofobni i hidrofilni krajevi polimernog lanca značajno utiču na proces biodegradacije. Otpuštanje rastvorenog oligomera sa karboksilnim završetkom zavisi od njegove rastvorljivosti u okružujućem vodenom medijumu, odnosno od faktora kao što su pH, jonska jačina i temperatura. Tokom degradacije se narušavaju brojna svojstva polimera, na primer molekulska masa, distribucija molekulskih masa, površinska morfologija, mehanička svojstva, kristaliničnost itd.

1.3.1.3 Poli(laktid-ko-glikolid), PLGA

Kopolimerizacijom glikolida i laktida se dobija polimer sa karakteristikama koje predstavljaju kombinaciju svojstava PGA i PLA (PLLA i PDLLA). PLGA je manje krut od svojih originalnih komponenti, pošto se kristaliničnost smanjuje sa povećanjem sadržaja bilo kog homopolimera. PLGA sa sastavom koji čine između 25 % i 70 % PGA je amorfan i ima zahtevana svojstva sistema za kontrolisanu dostavu lekova [52]. Sa porastom broja jedinica PGA u polimeru povećava se hidrofilnost polimera. Period degradacije PLGA je do dva meseca. Zbog svoje komercijalne dostupnosti, prihvatljive cene, biokompatibilnosti i produkata hidrolitičke degradacije koji su resorbilni i nisu štetni, PLGA se dosta koristi kao osnova matrice sistema za kontrolisanu dostavu lekova [53]. Popularnost PLGA se može objasniti i činjenicom da je FDA odobrila primenu PLGA u brojnim kliničkim aplikacijama [5].

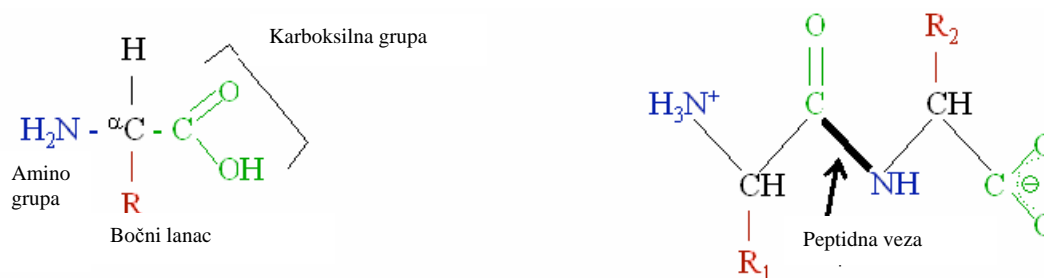
1.3.2 Proteini

Proteini su molekuli koji imaju bitnu ulogu u izvršavanju životnih funkcija. Oni regulišu različite aktivnosti u svim poznatim organizmima, od replikacije genetskog koda do transportovanja kiseonika, i generalno su odgovorni za regulisanje ćelijske mašinerije i definisanje fenotipa organizma. Enzimi su proteini koji katalizuju biološke reakcije. Sinteza proteina je ilustrovana na slici 1.16.



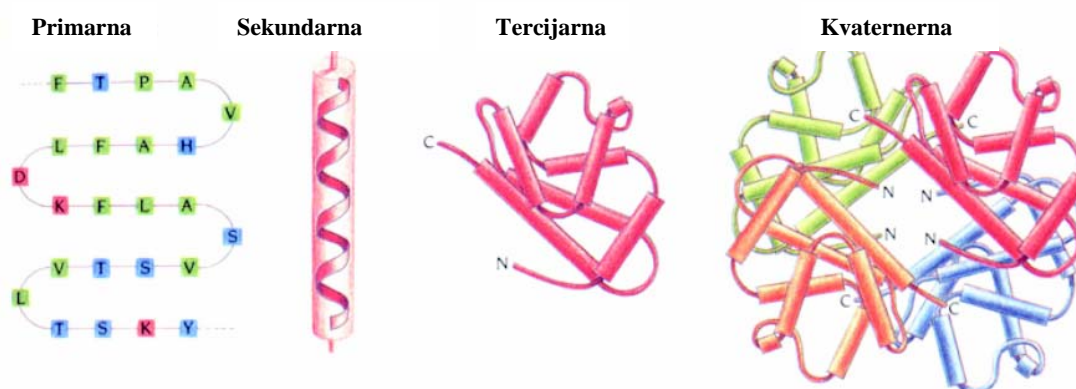
Slika 1.16 Šematski prikaz sinteze proteina [54]

Proteini predstavljaju polipeptidne lance koji su izgrađeni od amino kiselina koje su međusobno povezane peptidnom vezom. Postoji 20 amino kiselina koje se najčešće nalaze u proteinima. Kao što je prikazano na slici 1.17, amino kiselina sadrži karboksilnu grupu, amino grupu, centralni atom označen kao alfa (α) ugljenik, i promenljiv deo poznat kao bočni lanac (R). Amino kiseline se razlikuju samo po tipu R grupe koju sadrže. Svaka amino kiselina ima specifično ime i oznaku od 3 slova. Bočni lanci utiču na svojstva proteina. U zavisnosti od hemijske prirode bočnih lanaca, amino kiseline se klasifikuju na hidrofilne (polarne) ili hidrofobne (nepolarne). Zamenom samo jedne amino kiseline u proteinskom nizu se može potpuno promeniti funkcija proteina. Bolesna anemična ćelija je rezultat zamene samo jedne valin amino kiseline jediničnom glutaminskom kiselinom u lancu proteina u molekulu hemoglobina.



Slika 1.17 Prikaz strukture amino kiseline i peptidne veze [54]

Sekvenca proteina koja predstavlja amino kiselinu je označena kao njegova **primarna struktura**. Kao i polimeri, peptidi i proteini mogu posedovati kompleksne konfiguracije koje nastaju rotacijom veza u strukturi i interakcijama između bočnih lanaca. Stabilnost ovih struktura zavisi od R grupa, specifičnog niza amino kiselina, kao i sredine u kojoj se protein nalazi. Slika 1.18 ilustruje najčešće konfiguracije prisutne u proteinima. α -Heliks se obrazuje namotavanjem lanaca okretanjem u pravcu kazaljke na satu pri čemu dolazi do formiranja cilindra. Kao posledica ovog fenomena dolazi do formiranja vodoničnih veza između C=O i N-H grupa susednih spirala. U prirodi se javlja samo okretanje α -heliksa udesno, što rezultuje električnim dipolom sa viškom pozitivnog naboja na jednom kraju i negativnim nabojem na drugom. U β -ploči, peptidni lanac zauzima mnogo više prostora, sa rastojanjem od 0.35 nm između susednih peptidnih grupa, u poređenju sa 0.15 nm u slučaju α -heliksa. Ove strukturne ravni su takođe rezultat formiranih vodoničnih veza. α -Heliks i β -ploča su primeri **sekundarne strukture** proteina. Namotavanjem u specifični trodimenzionalni oblik, proteini ostvaruju sposobnost da izvršavaju svoje biološke funkcije. Ovaj oblik proteina se naziva **tercijarnom strukturom** i stabilizovan je različitim interakcijama kao što su vodonične veze, hidrofobne interakcije i disulfidni mostovi. Dodavanjem subjedinica na tercijarnu strukturu ostvaruje se **kvaternerna struktura-struktura klupka**. Ova četiri tipa strukture su ilustrovana na slici 1.18.



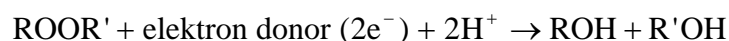
Slika 1.18 Moguće strukture proteina [54]

U zavisnosti od prirode krajeva lanaca, može doći i do hidrofobnih interakcija između lanaca, pri čemu dolazi do odmotavanja lanaca. Razdvajanje sulfidne veze, ili neko drugo dejstvo

koje izaziva promenu u strukturi proteina, dovodi do **denaturacije proteina** pri čemu protein gubi aktivnost. Denaturisani proteini su takođe manje rastvorljivi.

Goveđi serum albumin (BSA) je protein koji se može koristiti kao rastvarač ili blokirajući agens u brojnim aplikacijama [55, 56]. Takođe se koristi kao hrana u ćelijskoj i mikrobnjoj kulturi. U pojedinim slučajevima, BSA se koristi za stabilizaciju pojedinih proteina, na primer DNK i za sprečavanje adhezije enzima na reakcione sudove [57]. BSA se dosta koristi zbog svoje odlične stabilnosti, jer ne utiče na mnoge biohemijske reakcije, ima nisku cenu i dostupan je u velikim količinama jer se izoluje iz goveđe krvi [10]. Albumin se akumulira u čvrstim tumorima, što ga čini potencijalnim makromolekulskim nosačem za ciljanu dostavu lekova protiv tumora [10]. Molekulska masa BSA je 65 kDa.

Peroksidaza je hemoprotein, koji se može podeliti na anjonske i katjonske grupe prema svojoj elektroforetskoj pokretljivosti. Peroksidaza izolovana iz rena ima različite fizičko-hemijske funkcije u nekoliko primarnih i sekundarnih metaboličkih procesa kao što je oslobađanje od peroksida, učestvovanje u oksidaciji toksičnih komponenti, hormonskoj signalizaciji, zaštiti biljaka od patogena, IAA katabolizmu, biosintezi etilena itd. Peroksidaza takođe katalizuje reakciju oblika:

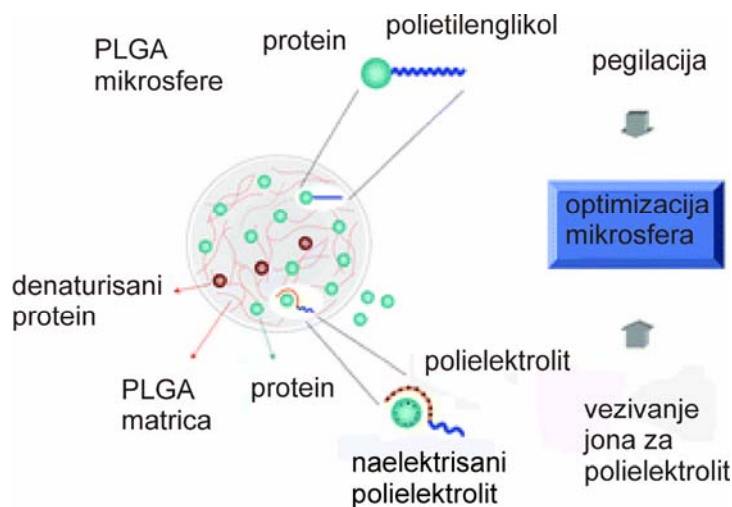


Za ovaj enzim optimalni substrat je vodonik peroksid. Priroda donora elektrona dosta zavisi od strukture enzima. Peroksidaza iz rena može koristiti različite organske komponente kao donore i primaoca elektrona [58]. Ona ima pristupačne aktivne položaje i mnoge komponente mogu dopreti do mesta reakcije. Glutationska peroksidaza, koja sadrži selenocistein, je peroksidaza koja je prisutna kod ljudi [59]. Ona koristi glutation kao donor elektrona i aktivna je i sa vodonik peroksidom i organskim hiperperoksidnim substratima. Molekulska masa peroksidaze je 45 kDa. Jedna od metoda koja se koristi da bi se objasnila funkcija peroksidaze je izolovanje i prečišćavanje iz delova biljaka i proučavanje fiziološke uloge svakog enzima pojedinačno. Peroksidaza se koristi u tretmanima različitih fizioloških oboljenja. Medicinska svojstva, uključujući anti-tumornu aktivnost, su svojstvena za njene hemijske konstituente sekundarnog metabolizma, uglavnom alkaloida.

1.4 Sferne kompozitne čestice

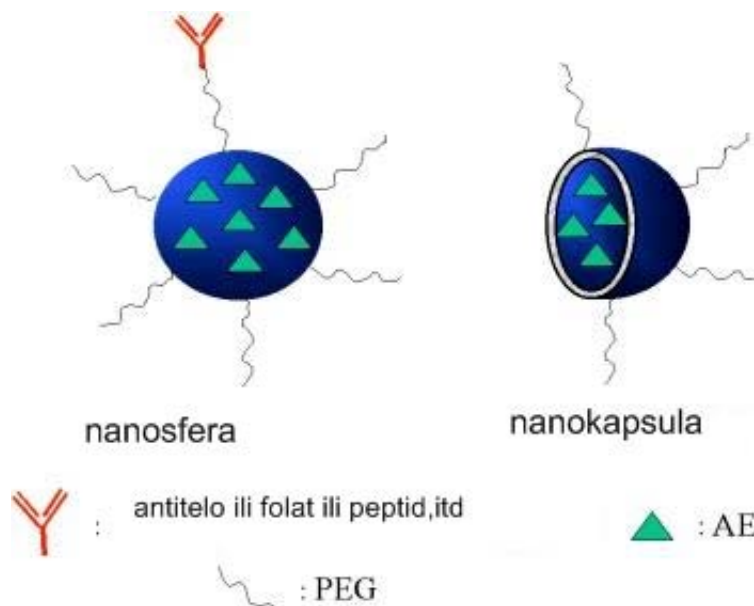
Tehnologije mikroinkapsulacije, skladištenje tečnih i čvrstih faza u sferne čestice mikronskih veličina, razvile su se sredinom 50-te i korišćene su za različite aplikacije. Mikrosfere su izgrađene bilo od veštačkog ili prirodnog polimera koji se mogu modifikovati kako bi ubrzali ili usporili degradaciju polimernih rezervoara i time modifikovali farmakokinetiku inkorporirane aktivne supstance. Najčešće korišćeni polimeri su polilaktid (PLA) i poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA) [59]. Brzine difuzije leka kroz polimernu matricu se mogu menjati u zavisnosti od zahtevanih karakteristika polimera i degradacija biodegradabilnih polimera se može odigrati u periodu od nekoliko meseci (PLGA) do nekoliko godina (PLA). Degradacijom *in vivo* nastaju produkti laktidne i

glikolne kiseline, CO_2 i H_2O koji se oslobađaju preko Krevsovog ciklusa [60]. Tokom poslednje decenije interesovanje za mikroinkapsulaciju sredstava za dostavu lekova je u velikom porastu. Na slici 1.19 prikazana je ilustracija inkapsulacije proteina u poli(laktid-ko-glikolid) za kontrolisanu dostavu.



Slika 1.19 Ilustracija inkapsulacije proteina u poli(laktid-ko-glikolid) za kontrolisanu dostavu [61]

Na slici 1.20 prikazani su primeri nanosfere i nanokapsule u kojima je inkorporiran protein.



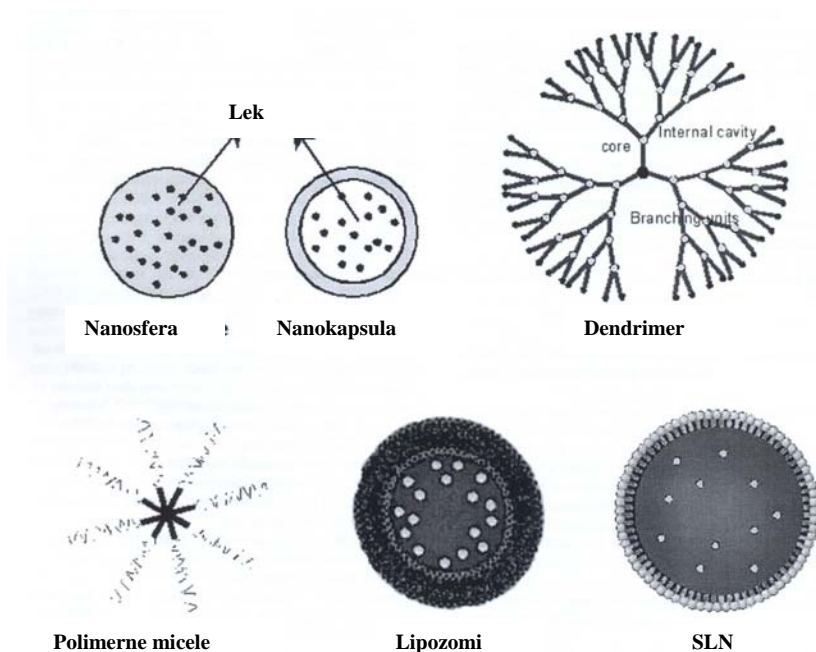
Slika 1.20 Prikaz nanosfere ili nanokapsule u kojoj je inkorporiran protein [1]

Mikrosfere se mogu dobiti različitim tehnikama koje u stvari predstavljaju modifikacije tri osnovne metode [57]:

- ekstrakcija/isparavanje rastvarača
- fazna separacija
- metoda raspršivanja⁴

⁴ Spray drying (metoda raspršivanja)

Pod terminom "mikročestice", moguće je razlikovati mikro/nanokapsule, mikro/nanosfere, liposome i ostale. Jedna od glavnih mana mikrosfera je "initial burst", fenomen pri kome se veliki deo inkapsuliranog leka otpušta u kratkom vremenskom intervalu odmah nakon administracije, a kao posledica ovog fenomena može se očekivati pojava brojnih sporednih efekata [62]. Nanokapsule podrazumevaju sisteme mehurova u kojima je lek okružen polimernom membranom, a nanosfere sisteme matrica u kojima je lek fizički i uniformno dispergovan [21]. Na slici 1.21 su prikazani različiti sistemi za kontrolisanu dostavu lekova koji se koriste u nanotehnologiji. Nanočestice ili koloidni nosači su intenzivno istraživani na polju biomedicine i biotehnologije, naročito u sistemima za dostavu lekova sa ciljanim navođenjem, zbog toga što su zahvaljujući svojoj veličini prihvatljivi za intravenozne injekcije [18]. Prednosti sistema sa ciljanom dostavom se ogledaju u dejstvu na specifičnim mestima u telu i sistemi sa ciljanom dostavom se koriste u terapijama kancera, genskoj terapiji, lečenju virusnih bolesti i bakterioloških infekcija. Sa druge strane, distribucija nanočestica u telu nakon injekcije je pod velikim uticajem interakcija čestica sa biološkom sredinom i zavisi od fizičko-hemijskih svojstava čestica kao što su: veličina, površinsko naelektrisanje, morfologija, hidrofilitnost itd. Među ovim faktorima, veličina čestica ima primarni značaj [9]. Primenjene čestice veličina u prečniku od nekoliko mikrona se uglavnom akumuliraju u plućnim kapilarima, a submikronske se odstranjuju od strane retikulo endotelialnog sistema (RES). Prednosti aplikacija nanočestica sa ciljanim dostavljanjem leka do specifičnih delova tela se ogledaju u izbegavanju bilo kakvog hirurškog zahvata koji uvek može biti izvor infekcije. Kritičan problem u metodama procesiranja nanočestica predstavlja dobijanje uniformnih čestica malih dimenzija [63]. Veličina čestica se može kontrolisati regulisanjem različitih faktora kao što su brzina mešanja, tip i koncentracija disperzionog sredstva, viskozitet organskih i vodenih faza, temperatura itd. [18].



Slika 1.21 Šematski prikaz različitih formi sistema za dostavu lekova koji se koriste u terapiji protiv kancera [20]

Tabela 1.4 Pregled dosadašnjih eksperimenata sa ciljem dobijanja mikrosfera na sistemu PLLA

Polimer	Metoda	Aktivna supstanca	Veličina	Autor
PLLA	Emulzija/uparavanje rastvarača	Savoksepin	125 nm	Y. N. Konan et al. [74]
PLLA	Emulzija/izmena rastvarača, uparavanje	Loperamid	270 nm	F. Némati et al. [143]
PLLA	Emulzija/uparavanje rastvarača	Albumin	300 nm	M. Ueda et al. [144]
PLLA	Precipitacija	Dipropionat	300-500 nm	S. Hyvönen et al. [114]
PLLA	Modifikovana emulzija/difuzija rastvarača	Beklometazon	500-900 nm	L. Peltonen et al. [100]
PLLA	Ekstrakcija/uparavanje rastvarača	Solbutamol sulfat-SS	200-1100 nm	H. Murakami et al. [98]
PLLA	Emulzija/uparavanje rastvarača	Albumin	0.7-1.2 μm	T. W. Chung et al. [97]
PLLA	Emulzija/uparavanje rastvarača	Lidokain	0.7-1.2 μm	T. W. Chung et al. [137]
PLLA	Emulzija/uparavanje rastvarača	Paklitaksel	50-90 μm	R. T. Liggins et al. [95]
PLLA	Emulzija/uparavanje rastvarača	Albumin	35-105 μm	R. T. Liggins et al. [145]
PLLA	Emulzija/uparavanje rastvarača	Naltrekson	100-250 μm	R. Dinarvand et al. [96]
PDLLA	Emulzija/uparavanje rastvarača	Paklitaksel	300 μm	Y. Mizutani et al. [146]

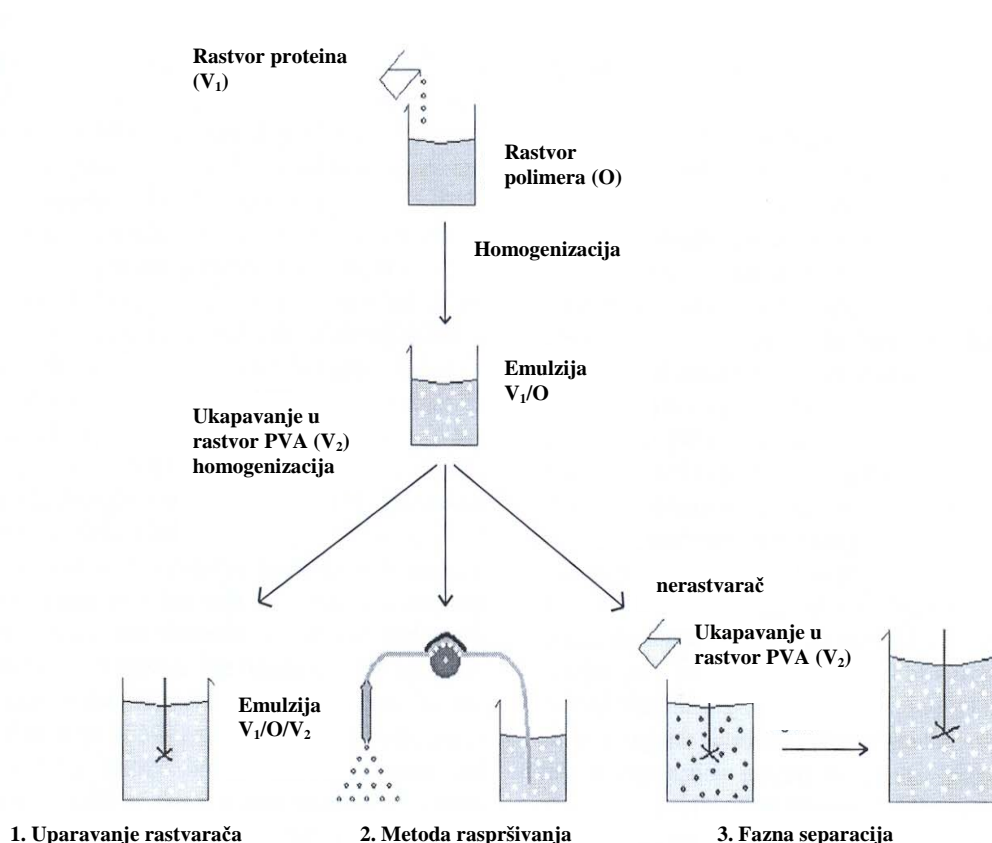
Tabela 1.5 Pregled dosadašnjih eksperimenata sa ciljem dobijanja mikrosfera na sistemu PDLLA

Polimer	Metoda	Aktivna supstanca	Veličina	Autor
PDLLA	Precipitacija	BDP	100 nm	F. B. Landry et al. [48]
PDLLA	Emulzija/uparavanje rastvarača		100-120 nm	F. B. Landy et al. [136]
PDLLA	Dijaliza	Paklitaksel	<200 nm	Z. Zhang et al. [59]
PDLLA	Dvostruka emulzija	Izradipin	110-208 nm	F. Delie et al. [43]
PDLLA	V/U/V dvostruka emulzija	Natrijum hromoglikat	201-266 nm	Y.-Y. Yang et al. [109]
PDLLA	Usoljavanje/precipitacija	p-THPP	312 nm	E. Allémann et al. [70]
PDLLA	Dijaliza	HIV-1 p24	300-600 nm	Y. Ataman-Önal et al. [91]
PDLLA	Usoljavanje/precipitacija	Savoksepin	<1000 nm	Y.N. Konan et al. [74]
PDLLA	Dijaliza	Epirubicin	198-1088 nm	M. Liu et al. [120]
PDLLA	Emulzija/uparavanje rastvarača	Albumin	0.7-1.2 µm	T. W. Chung et al. [97]
PDLLA	Emulzija/uparavanje rastvarača	Lidokain	0.7-1.2 µm	T. W. Chung et al. [137]
PDLLA	Emulzija/uparavanje rastvarača	Lidokain	0.75-1.14 µm	E. Leo et al. [138]
PDLLA	Sušenje raspršivanjem	Etanidazol	1.26-1.34 µm	F.- J. Wang et al. [93]
PDLLA	Emulzija/difuzija rastvarača	Albumin	161-2180 nm	D. Quintanar-Guerrero et al. [131]
PDLLA	Emulzija u/v uparavanje rastvarača	Ibuprofen	2.2-7.5 µm	C. Grandfils et al. [139]
PDLLA	Sušenje raspršivanjem	BSA	1-10 µm	B. Gander et al. [38]
PDLLA	Emulzija/uparavanje rastvarača		<10 µm	T. G. Park [140]
PDLLA	Emulzija/uparavanje rastvarača	Lidokain	1-50 µm	P.-C. Chen et al. [33]
PDLLA	Precipitacija	BSA	62-83 µm	S. Yoshioka et al. [141]
PDLLA	Pracipitacija	Progesteron	45-90 µm	M. Leroueil-Le Verger et al. [142]

Do sada su urađeni brojni eksperimenti sa ciljem dobijanja mikrosfera od bioresorbibilnih polimera u kojima su inkorporirane različite aktivne supstance. U tabelama 1.4 i 1.5 je dat pregled dosadašnjih eksperimenata na sistemima baziranim na PLLA i PDLLA.

1.4.1 Metode koje se koriste za procesiranje mikrosfera

Brojne metode se mogu koristiti za procesiranje mikrosfera od biodegradabilnih polimera PLLA i PDLLA u kojima je inkorporirana aktivna supstanca [64]. Tehnike uparavanja rastvarača na bazi emulzije ulje-u-vodi su među najpopularnijim metodama za mikroinkapsulaciju zbog relativno lakog procesiranja i svestranosti [18]. Šematski prikaz tehnika koje se koriste za inkapsulaciju aktivnih supstanci je dat na slici 1.22 [57]. U zavisnosti od toga da li je u pitanju hidrofilna ili hidrofobna aktivna supstanca, koristi se emulzija tipa ulje-u-vodi (u/v) ili [(voda-u-ulju)-u vodi] (višestruka emulzija).

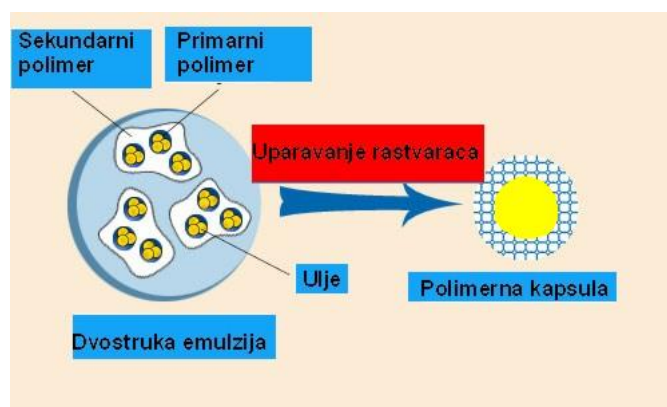


Slika 1.22 Konvencionalne metode koje se koriste za mikroinkapsulaciju bioaktivnih supstanci [57]

1.4.1.1 Emulzija ulje-u-vodi (u/v)

Kada se radi sa hidrofobnim aktivnim supstancama, terapijski agens i polimer se rastvaraju u isparljivom organskom rastvaraču, najčešće dihlormetanu, hloroformu ili acetonu. Ova uljana faza se zatim pod energičnim mešanjem ukapava u vodenu fazu koja sadrži stabilizator kao

što je polivinil alkohol, polivinil pirolidon ili želatin (emulzija ulje-u-vodi, u/v). Nemešljivost dve faze omogućava formiranje stabilne emulzije. Uloga stabilizatora, takođe označenog kao emulziono sredstvo, je da zaštiti kapljice od koalescencije i aglomeracije da bi se sačuvala stabilna emulzija. Polimer precipitira kako se rastvarač uklanja isparavanjem, proces se ponekad ubrzava redukovanjem pritiska ili dodavanjem nerastvarača. Očvrsnule mikrosfere se zatim razdvajaju iz vodene faze, ispiraju i suše. Na slici 1.23 prikazano je formiranje polimerne kapsule uparavanjem rastvarača.



Slika 1.23 Formiranje polimerne kapsule uparavanjem rastvarača [65]

1.4.1.2 Emulzija voda-u-ulju-u-vodi (v/u/v)

Kada se radi sa hidrofilnim aktivnim supstancama, terapijski agens se prvo rastvara u vodi. Polimer se rastvara u organskom rastvaraču koji se meša sa vodom (kao što su aceton ili hloroform), a zatim se emulguje sa vodenim rastvorom aktivne supstance. Dobijena primarna emulzija se disperguje u vodenoj fazi koja obično sadrži koloidni stabilizator (višestruka emulzija v/u/v) [66]. Skoro trenutna difuzija organskog rastvarača u vodenu fazu rezultuje precipitacijom polimera u vidu nanočestica. Na kraju, rastvarač se uparava, kao što je navedeno u metodi u/v ili ekstrahuje dijalizom nasuprot vodi [67]. U principu, samo aktivne supstance koje se rastvaraju u organskom rastvaraču mogu biti inkorporirane korišćenjem prve metode (emulzija u/v). Ova tehnika inkapsulacije (v/u/v) se koristi za inkapsulaciju bioaktivnih makromolekula kao što su proteini, vakcine, i peptidi. Tehnika se naziva i sušenjem u vodi. Obe metode zahtevaju formulisanje optimalnih uslova koji zavise od tipa korišćenog polimera/kopolimera, njihove molekulske težine, aktivne supstance koja treba da se inkorporira, veličine čestica koje treba da se dostignu, itd. [68-71]. Ostale, ne tako često korišćene metode, uključuju emulzionu difuziju rastvarača u uljanu fazu [72, 73] i "salting out"⁵ procese [74, 75].

Metoda emulzionog uparavanja rastvarača je najrasprostranjenija metoda koja se koristi za dobijanje nanosfera ili mikrosfera PLLA i PDLLA. Ova metoda zahteva velike količine površinski aktivnih supstanci za stabilizaciju dispergovanih čestica [18, 35]. Najčešće korišćen stabilizator je polivinil alkohol, PVA [76, 77]. Polivinil alkohol se teško uklanja sa površine čestica. Poznato je da PVA zaostaje na površini mikro ili nanočestica PLLA i PDLLA, menja bioresorbilnost polimernih

⁵ "salting out"-dodavanje soli (NaCl, MgCl₂) da bi se razdvojila organska od vodene faze

nosača, biodistributivnost polimernih čestica i utiče na brzinu otpuštanja inkorporiranih lekova [78-80]. Površinski aktivne supstance kao što su polietilen oksid (PEO), polietilen glikol (PEG), polivinil pirolidon (PVP) i poloxamer PEO-polipropilen oksid blok kopolimer se takođe koriste za stabilizaciju čestica [81-84]. Takođe, neke od mana ovih metoda su teškoća i neophodnost uklanjanja rastvarača i površinski aktivnih supstanci koji su vrlo toksični; mali prinos, previše koraka za pripremu, neophodnost korišćenja velike količine površinski aktivnih supstanci [82-85]. Albumin se usled svoje dostupnosti u čistom obliku i svoje biodegradabilnosti, netoksičnosti i činjenice da ne izaziva negativnu imunogenezu, pokazao kao atraktivna površinski aktivna supstanca koja ima široku primenu u procesiranju mikrosfera [10].

1.4.1.3 Emulzije ulje-u-ulju (u/u) i voda-u-ulju-u-ulju (v/u/u)

Mala efikasnost inkapsulacije i velika količina otpuštenog leka nakon inkubacije su problemi koji su povezani sa tehnikama uparavanja rastvarača, kada se koriste za pripremanje mikrosfera koje sadrže supstance rastvorne u vodi [52]. Ova pojava se može objasniti preko difuzije leka u vodeni medijum tokom procesiranja. Prethodno opisane tehnike nisu adekvatne kada se radi sa polimerima sklonim hidrolizi, na primer polisaharidima, pošto emulzije koje sadrže vodu mogu izazvati degradaciju polimera i dovesti do smanjenja molekulske mase polimera [83]. Tehnike uparavanja rastvarača bazirane na sistemima ulje-u-ulju (u/u) ili voda-u-ulju-u-ulju (v/u/u) predstavljaju korisne alternative. Upotrebom ulja kao kontinualne faze, može se sprečiti rastvaranje leka tokom procesiranja mikrosfera. Metoda (u/u) je približno slična tehnici (u/v) ali obuhvata rastvaranje polimera i leka u organskom rastvaraču, najčešće metilen hloridu, i emulzifikaciju ovog organskog polimernog rastvora pre nego što se emulzija doda u stabilišuću vodenu fazu. Kada se koristi tehnika (v/u/u), vodeni rastvor leka se prvo emulguje u organskom polimernom rastvaraču pre nego što se emulzija doda u stabilišuću uljanu fazu. Preferiraju se biljna ulja, pošto su hidrofobna i jestiva. Stabilna emulzija se formira intenzivnim mešanjem. Mikročestice se formiraju kako se organski rastvarač ekstahuje u uljanu fazu. Tehnika (v/u/u), takođe nazvana sušenjem u ulju, se koristi za inkapsulaciju različitih tipova proteina.

1.4.1.4 Dijaliza

Metoda dijalize je prihvatljiva kao jednostavna i efektna metoda za pripremu malih veličina-nanočestica pomoću blok, kopolimera i drugih amfipatičnih materijala [59, 86-90]. Metodom dijalize se mogu napraviti nanočestice bez površinski aktivnih supstanci korišćenjem različitih rastvarača [91]. Većina površinski aktivnih supstanci nije biodegradabilna, nije digestivna i nije uvek biokompatibilna. Takođe, na koži se mogu manifestovati u vidu alergijske reakcije [92]. Na primer, kao početni rastvarači, za pripremu nanočestica bez površinski aktivnih supstanci, mogu se koristiti dimetilformamid (DMF), dimetilsulfoksid (DMSO), dimetilacetamid (DMAc) i aceton. Metoda dijalize mora da se izvodi tokom 24h da bi se potpuno odstranio rastvarač i da bi se dobile nanočestice bez površinski aktivnih supstanci. Upotrebom DMF, DMSO i DMAc dobijaju se submikronske čestice. U dosadašnjim istraživanjima, na osnovu morfološke analize se može primetiti da se korišćenjem DMF

dobijaju veće sfere (200 nm), dok se korišćenjem DMSO i DMAc dobijaju manje čestice (100 nm). Ako se aceton koristi kao početni rastvarač veličina čestice se povećava i kreće se u opsegu 500-1000 nm [64].

Pri izboru rastvarača moraju se uzeti u obzir sledeći faktori:

- sposobnost da u potpunosti rastvori polimer;
- nemešljivost rastvarača sa kontinualnom fazom;
- velika isparljivost rastvarača;
- toksičnost je u granicama tolerancije.

Rastvarači koji se najčešće koriste za pravljenje emulzije ulje/voda, dihlormetan, hloroform i aceton, vrlo dobro zadovoljavaju prva tri kriterijuma [18]. Oni su, ipak, toksični i posebna pažnja treba da se posveti ukljanjanju svih tragova rastvarača na kraju procesiranja.

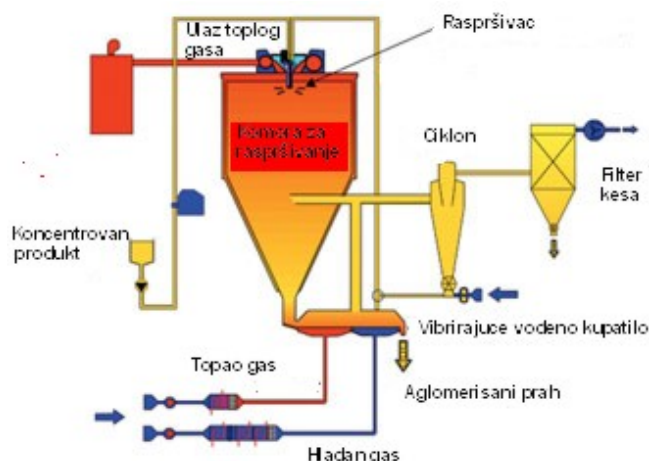
Kontinualna faza bi trebalo da zadovoljava sledeće zahteve:

- kontinualna faza ne može rastvoriti polimer;
- kontinualna faza se ne meša sa dispergovanom fazom;
- kontinualna faza je manje isparljiva od rastvarača dispergovane faze;
- toksičnost kontinualne faze je vrlo mala i lako se razdvaja od istaloženih mikrosfera.

Kao hidrofilna kontinualna faza se najčešće koristi destilovana voda koja zadovoljava ove kriterijume uključujući i biokompatibilnost.

1.4.1.5 Metoda raspršivanja

Jedna od vrlo popularnih tehnika koja se koristi za inkapsulaciju aktivnih supstanci u polimernim sferama je metoda raspršivanja. Metoda raspršivanja je najpoželjnija tehnika za industrijsko procesiranje mikrosfera [66, 93]. Polimerni rastvor se u vidu kapi raspršava u toplu komoru, koja obezbeđuje uparavanje rastvarača i precipitaciju polimera. Prednost ove metode se ogleda u mogućoj značajnoj kontroli veličine čestica. Proces mikroinkapsulacije baziran na fluidizovanom oblaganju je takođe u širokoj upotrebi. Ovaj proces obuhvata rastvaranje polimera i leka u zajedničkom rastvaraču. Mikrosfere se formiraju prilikom procesiranja ovog rastvora kroz aparaturu sa Wursterovim gasom koji se rasipa oko suspenzije. Na slici 1.24 dat je šematski prikaz metode raspršivanja.



Slika 1.24 Šematski prikaz metode raspršivanja [94]

1.4.2 Uticaj različitih parametara na procesiranje mikrosfera

Kada se emulzione tehnike koriste za pripremu mikrosfera, brojni procesni parametri utiču na finalnu strukturu mikrosfera, na primer, izbor rastvarača i surfaktanta, fazni viskozitet, odnos dispergovane prema kontinualnoj fazi, brzina mešanja, temperatura i vreme procesiranja [20]. Pažljivom modifikacijom procesnih uslova mogu se dobiti sferne čestice sa širokim opsegom veličina, od submikronskih do mikronskih skala. Surfaktanti koji su proučavani u emulzionim tehnikama su želatin, polivinil alkohol (PVA), polivinil pirolidon (PVP), tween (polioksietilen derivati sorbitan masnih estara), alginati, metil celuloza, polietilen glikol (PEG), PEG-dekstrin konjugovani, i PEG-PPO kopolimeri [13, 18].

Molekulska masa ima veliki uticaj na ponašanje polimera. Primećeno je da temperatura ostakljivanja (T_g), temperatura topljenja i entalpija rastu sa povećanjem molekulske mase polimera. Semi-kristalni polimeri male molekulske mase imaju potencijal za formiranje mikrosfera za dostavu lekova u periodu od nekoliko dana do nekoliko nedelja. Karakteristično za PLLA male molekulske mase je da se termalna svojstva veoma menjaju sa promenom mase [95].

Ispitivanjem uticaja brzine mešanja na morfologiju i raspodelu veličina čestica, i praćenjem otpuštanja medikamenta, primećeno je da se srednji prečnik čestica značajno smanjuje sa povećanjem brzine mešanja. Ovakvo ponašanje se i očekuje iz razloga što velike brzine mešanja obezbeđuju smicajnu silu koja je neophodna za razbijanje uljane faze na manje kapi. Na primer, pri brzinama od 400 i 800 rpm, dobijene čestice su sfere glatkih površina, dok sa povećanjem brzine na 1200 rpm, mikrosfere postaju neznatno nepravilne.

Ispitivanjem uticaja odnosa polimer/medikament, primećeno je da u slučaju male koncentracije medikamenta u polimernoj matrici (<20%), veličina mikrosfera nema uticaja na brzinu otpuštanja medikamenta. Povećanjem koncentracije sa 20% na 50%, povećava se brzina otpuštanja leka. Povećanjem koncentracije polimerne faze, povećava se prečnik mikrosfera. Ovakvo ponašanje se može povezati sa povećanjem viskoziteta dispergovane faze usled čega se pospešuje aglomeracija emulgovanih kapljica disperzije. Veličina mikrosfera i količina leka u njima određuju brzinu i postupak otpuštanja leka [95].

Kinetika uklanjanja rastvarača, takođe utiče na morfologiju i karakteristike otpuštanja leka iz mikrosfera. Brzina isparavanja rastvarača se povećava sa povećanjem brzine mešanja disperzije, a smanjuje sa povećanjem količine leka. Kinetika uklanjanja rastvarača ne utiče samo na morfologiju, sadržaj leka i njegovo otpuštanje, već i na termička svojstva mikrosfera. U većim mikrosferama, površinska degradacija je usporena što se odražava na otpuštanje leka koje zavisi od termičkih osobina. Na primer, povećanjem brzine mešanja sa 900 na 2100 rpm, a time i brzine isparavanja rastvarača, srednji prečnik mikrosfera se smanjuje sa 75 μm na 12 μm [95]. Povećanje brzine isparavanja rastvarača se može postići i snižavanjem pritiska tokom procesa očvršćavanja emulgovanih kapi. Pri velikim brzinama isparavanja rastvarača (⁶FRSE procesi), snižavanjem pritiska, dobijaju se mikrosfere glatkih površina. Pri normalnim brzinama isparavanja rastvarača

⁶ FRSE-fast rate of solvent evaporation

(⁷NRSE procesi), tj. normalnom pritisku, površina sfera je kao pomorandžina kora-visoko porozna. Na primer, pri konstantnoj temperaturi od 25°C, i različitim pritiscima 760 mmHg, i 160 mmHg, rastvarač ispari u toku 2h, odnosno 6h, respektivno. Način uklanjanja rastvarača takođe ima uticaj na veličinu mikrosfera. Na primer, u NRSE procesima srednji prečnik sfera je 1.14 μm, dok je u FRSE procesima 750 nm [96, 97]. Vrlo je bitno kontrolisati brzinu uklanjanja rastvarača u svim tehnikama procesiranja mikročestica da bi čestice imale zahtevanu i ponovljivu veličinu i morfologiju [37].

Temperatura procesiranja takođe ima veliki uticaj na morfologiju mikrosfera. Pri povišenim temperaturama, brzina precipitacije bi bila suviše velika i izabrani rastvarači bi "proključali" iz emulzionih kapljica. Poznato je da se pri ovakvim uslovima dobijaju deformisane ili visokoporozne sfere. Ključanje se može sprečiti na taj način što se priprema sfera izvodi na niskim temperaturama i pri niskom pritisku. Tip i koncentracija emulzifikatora takođe mogu uticati na veličinu mikrosfera, oblik, poroznost i efikasnost inkapsulacije [81]. Primećeno je da je viskozitet organske faze bitan faktor koji utiče na površinsku morfologiju rezultujućih mikrosfera [18].

Kombinacijom binarnih organskih rastvarača se može uticati na veličinu čestica. Kombinacija rastvarača se zasniva na činjenici da određeni rastvarači pokazuju veći afinitet prema PLA nego prema PVA, a drugi prema PVA. Na primer, dobri rezultati se dobijaju u uslovima binarnih organskih rastvarača aceton/etanol u odnosu 6/4 [98]. Takođe izborom samog rastvarača se može uticati na veličinu mikrosfera. Brojna istraživanja su pokazala da se kada se hloroform koristi kao organski rastvarač dobijaju manje čestice nego sa dihlormetanom [84, 99].

Različitom kombinacijom odnosa korastvarača se može uticati na morfologiju čestica. U slučaju malih udela acetona dobijaju se sitne, približno sferne čestice, ali ipak veliki deo polimera ostaje aglomerisan. Viskozitet rastvora aceton-hloroform je veoma mali i može biti jedan od razloga zbog čega se polimer aglomeriše na površini. Moguće je da su kvazi-emulzione kapljice nedovoljno stabilne i da je difuzija acetona suviše brza. Metanol je polarniji rastvarač sa takođe manjim viskozitetom od acetona. Sa malom količinom metanola, dobijaju se sitne sferne čestice, sa manjim aglomeratima u poređenju sa česticama dobijenim sa acetonom. Sa povećanjem količine korastvarača dobijaju se veće čestice sa širom raspedelom veličina. Etanol je manje polaran rastvarač od metanola, ali je viskozitet etanola mnogo veći od viskoziteta metanola i acetona. Etanol se pokazao kao najbolji korastvarač, broj dobijenih čestica je najveći, a čestice su savršeno sferne [103].

