

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET ZA FIZIČKU HEMIJU

Magdalena M. Stevanović

**Sinteza, karakterizacija i degradacija
nanosfera poli(DL-laktid-ko-glikolida)
koje sadrže askorbinsku kiselinu**

doktorska disertacija

Beograd, 2007

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

Magdalena M. Stevanović

**Synthesis, characterization and
degradation of poly
(DL-lactide-co-glycolide) nanospheres
containing ascorbic acid**

Doctoral Dissertation

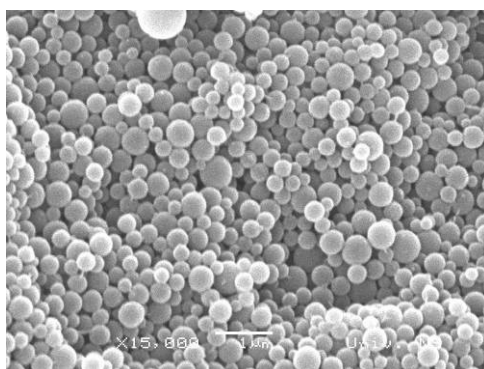
Belgrade, 2007

Univerzitet u Beogradu
Fakultet za fizičku hemiju

mr Magdalena Stevanović

**Sinteza, karakterizacija i degradacija poli(DL-laktid-
ko-glikolid) nanosfera koje sadrže askorbinsku kiselinu**

-doktorska disertacija-



Beograd, 2007.

Zahvaljujem se suprugu Goranu na ogromnoj podršci, ljubavi, razumevanju i konkretnoj pomoći tokom izrade ove doktorske disertacije.

Mojim Stevanovićima, Radićima i Zeljićima

U okviru ove doktorske teze istraživanja su ostvarena kroz niz programa iz oblasti nauke materijala koji se realizuju u Institutu tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti pod rukovodstvom prof. dr Dragana Uskokovića, mentora teze, kome dugujem iskrenu zahvalnost za podršku i pomoć u mom naučnom usavršavanju. Zahvaljujem se i mentoru dr Gordani Ćirić Marjanović sa Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu na korisnim savetima i pomoći. Takođe sam zahvalna na pomoći dr Nikoli Cvjetičaninu sa Fakulteta za fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu kao i dr Nenadu Ignjatoviću iz Instituta tehničkih nauka SANU.

U okviru ove teze, analiza uzoraka metodom infracrvene spektroskopije je uradjena zahvaljujući pomoći mr Zorana Nedića sa Fakulteta za fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu i Aleksandre Radulović iz Instituta za opštu i fizičku hemiju. Ispitivanje uzoraka diferencijalnom skanirajućom kalorimetrijom je uradjeno zahvaljujući pomoći Dejana Miličevića iz Instituta za nuklearne nauke Vinča, Laboratorija za radiohemiju i fiziku, dok je analiziranje uzoraka UV-VIS spektrofotometrijom uradjeno zahvaljujući pomoći mr Jasmine Savić iz Laboratorije za opštu i fizičku hemiju Instituta za nuklearne nauke Vinča, na čemu sam im iskreno zahvalna. Takođe veliko hvala prof. Milošu Bokorovu sa Biološkog fakulteta iz Novog Sada na karakterizaciji uzoraka skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Posebnu zahvalnost dugujem i prof. Branki Jordović i Bori Nedeljkoviću sa Tehničkog fakulteta iz Čačka na uradjenim stereološkim ispitivanjima uzoraka. Zahvaljujem se kolegama iz Instituta tehničkih nauka SANU kao i kolegama sa Fakulteta za fizičku hemiju.

Teza se sastoji iz sedam celina. Prvo poglavlje predstavlja teorijski deo u kome je dat pregled literature koja se odnosi na nanotehnologiju i nanomedicinu, polimerne biomaterijale, degradabilne polimere, biodegradaciju i biokompatibilnost poli(laktid-ko-glikolida), kontrolisanu dostavu medikamenata, dobijanje čestica poli (laktid-ko glikolida) i njihovu primenu kao sistema za kontrolisanu dostavu medikamenata, vitamine rastvorne u vodi, askorbinsku kiselinu, poli(laktid-ko-glikolid) u kontrolisanoj dostavi vitamina. Drugo poglavlje objašnjava ukratko cilj rada. Treće poglavlje prikazuje eksperimentalni rad kao i uslove pod kojima je rađena karakterizacija uzoraka. Četvrto poglavlje iznosi i tumači rezultate istraživanja dok peto daje diskusiju rezultata. Šesto poglavlje daje zaključak svega urađenog dok je u sedmom dat spisak referenci.

Sadržaj

1 Teorijski deo	17
1.1 Nanotehnologija i nanomedicina	18
1.1.1 Micele u nanomedicini.....	20
1.1.2 Lipozomi u nanomedicini.....	21
1.1.3 Dendrimeri u nanomedicini.....	21
1.1.4 Polimerne micele.....	22
1.1.5 Polimerne nanočestice.....	22
1.2 Polimerni biomaterijali	24
1.2.1 Primena polimernih biomaterijala u medicini.....	26
1.2.2 Primena polimernih biomaterijala u farmakologiji.....	27
1.2.3 Primena polimernih biomaterijala u inženjerstvu tkiva.....	28
1.3 Degradabilni polimeri	29
1.4 Biodegradacija i biokompatibilnost poli(laktid-ko-glikolida)	35
1.5 Kontrolisana dostava medikamenata	38
1.6 Dobijanje čestica poli(laktid-ko-glikolida) i njihova primena kao sistema za kontrolisanu dostavu medikamenata	43
1.7 Vitamini rastvorni u vodi	52
1.8 Askorbinska kiselina	54
1.9 Poli(laktid-ko-glikolid) u kontrolisanoj dostavi vitamina	56
2 Cilj istraživanja	58
3 Eksperimentalni deo	61
3.1 Eksperimentalne metode	62

3.1.1 Metoda centrifugalnog procesiranja	62
3.1.2 Infracrvena spektroskopija.....	62
3.1.3 UV-VIS spektrofotometrija	63
3.1.4 Skenirajuća elektronska mikroskopija	63
3.1.5 Stereološka analiza	64
3.1.6 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija	65
3.2 Eksperimentalni rad.....	66
3.2.1 Dobijanje nanosfera kopolimera poli(DL-laktid-ko-glikolida).....	66
3.2.2 Ispitivanje uticaja različitih stabilizatora	68
3.2.3 Inkapsulacija askorbinske kiseline u polimernu matricu poli(DL-laktid-ko-glikolida).....	69
3.2.4 Izračunavanje prinosa inkapsulacije	71
3.2.5 Izračunavanje mase inkapsulirane askorbinske kiseline i efikasnost inkapsulacije	71
3.2.6 Eksperiment praćenja degradacije nanosfera poli(DL-laktid-ko-glikolida) bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline u fiziološkom rastvoru kao degradacionom medijumu.....	73
3.2.7 Eksperiment praćenja degradacije nanosfera poli(DL-laktid-ko-glikolida) bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline u PBS-u kao degradacionom medijumu uz prisustvo azida	74
4 Rezultati.....	76
4.1 Prinos čestica DLPLG i DLPLG/askorbinska kiselina	77
4.2 Efikasnost inkapsulacije i masa inkapsulirane askorbinske kiseline.....	78
4.3 Infracrvena spektroskopija	81
4.4 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija.....	85
4.5 Ispitivanje uticaja stabilizatora na morfološke karakteristike čestica DLPLG-a bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline	87
4.5.1 Rezultati skenirajuće elektronske mikroskopije	87

4.5.2 Rezultati stereološke analize.....	90
4.6 Degradacija nanosfera poli(DL-laktid-ko-glikolida) bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline u fiziološkom rastvoru kao degradacionom medijumu.....	100
4.7 Morfološke promene tokom degradacije DLPLG i DLPLG/askorbinska kiselina čestica u fiziološkom rastvoru kao degradacionom medijumu	111
4.8 Sterološka analiza čestica DLPLG-a bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline tokom degradacionog procesa u fiziološkom rastvoru kao degradacionom medijumu	116
4.9 Degradacija nanosfera poli(DL-laktid-ko-glikolida) bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline u PBS-u kao degradacionom medijumu.....	125
4.10 Morfološke promene tokom degradacije DLPLG i DLPLG/askorbinska kiselina čestica u PBS-u kao degradacionom medijumu.....	134
5 Diskusija.....	138
5.1 Diskusija rezultata.....	139
6 Zaključak.....	149
7 Literatura	153

Sadržaj slika

<i>Slika 1.1-1 Nanorobot [11]</i>	18
<i>Slika 1.1-2 Prikaz dendrimera [29]</i>	21
<i>Slika 1.1-3 Polimerna micela</i>	22
<i>Slika 1.1-4 Polimerne nanočestice</i>	23
<i>Slika 1.2-1 Polimeri u medicini [56]</i>	26
<i>Slika 1.3-1 Fibrin i crvena krvna zrnca [92]</i>	29
<i>Slika 1.3-2 Porozne polimerne čestice [95]</i>	29
<i>Slika 1.4-1 Sinteza PLGA-a i PLA-a</i>	35
<i>Slika 1.4-2 Shemaski prikaz hidrolize polilaktida u monomerne jedinice</i>	36
<i>Slika 1.5-1 Nivo leka u krvi: a) konvencionalna i b) kontrolisana dostava</i>	39
<i>Slika 1.5-2 Oslobođanje leka iz a) rezervoar sistema i b) matrica sistema</i>	41
<i>Slika 1.5-3 Degradacija polimera homogenom i heterogenom erozijom polimerne mase</i>	42
<i>Slika 1.6-1 Komercijalne granule poli(DL-laktid-ko-glikolida) i poli(L-laktid-ko-glikolida)</i>	43
<i>Slika 1.6-2 Slika, adhezije ćelija na česticama poli(DL-laktid-ko-glikolida), dobijena A) optičkim i B) skenirajućim elektronskim mikroskopom [170]</i>	45
<i>Slika 1.6-3 Shematski prikaz oslobađanja rhGH iz mikrosfera PLGA-a sa zatvorenim porama nakon tretiranja etanolom [251]</i>	50
<i>Slika 1.8-1 Vitamin C</i>	54
<i>Slika 1.8-2 Oksidacija vitamina C</i>	55
<i>Slika 3.1-1 IR spektar askorbinske kiseline [307]</i>	63
<i>Slika 3.1-2 Grafički prikaz pojedinih stereoloških parametara: a) površina ekvatorijalnog preseka, b) obim, c) feret x i feret y, d) maksimalni dijametar čestice, e) faktor oblika</i>	64
<i>Slika 3.2-1 Shematski prikaz dobijanja nanočestica poli(DL-laktid-ko-glikolida) fizičko-hemijskom metodom rastvarač/nerastvarač uz korišćenje tehnike centrifugalnog procesiranja</i>	68
<i>Slika 3.2-2 Shematski prikaz dobijanja čestica DLPLG/askorbinska kiselina</i>	70
<i>Slika 3.2-3 UV spektri vodenog rastvora askorbinske kiseline (vitamina C)</i>	72
<i>Slika 3.2-4 Kalibraciona kriva askorbinske kiseline</i>	73
<i>Slika 4.2-1 UV spektri askorbinske kiseline iz supernatanta (PVA kao stabilizator)</i>	78

<i>Slika 4.2-2 UV spektri askorbinske kiseline iz supernatanta (PVP kao stabilizator).....</i>	79
<i>Slika 4.3-1 IR spektar nanosfera DLPLG-a dobijenih korišćenjem PVA-a kao stabilizatora čestica.....</i>	81
<i>Slika 4.3-2 IR spektar nanosfera DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% wt (PVA kao stabilizator).....</i>	82
<i>Slika 4.3-3 IR spektar nanosfera DLPLG-a dobijenih korišćen PVP-a kao stabilizatora čestica.....</i>	83
<i>Slika 4.3-4 IR spektar nanosfera DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% wt (PVP kao stabilizator).....</i>	84
<i>Slika 4.4-1 DSC kriva nanočestica DLPLG-a dobijenih sa PVA kao stabilizatorom.....</i>	85
<i>Slika 4.4-2 DSC kriva nanočestica DLPLG-a dobijenih sa PVP-om kao stabilizatorom.....</i>	86
<i>Slika 4.5-1 SEM fotografije a) nanosfera DLPLG-a b) čestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% c) DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% d) DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% e) DLPLG/askorbinska kiselina 30/70%; dobijenih korišćenjem polivinil alkohola (PVA) kao stabilizatora čestica.....</i>	88
<i>Slika 4.5-2 SEM fotografije a) nanosfera DLPLG-a b) čestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% c) DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% d) DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% e) DLPLG/askorbinska kiselina 30/70%; dobijenih korišćenjem polivinil pirolidona (PVP) kao stabilizatora čestica.....</i>	89
<i>Slika 4.5-3 Uporedni rezultati stereoloških ispitivanja nanosfera DLPLG-a dobijenih sa polivinil alkoholom (PVA) i polivinil pirolidonom (PVP) kao stabilizatorom čestica bazirano na stereološkom parametru a) A_a (poprečni presek čestice); b) L_p (obim); c) D_{max} (maksimalni prečnik čestice); d) feret X (projekcija čestice na x osu); e) feret Y (projekcija čestice na y osu); i f) perimetar form faktoru f_L (faktor oblika);.....</i>	91
<i>Slika 4.5-4 Rezultati stereoloških ispitivanja za odnos L_p/A_a u slučaju nanosfera DLPLG-a dobijenog sa a) polivinil alkoholom i b) polivinil pirolidonom kao stabilizatorom čestica.....</i>	92
<i>Slika 4.5-5 Rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG-a sa različitim sadržajem askorbinske kiseline dobijenih u eksperimentu u kome je kao stabilizator čestica korišćen PVA a) A_a b) L_p c) D_{max} d) feret X e) feret Y i f) perimetar form faktor, f_L.....</i>	95
<i>Slika 4.5-6 Rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG-a sa različitim sadržajem askorbinske kiseline dobijenih u eksperimentu u kome je kao stabilizator čestica korišćen PVP a) A_a b) L_p c) D_{max} d) feret X e) feret Y i f) perimetar form faktor, f_L.....</i>	98
<i>Slika 4.6-1 UV spektri rastvora iznad taloga nanosfera DLPLG-a nakon različitih perioda degradacije u fiziološkom rastvoru kao degradacionom medijumu.....</i>	100
<i>Slika 4.6-2 UV spektri rastvora iznad taloga nanosfera DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% nakon različitih perioda degradacije u fiziološkom rastvoru kao degradacionom medijumu.....</i>	101
<i>Slika 4.6-3 UV spektri rastvora iznad taloga čestica DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% nakon različitih perioda degradacije u fiziološkom rastvoru kao degradacionom medijumu.....</i>	102

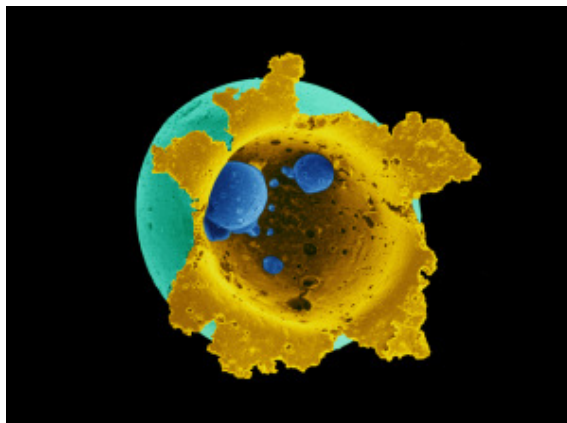
<i>Slika 4.6-4 UV spektri rastvora iznad taloga čestica DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% nakon različitih perioda degradacije u fiziološkom rastvoru kao degradacionom medijumu</i>	<i>103</i>
<i>Slika 4.6-5 Oslobađanje askorbinske kiseline u procentima iz nanočestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% tokom vremena a) kumulativna kriva i b) relativni prikaz.....</i>	<i>104</i>
<i>Slika 4.6-6 Oslobađanje askorbinske kiseline u procentima iz čestica DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% tokom vremena a) kumulativna kriva i b) relativni prikaz.....</i>	<i>105</i>
<i>Slika 4.6-7 Oslobađanje askorbinske kiseline u procentima iz čestica DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% tokom vremena a) kumulativna kriva i b) relativni prikaz.....</i>	<i>106</i>
<i>Slika 4.6-8 UV spektri vodenih rastvora mlečne kiseline</i>	<i>107</i>
<i>Slika 4.6-9 Kalibraciona kriva mlečne kiseline</i>	<i>108</i>
<i>Slika 4.6-10 Promena pH vrednosti fiziološkog rastvora sa vremenom tokom procesa degradacije čestica DLPLG-a bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline.....</i>	<i>110</i>
<i>Slika 4.7-1 SEM slike nanosfera DLPLG nakon a) dva dana, b) 24 dana i c) 39 dana degradacije u fiziološkom rastvoru</i>	<i>112</i>
<i>Slika 4.7-2 SEM slike nanočestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% nakon a) dva dana, b) 24 dana i c) 39 dana degradacije u fiziološkom rastvoru.....</i>	<i>113</i>
<i>Slika 4.7-3 SEM slike čestica DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% nakon a) dva dana, b) 24 dana i c) 39 dana degradacije u fiziološkom rastvoru</i>	<i>114</i>
<i>Slika 4.7-4 SEM slike čestica DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% nakon a) dva dana, b) 24 dana i c) 39 dana degradacije u fiziološkom rastvoru</i>	<i>115</i>
<i>Slika 4.8-1 Rezultati stereološke analize nanosfera DLPLG-a nakon dva dana degradacije u fiziološkom rastvoru.....</i>	<i>118</i>
<i>Slika 4.8-2 Stereologija nanočestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15 % nakon dva dana degradacije u fiziološkom rastvoru</i>	<i>120</i>
<i>Slika 4.8-3 Stereologija čestica DLPLG/askorbinska kiselina 70/30 % nakon dva dana degradacije u fiziološkom rastvoru</i>	<i>122</i>
<i>Slika 4.8-4 Stereologija čestica DLPLG/askorbinska kiselina 50/50 % nakon dva dana degradacije u fiziološkom rastvoru</i>	<i>124</i>
<i>Slika 4.9-1 UV spektri rastvora iznad taloga nanosfera DLPLG-a nakon različitih perioda degradacije u PBS-u kao degradacionom medijumu</i>	<i>125</i>
<i>Slika 4.9-2 UV spektri rastvora iznad taloga nanočestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% nakon različitih perioda degradacije u PBS-u kao degradacionom medijumu</i>	<i>126</i>

<i>Slika 4.9-3 UV spektri rastvora iznad taloga čestica DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% nakon različitih perioda degradacije u PBS-u kao degradacionom medijumu</i>	<i>127</i>
<i>Slika 4.9-4 UV spektri rastvora iznad taloga čestica DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% nakon različitih perioda degradacije u PBS-u kao degradacionom medijumu</i>	<i>128</i>
<i>Slika 4.9-5 Oslobađanje askorbinske kiseline u procentima iz nanočestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% tokom vremena a) kumulativna kriva i b) relativni prikaz.....</i>	<i>129</i>
<i>Slika 4.9-6 Oslobađanje askorbinske kiseline u procentima iz čestica DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% tokom vremena a) kumulativna kriva i b) relativni prikaz.....</i>	<i>130</i>
<i>Slika 4.9-7 Oslobađanje askorbinske kiseline u procentima iz čestica DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% tokom vremena a) kumulativna kriva i b) relativni prikaz.....</i>	<i>131</i>
<i>Slika 4.9-8 Promena pH vrednosti PBS rastvora, sa vremenom, tokom procesa degradacije čestica DLPLG-a bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline.....</i>	<i>133</i>
<i>Slika 4.10-1 SEM slike nanosfera DLPLG-a nakon a) 17 dana i b) 28 dana degradacije u fosfatnom pufer rastvoru</i>	<i>134</i>
<i>Slika 4.10-2 SEM slike nanočestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% nakon a) 17 dana i b) 28 dana degradacije u fosfatnom pufer rastvoru.....</i>	<i>135</i>
<i>Slika 4.10-3 SEM slike čestica DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% nakon a) 17 dana i b) 28 dana degradacije u fosfatnom pufer rastvoru.....</i>	<i>136</i>
<i>Slika 4.10-4 SEM slike nanočestica DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% nakon a) 17 dana i b) 28 dana degradacije u fosfatnom pufer rastvoru.....</i>	<i>137</i>
<i>Slika 5.1-1 Upporedne krive zavisnosti apsorpcije na talasnoj dužini apsorpcionog maksimuma ($\lambda=264\text{nm}$) od vremena degradacije, u fiziološkom rastvoru, u slučaju uzoraka DLPLG-a, DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%, DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% i DLPLG/askorbinska kiselina 50/50%.....</i>	<i>140</i>
<i>Slika 5.1-2 Kumulativne krive oslobađanja askorbinske kiseline u procentima tokom vremena degradacije, u fiziološkom rastvoru, u slučaju uzoraka DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%, DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% i DLPLG/askorbinska kiselina 50/50%.....</i>	<i>141</i>
<i>Slika 5.1-3 Upporedne krive zavisnosti apsorpcije na talasnoj dužini apsorpcionog maksimuma ($\lambda=264\text{nm}$) od vremena degradacije, u PBS-u, u slučaju uzoraka DLPLG-a, DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%, DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% i DLPLG/askorbinska kiselina 50/50%.....</i>	<i>142</i>
<i>Slika 5.1-4 Kumulativne krive oslobađanja askorbinske kiseline u procentima tokom vremena degradacije, u PBS-u, u slučaju uzoraka DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%, DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% i DLPLG/askorbinska kiselina 50/50%.....</i>	<i>143</i>

<i>Slika 5.1-5 Uporedni rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG-a bez i sa askorbinskom kiselinom pre i nakon dva dana degradacije, u fiziološkom rastvoru, na osnovu poprečnog preseka čestice -A_a.....</i>	<i>145</i>
<i>Slika 5.1-6 Uporedni rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG-a bez i sa askorbinskom kiselinom pre i nakon dva dana degradacije, u fiziološkom rastvoru, na osnovu obima čestice -L_p</i>	<i>145</i>
<i>Slika 5.1-7 Uporedni rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG-a bez i sa askorbinskom kiselinom pre i nakon dva dana degradacije, u fiziološkom rastvoru, na osnovu maksimalnog prečnika čestice -D_{max}.....</i>	<i>146</i>
<i>Slika 5.1-8 Uporedni rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG-a bez i sa askorbinskom kiselinom pre i nakon dva dana degradacije, u fiziološkom rastvoru, na osnovu feret X</i>	<i>146</i>
<i>Slika 5.1-9 Uporedni rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG-a bez i sa askorbinskom kiselinom pre i nakon dva dana degradacije, u fiziološkom rastvoru, na osnovu feret Y</i>	<i>147</i>
<i>Slika 5.1-10 Uporedni rezultati stereoloških ispitivanja pre i nakon dva dana degradacije u fiziološkom rastvoru za uzorak aa') nanosfera DLPLG-a bb') DLPLG/askorbinska kiselina 85/15 %; cc') DLPLG/askorbinska kiselina 70/30 %; dd') DLPLG/askorbinska kiselina 50/50 % čestica; bazirano na perimetar form farkoru, f_L</i>	<i>148</i>

Sadržaj tabela

<i>Tabela 1.1-1 Primeri nanoproizvoda i polje njihove, najčešće, primene [4].....</i>	20
<i>Tabela 1.3-1 Hemijska struktura bidegradabilnih polimera [96].....</i>	31
<i>Tabela 1.3-2 Primeri biodegradabilnih polimera, njihove termalne i mehaničke osobine, aproksimativno degradaciono vreme i produkti degradacije [105].....</i>	34
<i>Tabela 3.2-1 Eksperimentalni uslovi prilikom dobijanja praha DLPLG-a [45].....</i>	66
<i>Tabela 4.1-1 Prinos čestica dobijenih u eksperimentu u kome je kao stabilizator čestica korišćen polivinil pirolidon (PVP) i polivinil alkohol (PVA)</i>	77
<i>Tabela 4.2-1 Efikasnost inkapsulacije i masa inkapsulirane askorbinske kiseline u DLPLG/askorbinska kiselina česticama (PVA stabilizator čestica).....</i>	79
<i>Tabela 4.2-2 Efikasnost inkapsulacije i masa inkapsulirane askorbinske kiseline u DLPLG/askorbinska kiselina česticama (PVP stabilizator čestica).....</i>	80
<i>Tabela 4.5-1 Rezultati stereoloških ispitivanja nanosfera DLPLG-a dobijenih sa polivinil alkoholom i polivinil pirolidonom kao stabilizatorom čestica</i>	93
<i>Tabela 4.5-2 Rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG-a sa različitim sadržajem askorbinske kiseline dobijenih u eksperimentu sa PVA kao stabilizatorom.....</i>	96
<i>Tabela 4.5-3 Rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG-a sa različitim sadržajem askorbinske kiseline dobijenih u eksperimentu sa PVP-om kao stabilizatorom</i>	99
<i>Tabela 4.6-1 Masa mlečne kiseline izračunata na osnovu apsorpcije na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije od 220nm sa spektara snimanih u 55-tom danu degradacije i kalibracione krive za mlečnu kiselinu.....</i>	108
<i>Tabela 4.9-1 Masa mlečne kiseline izračunata na osnovu apsorpcije na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije od 220nm sa spektara snimanih u 63-ćem danu degradacije i kalibracione krive za mlečnu kiselinu.....</i>	132
<i>Tabela 5.1-1 Rezultati stereološke analize pre i nakon dva dana degradacije u fiziološkom rastvoru za slučaj DLPLG, DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%, DLPLG/askorbinska kiselina 70/30%, DLPLG/askorbinska kiselina 50/50%. U tabeli su prikazane srednje vrednosti stereoloških parametara.</i>	144



*"Nikad ne idi utabanom stazom jer
vodi tamo gde su drugi već bili"*

(Alexander Graham Bell)

APSTRAKT

Askorbinska kiselina (vitamin C) je izuzetno važan i organizmu neophodan vitamin. Ima ulogu reduktanta slobodnih radikala čime smanjuje oštećenja nastala oksidativnim stresom koji je uzrok ili pratilac mnogih bolesti. U organizmu se ne skladišti i vrlo brzo se iz njega izlučuje. Problem se sastoji u tome da se askorbinska kiselina lako dekonponuje u biološki neaktivna jedinjenja čime je upotreba askorbinske kiseline na polju medicine, farmakologije, kozmetologije veoma limitirana. Kopolimer poli(DL-laktid-ko-glikolid) (DLPLG¹) se, pored ostalog, koristi za izradu sistema za kontrolisanu dostavu najrazličitijih klasa medikamenata. Pod medikamentima se podrazumevaju lekovi i druga terapijska sredstva. Polimerne čestice DLPLG-a dozvoljavaju inkapsulaciju medikamenata unutar polimerne matrice a za njihovo kontrolisano i ravnomerno otpuštanje unutar organizma osnovni je zahtev idealna sferičnost čestica kao i uska raspodela njihovih veličina. Inkapsulacijom askorbinske kiseline u polimernu matricu poli(DL-laktid-ko-glikolida) (DLPLG) bilo bi potencijalno moguće prevazići hemijsku nestabilnost vitamina C kao i postići njegovu višu, efikasniju i ravnomerniju raspodelu u organizmu, tokom dužeg perioda vremena.

U ovoj disertaciji je opisano dobijanje poli(DL-laktid-ko-glikolid) nanosfera korišćenjem fizičko-hemijske metode rastvarač/nerastvarač i tehnike centrifugalnog procesiranja. Ispitan je uticaj različitih stabilizatora (polivinil alkohola, polivinil piroolidona) na morfološke karakteristike čestica DLPLG-a sa i bez inkapsulirane askorbinske kiseline. U polimernu matricu DLPLG-a su inkapsulirane različite koncentracije askorbinske kiseline homogenizacijom vodene i organske faze. Nanočestice DLPLG-a sa različitim sadržajem askorbinske kiseline imaju različite morfološke karakteristike, različit stepen uniformnosti, sferičnosti, aglomeracije kao i različite veličine. Izračunat je prinos čestica DLPLG-a sa i bez vitamina kao i efikasnost inkapsulacije vitamina u polimernu matricu DLPLG-a. Proces degradacije čestica DLPLG-a bez i sa askorbinskom kiselinom kao i otpuštanje askorbinske kiseline iz polimerne matrice DLPLG-a tokom degradacije je ispitivano u in vitro uslovima u različitim degradacionim medijumima (fiziološkom rastvoru i fosfatnom pufer rastvoru uz prisustvo azida).

¹ U literaturi se za poli(DL-laktid-ko-glikolid) često koristi i skraćenica PLGA

Karakterizacija uzoraka je radjena metodama infracrvene spektroskopije (IR), ultravioletne spektrofotometrije (UV-VIS), diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC), skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) a radjena je i detaljna stereološka analiza.

ABSTRACT

Ascorbic acid (vitamin C) is essential for preserving optimal health and it is used by the body for many purposes. Ascorbic acid acts as a reductant for many free radicals, thereby minimising the damage caused by oxidative stress which is a root cause of, or at least associated with, many diseases. Ascorbic acid is water soluble vitamin, which cannot be synthesised and stored in the body. The problem is that ascorbic acid easily decomposes into biologically inactive compounds making its use very limited in the field of pharmaceuticals, dermatologicals and cosmetics. Copolymer poly(DL-lactide-co-glycolide) (DLPLG) is among other things used for the controlled delivery of the various classes of medicaments. Under medicaments we assume drugs and other therapeutically applications. DLPLG polymer particles allow the encapsulation of the medicament within the polymer matrix, where the principle requirement for the controlled and balanced release of the medicament in the body is its ideal spherical shape and narrow particle size distribution. By encapsulating the ascorbic acid into the polymeric matrix it is assumed that its chemical instability can be overcome as well as higher, more efficient and equally distributed concentration throughout extended period of time can be achieved.

This dissertation is describing the process of obtaining poly(DL-lactide-co-glycolide) (DLPLG) nanospheres using physico-chemical method with solvent/non-solvent systems where obtained solutions have been centrifuged. The influence of the different stabilizers (polyvinyl alcohol (PVA), polyvinyl pyrrolidone (PVP)) on the morphological characteristics of DLPLG particles with and without ascorbic acid has been examined. The encapsulation of the ascorbic acid in the polymer matrix is performed by homogenization of water and organic phases. Nanoparticles of the copolymer DLPLG with the different content of the ascorbic acid have different morphological characteristics, i.e. variable degree of uniformity, agglomeration, sizes and spherical shaping. The particle yield of DLPLG with and without ascorbic acid has been calculated as well as the loading efficiency of the ascorbic acid into the polymer matrix DLPLG. The degradation of the nanospheres of DLPLG, DLPLG/ascorbic acid nanoparticles and release rate of the ascorbic acid were studied for eight weeks in different degradation medium (physiological solution (0.9% sodium chloride in water) and phosphate buffered saline).