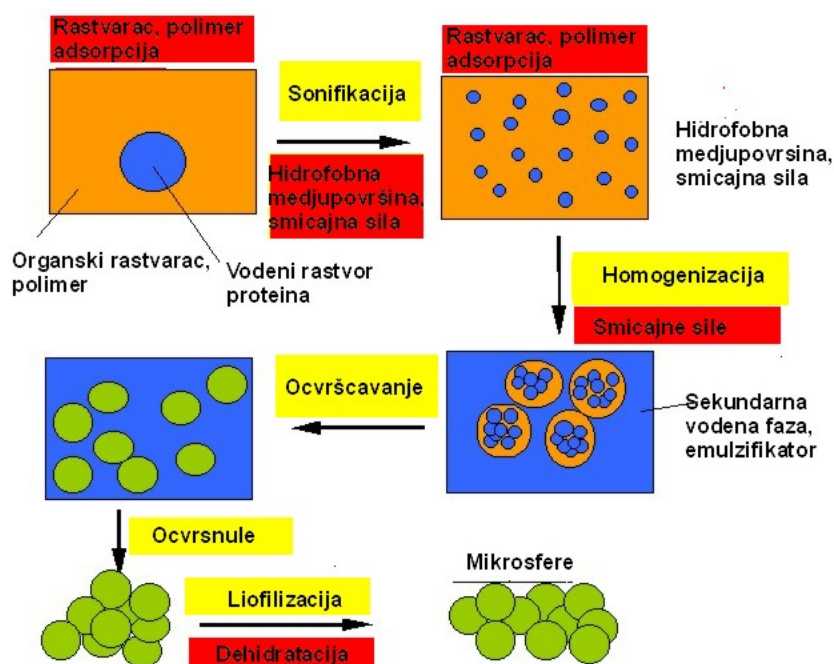
Takođe su rađena ispitivanja u kojima nije korišćen korastvarač i vršeno je poređenje sa sistemima u kojima su kao korastvarači korišćeni metanol, etanol, heksan i heptan. Dobijeni su sledeći rezultati, respektivno: 359 μm, 322 μm, 347 μm, 464 μm i 605 μm. Najmanje čestice su dobijene kada se kao korastvarač koristi metanol [43]. Kompleksnost tehnike pripreme sfera se ogleda u tome što je teško predvideti idealne uslove metode za specifični polimer. Praktično, za svaki sistem polimer-lek se empirijski moraju pronaći optimalni uslovi.

⁷ NRSE-normal rate of solvent evaporation

1.4.3 Inkapsulacija biomakromolekula u polimerne mikrosfere od PLLA i PDLLA

Klinička primena visoko potencijalnih terapijskih peptida i proteina, kao što su agensi protiv kancera, hormoni, antipertenzivni agensi, analgetici, faktori rasta, trombolitici i ostali, je vrlo ograničena zbog brojnih problema povezanih sa fizičkim i hemijskim svojstvima ovih komponenti. Velike molekulske mase i nestabilnost u gastrointestinalnoj (GI) sredini ne dozvoljavaju oralnu primenu konvencionalnih formi peptida i proteina. Iz ovih razloga, efikasan tretman ovim komponentama zahteva čestu parenteralnu administraciju da bi se postigao odgovarajući nivo u serumu tokom dužeg vremenskog perioda [101]. Inkapsulacija biomakromolekula, na primer proteina i vakcina, u polimerne mikrosfere predstavlja veliki izazov. Fizička i hemijska nestabilnost, kao i enzimska degradacija, su najčešći problemi vezani za sisteme bazirane na proteinima. **Hemijska stabilnost** podrazumeva najčešće integritet sekvence amino kiseline (primarne strukture) i reaktivnost sporednih lanaca. Aktivnost peptida zavisi od primarne i mogućih sekundarnih struktura. Proteini poseduju i tercijarnu, a ponekad čak i kvaternernu strukturu koja obezbeđuje proteinskim lancima da se uvijaju i zauzimaju trodimenzionalnu konformaciju. **Fizička stabilnost** se uopšteno definiše kao sposobnost proteina da zadrži makar tercijarnu strukturu, koja je takođe važna za biološku aktivnost. Hemijska degradacija podrazumeva deamidaciju, izomerizaciju, hidrolizu, racemizaciju, oksidaciju, formiranje disulfida i β -eliminaciju. Fizička degradacija podrazumeva reverzibilnu ili ireverzibilnu denaturaciju preko gubitka tercijarne strukture i odmotavanja lanaca sa daljim reakcijama kao što su hemijska degradacija, agregacija i precipitacija. Farmaceutska svojstva terapijskih proteina najviše zavise od održavanja **biološke aktivnosti**. Stabilnost proteina je svakako jedna od najvažnijih karakteristika koja se mora zadržati za uspešno inkorporiranje u biodegradabilne sisteme, kao što su nano- ili mikročestice [102]. Zbog delikatnosti ovih agenasa; bioaktivnost se može izgubiti tokom samog procesiranja mikročestica, i usled adsorpcije ili agregacije otpuštanje agenasa može biti prilično oskudno [24]. Dizajniranje sistema za kontrolisanu dostavu proteina, koje bi omogućilo prevazilaženje ovih problema, predstavlja jedan od najinovativnijih aspekata moderne farmaceutske tehnologije. Biodegradabilne mikrosfere bazirane na poli(L-laktidnoj kiselini) (PLLA) isto kao i na poli(D,L-laktidnoj kiselini) (PDLLA) su postale veoma atraktivni materijal koji se koristi u sistemima za kontrolisanu dostavu peptida, proteina i hormona, najviše zbog svoje kompatibilnosti sa tkivom i adekvatne biodegradabilnosti [35, 36, 50, 66, 81, 103-105]. Najveća prednost ovih sistema se ogleda u njihovoj odličnoj biokompatibilnosti i sposobnosti za produženim otpuštanjem leka tokom vremenskog perioda od nekoliko dana do nekoliko meseci [101]. Priroda organskog rastvarača takođe ima uticaj na stabilnost proteina [102, 103]. Vrlo atraktivni cilj u formulaciji proteina je da se obezbedi otpušanje prirodnog molekula iz dozirane forme, bez prethodne hemijske modifikacije. Ako je protein koji se inkorporira enzim, hemijska modifikacija treba da osigura zadržavanje njegove specifične aktivnosti. Biološka aktivnost proteina može biti nepovratno poremećena čak pri malim promenama pH, temperature, ili jonske koncentracije [17]. Kristalni proteini su obično manje skloni hemijskoj degradaciji od amorfne forme [102]. Glavni predmet istraživanja se ogleda u dizajniranju sistema rastvarača baziranom na

energijama interakcija između rastvarača, polimera i vodene faze proteina, pri čemu se proizvode mikrosfere sa optimalnim karakteristikama, bez narušene aktivnosti, sa visokim stepenom inkapsulacije i malom erozijom iz matrice [36, 81]. Međupovršina između vode i rastvarača je dobro poznat destabilišući faktor. Najčešće, proteini od trenutka kada počnu da migriraju i da se adsorbuju na površni postaju veoma skloni agregaciji [102]. Tipični sistemi, mikro i nanosfere u kojima je inkorporiran protein, se dobijaju procesiranjem biodegradabilnih i biokompatibilnih polimera kao što su PLA i PDLLA, tradicionalnim tehnikama kao što su sušenje raspršivanjem, koacervacija, in situ polimerizacija, emulzifikacija/uparavanje rastvarača itd [66, 93]. Međutim, ove tehnike nisu baš fleksibilne i za njih je karakteristično da krajnji produkti često sadrže velike količine ostataka rastvarača, mali sadržaj proteina, dolazi do degradacije ili denaturacije proteina, javlja se neefikasno otpuštanje proteina i fizičke i morfološke karakteristike nisu odgovarajuće. Tehnike bazirane na superkritičnim i komprimovanim fluidima su se pokazale kao vrlo poželjne za inkorporiranje proteina [81]. Prednosti ovih metoda se ogledaju u odsustvu rastvarača, prihvatljivim tehnološkim i biofarmaceutskim svojstvima, visokoj čistoći i velikoj produktivnosti. Modifikovana precipitaciona metoda [93] je predložena za alternativnu metodu koja bi se koristila za efikasno inkorporiranje aktivnih supstanci na bazi proteina u mikrosfere PDLLA. Na slici 1.25 dat je šematski prikaz dobijanja mikrosfera u kojima je inkorporiran protein.



Slika 1.25 Šematski prikaz dobijanja mikrosfera u kojima je inkorporiran protein [106]

Otpuštanje proteina iz biodegradabilnih mikrosfera predstavlja kompleksan proces, koji se sastoji od: (1) otpuštanja proteina lociranog blizu površine čestice (initial burst), (2) difuzije kroz makropore ili samu polimernu fazu (bulk release), i (3) otpuštanja koje se odvija sa najvećim

kašnjenjem usled degradacije polimerne matrice (surface release) [50, 57]. Ako je koncentracija proteina blizu površine mikrosfera velika, zapreminsko otpuštanje će biti više izraženo. Tokom procesiranja mikrosfera, kada se javljaju jake interakcije između rastvarača polimera i proteina, sam rastvarač tokom isparavanja usmerava protein ka površini tako da se blizu površine mikrosfera može očekivati visoka koncentracija proteina. Biodegradabilne mikrosfere se najčešće koriste za kontrolisano otpuštanje proteina u periodu od nekoliko nedelja ili meseci, pri čemu se zapreminsko otpuštanje mora kontrolisati i ako je moguće sprečiti [35, 36, 38].

Do sada su proučavani mnogi sistemi za dostavu proteina bazirani na PLA, pri čemu se posebna pažnja posvećuje pripremi mikrosfera, stabilnosti proteina, i karakteristikama otpuštanja [37, 81, 101, 105-108]. Proučavani model proteini podrazumevaju bovin serum albumin, insulin, lizozim, transferin, glukoznu oksidazu i tripsin [81, 107-78]. Različiti peptidi, uključujući insulin, su takođe uspešno inkorporirani i otpušteni iz PLA mikrosfera [73]. Sistemi za kontrolisano otpuštanje antigena imaju veliki potencijal kao vakcine [73]. U novije vreme prezentovane su brojne studije vezane za kontrolisano otpuštanje DNK [35, 110] i faktora rasta [13, 93]. Mnogi autori su uspeali da inkorporiraju različite molekule DNK u mikrosfere PDLLA ali mala efikasnost inkapsulacije, gubitak integriteta i aktivnosti DNK i dalje predstavljaju probleme koji u ovim sistemima treba da se reše [41, 77, 110].

Sistemi sa kontrolisanim otpuštanjem su vrlo interesantni za tretman kancera gde se zahteva veća efikasnost tretmana na specifičnom mestu, i redukovanje negativnih sporednih efekata [22, 33]. Citostatici se mogu uspešno inkorporirati u mikrosfere PDLLA i njihova efektivna koncentracija se može održavati tokom produženog vremenskog perioda [59]. Polimerne sfere na bazi PDLLA se uspešno primenjuju za lečenje kancera prostate i endometrioze [101]. Protein C, inhibitor plazme, koji reguliše mehanizam koagulacije krvi modulišući antikoagulativnu reakciju je uspešno inkorporiran u sferama PDLLA [59]. U tabeli 1.6 su navedeni proteini koji su do sada inkorporirani u sferama bioresorbilnih polimera.

Tabela 1.6 Proteini koji su inkorporirani u sferama biodegradabilnih polimera [102]

Familija proteina	Protein	Terapeutska klasa
Antigeni	Difterija toksoid	Vakcina
	E. Koli enterotoksin B subjedinica	Vakcina
	Hepatitis B jezgro Ag	Vakcina
	Stafilokokni enterotoksin	Vakcina
	B-toksoid	
Enzimi	Tetanus toksoid	Vakcina
	Asparaginaza	Antitumorni agent
	Ugljenični anhidrat	Model protein
	Himotripsin	Proteolitički enzim
	Glukoza oksidaza	Model protein
	Heparinaza	Model protein
	Peroksidaza iz rena	Model protein
Lizozomi	Antiviralni agent	
Hormoni	Protein C	Antikoagulativni agent
	Superoksidna dizmutaza	Model protein
	Tripsin	Proteolitički enzim
	Ureaza	Model protein
	Kalcitonin	Regulator kalcijuma
	Hormon rasta	Faktor rasta
	Paratiroidni hormon	Regulator kalcijuma
	Insulin	Hipogliceminski hormon
	Leuprolid	LHRH analog
	Nafarelin	LHRH analog
Orntid	LHRH analog	
Citokini	Tetrakosaktid	Kortikotropni hormon
	Eritroprotein	Regulator proliferacije crvenih krvnih zrnaca i diferencijacije
Ostali proteini	Faktor rasta-I u obliku insulina	Promoter osteogeneze
	Interleukin	Citokinin, antitumorni agent
	Interferon	Citokinin, antitumorni agent
	Faktor nekroze tumora	Antitumorni agent
	Faktor rasta vaskularnog endotela	Citokinin
	Albumini	Model protein
	Faktor rasta nerava	Neurotrofični faktor

2. Cilj istraživanja

Zbog svojih atraktivnih svojstava mikrosfere biodegradabilnih polimera poli-L-laktida i poli-D,L-laktida su našle veliku primenu u mikroinkapsulaciji lekova i antigena. U tradicionalnim terapijama, koncentracija, trajanje i biološka aktivnost farmaceutskih agenasa se ne mogu kontrolisati. Kako bi se izbegli ovi problemi osmišljena je tehnologija kontrolisanog otpuštanja aktivne supstance. Ideja je bila da se terapijska koncentracija leka u telu održava tokom produženog vremenskog perioda, otpuštanjem agensa na predvidljiv i kontrolisan način. Inkapsulacija je potvrđena kao efektivan način za kontrolisanu dostavu različitih aktivnih supstanci. Dokazano je da efikasnost inkapsulacije i kinetika otpuštanja aktivnih supstanci zavise od veličine sintetisanih mikrosfera. U skladu sa ovim trendom, pokušali smo da na novi način dobijemo submikronske sfere od poli-L-laktida i poli-D,L-laktida bez i sa inkorporiranim proteinom. Kontrolisanjem veličine sfera, brzine degradacije kompozita i kretanja bioaktivnog materijala iz kompozitne čestice mogu se kontrolisati vreme dostave bioaktivnog materijala, kao i njegova brzina i mehanizam dejstva.

Polimerne čestice od poli-L-laktida i poli-D,L-laktida (u daljem tekstu PLLA i PDLLA) su dosta ispitivane kao deo kompozitnih biomaterijala. Kompozitni biomaterijali se sastoje od dve jasno definisane faze, čiji sastojci mogu biti organski ili neorganski. Organski deo (PLLA) može sadržati medikamente koji se vremenom otpuštaju i stimulišu okolno tkivo koje se regeneriše. Polimerni deo kompozita vremenom degradira oslobađajući komponente koje su kompatibilne sa tkivom i nisu toksične za ćelije. Kompozitni materijali mogu da se formiraju i od dve polimerne (organske) komponente, od kojih je jedna nosač, dok druga može poslužiti za modifikovanje procesa u tkivima, odnosno ćelijama. PLLA i PDLLA su dobri kandidati za polimerni - osnovni deo kompozitnih biomaterijala s obzirom na svojstva koja poseduju. Polimeri bazirani na PLA (PLLA i PDLLA) imaju duži period degradacije (12-24 meseci) od polimera baziranih na PLGA (1-6 meseci u zavisnosti od odnosa laktida i glikolida), što ih čini poželjnijim za inkapsulaciju aktivnih supstanci kao što su proteini, čije je dejstvo neophodno održati tokom dužeg vremenskog perioda. Najvažnije, ovi polimeri su biodegradabilni i prilikom degradacije u organizmu se razlažu na produkte čijim se metabolizmom dobijaju voda i ugljen dioksid, koji nisu toksični za organizam.

Degradacija polimera na bazi laktida i generalno svih hidrolitički degradabilnih polimera najviše zavisi od sledećih faktora:

- Hemijskog sastava
- Kristaliničnosti
- Hidrofilnosti

Samim tim, prilikom ugradnje kompozita koji imaju ovu polimernu osnovu, ponovna intervencija u cilju njihovog uklanjanja nije neophodna. Polilaktidi su hidrofobniji polimeri u poređenju sa PLGA i za degradaciju je potrebno duže vreme. PDLLA, koji je polimer D- i L-laktida degradira brže od L-homopolimera, pretpostavlja se zbog manje kristaliničnosti.

U skladu s gore navedenim, cilj ovog magistarskog rada je ispitivanje primenljivosti modifikovane precipitacione metode, kojom su u našoj laboratoriji uspešno dobijene sferne čestice PLGA u kojima su inkapsulirane askorbinska, odnosno folna kiselina, za dobijanje čestica PLLA i PDLLA kao i kompozita od PDLLA i proteina (BSA ili HRP) u obliku mikro- i nano-čestica.

Pojedinačni zadaci u okviru izrade ove magistarske teze su bili:

1. Ispitati primenljivost modifikovane precipitacione metode za dobijanje mikro- i nano- čestica od PLLA i PDLLA;
2. Modifikovati metodu u skladu sa ostalim ciljevima rada s obzirom na a) štetnost rastvarača koji se koristi u proceduri i b) toksičnost korastvarača, c) brzinu homogenizacije čestica, kao i d) koncentraciju stabilizatora koji se koristi za dobijanje čestica od PDLLA modifikovanom precipitacionom metodom;
3. Ispitati morfološke karakteristike i opseg veličina tako dobijenih čestica sa polimernom matricom od PLLA i PDLLA;
4. Ispitati primenljivost metode za dobijanje kompozitnih materijala sa polimernom matricom od PDLLA i bioaktivnom supstancom, goveđim albuminom (BSA) i peroksidazom (HRP), kao drugom fazom.
5. Tako dobijene čestice kompozita okarakterisati, tj. ispitati njihovu morfologiju i veličinu. Za karakterizaciju dobijenih prahova smo koristili sledeće metode: rendgenostrukturnu analizu, infracrvenu spektroskopiju, diferencijalno skenirajuću kalorimetriju, elektroforezu, skenirajuću elektronsku mikroskopiju, spektrofotometriju i stereološku analizu.

3. Eksperimentalni deo i metode karakterizacije

3.1 Eksperimentalni rad

Metoda koja je korišćena za dobijanje mikrosfera od bioresorbilnih polimera PLLA i PDLLA bez i sa inkorporiranom aktivnom supstancom (proteinom BSA i HRP) je modifikovana precipitaciona metoda. Komercijalne granule od poli-L-laktid-a i poli-D,L-laktid-a, molekulske mase oko 100 000 g/mol i 50 000 g/mol, respektivno, su dobijene iz kompanije Sigma (SIGMA-Aldrich, Germany). Goveđi albumin (BSA) i peroksidaza (HRP) su korišćeni kao model proteini za mikroinkapsulaciju. Protein peroksidaza (HRP) je izolovana iz rena. Molekulske mase proteina BSA i HRP su 65 kDa i 45 kDa, respektivno. Polivinil alkohol (PVA) (Merck-ALKALOID, Skopje, Bivša jugoslovenska republika Makedonija), sa 98% stepenom hidrolize, je korišćen kao stabilišući agens-surfaktant. Surfaktant ima ulogu hemijske barijere i sprečava aglomeraciju kompozitnih čestica. Organski rastvarači su hloroform (Lachema, Republika Češka), toluol, metanol i etanol (Superlab, Srbija). Svi reagensi su dobijeni u čistom obliku u kom su i korišćeni. Glavna prednost ove metode je što ne zahteva visoke temperature i, samim tim, može se primenjivati za inkapsulaciju temperaturno osetljivih bioaktivnih supstanci, kao što su proteini. PLLA i PLDLA su izuzetno osetljivi na vlagu i visoke temperature.

Proteini i peptidi se intenzivno proučavaju zbog svojih terapijskih aplikacija. Mnoga dosadašnja inženjerska istraživanja su fokusirana na upotrebu faktora rasta za stimulaciju ćelijske aktivnosti *in vivo*, kao i za regulisanje regeneracije tkiva. Lekovi bazirani na proteinima i peptidima obično imaju kratak polu život u plazmi. Kompozitne čestice koje se sastoje od polimernih nosača i proteina ili peptida, kao što su mikrosfere i nanosfere, predstavljaju efektivne sisteme koji se koriste za kontrolisan profil otpuštanja inkorporiranih bioaktivnih agenasa štiteći ih od degradacije sa ciljem postizanja visoke administrativne efikasnosti. Vreme njihove degradacije zavisi najviše od hemijske strukture polimernog lanca i veličine mikrosfera. Goveđi albumin (BSA), koji je u našim eksperimentima korišćen kao model protein, je enzim koji se izoluje iz goveđe krvi, vrlo je stabilan i postojan je pod vrlo agresivnim uslovima procesiranja mikrosfera. Peroksidaza (HRP) izolovana iz rena je enzim koji nije skup, a u ovom istraživanju je izabran kao model protein jer je vrlo osetljiv na rastvarače i povišene temperature. Ako proteini kao što je HRP mogu biti inkorporirani u sferama bioresorbilnog polimera PDLLA bez gubitka aktivnosti, postojala bi mogućnost da se istom metodom dobiju novi kompoziti u kojima bi mogli da se inkorporiraju i ostali proteini kao što su faktori rasta, interferoni, insulin itd.

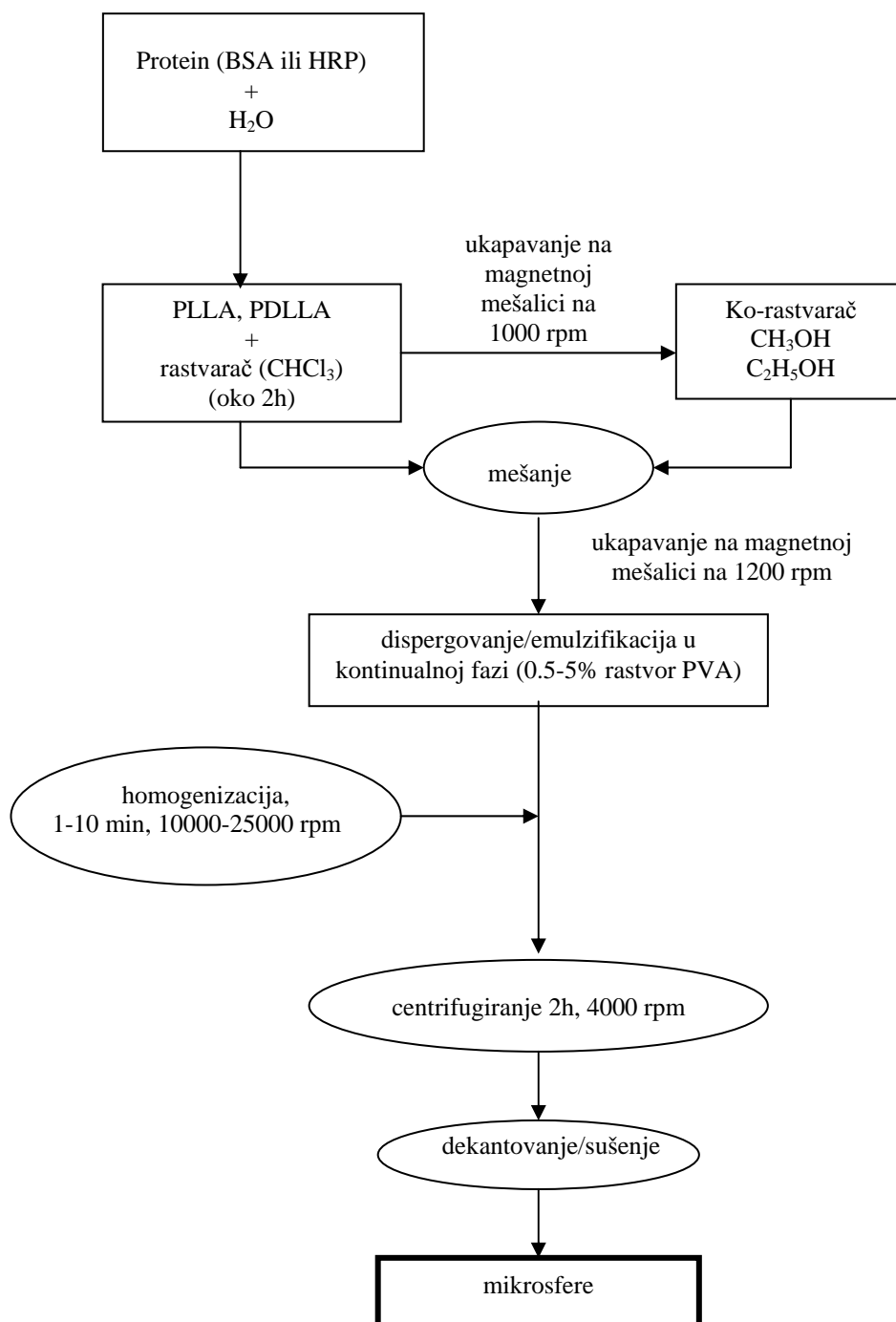
U ovim istraživanjima rađeno je procesiranje submikronskih sfera PLLA i PDLLA sa što uniformnijom raspodelom veličina u kojima je efikasno inkapsuliran protein (BSA i HRP). Ispitivani su različiti parametri procesa sa ciljem optimizacije razrađene metode dobijanja.

3.1.1 Eksperimentalni postupak

Mikrosfere su dobijene na sledeći način: 40 mg komercijalnih granula PLLA ili PDLLA je rastvoreno u hloroformu i vršena je precipitacija dobijenog rastvora u etanolu ili metanolu. Ova disperzija je ukapavana u 20-30 ml vodenog rastvora PVA koncentracije 0.5-5 wt % uz neprestano mešanje pomoću magnetne mešalice na 1200 rpm. Rezultujuća smeša je zatim mešana na 10 000-21 000 rpm pomoću homogenizatora (Ultra-Turrax T25, IKA, Nemačka). Rastvor je, zatim, centrifugiran dva sata na 4000 rpm (CENTRIKA, Ependorf), supernatant uklonjen, a mikročestice su ostavljene da se suše nekoliko dana u vakuum sušnici na sobnoj temperaturi. Šematski prikaz ove procedure je dat na slici 3.1.

Mikrosfere kompozita PDLLA i proteina (BSA ili HRP) su dobijene istom metodom. Protein je neposredno pre inkorporiranja rastvoren u vodi i postepeno dodat u rastvor polimera. Ostali koraci su identični koracima u postupku dobijanja polimernih sfera bez aktivne supstance.

Promenljivi parametri procesa su: ko-rastvarač (metanol ili etanol), koncentracije surfaktanta, odnos hloroform-voda kao i brzina i vreme homogenizacije. Uloga ko-rastvarača je da asistira u formiranju homogene disperzije sastavljene od vodenog rastvora proteina i polimera rastvorenog u hloroformu. Na površini, ko-rastvarač koji ne poseduje nikakav afinitet prema polimeru prvi difunduje iz polimernih kvazi-emulzionih kapljica. Hloroform sa velikim afinitetom prema polimeru difunduje kasnije iz smanjenih kapljica i, u isto vreme, počinje precipitacija polimera na površini. Ova dva koraka u difuzionom procesu, koji posebno zavise od svojstava rastvarača i interakcija između rastvarača i polimera, imaju bitnu ulogu u uspešnom formiranju mikrosfera. U samom procesu surfaktant (PVA) ima ulogu hemijske barijere koja štiti kompozitne čestice od aglomeracije [43]. Među promenljivim parametrima procesa, brzina i vreme homogenizacije su bili bitni faktori koji utiču na dobijanje malih i uniformnih mikročestica. Takođe, brzina homogenizacije dosta utiče na efikasnost inkapsulacije aktivne supstance. Sa ciljem ispitivanja uticaja koncentracije PVA na svojstva mikročestica, pripremljene su pojedine serije sa vodenom fazom koja sadrži različite koncentracije PVA. Koncentracija PVA u vodenoj fazi predstavlja ključni faktor u formiranju pravilnih mikrosfera sa glatkim površinama. Svi parametri procesa su navedeni u tabelama 3.1-3.4.



Slika 3.1 Šematski prikaz procesa dobijanja mikrosfera PLLA i PDLLA bez i sa proteinom (BSA i HRP)

Tabela 3.1 Parametri procesa za precipitacionu metodu dobijanja mikrosfera PLLA

Serijski No.	Ko-rastvarač	Hloroform (ml)	Ko-rastvarač (ml)	PVA, % w/v	Odnos hloroform/voda
1.	MeOH	1.5	3	0.5	1:20
2.	MeOH	1.5	3	1	1:20
3.	EtOH	1.5	3	0.5	1:20
4.	EtOH	1.5	3	1	1:20

Tabela 3.2 Parametri procesa za precipitacionu metodu dobijanja mikrosfera PDLLA

Serijski No.	Ko-rastvarač	Hloroform (ml)	Ko-rastvarač (ml)	PVA (1.0% v/w), (ml)	Brzina homogenizacije (rpm)	Odnos hloroform/voda
1.	EtOH	1.5	3	30	1 min, 10 000	1:20
2.	EtOH	1.5	3	30	1 min, 21 000	1:20
3.	EtOH	1.5	3	20	10 min, 10 000	1:13.33
4.	EtOH	1.5	3	20	10 min, 21 000	1:13.33
5.	MeOH	1.5	3	20	1 min, 10 000	1:13.33
6.	MeOH	1.5	3	20	1 min, 21 000	1:13.33
7.	MeOH	1.5	2.5	20	10 min, 10 000	1:13.33
8.	MeOH	1.5	2.5	20	10 min, 21 000	1:13.33
9.	MeOH	6x1.5	6x3.5	20	-	1:2.22
10.	MeOH	6x1.5	6x3.5	20 ⁸	-	1:2.22

Tabela 3.3 Parametri procesa za precipitacionu metodu dobijanja kompozitnih mikrosfera PDLLA+BSA

Serijski No.	Protein u 1 ml H ₂ O	Ko-rastvarač	PVA	Brzina homogenizacije (rpm)	Odnos hloroform/voda
1.	4 mg BSA	EtOH	30 ml 1% w/v	10 min, 21 000	1:20
2.	4 mg BSA	EtOH	20 ml 5% w/v	10 min, 21 000	1:13.33
3.	4 mg BSA	MeOH	20 ml 5% w/v	10 min, 21 000	1:13.33
4.		EtOH	30 ml 1% w/v + 4 mg BSA	10 min, 21 000	1:20

Tabela 3.4 Parametri procesa za precipitacionu metodu dobijanja kompozitnih mikrosfera PDLLA+HRP

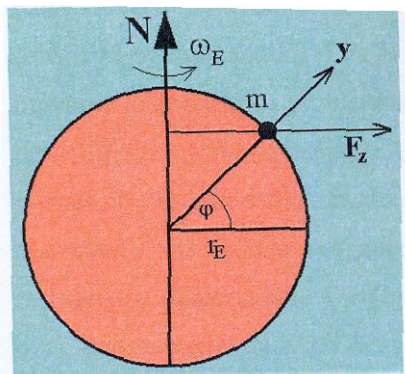
Serijski No.	Protein u 1 ml H ₂ O	Ko-rastvarač	PVA	Brzina homogenizacije (rpm)	Odnos hloroform/voda
1.	2 mg HRP	EtOH	30 ml 1% w/v	10 min, 21 000	1:20
2.	2 mg HRP	(rastvarač toluol) EtOH	30 ml 1% w/v	10 min, 21 000	1:20
3.	2 mg HRP	MeOH	20 ml 5% w/v	10 min, 21 000	1:13.33
4.	2 mg HRP	EtOH	20 ml 5% w/v	10 min, 21 000	1:13.33
⁹ 5.	2 mg HRP	EtOH	20 ml 5% w/v	10 min, 21 000	1:13.33

⁸ (5.0% w/v PVA)⁹Eksperiment 5. je rađen pod istim uslovima kao eksperiment 4., sa razlikom što je u eksperimentu 5. ukapavanje disperzije u rastvor PVA vršeno uz korišćenje homogenizatora (nije korišćena magnetna mešalica)

3.2 Eksperimentalne metode

3.2.1 Metoda centrifugalnog procesiranja

Centrifugalno procesiranje je metoda kojom se vrši razdvajanje i analiza ćelija, organela i bioloških makromolekula. Čestica se kreće u krugu poluprečnika r ugaonom brzinom ω pod uticajem centrifugalnog polja $\omega^2 r$. Centrifugalna sila F_c , koja deluje na ovu česticu jednaka je proizvodu efektivne mase čestice m i centrifugalnog polja: $F_c = m\omega^2 r = m(1 - k\rho)\omega^2 r$. Efektivna masa je manja od stvarne mase jer istisnuta tečnost stvara suprotnu silu. Faktor uzgona je jednak $(1 - k\rho)$, gde je k parcijalni volumen čestice, a ρ gustina tečnosti u kojoj se čestica nalazi. Čestica se u polju kreće konstantnom brzinom v , koja je proporcionalna centrifugalnoj sili, pri čemu je f koeficijent trenja čestice: $v = F_c / f$. Brzina taloženja, tj. brzina sedimentacije čestica zavisi od nekoliko faktora: a) mase čestice-teže čestice se uvek talože brže nego lakše čestice istog oblika i gustine, b) oblika čestice-koeficijent trenja kompaktne čestice je manji od koeficijenta trenja izdužene čestice iste mase, c) gustine čestice-gušće čestice se kreću mnogo brže od čestica manje gustine i d) gustine rastvora u kojem se čestice nalaze-čestica tone kada je $k\rho < 1$, pluta kada je $k\rho > 1$ i ne pomera se kada je $k\rho = 1$. Na slici 3.2 prikazan je uticaj centrifugalne sile na sferičnu česticu [1].



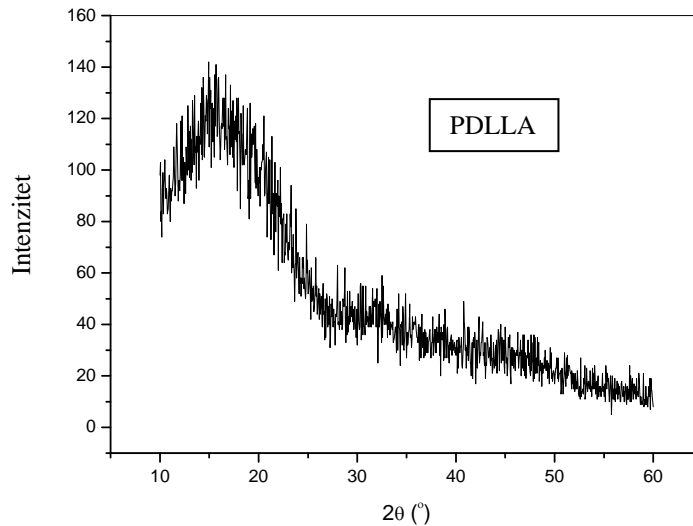
Slika 3.2 Uticaj centrifugalne sile na formiranje sferne čestice [1]

3.2.2 Rendgenostrukturalna analiza

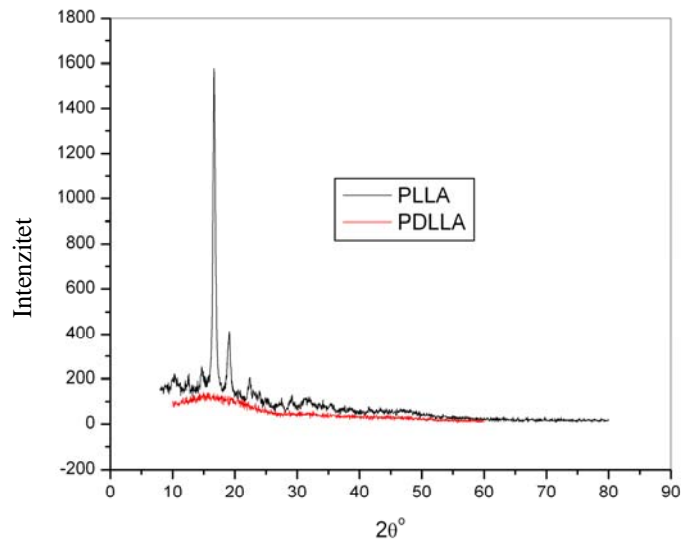
Za identifikaciju faza prahova polimera PLLA i PDLLA korišćena je rendgenostrukturalna analiza praha. Uzorci su izloženi rendgenskim zracima koji se detektuju nakon interakcije sa fazom uzorka. Dobijeni impulsi se pojačavaju, a posle prolaska kroz analizator i filter beleže. Dijagrami pokazuju intenzitet u zavisnosti od ugla (2θ), a vrednosti za međuravanska rastojanja se mogu izračunati iz Braggove jednačine ($n\lambda = 2d\sin\theta$).

Mehaničke osobine i hemijska stabilnost polimera dosta zavise od kristalne strukture i morfologije [111, 112]. U našim eksperimentima, fazna analiza prahova PLLA i PDLLA je izvršena

rendgenskom difrakcijom (XRD). XRD merenja su izvršena pomoću X-ray difraktometra za prah (Bruker D8 Advance). XRD eksperimenti su izvedeni u simetričnom refleksionom modu sa Cu $K\alpha$ radijacijom (1.5418 Å) pomoću gradijenta iskrivljenog Göbel ogledala sa višeslojnom optikom. Opseg 2θ je od 10° - 30° sa korakom od 0.05° i vremenom merenja od 6 s po koraku. Difraktogram praha PDLLA koji je korišćen u našim eksperimentima je prikazan na slici 3.3. Sa difraktograma se može videti da je PDLLA amorfan polimer sa najistaknutijim pikom na 15° . Na slici 3.4 je dat uporedni prikaz difraktograma semi-kristalnog PLLA [11] i amorfnog PDLLA [11].



Slika 3.3 Difraktogram praha PDLLA



Slika 3.4 Uporedni prikaz difraktograma prahova PLLA i PDLLA

3.2.3 Infracrvena spektroskopija

Infracrveni (IR) spektri sadrže informacije o vibracijama atoma u molekulu. Svaki molekul poseduje specifičan spektar IR oblasti i primenom IR spektroskopije može se izvršiti identifikacija jedinjenja (deo od 4000 do 600 cm^{-1} se naziva oblast otisaka prstiju za hemijska jedinjenja). Ova metoda može da se koristi i za kvantitativnu i za kvalitativnu analizu. Vibracioni spektri sadrže podatke o strukturi molekula (kristala), globalnoj geometriji i detalje o načinu vezivanja atoma u molekulu. Na osnovu vibracionih spektara se mogu dobiti podaci o mehanizmu odvijanja procesa, faznim transformacijama, dinamici protona i protonskih vrsta u različitim materijalima, termodinamičkim veličinama itd [1]. Analiziranje uzoraka prahova PDLLA rađeno je infracrvenom spektroskopijom pomoću uređaja Perkin-Elmer 983G Infracrvenog spektrofotometra, korišćenjem KBr tehnike (fino spraseni KBr i fino spraseni uzorak), u intervalu od 250-4000 cm^{-1} . U našim eksperimentima, metoda infracrvene spektroskopije korišćena je za kvalitativnu analizu prahova polimera PDLLA. Identifikacijom faza korišćenjem IR dijagrama (poglavlje 4.2.1 slika 4.11) može se ustanoviti prisustvo karakterističnih traka polimera PDLLA [36, 67]. U tabeli 3.5 su prikazani IR spektri prahova PDLLA koji su dobijeni sa metanolom kao ko-rastvaračem. Identifikacija traka koje se mogu primetiti u IR spektru praha PDLLA dobijenim sa metanolom kao ko-rastvaračem (poglavlje 4.2.1 slika 4.11), je sumarno predstavljena u tabeli 3.5 [112].

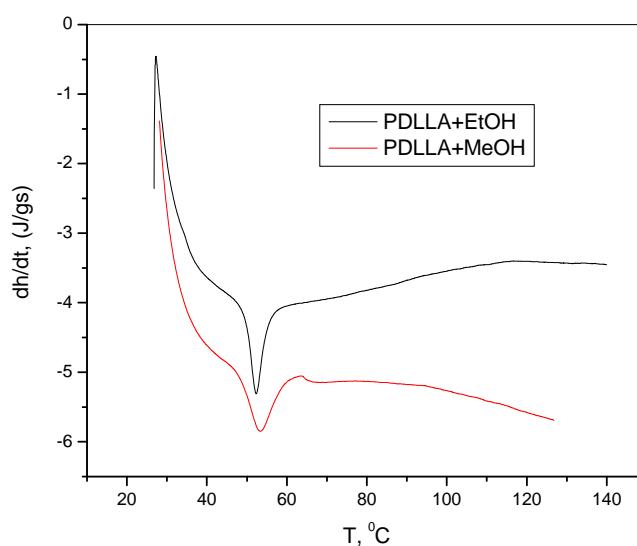
Tabela 3.5 IR spektri prahova PDLLA dobijenih sa metanolom kao ko-rastvaračem

Grupa	Traka na talasnom broju, cm^{-1}
CH veza	2998, 2941, 2867, 2848
C=O veza	1751
CH veza CH_3 grupe	1461, 1381, 1361
C-O veza	1271, 1191, 1082, 1132, 1042
CH veza	953, 862, 753
OH grupa molekula vode	3500

3.2.4 Diferencijalna skanirajuća kalorimetrija

Diferencijalnom skanirajućom kalorimetrijom (DSC) se na osnovu razlike toplotnog fluksa ka uzorku i ka etalonu prilikom njihovog istovremenog zagrevanja ispituju termijske osobine supstanci. Metoda DSC je odgovarajuća za kvantitativna određivanja promene entalpije. Kada u uzorku počne proces praćen promenom entalpije pojavljuje se temperaturska razlika između uzorka i etalona koja izaziva pojavu EMS između dva izvoda od hromela. Zaostajanje temperature uzorka u odnosu na etalon (zbog endotermnog procesa) pojačava fluks toplote ka uzorku, a prednjačenje (zbog egzotermnog procesa) ga smanjuje. Temperaturska razlika između uzorka i etalona prikazuje se sa jedinicama toplotnog fluksa dQ/dT u funkciji temperature. Promene toplotnog kapaciteta u toku

zagrevanja odražavaju se otklonom od bazne linije, a egzotermni i endotermni procesi kao pikovi na odgovarajuću stranu od bazne linije. Površina pika DSC krive direktno je srazmerna odgovarajućoj promeni entalpije [1]. DSC merenja prahova PDLLA izvršena su na Perkin Elmer Model DSC-2 diferencijalnom skanirajućem kalorimetru opremljenim sa sistemom za dobijanje podataka. Toplotni kapacitet je meren u mcal/s (koje su kasnije pretvorene u J/s ($1\text{mcal}=0.0041398\text{ J}$)), a temperatura je merena u °C. Opseg temperature u kome je vršeno merenje je iznosio 20°C-140°C. Brzina grejanja je iznosila 10°C/min. Na slici 3.5 prikazani su DSC dijagrami prahova PDLLA [111] koji su dobijeni sa metanolom ili etanolom kao ko-rastvaračem. Kada se kao ko-rastvarač koristi etanol, dobija se difraktogram sa oštrijim pikom, tj. većom kristaliničnošću. U slučaju metanola kao ko-rastvarača, difraktogram pokazuje širi pik, tj. manju kristaliničnost.



Slika 3.5 DSC dijagrami prahova PDLLA dobijenih sa metanolom ili etanolom kao ko-rastvaračem

3.2.5 Elektroforeza- Natrijum dodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeza (SDS PAGE)

Elektroforeza je kretanje jona u električnom polju. Pokretljivost obezbeđuje puffer, a nosač može da bude tečnost (slobodna elektroforeza) ili neki čvrsti nosač (zonska elektroforeza). Na čvrstim nosačima, pokretljivost je definisana kako odnosom *naelektrisanje/masa*, tako i različitim stepenom hidratacije različitih jona, različitim interakcijama proteina i matriksa i sl. Elektroforeza se danas koristi pre svega za proveravanje homogenosti proteina (SDS PAGE i IEF) ili za određivanje molekulske mase (SDS PAGE) ili za određivanje pI vrednosti proteina (IEF) [113].

Natrijum dodecilsulfat (SDS) $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{OSO}_3\text{Na}$ je anjonski deterdžent koji efikasno denaturiše proteine, rušeći njihovu trodimenzionalnu strukturu. Molekuli SDS-a se vezuju za subjedinice proteina svojim hidrofobnim repom. Negativno naelektrisanje SDS-a uslovljava njihovo međusobno odbijanje, tako da se protein relativno lako odvija, odnosno denaturiše. U proseku se na svake dve aminokiseline vezuje približno jedan molekul SDS-a. Vezivanje SDS-a uslovljava

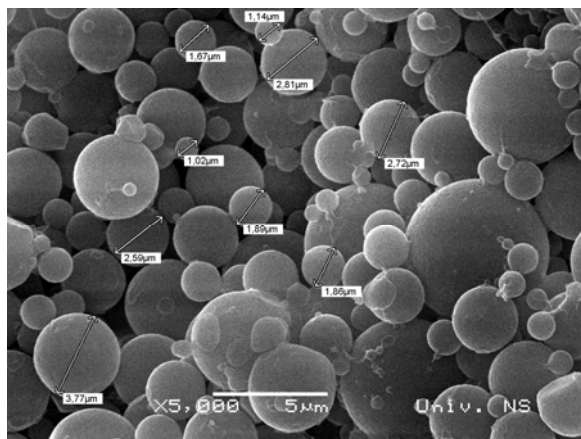
razdvajanje proteina od ostalih agregata ili od lipida. Kovalentne S-S veze između različitih lanaca se kidaju dodatkom redukcionog sredstva (β -merkaptoetanol ili ditioneitol).

U toku elektroforeze, smeša ovih kompleksa se kreće kroz poliakrilamidni gel. Svi proteini su pokriveni molekulima SDS-a, tako da su svi jako negativno naelektrisani, zbog čega se svi "kompleksi" kreću ka pozitivnoj elektrodi. Manji molekuli se kreću brže (manji otpor sredine) kroz gel i, za isto vreme, pređu duži put od većih molekula. Na kraju elektroforeze proteini su razdvojeni u diskretne trake po opadajućoj masi (veličini molekula), od mesta nanošenja do kraja gela. Pokretljivost se izražava preko R_f vrednosti.

Bojenjem organskim bojama ili srebrom omogućava se da se po pojedinačnoj traci proteina detektuje od 0.5 μ g do 0.5 ng proteina. Lakoća rada, efikasnost i osetljivost čine ovu metodu najosetljivijom i najčešće korišćenom u analizi složenih proteinskih smeša.