The samples have been characterized by Infrared Spectroscopy (IR), Ultraviolet Spectroscopy (UV), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Scanning Electron Microscopy (SEM) and Stereological analysis.

1 Teorijski deo

1.1 Nanotehnologija i nanomedicina

Nanotehnologija je široka interdisciplinarna oblast istraživanja koja se eksplozivno razvija poslednjih godina [1]. Proizvodnja nanomaterijala kao što su klasteri, nanočestice, nanožice, nanotube, tanki filmovi, itd. je ključna komponenta uspešnog razvoja nanotehnologije zahvaljujući njihovim neobičnim i izvanrednim fizičkim i hemijskim osobinama koje su rezultat efekta nano veličine [2-4]. Nanotehnologija, pored ostalog, ima veliki značaj i potencijal na polju biomaterijala, biomedicinskih istraživanja, kliničke primene jer nanoobjekti su generalno sličnih dimenzija kao i biološki entiteti, npr. ćelija, organela, DNK, itd. [5-8]. Prednosti posebnih osobina nanostrukture povećavaju efikasnost i preciznost medicinske dijagnostike, opservacije i terapije na nivou pojedinačnih molekula ili molekulskih struktura [8]. Metode konvencionalne medicine pokušavaju da "loše" ćelije uklone sečenjem (hirurgija), da ih "sprže" (radioterapija) ili ih "otruju" pre nego "dobre" ćelije (hemoterapija). Nanomedicina pokušava da ili otkloni određene ćelije ili ih reparira ćeliju po ćeliju [10]. Pojedinačan ćelijski tretman može biti npr. baziran na molekularnoj biosenzorskoj informaciji na osnovu koje se kontroliše isporuka odgovarajuće količine leka u određenu ćeliju.



Slika 1.1-1 Nanorobot [11]

Na početku 21. veka, pola veka nakon otkrića strukture dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) (Francis Crick i James Watson, Nobelova nagrada iz medicine 1962. godine), svet nauke je suočen sa značajnim napretkom u brojnim disciplinama naročito na polju molekularne biologije i manipulisanju molekulima nukleinskih kiselina, hemije, fizičke hemije, fizike, itd.. Brojne tehnike molekularne biologije su uspešno primenjene u biologiji, biotehnologiji, medicinskoj nauci, dijagnostici, forenzičkim disciplinama i brojnim drugim. Uvođenje metodologije lančane reakcije polimeraze (polymerase chain reaction, PCR) je rezultiralo u unapređenju starih i dizajniranju novih laboratorijskih sredstava i aparature za PCR amplifikaciju i analizu amplificiranih DNK-a fragmenata [12]. Paralelno sa ovim napretkom, priroda DNK-a molekula, njihova građa i struktura je značajno zainteresovala brojne istraživače. Osim toga, postoji veliki broj istraživanja u kojima se podražava građa i funkcija živih sistema, kao i razvoj i konstrukcija artificijelnih nanosredstava, kao što su biomolekularni senzori, zatim primena u genskoj terapiji, tkivni i

ćelijski inženjering, uključujući i budući razvoj nanorobota (slika 1.1-1) [11]. Biomedicinske i biotehnoške primene nanočestica su predmet posebnog interesovanja u istraživačkim i razvojnim projektima sa potencijalnom primenom, koja uključuje korišćenje nanočestica kao nosača za medikamente ili DNK-a, zatim kao komponenti u medicinskim dijagnostičkim setovima, kao biosenzora i membrana za biološke separacije, itd..

Veoma važna oblast ovog naučnog polja je i razvoj sredstava za kontrolisanu dostavu medikamenata u živim sistemima. Nanočestice se razvijaju kao značajna strategija za unošenje i prenos lekova, terapijskih sredstava, rekombinantnih proteina, vakcina i u poslednje vreme nukleotida. Nanočestice i drugi koloidni sistemi za unošenje i prenos lekova značajno modifikuju kinetiku, raspodelu u organizmu, kao i eliminaciju lekova, pri čemu se značajno ističe i smanjena pojava neželjenih efekata, zahvaljujući kontrolisanom oslobađanju aktivne supstance [13]. Stoga nanočestice u sektoru farmaceutske biotehnologije unapređuju terapijski indeks i omogućuju rešenja za probleme unošenja i prenosa nove klase biotehnoških lekova, uključujući rekombinantne proteine i oligonukleotide.

Osnovni cilj razvoja i dizajniranja sistema za kontrolisanu dostavu terapijskih sredstava je ciljana terapija i dostavljanje lekova do specifičnih obolelih tkiva i organa na mestu gde je farmakološko dejstvo željeno, čime se druga tkiva štede, odnosno ne oštećuju primenjenom terapijom [14]. Koncept "magičnog metka" koji je postulirao Ehrlich (Paul Ehrlich, Nobelova nagrada iz medicine 1908. god. [15]) početkom 20. veka, sada je zamenjen konceptom "čarobnog štapića", u vidu sistema za ciljanu terapiju [16]. Ovaj koncept je zasnovan na specifičnim ciljnim ligandima koji su vodiči za nosače lekova do molekularnih meta, bilo da su to molekuli na površini ćelija ili na jedarnoj membrani. Nanosistemi, uključujući i sisteme za prenos lekova (< 1000 nm), kao što su micele, lipozomi, dendrimeri, polimerne micele, nanokristali i polimerne nanočestice, predstavljaju prve i najznačajnije predstavnike ovog polja nauke koje se stalno razvija (tabela 1.1.1). Ciljana primena lekova na specifičnim lokacijama u organizmu i održavanje farmakološki relevantnih doza tokom celokupnog perioda u kojem je neophodno dejstvo leka su glavni ciljevi koje nanosistemi omogućuju [17, 18]. Određeni izazovi za dalji razvoj i unapređivanje nanosistema za unošenje i prenos lekova nalaze se u savladavanju bioloških barijera. Trendovi koji ukazuju da se ove prepreke mogu donekle savladati jesu direktna

primena korišćenjem katetera ili korišćenjem spoljašnjih vodiča (magnetna polja ili ultrazvuk), kao i ispitivanje i korišćenje pristupačnih meta na endotelu krvnih sudova.

Tabela 1.1-1 Primeri nanoproizvoda i polje njihove, najčešće, primene [4]

tip proizvoda	broj	primena	%
nanočestice	160	medicina i farmacija	30
nanotube	55	hemikalije i materijali	29
nanoporozni materijali	22	informatika i telekomunikacije	21
fulereni	21	energetika	10
kvantne tačke	19	automobilska industrija	5
nanostrukturalni materijali	16	svemirski programi i aerodinamika	2
nanovlakna	9	tekstilna industrija	2
nanokapsule	8	poljoprivreda	1
nanožice	6	-	>1
dendrimeri	5	medicina i farmacija	>1
ukupno	321		

1.1.1 Micele u nanomedicini

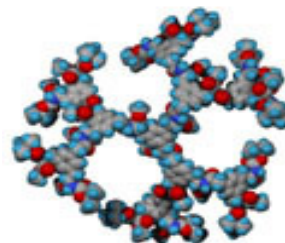
Micele su agregati molekula u vodi, sa nepolarnim delovima u unutrašnjosti i polarnim na površini koja je izložena vodi. Površinski aktivne supstance formiraju micele na kritičnoj micelarnoj koncentraciji (KMK). Kritična micelarna koncentracija je koncentracija na kojoj dolazi do nagle promene fizičkih osobina micelarnih sistema. Lipozomi su micelarni sistem od posebnog interesa u medicini, farmakologiji i koriste se za kontrolisanu dostavu medikamenata, itd.

1.1.2 Lipozomi u nanomedicini

Lipozomi su zatvoreni mehuri koji se formiraju hidratacijom suvih fosfolipida iznad njihove tranzicione temperature [6]. U zavisnosti od naelektrisanja lipozomi se dele na nenaelektrisane (lecitin-holesterol), negativno naelektrisane (lecitin-holesterol-fosfatidinska kiselina-dicetil fosfat) i pozitivno naelektrisane (lecitin-holesterol-stearilamin) [19-22]. Klasifikuju se u nekoliko grupa na osnovu veličine i broja dvoslojeva. Multilaminarni mehur se sastoji od nekoliko lipidnih dvoslojeva koji su međusobno razdvojeni vodom. Veličina lipozoma se kreće od nekoliko stotina do nekoliko hiljada nanometara. Mala veličina čestice znači veliku relativnu površinu. Ovo može stvoriti probleme aglomeracije primarnih nanočestica u biološkoj sredini, što onda utiče na efektivnu veličinu nanočestica i njihovu kinetiku uklanjanja iz organizma. Na primer poznato je da dendrimeri i kvantne tačke aglomerišu u biološkoj sredini a drugi primer je interakcija između nanosistema na bazi lipida i lipoproteina, što može indukovati drastičnu promenu veličine čestice [6]. Molekuli medikamenta se zarobe ili u vodi ili se interkaliraju u lipidni dvosloj lipozoma, zavisno od osobina medikamenta koji se prenosi unutar organizma. Primena lipozoma je limitirana usled problema kao što su mala efikasnost inkapsulacije, rapidan gubitak u vodi-rastvornih medikamentata u prisustvu krvnih komponenata kao i niska stabilnost prilikom skladištenja [7]. Polimerne nanočestice imaju niz prednosti u odnosu na lipozome i tu svakako spadaju povećanje stabilnosti inkorporiranog leka/proteina mogućnost lakšeg modelovanja površine polimerne čestice, veličine čestice, lakše skladištenje, itd.

1.1.3 Dendrimeri u nanomedicini

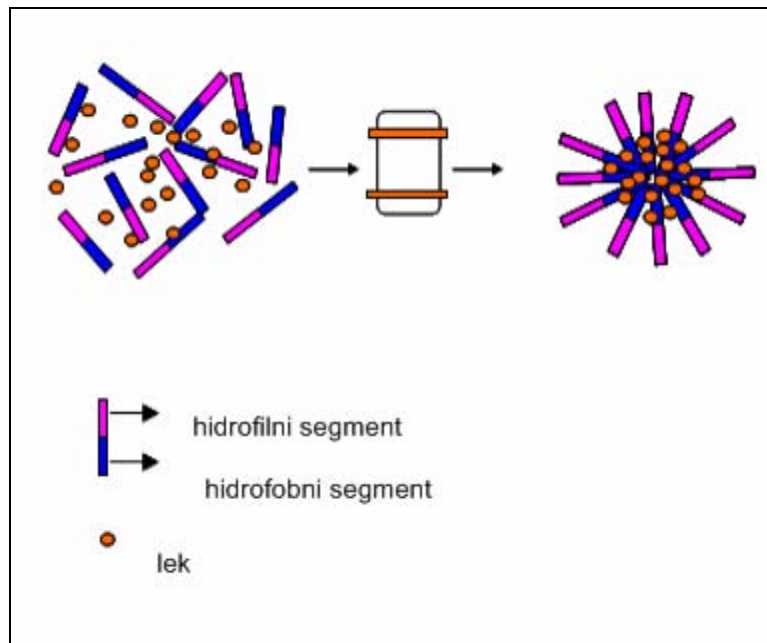
Dendrimeri predstavljaju vrlo razgranate molekule pri čemu grananje počinje od centra ka spoljašnosti [23-26]. Dendrimer je sfernog oblika i strukture koja podseća na krošnju drveta, sa mnoštvom krajnjih grupa [27]. Rast polimera počinje od centralnog molekula i odvija se radijalno nizom reakcija polimerizacije [28, 29]. Kontrola veličine se može postići u zavisnosti od nivoa polimerizacije. Krajevi dendrimera se mogu kovalentno povezati sa terapeutskim ili dijagnostičkim agensima.



Slika 1.1-2 Prikaz dendrimera [29]

1.1.4 Polimerne micelle

Kopolimeri sa amfiličnim karakterom, koji imaju veliku razliku u rastvorljivosti hidrofilnih i hidrofobnih segmenata formiraju u vodenoj sredini polimerne micelle sa veličinama koje mogu biti i nekoliko nanometara [30-32]. Ovakve micelle imaju prilično usku raspodelu veličina a karakteriše ih i jedinstven omotač ("core-shell" pa se iz tog razloga vrlo često u literaturi pominju kao "core-shell" nanočestice) kod koga su hidrofobni segmenti odvojeni od rastvora i formiraju jedan unutrašnji omotač. U poređenju sa drugim micelama, polimerne micelle su daleko stabilnije, karakteriše ih značajno niža kritična micelarna koncentracija (KMK), sporije se razlažu čime prolongiraju oslobađanje medikamenta i njegovu eventualno veću koncentraciju na mestu gde je njegovo dejstvo željeno [33, 34].

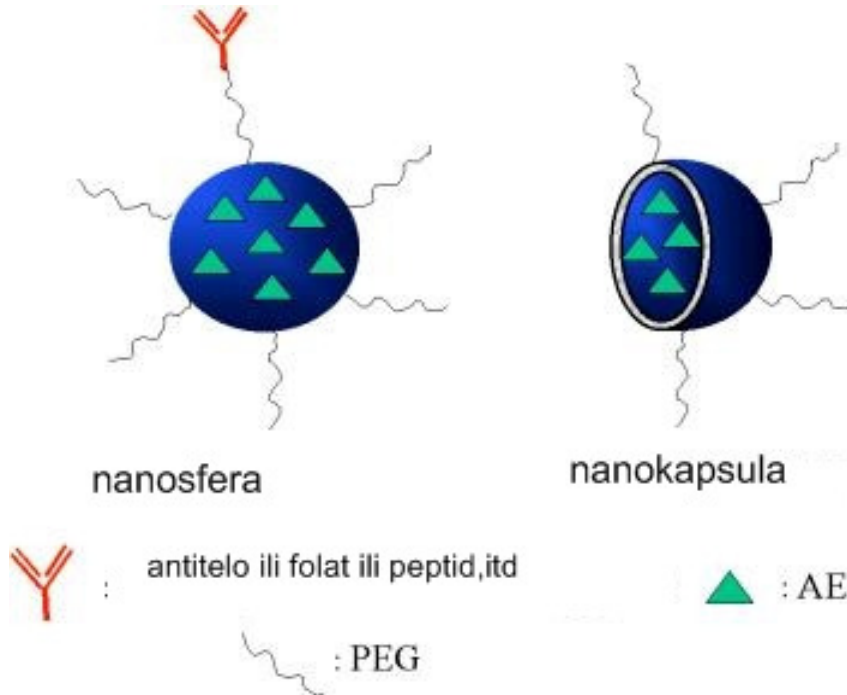


Slika 1.1-3 Polimerna micela

1.1.5 Polimerne nanočestice

Kao što im i samo ime kaže polimerne nanočestice su nanočestice sintetizovane od polimera. Medikament može biti inkapsuliran, imobilisan ili "zakačen" za nanočesticu i u zavisnosti od načina sinteze mogu se dobiti nanokapsule, nanosfere ili nanočestice [35-38]. Nanokapsule su šuplji sistemi u kojima je medikament okružen polimernom membranom,

dok je u slučaju nanosfere medikament fizički i uniformno dispergovan u polimernoj matrici (slika 1.1-4).



Slika 1.1-4 Polimerne nanočestice

Poslednjih godina, polimerne nanočestice su privukle veliku pažnju istraživača kao materijali za dobijanje sistema za kontrolisanu dostavu medikamenata [39,40]. Uprkos razvoju mnogih sintetičkih i polusintetičkih polimera i dalje se za kontrolisanu dostavu lekova koriste i prirodni polimeri kao što su hitozan (chitosan), razne smole, želatin, albumin, itd. Polimeri korišćeni u kontrolisanoj dostavi medikamenata moraju biti hemijski inertni, netoksični, biokompatibilni, laki za sterilizaciju, bez neželjenih produkata degradacije, itd [41]. Polimeri koji su se ranijih godina koristili u najrazličitije ne-biološke svrhe su se pokazali i kao materijali koji se mogu koristiti i za prenos bioaktivnih agenasa i za druge farmaceutske, medicinske i biološke potrebe a u njih spadaju celuloza, poli(2-hidroksi etil metakrilat), poli(N-vinil-pirolidon), poli(metil-metakrilat), poli(vinil alkohol), poli(akrilna kiselina), poliakrilamid, poli(etilen-ko-vinil acetat), poli(etilen glikol), poli(metakrilna kiselina). Poslednjih godina polimerni materijali se dizajniraju specijalno za medicinske i farmakološke potrebe i u njih spadaju poli(laktid), poli(glikolid), poli(laktid-ko-glikolid), poli(DL-laktid-ko-glikolid), polianhidridi, poliortoestri, policianoakrilati, poli(kaprolakton) [42, 43].

1.2 Polimerni biomaterijali

Biomaterijali su materijali koji se koriste za zamenu i reparaciju živog tkiva i organa kako iz zdravstvenih tako i iz estetskih razloga. Na godišnjem nivou se u svetu izdvoje ogromne sume novca za proizvodnju biomaterijala kao što su veštački kuk ili koleno, intraokularna sočiva, kontaktna sočiva, implantati, itd. Svi biomaterijali, bez obzira na vrstu, moraju zadovoljiti uslove biokompatibilnosti, netoksičnosti i ne izazivanja bilo koje vrste negativnog imunološkog odgovora organizma [44]. Podela biomaterijala su brojne i raznovrsne po različitim kriterijumima. Prema mestu krajnje upotrebe biomaterijali mogu biti: ortopedski, dentalni, oftalmološki, kardiovaskularni, dermatološki, pomoćni itd. Na osnovu načina aplikacije biomaterijali se mogu koristiti kao prah, blok, cement, funkcionalno – gradijentni, tanak sloj ili prevlaka, itd.. Prema tipu odgovora implant – tkivo, biomaterijali mogu biti bioinertni, bioaktivni i biresorbilni [44,45]. Najčešća podela biomaterijala je, ipak, po hemijskom sastavu i to na metalne, polimerne, keramičke, prirodne i kompozitne [46].

Hiljadama godina ljudi su koristili ili pokušavali da koriste jedinjenja prisutna u prirodi, praveći od najrazličitijih supstanci materijale za dobijanje alata i raznih sredstava od praktičnog interesa. Kao rezultat toga jedinjenja biljnog, životinjskog i neorganskog porekla su eksploatisana u svojstvu materijala. U sledećen stupnju ljudi su otkrili kako da kreiraju jedinjenja kako bi dobili nove materijale [47]. Sa vremenom, legure, keramike i hemijski modifikovani biopolimeri su se pojavili u svojstvu materijala zahvaljujući hemiji, fizici, fizičkoj hemiji i nauci o materijalima. Sintetički polimeri su poznati kao takvi već duži niz godina. Danas, sve oblasti ljudske aktivnosti iskorišćavaju prednosti jedinjenja i sistema baziranih na sintetičkim polimerima, često kao zamenu za biopolimerne materijale (drvo, krzno, celulozu, itd). Organska hemija je izvor velikog broja monomera "blokova za građenje" polimera, omogućavajući tako stvaranje mnoštva materijala sa odgovarajućim osobinama. U ovoj oblasti saznanja se stiču, sa jedne strane, izučavanjem biopolimera i njihovih kompleksnih struktura i aktivnosti. Ovakav prilaz je težak iz razloga različitosti ponavljajućih jedinica (monomera) kao i kompleksnosti struktura koje režiira sama priroda. Sa druge strane, saznanja se stiču istraživanjem mnogo jednostavnijih sintetičkih polimera pošto su i najkompleksniji sintetički polimeri obično bazirani na dve ili tri konstitutivne ponavljajuće jedinice. Trenutno, polimerni hemičari su još uvek jako daleko od posedovanja savršene kontrole nad veličinom i organizacijom makromolekula koji čine

sintetičke polimerne sisteme i materijale. Biomedicinski sektor je od posebnog značaja za istraživače jer zahteva materijale izuzetno kompleksnih struktura u cilju zadovoljenja mnogobrojnih zahteva najrazličitijih aplikacija. U svakom slučaju, u ovoj oblasti istraživanja su u pravcu dobijanja, eksploatacije materijala sa osobinama koje se mogu modifikovati, tj. modelovati i kontrolisati u skladu sa potrebama. Prilazi istraživanja moraju uzeti u obzir i kompleksnost bioloških sistema i procesa koji su još uvek nedovoljno razjašnjeni. Danas primena polimera je esencijalna u hirurgiji (konci za ušivanje organa i rana, najrazličitiji implantati) u farmakologiji (kontrolisana dostava lekova), itd. [48]. U sintetičke polimere koji su dosta korišćeni u medicini spadaju: poli(metil metakrilat) (za izradu tvrdih kontaktnih sočiva, intra-okularna sočiva), polimerna jedinjenja bazirana na metil metakrilatu (akrilni cementi u ortopediji, facijalne proteze, veštački zglobovi,...), poli(2-hidroksietil metakrilat) (meka kontaktna sočiva, u plastičnoj hirurgiji...), poliamidi (konci za ušivanje rana), poli(vinil hlorid) (kateteri), poli(etilen terftalat) (vaskularne proteze, srčani zalisci,...), poli(tetrafluoroetilen) (ortopedija), poliuretani (katetera, srčanih pumpi,...), silikoni (plastična hirurgija, tube, ...), itd. [49-53]. Upotreba sintetičkih polimera u biomedicinske svrhe neretko je samo prilagođavanje već postojećih i već korišćenih, u neke druge svrhe, polimera. Na primer, ne postoji neka fundamentalna razlika između polimernog tekstilnog vlakna i biomedicinskog vlakna u vaskularnoj hirurgiji, bar ne sa stanovišta nauke o polimerima. Oba tipa su napravljena od poli(etilen terftalata). Sa hemijskog stanovišta, razlika između akrilnog cementa korišćenog u ortopediji i stomatologiji i poli(metil metakrilata) u industriji stakala, zaptivnih smola i lepaka, je relativno mala. Inicijalni monomeri i odgovarajuća hemija su veoma bliski, ali je glavna razlika u sintezi, obradi i uslovima tokom sinteze. Danas, inovacije na polju polimera korišćenih u terapijske svrhe se baziraju na mnogo specifičnijim strategijama, mada je unapređivanje klasičnih polimera korišćenih u medicinske svrhe još uvek neophodno. Ova oblast zahteva nova jedinjenja prilagođena veoma specifičnim i/ili vremenski-ograničenim aplikacijama, "vođena" regeneracija tkiva, inženjerstvo tkiva, sistemi za kontrolisanu dostavu medikamenata, genska terapija,... Hemija polimera ima ključnu ulogu i zahteva sve funkcionalizovane monomere koji se mogu kombinovati kopolimerizacijom u cilju generisanja makromolekulskih sistema koji služe kao izvor rastvornih, disperzibilnih ili čvrstih jedinjenja. Na svojstva polimera utiče niz faktora kao što su sastav osnovnih i bočnih grupa, struktura lanca (na koju utiče izbor rastvarača koji se koriste u sintezi polimera, dinamika sušenja itd), i molska masa (na koju utiče rekristalizacija monomera, koncentracija inicijatora, nivo vakuma u procesu sušenja polimera itd). U poslednje vreme,

upotreba tzv. biodegradabilnih terapijskih sredstava sve više zamenjuje upotrebu bionedegradabilnih (dugotrajnih) materijala. U toku istraživanja važno je voditi računa o fiziološkim uslovima koji utiču na fizičke, hemijske i biološke osobine polimernih materijala unetih u organizam [54]. U ove uslove spadaju npr. pH (u organizmu je uglavnom $\text{pH} \approx 7.4$), osmolaritet (0.9% NaCl), temperatura ($\approx 37^\circ\text{C}$), prisustvo mnogih anjona i katjona, više ili manje naelektrisanih makrokolekulskih sistema kao što su polisaharidi, proteini, ćelijske membrane, itd [55]. Polimerni biomaterijali moraju zadovoljiti uslove biokompatibilnosti (da su netoksični, da ne izazivaju imuni odgovor organizma, da ne dovode do mutacija, itd.) i biofunktionalnosti (da poseduju odgovarajuće hemijske, fizičke, fizičko-hemijske, termalne i biološke osobine, da su laki za upotrebu, da su laki za sterilizaciju, stabilni prilikom skladištenja, itd.).

1.2.1 Primena polimernih biomaterijala u medicini

Polimerni biomaterijali se dosta koriste u najrazličitije medicinske svrhe.



Slika 1.2-1 Polimeri u medicini [56]

Polimeri mogu pokazivati viskoelastične osobine slične onima kod prirodne kosti i iz tog ali i mnogih drugih razloga se polimerni biomaterijali često koriste u ortopedске svrhe, za zamenu koštanog tkiva, podsticanje koštanog rasta, izradu proteza, itd. [57,58]. Veliki naponi se ulažu u istraživanjima kako bi se prevazišao ili bar donekle ublažio hemijski, fizički, biohemijski uticaj na implant od polimernog materijala u organizmu. Dok funkcionalne osobine polimernog dela proteze zavise od makrokolekulskih karakteristika, biokompatibilnost zavisi primarno od površinskih osobina polimernog biomaterijala

(implanta, čestice u kontrolisanoj dostavi medikamenata) ukoliko nisu prisutni toksični delovi unutar polimerne mase. Postoji mnogo načina modifikacije površine polimernog biomaterijala npr. korišćenjem protein-odbijajućeg ("protein repulsive") površinskog modifikatora kao što je poli(etilen glikol) (PEG) u cilju izbegavanja komplementne aktivacije, adhezije krvnih pločica i tromboze [59,60]. Posebna pažnja se posvećuje i kompozitnim sistemima npr. kompozitima polimera sa trikalcijum fosfatom ili hidroksiapatitom u cilju imitiranja prirodne kosti (HAp/PLGA, BCP/PLGA) [61-65]. Poli (α -hidroksilne kiseline) dobijene od enantiomera glikolne i mlečne kiseline se koriste u hirurgiji kao konci za ušivanje organa i rana, izradu membrana, filmova, fiksaciju koštanih fraktura, itd.

1.2.2 Primena polimernih biomaterijala u farmakologiji

Najpre su u farmakologiji korišćeni bioneresorbilni polimerni materijali u cilju produženja vremena dostave lekova u organizmu ali su ih vrlo brzo u tome zamenili degradabilni polimeri. Degradabilni polimerni materijali za kontrolisanu dostavu medikamenata mogu biti mikročestice, nanočestice, micle, višemolekulski agregati, amfilični polimerni sistemi, itd.. Posebna pažnja se posvećuje i polielektrolitskim sistemima koji uključuju gene za ćelijsku transfekciju i upotrebi polimernih nosača kako bi se prevazišlo odbacivanje čestica od strane imunog sistema organizma [66]. Među najsofisticiranijim sistemima za prenos medikamenta u organizmu su polimerne čestice u kojima je medikament hemijski vezan ili fizički prisutan [67]. Hemijski ili fizički umreženi hidrogelovi se koriste za prenos proteina i hormona. Mnogi polikatjoni su testirani za prenos polinukleotida (osetljivih oligonukleotida, gena, segmenata DNK-a). U farmakologiji polimerne čestice se koriste radi postizanja odgovarajuće bioaktivnosti, distribucije, farmakokinetike i odgovarajućih terepautskih efekata određenog terapijskog sredstva [68-69]. U istraživanjima se koriste najrazličitiji polimeri (polianhidridi, poli (propilen-ko-fumarat) (PPF), poli (α -hidroksi estri) kao što je poli (laktid) (PLA), poli (glikolid) (PGA), poli (laktid-ko-glikolid) (PLGA), poli(DL-laktid-ko-glikolid) (DLPLG)...) u cilju dobijanja odgovarajućeg sistema za kontrolisanu dostavu medikamenata [70].

1.2.3 Primena polimernih biomaterijala u inženjerstvu tkiva

Polimerni biomaterijali se koriste i u inženjerstvu tkiva, grani biomedicine koja između ostalog, izučava i rast ćelija na resorbujućoj podlozi izvan tela [72]. Takva podloga sa tkivom se ugrađuje u organizam na obolelo mesto, vremenom se resorbuje i omogućava novonastalom živom tkivu da je zameni. Ovakvim pristupom bi se potencijalno prevazišli problemi nedostatka donora tkiva, problemi vezani za donor-primalac kompatibilnost, itd.. Polimerne podloge u inženjerstvu tkiva, tzv. polimerni skafoldi (eng scaffold-mreža, skela) mogu biti različite poroznosti, veličina i oblika, različitih površinskih osobina, omogućavajući time različitu proliferaciju i diferencijaciju ćelija [73-88]. U inženjerstvu tkiva jedan od važnih uslova je bioresorbilnost polimera. Aplikacija na polju inženjerstva tkiva je limitirana nedostatkom odgovarajuće vaskularizacije u fazi konstruisanja implanata kao u fazi njihove integracije u organizam [89]. Podloge u inženjerstvu tkiva od bioaktivnih polimernih materijala otpuštaju kontrolisanom brzinom produkte disocijacije ili faktore rasta kao što su morfogenski proteini kosti i na taj način aktiviraju ćelije i promovišu obnovu tkiva. U polimere koji se ispituju i koriste kao nosači u inženjerstvu tkiva spadaju i poli (α -hidroksi estri) kao što je poli (laktid) (PLA), poli (glikolid) (PGA) kao i kopolimer poli (laktid-ko-glikolid) (PLGA) [89].

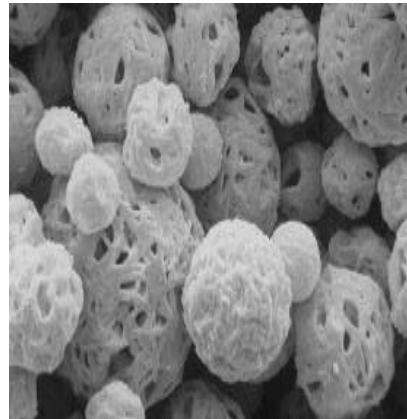
1.3 Degradabilni polimeri

Degradabilni polimeri mogu biti prirodni, modifikovani prirodni i sintetički polimeri. Prirodni polimeri su uvek biodegradabilni. Celuloza, kolagen, fibrin (slika 1.3-2), albumin i polisaharidi su primeri prirodnih polimera [91, 92]. Kolagen se npr. koristi za kontrolisanu dostavu medikamenata na bazi proteina. Modifikovani prirodni polimeri su izmenjeni prirodni polimeri u cilju zadovoljenja određenih potreba. Modifikacije se, najčešće, rade u cilju smanjenja perioda degradacije, koje je često veoma dugo u slučaju prirodnih polimera, i ovaj problem se najčešće rešava dodavanjem polarnih grupa [93]. Polarne grupe su nestabilnije i pospešuju degradaciju polimera.



Slika 1.3-1 Fibrin i crvena krvna zrnca [92]

Sintetički polimeri su naročito atraktivni za primenu u svojstvu biomaterijala i njihova prednost u odnosu na prirodne je što su pogodniji za obradu, modelovanje i dobijanje materijala različitih oblika, veličina, poroznosti (slika 1.3-1), određenih morfoloških i drugih odgovarajućih osobina [94, 95]. Mnogi autori naglašavaju razliku između degradacije (proces kod koga dolazi do kidanja veza usled hidrolize ili oksidacije) i biodegradacije (kidanje veza je uz posredovanje ćelija ("cell-mediated"), enzima, itd.).