3.2.6 Skenirajuća elektronska mikroskopija

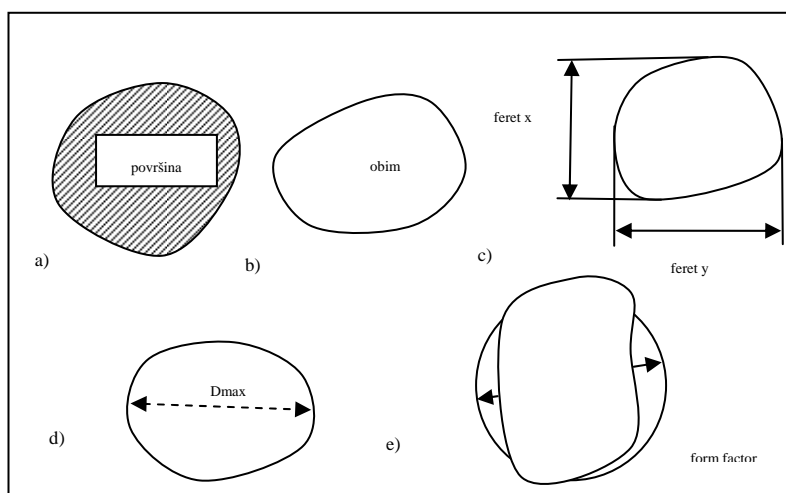
Veličina i oblik čestica prahova PLLA i PDLLA (bez i sa inkorporiranim proteinom) određivani su skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Elektronski mikroskop služi za dobijanje uvećane slike objekta difrakcijom visoko energetskih elektrona, a istovremeno predstavlja metodu koja se koristi za ispitivanje topografije površina čvrstih, neisparljivih materijala, direktnim posmatranjem ili proučavanjem fotografski snimljenih objekata. Uzorci za SEM moraju biti neisparljivi, da bi se unutar mikroskopa mogao održati visoki vakuum. Uzorci moraju biti elektroprovodni, jer se uzorci koji nemaju provodljivost sa upadnim snopom elektrona statički naelektrišu, zbog čega elektronski snop "beži" sa mesta koje se posmatra, što onemogućuje posmatranje. Za karakterizaciju uzoraka PLLA i PDLLA (bez i sa inkorporiranim proteinom) korišćen je elektronski mikroskop marke JEOL-JSM-6460LV (Japan), sa energijom elektrona od 10 do 50 KeV-a. Uzorci su naparavani zlatom pomoću uređaja za naparavanje 3 Δ L-TEC SCD005, pomoću struje od 30 mA sa udaljenosti od 50 mm tokom 180 s. Karakteristična SEM fotografija mikrosfera PDLLA bez inkorporiranog proteina je prikazana na slici 3.6. Sa SEM fotografija prahova PLLA i PDLLA (bez i sa inkorporiranim proteinom) određivane su površinska morfologija i veličina čestica.



Slika 3.6 SEM fotografija praha PDLLA bez proteina

3.2.7 Stereološka analiza

Slike dobijene skenirajućom elektronskom mikroskopijom korišćene su za određivanje distribucije veličina čestica, kao i ostalih parametara koji određuju veličinu i oblik čestice, metodom merenja površina korišćenjem poluautomatskog analizatora slike (semi-automatic image analyzer Leica Q500 MC sa Qwin softverom). Merena je površina projekcije preseka čestice po maksimalnom prečniku. Sa SEM fotografija analizirane su čestice (200 do 300 čestica po fotografiji), a zatim su određivani parametri koji karakterišu veličinu (poprečni presek- A_a , obim- L_p , maksimalni dijametar čestice- D_{max} , feret x-projeksija čestice na x osu i feret y-projeksija čestice na y osu), oblik čestica (faktor oblika- f_L) i izveden je odnos obima i površine (L_p/A_A) koji ukazuje na uniformnost čestica. Grafički prikaz pojedinih stereoloških parametara je dat na slici 3.7. Za sve izmerene parametre određene su minimalna, maksimalna i srednja vrednost.

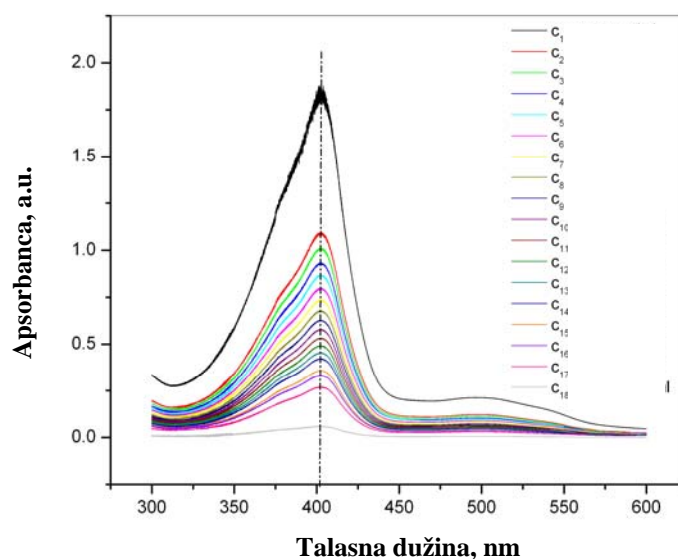


Slika 3.7 Grafički prikaz pojedinih stereoloških parametara: a) površina ekvatorijalnog preseka, b) obim, c) feret x i feret y, d) maksimalni dijametar čestice, e) faktor oblika [1]

3.2.8 UV-VIS spektrofotometrija

Za kvantitativnu analizu uzoraka u kojima je inkorporiran protein HRP korišćena je spektrofotometrijska metoda. Na osnovu rezultata dobijenih indirektnom metodom, merenjem koncentracije HRP u supernatantu, određena je efikasnost inkapsulacije. Sva hemijska jedinjenja apsorbuju energiju ili svetlost u najmanje jednoj oblasti spektra elektromagnetnog zračenja. Energija na kojoj se apsorpcija dešava zavisi od dostupnih elektronskih, vibracionih ili rotacionih nivoa energije u molekulu. Kada apsorpcija potiče od spektra u UV-VIS oblasti, prelaz se dešava između energetske nivoa elektrona u molekulu. UV-VIS spektrofotometrija je fizičko-hemijska metoda koja se koristi za kvalitativnu ili kvantitativnu analizu uzoraka, određivanje kinetike kao i za određivanje optičkih svojstava materijala. Kvalitativna analiza podrazumeva identifikaciju čiste komponente, detektovanje prisustva ili odsustva pojedinačnih molekula u rastvoru ili identifikaciju pojedinačnih funkcionalnih grupa (kao što su karbonilna, aromatična ili nitro), aktivnih u UV-VIS oblasti (200-400 nm ili 400-800 nm). Kvantitativna analiza podrazumeva određivanje količine (koncentracije) molekula u rastvoru. Metode koje se koriste za kvantitativnu analizu su bazirane na pretpostavci

Lamber-Beerovog zakona a dalja kategorizacija je izvršena u zavisnosti od toga da li je u pitanju analiza jedne ili više komponenti [1]. Analiza čiste komponente (proteina HRP) se bazira na pravljenju kalibracione krive koja se može dobiti merenjem apsorbanci standardnih uzoraka poznatih koncentracija proteina HRP (slika 3.8, koncentracije c_1 - c_{18} su koncentracije HRP poređane po opadajućoj vrednosti koje su korišćene za pravljenje kalibracione krive). Na osnovu izmerene vrednosti apsorbance poznatog uzorka (PDLLA u kojem je inkorporiran protein HRP) iz kalibracione krive određena je koncentracija HRP. Na osnovu vrednosti koncentracije HRP u supernatantu izračunata je efikasnost inkapsulacije proteina HRP u polimeru PDLLA.



Slika 3.8 Apsorpcioni spektri različitih koncentracija vodenog rastvora HRP

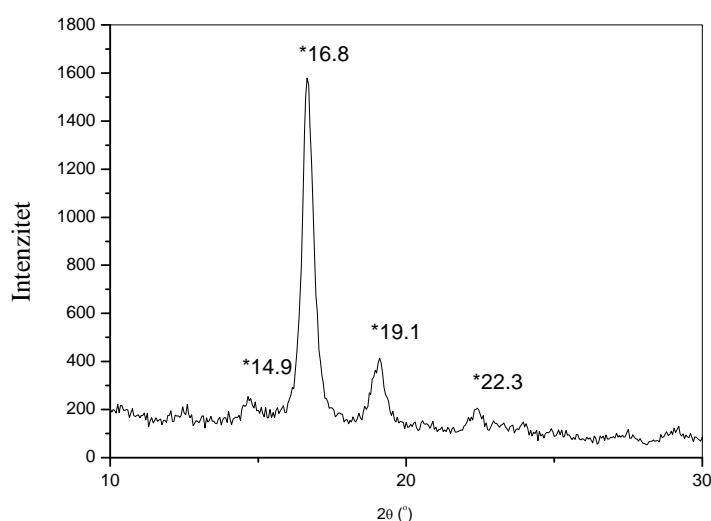
U našim eksperimentima merenja koncentracije vodenog rastvora HRP, kao i određivanje efikasnosti inkapsulacije HRP u polimeru PDLLA, rađena su u vidljivoj oblasti korišćenjem GBC UV-Visible Cintra 101 spektrofotometra u intervalu od 300-600 nm, brzinom 100 nm/min i korakom 0.427 nm.

4. Rezultati

4.1 Rezultati praha poli-L-laktid, PLLA

4.1.1 Rezultati rendgenske analize praha PLLA

Mehaničke osobine i hemijska stabilnost kristalnih polimera dosta zavise od kristalne strukture, kristaliničnosti i morfologije [111, 112]. U našim eksperimentima, fazna analiza praha PLLA je izvršena rendgenskom difrakcijom (XRD). XRD merenja takođe daju informaciju o kristalnoj strukturi i kristaliničnosti, a u ovom radu su izvedena da bi se razjasnilo ponašanje semi-kristalnog polimera i identifikovale faze praha PLLA. XRD merenja su izvršena pomoću XRD difraktometra za prah (Bruker D8 Advance).



Slika 4.1 Difraktogram praha PLLA

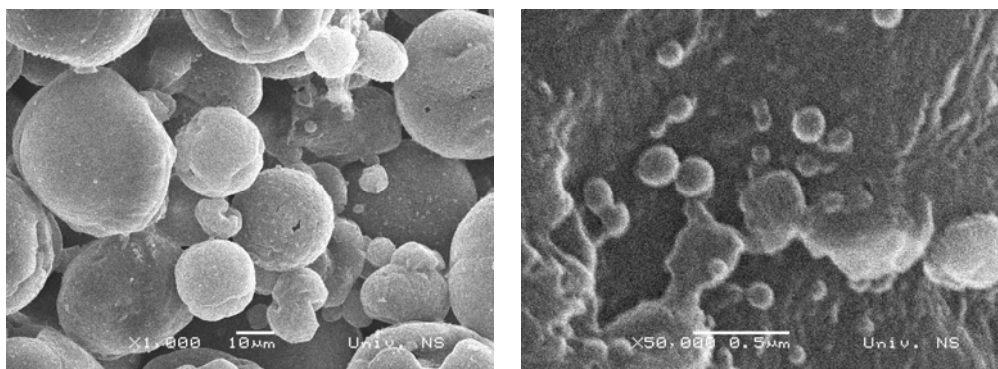
Na slici 4.1 prikazan je XRD dijagram praha PLLA. Na difraktogramu se mogu zapaziti značajniji pikovi na $2\theta = 14.9^\circ$, 16.8° , 19.1° i 22.3° koji se poklapaju sa pikovima karakterističnim za homopolimer PLA na 15° , 16° , 18.5° i 22.5° [81, 111]. Na osnovu rezultata dobijenih rendgenskom difrakcijom može se zaključiti da proces dobijanja mikrosfera PLLA nije uticao na karakteristike polimera, tj. nije došlo do promene faza što se može zapaziti na difraktogramu praha PLLA [111, 114].

4.1.2 Rezultati skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) praha PLLA

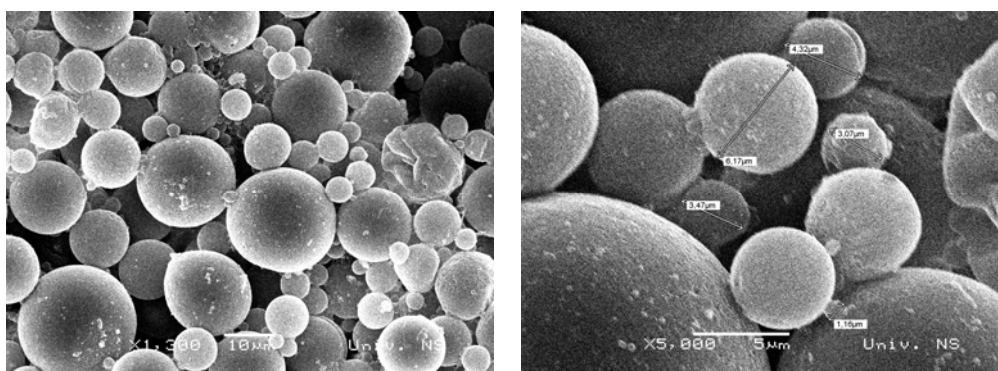
Površinska morfologija i veličina čestica dobijenih prahova PLLA su ispitane skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM). Za morfološku analizu prahova PLLA korišćen je elektronski mikroskop marke JEOL-JSM-6460LV (Japan), sa energijom elektrona od 10 do 50 KeV-a. Pri procesiranju mikrosfera PLLA kao rastvarač korišćen je hloroform, a kao ko-rastvarači korišćeni su metanol ili etanol. Takođe su korišćene različite koncentracije PVA. Karakteristične SEM fotografije

mikrosfera PLLA pripremljenih sa hloroformom kao rastvaračem, etanolom ili metanolom kao ko-rastvaračima i različitim koncentracijama PVA su prikazane na slikama 4.2-4.5. Slike 4.2 i 4.3 predstavljaju serije sa metanolom i koncentracijama PVA od 0.5% i 1%, respektivno. Slike 4.4 i 4.5 predstavljaju serije sa etanolom i koncentracijama PVA od 0.5% i 1%, respektivno. Veličina bara u svim serijama je 10 μm (slike sa leve strane). Svi eksperimentalni uslovi su navedeni u tabeli 3.1.

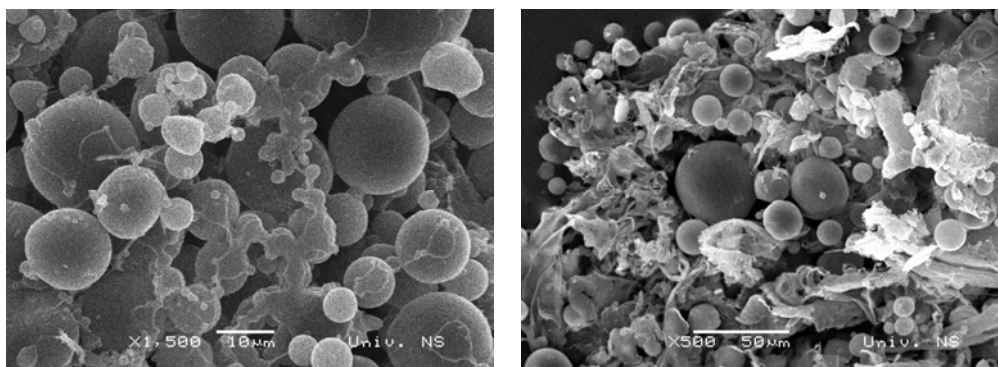
Sa SEM fotografija se može videti da su u svim serijama dobijene sferne čestice. U prvoj seriji su dobijene veće i nepravilne čestice sa širom raspodelom veličina. Oblik čestica je najnepravilniji u poređenju sa česticama iz ostalih serija. U drugoj seriji su dobijene pravilne, sferne čestice. Čestice druge serije zadovoljavaju uslov idealne sferičnosti, ali ne i uniformnosti. Dobijene čestice imaju široku raspodelu veličina. Čestice druge serije su manje od čestica dobijenih u prvoj seriji. Čestice treće i četvrte serije su drastično manje i uniformnije, ali su delimično aglomerisane. U četvrtoj seriji su dobijene najoptimalnije čestice, čestice su najmanje i najuniformnije. U svim serijama je zadovoljen uslov potrebne sferičnosti, ali uniformnost nije u potpunosti zadovoljena.



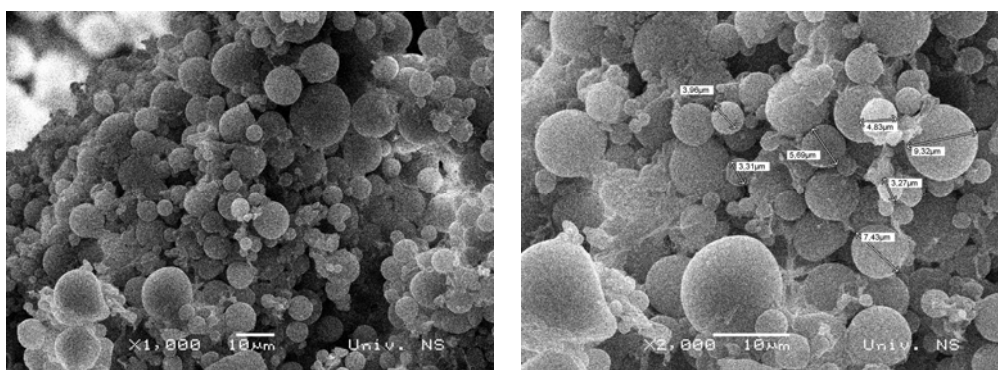
Slika 4.2 SEM fotografije praha prve serije



Slika 4.3 SEM fotografije praha druge serije



Slika 4.4 SEM fotografije praha treće serije

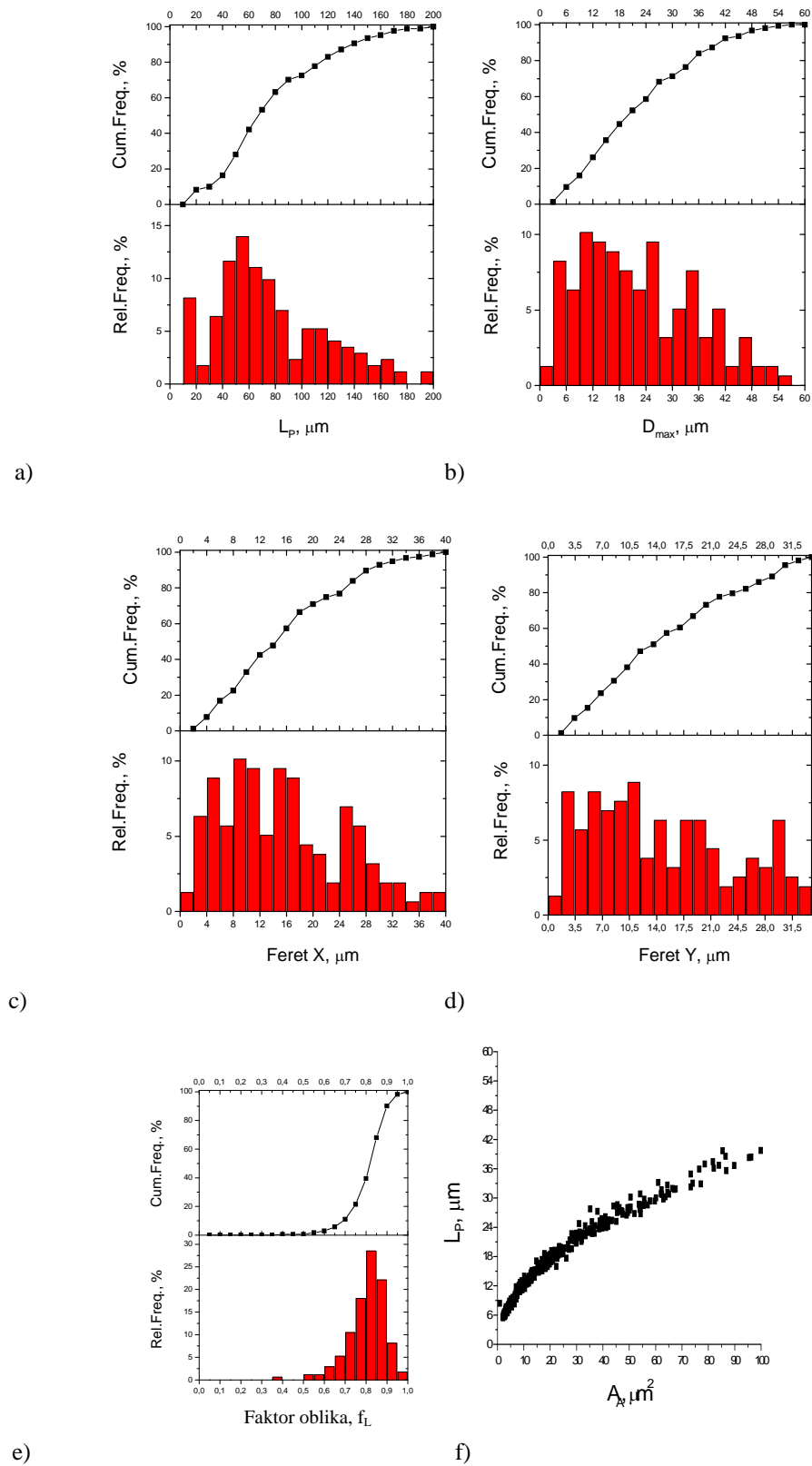


Slika 4.5 SEM fotografije praha četvrte serije

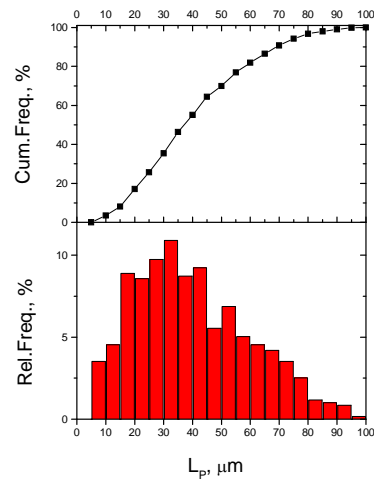
4.1.3 Rezultati stereološke analize (Metoda analize površinske projekcije)

Primenom metode stereološke analize čestica dobijenih u sve četiri serije, određeni su parametri koji karakterišu veličinu čestica (poprečni presek- A_A , obim- L_P , maksimalni dijаметar čestice D_{max} , feret X i feret Y) i parametar koji karakteriše oblik čestica (faktor oblika- f_L). Na osnovu određenih parametara izvedena je veličina koja predstavlja odnos obima i površine (L_P/A_A) koja ukazuje na uniformnost čestica. Sa tipične SEM fotografije izabrano je oko 200-300 čestica i izmereni su ovi parametri. Na osnovu izmerenih vrednosti napravljeni su dijagrami kumulativne i relativne zavisnosti ovih veličina (slike 4.6-4.9) i određene su minimalne, maksimalne i srednje vrednosti svih veličina (tabela 5.1).

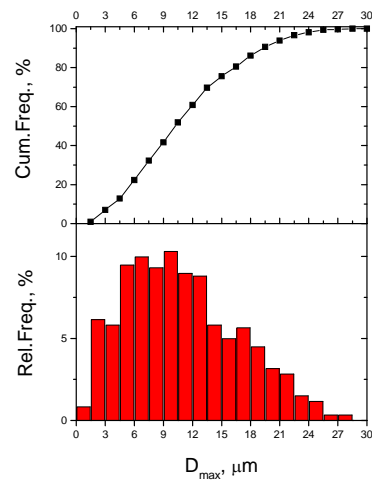
Na osnovu stereoloških merenja može se videti da su čestice dobijene u prvoj i drugoj seriji velike. Iz rezultata dobijenih stereološkim merenjima čestica prve serije, koji su prikazani na slici 4.6, vidi se da su dobijene najveće čestice. Srednja vrednost D_{max} prve serije je 22.38 μm (slika 4.6b). Srednja vrednost faktora oblika čestica prve serije iznosi 0.81 (slika 4.6e). Čestice dobijene u drugoj seriji su manje od čestica u prvoj seriji, i pravilnijeg oblika. Srednja vrednost D_{max} druge serije iznosi 10.94 μm (slika 4.7b). Srednja vrednost faktora oblika iznosi 0.86 (slika 4.7e). Čestice dobijene u trećoj i četvrtoj seriji su manje i uniformnije od čestica dobijenih u prvoj i drugoj seriji. Srednja vrednost D_{max} čestica treće serije iznosi 6.69 μm (slika 4.8b). Srednja vrednost D_{max} čestica četvrte serije iznosi 4.93 μm (slika 4.9b). Srednje vrednosti faktora oblika treće i četvrte serije su 0.80 i 0.82, respektivno (slika 4.8e i slika 4.9e) (tabela 5.1).



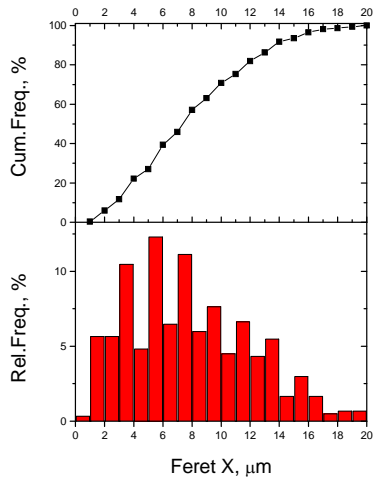
Slika 4.6 Rezultati stereoloških merenja čestica praha PLLA prve serije: a) obim- L_p , b) maksimalni prečnik čestice- D_{max} c) feret X, d) feret Y, e) faktor oblika- f_L , f) odnos L_p/A_A



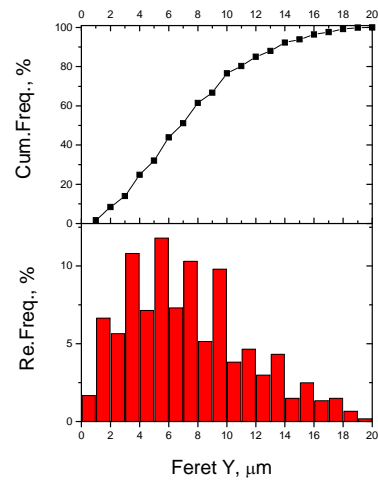
a)



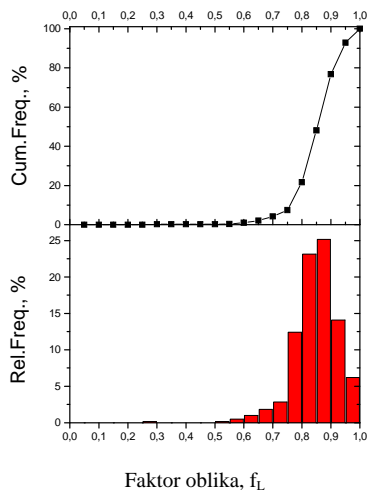
b)



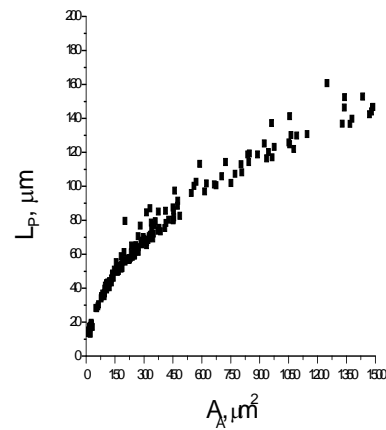
c)



d)

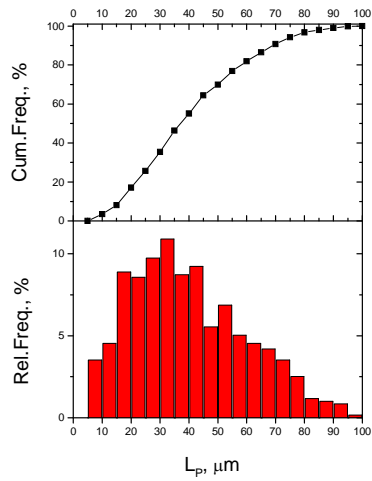


e)

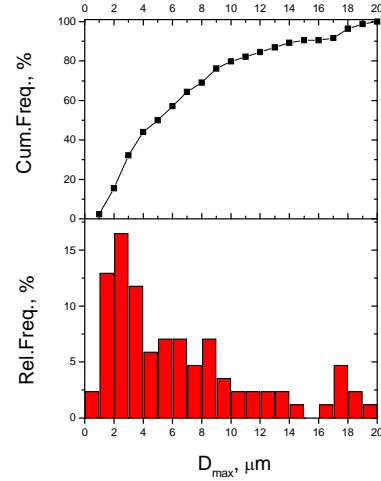


f)

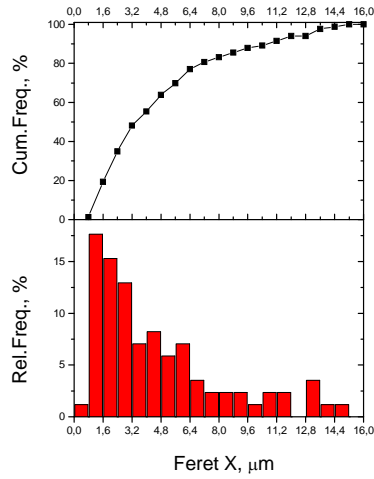
Slika 4.7 Rezultati stereoloških merenja čestica praha PLLA druge serije a) poprečni presek- A_A , b) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , c) feret X, d) feret Y, e) faktor oblika- f_L , f) odnos L_P/A_A



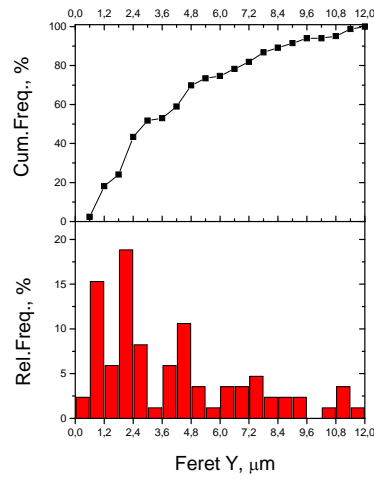
a)



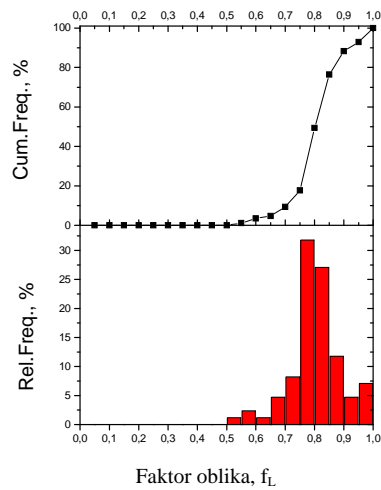
b)



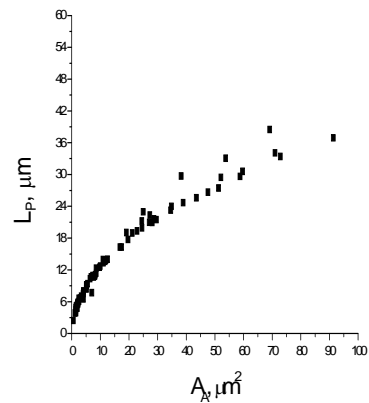
c)



d)

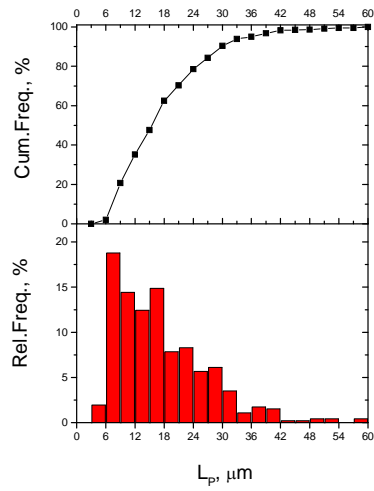


e)

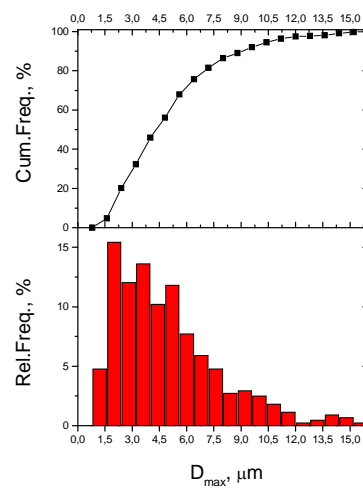


f)

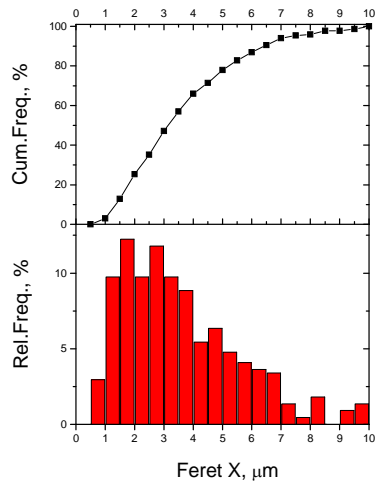
Slika 4.8 Rezultati stereoloških merenja čestica praha PLLA treće serije a) obim L_p , b) maksimalni prečnik čestice- D_{max} c) feret X, d) feret Y, e) faktor oblika- f_L , f) odnos L_p/A_A



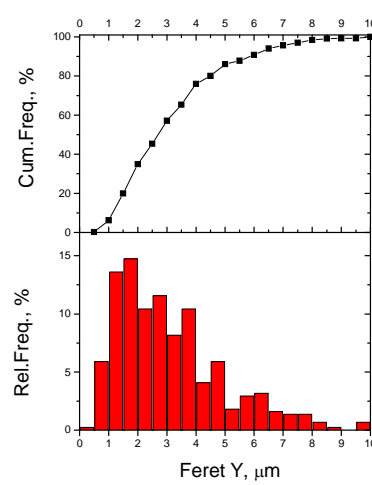
a)



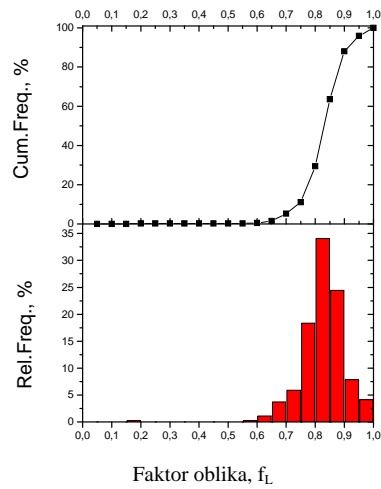
b)



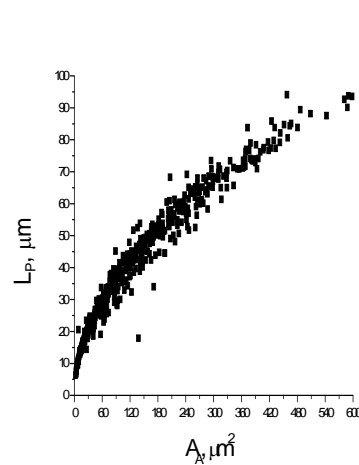
c)



d)



e)



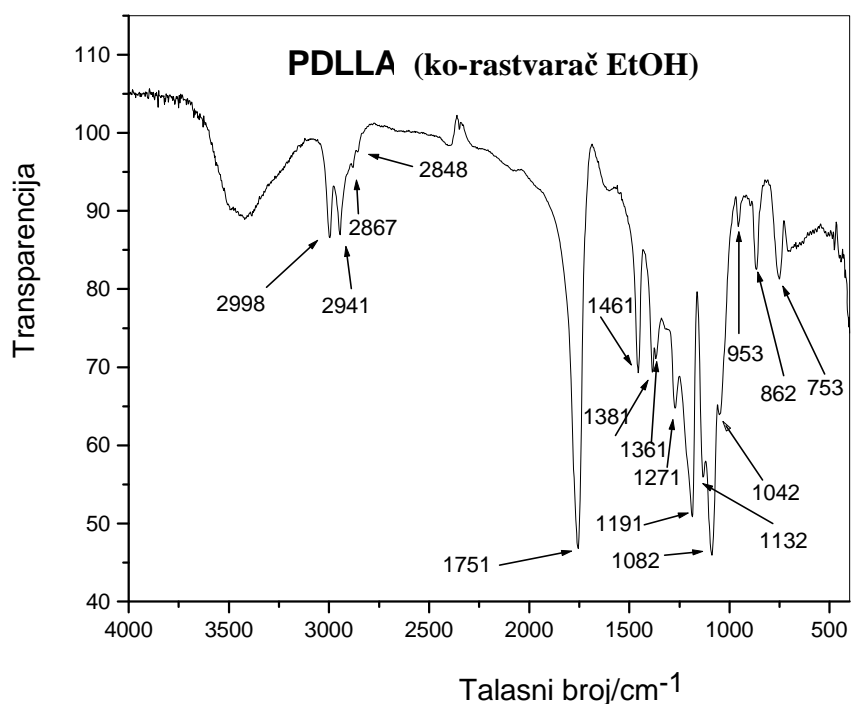
f)

Slika 4.9 Rezultati stereoloških merenja čestica praha PLLA četvrte serije a) obim L_P , b) maksimalni prečnik čestice- D_{max} c) feret X, d) feret Y, e) faktor oblika- f_L , f) odnos L_P/A_A

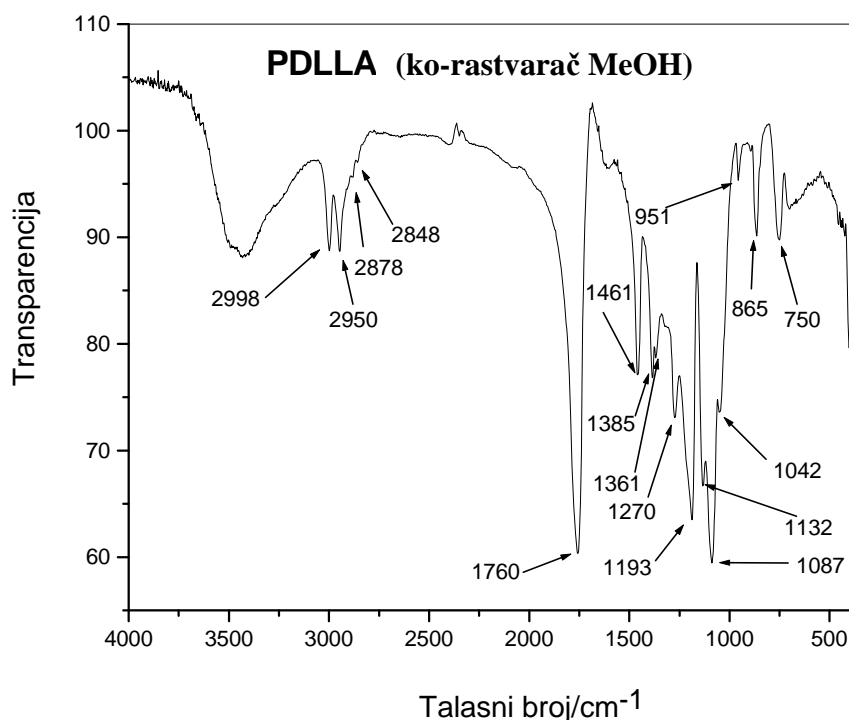
4.2 Rezultati praha poli-D,L-laktid, PDLLA

4.2.1 Rezultati infracrvene spektroskopije praha PDLLA

Za kvalitativnu analizu prahova PDLLA, koji su dobijeni sa polivinil alkoholom kao stabilizatorom i različitim ko-rastvaračima (metanolom i etanolom), korišćena je metoda infracrvene spektroskopije. Slika 4.10 predstavlja IR spektar praha PDLLA dobijenog sa etanolom kao ko-rastvaračem, a slika 4.11 predstavlja IR spektar praha PDLLA dobijenog sa metanolom kao ko-rastvaračem. Identifikacijom faza korišćenjem IR spektara praha PDLLA dobijenog sa etanolom kao ko-rastvaračem (slika 4.10) može se ustanoviti prisustvo karakterističnih traka PDLLA na sledećim talasnim brojevima [67]: 2998 cm^{-1} , 2941 cm^{-1} , 2867 cm^{-1} , 2848 cm^{-1} (koje pripadaju CH vezi), 1751 cm^{-1} (C=O veza), 1461 cm^{-1} , 1381 cm^{-1} , 1361 cm^{-1} (CH veza CH_3 grupe), 1271 cm^{-1} , 1191 cm^{-1} , 1082 cm^{-1} , 1132 cm^{-1} , 1042 cm^{-1} (C-O veza), 953 cm^{-1} , 862 cm^{-1} , 753 cm^{-1} (CH veza), a široka traka na talasnom broju 3500 cm^{-1} potiče od OH grupe molekula vode [112].



Slika 4.10 IR spektar praha PDLLA, kao ko-rastvarač je korišćen etanol



Slika 4.11 IR spektar praha PDLLA, kao ko-rastvarač je korišćen metanol

Identifikacijom faza korišćenjem IR spektara praha PDLLA dobijenog sa metanolom kao ko-rastvaračem (slika 4.11) može se ustanoviti prisustvo karakterističnih traka PDLLA na sledećim talasnim brojevima [67]: 2998 cm^{-1} , 2950 cm^{-1} , 2878 cm^{-1} , 2848 cm^{-1} (koje pripadaju CH vezi), 1760 cm^{-1} (C=O veza), 1461 cm^{-1} , 1385 cm^{-1} , 1361 cm^{-1} (CH veza CH_3 grupe), 1270 cm^{-1} , 1193 cm^{-1} , 1087 cm^{-1} , 1132 cm^{-1} , 1042 cm^{-1} (C-O veza), 951 cm^{-1} , 865 cm^{-1} , 750 cm^{-1} (CH veza), a široka traka na talasnom broju 3500 cm^{-1} potiče od OH grupe molekula vode [112].

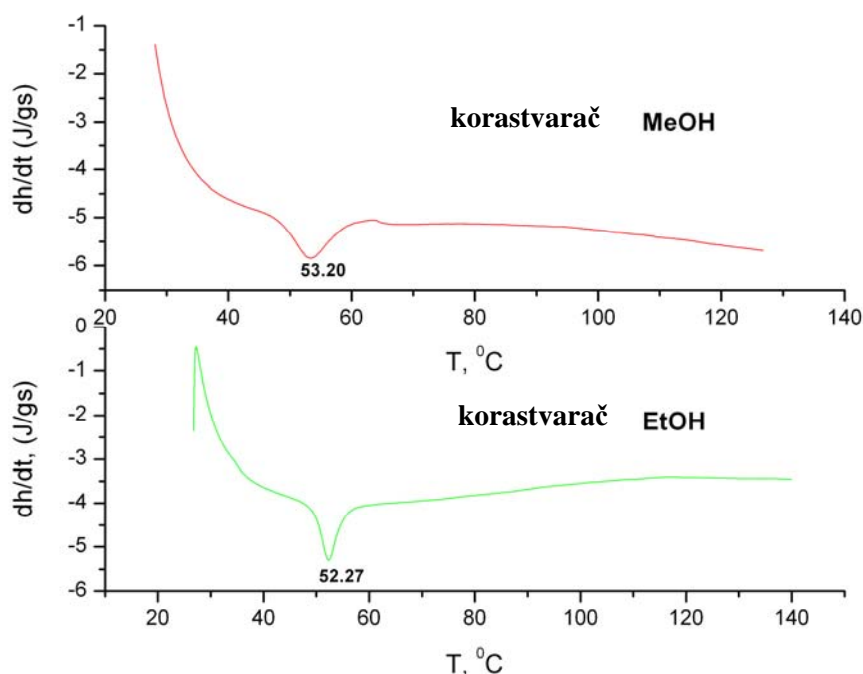
Spektri PDLLA dobijeni korišćenjem različitih ko-rastvarača ne pokazuju značajnije razlike i karakteristične trake ne odstupaju od traka karakterističnih za PDLLA. Na osnovu dobijenih rezultata može se primetiti da se tokom procesiranja mikrosfera PDLLA karakteristike polaznog sistema nisu izmenile [114].

4.2.2 Rezultati diferencijalne skanirajuće kalorimetrije praha PDLLA

PDLLA je amorfan polimer sa temperaturom staklastog prelaza (T_g) u opsegu oko $50\text{--}60^\circ\text{C}$. Polimeri koji su izgrađeni od mlečnih kiselina imaju T_g iznad temperature tela, predstavljaju krute sisteme sa malom elastičnošću i vrlo su krti na sobnoj temperaturi [119]. Diferencijalna skanirajuća kalorimetrija (DSC) je jedna od metoda koja je korišćena za karakterizaciju praha poli(DL-laktida) dobijenog sa polivinil alkoholom kao stabilizatorom i metanolom ili etanolom kao ko-rastvaračem.

Merenja su rađena u temperaturnom opsegu od 20°C do 140°C sa brzinom grejanja od 10°C u minuti.

Na slici 4.12 prikazane su DSC krive prahova PDLLA koji su dobijeni korišćenjem različitih ko-rastvarača, metanola ili etanola, respektivno. Na DSC krivama se može uočiti samo pik staklastog prelaza jer je polimer PDLLA amorfan [11, 59, 116]. DSC dijagrami prahova PDLLA dobijenih sa različitim ko-rastvaračima ne pokazuju značajnije razlike. Prah dobijen sa metanolom kao ko-rastvaračem ima širi pik ostakljivanja na temperaturi od 53.20°C, što pokazuje da je polimer manje kristaliničan. Ovaj rezultat bi mogao da ukazuje na to da se sa metanolom kao ko-rastvaračem smanjuje kristaliničnost i na taj način se može skratiti period degradacije [33]. Prah dobijen sa etanolom kao ko-rastvaračem ima oštiji pik ostakljivanja na temperaturi od 52.27°C, tj. polimer je više kristaliničan.



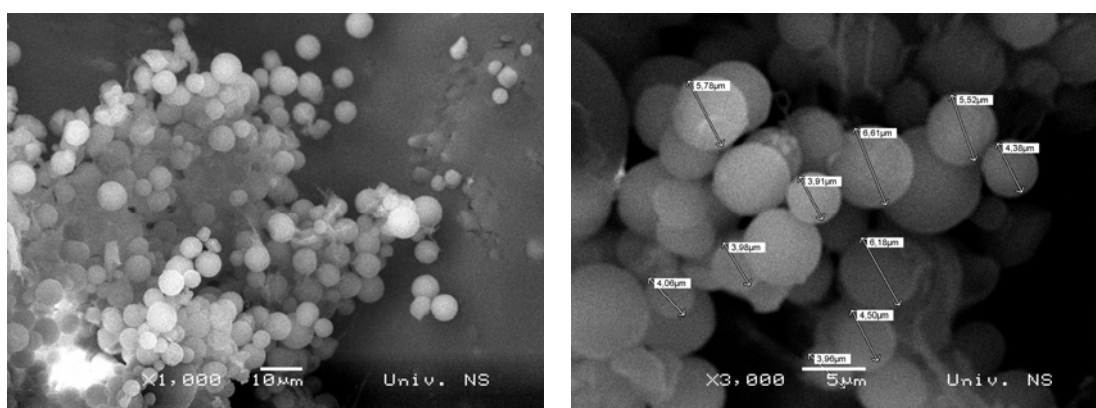
Slika 4.12 DSC dijagram prahova PDLLA koji su dobijeni sa metanolom ili etanolom kao ko-rastvaračem

4.2.3 Rezultati skenirajuće elektronske mikroskopije praha PDLLA

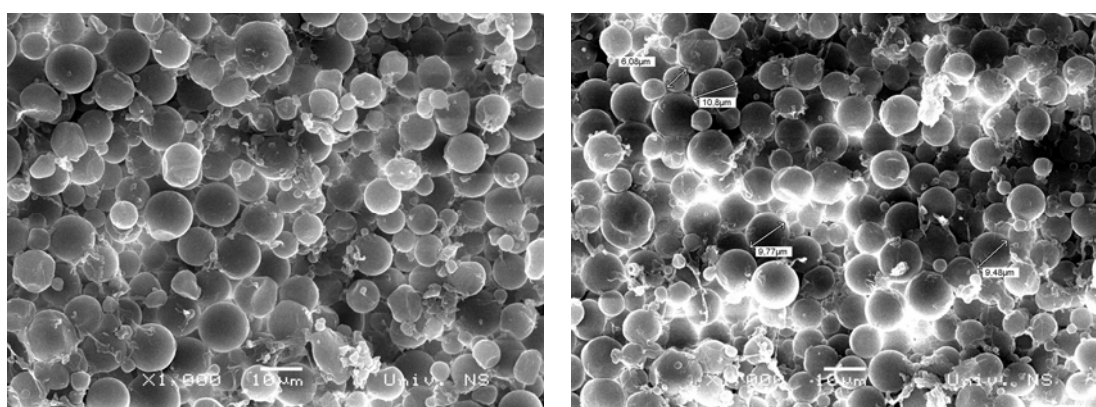
Veličina i oblik čestica prahova PDLLA su ispitivani i analizirani pomoću SEM-a. SEM fotografije mikrosfera PDLLA pripremljenih sa polivinil alkoholom kao stabilizatorom, sa etanolom ili metanolom kao ko-rastvaračima i različitim vremenima i brzinama homogenizacije su prikazane na slikama 4.13-4.20. Slike 4.13-4.16 predstavljaju serije čestica koje su dobijene sa 1% PVA, etanolom i brzinama homogenizacije 1 min 10 000 rpm, 1 min 21 000 rpm, 10 min 10 000 rpm i 10 min 21 000 rpm, respektivno. Slike 4.17-4.20 predstavljaju serije čestica koje su dobijene sa 1% PVA, metanolom i brzinama homogenizacije 1 min 10 000 rpm, 1 min 21 000 rpm, 10 min 10 000

rpm i 10 min 21 000 rpm, respektivno; slike 4.21 i 4.22 predstavljaju serije koje su pripremljene bez koraka homogenizacije sa 1% w/v i 5% w/v PVA, respektivno. Svi eksperimentalni uslovi su detaljno opisani u tabeli 3.2. Veličina bara je 10 μm u serijama 1, 3, 5, 7 i 9 (slike sa leve strane), a 5 μm u serijama 2, 4, 6, 8 i 10 (slike sa leve strane). Sve serije su obeležene kao što je prikazano u tabeli 3.2.

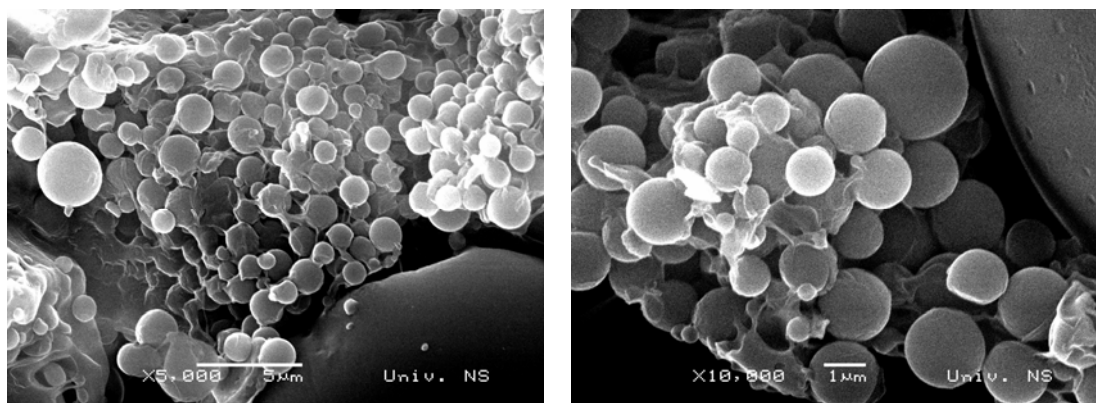
Sa SEM fotografija se može videti da su sve čestice sferne sa glatkim površinama. Srednji prečnik mikrosfera dobijenih precipitacionom metodom je manji sa metanolom (slike 4.17-4.22) nego sa etanolom (slike 4.13-4.16). Ovakve karakteristike se mogu pripisati većoj rastvorljivosti PDLLA u metanolu, koji izaziva brže formiranje mikročestica [117]. Najmanje sferne čestice su dobijene u seriji 8 (slika 4.16) sa metanolom kao ko-rastvaračem i homogenizacijom 10 min na 21 000 rpm. U svim serijama je zadovoljen uslov idealne sferičnosti.



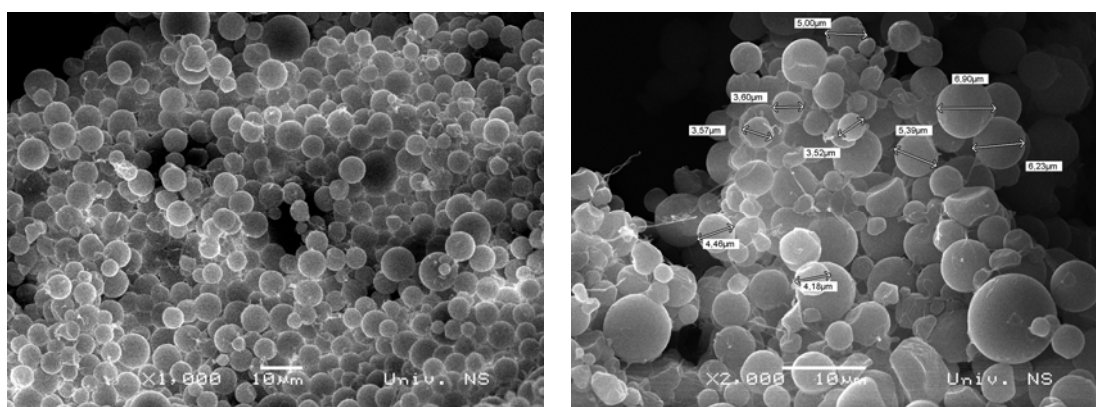
Slika 4.13 SEM fotografije praha 1. serije



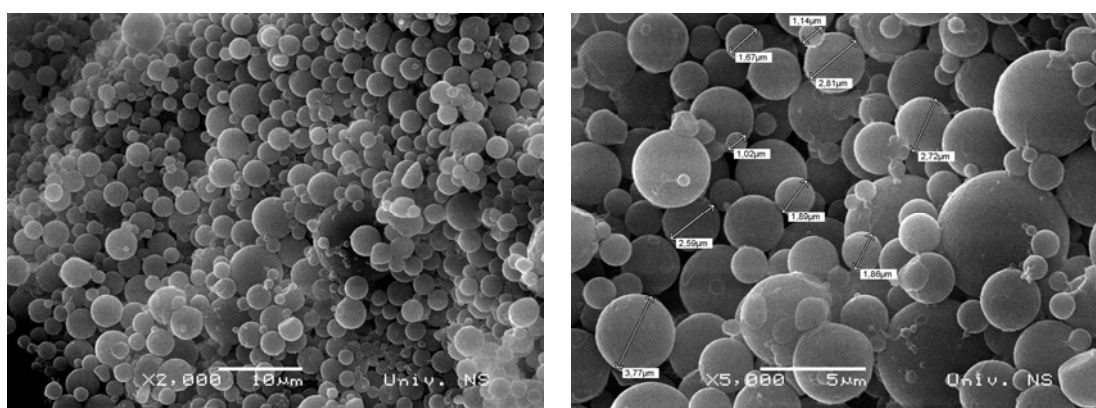
Slika 4.14 SEM fotografije praha 2. serije



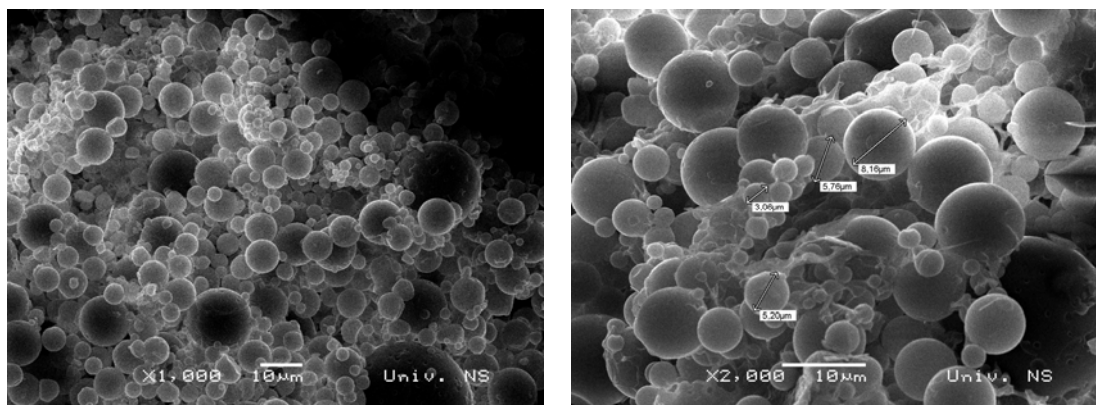
Slika 4.15 SEM fotografije praha 3. serije



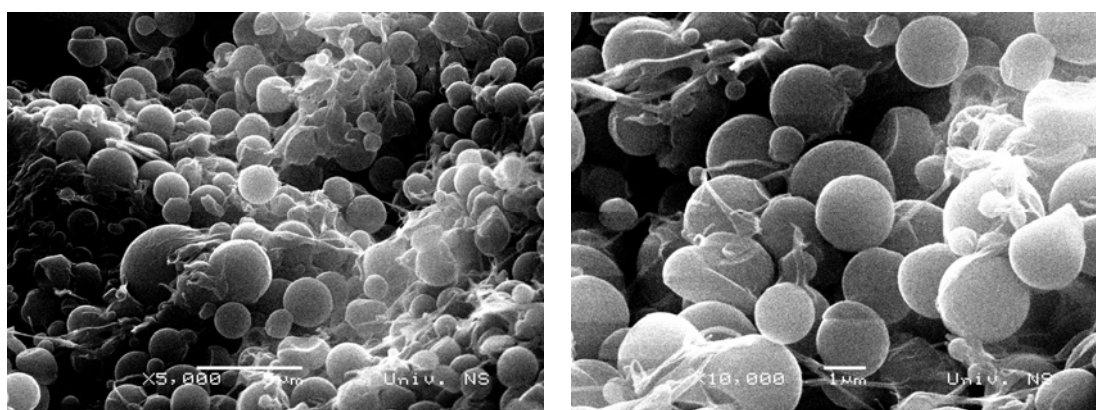
Slika 4.16 SEM fotografije praha 4. serije



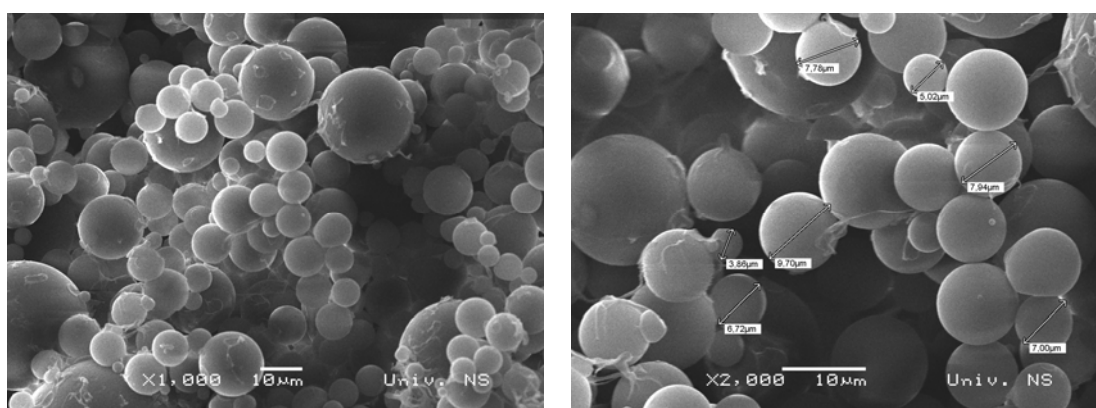
Slika 4.17 SEM fotografije praha 5. serije



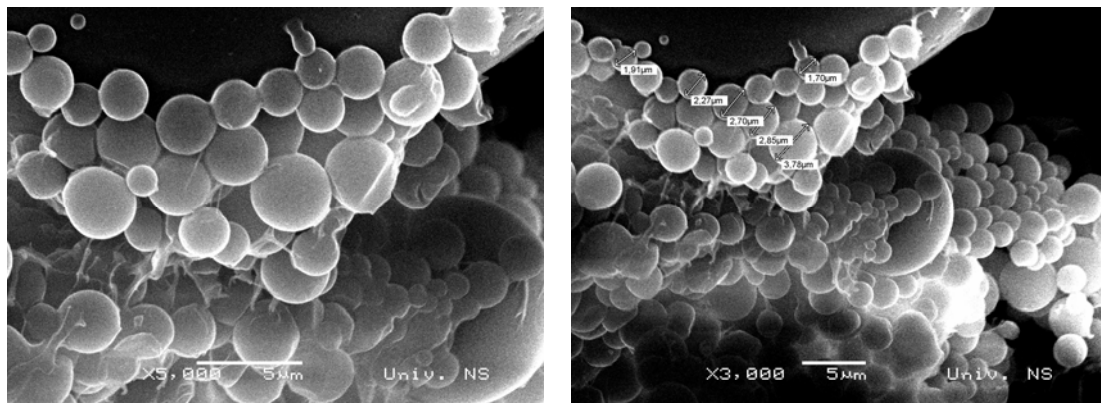
Slika 4.18 SEM fotografije praha 6. serije



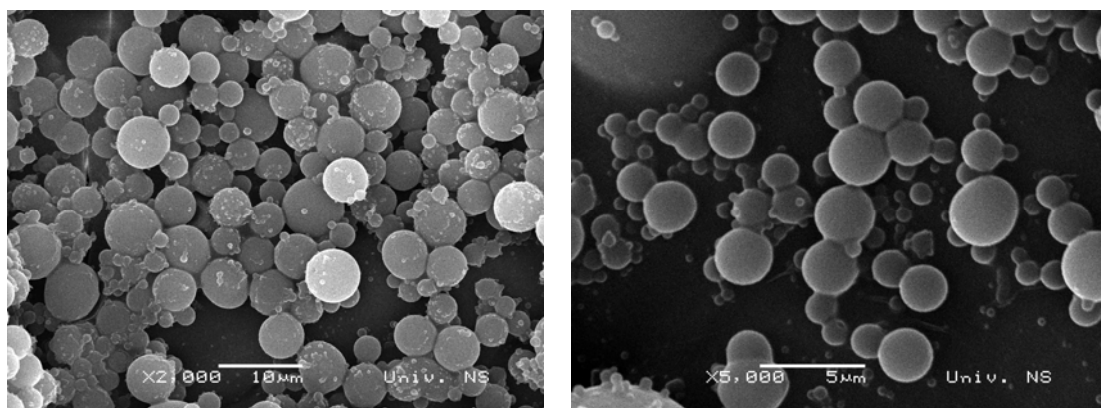
Slika 4.19 SEM fotografije praha 7. serije



Slika 4.20 SEM fotografije praha 8. serije



Slika 4.21 SEM fotografije praha 9. serije

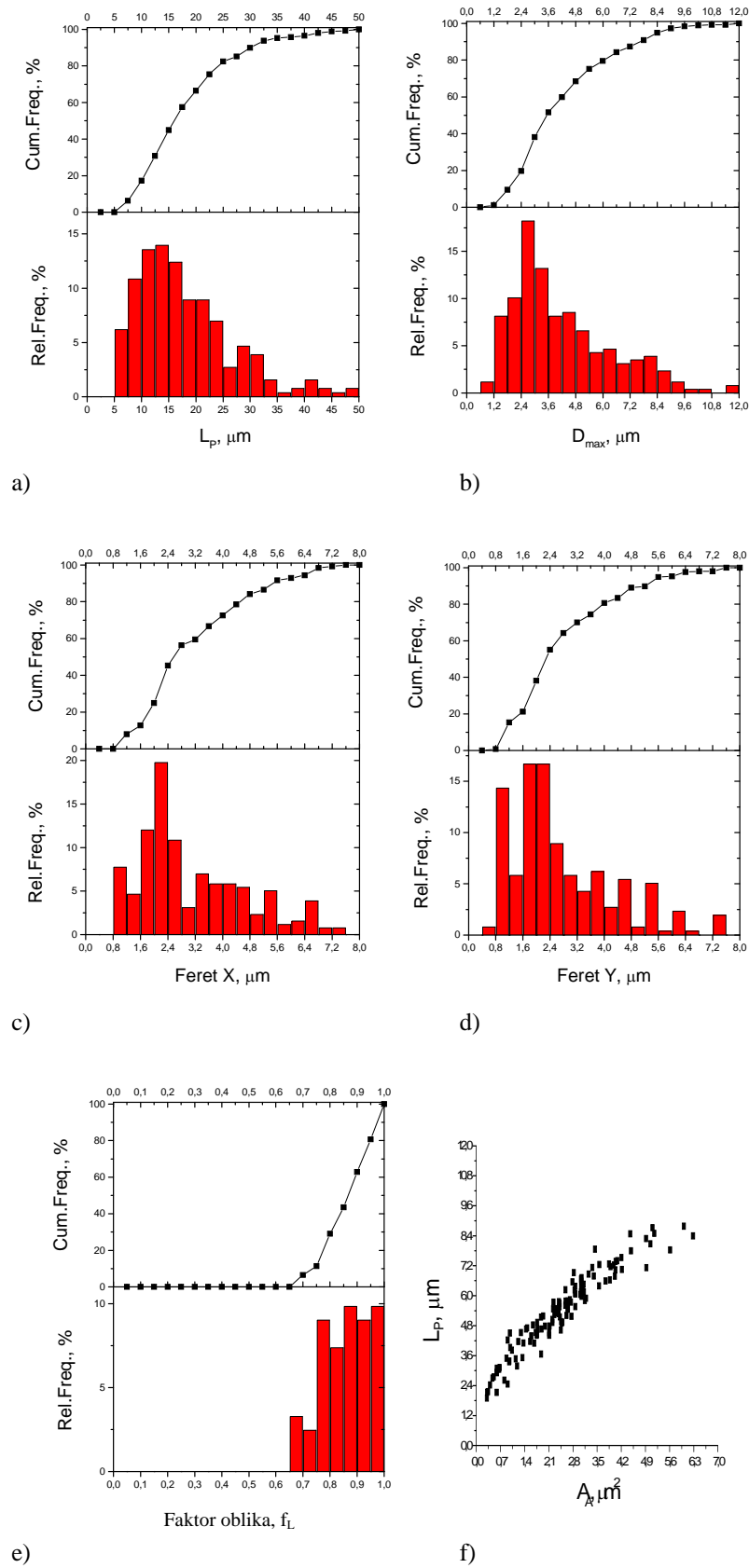


Slika 4.22 SEM fotografije praha 10. serije

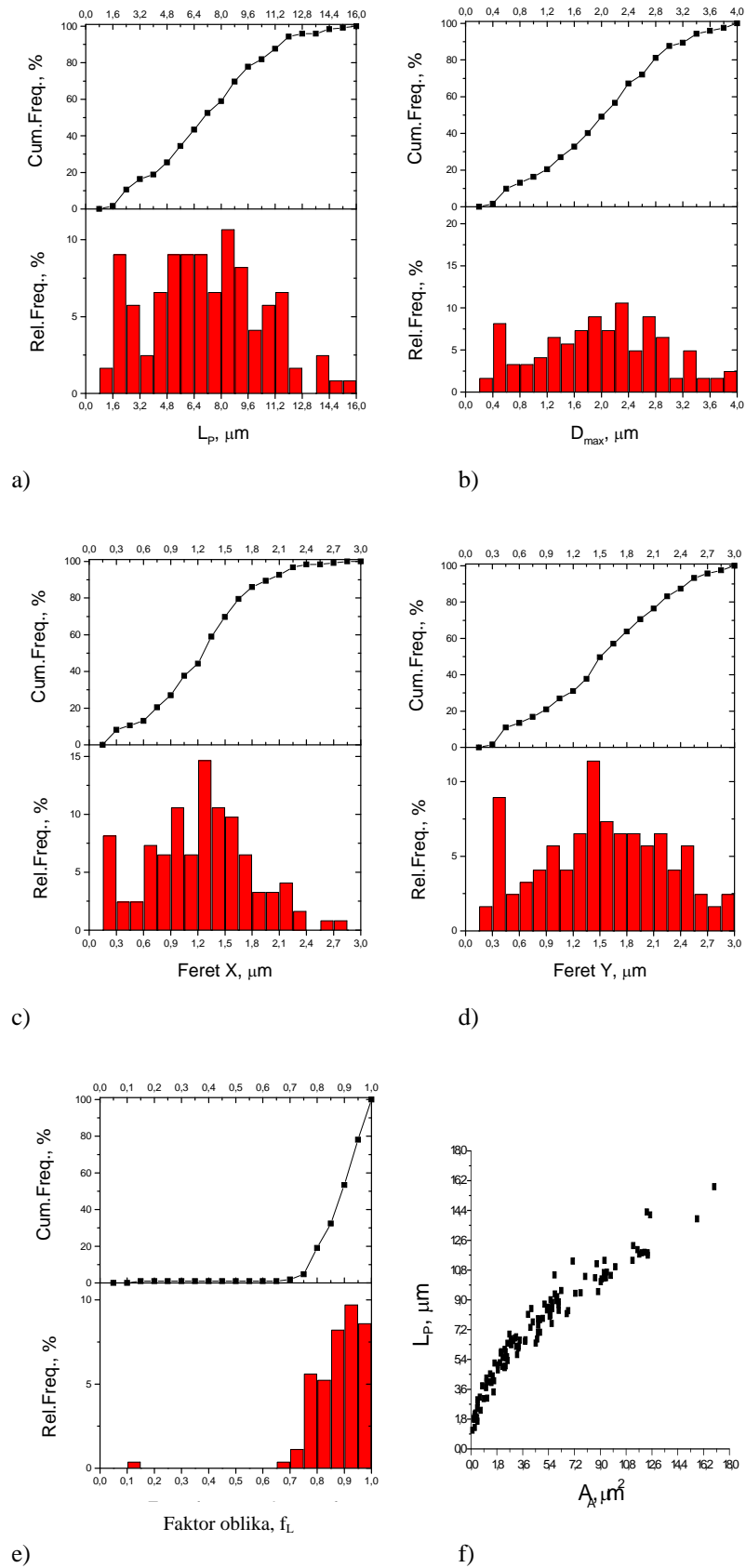
4.2.4 Rezultati stereoloških merenja čestica praha PDLLA

Sa tipične SEM fotografije PDLLA koja sadrži u proseku 200-300 čestica su određeni sledeći parametri: obim- L_p , poprečni presek- A_A , maksimalni dijametar čestice- D_{max} , feret X, feret Y, faktor oblika (f_L) i izveden je odnos obima i površine L_p/A_A . Na osnovu izmerenih vrednosti urađeni su dijagrami kumulativne i relativne zavisnosti ovih veličina (slike 4.23-4.32) i određene su minimalne, maksimalne i srednje vrednosti svih veličina (tabela 5.2).

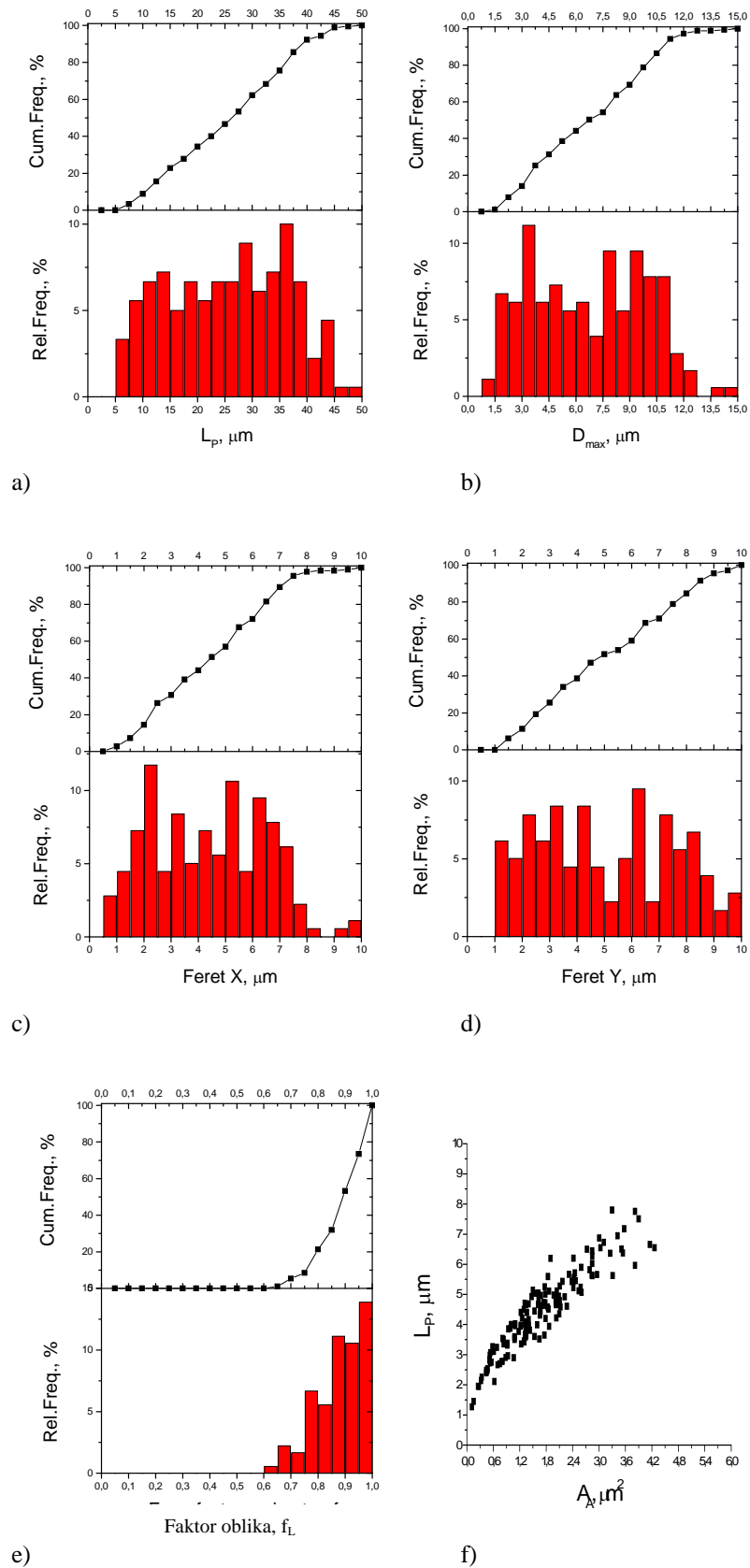
Iz rezultata dobijenih stereološkom analizom se može videti da su čestice u prvoj i petoj seriji (slike 4.23 i 4.27) veće sa srednjim prečnikom 4.37 μm i 8.44 μm , respektivno (tabela 5.2). Čestice u trećoj, četvrtoj i sedmoj seriji su takođe veće ali uniformnije (slike 4.25, 4.26, i 4.29). Srednji prečnik čestica je 6.72 μm , 5.36 μm i 5.48 μm , respektivno (tabela 5.2). Čestice u devetoj seriji su manje sa srednjim prečnikom 2.28 μm , ali u ovoj seriji se mogu primetiti dve serije različitih veličina (slika 4.31). Najmanje čestice su dobijene u drugoj, šestoj, osmoj i desetoj seriji sa najužom raspodelom veličina (slike 4.24, 4.28, 4.30 i 4.32). Srednji prečnik u svakoj seriji je 2.01 μm , 1.58 μm , 1.25 μm i 2.46 μm , respektivno.



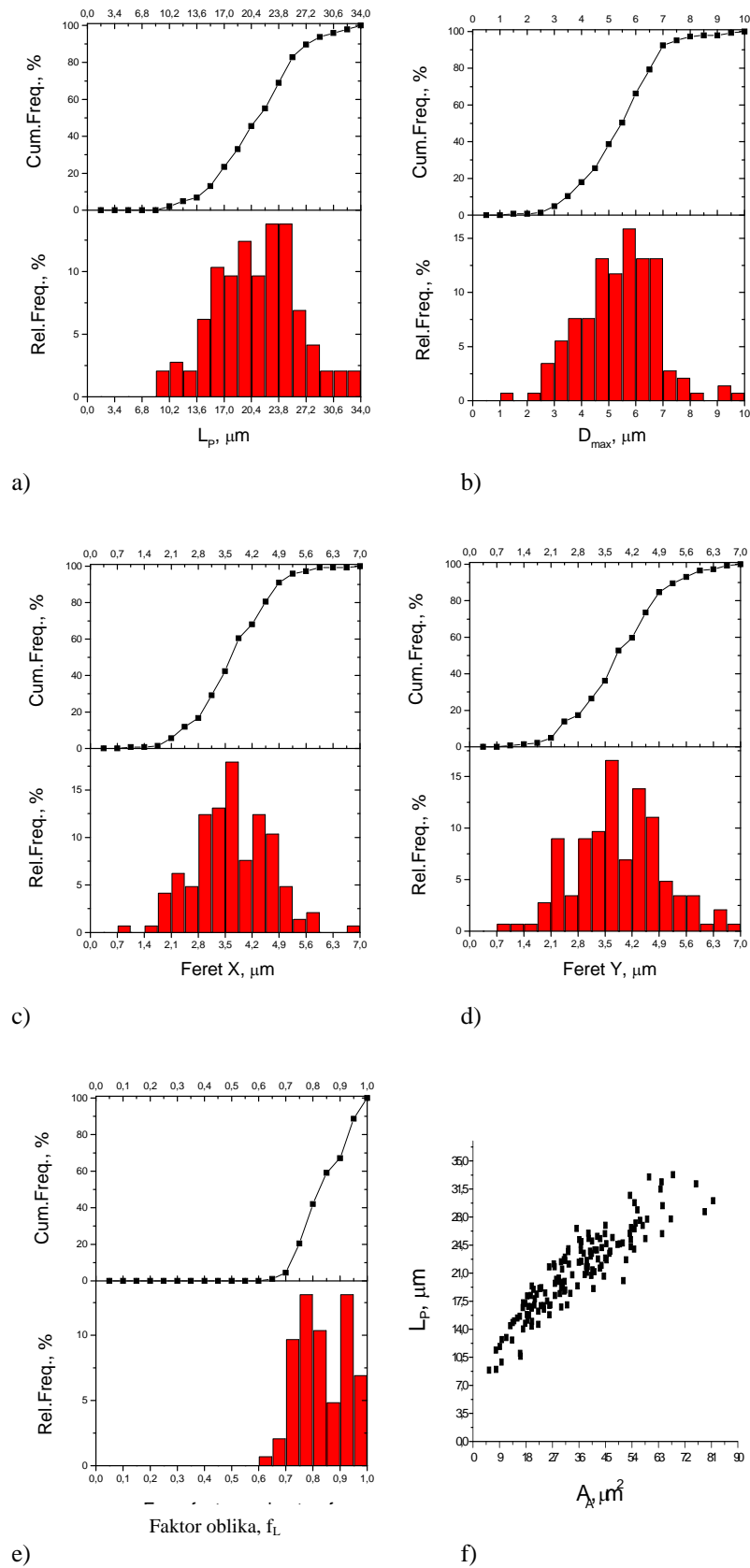
Slika 4.23 Rezultati stereoloških merenja čestica praha PDLLA prve serije: a) obim- L_P , b) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , c) feret X, d) feret Y, e) faktor oblika- f_L , f) odnos L_P/A_A



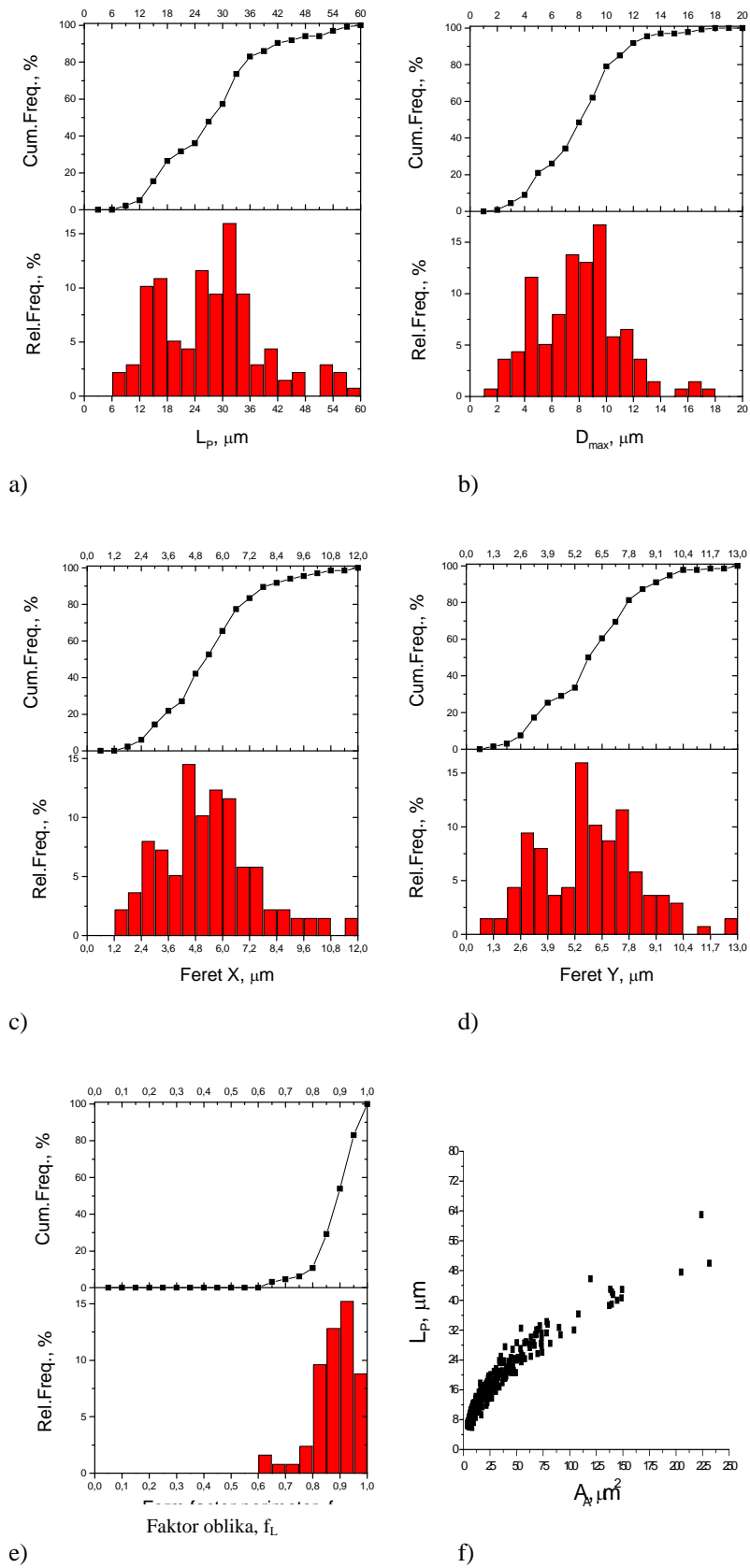
Slika 4.24 Rezultati stereoloških merenja čestica praha PDLLA druge serije: a) obim- L_P , b) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , c) feret X, d) feret Y, e) faktor oblika- f_L , f) odnos L_P/A_A



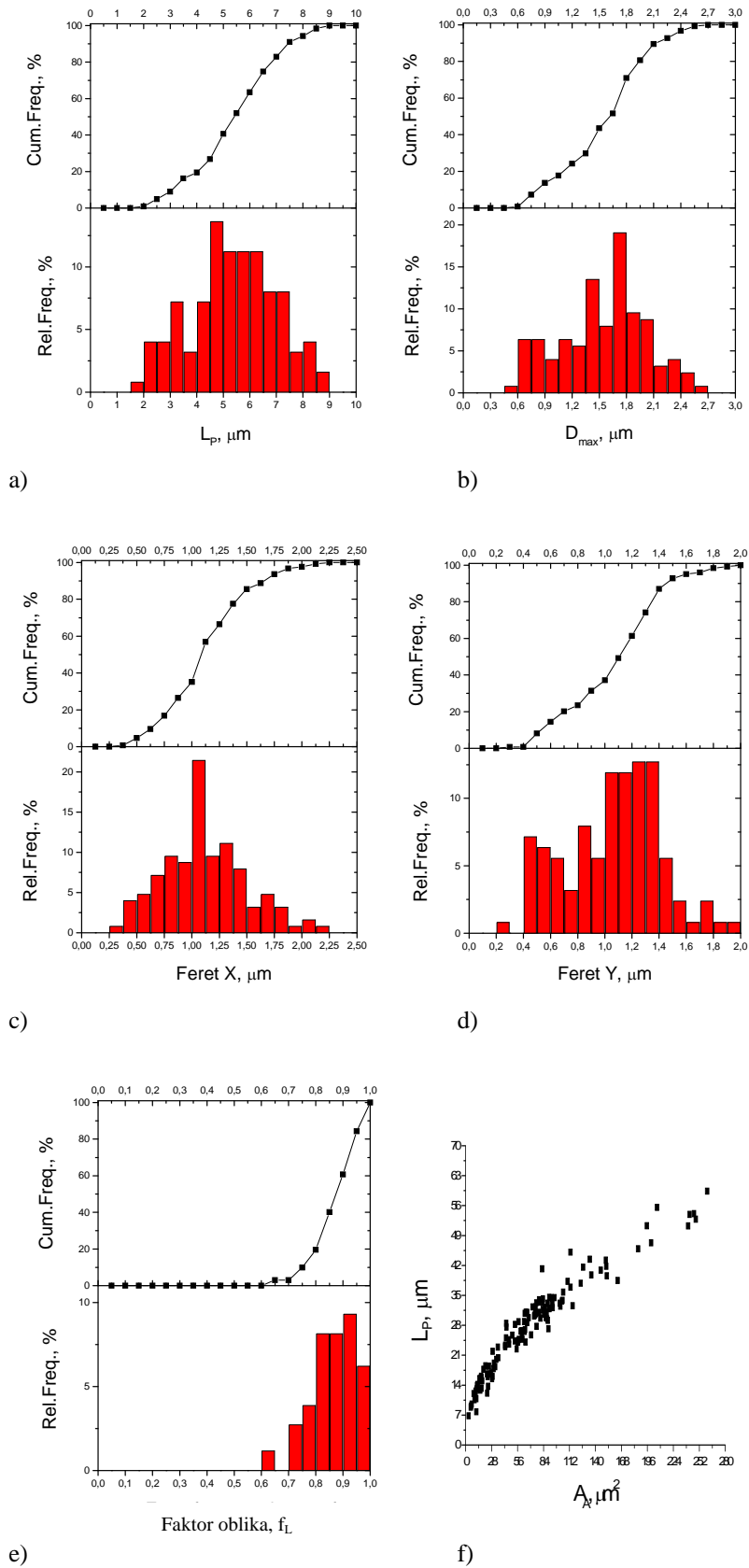
Slika 4.25 Rezultati stereoloških merenja čestica praha PDLLA treće serije: a) obim- L_p , b) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , c) feret X, d) feret Y, e) faktor oblika- f_L , f) odnos L_p/A_A



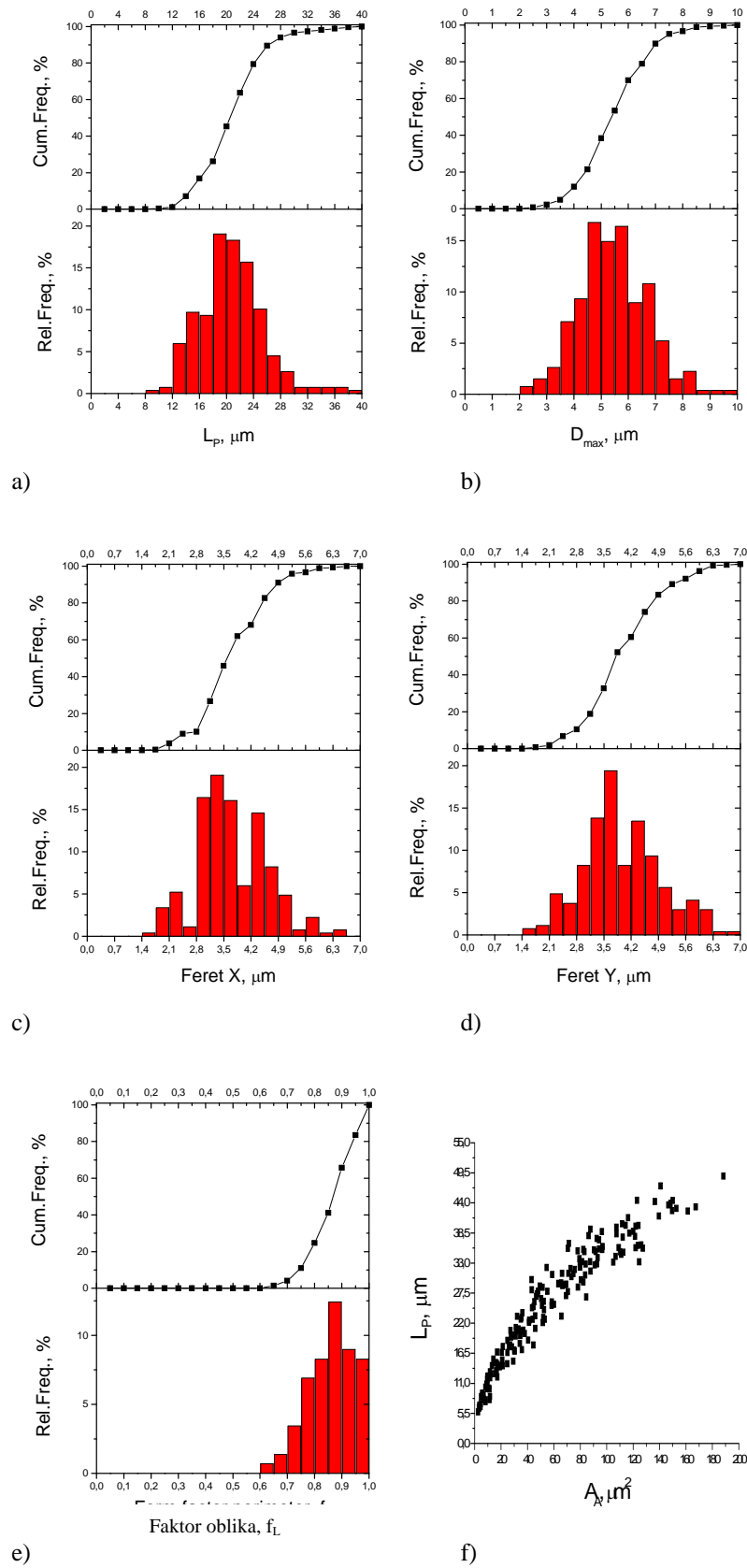
Slika 4.26 Rezultati stereoloških merenja čestica praha PDLLA četvrte serije: a) obim- L_P , b) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , c) feret X, d) feret Y, e) faktor oblika- f_L , f) odnos L_P/A_A