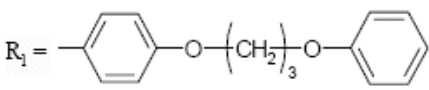
Slika 1.3-2 Porozne polimerne čestice [95]

Degradabilni sintetički polimeri kao što su poli(glikolid), poli(laktid) i njihovi kopolimeri, poli(p-dioxanon), i kopolimer trimetilen karbonata i glikolida imaju široku primenu u medicini, farmaciji, kozmetologiji, kao polimeri za dobijanje konaca za ušivanje rana, izradu sistema za kontrolisano otpuštanje medikamenata, nosača u inženjerstvu tkiva, fiksaciju koštanih fraktura, itd. Najatraktivniji i najčešće korišćeni biodegradabilni polimeri su poliestri kao što su poli(laktid), poli(laktid-ko-glikolid), poli(ϵ -kaprolakton) (tabela

1.3.1) [96]. Ovi materijali su komercijalno dostupni različitih sastava i molekulskih masa što omogućava njihovo ispitivanje i kontrolisanje degradacije [97]. Degradacija je postignuta sintezom polimera koji u osnovi imaju hidrolitički nestabilne veze [98]. Hemijska jedinjenja sa ovakvim karakteristikama su estri, anhidridi, ortoestri i amidi [99-103]. Poliestri mogu biti na primer homopolimeri sastavljeni od jedne vrste monomera ili kopolimeri sastavljeni od raznovrsnih monomera npr. od laktida i glikolida. Krajnji produkti razgradnje PLA-a, PLG-a, PLGA-a se nesmetano uključuju u metabolizam dajući pri tome netoksične produkte. Dosta su prisutni i kopolimeri trimetil karbonata i ϵ -kapolaktona, kao i poli(dioxana) [104].

Termin degradacija opisuje proces kidanja polimernih lanaca što dovodi do smanjenja molekulske mase polimera. Degradacija indukuje eroziju materijala koja je, takođe, definisana gubitkom mase materijala usled kidanja polimernih lanaca [98]. Smatra se da prvo dolazi do razgradnje u amorfnim područjima polimera, odnosno da amorfna područja polimera predstavljaju centre u kojima započinje biodegradacija i hidroliza. Tokom procesa biodegradacije dolazi do smanjenja pH okoline, molekulske mase, modula i jačine na kidanje, povećanja kristaliničnosti, itd. U *in vivo* uslovima polimer bi trebalo da brže degradira jer dolazi u dodir sa različitim enzimima, odnosno, dolazi do enzimski katalizovane degradacije [105-106]. Na degradaciju utiču hemijska struktura polimera, hemijski sastav, raspodela i ponovljivost jedinica u polimeru, prisustvo jonskih grupa, prisustvo defakata u lancu, konfiguracija, molekulska masa, raspodela molekulskih masa, morfologija, odnos amornosti i kristaliničnosti, mikrostruktura, uslovi procesiranja, sterilizacija, skladištenje, oblik, fizičko-hemijski faktori (jonska izmena, pH, difuzioni koeficijent...), mehanizam hidrolize [107-110].

Tabela 1.3-1 Hemijska struktura bidegradabilnih polimera [96]

Tip	Struktura	primer
Poliestri	$\text{H} \left[\text{O} - \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{C}(=\text{O}) - \text{O} - \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{C}(=\text{O}) \right]_m \text{OH}$	poli(laktid)
	$\text{H} \left[\text{O} - \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{C}(=\text{O}) \right]_m \left[\text{O} - \text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) \right]_n \text{OH}$	poli(laktid-ko-glikolid)
	$\text{R} \left[\text{C}(=\text{O}) - (\text{CH}_2)_5 - \text{O} \right]_m \text{H}$	poli(ϵ -kaprolakton)
	$\text{OH} \left[\text{C}(=\text{O}) - \underset{\text{H}}{\text{C}} - \underset{\text{H}}{\text{C}} - \text{C}(=\text{O}) \right]_m \left[\text{O} - \underset{\text{H}}{\text{C}}(\text{COOC}_2\text{H}_5) - \underset{\text{H}}{\text{C}}(\text{COOC}_2\text{H}_5) - \text{O} \right]_n \text{H}$	politartarat
Polianhidridi	$\text{H} - \text{O} \left[\text{C}(=\text{O}) - \text{R}_1 - \text{C}(=\text{O}) - \text{O} - \text{C}(=\text{O}) - \text{R}_1 - \text{C}(=\text{O}) - \text{O} \right]_m \text{H}$	polisebacinska kis. $\text{R}_1 = -(\text{CH}_2)_8$ polifumarna kis. $\text{R}_1 = -\text{CH}=\text{CH}$
	$\text{H} - \text{O} \left[\text{C}(=\text{O}) - \text{R}_1 - \text{C}(=\text{O}) - \text{O} \right]_m \left[\text{C}(=\text{O}) - \text{R}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{O} \right]_n \text{H}$	$\text{R}_2 = -(\text{CH}_2)_8$ $\text{R}_1 =$ 
	poli[1,3-bis-(p-karboksifenoksi)propan-ko-sebacinska kis.]	

Kod degradabilnih polimera dva tipa erozionog procesa su moguća i to su erozija iz mase polimera ("bulk" erozija) i površinska erozija [98]. Polimeri koji degradiraju "bulk" erozijom degradiraju duž celog poprečnog preseka jer voda penetrira u polimernu masu brže od samog degradiranja polimera.

U slučaju polimera kod kojih je zastupljena površinska degradacija proces degradacije je brži od procesa penetriranja vode u polimernu masu pa kao posledica toga polimerna čestica erodira najpre na površini. Kod većine polimera, ipak, zastupljena su oba mehanizma erodiranja. Erozijski materijal, odnosno polimerne čestice, omogućava otpuštanje medikamenta i može se dešavati kao difuzija, bubrenje ("swelling") i kontrolisana erozija. Polimerni materijali mogu otpustiti medikament pomoću sva tri mehanizma ali će, ipak, najbrži dominirati. U slučaju biodegradabilnih poliestara koji su sastavljeni od monomera povezanih estarskim vezama, degradacija počinje nakon prodiranja vode u polimer a zatim nasumičnim kidanjem hidrolitički nestabilnih veza [111]. Na hidrolizu utiču molekulska masa, odnos homopolimernih komponenata u kopolimeru, polidisperznost, stepen kristaliničnosti, itd. Poli(ϵ -kaprolakton), izrazito hidrofoban i kristaliničan poliester veoma sporo degradira u poređenju sa manje hidrofobnim i amorfnim poli(laktid-ko-glikolidom) [112]. U zavisnosti od različitih faktora vreme degradacije može iznositi od nekoliko nedelja do čak nekoliko godina. Svi poliistri imaju hidrolitički osetljive grupe locirane u polimernom lancu [112].

Nova klasa biodegradabilnih polimera, baziranih na tartarnoj kiselini (tartaric acid), koji sadrže estarske veze u osnovnom lancu i ketalne veze u bočnim lancima, tzv., poli(tartarati) se takođe mogu u određenim slučajevima koristiti za izradu sistema za kontrolisanu dostavu medikamenata ali još uvek nisu u komercijalnoj upotrebi [113].

U biodegradabilne polimere spadaju i poli(ortoestri) (POE) koji se mogu svrstati u četiri grupe. Polimeri prve i druge grupe, POE I i POE II, su kristalni materijali dok su POE III i POE IV semikristalni. U poli(ortoestre) se mogu inkapsulirati terapeutske agensi i aditivi jednostavnim mešanjem, bez upotrebe rastvarača i povišenih temperatura što je prednost u odnosu na druge biodegradabilne polimere [115,116].

U biodegradabilne polimere spadaju i polianhidridi [117]. Najviše ispitivani su p(CPP-SA) i p(FA-SA). Prvi polimer je kopolimer sebacinske kiseline (sebacic acid, SA) i 1,3-bis(karboksiphenoksi)propana (CPP), a drugi je kopolimer sebacinske i fumarne kiseline (FA). Polianhidridi degradiraju relativno brzo u periodu od nekoliko dana do

nekoliko nedelja i iz toga razloga se mogu koristiti za kratkoročnu dostavu biaktivnih agenasa [117]. Na vreme i brzinu degradacije utiče broj hidrofobnih i hidrofilnih komponenti u kopolimeru .

Tirozin-bazirani polikarbonati su degradabilni polimeri koji se često koriste u ortopediji. Ovi polimeri poseduju tri potencijalno hidrofilne veze i to su amidna, karbonatna i estarska [118]. Studije pokazuju da karbonatna grupa može, potencijalno, brže hidrolizovati nego estarska kao i da amidna veza nije labilna u in vitro uslovima. Pošto hidrolizom karbonatnih grupa nastaju alkoholi i ugljen dioksid to je problem kiselosti rastvora koji se javlja u slučaju poliestara, prevaziđen.

Poliuretani (PU) predstavljaju veliku klasu sintetičkih elastomera koji se koriste za najrazličitije medicinske implante, naročito za dugoročne imlante. Pokazuju dobre mehaničke osobine i dobru biokompatibilnost. Koriste se za izradu pejsmejkeri i vaskularnih kalemova. Poliuretani mogu biti dizajnirani tako da imaju hemijske veze koje su degradabilne u fiziološkom okruženju [119]. Degradabilni poliuretani se u poslednje vreme ispituju kao nosači u inženjerstvu tkiva [119] ali je veliki problem u mogućim toksičnim produktima degradacije, uglavnom onim koji potiču od komponenata disocijacije.

Polifosfazene čini nekoliko stotina različitih polimera koji su uglavnom biostabilni (bionedegradabilni) ali, ipak, inkorporiranjem specifičnih bočnih grupa kao što su amino kiseline, laktati, imidazolne jedinice, polifosfazeni postaju biodegradabilni. Povećanje npr. broja imidazolnih bočnih grupa polifosfazena dovodi do pojačane degradacije polimera [105].

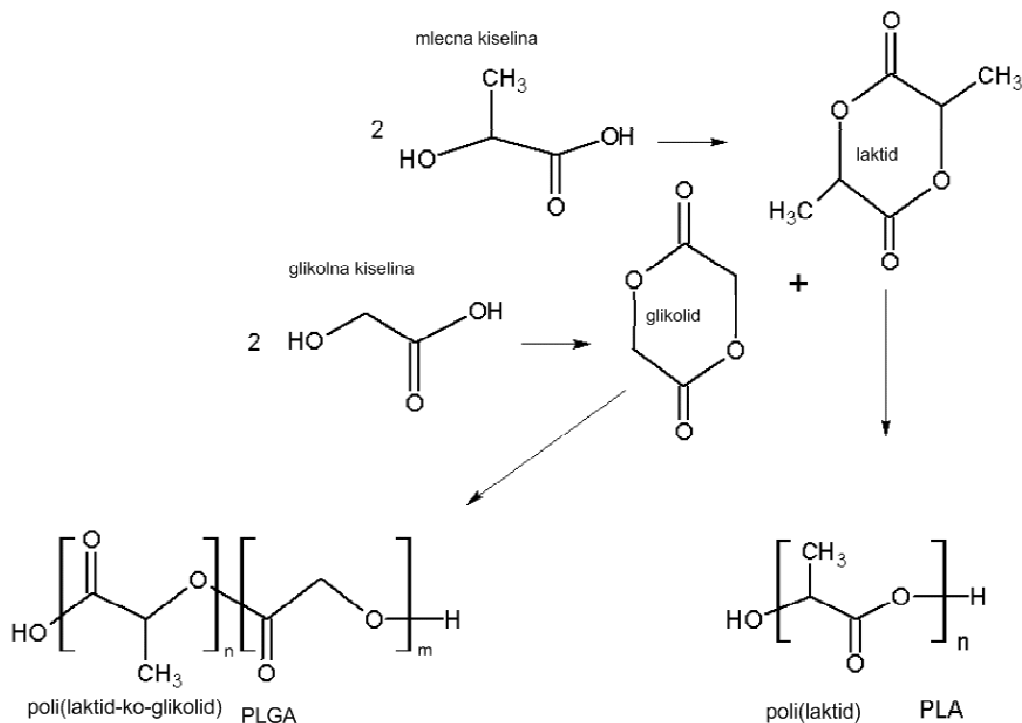
Tabela 1.3-2 Primeri biodegradabilnih polimera, njihove termalne i mehaničke osobine, aproksimativno degradaciono vreme i produkti degradacije [105]

Polimer	Termalne i mehaničke osobine			Aproksimativno degradaciono vreme (meseći)	Produkti degradacije	Biokompatibilnost i bidegradacija
	Temperatura topljenja (°C)	Temperatura staklastog prelaza (°C)	Modul savijanja (GPa)			
Poliestri						
Poli(glikolid)	225-230	35-40	7	6 do 12	glikolna kiselina	Biokompatibilni Biodegradacija ovih polimera dovodi do smanjenja molekulske mase, promene mehaničkih osobina, jačine na kidanje, itd. Krajnji produkti degradacije se uklanjaju iz organizma klasičnim metaboličkim putevima.
Poli(laktid)	173-178	60-65	2.7	>24	l-laktidna kis.	
Poli(DL-laktid)	amorfan	55-60	1.9	12 do 16	d,l-laktidna kis	
Poli(DL-laktid-ko-glikolid) 85/15	amorfan	50-55	2	5 do 6	d,l-laktidna i glikolna kis.	
Poli(DL-laktid-ko-glikolid) 75/25	amorfan	50-55	2	4 do 5	d,l-laktidna i glikolna kis.	
Poli(DL-laktid-ko-glikolid) 65/35	amorfan	45-50	2	3 do 4	d,l-laktidna i glikolna kis.	
Poli(DL-laktid-ko-glikolid) 50/50	amorfan	45-55	2	1 do 2	d,l-laktidna i glikolna kis.	
Poli(kaprolakton)	58-63	-125	0.4	>24	kaprolonska kis. (caproic acid)	Generalno netoksični i tkivno kompatibilni polimeri
Poli(propilen fumarat)	-	-	2-30 (MPa)	Zavisno od procesa sinteze nekoliko meseci na osnovu podataka in vitro istraživanja	fumarna kis, propilen glikol, i poli(akrilna-ko-fumarna kiselina)	
Polianhidridi, polikarbonati, poliuretani, polifosfazeni						
Poli(1,6-bi (karboxifenoksi) heksan (polianhidrid))	-	-	1.3Mpa (Yungov modul)	12 (in vitro)	Dikarboksilne kiseline	Polianhidridi su biokompatibilni i imaju dobro definisane produkte degradacije. Degradiraju kidanjem anhidridnih veza (površinska degradacija)
Tirozin-bazirani polikarbonat	-	-	Dovoljna mehanička snaga za koštane fiksacije	Veoma spora degradacija (in vitro)	Tirozin, ugljen dioksid, alkoholi	Biokompatibilni, podstiču rast kosti in vivo
Poliuretani	-	-	8-40Mpa sila istezanja	1 do 2	Lizin, glikolna i kaprolna kiselina	Bez negativnih tkivnih odgovora
Etilglicin polifosfazen	-	-	-	>1 (in vitro)	Fosfati i drugi produkti u zavisnosti od bočnih grupa	Biokompatibilan i potpomaže osteogenezu ćelija

1.4 Biodegradacija i biokompatibilnost poli(laktid-ko-glikolida)

Poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA) je kopolimer laktida i glikolida registrovan od strane Američke organizacije za kontrolu hrane i lekova (Food and Drug Administration, FDA) kao materijal koji se može koristiti u medicini i farmaciji i spada u klasu biodegradabilnih i biokompatibilnih polimera [120]. Biokompatibilnost je svojstvo materijala da ne izaziva negativne odgovore organizma (alergijske reakcije, negativni imunološki odgovor organizma, ne dovodi do zapaljenskih procesa, itd.) [121]. Biokompatibilnost treba posmatrati kao "dvosmerni put" sa materijalom koji utiče na organizam sistemski ili lokalno ali i organizam utiče na degradaciju materijala. U tkivnom inženjerstvu npr. biokompatibilnost se opisuje kao sposobnost materijala tj. skafolda, matrice, membrane da podrži ćelijsku aktivnost u cilju optimizacije regeneracije tkiva bez neželjenih štetnih efekata na same ćelije i organizam bilo lokalno ili sistemski [122].

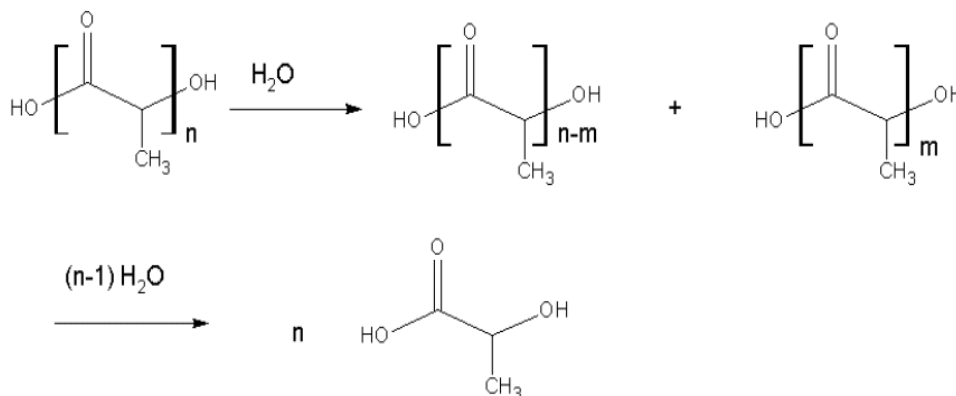
PLGA je sintetizovan nasumičnom ko-polimerizacijom glikolida i laktida (slika 1.4-1). Laktid je ciklični dimer mlečne kiseline i u prirodi postoji u obliku dva optička izomera i to kao d- i l-laktid, dok je dl-laktid sintetički spoj d-laktida i l-laktida.



Slika 1.4-1 Sinteza PLGA-a i PLA-a

Najčešći katalizatori koji se koriste prilikom sinteze PLGA-a uključuju tin(II)2-etilhexanoat, tin(II)alkoksid ili aluminium izopropoksid. Tokom polimerizacije, sukcesivne monomerne jedinice (glikolida ili laktida) se vezuju u PLGA estarskim vezama, pri čemu se dobija linearni, alifatični poliestar. U zavisnosti od odnosa laktida i glikolida dobijaju se različite forme poli(laktid-ko-glikolida) koje mogu biti visoko kristalinične (npr. poli(L-laktid)) do potpuno amorfnih (poli(DL-laktid-ko-glikolid) [123]. Kopolimer PLGA je češće amorfan nego kristaliničan i ima temperaturu staklastog prelaza između 40 i 60°C. Za razliku od laktida (polilaktida) i glikolida (poliglikolida) koji pokazuju slabu rastvorljivost u većini rastvarača, PLGA je rastvoran u širokom opsegu rastvarača kao npr. u acetonu, etil acetatu, tetrahidrofuranu, itd. PLGA degradira hidrolizom estarskih veza u prisustvu vode [124-128]. Vreme potrebno za potpunu degradaciju je u korelaciji sa odnosom homopolimera u kopolimeru tj. što je veći udeo glikolida u kopolimeru to će vreme degradacije biti kraće. Izuzetak je kopolimer sa odnosom homopolimernih komponenata 50:50. Kopolimer sa 50% glikolida i 50% dl-laktida degradira brže nego oba homopolimera. Kopolimer l-laktida sa 25-75% glikolida je amorfan zbog poremećaja pravilnosti polimernog lanca drugim monomerom.

Degradacija alifatičnih poliestara se proučava od strane mnogih autora. Generalno je prihvaćeno da kopolimer PLGA i homopolimeri polilaktid (PLA) i poliglikolid (PGA) degradiraju hidrolizom estarskih veza (slika 1.4-2) [120].



Slika 1.4-2 Shemaski prikaz hidrolize polilaktida u monomerne jedinice

Produkti degradacije su monomeri a krajnji produkti degradacije su ugljen dioksid i voda koji se otklanjaju iz organizma klasičnim metaboličkim putevima (Krebsov ciklus). Na degradaciju kopolimera utiču razni fizičko-hemijski faktori kao što su pH sredine, jonska jačina, temperatura medijuma u kome polimer degradira, odnos homopolimernih

komponentata u kopolimeru, molekulska masa, stepen kristaliničnosti, itd. Na degradaciju polimera svakako utiče i prisustvo aditiva (kiselina, baze, monomeri, rastvarač, itd.). Morfologija (veličina i oblik) čestica je izuzetno važan faktor koji utiče na mehanizam degradacije kopolimera. Vert i saradnici [129,130] su ispitivali uticaj veličine čestica na brzinu degradacije polimera baziranih na laktidu i glikolidu. Njihova in vitro i in vivo studija je ustanovila heterogeni mehanizam degradacije polimernih uzoraka sa većim česticama. Heterogenu degradaciju polimera karakteriše brža degradacija polimerne mase (jezgra) nego površine. Za razliku od uzoraka sa većim dimenzijama čestica, uzorci PLA/GA sa mikrosferama manjim od $300\mu\text{m}$ u prečniku homogeno degradiraju, odnosno brzina degradacije mase je približna brzini degradacije površine [131].

Sa generalne tačke gledišta dva fenomena su razmatrana. Prvi je da degradacija uzrokuje povećanje broja krajnjih karboksilnih grupa koje zatim autokatalizuju hidrolizu estarskih veza [132]. Drugi fenomen je da sa vremenom degradacije raste količina oligomera u polimernoj matrici i rastvorni oligomeri mogu "pobeći" iz mase polimera. Kod polimernih uzoraka sa većim dimenzijama čestica samo rastvorni oligomeri locirani blizu površine mogu difundovati iz matrice pre nego što u potpunosti degradiraju, dok oligomeri smešteni dublje u masi polimera ostaju zarobljeni i povećavaju kiselost same matrice. Zarobljeni oligomeri povećavaju koncentraciju estarskih i karboksilnih veza što rezultuje u povećanju brzine degradacije i autokatalize. Ovaj difuziono-reakcioni fenomen [134,135] dovodi do diferencijacije površine i unutrašnjosti većih polimernih uzoraka prilikom degradacije [135].

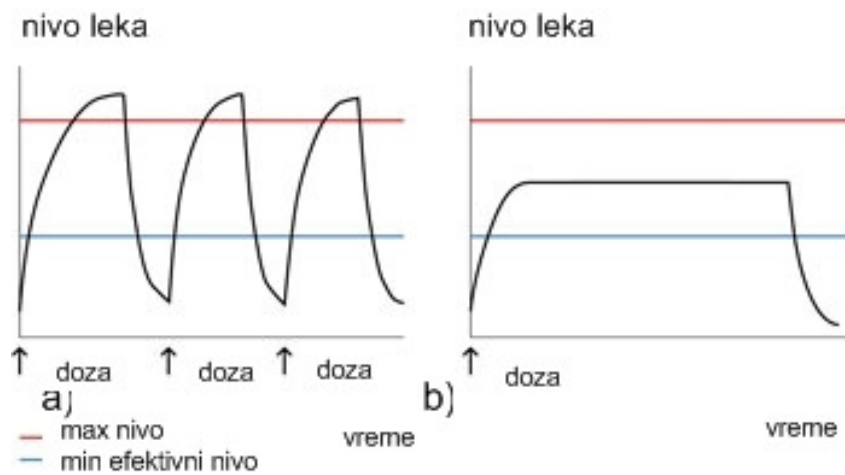
Do sada, ipak, degradacioni proces nije u potpunosti razjašnjen i upravo njime se mnoga istraživanja bave.

1.5 Kontrolisana dostava medikamenata

Dizajniranje, projektovanje i potencijana primena sistema za kontrolisanu dostavu medikamenata poslednjih godina doživljava pravu ekspanziju i predstavlja oblast interesovanja mnogih istraživača [137,138]. Pod medikamentima se podrazumevaju antikancerogeni agensi, antihipertenzivni agensi, imunomodulatori, hormoni, vitamini i makromolekuli kao što je nukleinska kiselina, proteini, peptidi, antitela, itd.. Polimerni materijali se intenzivno proučavaju kao materijali za izradu sistema za kontrolisanu dostavu medikamenata. Kontrolisana dostava medikamenata podrazumeva da je polimer, bilo prirodni ili sintetički, na određen način ukombinovan sa medikamentom tako da se oslobađanje (otpuštanje) medikamenta odigrava na predvidljiv način [139-144]. Oslobađanje medikamenta tokom vremena može se odigravati konstantno, periodično ili biti potencirano tj. izazvano nekim od okolnih, spoljašnjih faktora (pH sredine, temperatura, prisustvo enzima, itd.). Krajnji cilj kontrolisane dostave medikamenta jeste postizanje ravnomernije, efikasnije koncentracije medikamenta tokom dužeg perioda vremena, smanjenje sporednih, neželjenih, efekata, eliminisanje potencijalne predoziranosti kao i prevazilaženje nedovoljne, tj. neefikasne koncentracije medikamenta. Održavanjem koncentracije medikamenta na određenom nivou izbegava se njegovo često apliciranje i time se povećava komfornost pacijenata. Potencijalna ne-biokompatibilnost upotrebljenih materijala, nepoželjni produkti degradacije, hiruški zahtev za uklanjanjem implanta, viša cena sistema za kontrolisanu dostavu su mane kontrolisane dostave medikamenata.

Sistemi za kontrolisanu dostavu medikamenata mogu biti od izuzetnog značaja kada se medikamenti iz nekog razloga ne mogu adekvatno uneti i administrirati u organizam na standardan, konvencionalan, način. To je npr. u situacijama koje zahtevaju sporo oslobađanje u vodi rastvornih medikamenata, brzo oslobađanje slabo rastvornih medikamenata, dostavu medikamenta do tačno određenog mesta u organizmu, dostavu dva ili više terapeutskih sredstava slične formulacije, sistemi koji se mogu rastvoriti ili degradirati i ukloniti iz organizma klasičnim metaboličkim putevima [145]. Idealan sistem za kontrolisanu dostavu bi trebalo da bude inertan, biokompatibilan, određenih mehaničkih osobina, da njegovo apliciranje bude dovoljno komforno za pacijenta, da je efikasnost inkapsulacije odnosno imobilizacije medikamenta unutar čestice (polimerne matrice) zadovoljavajuća, da je jednostavan za administraciju i uklanjanje kao i da je lak za sintezu i sterilizaciju.

Za razliku od standardnih, konvencionalnih metoda gde nakon unošenja medikamenta u organizam koncentracija medikamenta dostiže maksimalni efektivni nivo (koji u određenim slučajevima može biti i toksičan) a zatim njegova koncentracija opada do ispod minimalnog efektivnog nivoa sa sistemom za kontrolisanu dostavu medikamenta postiže se konstantna i ravnomerna koncentracija medikamenta (sa vrednošću između minimalne i maksimalne vrednosti) u organizmu tokom dužeg perioda vremena. Ovaj vremenski period može biti od nekoliko dana do nekoliko godina [146].



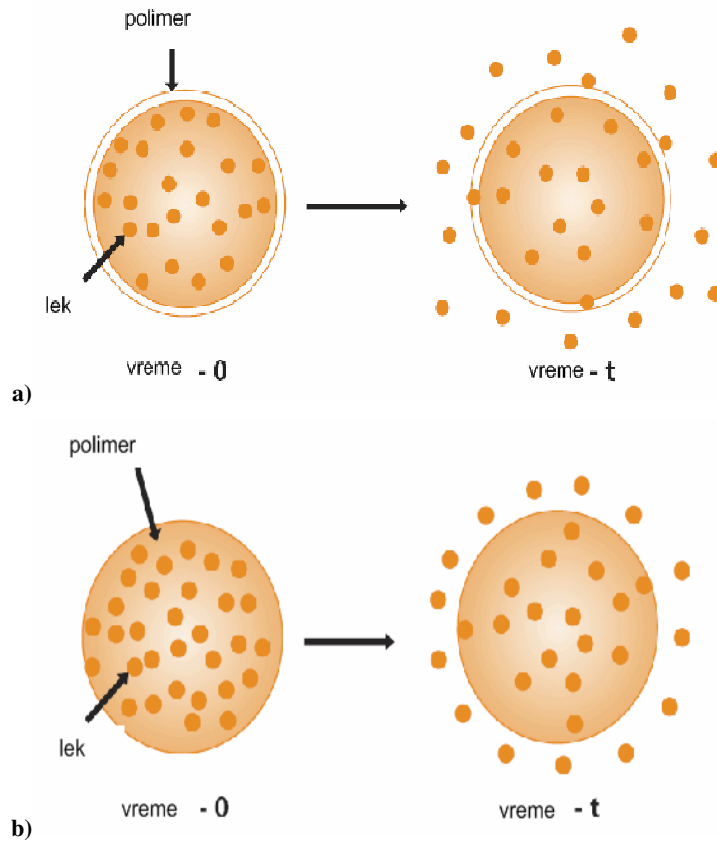
Slika 1.5-1 Nivo leka u krvi: a) konvencionalna i b) kontrolisana dostava

Poslednjih godina, sistemi za kontrolisanu dostavu i polimerni materijali korišćeni za izradu ovih sistema, postaju znatno sofisticiraniji, i mnogo više od sistema za isključivo prolongiranje otpuštanja medikamenta u organizmu. Na primer, sadašnji sistemi mogu reagovati na promene u biološkom okruženju otpuštanjem medikamenta ili zaustavljanjem otpuštanja u zavisnosti od tipa promena. Osim toga, sa sistemom za kontrolisanu dostavu bi bilo moguće dostaviti medikament do tačno određene ćelije, tkiva ili organa. Sistemi za kontrolisanu dostavu medikamenata se mogu podeliti na sisteme sa ciljanim otpuštanjem medikamenta (target drug delivery, otpuštanje medikamenta započinje kada se sistem nađe na tačno određenom mestu), sisteme sa zaključanim otpuštanjem (triggered release, otpuštanje počinje na određenoj temperaturi, pH sredine, itd.) i sisteme sa neprekidnim otpuštanjem (sustained release, postiže se dugotrajniji efektivni nivo aktivnog agensa) [147].