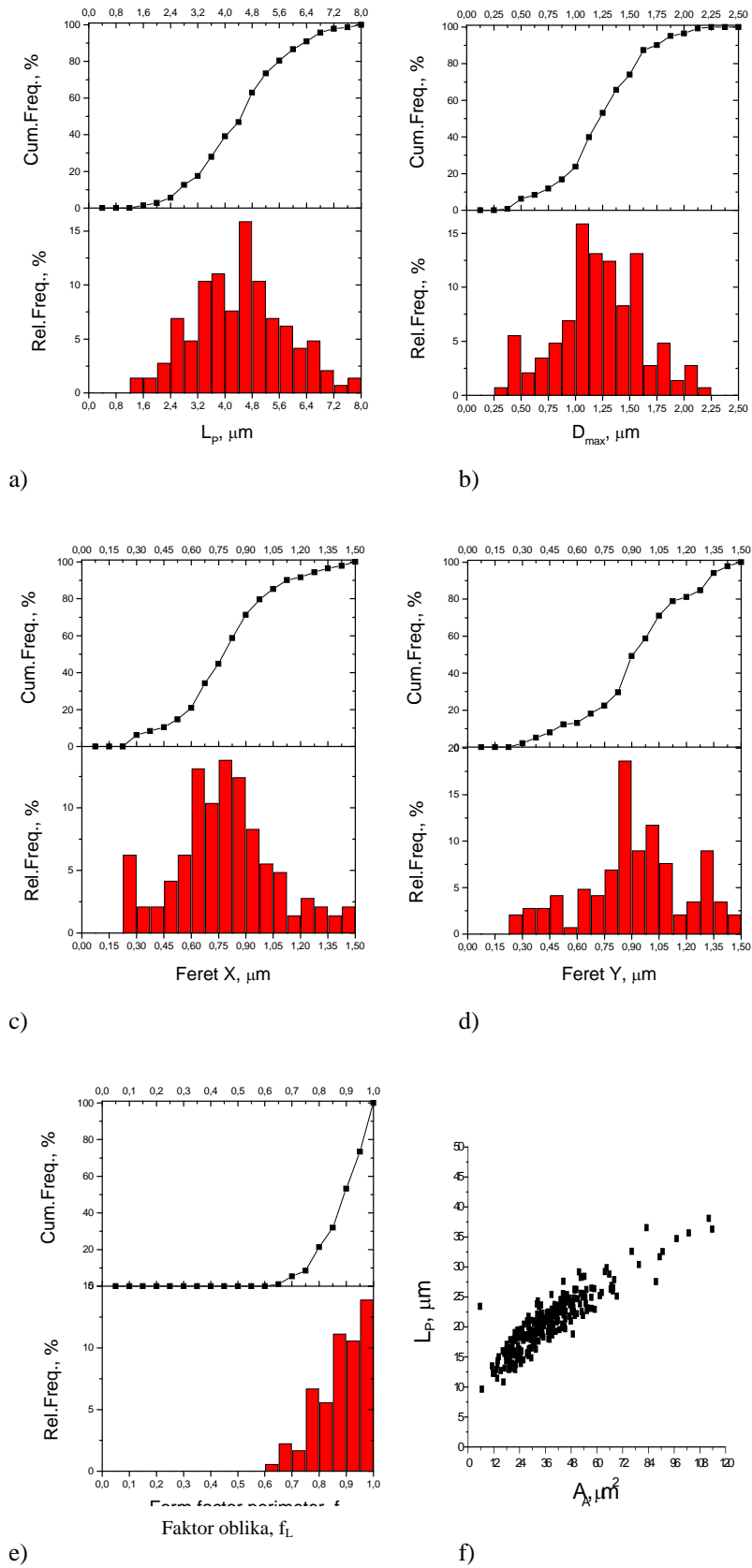
Slika 4.27 Rezultati stereoloških merenja čestica praha PDLLA pete serije: a) obim- L_p , b) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , c) feret X, d) feret Y, e) faktor oblika- f_L , f) odnos L_p/A_A



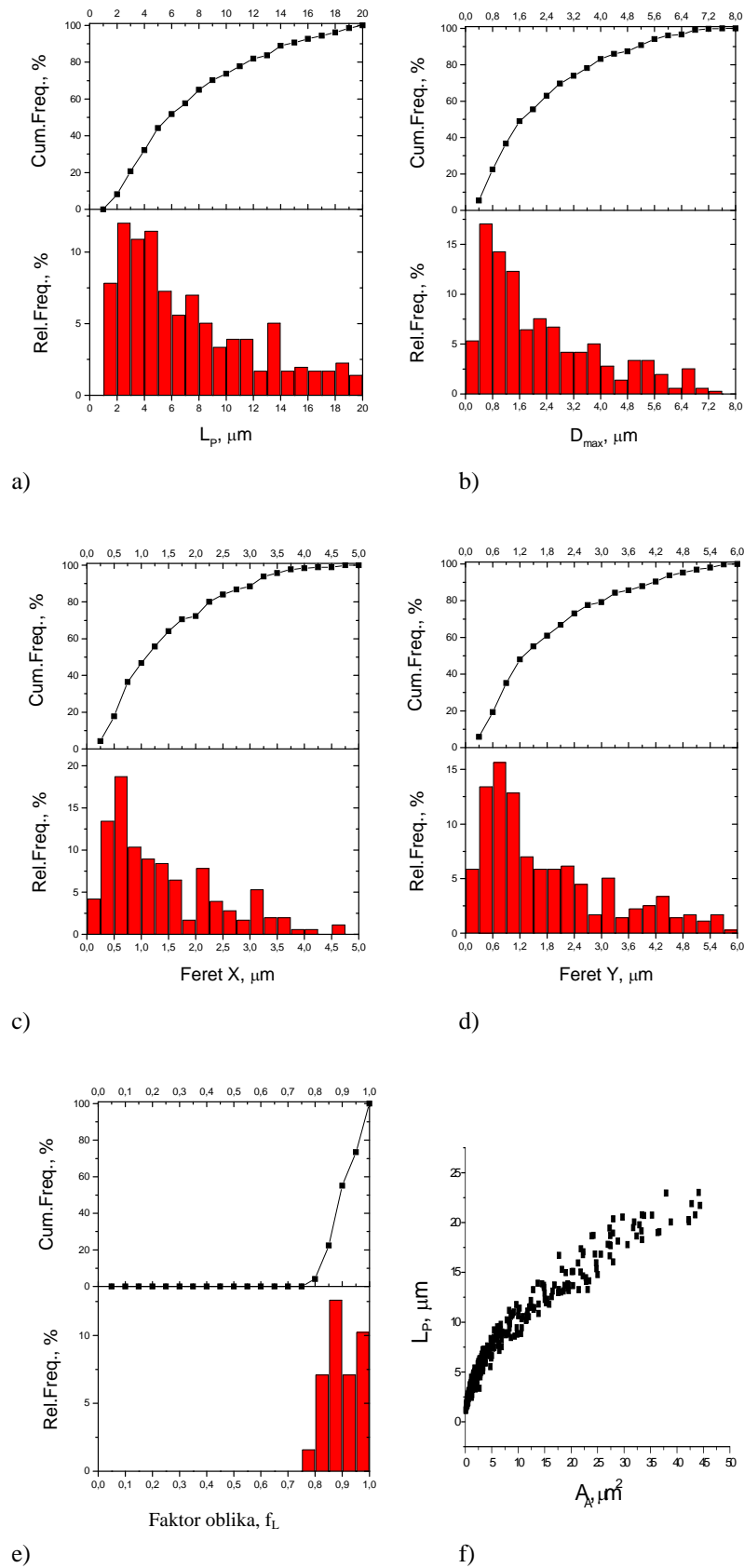
Slika 4.28 Rezultati stereoloških merenja čestica praha PDLLA šeste serije: a) obim- L_p , b) maksimalni prečnik čestice- D_{\max} , c) feret X , d) feret Y , e) faktor oblika- f_L , f) odnos L_p/A_A



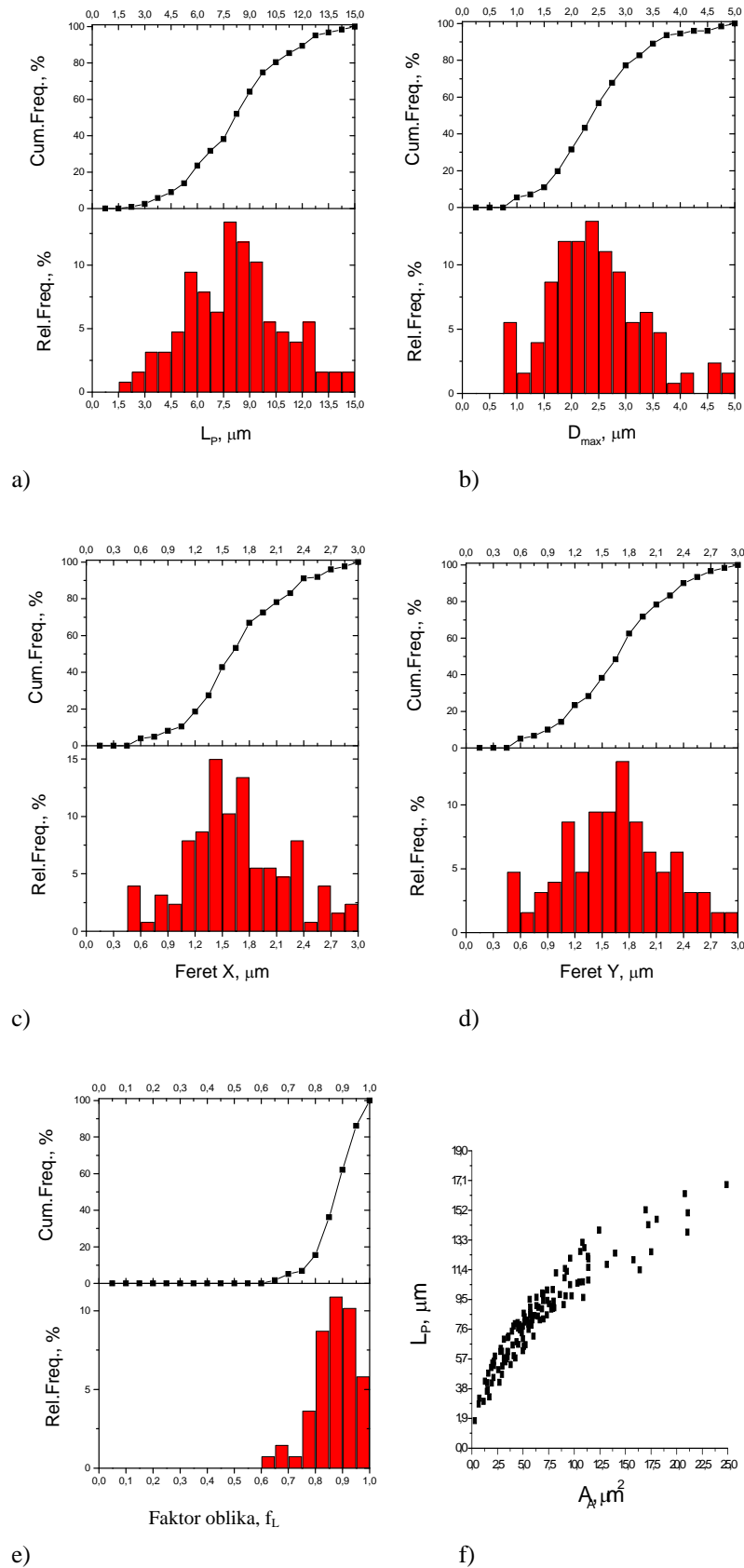
Slika 4.29 Rezultati stereoloških merenja čestica praha PDLLA sedme serije: a) obim- L_p , b) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , c) feret X, d) feret Y, e) faktor oblika- f_L , f) odnos L_p/A_A



Slika 4.30 Rezultati stereoloških merenja čestica praha PDLLA osme serije: a) obim- L_P , b) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , c) feret X, d) feret Y, e) faktor oblika- f_L , f) odnos L_P/A_A



Slika 4.31 Rezultati stereoloških merenja čestica praha PDLLA devete serije a) obim- L_P , b) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , c) feret X, d) feret Y, e) faktor oblika- f_L , f) odnos L_P/A_A



Slika 4.32 Rezultati stereoloških merenja čestica praha PDLLA desete serije: a) obim- L_p , b) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , c) feret X, d) feret Y, e) faktor oblika- f_L , f) odnos L_p/A_A

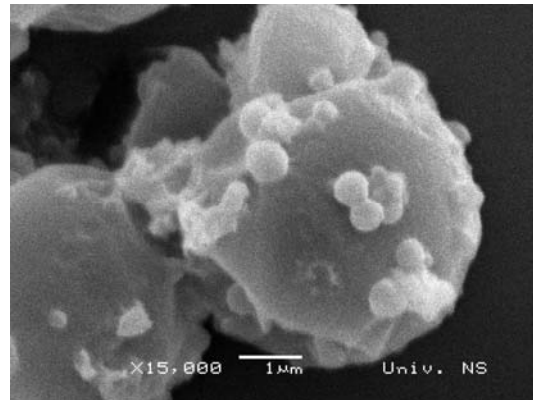
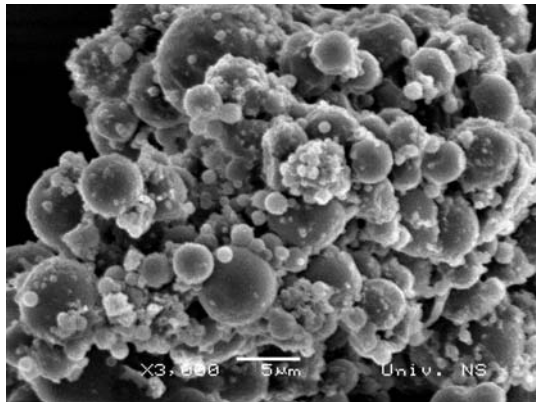
4.3 Rezultati prahova kompozita (poli-D,L-laktid+BSA) i (poli-D,L-laktid+HRP)

4.3.1 Rezultati skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) prahova kompozita (PDLLA+BSA i PDLLA+HRP)

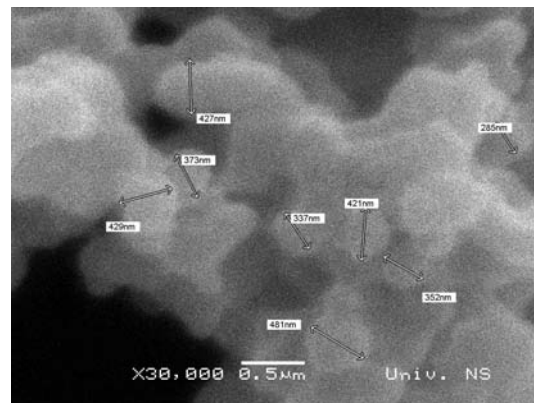
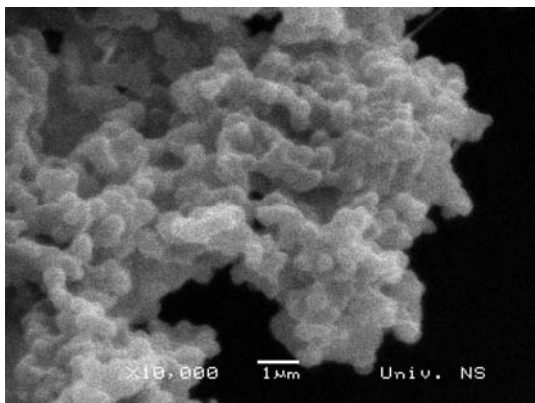
Morfološka analiza čestica prahova PDLLA u kojima je inkorporiran protein (BSA i HRP) je rađena korišćenjem skenirajuće elektronske mikroskopije. Na osnovu skenirajuće elektronske mikroskopije dobijena je slika o obliku i veličini čestica PDLLA u kojima je inkorporiran protein (BSA i HRP). U prve četiri serije, kao model protein, korišćen je BSA (slike 4.33-4.36), dok je u ostalim serijama korišćena peroksidaza, HRP (slike 4.37-4.41). U prvoj, drugoj i četvrtoj seriji, prikazanim na slikama 4.33, 4.34 i 4.36, kao ko-rastvarač je korišćen etanol, osim u trećoj seriji, prikazanoj na slici 4.35, u kojoj je kao ko-rastvarač korišćen metanol. U prvoj i četvrtoj seriji (slike 4.33 i 4.36) je korišćen 1% PVA, dok je u drugoj i trećoj seriji (slike 4.34 i 4.35) korišćen 5% PVA. U serijama u kojima je kao model protein korišćen HRP, prikazanim na slikama 4.37-4.41 je kao ko-rastvarač korišćen etanol, osim u trećoj seriji, u kojoj je kao ko-rastvarač korišćen metanol. U prvoj i drugoj seriji, prikazanim na slikama 4.37 i 4.38 korišćen je 1% PVA, dok je u trećoj, četvrtoj i petoj seriji, prikazanim na slikama 4.39-4.41 korišćen 5% PVA. Rastvor je u svim serijama homogenizovan 10 min na 21000 rpm.

U svim serijama u kojima je kao model protein korišćen BSA (slike 4.33-4.36), dobijene su sferne čestice. U prvoj seriji su dobijene najnepravilnije čestice sa širokom raspodelom veličina, dok su u ostalim serijama dobijene pravilne sferne čestice sa uskom raspodelom veličina. Čestice u drugoj i trećoj seriji su delimično aglomerisane (slike 4.34 i 4.35). Sve serije su obeležene kao što je navedeno u tabeli 3.3.

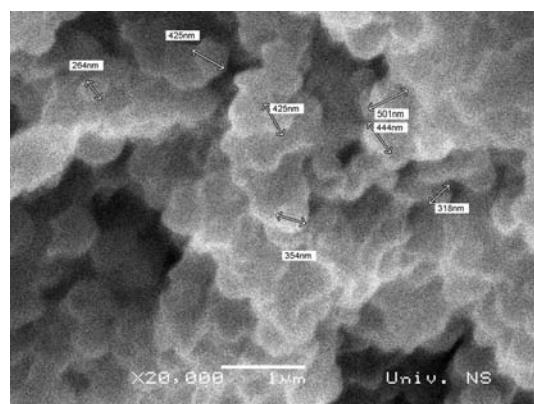
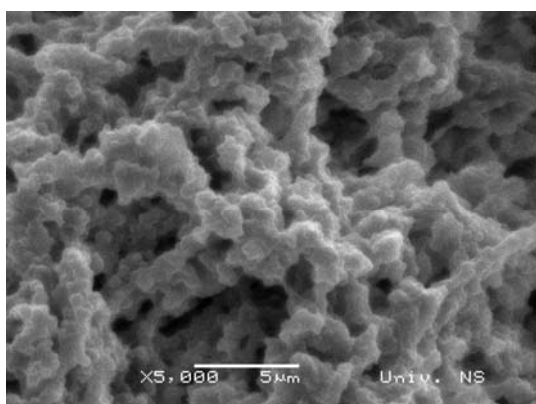
U svim serijama u kojima je kao model protein korišćen HRP (slike 4.37-4.41), dobijene su pravilne sferne čestice sa uskom raspodelom veličina. Sve čestice, osim čestica dobijenih u drugoj seriji (slika 4.38) imaju glatku površinu. Kod čestica druge serije, u kojoj je kao rastvarač korišćen toluol, može se primetiti prisustvo malih rupa na površini. Najpravilnije, približno uniformne sferne čestice su dobijene u četvrtoj seriji (slika 4.40). Sve serije su obeležene kao što je navedeno u tabeli 3.4.



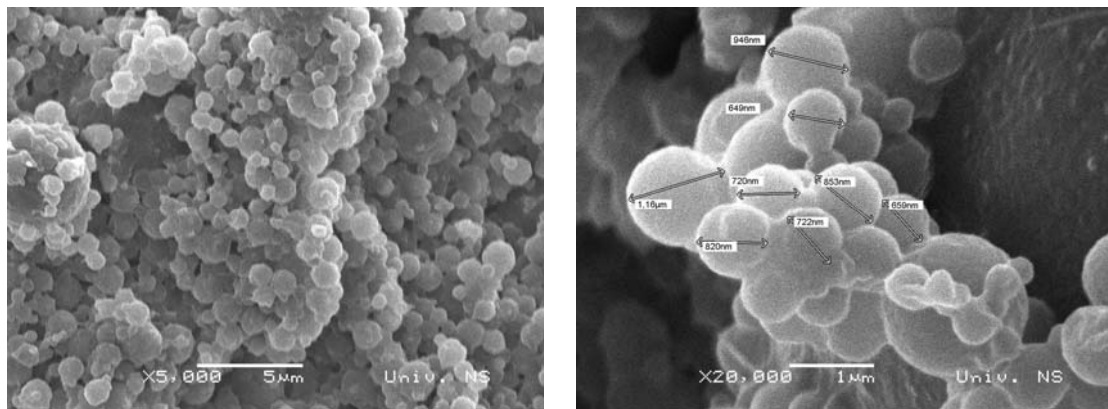
Slika 4.33 SEM fotografije serije 1 (PDLLA+BSA)



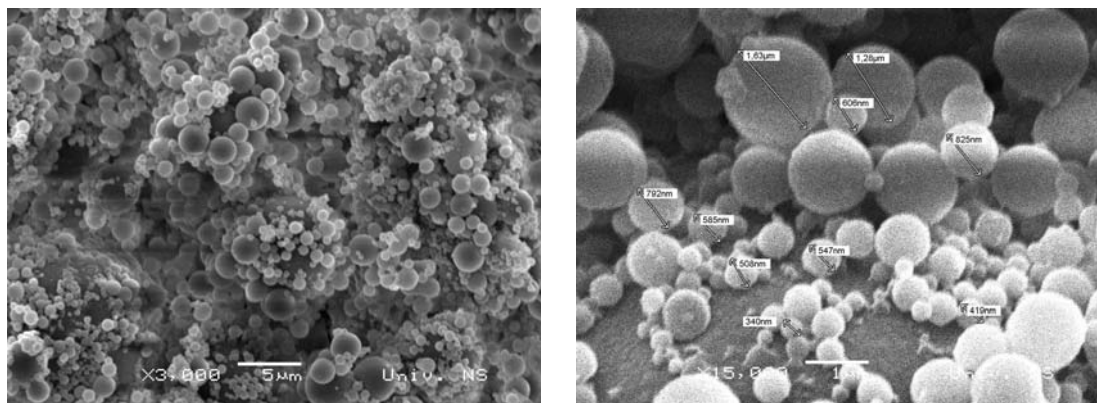
Slika 4.34 SEM fotografije serije 2 (PDLLA+BSA)



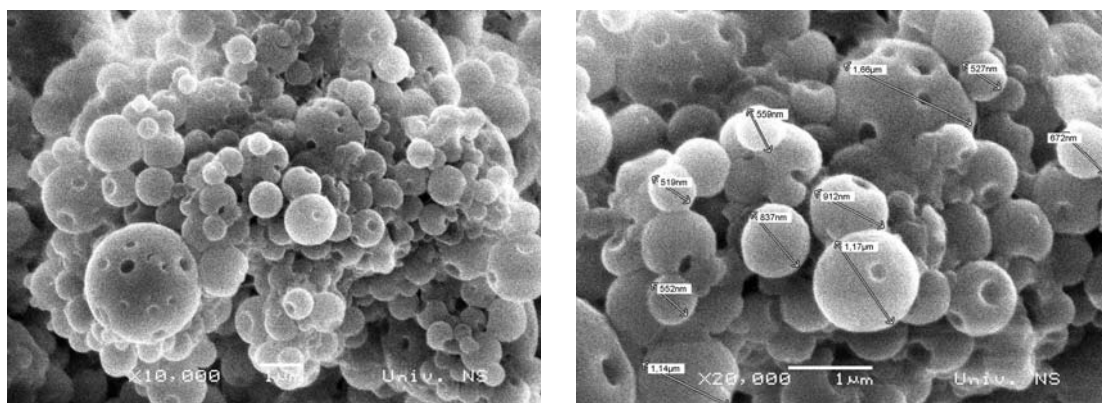
Slika 4.35 SEM fotografije serije 3 (PDLLA+BSA)



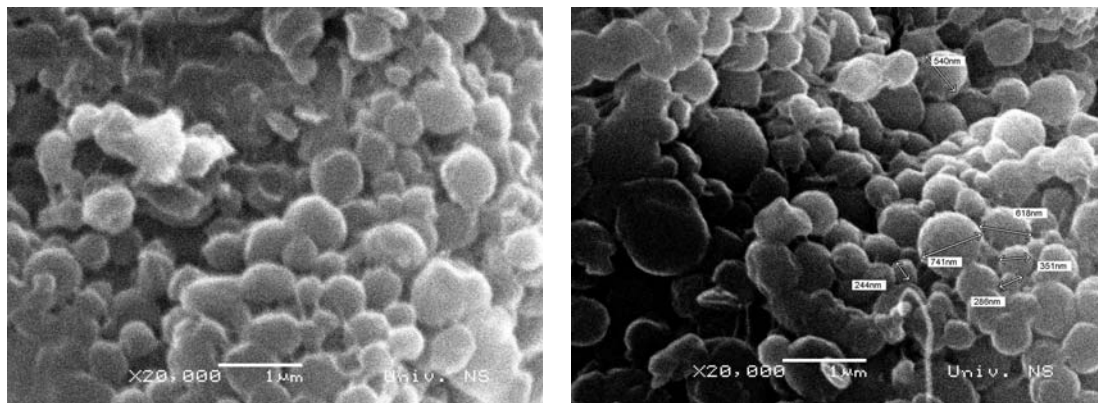
Slika 4.36 SEM fotografije serije 4 (PDLLA+BSA)



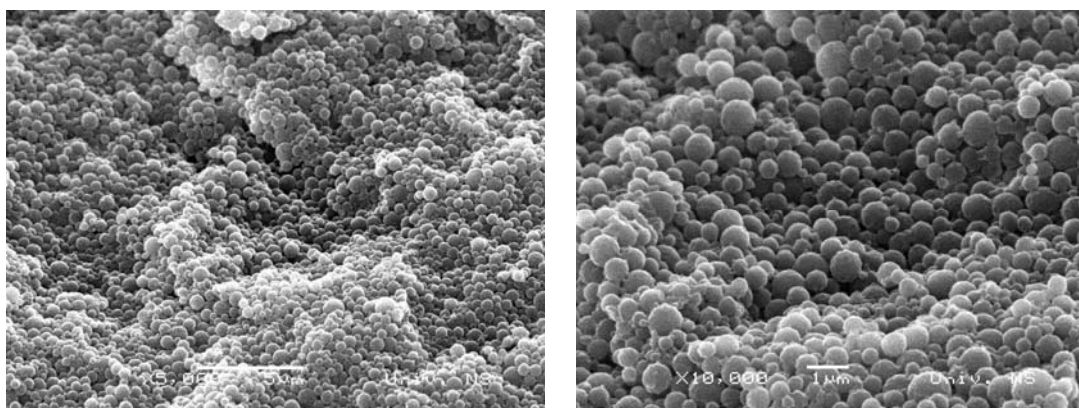
Slika 4.37 SEM fotografije serije 1 (PDLLA+HRP)



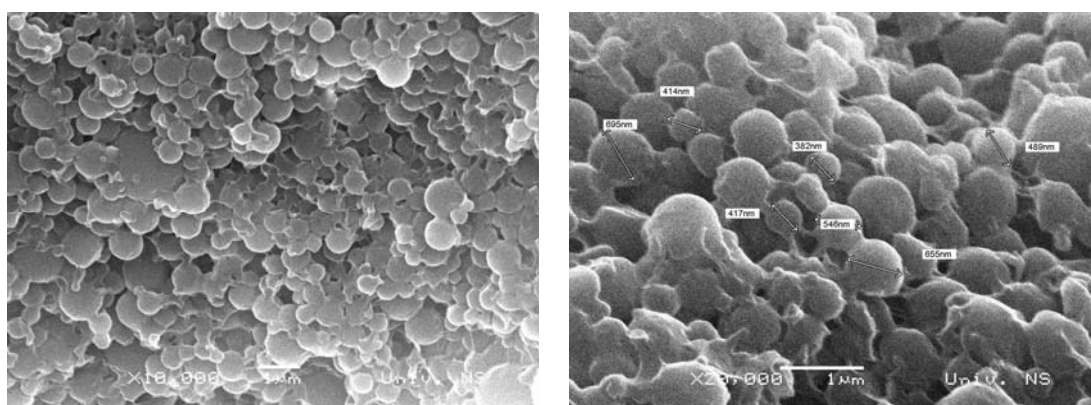
Slika 4.38 SEM fotografije serije 2 (PDLLA+HRP)



Slika 4.39 SEM fotografije serije 3 (PDLLA+HRP)



Slika 4.40 SEM fotografije serije 4 (PDLLA+HRP)



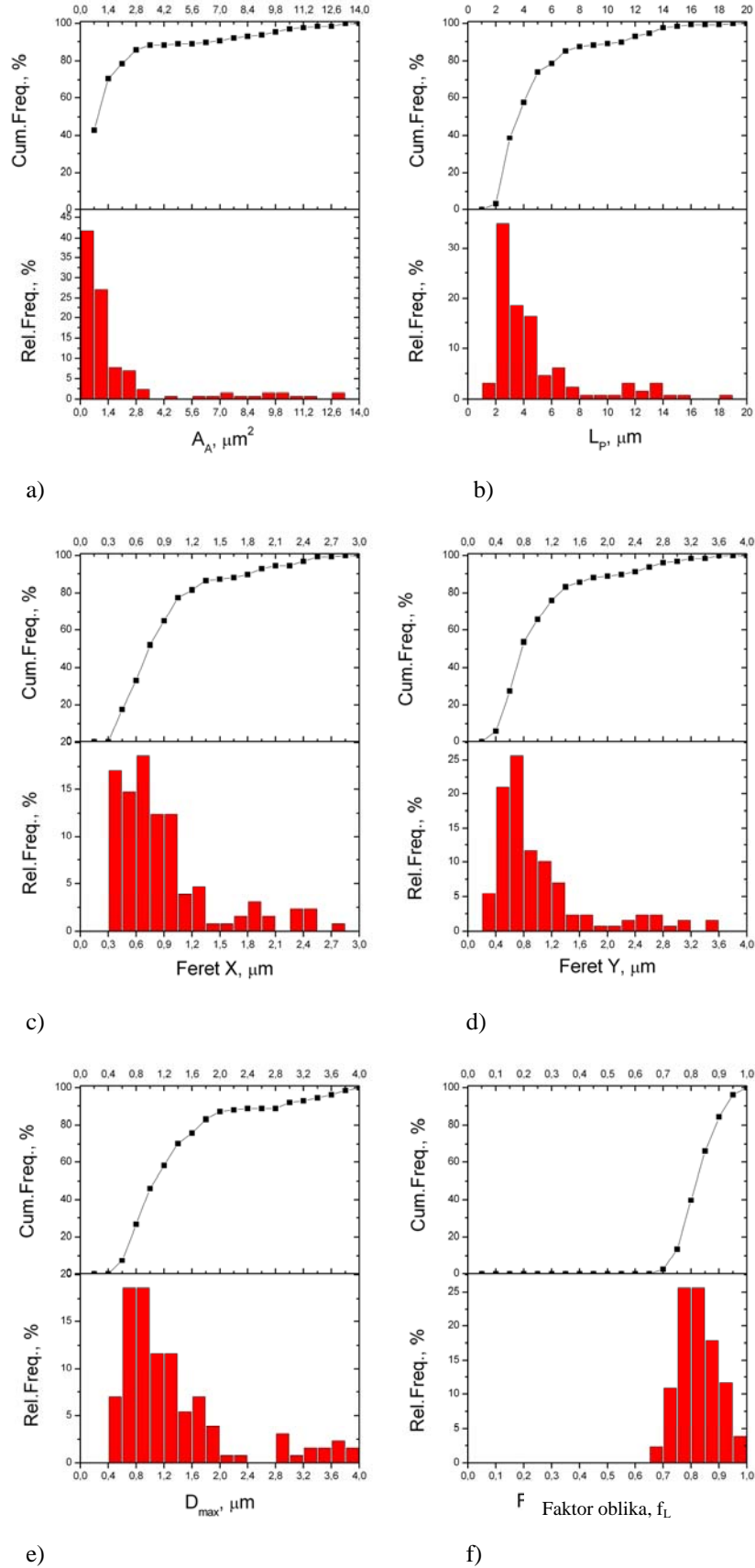
Slika 4.41 SEM fotografije serije 5 (PDLLA+HRP)

4.3.2 Rezultati stereološke analize prahova kompozita (PDLLA+BSA i PDLLA+HRP)

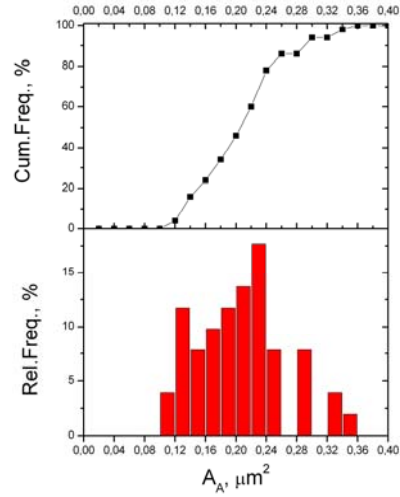
Sa SEM fotografija čestica prahova PDLLA u kojima je inkorporiran protein (BSA ili HRP) stereološkom analizom su određeni sledeći parametri: obim- L_p , poprečni presek- A_A , maksimalni prečnik čestice- D_{max} , feret X, feret Y, i faktor oblika (f_L). Na osnovu izmerenih vrednosti napravljeni su dijagrami kumulativne i relativne zavisnosti ovih veličina i određene su minimalne, maksimalne i srednje vrednosti svih veličina (tabele 5.3 i 5.4). Slike 4.42-4.45 predstavljaju serije u kojima je kao model protein korišćen BSA, a slike 4.46-4.50 predstavljaju serije u kojima je kao model protein korišćen HRP.

Na osnovu srednjih vrednosti maksimalnog prečnika čestica praha PDLLA u kojima je kao protein inkapsuliran BSA može se videti da su čestice u prvoj i četvrtoj seriji, u kojima je korišćen 1% PVA, veće (slike 4.42 i 4.45) sa srednjim prečnikom 1.50 μm i 1.15 μm , respektivno (tabela 5.3). Čestice u drugoj i trećoj seriji, u kojima je korišćen 5% PVA, su manje (slike 4.43 i 4.44) sa srednjim prečnikom 530 nm i 490 nm, respektivno (tabela 5.3). U svim serijama je kao ko-rastvarač korišćen etanol, osim u trećoj seriji u kojoj je kao ko-rastvarač korišćen metanol. U svim serijama su dobijene pravilne sferne čestice sa srednjom vrednošću faktora oblika 0.83, 0.83, 0.82 i 0.87 (serije 1-4 tabela 5.3).

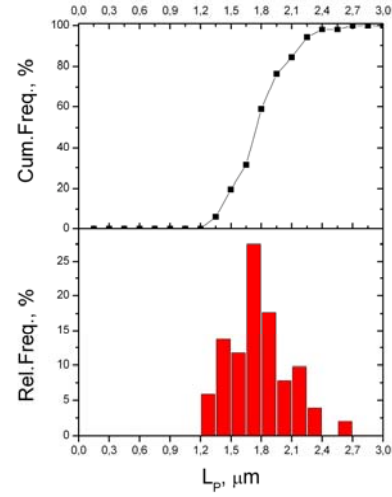
Na osnovu srednjih vrednosti maksimalnog prečnika čestica praha PDLLA u kojima je kao protein inkapsuliran HRP se može videti da su čestice u prvoj i drugoj seriji, u kojima je korišćen 1% PVA veće (slike 4.46 i 4.47), sa srednjim prečnikom 1.13 μm i 0.96 μm , respektivno. Čestice dobijene u trećoj, četvrtoj i petoj seriji, u kojima je korišćen 5% PVA, su manje (slike 4.48-4.50) sa srednjim prečnikom 460 nm, 530 nm i 590 nm, respektivno (tabela 5.4). Srednje vrednosti faktora oblika čestica prve i druge serije su 0.88 i 0.81, dok su srednje vrednosti faktora oblika treće, četvrte i pete serije 0.77, 0.78 i 0.81, respektivno (tabela 5.4).



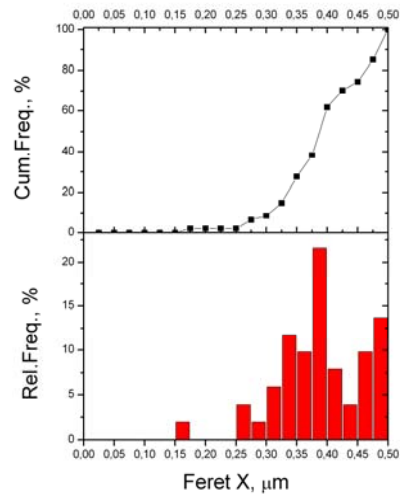
Slika 4.42 Rezultati stereoloških merenja čestica praha PDLLA u kojem je inkorporiran protein BSA-serija 1. a) poprečni presek- A_A , b) obim- L_P , c) feret X, d) feret Y, e) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , f) faktor oblika- f_L



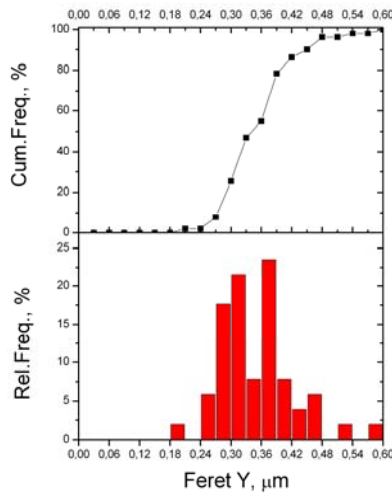
a)



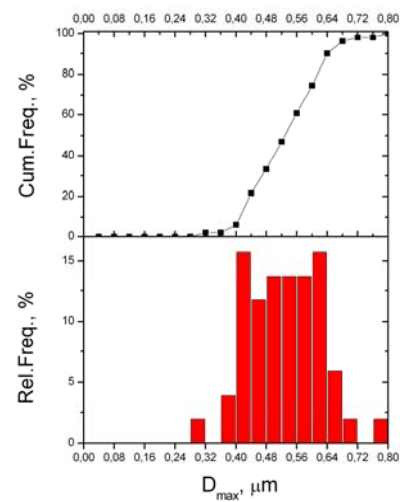
b)



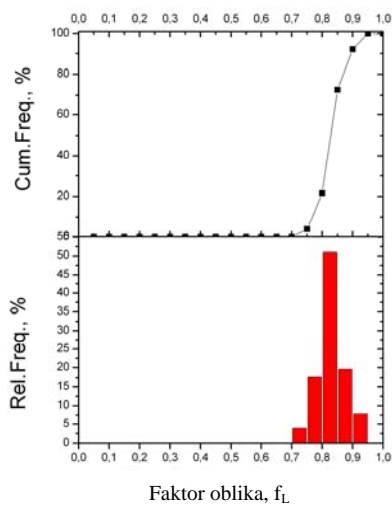
c)



d)

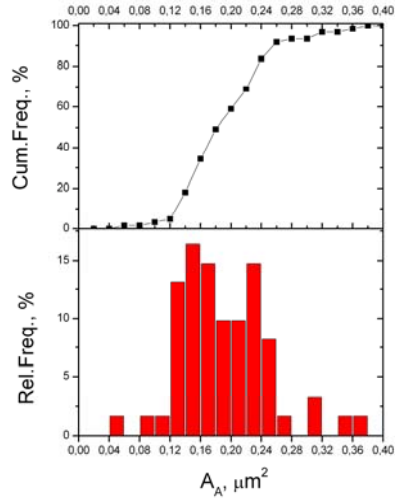


e)

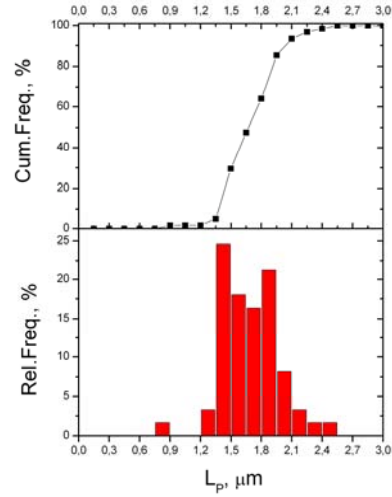


f)

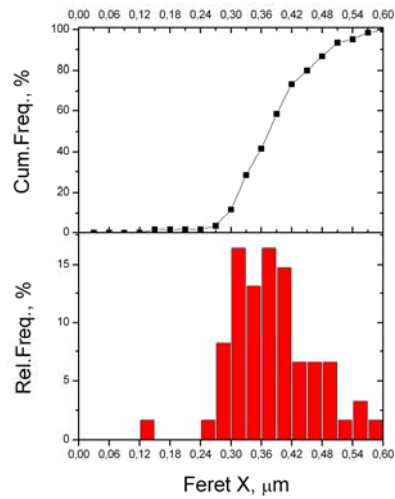
Slika 4.43 Rezultati stereoloških merenja čestica praha PDLLA u kojem je inkorporiran protein BSA-serija 2. a) poprečni presek- A_A , b) obim- L_P , c) feret X, d) feret Y, e) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , f) faktor oblika- f_L



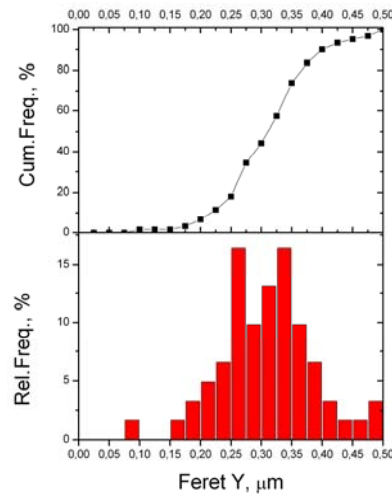
a)



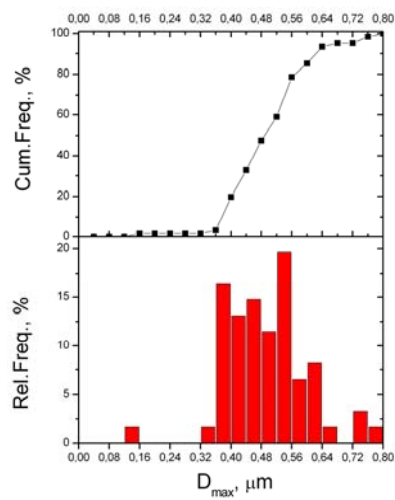
b)



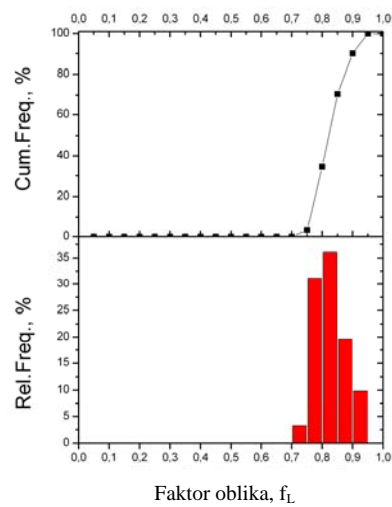
c)



d)

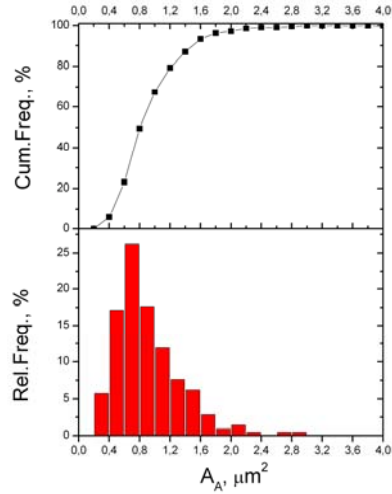


e)

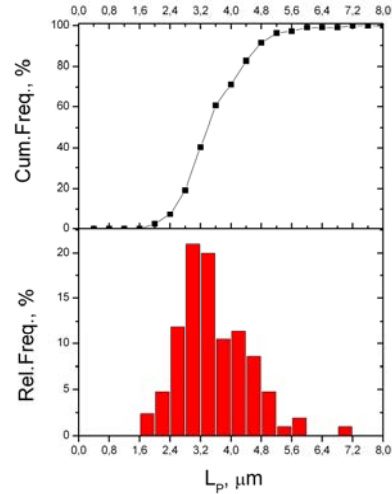


f)

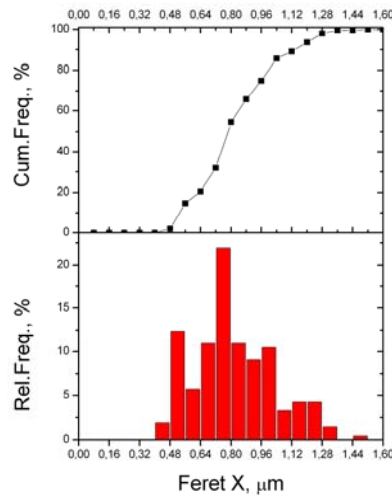
Slika 4.44 Rezultati stereoloških merenja čestica praha PDLLA u kojem je inkorporiran protein BSA-serija 3. a) poprečni presek- A_A , b) obim- L_P , c) feret X, d) feret Y, e) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , f) faktor oblika- f_L



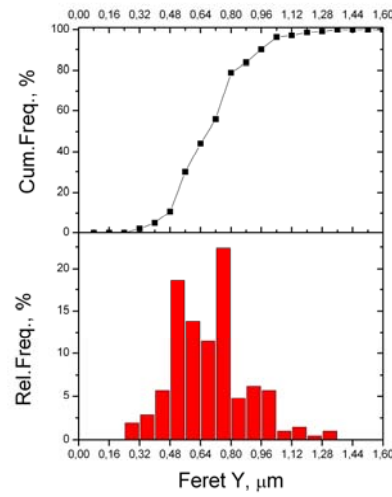
a)



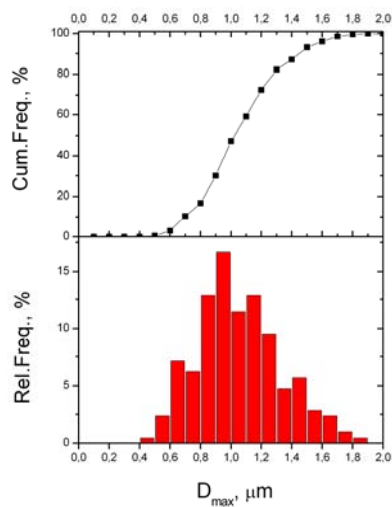
b)



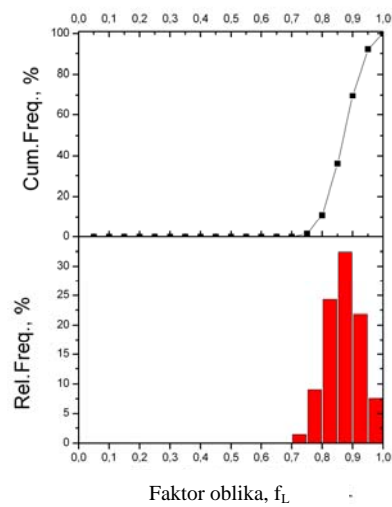
c)



d)

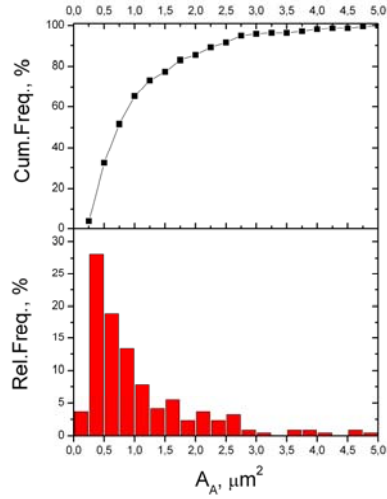


e)

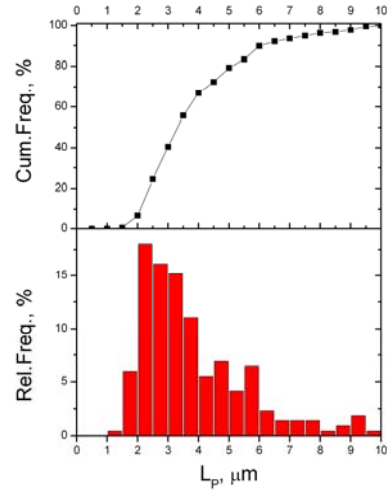


f)

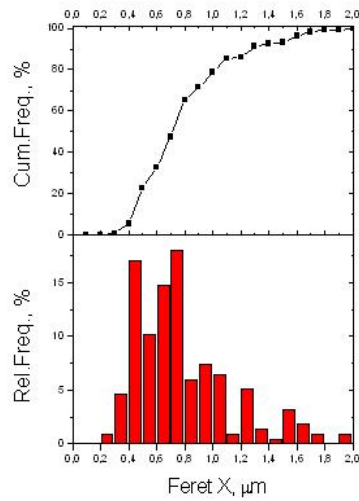
Slika 4.45 Rezultati stereoloških merenja čestica praha PDLLA u kojem je inkorporiran protein BSA-serija 4. a) poprečni presek- A_A , b) obim- L_P , c) feret X, d) feret Y, e) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , f) faktor oblika- f_L



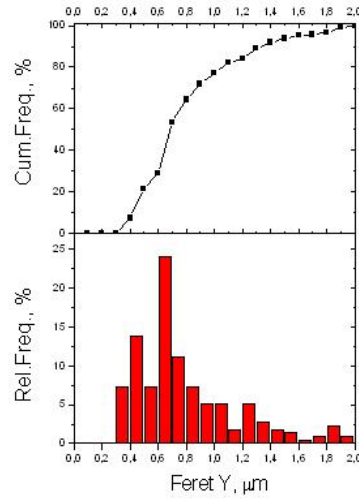
a)



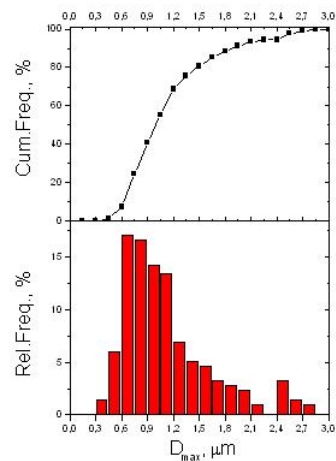
b)



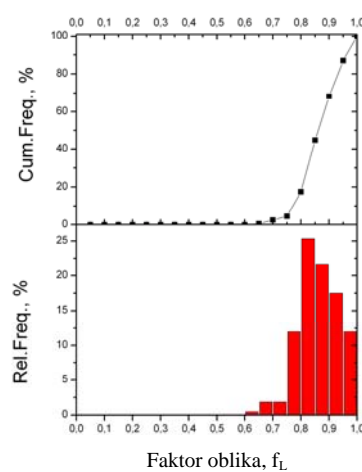
c)



d)

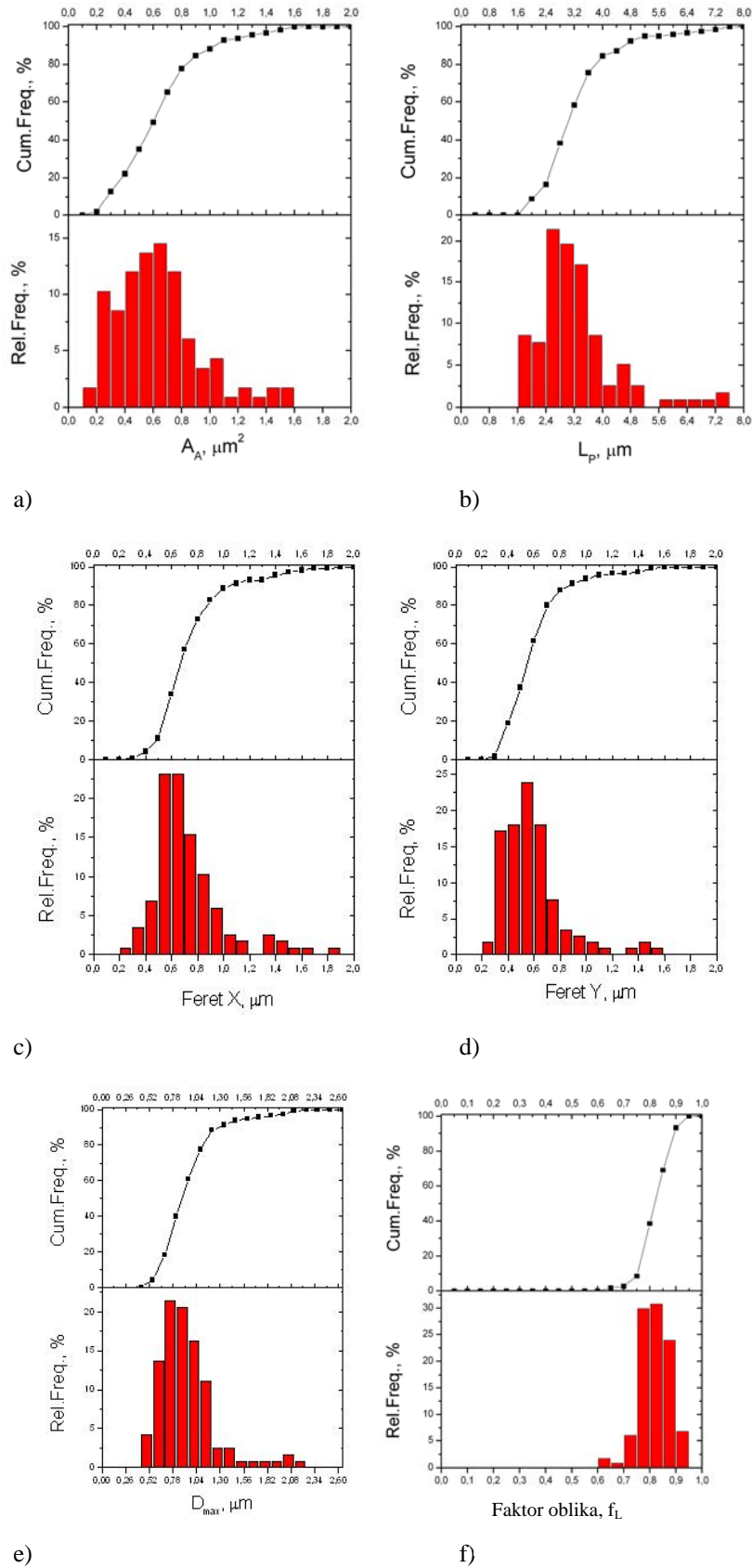


e)

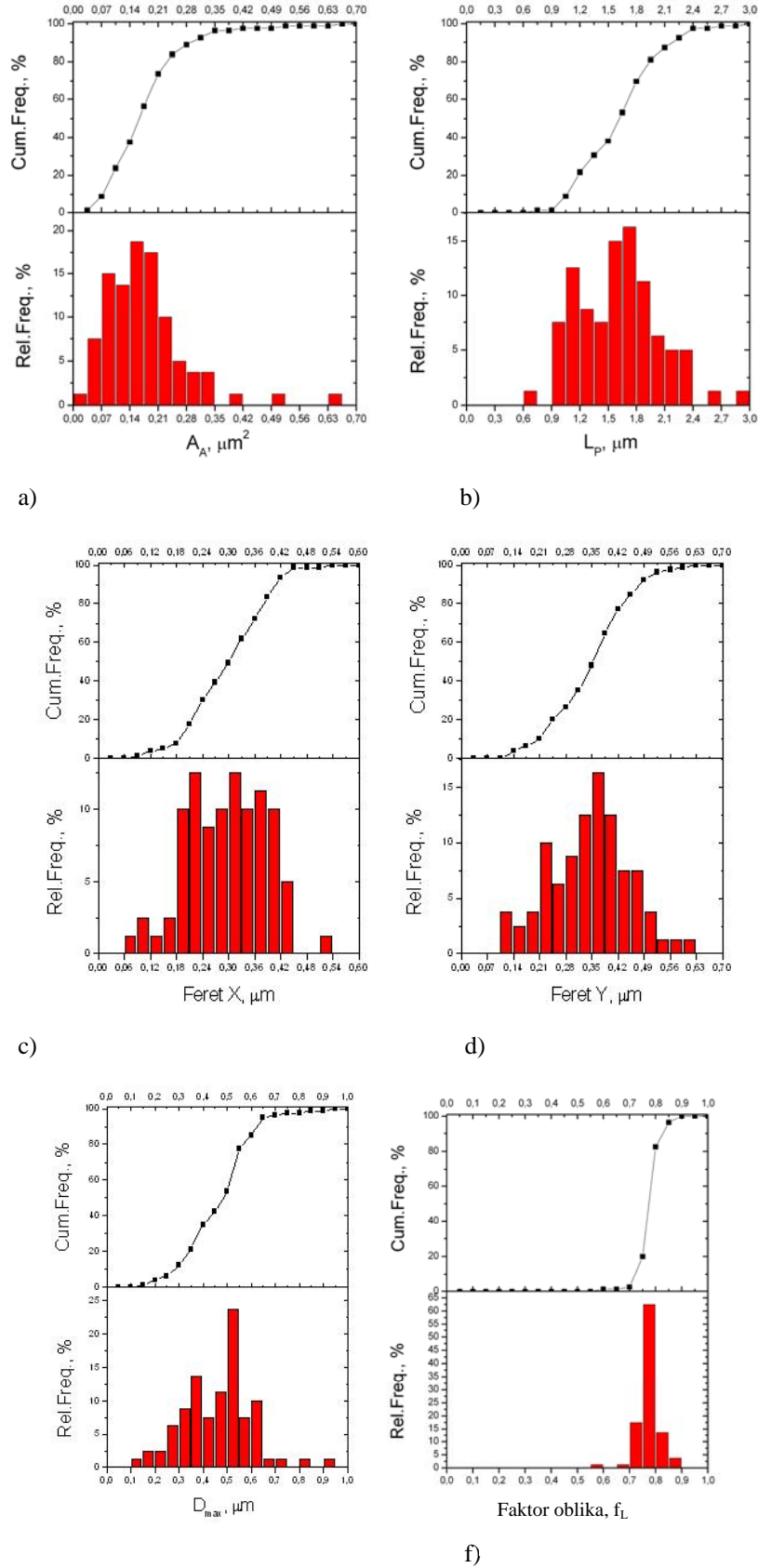


f)

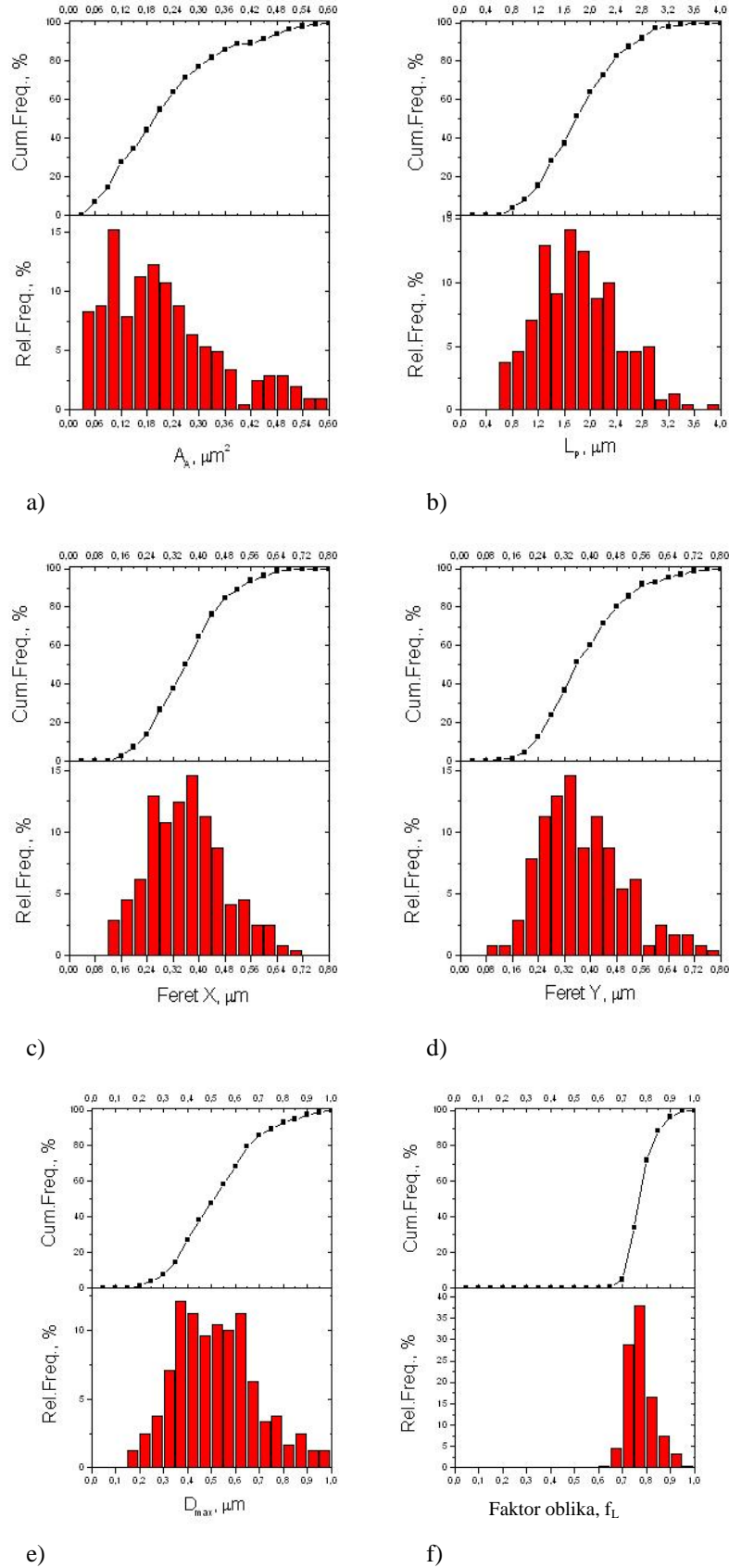
Slika 4.46 Rezultati stereoloških merenja čestica praha PDLLA u kojem je inkorporiran protein HRP-serija 1. a) poprečni presek- A_A , b) obim- L_p , c) feret X, d) feret Y, e) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , f) faktor oblika- f_L



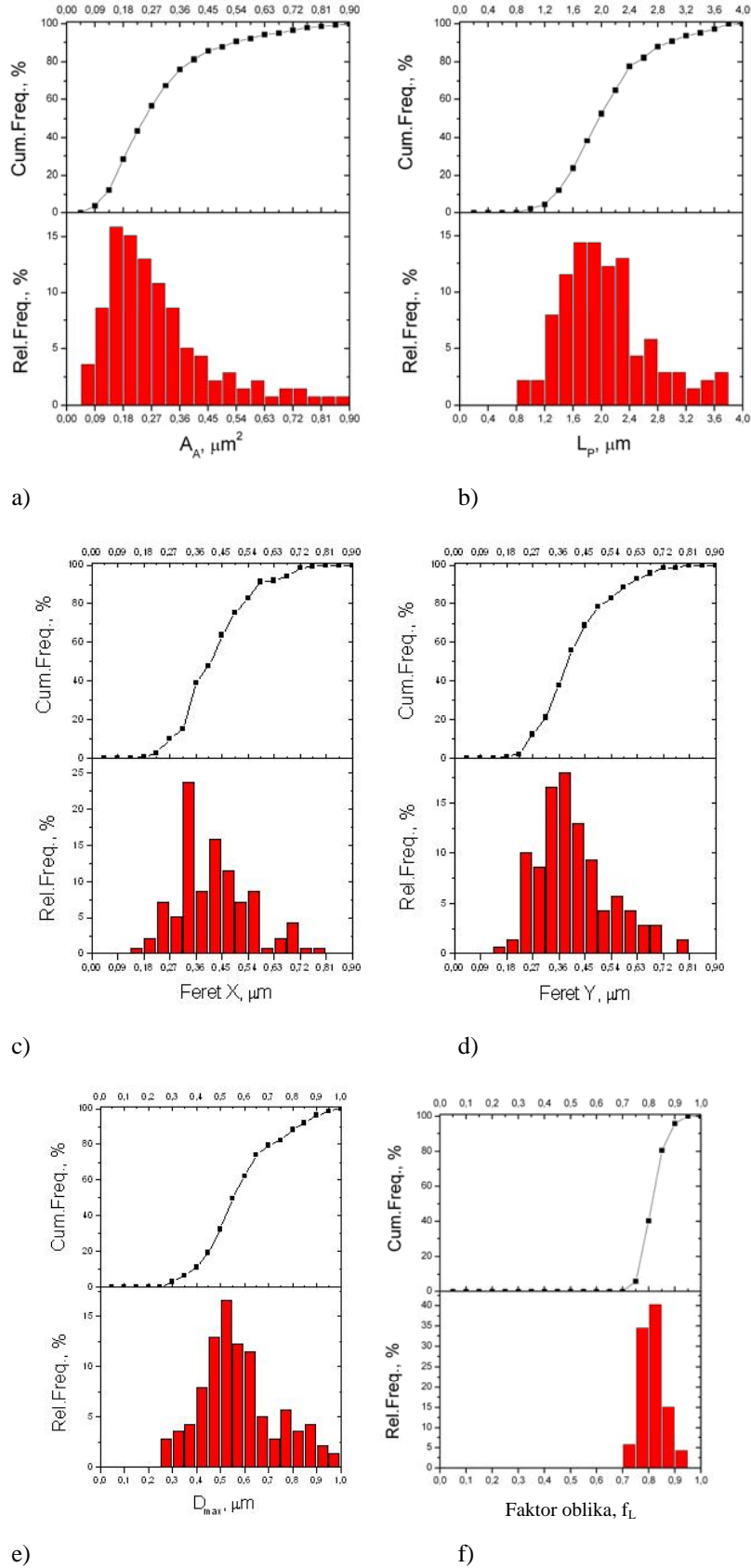
Slika 4.47 Rezultati stereoloških merenja čestica praha PDLLA u kojem je inkorporiran protein HRP-serija 2. a) poprečni presek- A_A , b) obim- L_P , c) feret X, d) feret Y, e) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , f) faktor oblika- f_L



Slika 4.48 Rezultati stereoloških merenja čestica praha PDLLA u kojem je inkorporiran protein HRP-serija 3. a) poprečni presek- A_A , b) obim- L_p , c) feret X, d) feret Y, e) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , f) faktor oblika- f_L



Slika 4.49 Rezultati stereoloških merenja čestica praha PDLLA u kojem je inkorporiran protein HRP-serija 4. a) poprečni presek- A_A , b) obim- L_p , c) feret X, d) feret Y, e) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , f) faktor oblika- f_L



Slika 4.50 Rezultati stereoloških merenja čestica praha PDLLA u kojem je inkorporiran protein HRP-serija 5. a) poprečni presek- A_A , b) obim- L_P , c) feret X, d) feret Y, e) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , f) faktor oblika- f_L

4.3.3 Rezultati SDS-PAGE elektroforeze prahova kompozita (PDLLA+BSA i PDLLA+HRP)

Kvalitativna analiza kompozitnog praha sastavljanog od polimera PDLLA i proteina, BSA ili HRP, je urađena primenom elektroforeze. Za razdvajanje i karakterizaciju proteina korišćena je tehnika jednodimenzionalne elektroforeze u poliakrilamidnom gelu u prisustvu sodium-dodecilsulfata (SDS-PAGE) po modifikovanoj metodi Sambrook-a i sar. (1989) [118], koju je postavio Laemmli (1970) [119].

Ova metoda se zasniva na razdvajanju proteina na osnovu njihovih molekulskih masa, gde poliakrilamidni gel služi kao inertni matriks kroz čije se pore proteini kreću pod uticajem električnog polja. Veličina pora varira u zavisnosti od procenta akril- i bis-akrilamida u gelu i podešava se prema opsegu molekulskih masa proteina koji se razdvajaju. Negativno naelektrisani molekuli SDS-a, prisutni u rastvoru u kome se resuspenduju uzorci, vezuju se svojim hidrofobnim delom za hidrofobne delove molekula proteina. Pošto je količina SDS-a vezanog za jedinicu mase proteina konstantna (1.4 g SDS-a / 1 g proteina), šarža proteina je određena SDS-om a ne šaržama amino kiselina. Tako je veličina negativne šarže svakog proteina direktno proporcionalna njegovoj molekulskoj težini. U električnom polju, tokom elektroforeze, negativno naelektrisani proteini kreću se ka pozitivnom polu kroz poliakrilamidni gel koji služi kao molekulsko sito. Ovako se proteini razdvajaju u niz diskretnih traka koje postaju vidljive nakon bojenja gelova.

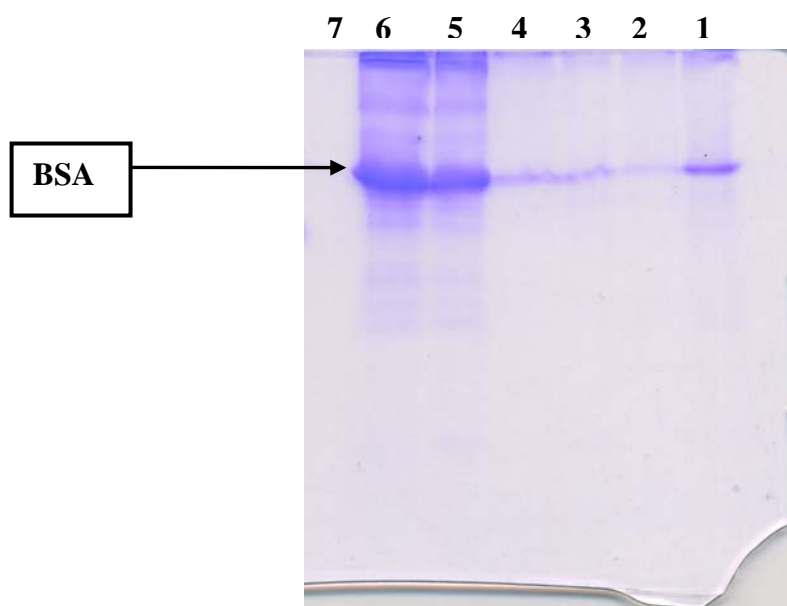
U eksperimentima je kao gel za razdvajanje korišćen 12% poliakrilamidni gel sledećeg sastava: 11.7% akrilamid, 0.3% metilen-bis-akrilamid, 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.1% SDS, 0.05% amonijum - persulfat i 0.05% TEMED (tetrametil-etilen-diamin). Preko polimerizovanog gela za razdvajanje u pločama, naliven je 4% gel za skoncentrisavanje uzoraka u sastavu: 3.9% akrilamid, 0.1% metilen-bis-akrilamid, 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.1% SDS, 0.05% amonijum - persulfat, 0.1% TEMED. Proteini su pre nanošenja na elektroforezu rastvoreni u puferu za uzorke: 2% SDS, 0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, 5% β -merkaptoetanol, 8.8% glicerol i 0.05% bromfenol plavo. Kao pufer za elektroforezu korišćen je Tris-glicinski pufer, pH 8.8: 0.195 M glicin, 25 mM Tris-HCl, pH 8.8, 0.1% SDS. Kroz gel za skoncentrisavanje uzorci su putovali pri naponu 0.12 kV, a nakon ulaska u gel za razdvajanje napon je povećan na 0.15 kV. Elektroforeza je trajala jedan sat, odnosno do izlaska boje bromfenol plavo iz gela, a rađena je u mini Bio-Rad sistemu (Mini-PROTEAN II electrophoresis cell). Po završetku elektroforeze gelovi su bojeni Coomassie plavim.

Bojenje proteina u poliakrilamidnom gelu

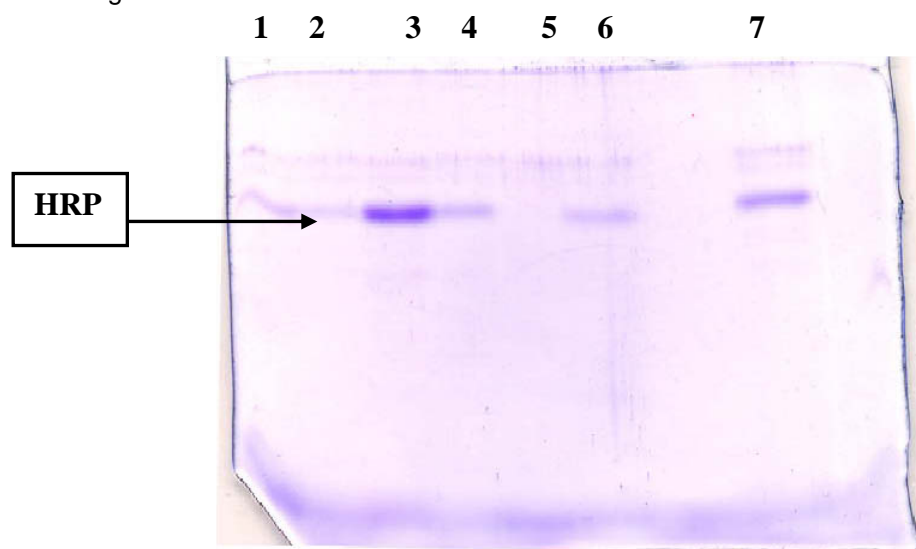
Nakon elektroforeze proteini su bojeni potapanjem gela u rastvor: 0.2% Coomassie plavo (Coomassie Brilliant Blue R-250), 45% metanol i 10% glacijalna sirćetna kiselina, preko noći uz mešanje. Odbojavanje gelova, u cilju uklanjanja nespecifično vezane boje, vršeno je u smeši metanola, vode i glacijalne sirćetne kiseline u odnosu 4.5 : 4.5 : 1 (v/v).

Sa gela elektroforeze se može potvrditi prisustvo proteina u različitim serijama. Trake predstavljaju serije koje su rađene pod različitim uslovima i navedene su u tabeli 3.3. Na osnovu

elektroforeze se može reći da je u polimernoj matrici u svim slučajevima uspešno inkapsuliran protein BSA molekulske mase 65 kDa [36].



Slika 4.51 Gel elektroforeze proteina BSA: serija 1-traka 1, serija 2-traka 3, serija 3-traka 5, serija 4-traka 7. Na osnovu slike gela elektroforeze (slika 4.51) se može potvrditi prisustvo proteina BSA, molekulske mase 65 kDa [78], u svim serijama osim u četvrtoj seriji. U četvrtoj seriji BSA je korišćen u svojstvu površinskog stabilizatora.



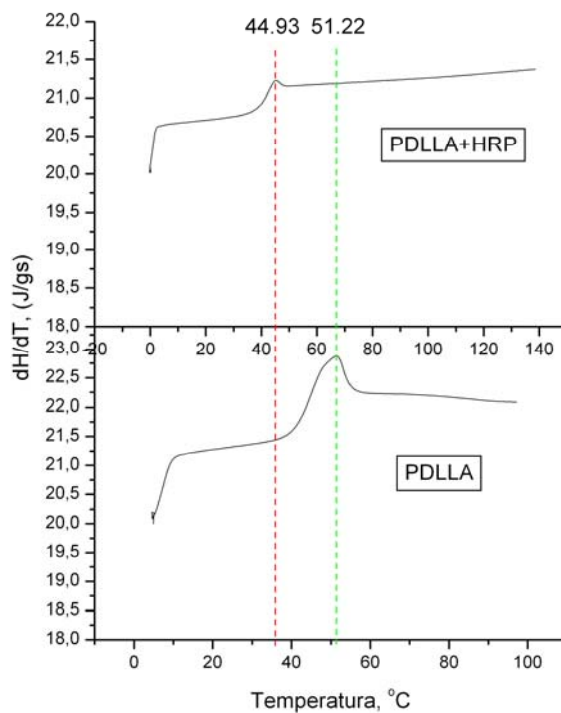
Slika 4.52 Gel elektroforeze proteina HRP: serija 1-traka 4, serija 2-traka 5, serija 3-trake 1 i 3, serija 4-traka 7, serija 5-trake 2 i 6

Sa slike 4.52 gela elektroforeze može se potvrditi prisustvo proteina u različitim serijama. Trake predstavljaju serije koje su rađene pod različitim uslovima i navedene su u tabeli 3.4. Na osnovu elektroforeze se može reći da je u polimernoj matrici uspešno inkapsuliran protein u svim slučajevima, osim kada je kao rastvarač korišćen toluol (druga serija). Protein koji je inkapsuliran u svim serijama je peroksidaza, HRP molekulske mase 45 kDa [36]. Na osnovu slike gela

elektroforeze (slika 4.52) se može potvrditi prisustvo proteina HRP, molekulske mase 45 kDa [36], u svim serijama osim u drugoj seriji. U drugoj seriji je kao rastvarač korišćen toluol, koji je izazvao trenutnu difuziju proteina iz polimernih čestica.

4.3.4 Rezultati diferencijalne skanirajuće kalorimetrije prahova kompozita (PDLLA+BSA i PDLLA+HRP)

Diferencijalna skanirajuća kalorimetrija (DSC) je jedna od metoda koja je korišćena za karakterizaciju praha poli(DL-laktida) (PDLLA) i praha kompozita PDLLA u kojem je inkorporiran protein HRP. Merenja su rađena u temperaturnom opsegu od 0°C do 140°C sa brzinom grejanja od 10°C u minuti. PDLLA je amorfni polimer sa temperaturom staklastog prelaza (T_g) u opsegu oko 50-60°C [11, 59, 116]. Na slici 4.53 prikazane su DSC krive prahova čistog polimera PDLLA i kompozita koji se sastoji od PDLLA i HRP. Na DSC krivama se može uočiti samo pik staklastog prelaza jer je polimer PDLLA amorfni [11, 59, 116]. Sa DSC dijagrama se može videti da se kod čistog praha PDLLA javlja staklasti prelaz na temperaturi $T_g = 51,22$ °C, dok je kod kompozita koji se sastoji od PDLLA i HRP temperatura staklastog prelaza znatno niža i nalazi se na $T_g = 44,93$ °C. Na osnovu sniženja temperature staklastog prelaza, može se zaključiti da je precipitacionom metodom koja je korišćena za dobijanje kompozitnog praha, uspešno inkorporiran protein HRP u polimer PDLLA. Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da je inkorporiranjem proteina HRP u polimeru PDLLA došlo do promene u strukturi polimera.



Slika 4.53 DSC krive čistog praha PDLLA i praha kompozita PDLLA+HRP

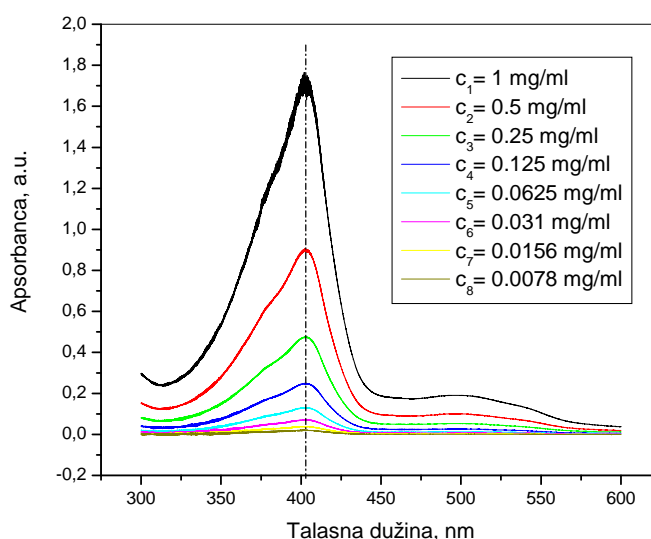
4.3.5 Određivanje efikasnosti inkapsulacije

Za izračunavanje mase inkapsulirane peroksidaze u polimernoj matrici PDLLA (loading amount) i efikasnosti inkapsulacije (loading efficiency) korišćena je indirektna metoda opisana od strane Liu i saradnika [120] i Dinarvand-a i saradnika [96]. Obe metode, direktna (rastvaranje dobijenih čestica i merenje količine medikamenta na osnovu apsorpcije, Dinarvand i saradnici) i indirektna (merenje neinkapsuliranog medikamenta u supernatantu dobijenom u procesu sinteze a zatim indirektno izračunavanje inkapsuliranog medikamenta) se koriste za određivanje efikasnosti inkapsulacije.

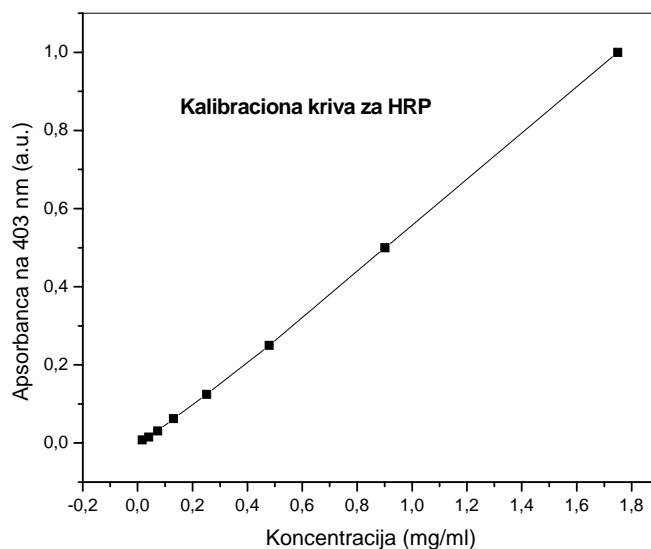
Peroksidaza apsorbuje svetlost u vidljivoj oblasti na karakterističnoj talasnoj dužini $\lambda=403$ nm. Na osnovu merenja apsorpcije na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije, $\lambda_{\max}=403$ nm, vodenog rastvora sa poznatim koncentracijama peroksidaze (slika 4.54), je napravljena kalibraciona kriva (slika 4.55). Linearna zavisnost između apsorpcije na 403 nm i koncentracije data je Lambert-Beerovim zakonom: $A=abc$ (gde je a apsorptivnost ($\text{g}^{-1}\text{dm}^{-3}\text{cm}^{-1}$), b debljina sloja (cm), i c je koncentracija uzorka, u ovom slučaju koncentracija peroksidaze (gdm^{-3})). Supernatant dobijen tokom procesa sinteze je analiziran korišćenjem UV spektrofotometra i koncentracija peroksidaze u supernatantu je određivana primenom kalibracione krive. Koncentracija neinkapsulirane peroksidaze je izračunata na osnovu apsorpcije supernatanta. Poznavajući inicijalnu količinu peroksidaze unetu u sistem (M_{uk}) i koncentraciju (slika 4.55), odnosno masu neinkapsulirane peroksidaze ($M_{neink.}$) izračunata je masa inkapsulirane peroksidaze ($M_{inkap.}$), na osnovu čega je određena efikasnost inkapsulacije. Masa inkapsulirane peroksidaze i efikasnost inkapsulacije su izračunate na osnovu sledećih jednačina:

$$(1) M_{inkap.} = M_{uk.} - M_{neink.}$$

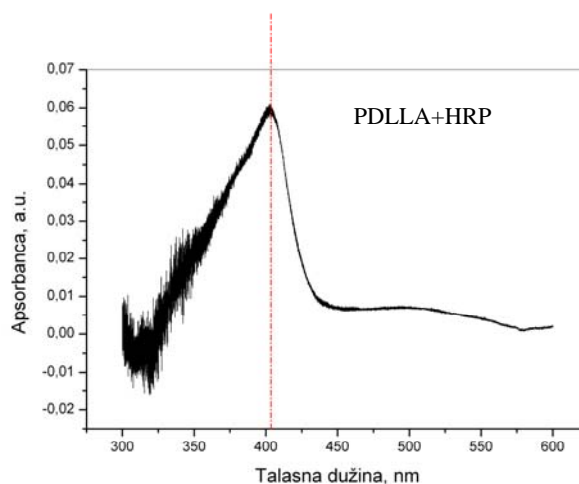
$$(2) \text{Efikasnost inkapsulacije (\%)} = \left[M_{inkap.} / M_{uk.} \right] \times 100$$



Slika 4.54 Apsorpcioni spektri različitih koncentracija vodenog rastvora peroksidaze HRP



Slika 4.55 Kalibraciona kriva peroksidaze na talasnoj dužini, $\lambda=403$ nm



Slika 4.56 Apsorpcioni spektar peroksidaze prisutne u supernatantu (serija 3 tabela 3.4)

Apsorbanca peroksidaze na 403 nm iznosi 0,0593.

Sadržaj inkapsuliranog leka je određen korišćenjem UV spektrofotometra (GPC Cintra) na 403 nm. Ukupna efikasnost inkapsulacije je izračunata na osnovu proračuna masene koncentracije leka u supernatantu (0.0212 mg/ml) pomnožene sa ukupnom zapreminom supernatanta (25.5ml) [78]. Koncentracija peroksidaze u supernatantu (0.0212 mg/ml) je izračunata na osnovu apsorbancije za peroksidazu na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije $\lambda=403$ nm (slika 4.55). Uz pretpostavku da je ukupna količina peroksidaze koja nije prisutna u supernatantu inkapsulirana u česticama PDLA (što se može zaključiti na osnovu filma elektroforeze (slika 4.52-traka 7)), iz razlike mase peroksidaze unete u sistem (1 mg) i mase peroksidaze u supernatantu (0.54 mg), izračunata je efikasnost inkapsulacije koja iznosi 46%.

5. Diskusija

5.1 Uticaj procesnih parametara na morfologiju čestica PLLA

Brojne fizičke karakteristike sistema za kontrolisanu dostavu lekova, kao što su veličina sfera, površina i poroznost, imaju bitnu ulogu u brzini degradacije samog polimera, a samim tim utiču i na mehanizam otpuštanja aktivne supstance. Za sistem koji će se koristiti za kontrolisanu dostavu lekova, vrlo je važno da se prouči proces degradacije finalnog sistema, iz razloga što se on može prilično razlikovati od procesa degradacije koji je karakterističan za čist, komercijalni polimer.

Cilj našeg rada je da se ispita uticaj različitih parametara procesa dobijanja mikrosfera PLLA i PDLLA, na karakteristike dobijenih čestica. U ovom radu su istom metodom dobijeni prahovi PLLA i PDLLA uz određene modifikacije usled specifičnosti svakog polimera. Identična metoda je korišćena i za procesiranje mikrosfera PDLLA u kojima je inkorporiran protein. Kao model proteini korišćeni su BSA i HRP; oba proteina su hidrofilna [121, 122].

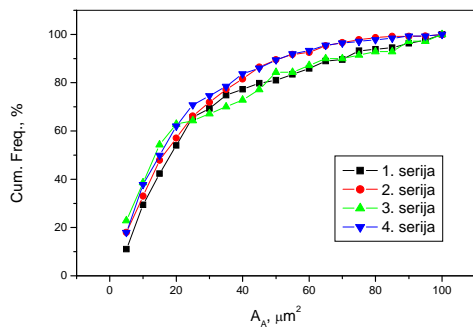
Stabilnost polimerne matrice zavisi od različitih faktora, kao što su: metoda procesiranja mikrosfera, karakteristike samog polimera i uslovi procesiranja, ali takođe i od oblika i veličine dobijenih čestica. Sama metoda procesiranja sistema za kontrolisanu dostavu lekova, karakteristike polimera PLLA i PDLLA (početna molekulska masa) kao i uslovi procesiranja (temperatura, pH, jonska jačina...) se mogu dosta razlikovati od sistema do sistema, što ih čini složenim za upoređivanje. Neophodno je da se precizno ispituju karakteristike svakog novog sistema, koji će se koristiti za kontrolisanu dostavu lekova.

U ovom radu, modifikovana precipitaciona metoda, koja je nedavno primenjena za dobijanje mikročestica PLGA [123-129] je korišćena za dobijanje mikrosfera PLLA [117] i PDLLA [130] sa različitim karakteristikama (bez i sa inkorporiranim proteinom BSA ili HRP). Varirani su različiti parametri procesa kako bi se ispitao njihov uticaj na veličinu i oblik čestica dobijenih modifikovanom precipitacionom metodom. Svi procesni parametri su navedeni u tabelama 3.1-3.4. Uloga ko-rastvarača je bila da pomogne u formiranju homogene disperzije napravljene od proteina (BSA ili HRP) koji je rastvoren u vodi i polimera koji je rastvoren u hloroformu. U samom procesu surfaktant (PVA) ima ulogu hemijske barijere koja štiti kompozitne čestice od aglomeracije [43]. PVA je izabran kao surfaktant iz razloga što nije štetan za ljudsko telo i što se već nalazi u komercijalnoj upotrebi [6]. Polivinil alkohol se pokazao kao jedan od najpoželjnijih surfaktanata, kada se voda koristi kao kontinualna faza [32]. Brzina homogenizacije je jedan od bitnijih faktora koji utiče na pravljenje malih i uniformnih mikročestica. Takođe, brzina homogenizacije dosta utiče na efikasnost inkapsulacije aktivne supstance. Mešanje izaziva disperziju rastvarača na kapljice nepravilnih veličina koje su u ravnoteži sa kontinualnom fazom, pri čemu se stvaraju veće međupovršine na kojima se adsorbuje stabilizator. Dodavanje vode i korak centrifugiranja destabilišu ravnotežu i izazivaju difuziju organskog rastvarača ka spoljnoj površini. Stereološki rezultati parametara koji definišu česticu, L_p , D_{max} , feret X, feret Y i perimeter form faktor (minimalne, maksimalne i srednje vrednosti) su prikazani u tabeli 5.1.

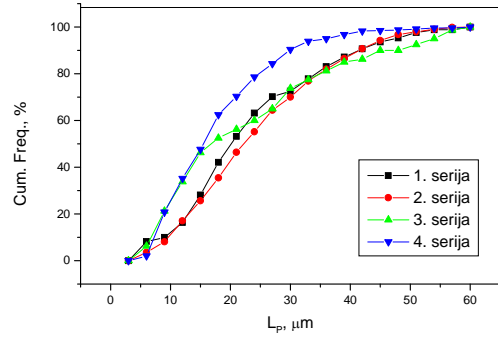
Tabela 5.1 Rezultati stereološke analize praha PLLA

Prah PLLA (serija)	Lp (µm)			Dmax (µm)			Feret X (µm)			Feret Y (µm)			Faktor oblika (µm)		
	min	max	srednji	min	max	srednji	min	max	srednji	min	max	srednji	min	max	srednji
1	13.26	211.25	77.10	2.53	64.40	22.38	1.98	57.12	16.29	1.59	36.10	14.97	0.4	0.99	0.81
2	6.30	125.66	40.41	0.82	36.61	10.94	0.51	28.07	7.93	0.51	23.50	7.42	0.26	1.00	0.86
3	2.44	70.18	19.58	0.92	28.55	6.69	0.77	28.10	5.06	0.39	13.79	4.23	0.54	1.00	0.80
4	5.42	58.56	17.34	0.98	16.55	4.93	0.59	14.55	3.70	0.49	11.40	3.19	0.15	1.00	0.82

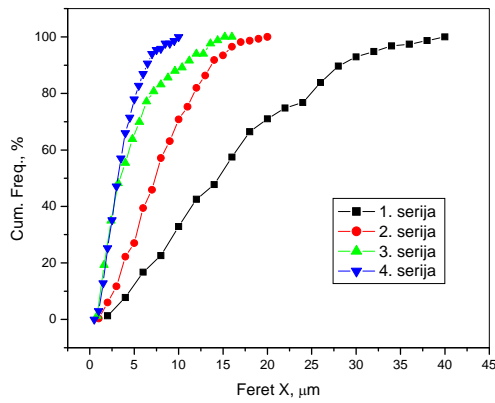
Na slici 5.1 dat je uporedni prikaz rezultata stereoloških merenja čestica prahova PLLA svih serija: a) poprečni presek- A_A , b) obim L_P , c) feret X, d) feret Y, e) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , f) faktor oblika- f_L . Kao reprezentativni parametar za diskusiju dobijenih rezultata uzeta je srednja vrednost maksimalnog prečnika čestica. Veličina i karakteristike čestica prahova PDLLA se značajno menjaju promenom ovih uslova procesiranja (tabela 5.1 i slika 5.1). Iz rezultata dobijenih stereološkom analizom može se videti da su čestice u prvoj i drugoj seriji veće sa srednjim prečnikom od 22.38 µm i 10.94 µm, respektivno (tabela 5.1). Čestice u prvoj seriji su velike sa širokom raspedelom veličina (Slika 4.2), i oblik je nepravilniji u poređenju sa česticama dobijenim u ostalim serijama (Slika 4.2). U trećoj i četvrtoj seriji čestice su manje i uniformnije (Slike 4.4 i 4.5). Srednji prečnik čestica je 6.69 µm i 4.93 µm, respektivno (tabela 5.1). U trećoj seriji čestice su još uvek parcijalno aglomerisane (Slika 4.4). U četvrtoj seriji dobijene su najmanje i najuniformnije čestice (Slika 4.5).