Širok opseg materijala se koristi za izradu sistema za kontrolisanu dostavu medikamenata. Prvobitno korišćeni polimerni materijali su najpre bili korišćeni u druge, ne-biološke svrhe ali su kasnije odabrani zbog svojih fizičkih osobina npr: poli(uretani)

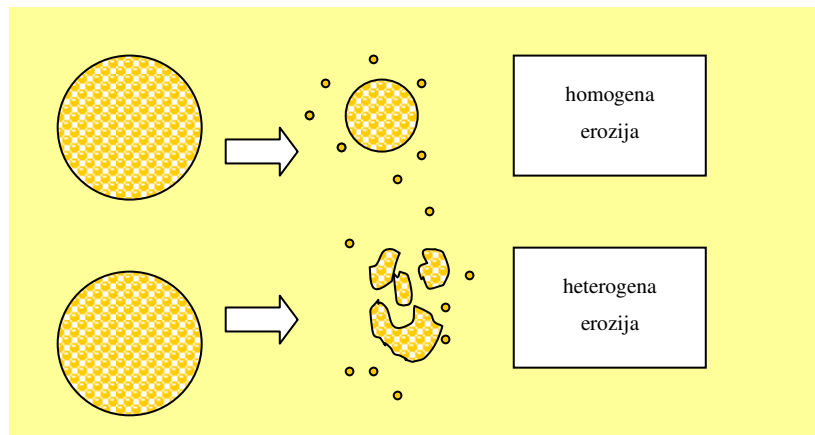
zbog elastičnosti, poli(siloksani) ili silikoni zbog izolacionih sposobnosti, poli(metilmetakrilati) mehaničkih osobina i transparentnosti, polivinil alkohol zbog hidrofилnosti i snage, poli(etileni) zbog tvrdoće i nedostatka oticanja, polivinil pirolidon zbog suspenzionih sposobnosti [91]. Neki od materijala koji se trenutno koriste i istražuju u cilju kontrolisane dostave medikamenata su poli(2-hidroxi etil metakrilat), poli(N-vinil pirolidon), poli(metil metakrilat), polivinil alkohol, poli(akrilna kiselina), poli(etilen glikol), poli(metakrilna kiselina). Poslednjih godina polimerni materijali, inicijelno korišćeni i u druge medicinske svrhe, se intenzivno istražuju za kontrolisanu dostavu medikamenata i naročito su interesantni zbog sposobnosti degradacije a u njih spadaju polilaktidi, poliglikolidi, poli(laktid-ko-glikolid), polianhidridi i poliortoestri. Jedna od glavnih prednosti ovih polimernih materijala je u tome što kao produkte degradacije daju molekule koji se nesmetano mogu uključiti u metabolizam i ukloniti iz organizma regularnim metaboličkim putevima.

Postoje tri primarna mehanizma otpuštanja medikamenta iz sistema za kontrolisanu dostavu i to su difuzija, degradacija i bubrenje praćeno difuzijom [148-152]. U određenom sistemu mogu biti zastupljeni i dominantni jedan ili više mehanizama. Medikament može biti na različite načine inkorporiran u polimernom materijalu i to inkapsuliran pri čemu se dobija tzv. rezervoar sistem (slika 1.5-2 a) ili imobilisan odnosno dispergovan u polimernoj matrici pri čemu se dobija matrica sistem (slika 1.5-2 b). Rezvoar sistem je onaj kod koga bioaktivni agens (medikament) formira jezgro oko koga je polimerna membrana koja predstavlja inertnu difuzionu barijeru. Takvi sistemi su kapsule, mikrokapsule, lipozomi, šuplje sfere, itd.. Difuzija se dešava kada aktivni agens prođe polimernu membranu odnosno kada polimerna membrana postane porozna medikament će difundovati kroz pore (makroskopski nivo), ili prolaskom medikamenta između polimernih lanaca (molekulski nivo). U matrica sistemu difuzija se dešava kada medikament prelazi iz polimerne matrice u spoljašnje okruženje [153].



Slika 1.5-2 Oslobođanje leka iz a) rezervoar sistema i b) matrica sistema

U slučaju sistema napravljenih od biodegradabilnih polimera otpuštanje medikamenata se odigrava zahvaljujući degradaciji polimera nakon hidrolize i kidanja polimernih lanaca usled čega nastaju produkti degradacije koji se uključuju u metabolizam i uklanjaju iz organizma bez hiruških zahvata. Degradacija se može odigravati kao površinska erozija materijala (homogena erozija) ili erozija polimerne mase (heterogena erozija) (slika 1.5-3) ili kombinacijom i jednog i drugog mehanizma.



Slika 1.5-3 Degradacija polimera homogenom i heterogenom erozijom polimerne mase

Ukoliko je medikament dispergovan u polimernoj matrici uniformno, slično kao kod matrica sistema, u skladu sa tim kako polimer erodira tako će se medikament oslobađati. Ukoliko je medikament hemijski kovalentno vezan unutar polimera (ne samo fizički dispergovan) otpuštanje medikamenta će se dešavati nakon raskidanja veza pod dejstvom vode ili enzima. U sistemima zavisnim od upotrebljenog rastvarača (solvent-controlled sistem) kada rastvor (npr. fiziološki rastvor) penetrira u polimernu matricu, polimer bubri pri čemu je i njegova temperatura ostakljivanja niža od temperature okruženja i tada dolazi do difuzije medikamenta iz polimera u okolinu [153].

Poli(laktid-ko-glikolid) je degradabilni polimer koji se intenzivno istražuje u cilju dobijanja sistema za kontrolisanu dostavu medikamenata.

1.6 Dobijanje čestica poli(laktid-ko-glikolida) i njihova primena kao sistema za kontrolisanu dostavu medikamenata

Polimerne nanočestice sintetizovane bilo od prirodnih ili sintetičkih polimera su postale veoma važna oblast istraživanja na polju kontrolisane dostave medikamenata jer omogućavaju dostavu širokog spektra lekova u različite delove organizma i tokom produženog perioda vremena. Upotreba prirodnih polimera (npr. proteina i polisaharida) u cilju kontrolisane dostave lekova ipak nije široko rasprostranjena zbog variranja njihove čistoće kao i često potrebnog umrežavanja koje može denaturisati inkorporirani lek. Sintetički polimeri privlače mnogo više pažnje i interesovanja u ovoj oblasti a među njima su najčešće korišćeni polilaktid (PLA), poliglikolid (PGA), kopolimer poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA), poli(DL-laktid-ko-glikolid) (DLPLG). Čestice DLPLG-a omogućavaju inkapsulaciju ili imobilizaciju medikamenta unutar polimerne matrice pri čemu je osnovni zahtev za kontrolisano i ravnomerno oslobađanje medikamenta unutar organizma, idealna sferičnost čestica i uniformna raspodela njihovih veličina.



Slika 1.6-1 Komercijalne granule poli(DL-laktid-ko-glikolida) i poli(L-laktid-ko-glikolida)

U zavisnosti od prirode i matrice izabranog materijala metode za dobijanje polimernih čestica se mogu generalno podeliti u tri grupe i to: polimerizaciona metoda, koacervacija ili jonsko struktuiranje i disperzija polimernog rastvora. [45, 158]. Metode kao što su superkritična fluidna tehnika [154, 155] i kopiranje čestica u suvim šablonima (particle replication in non-wetting templates (PRINT)) su takođe opisane u literaturi [7]. U svom radu Park i saradnici opisuju dobijanje mikročestica poli(laktid-ko-glikolida) metodom mikromodelovanja tj. ispunjavanjem mikromodli polimernim rastvorom na sobnoj temperaturi kako bi se dobila mikrostruktura sastavljena od više materijala tj. od

polimera i inkorporiranog medikamenta Polimerne mikročestice su bile sa veličinama od 1 do 30 μm i to od PLA, PGA ili PLGA polimera [156].

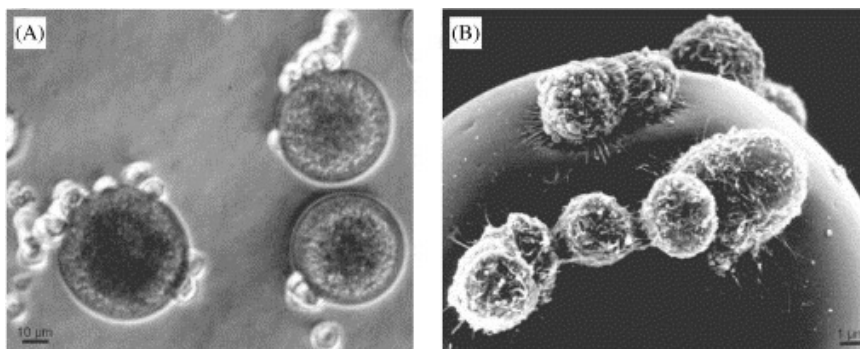
Na veličinu kao i oblik čestice utiču metoda dobijanja čestica, izbor rastvarača, stabilizator čestica, medikament koji se inkorporira, uslovi prilikom sinteze, itd. U polimerizacionoj metodi se monomeri polimerizuju i formiraju čestice u vodenom rastvoru. Koacervacija ili jonsko struktuiranje je metoda koja se najčešće koristi za formiranje biodegradabilnih čestica (najčešće hitozana (CS)) a sastoji se od dve vodene faze, pri čemu je jedna sa polimerom, etilen oksidom i propilen oksidom, a druga sa polianjon natrijum tripolifosfatom (TPP) [45]. U literaturi su opisane različite metode dobijanja polimernih nanočestica PLGA-a a najzastupljenija je metoda disperzije polimernog rastvora. U metodu disperzije polimernog rastvora spadaju metoda uparavanja i emulziona metoda i njihove varijacije [157]. Najčešće korišćena metoda za dobijanje PLGA-a čestica je emulziono-rastvarač-uparavanje metoda (emulsification/solvent/evaporation method) [159]. Ova metoda je posebno dobra za inkapsulaciju hidrofobnih medikamenata ali daje loše rezultate prilikom inkorporiranja bioaktivnih agenasa hidrofilne prirode. Ukratko, rastvarač/uparavanje metoda se sastoji u rastvaranju polimera i medikamenta u organskom rastvaraču (najčešće u dihlormetanu ili metilen hloridu) i zatim pravljenju emulzije dodavanjem vode [160]. U mnogim slučajevima formiranje polimernih kapljica nanometarskih veličina je indukovano sonifikacijom ili homogenizacijom nakon čega se organski rastvarač uklanja uparavanjem. Modifikacije ove metode omogućavaju i poboljšavaju uslove za inkapsulaciju hidrofilnih jedinjenja i proteina [161]. Upotreba toksičnih hloridnih rastvarača (kao što je metilen hlorid) može dovesti do razgradnje određenih medikamenata i proteina tokom procesa sinteze pa su iz tog razloga uloženi napor u razvoj i drugih tehnika dobijanja polimernih nanočestica kao što je emulziono-difuziona metoda u kojoj se kao rastvarači koriste npr. aceton ili propilen karbonat. Polimer i bioaktivno jedinjenje se rastvaraju u rastvaraču a zatim emulzificiraju u vodenoj fazi koja sadrži stabilizator. Stabilizator sprečava agregaciju emulzionih kapljica. Rastvor se meša kako bi došlo do nanoprecipitacije čestica. Rastvarač se može ukloniti dijalizacionom metodom ili centrifugiranjem.

Emulzionim procesom su dobijene PLGA sfere u opsegu od 150-200 μm , 45 μm i 30 μm [45]. Modifikovanom emulzionom metodom se dimenzije dobijenih čestica smanjuju i iznose do 10 μm [45]. Suvim raspršivanjem dobijene su mikrosfere PLGA sa veličinama od 1 do 8 μm u kojima je inkapsuliran anticancer agens (paclitaxel)) [162].

Daljim modifikacijama procesa sinteze čestica tj. emulziono rastvarač uparavanje metodom dobijaju se čestice sa veličinama na nanometarskoj skali 570-970nm, 244-260nm [45]. Fizičko hemijskom metodom su dobijene čestice kopolimera DLPLG sa veličinama 150-230nm [163]. Nanočestice se mogu sintetizovati i nanoprecipitacionom metodom [164]. Polimer i lek su rastvoreni u acetonu i zatim dodati u vodeni rastvor sa stabilizatorom pluronic F68. Aceton je uklonjen uparavanjem pod redukovanim pritiskom i dobijena je suspenzija nanočestica sa veličinama od 110 do 208nm . Suvim raspršivanjem su dobijene čestice sa srednjim veličinama od 100 do 250nm [165]. Jin i saradnici su ispitivali fizičko-hemijske karakteristike čestica kao što su efikasnost inkapsulacije, morfologija i oslobađanje u *in vitro* uslovima paclitaxela, etanidazola i paclitaxel+etanidazola iz nanočestica PLGA dobijenih metodom o/w i w/o/w tj emulziono –rastvarač uparavanje metodom (emulsification-solvent evaporation method) [166]. Veličine čestica u iznosile od 80 do 150 nm. Emulziono uparavanjem metodom sa SDS-om (sodium dodecil sulfate) kao surfaktantom su dobijene čestice sa veličinama od 38.6 do 67.1nm [167].

Veličina čestica kao i raspodela njihovih veličina su važne karakteristike čestice koje utiču na njihovu *in vivo* distribuciju, biološki odgovor organizma, toksičnost, mogućnosti ciljane dostave, efikasnost inkapsulacije, količinu inkapsuliranog medikamenta, oslobađanje leka, stabilnost sistema za kontrolisanu dostavu, itd. [168,169].

Mnoga istraživanja su ukazala na to da polimerne čestice submikronskih veličina imaju niz prednosti u odnosu na mikročestice kao sisteme za kontrolisanu dostavu. Nanočestice imaju bolju interakciju i adheziju sa ćelijama ("intracellular uptake") (slika 1.6-2) u odnosu na mikročestice i širi opseg bioloških ciljeva zahvaljući malim dimenzijama i relativnoj mobilnosti [170-172].



Slika 1.6-2 Slika, adhezije ćelija na česticama poli(DL-laktid-ko-glikolida), dobijena A) optičkim i B) skenirajućim elektronskim mikroskopom [170]

Cirkulaciono vreme poli(laktid-ko-glikolid) čestica u in vivo uslovima je određeno fizičko-hemijskim karakteristikama čestice naročito njenom veličinom, površinskim afinitetima, površinskim naelektrisanjem, itd.. Na veličinu čestica može uticati i vrsta upotrebljenog rastvarača [173]. U različitim metodama se koriste različiti rastvarači i to najčešće aceton, dihlormetan, trihidro furan, i propilen karbonat u rastvarač/difuzionoj metodi, metilen karbonat i acetat u metodi izmene rastvarača, aceton i acetonitril u nanoprecipitaciji, dihlormetan i metilen karbonat u rastvarač/uparavanje metodi, etil acetat, metilen hlorid, dihlor metan, i aceton u višestrukoj emulzionoj metodi, aceton u interfacijalnoj depoziciji, metilen hlorid u faznoj inverzionoj inkapsulaciji [174]. U radu Bilati i saradnika [164] je pokazano da veličina i raspodela PLGA-a čestica zavisi i od vrste upotrebljenog nerastvarača kao i od odnosa rastvarača i nerastvarača [45]. Kada je kao nerastvarač korišćen alkohol, srednja veličina čestica PLGA je najmanja kada je u eksperimentu upotrebljen metanol pa etanol i najveća kada je upotrebljen propanol.

Mnoga istraživanja su posvećena dobijanju i primeni čestica poli(DL-laktid-ko-glikolida) pri čemu se u okviru tih istraživanja posebno stavlja akcenat na ispitivanje uticaja različitih faktora na površinske osobine čestice tj. zeta potencijal i permeabilnost [7]. Prilikom dobijanja čestica PLGA-a različiti stabilizatori se koriste kako bi se postiglo određeno površinsko naelektrisanje čestice tj. specifičan zeta potencijal čime se sprečava njihova aglomeracija. Tip i koncentracija stabilizatora mogu uticati i na veličinu čestice a samim tim i na kinetiku oslobađanja medikamenta, biodistribuciju, itd. [175]. Kao stabilizatori čestica se mogu koristiti poli(vinil alkohol) (PVA), fosfolipidi, holesterol, vitamin E (TPGS), poli(vinil piroolidon) (PVP), itd. [176]. U radu Feczko i saradnika je ispitan uticaj različitih stabilizatora na osobine čestica PLGA-a dobijenih višestrukom voda/ulje/voda emulziono rastvarač uparavanje metodom. Dobar prinos čestica kao i efikasnost inkapsulacije (>90%) je postignuta kada je kao stabilizator čestica korišćen poli(vinil alkohol) [177].

U literaturi su opisane različite metode inkorporiranja lekova u polimernu česticu i u zavisnosti od metode npr. lek može biti imobilisan u polimernoj matrici, inkapsuliran kao polimerno jezgro, obložen polimernom membranom, hemijski konjugovan ili adsorbovan na površini polimera. Čestice poli(laktid-ko-glikolida) se koriste za prenos najrazličitijih klasa medikamenata: antikancer agenasa, hormona, polipeptida, proteina, antigena, vakcina, antibiotika, dezoksiribonukleinske kiseline, itd. [178-209]. Idealno, "uspešan" sistem za kontrolisanu dostavu medikamenata bi trebalo da ima veliku efikasnost

inkapsulacije i da omogućava inkorporiranje odgovarajuće količine medikamenta. U literaturi su opisane dve metode inkorporiranja medikamenta u PLGA-a i to: inkorporiranje medikamenta tokom sinteze čestica i absorpcijom medikamenta nakon formiranja čestica što se postiže inkubacijom čestica u koncentrovanom rastvoru sa medikamentom. Metodom rastvarač/uparavanje su dobijene čestice PLGA-a u koje je inkapsuliran dexametazon i karakterisana je njihova veličina, količina inkapsuliranog medikamenta i njegovo oslobađanje u *in vitro* uslovima [210]. Količina inkapsuliranog dexametazona je iznosila ~13% dok je u *in vitro* uslovima otpušten približno 90% u prvih dve nedelje eksperimenta [210]. Poli(laktid-ko-glikolid) mikrosfere se mogu koristiti i u cilju otklanjanja bilirubina kod hiperbilirubiničnih pacova i to je opisano u radu Ahmad i saradnika. Vezivanje bilirubina za mikrosfere PLGA-a je postignuto inkapsulacijom albumina (rat serum albumin, RSA) i stvaranjem kompleksa bilirubin-albumin [211].

Jedan od potencijalnih problema u kontrolisanoj dostavi medikamena jeste postizanje konstantnog i tačno određenog nivoa otpuštanja medikamenta iz polimerne matrice PLGA-a. U slučaju mnogih medikamena, prilikom degradacije čestica PLGA-a, dolazi najpre do njihovog naglog oslobađanja ("initial burst"). Matsumoto i saradnici su se bavili mogućnošću prevazilaženja naglog oslobađanja medikamenta iz polimerne matrice tako što su sintetizovali multi-rezervoar mikrosfere jedinstvene strukture koja se sastojala u tome da je u malim dispezionim kapljicama unutar mikrosfere PLGA-a lokalizovan medikament [212, 213].

Kada se nanočestice DLPLG-a administriraju npr. intravenozno one se lako prepoznaju od strane imunog sistema organizma i uklanjaju se iz cirkulacije fagocitozom [214]. Pored veličine čestice na to utiču i površinske osobine čestice određene i količinom adsorbovanih krvnih komponenata, uglavnom proteina, opsonina [215, 216]. Sve ovo utiče na *in vivo* distribuciju i degradaciju čestica. Većina komercijalno dostupnih polimera pa i poli(laktid-ko-glikolid) imaju inertnu prirodu površine i iz tog razloga se moraju površinski funkcionalizovati pričvršćivanjem bioaktivnih jedinjenja [217-220]. Sledeći korak je optimizacija tehnike funkcionalizovanja površine u cilju postizanja odgovarajućeg tipa i kvantiteta reaktivnih funkcionalnih grupa. Bioaktivna jedinjenja mogu biti prirodna ili sintetička i definišu se kao jedinjenja koja katalizuju ili menjaju specifični odgovor biološkog sistema na polimerni materijal. Glavne metode imobilizacije bioaktivnih jedinjenja na površini polimera je adsorpcija elektrostatičkim interakcijama, vezivanje po principu ligand-receptor ili vezivanje kovalentnim vezama [221]. Biološka jedinjenja za

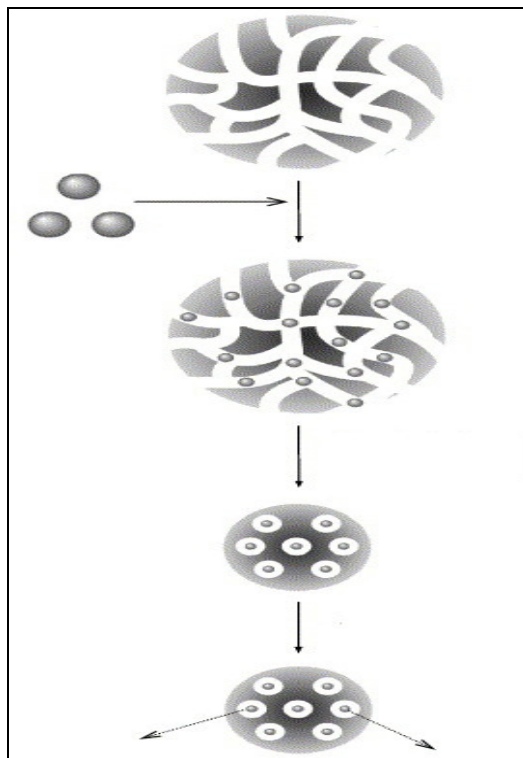
funkcionalizaciju površine PLGA-a mogu biti enzimi, peptidi, polisaharidi, fosfolipidi, antitela, poli(etilen glikol) (PEG), itd. [222]. Polimerne mikrosfere se mogu modifikovati specifičnim ligandima kako bi se postigla ciljana kontrolisana dostava (targeted controlled delivery) [223]. Oblaganje sfera želatinom ili humanim serum albuminom može pospešiti njihovu biokompatibilnost. Obložene čestice imaju veću stabilnost i selektivnost. U radu Wang i saradnika je opisano oblaganje mikrosfera PLGA-a fibroinom (silk fibroin) pri čemu je debljina sloja bila heterogena i prosečne debljine 1 μ m. Ovakve sfere su se pokazale stabilnijim na degradaciju dok je vreme otpuštanja medikamenta prolongirano [224]. U cilju kontrolisane dostave lekova do kostiju (bone –targeted drug delivery) u radu Choi i saradnika je opisano modifikovanje površine nanočestica poli(DL-laktid-ko-glikolida) alendronitom (tip bisfosfonata, AL) zbog lake konjugacije AL sa PLGA karboimidnom hemijom. Modifikovane čestice su se pokazale, potencijalno, pogodnijim za kontrolisanu dostavu lekova u cilju tretiranja koštanih obolenja [225]. U radu Fischer i saradnika je opisana modifikacija površine čestica, poli(laktid-ko-glikolida) dobijenih rastvarač/ekstrakcija metodom i ulje/voda disperzionom metodom bez korišćenja surfaktanata, prevlačenjem polielektrolita hitozana preko površine čestica, koji je pogodan za kovalentno vezivanje bioaktivnih liganada. Veličine čestica su iznosile od 1 do 10 μ m [226]. Modifikacija čestica PLGA je postignuta elektrostatičkim interakcijama između negativno naelektrisanih čestica PLGA-a i pozitivno naelektrisanog hitozana. Ispitana je i konjugacija dva model liganda (fluorescamina i NHS-PEG-biotina) na primarne amino grupe hitozana i pokazano je da su oba liganda ostala funkcionalna.

Adsorpcija plazma proteina na mikro- i nanosferama PLGA-a je jedan od važnih ograničavajućih faktora njihove upotrebe. Poli(L-lizin)-g-poli(etilen glikol) (PLL-g-PEG) se pokazao u istraživanjima kao materijal koji dovodi do supresije proteinske adsorpcije pa je cilj istraživanja Muller i saradnika bio površinska modifikacija PLGA-a sa PLL-g-PEG-om i ispitivanje efikasnosti smanjenja proteinske adsorpcije na površini PLGA [227]. Na površini modifikovanih sfera u odnosu na nemođifikovane je došlo do značajno manje adsorpcije proteina.

Površinsku modifikaciju PLGA-a kombinacijom kiseonik plazma tretmana sa katjonskim želatinom kako bi se pospešio afinitet čestica prema ćelijama su ispitivali Shen i saradnici [228]. I u radu Khorasani i saradnika je opisano modifikovanje površine PLGA-a kiseonik plazma tretmanom i, takođe, je pokazano da je afinitet ćelija prema ovakvim česticama veći [229].

PLA, PGA i PLGA su polimeri poznati po dobroj biokompatibilnosti i biodegradabilnosti [230]. Variranjem odnosa polilaktida i poliglikolida u kopolimeru poli(laktid-ko-glikolidu) može se uticati na brzinu i mehanizam degradacije a samim tim i na kinetiku otpuštanja medikamenta iz polimerne matrice [231-233]. Povećavanjem odnosa PLA-a postiže se veća hidrofobičnost dok se povećanjem PGA-a postiže veća hidrofiličnost PLGA-a [234]. Kopolimer PLGA-a sa većim udelom PGA-a će brže degradirati. Mnogi autori su se u svojim istraživanjima bavili ispitivanjem *in vitro* i *in vivo* degradacije poli(laktid-ko-glikolida) kao i ispitivanjem različitih faktora na degradaciju kao što su pH [235-236], temperatura degradacionog medijuma, različiti medijumi [237], uticaj porogena, prisustvo enzima u degradacionom medijumu, uticajem veličine čestica, itd. [238-244]. Alonso i saradnici su razvili sistem za kontrolisanu dostavu vakcine protiv tetanusa. PLGA sa odnosom laktida i glikolida 50/50 je upotrebljen za pravljenje mikrosfera u kojima je inkorporiran medikament. *In vitro* studija je pokazala profil oslobađanja medikamenta (vakcine) sa povećanjem brzine oslobađanja nakon 15 dana [245]. Ispitivanjem procesa degradacije čestica PLGA-a dobijenih metodom suvog raspršivanja su se bavili Blanco i saradnici [246] i u svom radu su opisali degradaciju čestica kroz dva stupnja. U početku je degradacija čestica sporija dok kasnije dolazi do intenzivnije degradacije i gubitka mase PLGA-a sa povećanjem koncentracije laktida u medijumu. Efekat tipa inkorporiranog medikamenta na proces degradacije poli(DL-laktid-ko-glikolida) su ispitali Siegel i saradnici [247]. Upoređivanjem kinetike otpuštanja šest različitih medikamenata (haloperidola, hidrohlorotiozida, kortikosterona, ibuprofena, aspirina i tiotixena) pri čemu su svi medikamenti bili uneti u istoj količinu (20% wt) pokazano je da se prilikom dizajniranja biodegradabilnih polimernih čestica mora uzeti u obzir i uticaj medikamenta, koji se inkapsulira, na polimernu degradaciju i otpuštanje medikamenta. Haloperidol je otušen u roku od 38 dana dok je za otpuštanje aspirina bilo potrebno 13 dana [247]. Na degradaciju PLGA utiče i pH degradacionog medijuma. Dodavanjem aditiva, npr. baznih soli (npr $Mg(OH)_2$) se povećava pH vrednost rastvora i time usporava proces degradacije polimera [248]. Jedan od važnih faktora koji utiče na proces degradacije čestica poli(laktid-ko-glikolida) jeste i stepen njihove poroznosti. Porozne čestice PLGA dobijene rastvarač/ekstrakcija/uparavanje metodom sa inkorporiranim medikamentom su suspendovane u fosfatnom pufer rastvoru na pH 7.4 i ispitivana je njihova degradacija kao i otpuštanje medikamenta. Nasuprot ne-poroznim česticama identične kompozicije, relativno otpuštanje medikamenta opada sa povećanjem veličine čestica. Gravimetrijska analiza je pokazala da brzina degradacije polimera raste sa

porastom dimenzije mikročestice ukazujući na to da autokatalitički efekat igra značajnu ulogu čak i kod malih i visokoporoznih PLGA-a mikročestica. Ipak, ovaj efekat je mnogo manje izražen nego kod ne-poroznog sistema. Važno je napomenuti da je ovo kompenzovano povećanjem difuzionog efekta sa povećanjem dimezija sistema. Inicijalna visoka poroznost čestica dovodi do povećane mobilnosti medikamenta ali i utiče na mehanizam degradacije [249]. Generalno, otpuštanje medikamenta će biti brže kod porogenih čestica. Vrlo često se kao porogen koristi NaCl [250] ali su zastupljeni i drugi porogeni kao što je pluronic f127. Kim i saradnici su opisali dobijanje poroznih mikrosfera PLGA-a emulzionom metodom pri čemu je korišćen pluronic f127 kao porogen (slika 1.6-2) .U porozne mikrosfere PLGA-a je inkapsuliran humani hormon rasta (rhGH) a zatim su čestice tretirane 40% etanolom ili acetronitriplom ili tetrahidrofuranom kao rastvaračem koji dovode do zatvaranja pora. Etanol kao rastvarač za zatvaranje pora (pore-closing solvent) se nije pokazao dovoljno efektivnim dok je tretiranje PLGA/rhGH čestica sa 20% acetronitriplom rezultiralo u zatvaranju pora na površini dok su unutrašnji slojevi ostali izolovani [251].



Slika 1.6-3 Shematski prikaz oslobađanja rhGH iz mikrosfera PLGA-a sa zatvorenim porama nakon tretiranja etanolom [251]

Prilikom inkapsulacije proteina u polimernu matricu PLGA-a usled hidrolize polimera koja dovodi do akumuliranja monomera, laktidne i glikolne kiseline što rezultuje i u značajnom snižavanju pH okoline, može doći do denaturacije inkapsuliranog proteina [252-258]. Modifikacija polimera je način na koji se mogu poboljšati osobine PLGA-a, npr. stabilnost inkorporiranog medikamenta, uticati na profil oslobađanja medikamenta, mehanizam degradacije kao i mogućnosti ciljane dostave [259, 260]. Povećanje stabilnosti proteina u poli(laktid-ko-glikolidu) se može povećati pravljenjem kompleksa proteina i cinka ili dodavanjem antacidnih dodataka u pufer radi stabilisanja pH. Ipak, mnogi autori se odlučuju za hibridizaciju PLGA sa drugim jedinjenjem npr. sa alginatom i hitozanom [261], pektinom [262], poli(propilen fumaratom) [263], poloxamerom i poloxaminom [264-265], polipirolom [266], želatinom [267], polivinil alkoholom [268, 269], PVA-hitozan-PEG-om i poli(orto estrima). Drugi način za poboljšanje osobina PLGA-a jeste i modifikacija samog polimera kako bi se povećala njegova hidrofilčnost i time povećala stabilnost proteina u polimernoj matrici a i uticalo na mehanizam degradacije i takvi modifikovani polimeri su blok kopolimeri sastavljeni od PLGA i npr. poli(etilen oksida) (PEO), poli(etilen glikola) (PEG) [270-272] ili poli(etilen imina) (PEI) [273]. Posebno interesovanje postoji i za tri blok kopolimere PLGA-PEG-PLGA kao materijal korišćen u genskoj terapiji ili PEG-PLGA-PEG materijal koji se pokazao kao materijal koji pomaže kod procesa zarašćivanja rana, itd. U svojim istraživanjima Grzparis i saradnici su ispitivali aktivnost poli(DL-laktid-ko-glikolid)-metoksi-poli(etilen glikol) (PLGA-mPEG) čestica u *in vitro* uslovima i došli su do zaključka da čestice PLGA-mPEG pokazuju nisku citotoksičnost koja raste sa porastom odnosa PLGA/PEG u kopolimeru [274]. Blok kopolimer PEO-PLGA je korišćen u radu Zveers i saradnika kao materijal u koji je inkapsuliran dexametazon i rapamicin i ispitivana je njihova degradacija u fosfatnom pufer rastvoru. Kada su čestice sintetizovane bez korišćenja stabilizatora u eksperimentu lekovi su otpušteni iz polimernog materijala nakon 5 sati dok je njihovo vreme otpuštanja značajno produženo kada su čestice nakon inkapsulacije tretirane želatinom ili albuminom. Vreme otuštanja dexametazona je iznosilo 17 dana a rapamicina 50 dana [275].