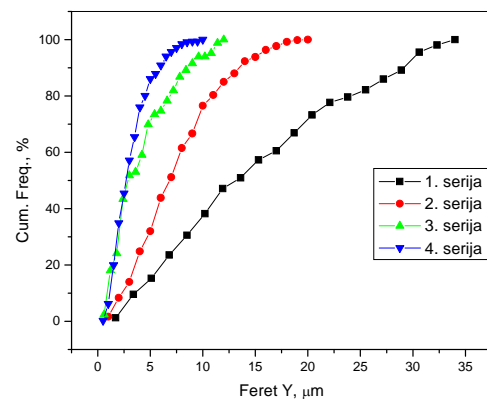
a)



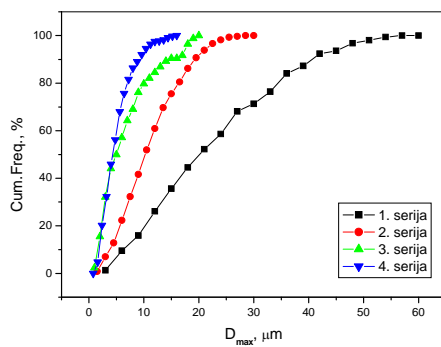
b)



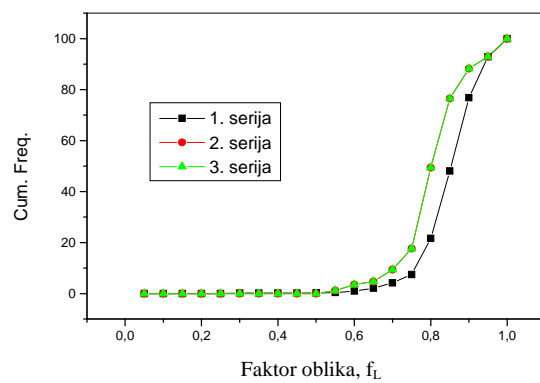
c)



d)



e)



f)

Slika 5.1 Uporedni prikaz rezultata stereoloških merenja čestica praha PLLA četiri serije: a) poprečni presek- A_A , b) obim L_P , c) feret X, d) feret Y, e) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , f) faktor oblika- f_L

5.1.1 Uticaj ko-rastvarača na morfologiju čestica PLLA

Motivacija za zamenu metanola etanolom u farmaceutskim aplikacijama je iz razloga što je priroda etanola manje štetna [47]. Pozitivni uticaj alkohola se može objasniti tako što se prisustvom alkohola u unutrašnjoj fazi ubrzava precipitacija polimera i povećava fazna separacija polimera tokom difuzije rastvarača. Metanol je polarniji rastvarač od etanola, ali je viskozitet etanola mnogo veći od viskoziteta metanola. Specifična svojstva etanola kao rastvarača (veliki viskozitet, interakcije sa polimerom PLLA) igraju veoma bitnu ulogu. Rastvorljivost PLLA u etanolu je manja nego u metanolu. Veliki viskozitet etanola ima pozitivan efekat na formiranje mikrosfera PLLA. Mali viskozitet metanola može biti jedan od razloga zbog čega dolazi do agregacije polimera na površini, jer kvazi-emulzione kapljice nisu dovoljno stabilne, a difuzija metanola se odvija suviše brzo. Može se primetiti i da polarnost rastvarača nema značajni uticaj na formiranje mikrosfera PLLA. Iz dobijenih rezultata se vidi da čestice dobijene sa etanolom imaju uniformniju raspodelu veličina. U eksperimentima u kojima su procesirane mikrosfere PLLA, etanol se pokazao kao bolji ko-rastvarač jer su dobijene najmanje čestice sa najužom raspodelom veličina, broj formiranih čestica je najveći i čestice su najpravilnije. Izborom ko-rastvarača može se uticati na karakteristike mikročestica PLLA dobijenih modifikovanom precipitacionom metodom.

5.1.2 Uticaj koncentracije PVA na morfologiju čestica PLLA

Da bi se sprečila koalescencija dispergovanih kapi, obično se kontinualnoj fazi dodaje neki površinsko aktivni stabilizator najčešće PVA (polivinil alkohol), HPMC (hidroksipropilmetil celuloza) ili PVP (polivinilpirolidon). Veća koncentracija stabilizatora dovodi do veće količine materijala koji se adsorbuje na površini formiranih kapi čime se smanjuje koalescencija. Makromolekulski stabilizatori povećavaju viskozitet kontinualne faze povećavajući na taj način smicajne sile koje deluju na dispergovane kapljice, što rezultuje smanjenjem njihove veličine. U dosadašnjim ispitivanjima koncentracija PVA je varirana u opsegu od 0.02 % do 10 %. Uočeno je da sa povećanjem koncentracije stabilizatora do 5% dolazi do smanjenja veličine mikrosfera, dok dalje povećanje koncentracije nema značajniji uticaj na veličinu [131].

U našim eksperimentima koncentracija PVA je varirana u opsegu 0.5-1 % (wt/vol), kako bi se ispitalo uticaj na morfološke karakteristike čestica praha PLLA. Kao što je prikazano u delu sa rezultatima, veličina čestica se smanjuje sa povećanjem koncentracije PVA u vodenoj fazi (tabela 5.1). Posebno se pri koncentracijama PVA manjim od 1% (wt/vol) dobijaju nepravilne čestice sa velikim aglomeratima kao što može videti na slikama 4.2 i 4.4.

Dobijeni rezultati pokazuju da koncentracija stabilizatora ima veliki uticaj na dobijanje mikrosfera i sa povećanjem koncentracije PVA veličine čestica se smanjuju. Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da se optimalne čestice PLLA dobijaju sa etanolom kao ko-rastvaračem i 1% PVA, srednjeg prečnika oko 4.93 μm .

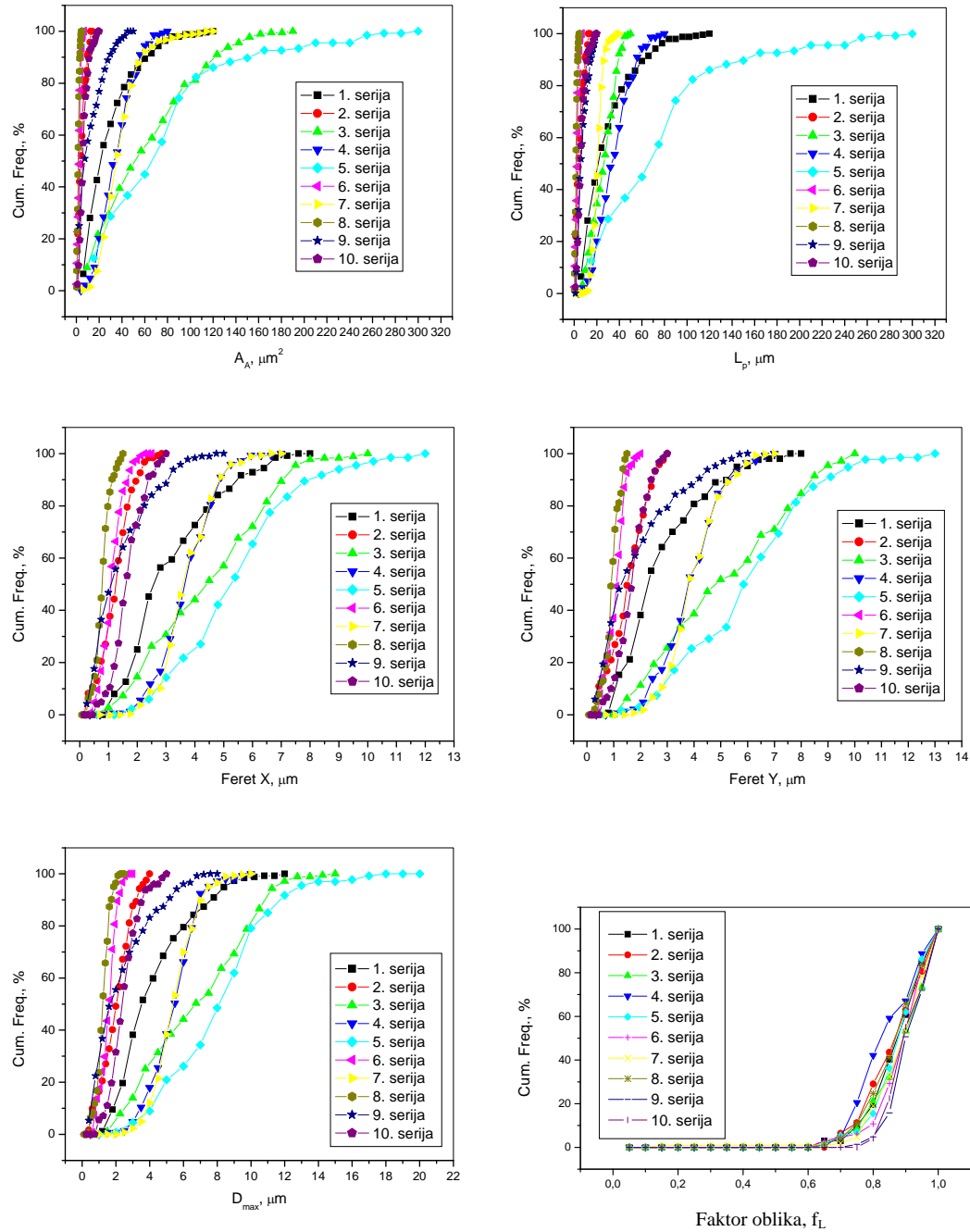
5.2 Uticaj procesnih parametara na morfologiju čestica PDLLA

Modifikovana precipitaciona metoda, koja je primenjena za dobijanje mikrosfera PLLA [116] korišćena je i za dobijanje mikrosfera PDLLA [130] (bez i sa inkorporiranim proteinom). PDLLA zbog svoje manje kristaliničnosti od PLLA ima kraći period degradacije (PLLA dve godine; PDLLA godinu dana) i poželjniji je za upotrebu u sistemima koji se koriste za kontrolisanu dostavu proteina. U našim eksperimentima varirani su različiti parametri procesa kako bi se testirao njihov uticaj na veličinu i oblik čestica novog sistema. Svi parametri su navedeni u tabelama 3.2-3.4.

Glavni fokus je bio da se ispita uticaj izbora ko-rastvarača (metanol ili etanol), odnosa dispergovane prema kontinualnoj fazi, koncentracije PVA kao i brzine i vremena homogenizacije na karakteristike čestica PDLLA. U tabeli 5.2 dat je pregled svih rezultata dobijenih stereološkom analizom čestica PDLLA. Na slici 5.2 prikazani su uporedni rezultati stereoloških merenja prahova PDLLA svih serija: a) poprečni presek- A_A , b) obim L_P , c) feret X, d) feret Y, e) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , f) faktor oblika- f_L . Veličina i karakteristike čestica prahova PDLLA se značajno menjaju promenom ovih uslova procesiranja (tabela 5.2 i slika 5.2).

Tabela 5.2 Rezultati stereološke analize čestica PDLLA

Prah PDLLA (serija)	Lp (μm)			Dmax (μm)			Feret X (μm)			Feret Y (μm)			Faktor oblika(μm)		
	min	max	srednji	min	max	srednji	min	max	srednji	min	max	srednji	min	max	srednji
1.	5.89	79.51	18.33 ±9.91	1.13	22.78	4.37 ±2.68	0.8	16.6	3.27 ±2.03	0.60	15.60	2.85 ±1.82	0.63	1.00	0.97 ±0.32
2.	1.12	15.83	7.10 ±4.04	0.34	4.04	2.01 ±0.92	0.2	3.00	1.24 ±0.57	0.20	3.24	1.57 ±0.75	0.65	1.00	0.98 ±0.22
3.	5.78	48.91	25.44 ±10.82	1.28	14.3	6.72 ±3.21	0.80	9.60	4.31 ±2.09	1.00	10.60	5.10 ±2.52	0.60	1.00	0.98 ±0.23
4.	8.90	33.27	21.05 ±5.13	1.41	9.90	5.36 ±1.42	1.00	7.20	3.68 ±1.02	1.00	7.20	3.86 ±1.15	0.63	1.00	0.96 ±0.20
5.	6.82	78.27	28.16 ±1.85	1.84	25.76	8.44 ±4.05	1.4	17.4	5.6 ±2.27	1.20	20.60	6.24 ±3.13	0.61	1.00	0.97 ±0.23
6.	1.90	18.17	5.52 ±2.03	0.46	4.67	1.58 ±0.57	0.36	3.32	1.14 ±0.42	0.28	3.28	1.09 ±0.42	0.60	1.00	0.96 ±0.20
7.	9.63	46.54	20.80 ±4.96	2.13	12.88	5.48 ±1.39	1.40	10.20	3.73 ±1.04	1.60	9.40	3.97 ±1.05	0.13	1.00	0.98 ±0.21
8.	1.27	11.97	4.54 ±1.57	0.37	3.14	1.25 ±0.44	0.24	2.36	0.79 ±0.31	0.24	2.56	0.95 ±0.34	0.62	1.00	0.97 ±0.21
9.	1.12	25.18	7.84 ±5.56	0.28	8.13	2.28 ±1.75	0.16	5.60	1.39 ±1.04	0.20	6.40	1.79 ±1.43	0.71	1.00	0.98 ±0.28
10.	1.75	16.83	8.39 ±2.98	0.75	4.87	2.46 ±0.86	0.60	3.13	1.70 ±0.58	0.46	3.73	1.76 ±0.68	0.78	1.00	0.98 ±0.24



Slika 5.2 Uporedni rezultati stereoloških merenja praha PDLA svih serija: a) poprečni presek- A_A , b) obim L_P , c) feret X, d) feret Y, e) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , f) faktor oblika- f_L

5.2.1 Uticaj brzine i vremena homogenizacije na morfologiju čestica PDLLA

Kod dobijanja emulzionih sistema, unošenje energije u sistem predstavlja fundamentalni korak. Da bi se ispitaio uticaj ovog faktora na oblik i distribuciju veličina mikročestica, u našim eksperimentima brzina homogenizacije je bila ili 10 000 ili 21 000 rpm, a vreme homogenizacije je bilo 1 ili 10 min. Rezultati ovih eksperimenata su prikazani u tabeli 5.2.

Precipitacionom metodom su u svim serijama dobijene pravilne sferne čestice što se može videti na slikama 4.13-4.22 i tabeli 5.2. Osim toga, očigledno je da duže vreme i veća brzina homogenizacije značajno utiču na redukciju srednjeg prečnika mikročestica (slika 5.2). Takođe, kod intenzivnijeg mešanja smanjuje se polidisperznost mikrosfera (slika 5.2). Čestice koje su dobijene na 10 000 rpm su veće sa srednjim prečnikom od $4.37 \pm 2.68 \mu\text{m}$ do $8.44 \pm 4.05 \mu\text{m}$. Čestice dobijene na 21 000 rpm su manje sa srednjim prečnikom od $1.25 \pm 0.44 \mu\text{m}$ do $5.36 \pm 1.42 \mu\text{m}$. Čestice dobijene sa homogenizacijom od 10 min pokazuju uniformniji profil distribucije (slika 5.2), dok čestice dobijene sa homogenizacijom od 1 min pokazuju dve serije različitih veličina (slika 5.2). Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da se sa dužim vremenom homogenizacije (10 min), velika energija unosi u sistem što dovodi do brže disperzije polimerne organske faze u mikrokapljice malih veličina sa uskim profilom distribucije [131].

5.2.2 Uticaj surfaktanta na morfologiju čestica PDLLA

U samom procesu surfaktant ima ulogu hemijske barijere koja štiti čestice od aglomeracije [42]. Među procesnim promenljivama, koncentracija PVA se smatra jednim od značajnijih faktora koji doprinosi formiranju sferičnih čestica PDLLA.

Da bi se ispitaio uticaj koncentracije PVA na karakteristike čestica (veličinu i distribuciju veličina), napravljene su pojedine serije vodenog rastvora PVA različitih koncentracija. Rezultati su sumirani u tabeli 5.2. Velika koncentracija emulzifikatora dovodi do smanjenja veličine dobijenih čestica. Ovakvi rezultati se mogu povezati sa efektom PVA koji ima u vodenoj fazi, a odnosi se na povećavanje hidrofилnosti sredine. PVA stabilise emulzione kapljice i na taj način podstiče smanjenje veličine čestica i utiče na efikasnost inkapsulacije aktivne supstance. U normalnim uslovima, stabilnost emulzije ulje u vodi se povećava sa porastom koncentracije PVA u vodenoj fazi zbog sprečavanja aglomeracije. Na taj način se može objasniti da povećanje koncentracije PVA u vodenoj fazi rezultuje smanjenjem veličine čestica. Pošto smo u slučaju PLLA primetili da se sa većim koncentracijama PVA (1% w/v) dobijaju manje čestice, u svim eksperimentima sa PDLLA je korišćen 1% (w/v) rastvor PVA, osim u 10. seriji u kojoj je korišćen 5% (w/v) PVA. Takođe se može primetiti da sa povećanjem koncentracije PVA u vodenoj fazi od 1-5% (w/v) dolazi do smanjenja opsega u distribuciji veličina (slika 5.2). Naši rezultati se slažu sa prethodno objavljenim podacima, do kojih su došli drugi autori, a koji su ustanovili da se srednji prečnik značajno smanjuje kada se koncentracija PVA varira od 0.5% do 5%, gde dalje povećanje koncentracije više nema uticaja [131]. Ovaj fenomen se može i očekivati od stabilisuće uloge surfaktanta, jer nedovoljna količina emulzifikatora

neće uspeti da stabilise sve čestice i zbog toga će se neke od njih aglomerisati [132]. Čestice dobijene sa većim koncentracijama surfaktanta pokazuju sferični oblik i odsustvo aglomerata (slika 4.22). Pri većim koncentracijama PVA, surfaktanti formiraju tanje micelle oko mikrosfera PDLLA i kao rezultat dobijaju se mikrosfere manjih veličina.

5.2.3 Uticaj odnosa hloroform/voda na morfologiju čestica PDLLA

U našim eksperimentima odnos organske (hloroform) prema vodenoj fazi je takođe bio promenljiv i predstavlja bitan parametar koji kontroliše karakteristike rezultujućih mikročestica. Emulzija formirana od organskih faza dispergovana je homogenizacijom u većoj zapremini vodenog rastvora u kome se nalaze čestice stabilizatora-PVA, kako bi se dobila stabilna emulzija ulje u vodi. Do sada je već primećeno da zapreminski odnos uljane prema unutrašnjoj vodenoj fazi utiče na unutrašnju i spoljašnju morfologiju čestica, kao i na profil otpuštanja aktivne supstance iz mikrosfera [109].

Zapremina hloroforma je bila 2 ml ili 3 ml, a zapremina vode 20 ml ili 30 ml. U našim eksperimentima primećeno je da se sa povećanjem zapremine kontinualne faze (vode), veličina čestica smanjuje (tabela 5.2).

5.2.4 Uticaj ko-rastvarača na morfologiju čestica PDLLA

Kada se alkohol koristi kao ko-rastvarač u precipitacionoj metodi, on difunduje u eksternu vodenu fazu usled svoje hidrofilnosti i rezultuje bržim formiranjem čvrstog polimernog omotača. Kao rezultat, srednja veličina mikročestica se smanjuje što je prikazano u tabeli 5.2. Etanol je manje polaran rastvarač od metanola, ali je njegov viskozitet mnogo veći od viskoziteta metanola [103].

U slučaju etanola kao ko-rastvarača, najmanje čestice su dobijene u seriji 2, upotrebom 1.5 ml hloroforma, 3 ml etanola i 30 ml 1% w/v vodenog rastvora PVA (serija 2 u tabeli 5.2). Takođe se može primetiti da je oblik čestica najidealnije sferičan (slika 4.14) i dobijene su čestice u velikom broju. Čestice su jasno razdvojene jedna od druge a površina je veoma glatka. Iz rezultata se vidi da polarnost rastvarača nema veliki uticaj na formiranje mikročestica. Takođe, veći viskozitet etanola može sprečiti aglomeraciju stabilisući mikročestice mnogo efikasnije [103].

Čestice dobijene sa metanolom su manje u poređenju sa česticama dobijenim sa etanolom (tabela 5.2 i slika 5.2). Najmanje čestice sa uskom raspodelom veličina su dobijene sa metanolom kao ko-rastvaračem, što se može videti na slici 5.2.

5.3 Uticaj procesnih parametara na morfologiju kompozitnih čestica koje se sastoje od PDLLA i proteina (BSA ili HRP)

Biodegradabilne sfere bazirane na PLA (PLLA i PDLLA) predstavljaju veoma atraktivne sisteme za kontrolisanu dostavu lekova na bazi peptida, proteina, hormona, vakcina itd. Glavni cilj našeg istraživanja je dizajniranje sistema rastvarača baziranih na energijama interakcija između rastvarača, polimera i vodene faze proteina (BSA ili HRP), koji kao proizvod daje mikrosfere sa optimalnim svojstvima: velika efikasnost inkapsulacije i mala erozija iz mase polimera.

Eksperimentalni uslovi pri kojima je rađeno procesiranje mikrosfera PLLA i PDLLA bez inkorporiranog proteina, optimizovani su sa daljim ciljem dobijanja što manjih, sferičnih kompozitnih čestica PDLLA sa što užom distribucijom veličina čestica u kojima je inkorporiran protein (BSA i HRP). Rađene su serije eksperimenata sa različitim rastvaračima i korastvaračima, različitim odnosom dispergovane i kontinualne faze, kao i različitim koncentracijama stabilizatora (tabele 3.3 i 3.4). Surfaktant ima ulogu u formiranju uniformnih i finih čestica, efikasnoj inkapsulaciji ili dispergovanju aktivnog materijala u polimernoj matrici, a takođe utiče i na ostala svojstva koja su u vezi sa primenom ili administracijom kompozitnih čestica [6]. Potvrđena je aktivnost proteina prisutnog u polimernoj čestici [118], a takođe je izračunata i efikasnost inkapsulacije čestica sa optimalnim karakteristikama (serija 4 tabela 3.4).

U našim eksperimentima rađena su ispitivanja morfoloških karakteristika čestica dobijenih inkorporiranjem proteina (BSA i HRP) u polimernoj matrici PDLLA. Sa SEM fotografija prahova PDLLA u kojima je inkorporiran BSA (slike 4.33-4.36) može se videti da precipitaciona metoda, koja se izvodi pod gore navedenim uslovima (tabela 3.3), kao rezultat daje mikrosfere sa srednjim prečnikom u opsegu od 490 nm-1.5 μ m (tabela 5.3) i vrlo uskom raspodelom veličina. U serijama 2. i 3. (slike 4.34 i 4.35), čestice su dosta aglomerisane. Razlog zbog čega dolazi do pojave aglomeracije bi mogla da bude povišena temperatura (oko 40 °C) na kojoj su sušene čestice pod vakuumom od 0.8 bar. Sa SEM fotografija prahova PDLLA u kojima je inkorporiran HRP (slike 4.37-4.41) može se videti da precipitaciona metoda, koja se izvodi pod gore navedenim uslovima (tabela 3.4), kao rezultat daje mikrosfere sa srednjim prečnikom u opsegu od 460 nm-1.13 μ m (tabela 5.4) i vrlo uskom raspodelom veličina. Površina ovih mikrosfera je relativno glatka. Kada se kao rastvarač koristi toluol, dobijaju se sferne polimerne čestice sa površinskim porama bez prisustva proteina (slika 4.38 i slika 4.52 traka 5). Ova pojava bi mogla da se pripíše trenutnoj difuziji proteina iz polimernih sfera ka toluolu, što dovodi do pojave šupljina na površini polimernih sfera koje su prikazane na SEM fotografijama (slika 4.38). Takođe se može zaključiti da sa toluolom dolazi do pojave koju nazivamo "initial burst" i velike erozije iz mase. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da se u našim eksperimentima toluol nije pokazao kao poželjni rastvarač.

Na osnovu SEM fotografija dobijenih prahova, može se videti da inkorporiranjem proteina (BSA i HRP) u sfere PDLLA, nije došlo do značajnijih promena u morfološkim karakteristikama odgovarajućih čestica PDLLA. Veličina sfera PDLLA u kojima je inkorporiran protein je manja u odnosu na čestice PDLLA bez proteina. Objašnjenje se pronalazi u optimizaciji svih uslova (odnos

hlороform/voda, brzina i vreme homogenizacije, koncentracija surfaktanta) pod kojima su procesirane sfere čistog PDLLA. Na osnovu rezultata dobijenih sa česticama praha PDLLA bez proteina uočen je trend ponašanja čestica pri različitim uslovima procesiranja mikrosfera. Rađene su dodatne modifikacije procesnih parametara (zapremina vode je povećana na 30 ml ili je koncentracija PVA povećana na 5%) sa ciljem dobijanja još manjih i uniformnijih sfera PDLLA u kojima je inkorporiran protein. U svim eksperimentima rađena je homogenizacija 10 min na 25000 rpm.

Na osnovu stereoloških merenja formirane su tabele 5.3 i 5.4 sa izračunatim minimalnim, maksimalnim i srednjim vrednostima parametara koji određuju česticu (vrednostima L_p , D_{max} , feret X, feret Y, form faktor). Na slikama 5.3 i 5.4 dati su uporedni rezultati kumulativne zavisnosti ovih veličina svih serija u kojima su inkorporirani proteini BSA (serije od 1-4) i HRP (serije od 1-5), respektivno.

Tabela 5.3 Rezultati stereoloških merenja čestica PDLLA u kojima je inkorporiran protein BSA

Prah PDLLA + protein (serija)	Lp (μm)			Dmax (μm)			Feret X (μm)			Feret Y (μm)			Faktor oblika (μm)		
	min	max	srednji	min	max	srednji	min	max	srednji	min	max	srednji	min	max	srednji
1.	1.77	24.20	5.06 ±4.07	0.47	6.85	1.50 ±1.19	0.30	4.27	0.98 ±0.75	0.36	5.36	1.13 ±0.93	0.67	1.00	0.83 ±0.07
2.	1.25	2.63	1.76 ±0.29	0.31	0.78	0.53 ±0.09	0.16	0.51	0.39 ±0.07	0.19	0.59	0.35 ±0.07	0.74	0.92	0.83 ±0.04
3.	0.86	2.44	1.68 ±0.28	0.16	0.78	0.49 ±0.10	0.12	0.61	0.38 ±0.09	0.09	0.49	0.31 ±0.07	0.71	0.94	0.82 ±0.04
4.	1.68	10.55	3.60 ±1.11	0.48	5.80	1.15 ±0.62	0.42	3.85	0.86 ±0.43	0.24	4.33	0.74 ±0.46	0.70	1.00	0.87 ±0.06

Tabela 5.4 Rezultati stereoloških merenja čestica PDLLA u kojima je inkorporiran protein HRP

Prah PDLLA + protein (serija)	Lp (μm)			Dmax (μm)			Feret X (μm)			Feret Y (μm)			Faktor oblika (μm)		
	min	max	srednji	min	max	srednji	min	max	srednji	min	max	srednji	min	max	srednji
1.	1.42	9.85	3.78 ±1.74	0.39	2.83	1.13 ±0.52	0.24	1.98	0.78 ±0.34	0.30	2.23	0.80 ±0.40	0.63	1.00	0.88 ±0.08
2.	1.65	10.97	3.36 ±1.50	0.43	2.92	0.96 ±0.41	0.29	1.88	0.72 ±0.27	0.25	2.38	0.62 ±0.32	0.63	0.94	0.81 ±0.05
3.	0.63	3.18	1.62 ±0.45	0.14	0.94	0.46 ±0.14	0.08	0.60	0.30 ±0.09	0.11	0.72	0.35 ±0.11	0.58	0.88	0.77 ±0.04
4.	0.67	3.93	1.83 ±0.62	0.18	1.03	0.53 ±0.17	0.12	0.82	0.36 ±0.12	0.10	0.81	0.36 ±0.13	0.63	1.00	0.78 ±0.05
5.	0.90	3.79	2.05 ±0.62	0.25	1.29	0.59 ±0.18	0.15	0.92	0.42 ±0.13	0.15	0.90	0.41 ±0.13	0.71	0.95	0.81 ±0.04

B. Gander i sar. [38] su postavili hipotezu da za efikasnu inkapsulaciju leka u polimeru, interakcije tipa lek-polimer moraju dominirati nad interakcijama lek-rastvarač ili polimer-rastvarač. Efikasnost inkapsulacije leka predstavlja jedan od ključnih kriterijuma za optimizaciju tehnika mikroinkapsulacije. B. Gander i sar. [38] su pokazali da efikasnost inkapsulacije dosta zavisi od rastvarača koji se koristi. Aceton i dihlormetan su se pokazali kao dobri rastvarači, sa efikasnošću

inkapsulacije od 65% i 75% (w/w), dok toluen, nitroetan i dimetil karbonat rezultuju srednjom efikasnošću od 41%-58%. U našim eksperimentima kao rastvarač korišćen je hloroform, koji se pokazao kao dobar rastvarač (efikasnost inkapsulacije proteina HRP od 46% i činjenica da protein nije izgubio aktivnost), dok se toluol, zbog trenutne difuzije proteina iz polimerne matrice, nije pokazao kao poželjan. Dosadašnji podaci ukazuju na to da za većinu sistema baziranih na rastvaračima, erozija iz matrice je inverzno proporcionalna efikasnosti inkapsulacije. Sistemi rastvarača koji imaju najveću efikasnost inkapsulacije skloni su najmanjoj eroziji iz matrice, što je jedan od neophodnih uslova za efikasno inkorporiranje proteina u polimernoj matrici. DCM, EtAc i 1,4 dioksan su se pokazali kao superiorni rastvarači.

Pošto se biodegradabilne mikrosfere najčešće koriste za kontrolisanu dostavu lekova u periodu od nekoliko nedelja ili meseci, erozija iz matrice se mora redukovati (biti manja od 10%) i kontrolisati. Za inkapsulaciju proteina (BSA i HRP) u polimerne sfere bolje je koristiti PDLLA [130] od PLLA, zbog kraćeg perioda degradacije. Kopolimeri L-laktida sa DL-laktidom su sintetisani kako bi se narušila kristaliničnost L-laktida i na taj način ubzao proces degradacije [130].

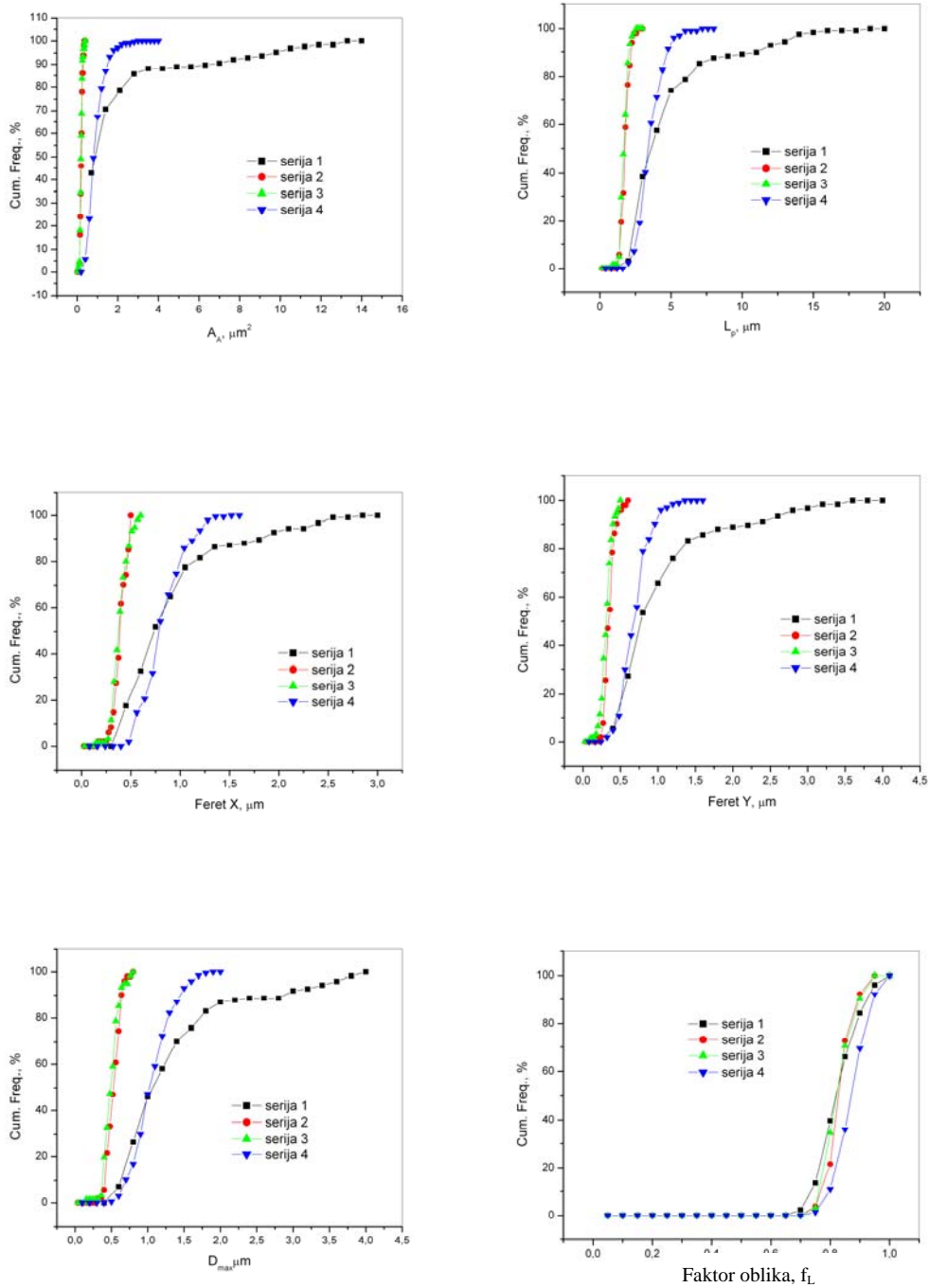
U našim eksperimentima, u prva četiri eksperimenta kao model protein korišćen je BSA. Iz rezultata dobijenih strereološkom analizom može se videti da su čestice u prvoj i četvrtoj seriji, u kojima je korišćen 1% PVA, veće sa srednjim prečnikom 1.50 μm i 1.15 μm (tabela 5.3), respektivno. U drugoj i trećoj seriji, u kojima je korišćen 5% PVA, su dobijene manje čestice sa uskom raspodelom veličina. Srednji prečnik čestica treće serije u kojoj je kao ko-rastvarač korišćen etanol, je 530 nm, dok je srednji prečnik čestica četvrte serije u kojoj je kao ko-rastvarač korišćen metanol, 490 nm (tabela 5.3). Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da se najmanje čestice dobijaju sa metanolom i 5% PVA.

U ostalim serijama kao protein je korišćen HRP. U svim serijama kao ko-rastvarač korišćen je etanol, osim u trećoj seriji, u kojoj je kao ko-rastvarač korišćen metanol. U prvoj i drugoj seriji, u kojima je korišćen 1% PVA, dobijene su veće čestice sa srednjim prečnikom 1.13 μm i 0.96 μm , respektivno (tabela 5.4). Čestice u trećoj, četvrtoj i petoj seriji, u kojima je korišćen 5% PVA, su drastično manje i približno uniformne (slika 5.4). Srednji prečnik čestica je 460 nm, 530 nm i 590 nm, respektivno (tabela 5.4). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se najmanje čestice dobijaju sa metanolom i 5% PVA.

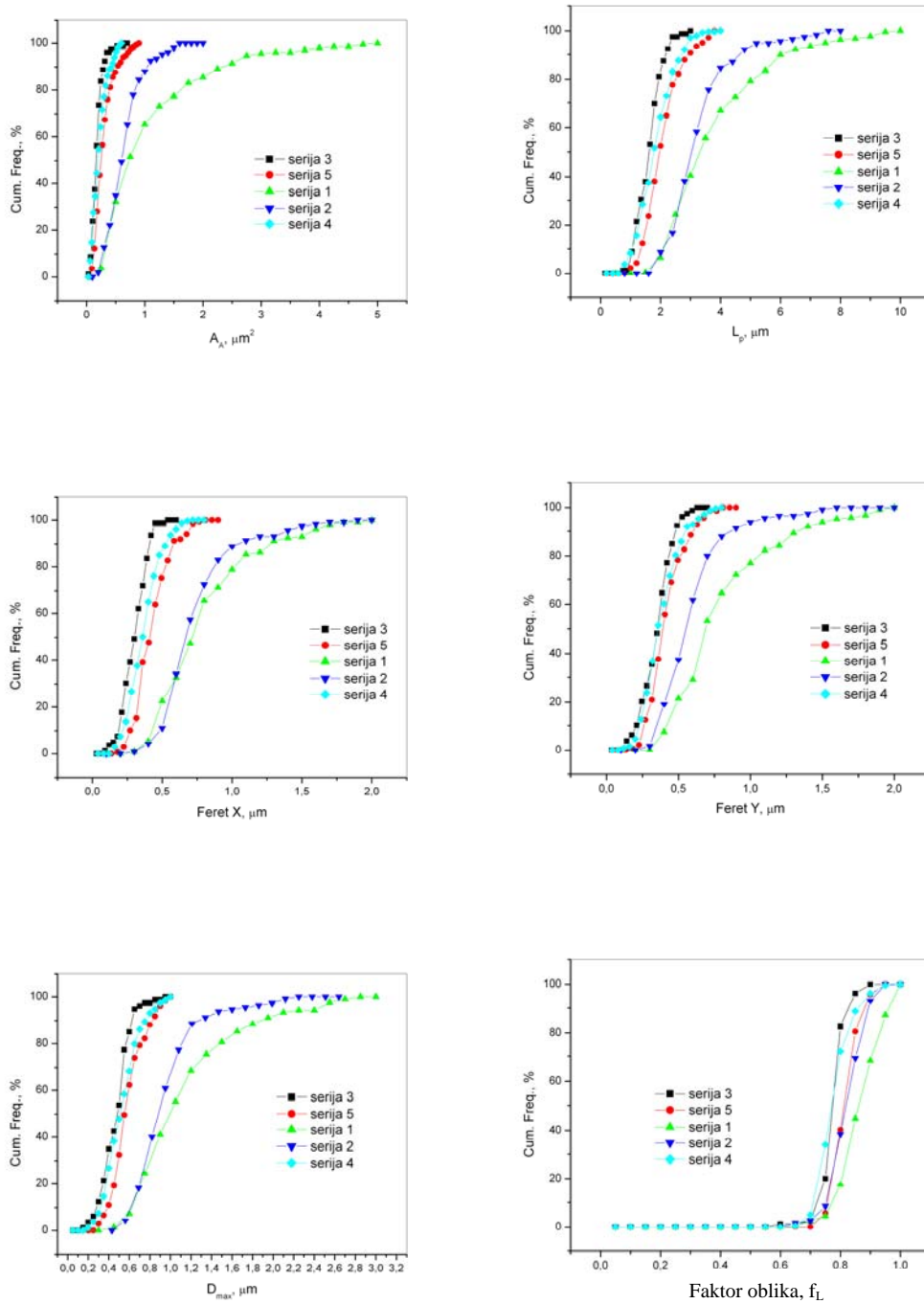
Na osnovu SEM fotografija, primenom elektroforeze i spektrofotometrije, može se videti da su modifikovanom precipitacionom metodom [130] uspešno dobijene sferne čestice PDLLA u kojima su inkapsulirani proteini, BSA ili HRP. U svim serijama su uspešno inkapsulirani proteini, osim u četvrtoj seriji sa BSA, u kojoj je BSA korišćen u svojstvu stabilizatora i drugoj seriji sa HRP, u kojoj je kao rastvarač korišćen toluol. Lociranje prisutnog proteina je utvrđeno na osnovu elektroforetskih merenja i indirektnom spektrofotometrijskom metodom koja je korišćena za izračunavanje koncentracije proteina u supernatantu. Dobijene mikrosfere su stabilne, značajno su manje od eritrocita i mogu se primenjivati intravenozno [24, 78].

Mikrosfere u kojima je inkapsuliran protein imaju široku biomedicinsku primenu na polju kontrolisane dostave lekova [81]. Lekovi bazirani na proteinima su skloni smanjenju biološke aktivnosti tokom agresivnih procesa pripreme [50, 122]. Za upotrebu u sistemima koji se koriste za

dostavu proteina, degradacija polimera i erozija predstavljaju značajne procese za kontrolisano otpuštanje proteina. Semi-kristalan polimer PLLA degradira sporijom brzinom od amornog polimera PDLLA. Kinetika otpuštanja proteina je od fundamentalnog značaja za postizanje terapijske koncentracije u tkivu i kontrolisanjem kinetike se mogu izbjeći toksične koncentracije. Otpuštanje proteina iz sfera poli(D,L-laktida) se odigrava preko dva mehanizma: primarnom difuzijom koja je praćena sekundarnom erozijom polimerne matrice [132].



Slika 5.3 Uporedni rezultati stereoloških merenja svih serija čestica PDLLA u kojima je inkorporiran protein BSA: a) poprečni presek- A_A , b) obim L_P , c) feret X, d) feret Y, e) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , f) faktor oblika- f_L



Slika 5.4 Uporedni rezultati stereoloških merenja svih serija čestica PDLLA u kojima je inkorporiran protein HRP: a) poprečni presek- A_A , b) obim L_p , c) feret X, d) feret Y, e) maksimalni prečnik čestice- D_{max} , f) faktor oblika- f_L

Veličina polimerne čestice u kojoj je inkorporiran lek značajno utiče na njegova terapijska svojstva. Generalno posmatrano, brzina otpuštanja terapijskog agensa se povećava sa povećanjem veličine čestice. Sposobnost kontrole veličine čestice u kojoj je inkorporiran lek omogućuje kontrolu trenda otpuštanja leka. Takođe, veličina čestica može uticati na odgovor ćelije [51]. Porozne čestice, zbog svoje male gustine, imaju prednosti pri pulmonalnom načinu doziranja. Pokretljivost čestica bilo u gasnim ili tečnim sistemima dosta zavisi od oblika i veličine čestica; zbog toga oblik i veličina čestica moraju biti poznati kako bi moglo da se kontroliše njihovo kretanje i translociranje [80]. Iz ovih razloga je neophodno da se pronađe generalna metoda za procesiranje polimernih mikrosfera kontrolisanih veličina [133].

Inkapsulacijom enzima u polimernoj čestici povećava se njegova stabilnost tokom produženog vremenskog perioda, u poređenju sa slobodnim enzimom prisutnim u vodenom rastvoru [27, 29]. U našim eksperimentima je, na osnovu vrednosti apsorbanca na talasnoj dužini od 403 nm, iz kalibracione krive izračunata koncentracija peroksidaze u supernatantu koja iznosi 0.0212 mg/ml [134]. Iz početne količine peroksidaze unete u sistem, koja iznosi 1 mg, izračunata je količina peroksidaze u supernatantu od 0.54 mg i efikasnost inkapsulacije od 46%. Proces inkorporiranja peroksidaze u mikrosfere PDLLA nije prouzrokovao sekundarnu strukturu HRP i protein nije izgubio aktivnost [122, 135]. Peroksidaza je protein koji nije skup, i izabran je kao model protein iz razloga što je vrlo osetljiv na rastvarače i povišenu temperaturu [27, 122].

Brojni faktori ukazuju na efikasnost ove metode za pripremu čestica sa vrlo dobrim karakteristikama kao što su sferični oblik i opseg veličina, kao i procenat inkapsulacije proteina. Veličina sfera u kojima je inkorporiran protein, kao što se iz rezultata može primetiti, zavisi od koncentracije surfaktanta i ko-rastvarača, ali ne i od tipa proteina koji je inkorporiran [28]. Ako proteini kao što je HRP mogu biti inkorporirani u sferama bioresorbilnog polimera PDLLA bez gubitka aktivnosti, postojala bi mogućnost da se istom metodom dobiju novi kompoziti u kojima bi mogli da se inkorporiraju i ostali proteini kao što su faktori rasta, interferoni, insulin itd.