1.7 Vitamini rastvorni u vodi

Vitamini su organska jedinjenja neophodna organizmu. Većina vitamina se, u organizmu, ne može sintetizovati kao ni esencijalne aminokiseline, masne kiseline i minerali već se mora unositi na druge načine, npr. hranom. U organizmu, vitamini utiču na rast i razvoj i mogu imati ulogu katalizatora, antioksidanasa, regulatora hemijskih reakcija, itd. Dele se na vitamine rastvorne u vodi i vitamine rastvorne u mastima. Za razliku od vitamina rastvornih u vodi koji se iz organizma veoma lako izlučuju, višak vitamina rastvornih u mastima se skladišti u ćelijama pa je moguć njihov toksičan efekat tj. pojava hipervitaminoze [276]. U vitamine rastvorne u vodi spadaju vitamini B kompleksa i askorbinska kiselina (vitamin C) [277].

Tiamin (aneurin, vitamin B1) ima važnu ulogu u metabolizmu ugljenih hidrata kao i za normalno funkcionisanje nervnog i kardiovaskularnog sistema. Tiamin u organizmu deluje u obliku koenzima tiamin pirofosfata. Unošenje tiamina je u direktnoj vezi sa unošenjem ugljenih hidrata [278].

Riboflavin (vitamin B2) je takođe potreban u procesima oslobađanja energije iz ugljenih hidrata, proteina i masti. Učestvuje u metabolizmu i transportu gvožđa u organizmu i potpomaže proces snabdevanja ćelija kiseonikom. Aktivni je sastojak dva koenzima i to: flavin-mononukleotida (FMN, čine ga riboflavin i fosfat) i flavin-adenin-dinukleotida (FAD, čine ga riboflavin, dva fosfata i adenin).

Vitamin B3 se nalazi u dva oblika i to kao nikotinska kiselina (niacin, vitamin B3) i kao amid te kiseline (niacinamid, vitamin PP). Vitamin B3 čine derivati piridina. Nikotinska kiselina i nikotinamid funkcionišu u organizmu nakon prevođenja u nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD) ili nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (NADP). NAD i NADP su koenzimi brojnih enzima uključenih u ciklus trikarbonskih kiselina, ATP, itd..

Piridoksin (vitamin B6) je neophodan za metabolizam proteina. Kao koenzim učestvuje u prevođenju glikogena u glukozu, proizvodnji žučnih kiselina i nezasićenih masnih kiselina.

Folna kiselina (vitamin B9) je izuzetno važna za sintezu DNK-a. Esencijalna je za normalnu ćelijsku deobu i nastajanje crvenih krvnih zrnaca. Nedostatak može dovesti do

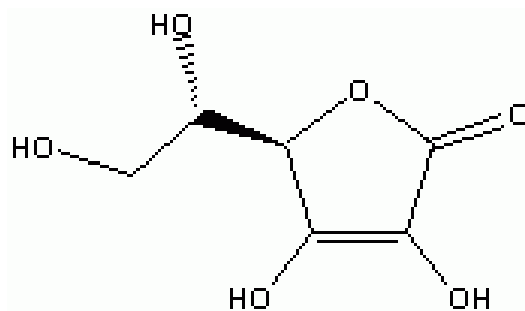
megaloblastne anemije. Folna kiselina je pteroilglutaminska kiselina. U prirodi se nalazi u obliku poliglutamata.

Kobalamin (vitamin B12) ima brojne fiziološke uloge: koenzim je u sintezi DNK-a i RNK-a, epitelnih ćelija i mijelinske ovojnice nerava. Veoma je važan u sintezi eritrocita.

U vitamine B kompleksa spadaju i pantotenska kiselina (B5, sastavni deo koenzima A) i biotin (B7, koenzim karboksilacije).

1.8 Askorbinska kiselina

Askorbinska kiselina (vitamin C, L-ascorbic acid) je izuzetno značajan i organizmu neophodan vitamin (slika 1.8-1). Spada u grupu u vodi rastvornih vitamina i neenzimskih antioksidanasa [279].



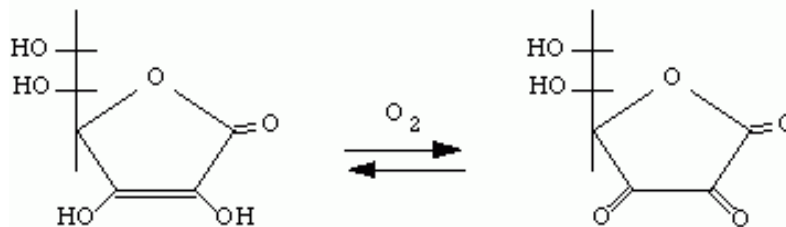
Slika 1.8-1 Vitamin C

Ima važnu biološku, farmakološku, dermatološku funkciju. Učestvuje u formiranju kolagena, proteina koji učestvuje u građi kostiju, hrskavice, krvnih sudova i mišića [280, 281]. Askorbinska kiselina je jak reduktant slobodnih radikala čime smanjuje oštećenja nastala oksidativnim stresom koji je uzrok ili pratioc mnogih bolesti. Vitamin C podstiče proizvodnju kortizona koji učestvuje u zarastanju povreda i u borbi protiv stresa. Potpomaze imunitet stimulišući nastajanje belih krvnih zrnaca čime učestvuje u borbi protiv virusnih, gljivičnih i bakterijskih infekcija. U većim dozama može povećati proizvodnju interferona i aktivirati imunološki odgovor na viruse [282]. Takođe smanjuje proizvodnju histamina i smanjuje alergijski efekat. Podstiče normalizovanje krvnog pritiska, smanjenje holesterola i štiti od arteroskleroze i drugih oblika srčanih bolesti. Deluje preventivno od kancerogenih obolenja jer sprečava stvaranje slobodnih radikala, koji učestvuju u nastajanju bolesti. Koristi se i kao pomoć kod odvikavanja od droga i alkohola, kao i nikotina, kofeina pa čak i šećera. Visoke doze mogu ublažiti simptome astinencije, povećati apetit i popraviti opšte stanje. Kod nedostatka gvoždja pomaže njegovu apsorbciju a kod dijabetesa popravlja iskoristivost šećera u krvi i time smanjuje štetne efekte [283].

Askorbinska kiselina je ketolakton sa šest ugljenikovih atoma pa je po strukturi jako slična glukozii. U organizmu se reverzibino oksiduje do dehidroksiaskorbinske kiseline koja poseduje potpunu vitaminsku aktivnost (slika 1.8-2) [284, 285]. To je i jedan od najnestabilnijih vitamina [286]. U organizmu se ne može značajno skladištiti i vrlo brzo se

izlučuje. Aproximativno, oko 73% unete količine vitamina C u organizam se izluči za manje od jednog dana [279]. Vitamin C je veoma nestabilan na vazduhu, svetlosti, toploti, pod uticajem vlage, kiseonika, pri čemu lako dekomponuje na biološki neaktivne komponente kao što su 2,3-diketo-L-gulonska kiselina (2,3-diketo-L-gulonic acid), oksalna kiselina (oxalic acid), L-treonska kiselina (L-threonic acid), L-ksilonska kiselina (L-xilonic acid) i L-liksonska kiselina (L-Lyxonic acid) [287]. Apliciranje vitamina C na polju kozmetike, dermatologije i farmaceutike je iz tih razloga limitirano uprkos njegovoj veoma korisnoj funkciji [288].

oxidation process



Slika 1.8-2 Oksidacija vitamina C

Kako bi se prevazišla hemijska nestabilnost vitamina C mnoga istraživanja su posvećena upravo inkapsulaciji ili imobilizaciji vitamina C [289-293]. Uglavnom su u istraživanjima korišćeni lipozomi, mikroemulzije ili tečni kristali [289-292]. U radu Chen i saradnika je opisano imobilisanje tj interkalacija vitamina C u neorganskim slojevima materijala baziranog na silicijumu i aluminijumu (MMT, montmorillonite). Sa porastom pH vrednosti materijala od 3 do 10 dolazi do penetracije molekula askorbinske kiseline u gornje slojeve materijala [293].

Potencijalno, inkapsulacijom askorbinske kiseline u polimernu matricu bi se značajno povećala njena efikasnost u organizmu. DLPLG-a nanosfere se mogu koristiti i za transdermalni prenos medikamenata u organizam [294] pored ostalog i antioksidanasa [295].

1.9 Poli(laktid-ko-glikolid) u kontrolisanoj dostavi vitamina

Poli(laktid-ko-glikolid) je kopolimerni materijal koji se može koristiti i u cilju dobijanja sistema za kontrolisanu dostavu vitamina. U organizmu veoma često postoji deficit vitamina koji su izuzetno značajni za njegovo pravilno metaboličko funkcionisanje. Dobijanje poli(DL-laktid-ko-glikolid) mikrosfera, rastvarač/uparavanje metodom, za kontrolisanu dostavu vitamin A palmitata (RAP) je opisano u radu Martinez-Sancho i saradnika. U mikrosfere su inkorporirane različite količine vitamina A (10-80mg) a zatim je praćeno njihovo otpuštanje u in vitro uslovima. Otpuštanje vitamina A iz mikrosfera je trajalo 49 dana. Mikrosfere su bile sa srednjim veličinama od 21.79 μ m [296]. Vitamin K₅ ima ulogu koagulanta u jetri. PLGA je modifikovan sa 2-imino-2-metoksietil-tiogalaktozidima (Gal-PLGA) u cilju kontrolisane dostave vitamina K₅ *in vivo*. Vitamin K₅ konjugovan sa Gal-PLGA-om je pokazivao koagulacionu aktivnost sve vreme merenja nakon intravenozne aplikacije dok je slobodni K₅ pokazivao aktivnost do 4 sata nakon administracije [297]. U radu Feng i saradnika je opisano korišćenje vitamina E kao surfaktanta čestica PLGA-a ili matrica materijala kada je hibridizovan sa polimerom u cilju kontrolisane dostave paklitaksela (antikancer agensa) pri čemu je zaključeno da vitamin E ima niz prednosti prilikom dobijanja PLGA čestica koje se manifestuju u visokoj efikasnosti inkapsulacije (\approx 100%) i kontrolisanoj kinetici otpuštanja leka [298, 299]. Veličina čestica poli(laktid-ko-glikolida) emulzificiranih vitaminom E je iznosila od 300 do 800nm [300]. Vitamin B12 je u vodi rastvoran vitamin koji se takođe može inkorporirati u matrici PLGA. Fine čestice vitamina B12 (0.2g) prosečnih dimenzija oko 3 μ m i kopolimera PLGA molekulske mase 10.000 a sa odnosom laktida i glikolida 50/50 (1.8 g) su rastvorene u metilen hloridu a zatim je rađena sonifikacija kako bi se dobila homogena disperzija koja je kasnije upotrebljena kao uljna faza. Kao stabilizator čestica je korišćen polivinil alkohol [301]. Folna kiselina (vitamin B₉) je izetno važan vitamin i često se nedovoljno unosi hranom. Čestice PLGA se mogu koristiti i kao sistem za kontrolisanu dostavu folne kiseline [302]. Dobijanje čestica poli(laktid-ko-glikolida) za kontrolisanu dostavu aspirina i folne kiseline emulzionom metodom (o/w ili w/o/w) su opisane u radu Kanthamneni i saradnika. Različite koncentracije folne kiseline i aspirina (20, 40 ili 60%) su dodavane u polimerni rastvor. Efikasnost inkapsulacije aspirina i folne kiseline je iznosila od 83 do 91% wt [303]. Folat se dosta istražuje kao ligand za ciljano navođenje čestica sa antikacer agensima kako bi se izbeglo njihovo nespecifično dejstvo na normalne

ćelije ali i povećao unos agensa u ciljane ćelije pa je shodno tome u mnogim istraživanjima opisana konjugacija čestica PLGA-a sa folnom kiselinom [304].

2 Cilj istraživanja

Askorbinska kiselina (vitamin C) je veoma značajan i organizmu neophodan vitamin. Problem je u tome što je askorbinska kiselina izuzetno hemijski nestabilna pod uticajem vlage, toplote, svetlosti itd. pri čemu se razlaže u biološki neaktivne oblike kakve su 2,3-di-keto-L-gulonska kiselina, treonska kiselina, oksalna itd., kao i u tome što se askorbinska kiselina uneta u organizam velikim delom i veoma brzo iz njega izluči.

Biodegradabilne polimerne mikro- i nanosfere kopolimera poli(D,L-laktid-ko-glikolid) (DLPLG) se koriste za izradu sistema za ciljanu i kontrolisanu dostavu medikamenata u organizmu. Od morfoloških osobina čestica, odnosno, od veličine, oblika, uniformnosti zavise i interakcije čestica sa ćelijom odnosno dinamika otpuštanja medikamenta (brzina i količina). Veličina čestica je posebno važna jer manje čestice imaju veću specifičnu površinu tj. veća im je površina kontakta, takođe, kod manjih čestica degradacija je sporija pa je samim tim i sporije otpuštanje medikamenta. U zavisnosti od toga i šta je željeni cilj odnosno da li se prenos medikamenta unutar organizma vrši transdermalno, oralno, intravenski zavisi i veličina i oblik potrebnih čestica.

Cilj istraživanja su činili:

- Dobijanje praha poli(DL-laktid-ko-glikolida) (DLPLG) od komercijalnih granula na jednostavan način tj. fizičko-hemijskom precipitacionom rastvarač/nerastvarač metodom i tehnikom centrifugalnog procesiranja (sovent/non-solvent method) sa česticama submikronskih veličina
- Inkapsulacija različitih koncentracija askorbinske kiseline (vitamin C) u čestice poli(DL-laktid-ko-glikolida)
- Ispitivanje strukturnih i morfoloških osobina čestica poli(DL-laktid-ko-glikolida) bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline
- Ispitivanje uticaja različitih stabilizatora tokom sinteze na morfološke osobine čestica DLPLG-a bez i sa različitim koncentracijama inkapsulirane askorbinske kiseline
- Ispitivanje procesa degradacije čestica DLPLG-a bez i sa različitim sadržajem inkapsulirane askorbinske kiseline kao i procesa otpuštanja askorbinske kiseline iz čestica DLPLG-a u fiziološkom rastvoru kao degradacionom medijumu
- Ispitivanje procesa degradacije čestica DLPLG-a bez i sa različitim sadržajem inkapsulirane askorbinske kiseline kao i ispitivanje procesa otpuštanja askorbinske

kiseline iz čestica DLPLG-a u PBS-u (fosfatnom pufer rastvoru) kao degradacionom medijumu uz prisustvo azida

- Ispitivanje morfoloških promena čestica DLPLG-a bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline tokom degradacionog procesa u fiziološkom rastvoru kao degradacionom medijumu
- Ispitivanje morfoloških promena čestica DLPLG-a bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline tokom degradacionog procesa u PBS-u kao degradacionom medijumu

Ispitivanje strukturnih i morfoloških osobina praha DLPLG-a bez i sa različitim sadržajem inkapsulirane askorbinske kiseline je rađeno metodama infracrvene spektroskopije (IR), diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC), ultravioletne spektrofotometrije (UV-VIS), skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) i stereološke analize.

3 Eksperimentalni deo

3.1 Eksperimentalne metode

3.1.1 Metoda centrifugalnog procesiranja

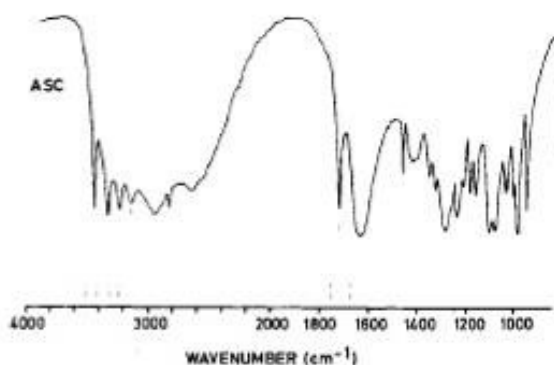
Centrifugalno procesiranje je metoda kojom se vrši razdvajanje i analiza ćelija, organela i bioloških makromolekula. Čestica koja se kreće u krugu poluprečnika r ugaonom brzinom ω pod uticajem je centrifugalnog polja $\omega^2 r$. Centrifugalna sila F_c , koja deluje na ovu česticu jednaka je umnošku 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 jednak je $(1 - k\rho)$ 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 čestice zavisi od nekoliko faktora: a) mase čestice- teže čestice se uvek talože brže nego one lakše, istog oblika i gustine b) oblika čestice- koeficijent trenja kompaktne čestice je manji nego onaj u slučaju izdužene čestice iste mase. Izdužene čestice se talože mnogo sporije od onih sferičnih iste mase. c) gustine čestice- gušće čestice se kreću mnogo brže od onih manje gustine d) gustine rastvora u kojoj se čestica nalazi- čestica tone kada je $k\rho < 1$, pluta kada je $k\rho > 1$ i ne pomera se kada je $k\rho = 1$.

Analiziranje dobijenih uzoraka je radjeno metodama infracrvene spektroskopije (IR), diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC), ultravioletne spektrofotometrije (UV-VIS), skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM), a radjena su i detaljna stereološka ispitivanja.

3.1.2 Infracrvena spektroskopija

Infracrveni (IR) spektri sadrže informacije o vibracijama atoma u molekulu [305,306]. Svaki molekul poseduje sebi svojstven spektar u IR oblasti pa se primenom IR spektrometrije može izvršiti identifikacija jedinjenja (deo od 4000 do 600 cm^{-1} naziva se oblast otisaka prstiju za hemijska jedinjenja) [305]. Može se izvršiti i kvantitativna i kvalitativna analiza. Vibracioni spektri sadrže podatke o strukturi molekula (kristala), globalnoj geometriji i detalje o načinu vezivanja atoma u molekulu. Na osnovu vibracionih spektara mogu se dobiti podaci o mehanizmu odvijanja procesa, faznim transformacijama, dinamici protona i protonskih vrsta u različitim materijalima, termodinamičkim veličinama

itd [305]. Analiziranje uzoraka rađeno je infracrvenom spektroskopijom pomoću uređaja Perkin-Elmer 983G Infracrvenog Spektrofotometra, korišćenjem KBr tehnike (fino prašeni KBr i fino prašeni uzorak), u intervalu od 250-4000 cm^{-1} . Na slici 3.1-1 je prikazan IR spektar askorbinske kiseline preuzet iz literature [307].



Slika 3.1-1 IR spektar askorbinske kiseline [307]

3.1.3 UV-VIS spektrofotometrija

UV-VIS spektrofotometrija je fizičko-hemijska metoda na osnovu koje se može uraditi i kvalitativna i kvantitativna analiza uzoraka, odnosno, može se uraditi identifikacija jedinjenja (aktivnog u UV-VIS oblasti (200-400nm, 400-800nm)) kao i odrediti njegova koncentracija. UV-VIS spektrofotometrija se zasniva na prelazima između elektronskih nivoa i najčešće se koristi za određivanje koncentracije makromolekula u rastvorima kao i za određivanje optičkih svojstava materijala. Hromofore su dobro definisane atomske strukture u velikim molekulima koje zbog svoje specifične apsorpcije daju boju molekulima.

Analiziranje uzoraka rađeno je ultravioletnom spektrofotometrijom korišćenjem Perkin-Elmer Lambda 35 UV-Vis spektrofotometra u intervalu od 200 do 400nm.

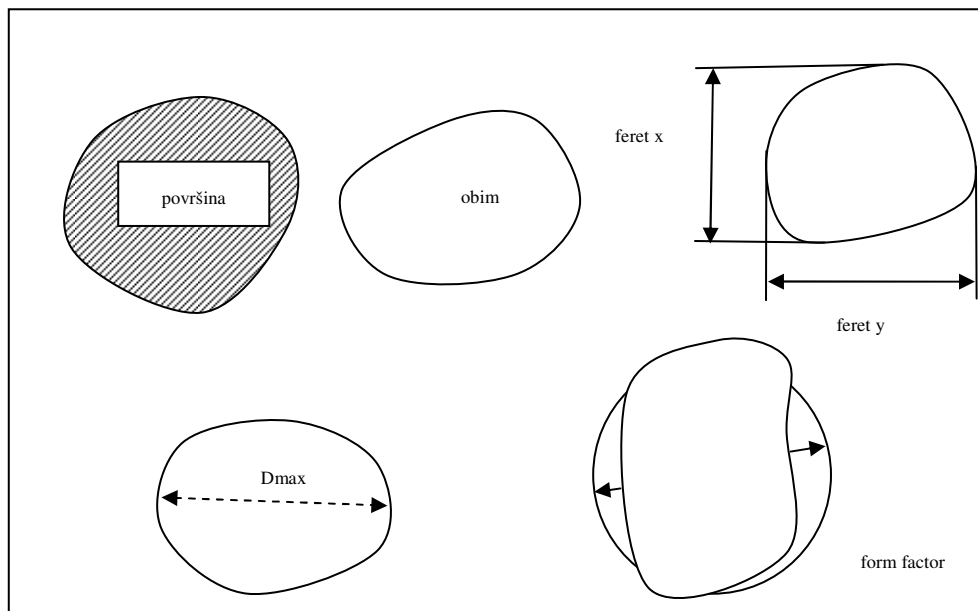
3.1.4 Skenirajuća elektronska mikroskopija

Elektronski mikroskop služi za dobijanje uvećane slike objekta difrakcijom visoko energetske elektrona, a istovremeno to je metoda ispitivanja topografije površina čvrstih, neisparljivih materijala, direktnim posmatranjem ili proučavanjem fotografski snimljenih objekata [305,306]. Uzorci za SEM moraju biti neisparljivi, da bi se unutar mikroskopa mogao održati visoki vakum, zatim obavezno je da uzorci budu elektroprovodni.

Neprovodni uzorci sa upadnim snopom elektrona statički elektrišu, zbog čega elektronski snop "beži" sa mesta koje se posmatra, što onemogućuje posmatranje [305]. Za karakterizaciju uzoraka skenirajućom elektronskom mikroskopijom korišćen je elektronski mikroskop marke JEOL-JSM-646OLV Japan, sa energijom elektrona od 10 do 50 KeV-a. Uzorci su najpre pripremljeni napanjanjem zlatom pomoću uređaja za napanjanje 3ΔL-TEC SCD005, strujom od 30mA sa udaljenosti od 50mm tokom 180s.

3.1.5 Stereološka analiza

Veličine čestica i njihova morfologija su ispitivane metodom merenja površina korišćenjem poluautomatskog analizatora slike (semi-automatic image analyzer, Leica Q500MC sa Qwin softverom) dobijene skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM). Merena je površina projekcije preseka čestice po maksimalnom prečniku. Sa SEM fotografija su analizirane čestice i to od 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 (projekcija čestice na x osu), feret y (projekcija čestice na y osu)) i oblik čestica (perimetar form factor- f_L) (slika 3.1-1). Za sve merene parametre određene su minimalna, maksimalna i srednja vrednost. [308,309]



Slika 3.1-2 Grafički prikaz pojedinih stereoloških parametara: a) površina ekvatorijalnog preseka, b) obim, c) feret x i feret y, d) maksimalni dijametar čestice, e) faktor oblika

3.1.6 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 [305]. Metoda DSC je odgovarajuća za kvantitativna određivanja promene entalpije [309, 310]. 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 [305]. Zaostajanje temperature uzorka u odnosu na etalon (zbog endoternog procesa) pojačava fluks toplote ka uzorku, a prednjačenje (zbog egzoternog procesa) ga smanjuje [305,306]. Temperaturska razlika između uzorka i etalona prikazuje se 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 odgovarajućoj strani od bazne linije. Površina pika DSC krive direktno je srazmerna odgovarajućoj promeni entalpije. DSC merenja izvršena su na Perkin Elmer Model DSC-2 diferencijalnom skanirajućem kalorimetru opremljenom 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 K. Opseg temperature u kome je vršeno merenje je iznosio od 320K do 540K. Brzina grejanja je iznosila 20 K/min

3.2 Eksperimentalni rad

3.2.1 Dobijanje nanosfera kopolimera poli(DL-laktid-ko-glikolida)

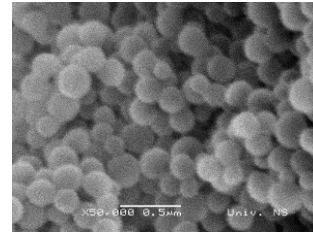
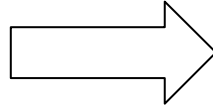
Sferne čestice praha kopolimera poli(DL-laktid-ko-glikolida-a) (DLPLG-a) su dobijene fizičko-hemijskom metodom rastvarač/nerastvarač (solvent/nonsolvent method) uz korišćenje tehnike centrifugalnog procesiranja (slika 3.2-1) [45,163]. Komercijalne granule DLPLG-a (0.05g) (DLPLG, laktid:glikolid 50:50, Durect, Lactel, Adsorbable Polymers International, molska masa 40000-50000g/mol.) su najpre rastvorene u acetonu (1.5ml). Rastvaranje je trajalo dva sata. Nakon rastvaranja je radjena precipitacija alkoholom metanolom (2 ml). Polimerna suspenzija je nakon toga polako ukapavana u vodeni rastvor stabilizatora (polivinil alkohola (PVP) ili polivinil pirolidona (PVP)) uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici. Korišćenjem stabilizatora stvara se "zeta" potencijal čime se sprečava aglomeracija i uz mešanje na magnetnoj mešalici (1200rpm) pod uticajem ugaone brzine i strujne frekvence formiraju se čestice. Nakon toga polimerna suspenzija je centrifugirana (CENTRIKA, Ependorf) pri čemu se oblik i dimenzije čestica finalizuju pod uticajem centrifugalne sile. Posle centrifugiranja rastvori su dekantovani a uzorci sušeni na vazduhu i sobnoj temperaturi. Na sferičnost čestica i njihovu veličinu veliki uticaj imaju molekulska masa polimera, odnos rastvarač/nerastvarač, vreme starenja sa nerastvaračem, vrsta upotrebljenog stabilizatora, brzina mešanja, vreme i brzina centrifugiranja [163,311]. Sferne čestice praha DLPLG-a najmanjih dimenzija a najveće uniformnosti su dobijene u eksperimentu sa najkraćim vremenom starenja sa nerastvaračem i najvećom brzinom i vremenom centrifugalnog procesiranja [45] (tabela 3.2.1) i ovi uslovi su korišćeni u daljim eksperimentima.