6. Zaključak

Istraživanja izvršena u okviru ovog magistarskog rada imala su za cilj da se prouči efekat različitih parametara procesa na karakteristike čistih i kompozitnih mikrosfera PLLA i PDLLA dobijenih modifikovanom precipitacionom metodom. Kontrola veličine čestica, oblika i distribucije veličina čestica su neophodni uslovi za postizanje reproduktivnosti, biološke postojanosti i ponovljivog trenda otpuštanja inkorporirane aktivne supstance. U našim eksperimentima rađena su četiri sistema: čiste čestice praha PLLA, čiste čestice praha PDLLA, kompozitne čestice praha PDLLA+BSA i kompozitne čestice praha PDLLA+HRP. U svim sistemima korišćena je modifikovana precipitaciona metoda. U prvom sistemu od komercijalnih granula PLLA molekulske mase 100 000 g/mol je dobijen prah PLLA. Kao rastvarač korišćen je hloroform, a kao ko-rastvarač metanol ili etanol. Kao površinski stabilizator korišćen je vodeni rastvor polivinil alkohola, čija koncentracija je bila 0.5% ili 1%. Nakon rastvaranja 40 mg komercijalnih granula u 1.5 ml hloroforma, vršeno je ukapavanje polimernog rastvora u 3 ml ko-rastvarača (metanola ili etanola). Dobijena disperzija je ukapavana u 20 ml vodenog rastvora PVA, uz korišćenje magnetne mešalice. Dobijena disperzija je, zatim, centrifugirana 2 sata na 4000 rpm, supernatant uklonjen, a prah sušen nekoliko dana na sobnoj temperaturi pod vakuumom. U drugom sistemu od komercijalnih granula PDLLA molekulske mase 50 000 g/mol je dobijen prah PDLLA. Svi koraci su identični koracima prvog sistema, s tim što je u drugom sistemu pre koraka centrifugiranja vršena homogenizacija pomoću homogenizatora Ultra Turrax. Vreme homogenizacije je bilo 1 ili 10 min, a brzina homogenizacije je bila 10 000 rpm ili 21 000 rpm. U drugom sistemu promenljivi parametri su pored ko-rastvarača bili i koncentracija PVA (1% ili 5%) i odnos dispergovane prema kontinualnoj fazi. U trećem sistemu je kao model protein korišćen BSA, koji je nakon rastvaranja u vodi emulgovan u rastvoru polimera PDLLA. U četvrtom sistemu je kao model protein korišćen HRP, koji je nakon rastvaranja u vodi emulgovan u rastvoru polimera PDLLA. Ostali koraci u trećem i četvrtom sistemu su identični koracima u drugom sistemu.

Skenirajuća elektronska mikroskopija je korišćena za morfološku analizu prahova sva četiri sistema, dok su stereološkim merenjima određeni parametri koji karakterišu oblik i veličinu, kao i distribuciju veličina čestica sva četiri sistema. Za identifikaciju faza prvog sistema korišćena je rendgenska analiza. Za identifikaciju faza drugog sistema korišćena su infracrvena spektroskopija i diferencijalno skanirajuća kalorimetrija. Za karakterizaciju proteina prisutnih u kompozitnim česticama korišćena je elektroforeza. U četvrtom sistemu je spektrofotometrijskim merenjima određena efikasnost inkapsulacije proteina HRP, a za potvrdu prisustva proteina u kompozitu urađena je diferencijalno skanirajuća kalorimetrija.

Dobijeni rezultati pokazuju da su modifikovanom precipitacionom metodom uspešno dobijene pravilne sferne čestice u sva četiri sistema. Dobijeni rezultati pokazuju da su izbor organskih rastvarača i koncentracija stabilizatora veoma bitni za uspešno procesiranje mikrosfera PLLA i PDLLA. Izborom ko-rastvarača se može uticati na karakteristike mikročestica PLLA dobijenih modifikovanom precipitacionom metodom. Na osnovu rezultata dobijenih u prvom sistemu, može se videti da se sa etanolom dobijaju manje čestice sa uniformnijom raspodelom veličina. U našim eksperimentima koji su rađeni sa PLLA, etanol se pokazao kao bolji ko-rastvarač jer su dobijene najmanje sferne čestice. Na osnovu stereoloških merenja može se videti da su čestice dobijene u prvoj i drugoj seriji, u kojima je kao ko-rastvarač korišćen metanol velike, sa srednjim prečnikom

22.38 μm i 10.94 μm , respektivno. Čestice dobijene u trećoj i četvrtoj seriji, u kojima je kao ko-rastvarač korišćen etanol su manje i uniformnije od čestica dobijenih u prvoj i drugoj seriji. Srednja vrednost D_{max} čestica treće serije iznosi 6.69 μm , a srednja vrednost D_{max} čestica četvrte serije iznosi 4.93 μm . Među procesnim promenljivama, koncentracija PVA predstavlja takođe jedan od ključnih faktora u formiranju sferičnih mikročestica PLLA. Može se primetiti da se sa povećanjem koncentracije PVA veličine čestica dosta smanjuju. Posebno se pri koncentracijama PVA manjim od 1% (w/v) dobijaju nepravilne čestice sa velikim aglomeratima. Mikročestice dobijene sa većim koncentracijama surfaktanta pokazuju sferični oblik i odsustvo aglomerata. Pri većim koncentracijama PVA, formiraju se tanje micle oko mikrosfera i kao posledica toga dobijaju se mikrosfere manjih veličina. Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da su u našim eksperimentima optimalne čestice PLLA dobijene sa etanolom kao ko-rastvaračem i 1% PVA.

Rezultati dobijeni u drugom sistemu, koji je rađen sa PDLLA, pokazuju da se modifikovanom precipitacionom metodom, koja je prethodno primenjena za dobijanje mikrosfera PLLA, uspešno mogu dobiti pravilne sferne čestice PDLLA. Ipak, urađene su dodatne modifikacije kako bi se testirala primenljivost ove metode na dobijanje mikrosfera PDLLA. Korišćenjem precipitacione metode, procenjeno je da nekoliko procesnih parametara utiče na postizanje optimalnih preparativnih uslova za dobijanje pravilnih sferičnih čestica PDLLA. Među procesnim promenljivama brzina homogenizacije predstavlja jedan od bitnijih faktora koji utiče na pravljenje malih i uniformnih mikrosfera. Može se zaključiti da sa dužim vremenom homogenizacije (10 min), velika energija koja se unosi u sistem vodi ka brznoj disperziji polimerne organske faze u mikrokapljice malih veličina sa uskim profilom distribucije. Iz rezultata dobijenih stereološkom analizom se može videti da su čestice u prvoj i petoj seriji, u kojima je rađena homogenizacija 1 min na 10000 rpm, veće sa srednjim prečnikom 4.37 μm i 8.44 μm , respektivno. Čestice u trećoj i sedmoj seriji, u kojima je rađena homogenizacija 10 min na 10000 rpm, su takođe veće ali uniformnije. Srednji prečnik čestica treće i sedme serije je 6.72 μm i 5.48 μm , respektivno. Čestice u četvrtoj seriji, u kojoj je kao ko-rastvarač korišćen etanol, u kojoj je rađena homogenizacija 10 min na 21000 rpm su veće, sa srednjim prečnikom od 5.36 μm . Čestice u drugoj i šestoj seriji, u kojima je rađena homogenizacija 1 min na 21000 rpm, su dosta manje. Srednji prečnik čestica druge i šeste serije iznosi 2.01 μm i 1.58 μm , respektivno. Najmanje čestice sa najužom raspodelom veličina, u kojima je rađena homogenizacija 10 min na 21 000 rpm, su dobijene u osmoj seriji, sa metanolom kao ko-rastvaračem, sa srednjim prečnikom 1.25 μm . Čestice u devetoj i desetoj seriji, koje su rađene bez koraka homogenizacije sa 5% rastvorom PVA, su manje sa srednjim prečnikom 2.28 μm i 2.46 μm , ali u ovim serijama se mogu primetiti dve serije čestica različitih veličina. Da bi se sintetisale male mikrosfere, podaci ukazuju da je idealno da se radi sa velikim koncentracijama PVA (5%), malim odnosom hloroform/voda i velikim brzinama homogenizacije (21 000 rpm). Takođe se može primetiti da se sa metanolom dobijaju manje čestice. U svrhe intravenozne aplikacije sistema za dostavu lekova koristile bi se najmanje čestice. Glavna prednost ove metode je što ne zahteva povišene temperature i samim tim može biti korisna za inkapsulaciju lekova osetljivih na toplotu, kao što su proteini.

Eksperimentalni uslovi pri kojima je rađeno procesiranje mikrosfera PLLA i PDLLA bez inkorporiranog proteina, su modifikovani sa daljim ciljem dobijanja što manjih, sferičnih kompozitnih čestica PDLLA, sa što užom distribucijom veličina u kojima su inkorporirani proteini BSA ili HRP. Na osnovu rezultata dobijenih sa česticama praha PDLLA bez proteina uočen je trend ponašanja čestica pri različitim uslovima procesiranja mikrosfera. Rađene su dodatne modifikacije procesnih parametara (zapremina vode je povećana na 30 ml ili je koncentracija PVA povećana na 5%) sa ciljem dobijanja još manjih i uniformnijih submikronskih sfera PDLLA u kojima je inkorporiran protein. U svim eksperimentima rađena je homogenizacija 10 min na 25000 rpm. Na osnovu srednjih vrednosti maksimalnog prečnika čestica praha PDLLA u kojima je kao protein inkapsuliran BSA može se videti da su čestice u prvoj i četvrtoj seriji, u kojima je korišćen 1% PVA, veće sa srednjim prečnikom 1.50 μm i 1.15 μm , respektivno. Čestice u drugoj i trećoj seriji, u kojima je korišćen 5% PVA, su manje sa srednjim prečnikom 530 nm i 490 nm, respektivno. U svim serijama je kao ko-rastvarač korišćen etanol, osim u trećoj seriji u kojoj je kao ko-rastvarač korišćen metanol. Površina ovih mikrosfera je relativno glatka. U svim serijama su dobijene pravilne sferne čestice.

Na osnovu srednjih vrednosti maksimalnog prečnika čestica praha PDLLA u kojima je kao protein inkapsuliran HRP se može videti da su čestice u prvoj i drugoj seriji, u kojima je korišćen 1% PVA, veće sa srednjim prečnikom 1.13 μm i 0.96 μm , respektivno. Čestice dobijene u trećoj, četvrtoj i petoj seriji, u kojima je korišćen 5% PVA, su manje sa srednjim prečnikom 460 nm, 530 nm i 590 nm, respektivno. U svim serijama su dobijene pravilne sferne čestice. U svim serijama je kao ko-rastvarač korišćen etanol, osim u trećoj seriji u kojoj je kao ko-rastvarač korišćen metanol. U svim serijama je uspešno inkapsuliran HRP osim u drugoj seriji u kojoj je kao rastvarač korišćen toluol. Kada se kao rastvarač koristi toluol, dobijaju se sferne polimerne čestice sa površinskim porama bez prisustva proteina usled trenutne difuzije proteina iz polimernih sfera ka toluolu i pojave šupljina na površini polimernih sfera.

Mikrosfere u kojima je inkapsuliran protein imaju široku biomedicinsku primenu na polju kontrolisane dostave lekova. Lekovi bazirani na proteinima su skloni gubljenju integriteta i biološke aktivnosti tokom agresivnih procesa pripreme. Veličina polimerne čestice u kojoj je inkorporiran lek značajno utiče na njegova terapijska svojstva. Generalno posmatrano, brzina otpuštanja terapijskog agensa se povećavanja sa povećanjem veličine čestice. Sposobnost kontrole veličine čestice u kojoj je inkorporiran protein omogućava kontrolu kinetike otpuštanja proteina. Takođe, veličina čestica može uticati na odgovor ćelije. Pokretljivost čestica bilo u gasnim ili tečnim sistemima zavisi od njihove veličine; zbog toga veličina čestica mora biti poznata i kontrolisana kako bi se efektivno kontrolisalo njihovo kretanje i translociranje. Brojni faktori ukazuju na efikasnost ove metode za pripremu čistih i kompozitnih čestica PLLA i PDLLA sa vrlo dobrim karakteristikama kao što su oblik i opseg veličina, kao i procenat inkapsulacije proteina. Proces inkorporiranja peroksidaze u mikrosfere PDLLA nije prouzrokovao sekundarnu strukturu HRP i protein nije izgubio aktivnost. Veličina mikrosfera u kojima je inkorporiran protein (BSA, HRP), kao što se iz rezultata može primetiti, dosta zavisi od koncentracije surfaktanta i ko-rastvarača, ali ne i od tipa proteina koji je inkorporiran. U našim eksperimentima hloroform se pokazao kao poželjan rastvarač sa efikasnošću inkapsulacije od 46%, dok se toluol pokazao kao nepoželjan jer dolazi do pojave koju

nazivamo "initial burst" i velike erozije iz matrice. Peroksidaza (HRP) izolovana iz rena je izabrana kao model protein jer je vrlo osetljiva na rastvarače i povišene temperature. Ako proteini kao što je HRP mogu biti inkorporirani u sferama bioresorbilnog polimera PDLLA bez gubitka aktivnosti, postojala bi mogućnost da se istom metodom dobiju novi kompoziti u kojima bi mogli da se inkorporiraju i ostali proteini kao što su faktori rasta, interferoni, insulin itd., što će biti predmet naših daljih istraživanja.

7. Literatura

- [1] M. Stevanović, Sinteza, karakterizacija i degradacija poli(DL-laktid-ko-glikolid) nanosfera koje sadrže askorbinsku kiselinu, Doktorska disertacija, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd 2007.
- [2] N. Ignjatović, Sinteza i dizajniranje strukture i osobina hidroksiapatit-polilaktid kompozitnih biomaterijala, Doktorska disertacija, Tehnološko metalurški fakultet, Beograd 2001.
- [3] R. Živković, Komparativno ispitivanje efikasnosti biomaterijala i lasera male snage u reparaciji koštanih defekata, Magistarska teza, Niš 2005.
- [4] M. Agrawal, Reconstructing the human body using biomaterials, JOM Journal of the Minerals, Metals and Materials Society, 50 (1998) 31-35.
- [5] J. C. Middleton, A. J. Tipton, Synthetic biodegradable polymers as medical devices, Medical Plastics and Biomaterials Magazine 199 (1998) 1089-1098.
- [6] P. Chattopadhyay, B. Y. Shekunov, J. S. Seitzinger, R. W. Huff, Composite particles and method for preparing, United States Patent No. US 6,966,990 Nov. 22 (2005)
- [7] T. Kubik, K. Bogunia-Kubik, M. Sugisaka, Nanotechnology on duty in medical applications, Current Pharmaceutical Biotechnology 6 (2005) 17-33.
- [8] P. C. Johnson, A. G. Mikos, J. P. Fisher, J. A. Jansen, Strategic directions in tissue engineering, Tissue Engineering 13 (2007) 2827-2837.
- [9] J. Tan, W. Mark Saltzman, Biomaterials with hierarchically defined micro- and nanoscale structure, Biomaterials 25 (2004) 3593-3601.
- [10] M. N. V. Ravi Kumar, Nano and microparticles as controlled drug delivery devices, Journal of Pharmaceutical Sciences 3 (2000) 234-258.
- [11] Y. Gao, L. Kong, L. Zhang, Y. Gong, G. Chen, N. Zhao, X. Zhang, Improvement of mechanical properties of poly(D, L-lactide) films by blending of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate), European Polymer Journal 42 (2006) 764-775.
- [12] J. Katz, Developments in medical polymers for biomaterials applications, Medical Device & Diagnostic Industry Magazine MDDI Article Index, 2001.
- [13] N. Saito, N. Murakami, J. Takahashi, H. Horiuchi, H. Ota, H. Kato, T. Okada, K. Nozaki, K. Takaoka, Synthetic biodegradable polymers as drug delivery systems for bone morphogenetic proteins, Advanced Drug Delivery Reviews 57 (2005) 1037-1048.
- [14] Y. M. Lin, A. R. Boccaccini, J. M. Polak, A. E. Bishop, Biocompatibility of poly-DL-lactic acid (PDLLA) for lung tissue Engineering, Journal of Biomaterials Applications 21 (2006) 109-118.
- [15] D. Anderson, Coating particles, methods of making and using, United States Patent US 7105229, 9.12.2006
- [16] M. Plavšić, Polimerni materijali nauka i inženjerstvo, Naučna knjiga, Beograd 1996.
- [17] I. Lynch, T. Cedervall, M. Lundqvist, C. Cabaleiro-Lago, S. Linse, K. A. Dawson, The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century, Advances in Colloid and Interface Science 134-135 (2007) 167-174.

- [18] C. P. Reis, R. J. Neufeld, A. J. Ribeiro, F. Veiga, Nanoencapsulation I. Methods for preparation drug-loaded polymeric nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2 (2006) 8-21.
- [19] L. G. Griffith, *Polymeric Biomaterials*, *Acta materialia* 48 (2000) 263-277.
- [20] H. Zhao, J. Gagnon, U. O Häfeli, Process and formulation variables in the preparation of injectable and biodegradable magnetic microspheres, *Biomagnetic Research and Technology* 5 (2007) 1-11.
- [21] G. Orive, R. M. Hernández, A. R. Gascón, J. L. Pedraz, Micro and nano drug delivery systems in cancer therapy, *Cancer Therapy* 3 (2005) 131-138.
- [22] K. Derakhshandeh, M. Erfan, S. Dadashzadeh, Encapsulation of 9-nitrocamptothecin, a novel anticancer drug, in biodegradable nanoparticles: factorial design, characterization and release kinetics, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 66 (2007) 34-41.
- [23] E.-S. Khafagy, M. Morishita, Y. Onuki, K. Takayama, Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: a comparative review, *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (2007) 1521-1546.
- [24] V. Kanchan, A. K. Panda, Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response, *Biomaterials* 28 (2007) 5344-5357.
- [25] O. C. Ferokhzad, S. Jon, A. Khademhosseini, T.-N. T. Tran, D. A. LaVan, R. Langer, Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells, *Cancer Research* 64 (2004) 7668-7672.
- [26] M. L. Hans, Synthesis, characterization, and application of biodegradable polymeric prodrug micelles for long-term drug delivery, Ph. D. Thesis, Drexel University, 2005.
- [27] M. Zilberman, O. Grinberg, HRP-Loaded bioresorbable microspheres: effect of copolymer composition and molecular weight on microstructure and release profile, *Journal of Biomaterials Applications* 22 (2007) 391-407.
- [28] D. Blanco, M. J. Alonso, Protein encapsulation and release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres: effect of the protein and polymer properties and of the co-encapsulation of surfactants, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45 (1998) 285-294.
- [29] C.-M. Dong, Y.-Z. Guo, K.-Y. Qiu, Z.-W. Gu, X.-D. Feng, In vitro degradation and controlled release behavior of D,L-PLGA50 and PCL-b-D,L-PLGA50 copolymer microspheres, *Journal of Controlled Release* 107 (2005) 53-64.
- [30] O.V. Salata, Applications of nanoparticles in biology and medicine, *Journal of Nanobiotechnology* 2 (2004) 1-6.
- [31] J. Tam, W. M. Saltzman, Biomaterials with hierarchically defined micro- and nanoscale structure, *Biomaterials* 25 (2004) 3593-3601.
- [32] D. Radulescu, Method for forming polymer microspheres, United States Patent No. US 6,998,074 Feb. 14, 2006.

- [33] P.-C. Chen, Y. Jeong Park, L.-C. Chang, D. S. Kohane, R. H. Bertlett, R. Langer, V. C. Yang, Injectable microparticle-gel system for prolonged and localized lidocaine release. I. In vitro characterization, *Journal of Biomedical Mater Research* 70A (2004) 412-419.
- [34] D. T. O'Hagan, D. Rahman, J. P. McGee, H. Jeffery, M. C. Davies, P. Williams, S. S. Davis, S. J. Challacombe, Biodegradable microparticles as controlled release antigen delivery systems, *Immunology* 73 (1991) 239-242.
- [35] N. Rizkalla, C. Range, F.-Xavier Lacasse, P. Hildgen, Effect of various formulation parameters on the properties of polymeric nanoparticles prepared by multiple emulsion method, *Journal of Microencapsulation* 23 (2006) 39-57.
- [36] G. C. M. Steffens, L. Nothdurft, G. Buse, H. Thissen, H. Höcker, D. Klee, High density binding of proteins and peptides to poly(D, L-lactide) grafted with polyacrylic acid, *Biomaterials* 23 (2002) 3523-3531.
- [37] L. Brannon-Peppas, Polymers in controlled drug delivery, *Medical Plastics and Biometaterials* 4 (1997) 34-44.
- [38] B. Gander, P. Johansen, Hô Nam-Trân, H. P. Merkle, Thermodynamic approach to protein microencapsulation into poly(D,L-lactide) by spray drying, *International Journal of Pharmaceutics* 129 (1996) 51-61.
- [39] www.drugdel.com/polymer.htm
- [40] M. Kaminski, A. Rosengart, C. Mertz, M. Finck, S. Guy, Y. Xie, H. Chen, P. Caviness, A. Alimi, N. Kivenas, V. Sullivan, A. Ebner, J. Ritter, Injectable magnetic particles for selective removal of blood borne toxins, Argonne National Laboratory, Midwestern University, October 2004.
- [41] J. Panyam, V. Labhasetwar, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Advanced Drug Delivery Reviews* 55 (2003) 329-347.
- [42] M.-K. Lai, R. C.-C. Tsiang, Microencapsulation of acetaminophen into poly(L-lactide) by three different emulsion solvent-evaporation methods, *Journal of Microencapsulation* 22 (2005) 261-274.
- [43] F. Delie, M. J. Blanco-Prieto, Polymeric particulates to improve oral bioavailability of peptide drugs, *Molecules* 10 (2005) 65-80.
- [44] www.umr-cnrs8612.u-psurd.fr/z-outils/images/site/mechanism.jpg
- [45] Y. Choi, S. Yoon Kim, S. Hee Kim, K.-S. Lee, C. Kim, Y. Byun, Long-term delivery of all-trans-retinoic acid using biodegradable PLLA/PEG-PLLA blended microspheres, *International Journal of Pharmaceutics* 215 (2001) 67-81.
- [46] U. Edlund, A.-C. Albertsson, Degradable polymer microspheres for controlled drug delivery, *Advances in Polymer Science* 157 (2002) 68-112.
- [47] T. R. Buggins, P. A. Dickinson, G. Taylor, The effects of pharmaceutical excipients on drug disposition, *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (2007) 1482-1503.
- [48] F. B. Landry, D. V. Bazile, G. Spenlehauer, M. Veillard, J. Kreuter, Release of the fluorescent marker Prodan® from poly(D, L-lactic acid) nanoparticles coated with albumin or

polyvinyl alcohol in model digestive fluids (USP XXII), *Journal of Controlled Release* 44 (1997) 227-236.

[49] P. Caliceti, S. Salmaso, N. Elvassore, A. Bertucco, Effective protein release from PEG/PLA nano-particles produced by compressed gas anti-solvent precipitation techniques, *Journal of Controlled Release* 94 (2004) 195-205.

[50] J. H. Jeong, S. Wan Kim, T. . Park, Molecular design of functional polymers for gene therapy, *Progress in Polymer Science* 32 (2007) 1239-1274.

[51] A. P. Gupta, V. Kumar, New emerging trends in synthetic biodegradable polymers-poly(lactide): A critique, *European Polymer Journal* 43 (2007) 4053-4074.

[52] J. Xie, L. Kuang Lim, Y. Phua, J. Hua, C.-H. Wang, Electrohydrodynamic atomization for biodegradable polymeric particle production, *Journal of Colloid and Interface Science* 302 (2006) 103-112.

[53] S. Zhou, X. Liao, X. Li, X. Deng, H. Li, Poly-D,L-lactide-co-poly(ethylene glycol) microspheres as potential vaccine delivery systems, *Journal of Controlled Release* 86 (2003) 195-205.

[54] N. Rieben, Fluorescent labeling and protein chemical characterization of bovin serum albumin, *Self-Assembling Nano Systems (Practical)*, Nano-Science Center, Spring 2007.

[55] A. J. DeFail, C. R. Chu, N. Izzo, K. G. Marra, Controlled release of bioactive TGF- β from microspheres embedded within biodegradable hydrogels, *Biomaterials* 27 (2006) 1579-1585.

[56] C.-H. Zheng, J.-Q. Gao, Y.-P. Zhang, W.-Q. Liang, A protein delivery system: biodegradable alginate-chitosan-poly(lactic-co-glycolic acid) composite microspheres, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323 (2004) 1321-1327.

[57] H. Tamber, P. Johansen, H. P. Merkle, B. Gander, Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (2005) 357-376.

[58] M. Rad, H. Ghourchian, A. A. Moosavi-Movahedi, J. Hong, K. Nazari, Spectrophotometric assay for horseradish peroxidase activity based on pyrocatechol-aniline coupling hydrogen donor, *Analytical Biochemistry* 362 (2007) 38-43.

[59] Z. Zhang, S.-S. Feng, In vitro investigation on poly(lactide)-tween 80 copolymer nanoparticles fabricated by dialysis method for chemotherapy, *Biomacromolecules* 7 (2006) 1139-1146.

[60] A. A. Moshfeghi, G. A. Peyman, Micro- and nanoparticulates, *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (2005) 2047-2052.

[61] www.rsc.org/ejga/JM/2007/b706939a-ga.gif

[62] A. Matsumoto, Y. Matsukawa, T. Suzuki, H. Yoshino, Drug release characteristics of multi-reservoir type microspheres with poly(DL-lactide-co-glycolide) and poly(DL-lactide), *Journal of Controlled Release* 106 (2005) 172-180.

- [63] H.-J. Jeon, Y.-I. Jeong, M.-K. Jang, Y.-H. Park, J.-W. Nah, Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics, *International Journal of Pharmaceutics* 207 (2000) 99-108.
- [64] S. Freitas, H. P. Merkle, B. Gander, Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology, *Journal of Controlled Release* 102 (2005) 313-332.
- [65] www.karmat.com/images/21af70e0-1b59-427d-93a4-e1b0bba9538c..jpg
- [66] M. Lück, K.-F. Pistel, Y.-X. Li, T. Blunk, R. H. Müller, Plasma protein adsorption on biodegradable microspheres consisting of poly(D,L-lactide-co-glycolide), poly(L-lactide) or ABA triblock copolymers containing poly(oxyethylene): influence of production method and polymer composition, *Journal of Controlled Release* 55 (1998) 107-120.
- [67] J. Lee, E. C. Cho, K. Cho, Incorporation and release behavior of hydrophobic drug in functionalized poly(D,L-lactide)-block-poly(ethylene oxide) micelles, *Journal of Controlled Release* 50 (1998) 31-40.
- [68] J. Kreuter, V. E. Petrov, D. A. Kharkevich, R. N. Alyautdin, Influence of the of surfactant on the analgesic effects induced by the peptide dalargin after its delivery across the blood-brain barrier using surfactant coated nanoparticles, *Journal of Controlled Release* 49 (1997) 81-87.
- [69] J. Kreuter, Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs, *Advanced Drug Delivery Reviews* 47 (2001) 65-81.
- [70] E. Allemann, P. Gravel, J. C. Leroux, L. Balant, R. Gurny, Kinetics of blood component adsorption on poly(D,L-lactic acid) nanoparticles: evidence of complement C3 component involvement, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 37 (1997) 229-234.
- [71] R. Gref, M. Lück, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnitsch, 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 18 (2000) 301-313.
- [72] T. Niwa, H. Takeuchi, T. Hino, M. Nohara, Y. Kawashima, Biodegradable submicron carriers for peptide drugs: preparation of α -lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres with nafarelin acetate by novel emulsion-phase separation method in an oil system, *International Journal of Pharmaceutics* 121 (1995) 45-54.
- [73] E. Horisawa, T. Hirota, S. Kawazoe, J. Yamada, H. Yamamoto, H. Takeuchi, Y. Kawashima, Prolonged anti-inflammatory action of DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres containing betamethasone sodium phosphate for an intra-articular delivery system in antigen-induced arthritic rabbit, *Pharmaceutical Research* 19 (2002) 403-410.
- [74] Y. N. Konan, R. Gutny, E. Allemann, Preparation and characterization of sterile and freeze dried sub-200 nm nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics* 233 (2002) 239-252.

- [75] F. De Jaeghere, E. Allemann, J. C. Leroux, W. Stevels, J. Feijen, E. Doelker et al., Formulation and lyoprotection of poly(lactic acid-co-ethylene oxide) nanoparticles: influence on physical stability and in vitro cell uptake, *Pharmaceutical Research* 16 (1999) 859-866.
- [76] S. C. Lee, J.T. Oh, M.H. Jang, S.I. Chung, Quantitative analysis of polyvinyl alcohol on the surface of poly(DL-lactide-co-glycolide) microparticles prepared by solvent evaporation method: effect of particle size and PVA concentration, *Journal of Controlled Release* 59 (1999) 123-132.
- [77] K. M. Shakesheff, C. Evora, I. Soriano, R. Langer, The adsorption of poly(vinyl alcohol) to biodegradable microparticles studied by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), *Journal of Colloid & Interface Science* 185 (1997) 538-547.
- [78] F. Boury, H. Marchais, J. E. Proust, J. P. Benoit, Bovine serum albumin release poly(α -hydroxy acid) microspheres: effects of polymer molecular weight and surface properties, *Journal of Controlled Release* 45 (1997) 75-86.
- [79] E. C. Lavelle, S. Sharif, N. W. Thomas, J. Holland, S. S. Davis, The importance of gastrointestinal uptake of particles in design of oral delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews* 18 (1995) 5-22.
- [80] Y. Tabata, Y. Ikada, Phagocytosis of polymer microspheres by macrophages, *Advances in Polymer Science* 94 (1991) 107-141.
- [81] P. Caliceti, S. Salmaso, N. Elvassore, A. Bertucco, Effective protein release from PEG/PLA nano particles produced by compressed gas-anti-solvent precipitation techniques, *Journal of Controlled Release* 94 (2004) 195-205.
- [82] B. Sjostrom, B. R. Kronberg, J. Carlfors, A method for the preparation of submicron particles of sparingly water-soluble drugs by precipitation in oil-in water emulsions, I: influence of emulsification and surfactant concentration, *Journal of Pharmaceutical Science* 82 (1993) 579-583.
- [83] B. Sjostrom, B. R. Kronberg, J. Carlfors, A method for the preparation of submicron particles of sparingly water-soluble drugs by precipitation in oil-in water emulsions, II: influence of emulsifier, the solvent, and the drug substance, *Journal of Pharmaceutical Science* 82 (1993) 585-589.
- [84] G. Gaucher, M. Poreba, F. Ravenelle, J.-C. Leroux, Poly(N-vinyl-pyrrolidone)-block-poly(D,L-Lactide) as polymeric emulsifier for the preparation of biodegradable nanoparticles, *Journal of Pharmaceutical Science* 96 (2007) 1763-1775.
- [85] C. Witschi, E. Doelker, Residual solvents in pharmaceutical products: acceptable limits, influences on physicochemical properties, analytical methods and documented values, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 43 (1997) 215-242.
- [86] Y. I. Jeong, J. B. Cheon, S. H. Kim et al., Clonazepam release from core-shell type nanoparticles in vitro, *Journal of Controlled Release* 51 (1998) 169-178.
- [87] G. S. Kwon, M. Naito, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kaoka, Physical entrapment of adriamycin in AB block copolymer micelles, *Pharmaceutical Research* 12 (1995) 192-195.
- [88] D. D. Lasic, Mixed micelles in drug delivery, *Nature* 355 (1992) 279-280.

- [89] J. W. Nah, Y. I. Jeong, C. S. Cho, Clonazepam release from core-shell type nanoparticles composed of poly(β -benzyl L-glutamate) as the hydrophobic part and poly(ethylene oxide) as the hydrophilic part, *Journal of Polymer Science. Part B: Polymer Physics* 36 (1998) 415-423.
- [90] S. Y. Kim, I. G. Shin, Y. M. Lee, Amphiphilic diblock copolymeric nanospheres composed of methoxy poly(ethylene glycol) and glycolide: properties, cytotoxicity and drug release behavior, *Biomaterials* 20 (1999) 1033-1042.
- [91] Y. Ataman-Onal, S. Munier, A. Ganée, C. Terrat, P.-Y. Durand, N. Battail, F. Martinon, R. Le Grand, M.-H. Charles, T. Delair, B. Verrier, Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models, *Journal of Controlled Release* 112 (2006) 175-185.
- [92] H. Wu, Y. Wan, X. Cao, Q. Wu, Interlocked chitosan/poly(DL-lactide) blends, *Materials Letters* 62 (2006) 330-334.
- [93] F.-J. Wang, C.-H. Wang, Etanidazol-loaded microspheres fabricated by spray-drying different poly(lactide/glycolide) polymers: effects on microsphere properties, *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition* 14 (2003) 157-183.
- [94] www.cd-adapco.com/press_room/dynamics/22/images/nizo1.jpg
- [95] R. T. Liggins, H. M. Burt, Paclitaxel loaded poly(L-lactic acid) PLLA microspheres II. The effect of processing parameters on microsphere morphology and drug release kinetics, *International Journal of Pharmaceutics* 281 (2004) 103-106.
- [96] R. Dinarvand, S. H. Moghadam, L. Mohammadyari-Fard, F. Atyabi, Preparation of biodegradable microspheres and matrix devices containing naltrexone, *AAPS PharmSciTech* 4 (2003) article 34.
- [97] T. W. Chung, Y. Y. Huang, Y. Z. Liu, Effects of the rate of solvent evaporation on the characteristics of drug loaded PLLA and PDLLA microspheres, *International Journal of Pharmaceutics* 212 (2001) 161-169.
- [98] H. Murakami, M. Kobayashi, H. Takeuchi, Y. Kawashima, Further application of modified spontaneous emulsification solvent diffusion method to various types of PLGA and PLA polymers for preparation of nanoparticles, *Powder Technology* 107 (2000) 137-143.
- [99] S. Hirsjärvi, L. Peltonen, J. Hirvonen, Layer-by-layer polyelectrolyte coating of low molecular weight poly(lactic acid) nanoparticles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 49 (2006) 93-99.
- [100] L. Peltonen, P. Koistinen, M. Karjalainen, A. Häkkinen, J. Hirvonen, The effect of cosolvents on the formulation of nanoparticles from low-molecular-weight poly(l)lactide, *AAPS PharmSciTech* 3 (2002) Article 32.
- [101] J. W. Kostanski, B. C. Thanoo, P. P. DeLuca, Preparation, characterization, and in vitro evaluation of 1- and 4-month controlled release Orntide PLA and PLGA microspheres, *Pharmaceutical Development and Technology* 5 (2000) 585-596.

[102] U. Bilati, E. Allémann, E. Doekler, Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 59 (2005) 375-388.

[103] M. F. Zambaux, F. Bonneaux, R. Gef, E. Dellacherie, C. Vigneron, Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles, *Journal of Controlled Release* 60 (1999) 179-188.

[104] K. F. Griffin, J. E. Eyles, I. D. Spiers, H. O. Alpar, E. D. Williamson, Protection against plague following immunisation with microencapsulated V antigen is reduced by co-encapsulation with IFN- γ or IL-4, but not IL-6, *Vaccine* 20 (2002) 3650-3657.

[105] S. Avivi, A. Gedanken, S-S bonds are not required for the sonochemical formation of proteinaceous microspheres: the case of streptavidin, *Biochemical Journal* 366 (2002) 705-707.

[106] www.ijus.com/volume3/edition5/section1.html

[107] W. Jiang, S. P. Schwendeman, Stabilization and controlled release of bovine serum albumin encapsulated in poly(D,L-lactide) and poly(ethylene glycol) microsphere blends, *Pharmaceutical Research* 18 (2001) 878-885.

[108] X. Li, Y. Zhang, R. Yan, W. Jia, M. Yuan, X. Deng, Z. Huang, Influence of process parameters on the protein stability encapsulated in poly-DL-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres, *Journal of Controlled Release* 68 (2000) 41-52.

[109] Y. Y. Yang, T. S. Chung, X. L. Bai, W. K. Chan, Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method, *Chemical Engineering Science* 55 (2000) 2223-2236.

[110] A. Basarkar, D. Devineni, R. Palaniappan, J. Singh, Preparation, characterization, cytotoxicity and transfection efficiency of poly(DL-lactide-co-glycolide) and poly(DL-lactic acid) cationic nanoparticles for controlled delivery of plasmid DNA, *International Journal of Pharmaceutics* 343 (2007) 247-254.

[111] M. Yasuniwa, K. Sakamo, Y. Ono, W. Kawahara, Melting behavior of poly(L-lactic acid): X-ray and DSC analyses of the melting process, *Polymer* 49 (2008) 1943-1951.

[112] J. Zhang, H. Sato, H. Tsuji, I. Noda, Y. Ozaki, Differences in the CH₃···O=C interactions among poly(l-lactide), poly(L-lactide)/poly(D-lactide) stereocomplex, and poly(3-Hydroxybutyrate) studied by infrared spectroscopy, *Journal of Molecular Structure* 735-736 (2005) 249-257.

[113] Z. Vujčić, Eksperimentalna biohemija-praktikum, Hemijski fakultet, Beograd 2002.

[114] S. Hyvönen, L. Peltonen, M. Karjalainen, J. Hirvonen, Effect of nanoprecipitation on the physicochemical properties of low molecular weight poly(L-lactic acid) nanoparticles loaded with salbutamol sulphate and beclomethasone dipropionate, *International Journal of Pharmaceutics* 295 (2005) 269-281.

[115] M. Asano, H. Fukuzaki, M. Yoshida, M. Kumakura, T. Mashimo, H. Yuasa, K. Imai, H. Yamanaka, U. Kawaharada, K. Suzuki, In vivo controlled release of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist from poly(DL-lactic acid) formulations of varying degradation pattern, *International Journal of Pharmaceutics* 67 (1991) 67-77.

[116] J. Ren, K. Adachi, Dielectric relaxation in blends of amorphous poly (DL-lactic acid) and semicrystalline poly(L-lactic acid), *Macromolecules* 36 (2003) 5180-5186.

[117] I. Jovanović, M. Stevanović, B. Nedeljković, N. Ignjatović, The effect of processing parameters on characteristics of poly-L-lactide microspheres, *Materials Science Forum* 555 (2007) 453-458.

[118] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular cloning a laboratory manual*, Second Edition, (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

[119] U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* (1970) 680-685.

[120] M. Liu, Z. Zhou, X. Wang, J. Xu, K. Yang, Q. Cui, X. Chen, M. Cao, J. Weng, Q. Zhang, Formation of poly(L,D-lactide) spheres with controlled size by direct dialysis, *Polymer* 48 (2007) 5767-5779.

[121] Y. Liu, N. Tsapis, D. A. Edwards, Investigating sustained-release nanoparticles for pulmonary drug delivery, Harvard University, MRSEC REU Program, (2003).

[122] M. E. R. Coimbra, C. N. Elias, P. G. Coelho, In vitro degradation of poly-L-D-lactic acid (PLDLA) pellets and powder used as synthetic alloplasts for bone grafting, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (2008) 3227-3234.

[123] M. Stevanović, N. Ignjatović, B. Jordović, D. Uskoković, Stereological analysis of the poly-(DL-lactide-co-glycolide) submicron sphere prepared by solvent/nonsolvent chemical methods and centrifugal processing, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18 (2007) 1339-1344.

[124] M. Stevanović, N. Ignjatović, B. Jordović, D. Uskoković, Stereological analysis of the poly (DL-lactide-co-glycolide) submicron sphere prepared by solvent/non-solvent chemical methods and centrifugal processing, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18 (2007) 1339-1344.

[125] M. M. Stevanović, B. Jordović, D. P. Uskoković, Preparation and characterization of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles containing ascorbic acid, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, (volume 2007), article id 84965, (doi:10.1155/2007/84965)

[126] M. Stevanović, J. Savić, B. Jordović, D. Uskoković, Fabrication, in vitro degradation and the release behaviours of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanospheres containing ascorbic acid, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 59 (2007) 215-223.

[127] M. M. Stevanović, B. Jordović, D. P. Uskoković, Morphological changes of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles containing ascorbic acid during in vitro degradation process, *Journal of Microscopy*, (2008), accepted

[128] M. Stevanović, B. Jordović, Z. Nedić, D. Miličević, The stabilizer influence on morphological characteristics of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanospheres, *Material Science Forum* 555 (2007) 447-452.

[129] M. Radić, N. Ignjatović, Z. Nedić, M. Mitrić, M. Miljković, D. Uskoković, Synthesis and characterization of the composite material biphasic calcium phosphate/poly-(DL-lactide-co-glycolide), *Material Science Forum* 494 (2005) 537-542.

[130] I. Jovanović, B. Jordović, M. Petković and D. Uskoković, Preparation of smallest microparticles of poly-D,L-lactide by modified precipitation method: influence of the process parameters, *Microscopy Research and Technique* 71 (2008) 86-92.

[131] D. Quintanar-Guerrero, H. Fessi, E. Allemann, E. Doelker, Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique, *International Journal of Pharmaceutics*, 143 (1996) 133-141.

[132] S. S. Feng, G. Huang, Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol[®]) from nanospheres of biodegradable polymers, *Journal of Controlled Release* 71 (2001) 53-69.

[133] G. Schmidmaier, B. Wildemann, A. Stemberger, N. P. Haas, M. Raschke, Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors, *Journal of Biomedical Materials Research. Part B: Applied Biomaterials* 58 (2001) 449-455.

[134] C. J. Hogan Jr, K. M. Yun, D.-R. Chen, I. W. Lenggoro, P. Biswas, K. Okuyama, Controlled size polymer particle production via electrohydrodynamic atomization, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical & Engineering Aspects* 311 (2007) 67-76.

[135] W. Al-Azzam, E. A. Pastrana, B. King, J. Méndez, K. Griebenow, Effect of the covalent modification of horseradish peroxidase with poly(ethylene glycol) on the activity and stability upon encapsulation in polyester microspheres, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94 (2005) 1808-1819.

[136] F. B. Landry, D. V. Bazile, G. Spenlehauer, M. Veillard, J. Kreuter, Degradation of poly(DL-lactic acid) nanoparticles coated with albumin in digestive fluids (USP XXII), *Biomaterials* 17 (1996) 715-723.

[137] T. W. Chung, Y. Y. Huang, Y. I. Tsai, Y. Z. Liu, Effects of solvent evaporation rate on the properties of protein-loaded PLLA and PDLLA microspheres fabricated by emulsion-solvent evaporation process, *Journal of Microencapsulation* 19 (2002) 463-471.

[138] E. Leo, F. Forni, M. Teresa Bernabei, Surface drug removal from ibuprofen-loaded PLA microspheres, *International Journal of Pharmaceutics* 196 (2000) 1-9.

[139] C. Grandfils, P. Flandroy, R. Jèrôme, Control of the biodegradation rate of poly(DL-lactide) microparticles intended as chemoembolization materials, *Journal of Controlled Release* 38 (1996) 109-122.

[140] T. G. Park, Degradation of poly(D,L lactic acid) microspheres: effect of molecular weight, *Journal of Controlled Release* 30 (1994) 161-173.

[141] S. Yoshioka, Y. Aso, S. Kojima, Drug release from poly(dl-lactide) microspheres controlled by γ -irradiation, *Journal of Controlled Release* 37 (1995) 263-267.

[142] M. Leroueil-Le Verger, L. Fluckiger, Y.-I. Kim, M. Hoffman, P. Maincent, Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 46 (1998) 137-143.

[143] F. Némati, C. Dubernet, H. Fessi, A. C. Verdière, M. F. Poupon, F. Puisieux et al., Reversion of multidrug resistance using nanoparticles in vitro: influence of the nature of the polymer, *International Journal of Pharmaceutics* 138 (1996) 237-46.

[144] M. Ueda, A. Iwara, J. Kreuter, Influence of the preparation methods on the drug release behavior of loperamide-loaded nanoparticles, *Journal of Microencapsulation* 15 (1998) 361-72.

[145] R. T. Liggins, H. M. Burt, Paclitaxel loaded poly(L-lactic acid) microspheres: properties of microspheres made with low molecular weight polymers, *International Journal of Pharmaceutics* 222 (2001) 19-33.

[146] Y. Mizutani, M. Hattori, M. Okuyama, T. Kasuga, M. Nogami, Poly(L-lactic acid) short fibers prepared by solvent evaporation using sodium tripolyphosphate, *Polymer* 46 (2005) 3789-3794.

Objavljeni rezultati koji čine deo ove teze

Delovi teze publikovani su u naučnim časopisima i materijalima naučnih skupova, a spisak tih publikacija je sledeći:

Rad u časopisu međunarodnog značaja R₅₁

- I. Jovanović, B. Jordović, M. Petković and D. Uskoković, Preparation of Smallest Microparticles of Poly-D,L-lactide by Modified Precipitation Method: Influence of the Process Parameters, *Microscopy Research and Technique*, 71 (2008) 86-92.

Rad u časopisu međunarodnog značaja R₅₂

- I. Jovanović, M. Stevanović, M. Mitrić, N. Ignjatović, D. Uskoković, The effect of processing parameters on characteristics of poly-l-lactide microspheres, *Materials Science Forum* 555 (2007) 453-458.

Rad saopšten na skupu međunarodnog značaja

- I. Jovanović, M. Petković, B. Jordović, N. Ignjatović, D. Uskoković, PDLLA microparticles containing BSA: effect of formulation variables on size distribution, 9th Conference of the Yugoslav Materials Science-YUCOMAT 2007, *Book of Abstracts* p. 170.
- I. Jovanović, B. Nedeljković, N. Ignjatović, *Proceedings of the 9th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Editors Prof. dr Ankica Antić-Jovanović, Volume II (2008) 500-502.
- I. Jovanović, M. Petković, G. Joksić, D. Uskoković, Genotoxicity of the poly-D,L-lactide microparticles on the human lymphocytes, 9th Conference of the Yugoslav Materials Science-YUCOMAT 2007, *Book of Abstracts* p. 61
- I. Jovanović, M. Mitrić, N. Ignjatović, D. Uskoković, The effect of processing parameters on characteristics of PLLA microspheres, 8th Conference of the Yugoslav Materials Science-YUCOMAT 2006, *Book of Abstracts* p. 142.
- I. Jovanović, M. Mitrić, N. Ignjatović, D. Uskoković, Preparation and characterization of poly-l-lactide microspheres, *International Workshop and Summer School Cell and Tissue Engineering*, *Book of Abstracts*, Faculty of technology and metallurgy University of Belgrade, July 1-8, 2006 Belgrade.

Nagrade

- Nagrada za najbolji poster na konferenciji YUCOMAT 2006, Herceg Novi, objavljeno u časopisu MRS BULLETIN, volume 31, december 2006, p. 1023
- Sertifikat za pohađanje međunarodne letnje škole Cell and Tissue Engineering, Tehnološko-metalurški fakultet, 1-8. jul, Beograd 2006.