Tabela 3.2-1 Eksperimentalni uslovi prilikom dobijanja praha DLPLG-a [45]

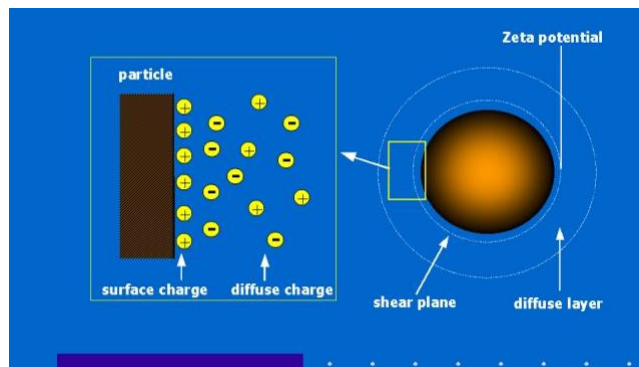
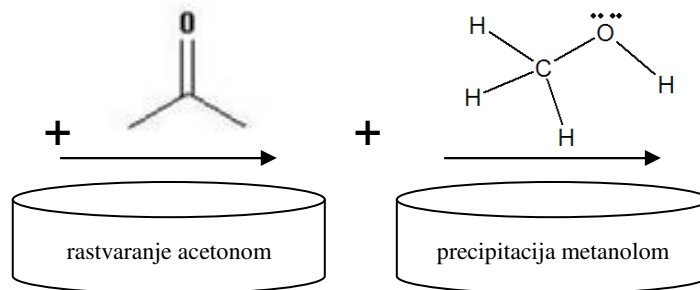
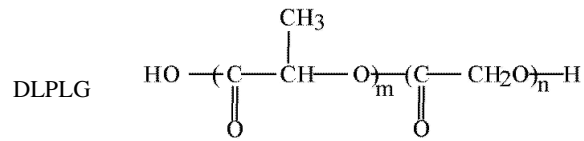
prah DLPLG (serija)	Vreme starenja sa nerastvaračem (min)	Vreme centrifugiranja (min)	Brzina centrifugiranja (rpm)
1	10	15	1500
2	30	30	3000
3	90	60	4000
4	5	60	4000
5	5	120	4000



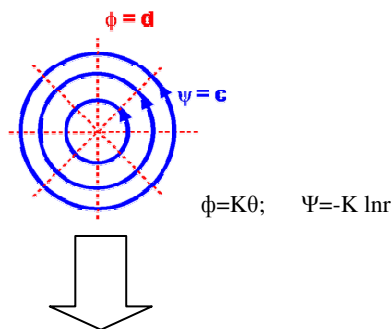
komercijalne granule DLPLG-a



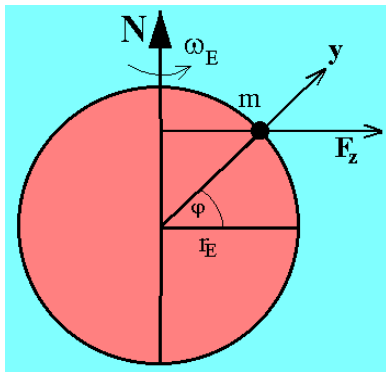
SEM slika nanopraha DLPLG-a



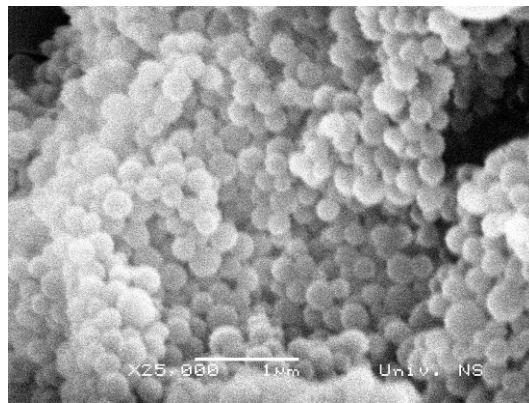
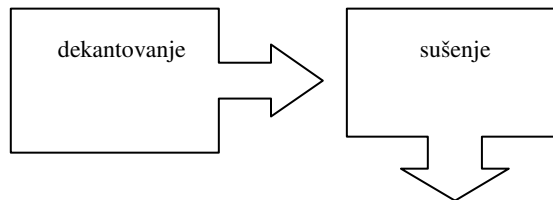
stabilizacija
čestica dodatkom
stabilizatora
(PVA, PVP) koji
stvara zeta
potencijal



uz
konstantno
mešanje na
1200rpm



izdvajanje sfernih čestica DLPLG-a
pod uticajem centrifugalne sile



SEM fotografija čestica praha DLPLG-a
dobijenih u eksperimentu

Slika 3.2-1 Shematski prikaz dobijanja nanočestica poli(DL-laktid-ko-glikolida) fizičko-hemijskom metodom rastvarač/nerastvarač uz korišćenje tehnike centrifugalnog procesiranja

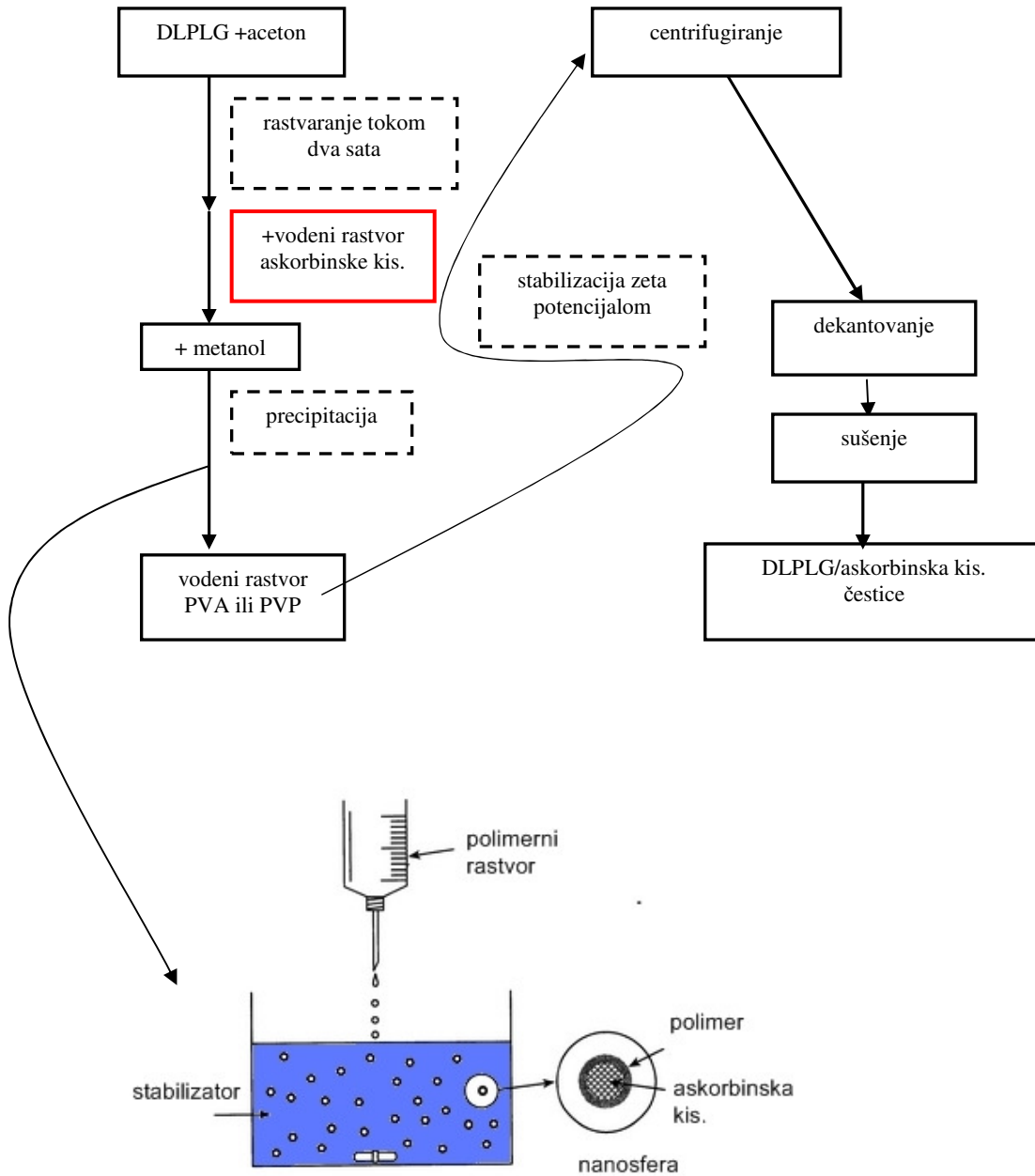
3.2.2 Ispitivanje uticaja različitih stabilizatora

U eksperimentima su kao stabilizatori čestica korišćeni polivinil alkohol (PVA, Merck Alkaloid) ili polivinil piroolidon (PVP, Merck k-25). Polimerna suspenzija (dobijena na način opisan u tekstu 3.2.1) je vrlo lagano ukapavana u (0.02%- 0.05%) rastvor PVA ili PVP-a uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici (1200rpm). PVA (ili PVP) se koristi kao stabilizator koji stvara negativno naelektrisanje čestica DLPLG-a tj. stvara određeni zeta potencijal [312]. PVA stvaranjem određenog zeta potencijala dovodi do smanjenja stepena aglomeracije jer se istoimeno naelektrisane čestice međusobno ne privlače.

Koncentracija PVA, odnosno PVP-a, je optimizovana kako bi se dobile najmanje dimenzije čestica za ovu metodu kao i da bi njihova aglomeracija bila svedena na minimum [312]. Iz literature je poznato da problemi koji se mogu javiti prilikom upotrebe stabilizatora čestica jeste njegovo teško uklanjanje iz sistema [313]. Zaostali stabilizator često modifikuje površinske karakteristike čestice na takav način da to dovodi do promena u brzini degradacije, distribucije u organizmu, otpuštanju medikamenta i biokompatibilnosti. Iz tog razloga je u eksperimentu korišćena koncentracija stabilizatora od samo 0.02 do 0.05%. U ovoj koncentraciji su i PVA i PVP bezbedni za ljudski upotrebu (The Physical and Theoretical Chemistry Laboratory Oxford University-Chemical and Other Safety Information, USA Food and Drug Administration)

3.2.3 Inkapsulacija askorbinske kiseline u polimernu matricu poli(DL-laktid-ko-glikolida)

U eksperimentu je korišćena askorbinska kiselina molske mase 176,13g/mol (MicrovitTM, Adisseo). Inkapsulacija askorbinske kiseline u polimernu matricu je rađena homogenizacijom vodene i organske faze (slika 3.2-2) [314,315]. Vodeni rastvor sa različitim koncentracijama askorbinske kiseline je dodavan u rastvor polimera DLPLG-a u acetonu. 50mg komercijalnih granula DLPLG-a je rastvoreno u 1.5ml acetona. Rastvaranje je trajalo dva sata. Nakon toga, vodeni rastvor askorbinske kiseline je dodavan u rastvor polimera uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici na 200rpm-a tokom 30 minuta. Koncentracija askorbinske kiseline je varirana kako bi se dobile čestice sa različitim sadržajem DLPLG-a i askorbinske kiseline i to: DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% wt, DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% wt, DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% wt i DLPLG/askorbinska kiselina 30/70% wt. U skladu sa tim masa askorbinske kiseline u 2ml vode je iznosila 8.80mg, 21.42mg i 50.00mg i 116.7mg. Nakon toga je rađena precipitacija metanolom (2ml). Ovako dobijene suspenzije su vrlo polako ukapavane u 20 ml vodenog rastvora stabilizatora (polivinil alkohola (PVA) ili polivinil pirolidona (PVP) (0.02%-0.05% w/w)) uz konstantno mešanje na 1200 rpm. Suspenzije su zatim centrifugirane (4000rpm tokom 120min) i dekantovane. Supernatant je skladišten za analizu UV-VIS spektrofotometrijskom metodom kako bi se izračunala efikasnost inkapsulacije askorbinske kiseline unutar polimernih čestica. Precipitat DLPLG/askorbinska kiselina dobijen u eksperimentu je sušen na sobnoj temperaturi.



Slika 3.2-2 Shematski prikaz dobijanja čestica DLPLG/askorbinska kiselina

3.2.4 Izračunavanje prinosa inkapsulacije

Precipitati poli(DL-laktid-ko-glikolida) bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline, dobijeni u eksperimentu, su sušeni na sobnoj temperaturi a zatim mereni kako bi se izračunao prinos čestica u eksperimentu. Prinos je izražen u procentima i izračunat je na osnovu jednačine:

$$\text{Prinos} = \left[\frac{M_{\text{pr.}}}{M_{\text{pol.}} + M_{\text{a.k.}}} \right] \times 100$$

[316]

$M_{\text{pr.}}$ -masa dobijenog precipitata DLPLG/askorbinska kiselina

$M_{\text{pol.}}$ -polazna masa polimera

$M_{\text{a.k.}}$ -polazna masa askorbinske kiseline

Prinos je računat za čestice DLPLG-a sa i bez askorbinske kiseline dobijene u eksperimentu u kome je kao stabilizator čestica korišćen PVA kao i u eksperimentu u kome je kao stabilizator čestica korišćen PVP [317].

3.2.5 Izračunavanje mase inkapsulirane askorbinske kiseline i efikasnost inkapsulacije

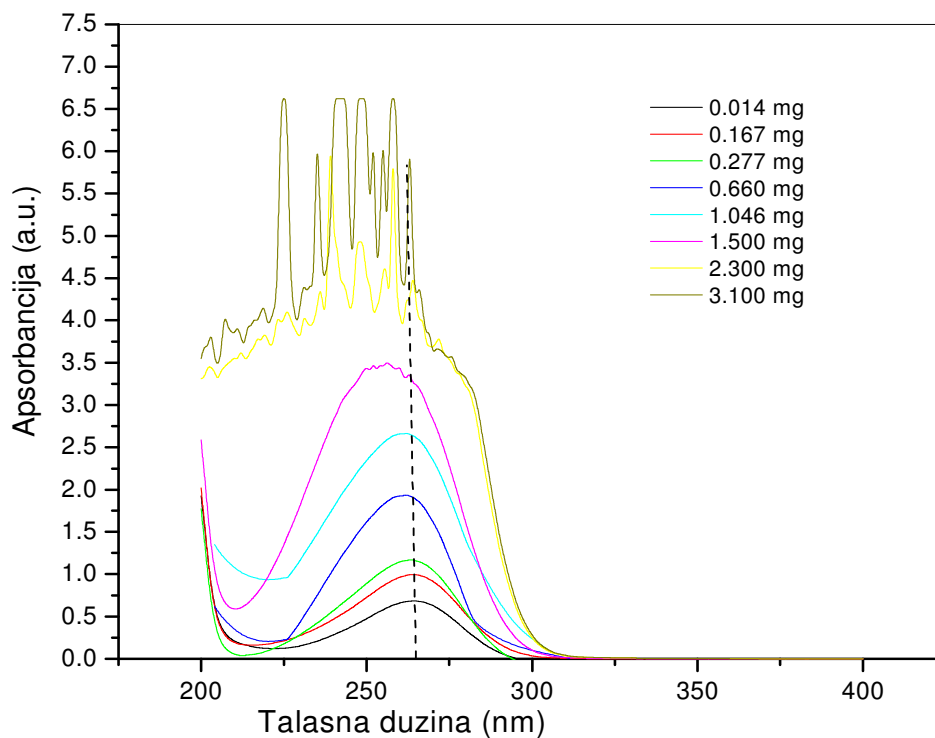
Za izračunavanje mase inkapsulirane askorbinske kiseline u polimernoj matrici DLPLG-a (loading amount) i efikasnosti inkapsulacije (loading efficiency) korišćena je indirektna metoda opisana od strane Liu i saradnika [318]. Oba pristupa, direktni (rastvaranje dobijenih nanočestica i merenje količine medikamenta na osnovu apsorpcije) i indirektni (kvantificiranjem ne-inkapsuliranog medikamenta u supernatantu dobijenom u procesu sinteze a zatim izračunavanjem inkapsuliranog medikamenta), se koriste od strane različitih autora za izračunavanje efikasnosti inkapsulacije [319]. Vrednosti dobijene indirektnom metodom odgovaraju vrednostima dobijenim direktnom metodom [318].

Količina inkapsulirane askorbinske kiseline tokom procesa sinteze nanočestica DLPLG/askorbinska kiselina je izračunata na sledeći način [317]. Askorbinska kiselina apsorbuje svetlost u ultravioletnoj oblasti na karakterističnoj talasnoj dužini 264nm. Na osnovu merenja apsorpcije na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije, $\lambda_{\text{max}}=264\text{nm}$,

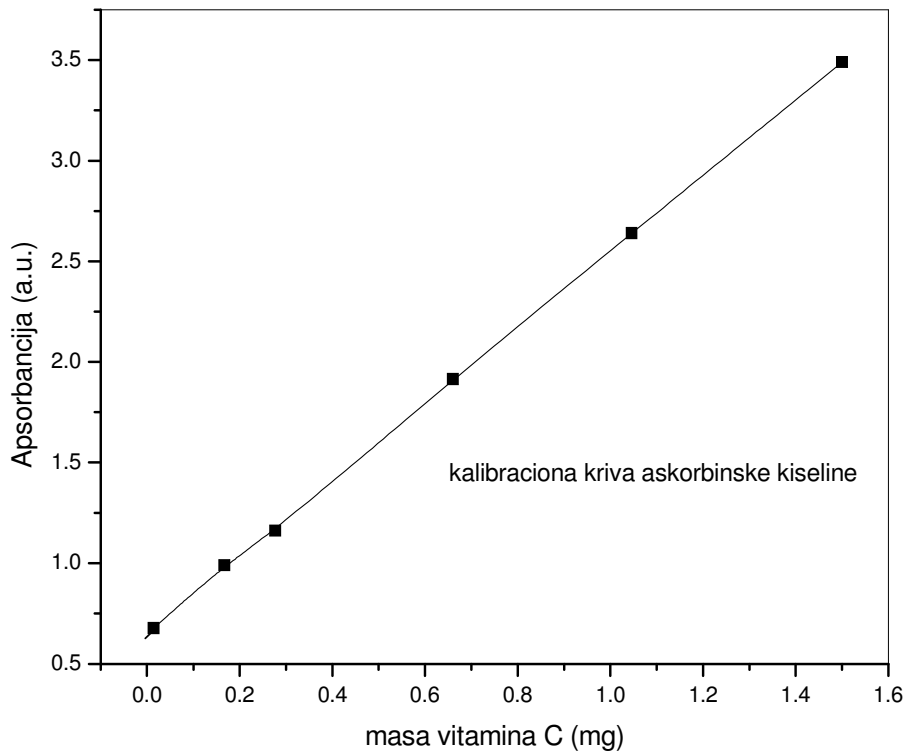
vodenog rastvora sa poznatim koncentracijama askorbinske kiseline (slika 3.2-3), je napravljena kalibraciona kriva (slika 3.2-4). Linearna zavisnost između apsorbancije na 264 nm i koncentracije je data Berovim zakonom: $A=abc$ (gde je a apsorptivnost ($\text{g}^{-1}\text{dm}^{-3}\text{cm}^{-1}$), b debljina sloja (cm), i c je koncentracija uzorka, u ovom slučaju koncentracija askorbinske kiseline (gdm^{-3}). Supernatant dobijen tokom procesa sinteze je analiziran UV spektrofotometrijski i koncentracija askorbinske kiseline u supernatantu je određivana primenom kalibracione krive. Koncentracija neinkapsulirane askorbinske kiseline je izračunata na osnovu apsorbancije supernatanta i celokupne zapremine supernatanta. Poznavajući inicijalnu količinu askorbinske kiseline upotrebljenu u sintezi čestica DLPLG/askorbinska kiselina ($M_{\text{uk.}}$) i koncentraciju, odnosno masu neinkapsulirane askorbinske kiseline ($M_{\text{neink.}}$) izračunata je masa inkapsulirane askorbinske kiseline ($M_{\text{inkap.}}$) a zatim je izračunata i efikasnost inkapsulacije. Masa inkapsulirane askorbinske kiseline i efikasnost inkapsulacije su izračunate na osnovu jednačina 1 i 2, respektivno :

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

$$(2) \quad \text{Efikasnost inkapsulacije (\%)} = [M_{\text{inkap.}} / M_{\text{uk.}}] \times 100 \quad [318]$$



Slika 3.2-3 UV spektri vodenog rastvora askorbinske kiseline (vitamina C)



Slika 3.2-4 Kalibraciona kriva askorbinske kiseline

3.2.6 Eksperiment praćenja degradacije nanosfera poli(DL-laktid-ko-glikolida) bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline u fiziološkom rastvoru kao degradacionom medijumu

Vreme potpune resorpcije kopolimera poli(DL-laktid-ko-glikolida-a) u organizmu je od 4 do 8 nedelja. Askorbinska kiselina uneta u organizam se velikim delom iz organizma izluči. Inkapsulirana askorbinska kiselina unutar polimerne matrice bi, potencijalno, trebalo da ima znatno veću efikasnost. Poli(DL-laktid-ko-glikolid) degradira u organizmu hidrolizom i postupno, tokom određenog vremenskog perioda otpušta askorbinsku kiselinu tako da se u organizmu postiže ravnomerna koncentracija vitamina C tokom dužeg vremenskog perioda. Čestice poli(DL-laktid-ko-glikolida) bez i sa različitim koncentracijama inkapsulirane askorbinske kiseline (DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%, 70/30% i 50/50%) su tokom dva meseca (8 nedelja) suspendovane u fiziološkom rastvoru (0.9% NaCl) na temperaturi od $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Vaciotem P-Selecta) [317].

Joni Na⁺ i Cl⁻ su joni koji dominiraju u ekstracelularnoj tečnosti. Ukupni volumen ekstracelularne tečnosti stoji u direktnoj korelaciji sa ukupnom količinom Na u organizmu. Serumska koncentracija Na i osmolaritet seruma su merilo za balans vode. Osmotski pritisak zavisi od broja molekula ili jona rastvorenih u tečnosti. Kod telesnih tečnosti (ekstra- ili intracelularnih) osmotski pritisak se kreće između 282-303mOsm/L. Približno 80% osmolarnosti plazme i međućelijske tečnosti potiče od jona Na⁺ i Cl⁻. Obzirom da fiziološki rastvor sadrži 154mM Na⁺ i 154mM Cl⁻, idealna osmolarnost ovog rastvora iznosila bi 308mOsm/L, što je praktično jednako osmolarnosti plazme ili međućelijske tečnosti tj. ovakav rastvor je izotoničan.

Uzorci, mase 2.5mg, su suspendovani u fiziološkom rastvoru. Tokom perioda degradacije (dva meseca) rastvor iznad taloga je odvajan u proseku svakih nedelju dana i analiziran UV spektrofotometrijski. Analiziranje uzoraka je rađeno na Perkin-Elmer Lambda 35 UV-VIS spektrofotometru u oblasti od 200nm do 400nm. Kao referentni rastvor je korišćen fiziološki rastvor. Tokom eksperimenta su praćene i promene vrednosti pH rastvora a deo taloga je odvajan i radi ispitivanja procesa degradacije metodom skenirajuće elektronske mikroskopije nakon čega je rađena i detaljna stereološka analiza.

3.2.7 Eksperiment praćenja degradacije nanosfera poli(DL-laktid-ko-glikolida) bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline u PBS-u kao degradacionom medijumu uz prisustvo azida

Eksperiment praćenja degradacije nanosfera poli (DL-laktid-ko-glikolida) bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline je rađen i u fosfatnom pufer rastvoru (PBS, phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich) kao degradacionom medijumu. Fosfatni pufer rastvor (PBS) je rastvor često korišćen u biohemiji iz razloga jer je izotoničan i netoksičan za ćelije. Sadrži natrijum hlorid, natrijum fosfat i kalijum fosfat.

U rastvor PBS-a je dodato po 110 µl azida (Sigma-Aldrich Fluka (Biochemica), sodium azide, 0.1M solution natriumazid NaN₃) radi sprečavanja bakterijskog delovanja. Azidi se često koriste u biohemiji i biomedicini jer imaju ulogu konzervansa [320]. Eksperiment je rađen u vodenom kupatilu (VIMS elektrik, SCG) na temperaturi 36.8C±0.5°C tokom 60 dana.

Eksperiment degradacije kopolimera DLPLG-a bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline u PBS-u je vremenski trajao duže nego što je to bilo u slučaju

eksperimenta degradacije u fiziološkom rastvoru. Ovo je ciljano urađeno i radi potvrde materijalnog bilansa prethodnog eksperimenta. Uzorci su snimani periodično u približno istim vremenskim intervalima kako bi rezultati mogli biti upoređivani sa rezultatima prethodnog eksperimenta. Snimanje je radjeno na Perkin-Elmer Lambda 35 UV-VIS spektrofotometru u oblasti 200-400nm i tokom procesa degradacije je praćeno i oslobađanje vitamina C na osnovu povećanja koncentracije vitamina u rastvoru. Kao referentni rastvor je korišćen rastvor PBS-a sa 110 μ l azida. Tokom eksperimenta su praćene i promene vrednosti pH rastvora a deo uzoraka je odvajan i radi ispitivanja procesa degradacije metodom skenirajuće elektronske mikroskopije.

4 Rezultati

4.1 Prinos čestica DLPLG i DLPLG/askorbinska kiselina

Prinos čestica je računat za čestice dobijene u eksperimentu u kome su kao stabilizatori čestica korišćeni PVA i PVP. Rezultati određivanja prinosa za čestice sa različitim odnosom kopolimerne komponente tj. DLPLG-a i askorbinske kiseline su slični i veći od 50%. Takođe su i rezultati za prinos čestica dobijenih uz korišćenje PVA ili PVP-a kao stabilizatora slični i za sve uslove veći od 50%. Ipak, pokazano je da je prinos čestica u slučaju uzoraka DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%, DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% i DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% veći kada je kao stabilizator čestica korišćen PVP i to za $\approx 2\%$.

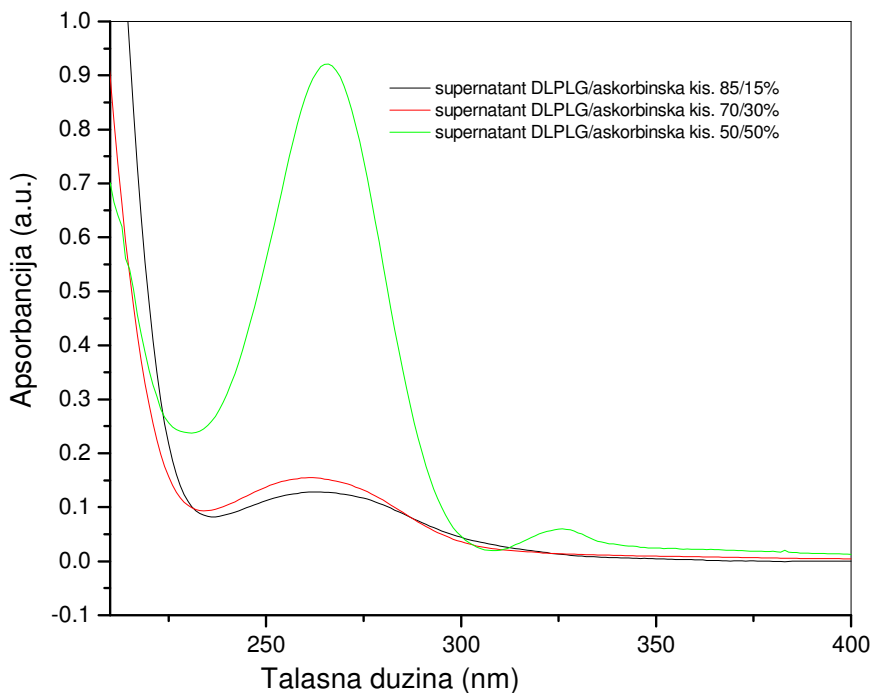
Tabela 4.1-1 Prinos čestica dobijenih u eksperimentu u kome je kao stabilizator čestica korišćen polivinil pirolidon (PVP) i polivinil alkohol (PVA)

DLPLG/askorbinska kiselina (%)	Prinos (%) (PVP)	Prinos (%) (PVA)
100/0	51.04	50.20
85/15	52.10	50.31
70/30	56.41	54.20
50/50	52.80	50.60
30/70	53.23	59.30

(vrednosti su date kao srednje vrednosti izračunate na osnovu podataka dobijenih iz nekoliko merenja tj. eksperimenata)

4.2 Efikasnost inkapsulacije i masa inkapsulirane askorbinske kiseline

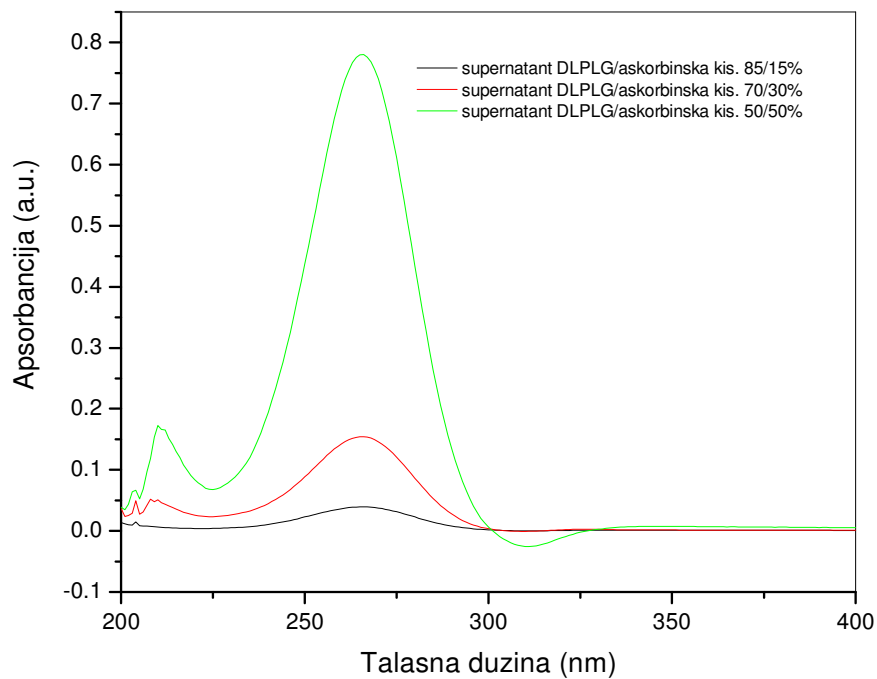
Na osnovu prethodno opisane procedure, supernatant dobijen u sintezi čestica DLPLG/askorbinska kiselina je analiziran UV spektrofotometrijski kako bi se odredila masa inkapsulirane askorbinske kiseline u česticama (slike 4.2-1 i 4.2-2). Rezultati su prikazani u tabeli 4.2.1 i u tabeli 4.2.2. Količina askorbinske kiseline u supernatantu je računata na osnovu apsorpcije za askorbinsku kiselinu na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije $\lambda=264\text{nm}$ i ukupne zapremine supernatanta (25.5ml). Uz pretpostavku da je sva askorbinska kiselina koja nije prisutna u supernatantu inkapsulirana u DLPLG česticama, efikasnost inkapsulacije je izračunata da je veća od 90% za sve odnose kopolimera DLPLG-a i askorbinske kiseline. Efikasnost inkapsulacije je veća od 90% u slučaju dobijanja čestica kada je kao stabilizator čestica korišćen PVA kao i u slučaju kada je korišćen PVP.



Slika 4.2-1 UV spektri askorbinske kiseline iz supernatanta (PVA kao stabilizator)

Tabela 4.2-1 Efikasnost inkapsulacije i masa inkapsulirane askorbinske kiseline u DLPLG/askorbinska kiselina česticama (PVA stabilizator čestica)

	apsorbancija supernatanta na $\lambda=264\text{nm}$	masa askorbinske kiseline u supernatantu (mg)	efikasnost inkapsulacije (%)	masa inkapsulirane askorbinske kiseline (mg)
DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%	0.1280	0.528	94.0	8.272
DLPLG/askorbinska kiselina 70/30%	0.2091	0.836	96.1	20.584
DLPLG/askorbinska kiselina 50/50%	0.9161	3.450	93.1	46.550



Slika 4.2-2 UV spektri askorbinske kiseline iz supernatanta (PVP kao stabilizator)

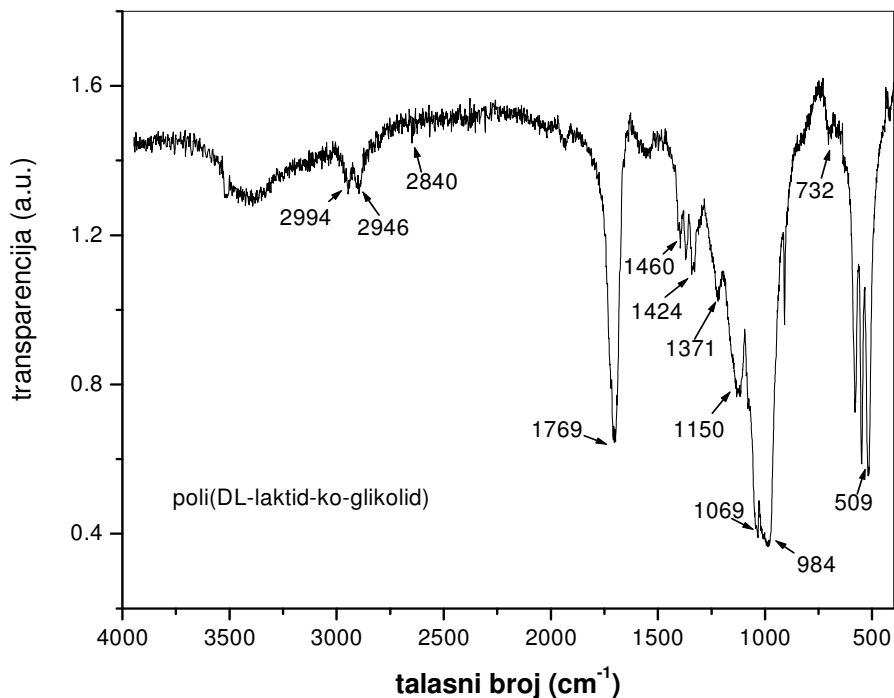
Tabela 4.2-2 Efikasnost inkapsulacije i masa inkapsulirane askorbinske kiseline u DLPLG/askorbinska kiselina česticama (PVP stabilizator čestica)

	apsorbancija supernatanta na $\lambda=264\text{nm}$	masa askorbinske kiseline u supernatantu (mg)	efikasnost inkapsulacije (%)	masa inkapsulirane askorbinske kiseline (mg)
DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%	0.0394	0.1581	98.2	8.641
DLPLG/askorbinska kiselina 70/30%	0.1534	0.6214	97.1	20.799
DLPLG/askorbinska kiselina 50/50%	0.7758	3.1000	93.8	46.900

4.3 Infracrvena spektroskopija

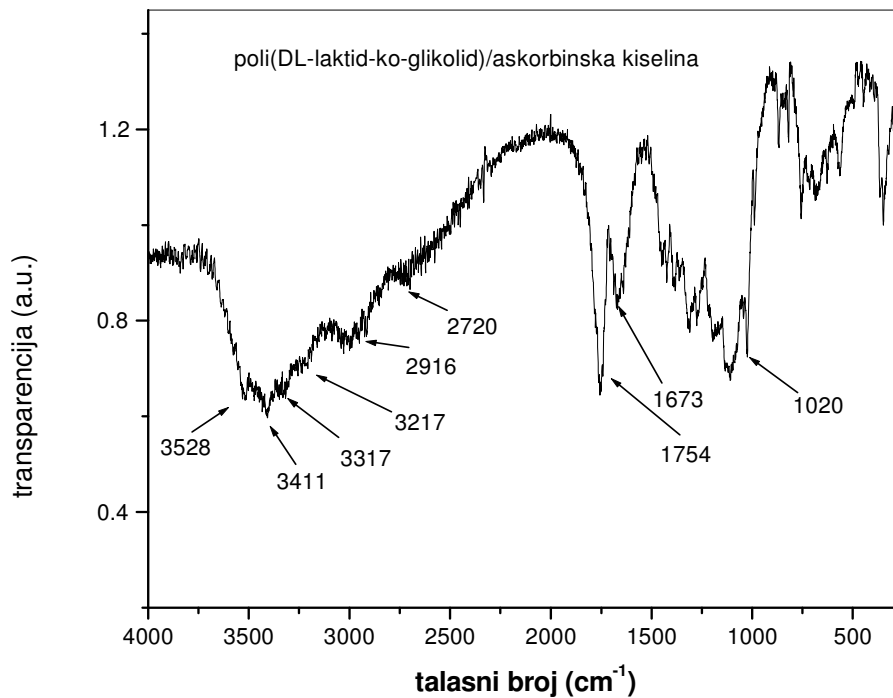
Kvalitativna analiza uzoraka poli(DL-laktid-ko-glikolida) sa i bez inkapsulirane askorbinske kiseline rađena je metodom infracrvene spektroskopije (IR). IR spektroskopijom analizirani su uzorci kopolimera DLPLG-a dobijenog u eksperimentu u kome je kao stabilizator čestica korišćen polivinil alkohol (PVA) kao i uzorci DLPLG-a dobijenog u eksperimentu u kome je kao stabilizator čestica korišćen polivinil pirolidon (PVP) [312].

IR spektar na slici 4.3-1. sadrži sve karakteristične grupe kopolimera poli(DL-laktid-ko-glikolida). Na IR spektru se mogu uočiti trake na talasnim brojevima 2994 cm^{-1} , 2946 cm^{-1} , 2840 cm^{-1} (C-H istežuće vibracije CH_3 i CH_2 grupe), 1769 cm^{-1} (istežuća vibracija C=O grupe), 1460 cm^{-1} , 1424 cm^{-1} (C-H deformacione vibracije CH_2 i CH_3 grupe), 1371 cm^{-1} (C-H simetrična deformaciona vibracija CH_3 grupe), 1150 cm^{-1} (C-O asimetrična istežuća vibracija (estarska)), 1069 cm^{-1} (C-O simetrična istežuća vibracija (estarska)), 984 cm^{-1} (C-O), 732 i 509 cm^{-1} (C-H) dok široka traka na $3100\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ odgovara OH grupi molekula vode [321,322].



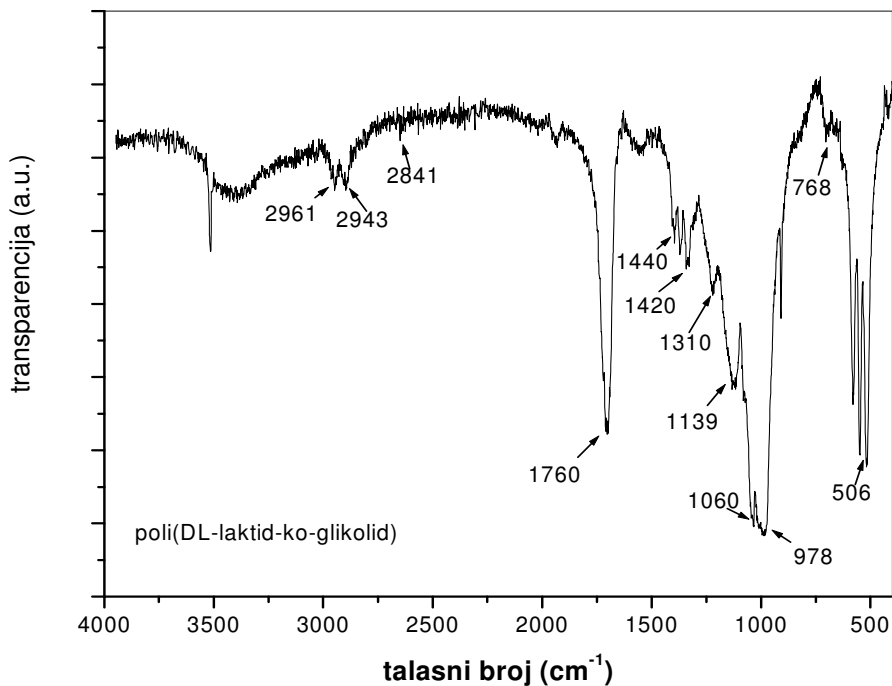
Slika 4.3-1 IR spektar nanosfera DLPLG-a dobijenih korišćenjem PVA-a kao stabilizatora čestica

Upoređivanjem IR spektra uzorka DLPLG/askorbinska kiselina (slika 4.3-2) [315] sa karakterističnim IR spektrom za askorbinsku kiselinu datom u literaturi [307,323] potvrđeno je da se dobijene nanočestice sastoje od poli(DL-laktid-ko-glikolida) i askorbinske kiseline. Pored karakterističnih grupa za DLPLG spektar sadrži i trake na 3528, 3411, 3317 3217 cm^{-1} koje potiču od četiri O-H vibracije askorbinske kiseline. Spektar takođe sadrži trake koje potiču od CH_2 ili CH grupe askorbinske kiseline na 2720 cm^{-1} . Spektar jasno pokazuje traku koja odgovara C-H vezi na 2916 cm^{-1} . Traka koja se nalazi na talasnom broju 1754 cm^{-1} odgovara C=O grupi, 1673 cm^{-1} C=C dok traka na 1020 cm^{-1} odgovara C-O grupi [307].



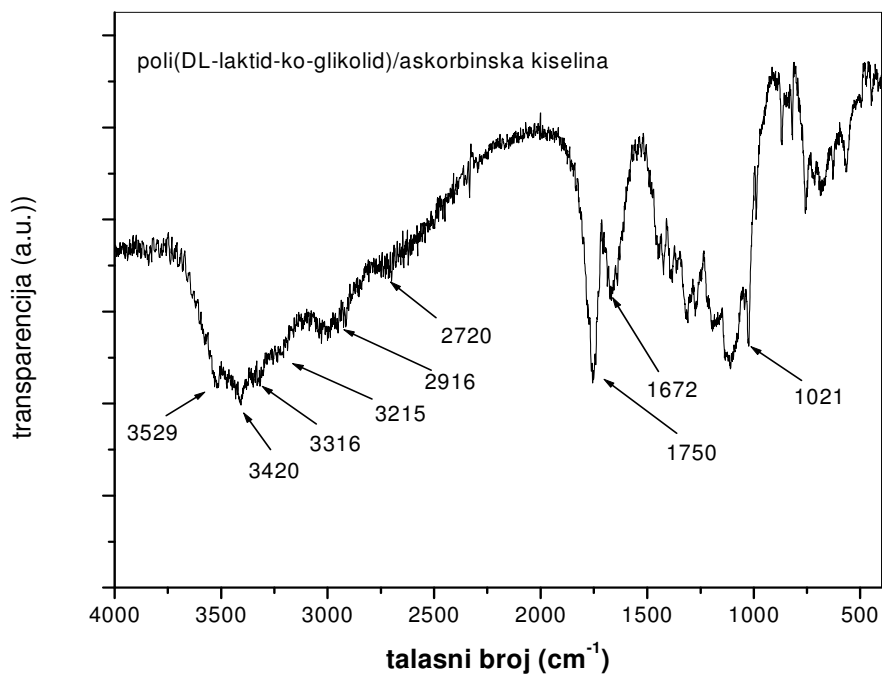
Slika 4.3-2 IR spektar nanosfera DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% wt (PVA kao stabilizator)

Uzorak poli(DL-laktid-ko-glikolida) dobijen u eksperimentu u kome je kao stabilizator čestica korišćen polivinil pirolidon (PVP) je, takođe, karakterisan metodom IR spektroskopije (slika 4.3-3). IR spektar sadrži grupe za poli(DL-laktid-ko-glikolid) na 2961, 2943, 2841 (C-H istežuće vibracije CH₃ i CH₂ grupe), 1760 (istežuća vibracija C=O grupe), 1440, 1420 (C-H deformacione vibracije CH₂ i CH₃ grupe), 1310 (C-H simetrična deformaciona vibracija CH₃ grupe), 1139 (C-O asimetrična istežuća vibracija (estarska)), 1060 (C-O simetrična istežuća vibracija (estarska)), 978 (C-O istežuća), 768, 506 (CH-veza) cm⁻¹. Spektar sadrži i široku traku na 3100-3600 cm⁻¹ OH grupe molekula vode [312].



Slika 4.3-3 IR spektar nanosfera DLPLG-a dobijenih korišćen PVP-a kao stabilizatora čestica

I kvalitativna analiza uzorka DLPLG/askorbinska kiselina dobijenog u eksperimentu gde je kao stabilizator čestica korišćen polivinil pirolidon je rađena IR spektroskopijom i takođe je potvrđeno da se čestice sastoje od kopolimera DLPLG-a i askorbinske kiseline (slika 4.3-4). Pored traka koje odgovaraju kopolimeru DLPLG spektar sadrži četiri trake O-H vibracija askorbinske kiseline na 3529, 3420, 3316, 3215 cm^{-1} , traku na 2720 cm^{-1} koja potiče od CH_2 ili CH grupe, na 2916 cm^{-1} od C-H grupe. Traka na talasnoj dužini od 1750 cm^{-1} pripada C=O grupi, 1672 cm^{-1} C=C dok traka na 1021 cm^{-1} pripada C-O grupi [315].

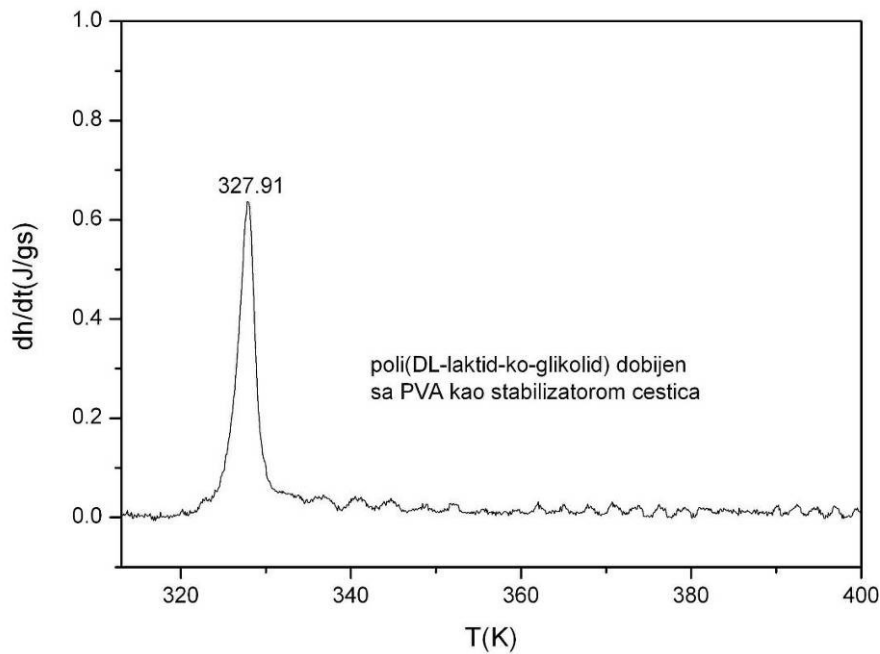


Slika 4.3-4 IR spektar nanosfera DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% wt (PVP kao stabilizator)

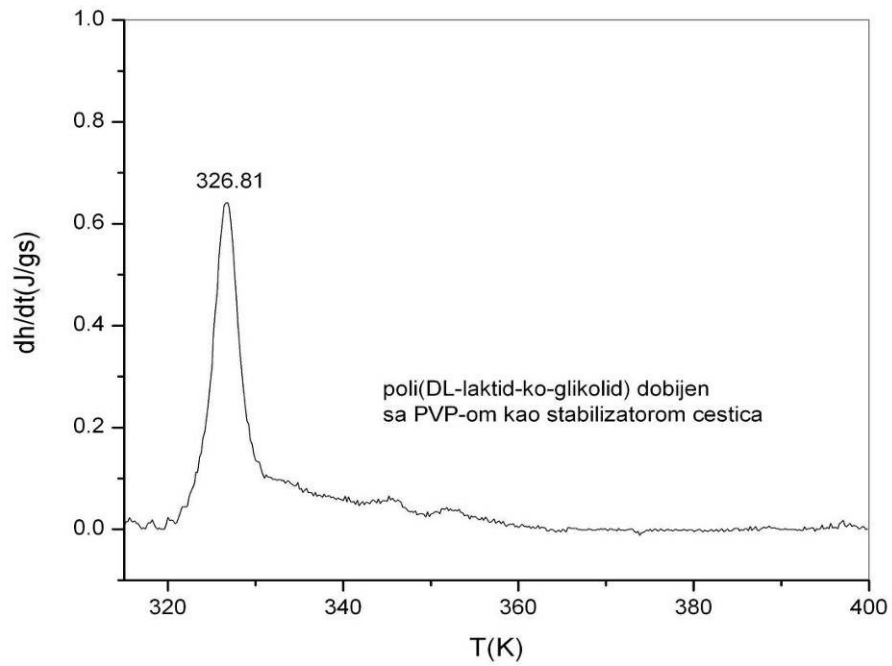
4.4 Diferencijalna skanirajuća kalorimetrija

Metodom diferencijalne skanirajuće kalorimetrije (DSC) su karakterisane nanočestice poli(DL-laktid-ko-glikolida) dobijene korišćenjem polivinil alkohola kao stabilizatora čestica kao i čestice dobijene korišćenjem polivinil piroolidona. Merenja su rađena u opsegu temperatura od 320K do 540K sa brzinom grejanja od 20 K/min.

Na slikama 4.4-1 i 4.4-2 su prikazane DSC krive dobijene u eksperimentu u kome je kao stabilizator korišćen PVA i PVP, respektivno. Na DSC krivama uočava se jedino pik staklastog prelaza, jer je kopolimer DLPLG amorfan. Pik ostakljivanja čestica DLPLG-a dobijenih sa PVA kao stabilizatorom je na temperaturi 327.91 K dok je pik čestica DLPLG-a dobijenih sa PVP kao stabilizatorom na temperaturi 326.81 K.



Slika 4.4-1 DSC kriva nanočestica DLPLG-a dobijenih sa PVA kao stabilizatorom

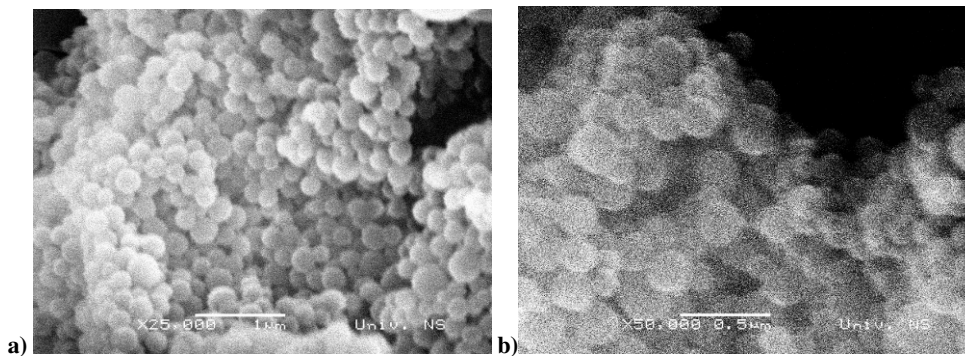


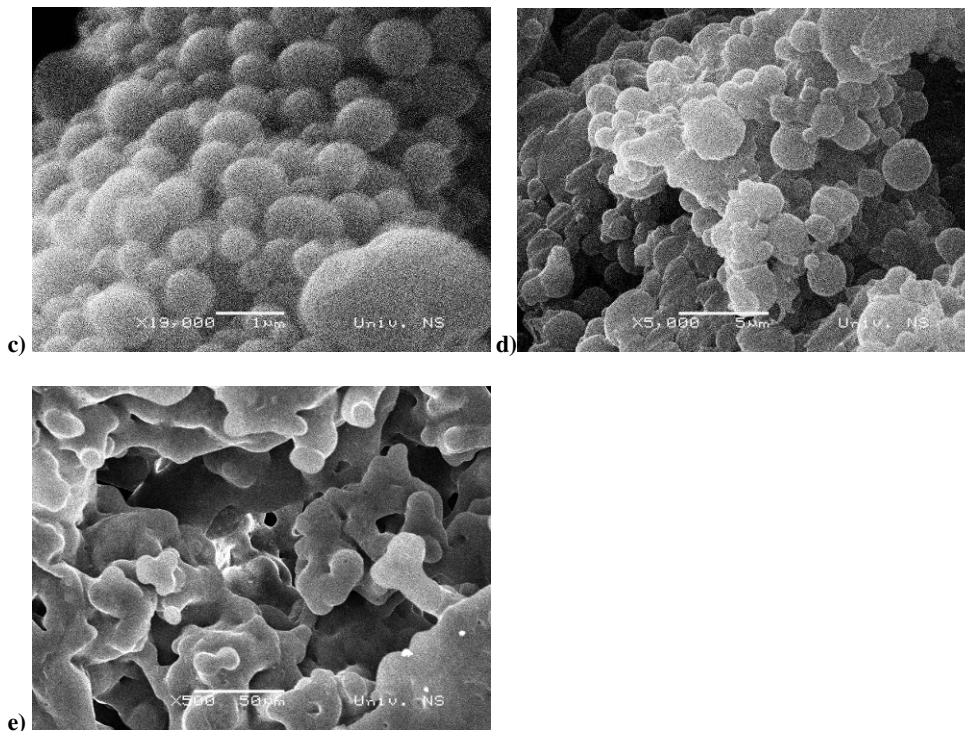
Slika 4.4-2 DSC kriva nanočestica DLPLG-a dobijenih sa PVP-om kao stabilizatorom

4.5 Ispitivanje uticaja stabilizatora na morfološke karakteristike čestica DLPLG-a bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline

4.5.1 Rezultati skenirajuće elektronske mikroskopije

Morfološke karakteristike čestica DLPLG-a bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline su ispitivane skenirajućom elektronskom mikroskopijom [312, 315]. Na osnovu SEM fotografija nanočestica DLPLG-a bez askorbinske kiseline (slika 4.5-1 a) vidi se da su čestice sfernih oblika, glatkih površina, neaglomerisane i izuzetno uniformne (uniformnije nego u slučaju drugih uzoraka). Sa SEM fotografija čestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% (slika 4.5-1 b) vidi se da su čestice takođe sfernih oblika što znači da inicijalna sferičnost čestica nije narušena. I u slučaju uzorka DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% čestice su, takođe, veoma uniformne. Čestice DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% (slika 4.5-1 c) su sfernih oblika ali većih dimenzija. U slučaju čestica DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% (slika 4.5-1 d) vidi se da je uniformnost čestica značajno narušena, čestice imaju sferne ali i nepravilne oblike i prilično su aglomerisane. U slučaju uzorka DLPLG/askorbinska kiselina 30/70% čestice su aglomerisane tako da u njihovom slučaju nije mogla biti rađena stereološka analiza.



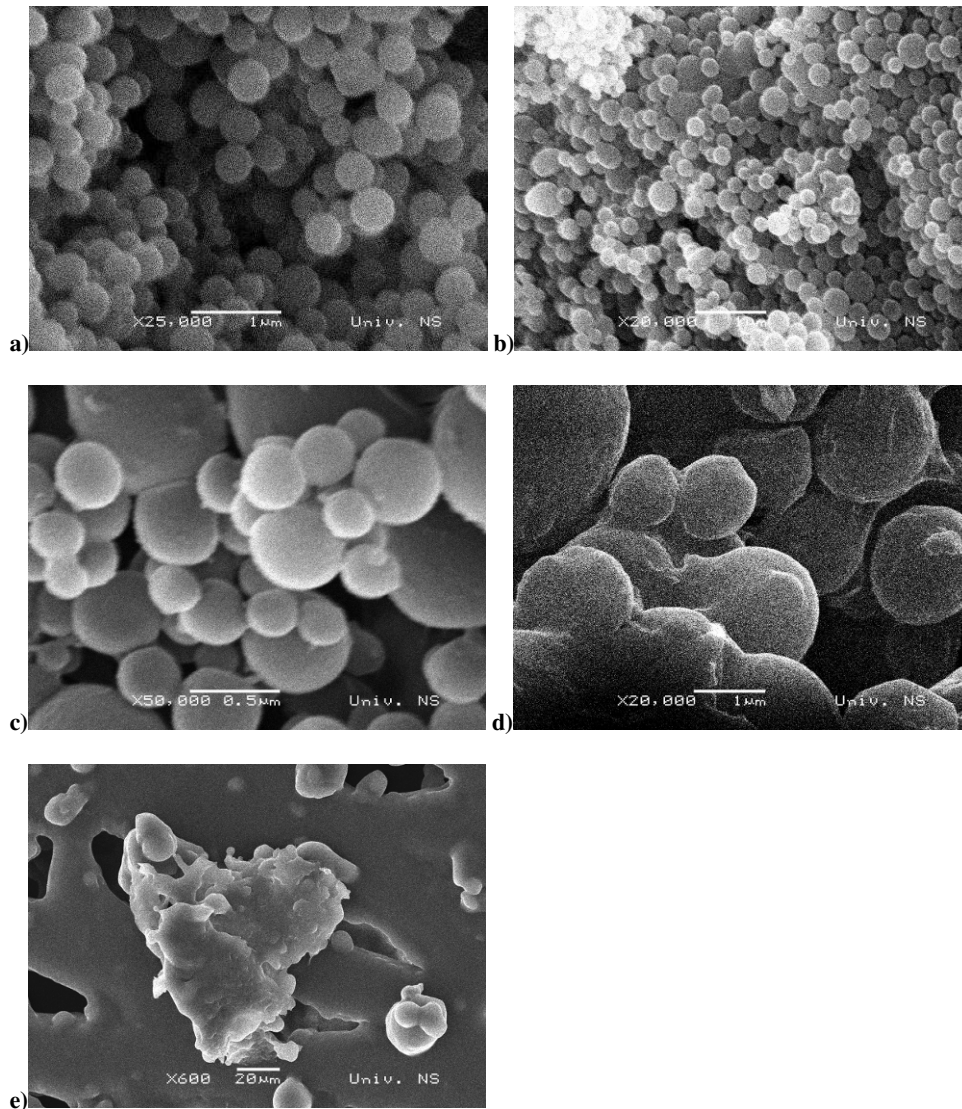


Slika 4.5-1 SEM fotografije a) nanosfera DLPLG-a b) čestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% c) DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% d) DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% e) DLPLG/askorbinska kiselina 30/70%; dobijenih korišćenjem polivinil alkohola (PVA) kao stabilizatora čestica

Na slici 4.5-1 su čestice DLPLG-a bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline dobijene korišćenjem polivinil alkohola kao stabilizatora čestica. Na osnovu SEM snimaka, očigledno je da su upotrebom PVA kao stabilizatora dobijene sferne, uniformne, neaglomerisane (DLPLG, DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%, DLPLG/askorbinska kiselina 70/30%) čestice submikronskih veličina (DLPLG, DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%).

Na osnovu SEM fotografija čestica DLPLG-a bez askorbinske kiseline dobijenih u eksperimentu u kome je kao stabilizator korišćen polivinil pirolidon (slika 4.5-2 a) vidi se da su čestice takođe sfernih oblika, velike uniformnosti i da je njihova veličina čak manja nego u slučaju DLPLG-a dobijenog sa PVA. Čestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% (slika 4.5-2 b) su sferne, uniformne i sa veličinama na submikronskoj skali. Inkapsulacijom askorbinske kiseline do 15% zadržava se inicijalni oblik DLPLG čestica. U slučaju uzorka DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% čestice imaju sferne oblike, manje su uniformne a većih su dimenzija (slika 4.5-2 c). Čestice DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% su

mikronskih veličina i prilično aglomerisane (slika 4.5-2 d). Kao i u slučaju uzorka DLPLG/askorbinska kiselina 30/70% dobijenog sa PVA i uzorak dobijen sa PVP je u velikoj meri aglomerisan i nije mogla biti rađena stereološka analiza.



Slika 4.5-2 SEM fotografije a) nanosfera DLPLG-a b) čestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% c) DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% d) DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% e) DLPLG/askorbinska kiselina 30/70%; dobijenih korišćenjem polivinil pirolidona (PVP) kao stabilizatora čestica

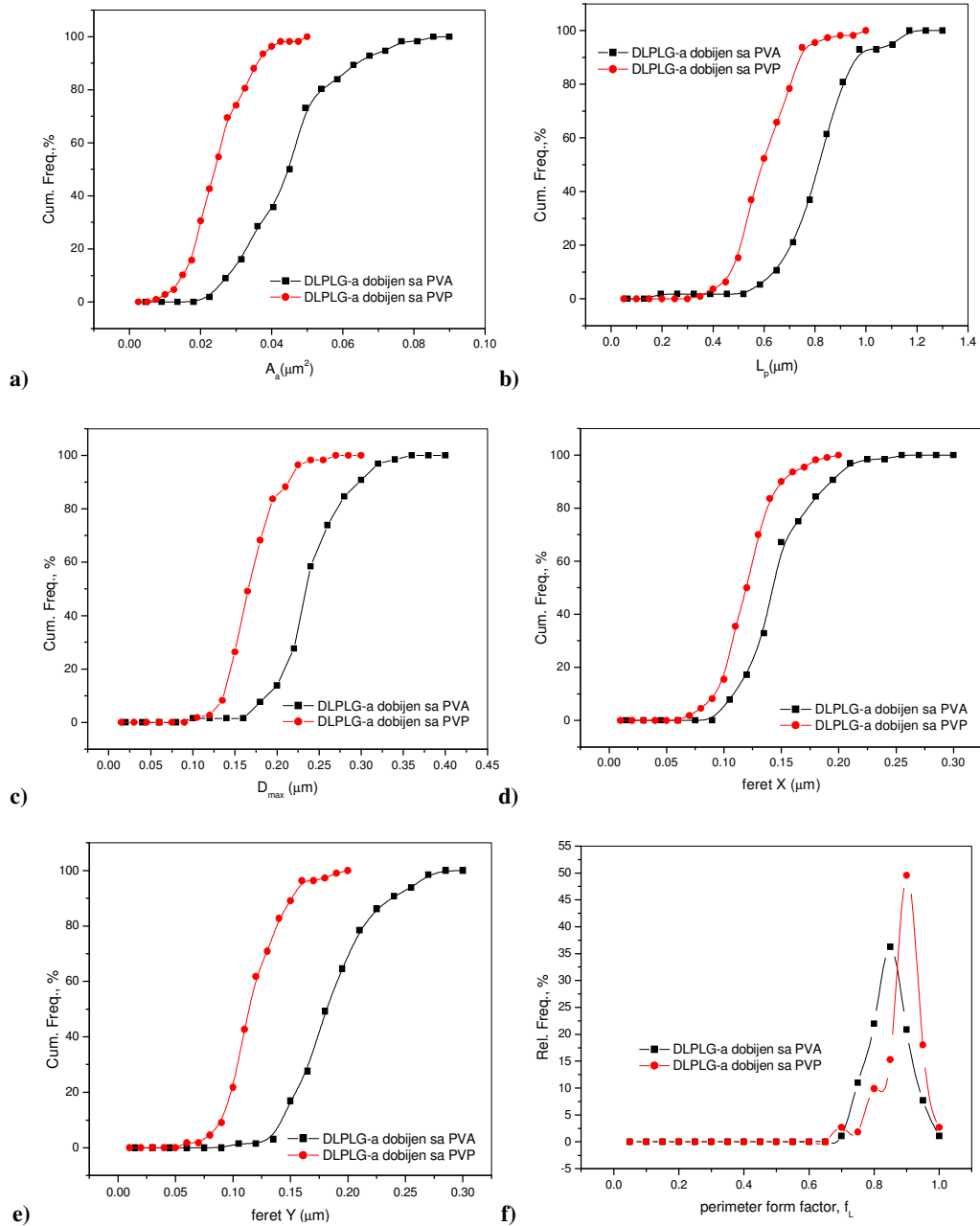
4.5.2 Rezultati stereološke analize

Imajući u vidu da je idealna sferičnost čestica kao i uska raspodela njihovih veličina od fundamentalnog značaja u kontrolisanoj dostavi medikamenata rađena je i detaljna stereološka analiza čestica. Od veličine, oblika, uniformnosti čestica zavisi i njihova interakcija sa ćelijom odnosno dinamika otpuštanja medikamenta (brzina i količina). U zavisnosti od toga šta je željeni cilj odnosno da li se prenos medikamenta unutar organizma vrši transdermalno, oralno, intravenski, zavisi i veličina i oblik potrebnih čestica. Čestice nanometarskih veličina imaju veću površinu kontakta, različit mehanizam degradacije, itd.

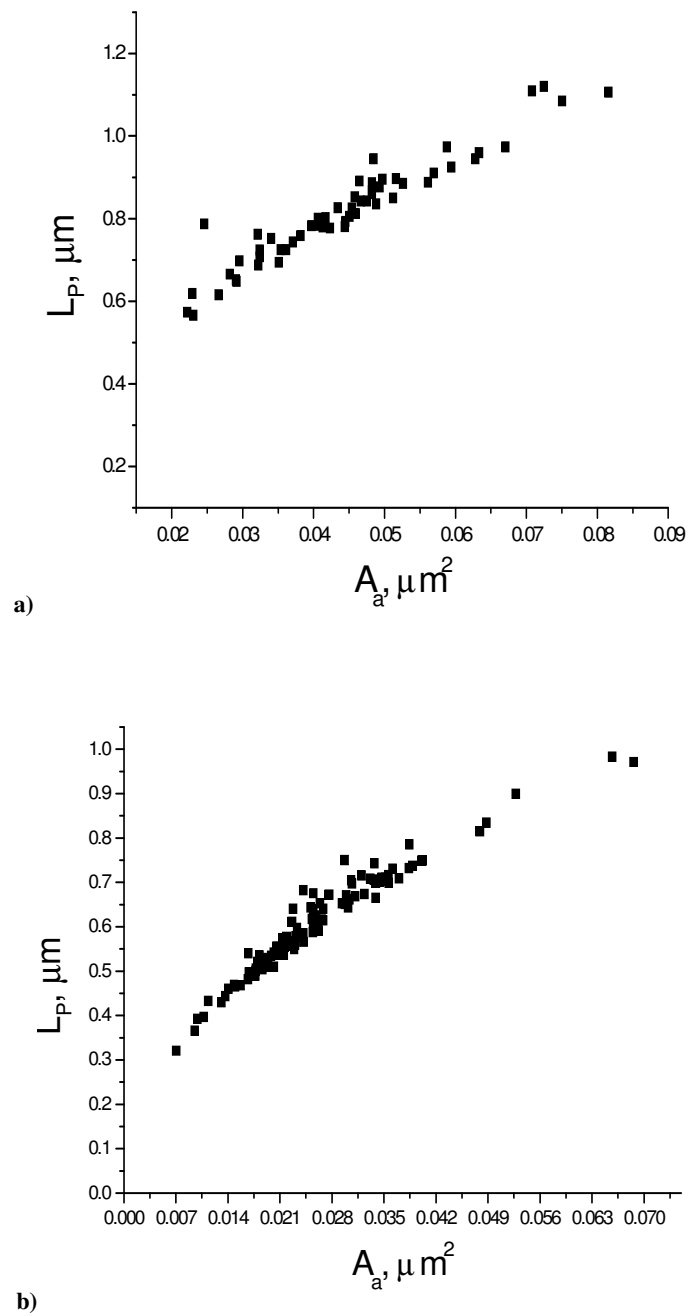
Na osnovu stereološke analize su određeni parametri koji karakterišu veličinu čestice (poprečni presek čestice- A_a , maksimalni prečnik čestice D_{max} , feret X (projekcija čestice na x osu), feret Y (projekcija čestice na y osu) kao i parametar koji karakteriše oblik čestice (perimeter form factor- f_L). Stereološkom analizom su karakterisane čestice DLPLG-a bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline i za sve parametre je određena minimalna, maksimalna i srednja vrednost.

Na slici 4.5-3 su dati uporedno rezultati stereoloških ispitivanja nanosfera DLPLG-a dobijenih sa polivinil alkoholom i polivinil pirolidonom kao stabilizatorom čestica. Rezultati su prikazani kao kumulativna kriva (kumulativni sadržaj čestica u odnosu na određeni stereološki parametar (slika 4.5-3 a-e)) ili kao relativna kriva (relativni udeo čestica u odnosu na određeni stereološki parametar (slika 4.5-3 f)). Na osnovu dobijenih rezultata se vidi da su čestice DLPLG-a (PVA) uniformne i da njihova srednja veličina iznosi od 150 do 230 nm u zavisnosti od toga koji se stereološki parametar posmatra D_{max} , feret X ili feret Y (slika 4.5-3 c,d,e; tabela 4.5.1). Maksimalni prečnik čestica DLPLG-a dobijenih sa PVA je u opsegu od 90 nm do 390 nm sa srednjom vrednošću 230 nm (tabela 4.5.1, slika 4.5-3 c). Veličina čestica DLPLG-a dobijenih sa PVP-om iznosi od 110 do 170 nm u zavisnosti od toga koji se stereološki parametar posmatra D_{max} , feret X ili feret Y (slika 4.5-3 c; tabela 4.5.1). Maksimalni prečnik čestica DLPLG-a dobijenih sa PVP je u opsegu od 90 do 340 nm sa srednjom vrednošću 170 nm. Na osnovu ovih rezultata pokazano je da su čestice DLPLG-a dobijene sa PVP-om kao stabilizatorom manjih veličina. Sa slike 4.5-3 vidi se da čestice dobijene sa PVP-om imaju manji poprečni presek (minimalna vrednost za A_a je $0.01 \mu\text{m}^2$ dok maksimalna vrednost iznosi $0.06 \mu\text{m}^2$), manji im je obim (minimalna vrednost za L_p je $0.32 \mu\text{m}$, maksimalna vrednost $0.98 \mu\text{m}$ dok

srednja iznosi $0.60 \mu\text{m}$) kao i viša vrednost perimetar form faktora (srednja vrednost je 0.90 , slika 4.5-3 f, tabela 4.5.1).



Slika 4.5-3 Uporedni rezultati stereoloških ispitivanja nanosfera DLPLG-a dobijenih sa polivinil alkoholom (PVA) i polivinil piroolidonom (PVP) kao stabilizatorom čestica bazirano na stereološkom parametru a) A_a (poprečni presek čestice); b) L_p (obim); c) D_{max} (maksimalni prečnik čestice); d) feret X (projekcija čestice na x osu); e) feret Y (projekcija čestice na y osu); i f) perimetar form faktoru f_L (faktor oblika);



Slika 4.5-4 Rezultati stereoloških ispitivanja za odnos L_p/A_a u slučaju nanosfera DLPLG-a dobijenog sa a) polivinil alkoholom i b) polivinil pirolidonom kao stabilizatorom čestica

Tabela 4.5-1 Rezultati stereoloških ispitivanja nanosfera DLPLG-a dobijenih sa polivinil alkoholom i polivinil pirolidonom kao stabilizatorom čestica

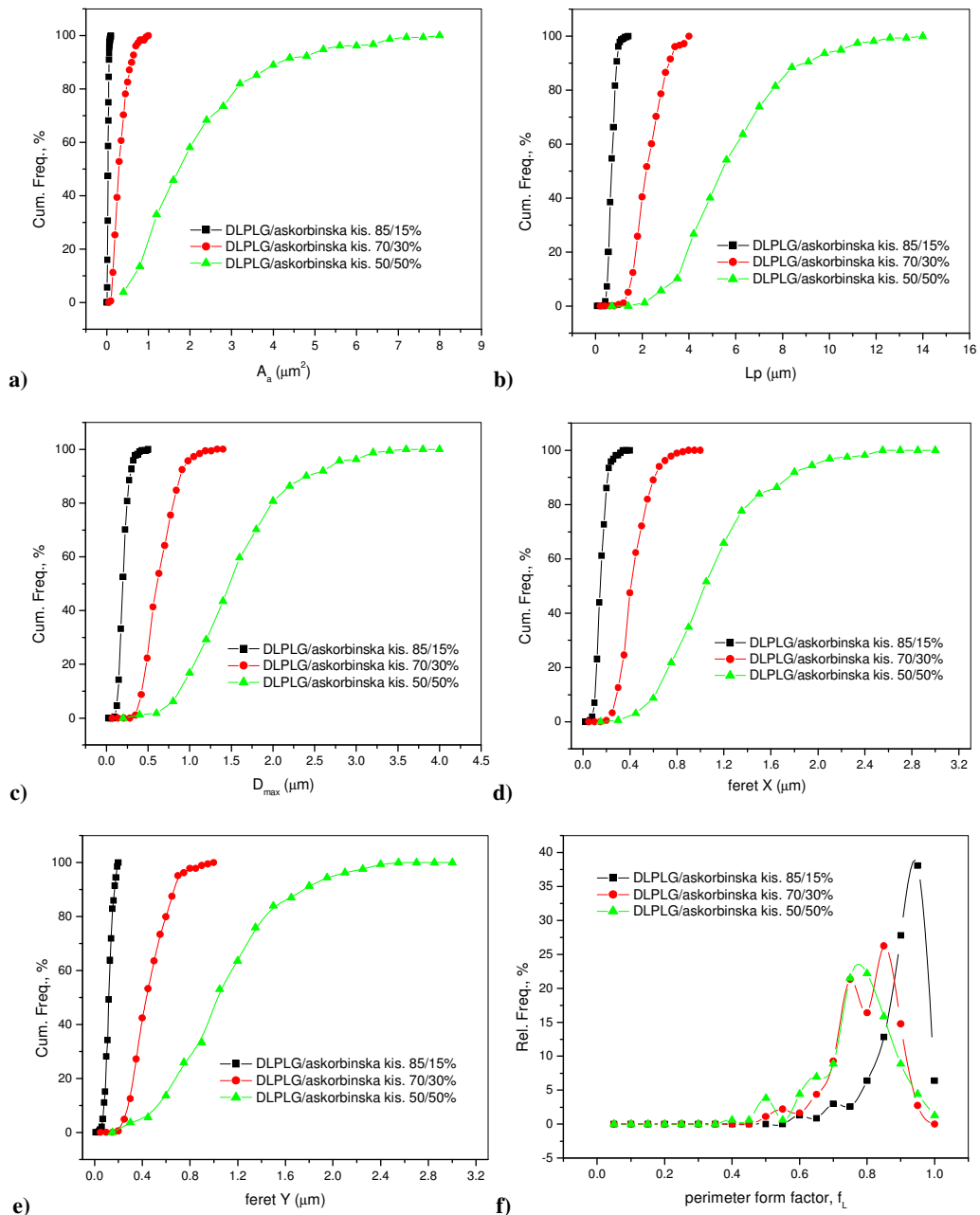
DLPLG		DLPLG dobijen sa PVA	DLPLG dobijen sa PVP
L_p (μm)	min	0.19	0.32
	max	1.12	0.98
	mean	0.81	0.60
A_a (μm^2)	min	0.02	0.01
	max	0.08	0.06
	mean	0.03	0.02
D_{max} (μm)	min	0.09	0.09
	max	0.39	0.34
	mean	0.23	0.17
feret X (μm)	min	0.09	0.07
	max	0.25	0.22
	mean	0.15	0.12
feret Y (μm)	min	0.09	0.05
	max	0.28	0.26
	mean	0.19	0.11
f_L	min	0.49	0.65
	max	0.91	0.97
	mean	0.89	0.90

Čestice DLPLG-a sa različitim sadržajem inkapsulirane askorbinske kiseline su, takođe, ispitivane stereološkom metodom. Za sve čestice su određeni parametri A_a , L_p , D_{max} , feret X, feret Y i perimetar form faktor f_L (slika 4.5-5, tabela 4.5.2). Na osnovu dobijenih rezultata stereoloških ispitivanja čestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% vidi se da su veoma uniformne. Srednja veličina čestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% je u opsegu od 130 do 200 nm u zavisnosti od toga koji se stereološki parametar posmatra (feret X, feret Y ili D_{max}). Vrednosti za maksimalni prečnik čestice, D_{max} , su od 90 nm do 490 nm sa srednjom vrednošću 200 nm (slika 4.5-5 c, tabela 4.5.2). Perimetar form faktor koji karakteriše oblik čestice u slučaju DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% čestica ima srednju vrednost 0.87 (4.5-5 f).

Vrednosti za D_{max} u slučaju čestica DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% su u opsegu od 300nm do 2590nm sa srednjom vrednošću 670nm, ukazujući na to da sa povećanjem sadržaja askorbinske kiseline dolazi i do povećanja čestica (slika 4.5-5c, tabela 4.5.2). Srednja vrednost perimetar form faktora za DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% čestice je 0.77 (4.5-5 f).

U slučaju čestica DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% vrednost za D_{max} iznose od 280 nm do 4510 nm dok je njihova srednja vrednost 1600 nm (4.5-5 f). Uniformnost čestica DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% je narušena a srednja vrednost perimetar form faktora je 0.74.

Uzorak DLPLG/askorbinska kiselina 30/70% je u velikoj meri aglomerisan tako da nije bilo moguće uraditi stereološku analizu.



Slika 4.5-5 Rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG-a sa različitim sadržajem askorbinske kiseline dobijenih u eksperimentu u kome je kao stabilizator čestica korišćen PVA a) A_s b) L_p c) D_{max} d) feret X e) feret Y i f) perimetar form faktor, f_L

Tabela 4.5-2 Rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG-a sa različitim sadržajem askorbinske kiseline dobijenih u eksperimentu sa PVA kao stabilizatorom

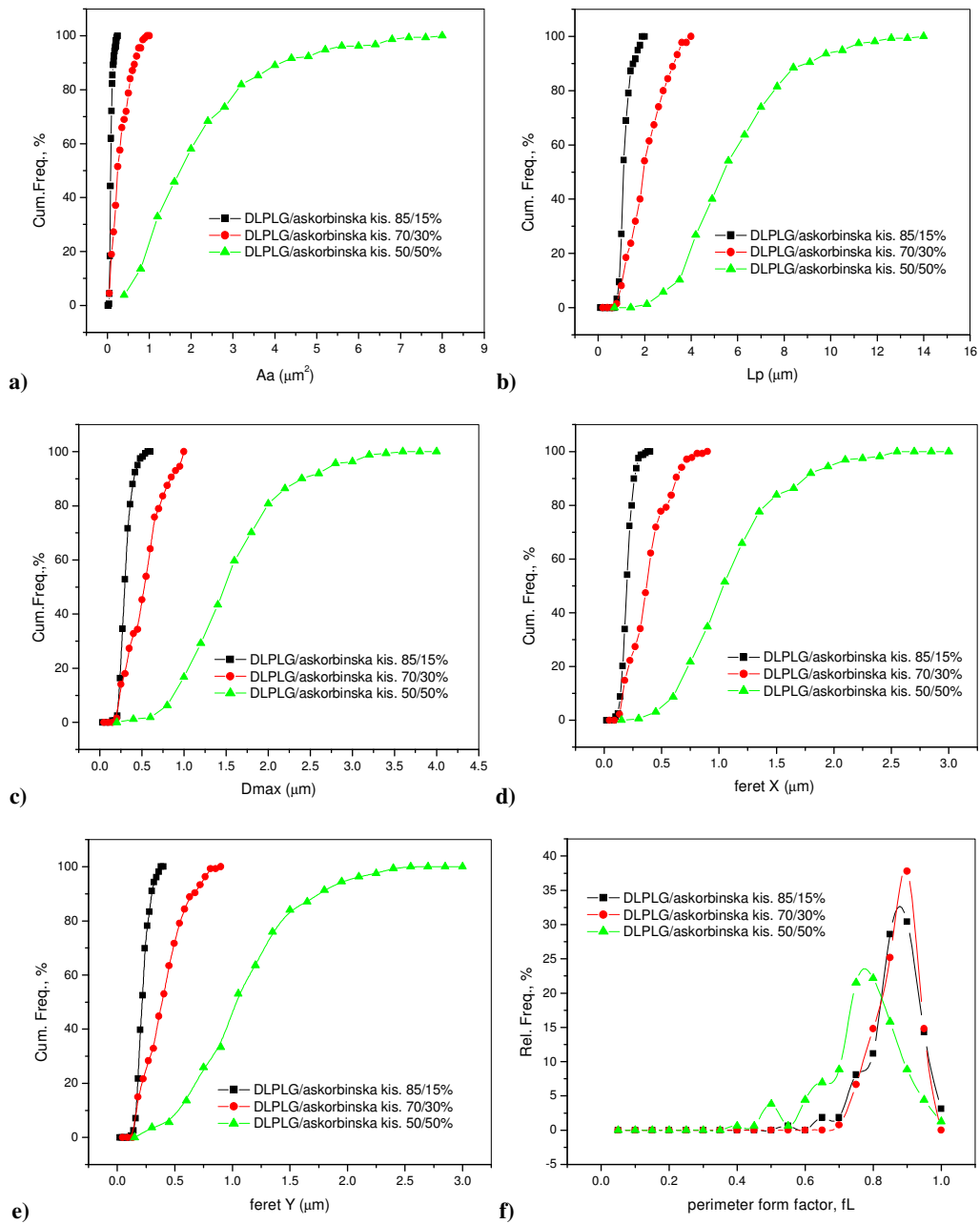
odnos DLPLG/askorbinska kiselina		85/15 %	70/30 %	50/50 %	30/70 %
L_p (μm)	min	0.37	0.95	1.62	-
	max	1.39	8.92	14.23	-
	mean	0.7	2.4	5.86	-
A_a (μm) ²	min	0.01	0.06	0.2	-
	max	0.14	4.63	13.25	-
	mean	0.03	0.41	2.3	-
D_{max} (μm)	min	0.09	0.3	0.28	-
	max	0.49	2.59	4.51	-
	mean	0.2	0.67	1.6	-
feret X (μm)	min	0.05	0.17	0.21	-
	max	0.43	2.19	4.13	-
	mean	0.15	0.46	1.13	-
feret Y (μm)	min	0.03	0.17	0.15	-
	max	0.26	1.65	3.1	-
	mean	0.13	0.48	1.09	-
f_L	min	0.57	0.48	0.35	-
	max	1	0.92	0.97	-
	mean	0.87	0.77	0.74	-

Stereološka ispitivanja su rađena i na česticama DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%, DLPLG/askorbinska kiselina 70/30%, DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% dobijenim sa PVP kao stabilizatorom. I u njihovom slučaju je potvrđeno da morfološke karakteristike čestica zavise od količine inkapsulirane askorbinske kiseline. DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% čestice su sa srednjim veličinama od 200 do 310 nm bazirano na rezultatima dobijenim za feret X, feret Y ili D_{max} (slika 4.5-6, tabela 4.5.3). Vrednosti za maksimalni prečnik čestice, D_{max} , su od 130 nm do 640 nm sa srednjom vrednošću 310 nm (slika 4.5-6 c, tabela 4.5.3) dok srednja vrednost perimetar form faktora iznosi 0.84 (4.5-6 f).

Srednja veličina čestica DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% je u opsegu 380 nm do 550 nm na osnovu feret X, feret Y ili D_{max} (4.5-6, tabela 4.5.3). Čestice DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% imaju vrednosti za maksimalni prečnik čestice, D_{max} , od 170 nm do 1330 nm sa srednjom vrednošću 550 nm (slika 4.5-6 c, tabela 4.5.3) dok srednja vrednost perimetar form faktora iznosi 0.83 (4.5-6 f).

DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% čestice imaju vrednosti za D_{max} od 240 nm do 4520 nm sa srednjom vrednošću 1560 nm (slika 4.5-6 c, tabela 4.5.3) dok srednja vrednost perimetar form faktora iznosi 0.76 (4.5-6 f).

Stereološka analiza DLPLG/askorbinska kiselina 30/70% uzorka nije rađena jer je uzorak aglomerisan.



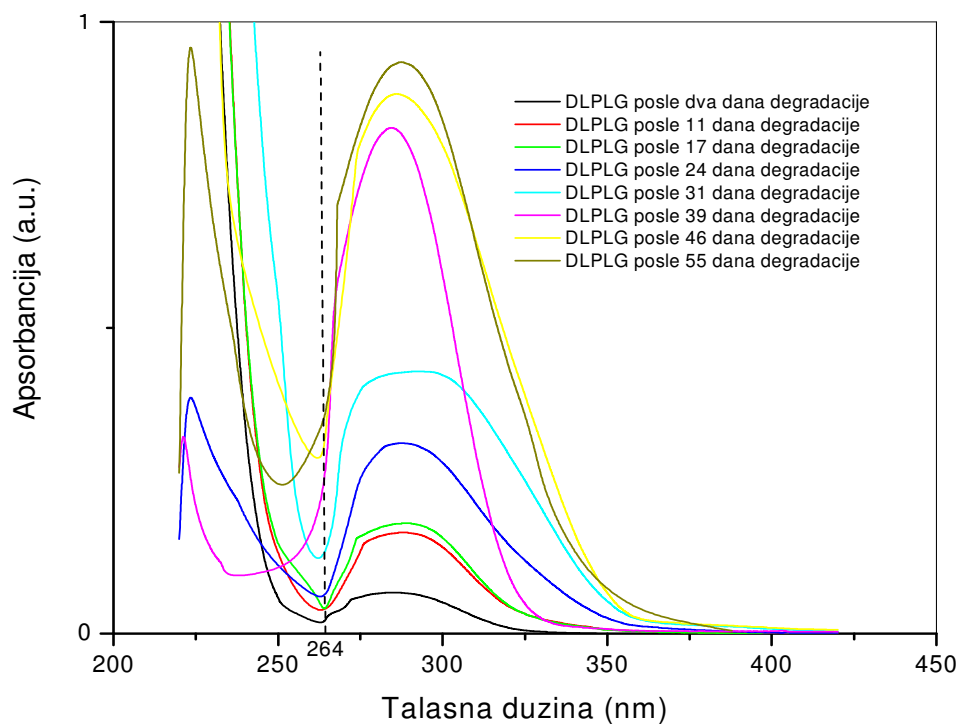
Slika 4.5-6 Rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG-a sa različitim sadržajem askorbinske kiseline dobijenih u eksperimentu u kome je kao stabilizator čestica korišćen PVP a) A_a b) L_p c) D_{max} d) feret X e) feret Y i f) perimetar form faktor, f_L

Tabela 4.5-3 Rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG-a sa različitim sadržajem askorbinske kiseline dobijenih u eksperimentu sa PVP-om kao stabilizatorom

Odnos DLPLG / askorbinska kislina		85/15 %	70/30 %	50/50 %	30/70 %
L_p (μm)	min	0.73	0.78	1.6	-
	max	2.42	3.88	15.01	-
	mean	1.17	2.05	5.89	-
A_a (μm) ²	min	0.04	0.04	0.18	-
	max	0.34	1.07	13.27	-
	mean	0.09	0.33	2.28	-
D_{max} (μm)	min	0.13	0.17	0.24	-
	max	0.64	1.33	4.52	-
	mean	0.31	0.55	1.56	-
feret X (μm)	min	0.09	0.1	0.25	-
	max	0.46	0.87	4.17	-
	mean	0.2	0.38	1.24	-
feret Y (μm)	min	0.1	0.14	0.17	-
	max	0.43	0.9	3.2	-
	mean	0.23	0.4	1.1	-
f_L	min	0.59	0.69	0.34	-
	max	1	0.93	0.98	-
	mean	0.84	0.83	0.76	-

4.6 Degradacija nanosfera poli(DL-laktid-ko-glikolida) bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline u fiziološkom rastvoru kao degradacionom medijumu

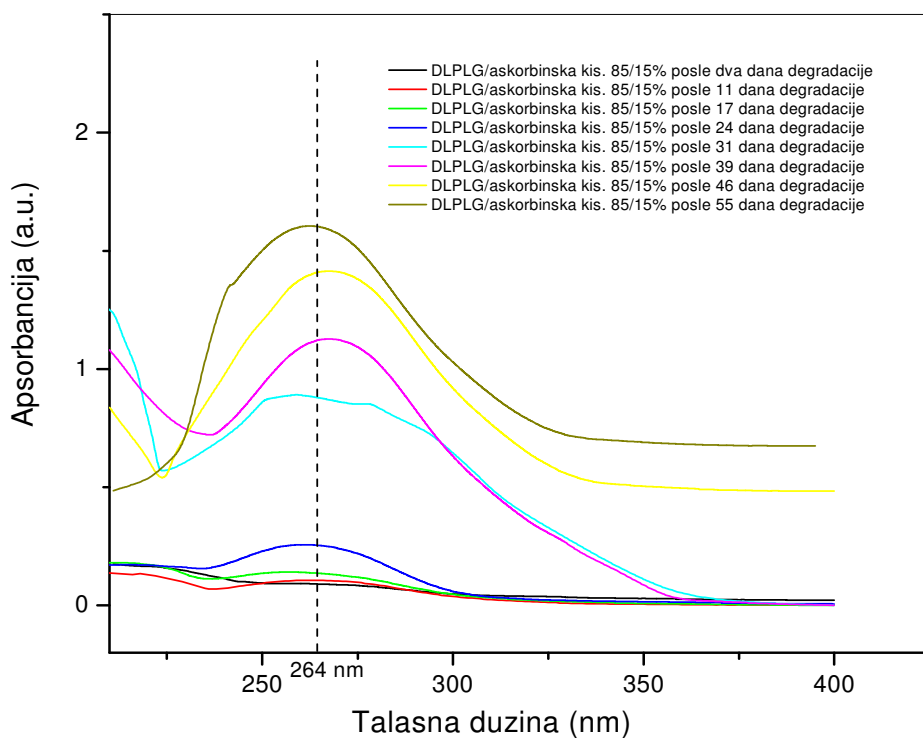
Proces degradacije nanočestica DLPLG-a bez i sa inkapsuliranom askorbinskom kiselinom kao i proces otpuštanja askorbinske kiseline iz polimerne matrice DLPLG-a tokom procesa degradacije (je analiziran metodom ultravioletne spektrofotometrije (UV VIS) [317]. Degradacija DLPLG-a i oslobađanje askorbinske kiseline je praćeno na osnovu merenja apsorbcije na talasnoj dužini maksimuma trake, λ_{\max} , koji je u korelaciji sa polimernom komponentom i askorbinskom kiselinom u rastvoru. Na slici 4.6-1 su prikazani UV spektri rastvora iznad taloga nanosfera DLPLG-a nakon različitih perioda degradacije u fiziološkom rastvoru kao degradacionom medijumu. Spektri su snimani nakon dva, 11, 17, 24, 31, 39, 46 i 55 dana.



Slika 4.6-1 UV spektri rastvora iznad taloga nanosfera DLPLG-a nakon različitih perioda degradacije u fiziološkom rastvoru kao degradacionom medijumu

Apsorpcioni maksimum rastvora iznad taloga nanosfera DLPLG-a je na talasnoj dužini $\lambda > 270$ nm što je u skladu sa literaturom [324] ali je apsorbancija rastvora iznad taloga DLPLG-a posmatrana i na karakterističnoj talasnoj dužini za askorbinsku kiselinu, $\lambda_{\max}=264$ nm, koja raste sa vremenom degradacije i to od vrednosti 0.0127 a.u. nakon dva dana do vrednosti 0.3400 a.u. nakon 55 dana degradacije (slika 4.6-1).

Na slici 4.6-2 su prikazani UV spektri rastvora iznad taloga nanočestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% nakon različitih perioda degradacije u fiziološkom rastvoru kao degradacionom medijumu



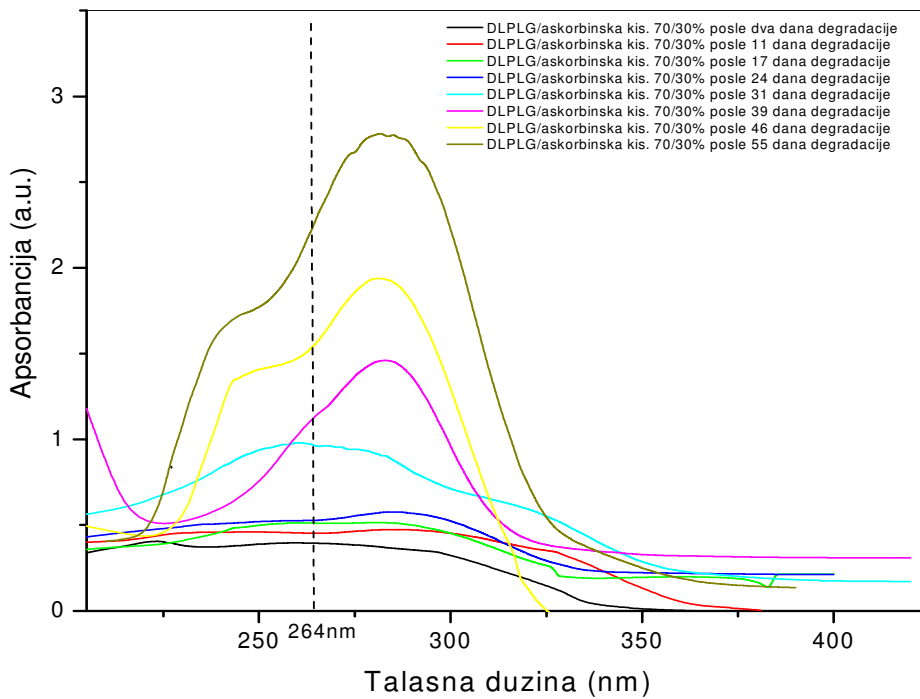
Slika 4.6-2 UV spektri rastvora iznad taloga nanosfera DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% nakon različitih perioda degradacije u fiziološkom rastvoru kao degradacionom medijumu

Apsorbancija, na talasnoj dužini $\lambda_{\max}=264$ nm, na spektrima rastvora iznad taloga nanosfera DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% raste sa vremenom degradacije i to od vrednosti 0.0108 a.u. nakon dva dana do vrednosti 1.6038 a.u. nakon 55 dana (slika 4.6-2)

Sa spektara rastvora iznad taloga DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% (slika 4.6-3) se, takođe, vidi da apsorbancija $\lambda_{\max}=264$ nm raste sa vremenom degradacije i to od vrednosti 0.3963 a.u. nakon dva dana do vrednosti 2.2880 a.u. nakon 55 dana dok je u

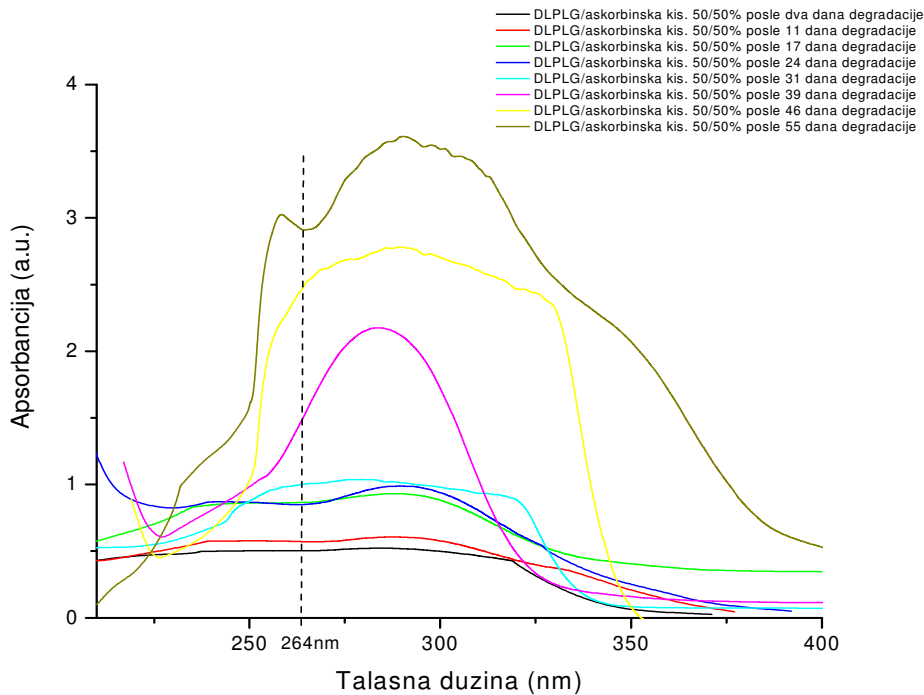
slučaju uzorka DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% (slika 4.6-4) apsorbancija porastla od vrednosti 0.4974 a.u. nakon dva dana do vrednosti 3.0110 a.u. nakon 55 dana.

Na slici 4.6-3 su prikazani UV spektri rastvora iznad taloga čestica DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% nakon različitih perioda degradacije u fiziološkom rastvoru kao degradacionom medijumu



Slika 4.6-3 UV spektri rastvora iznad taloga čestica DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% nakon različitih perioda degradacije u fiziološkom rastvoru kao degradacionom medijumu

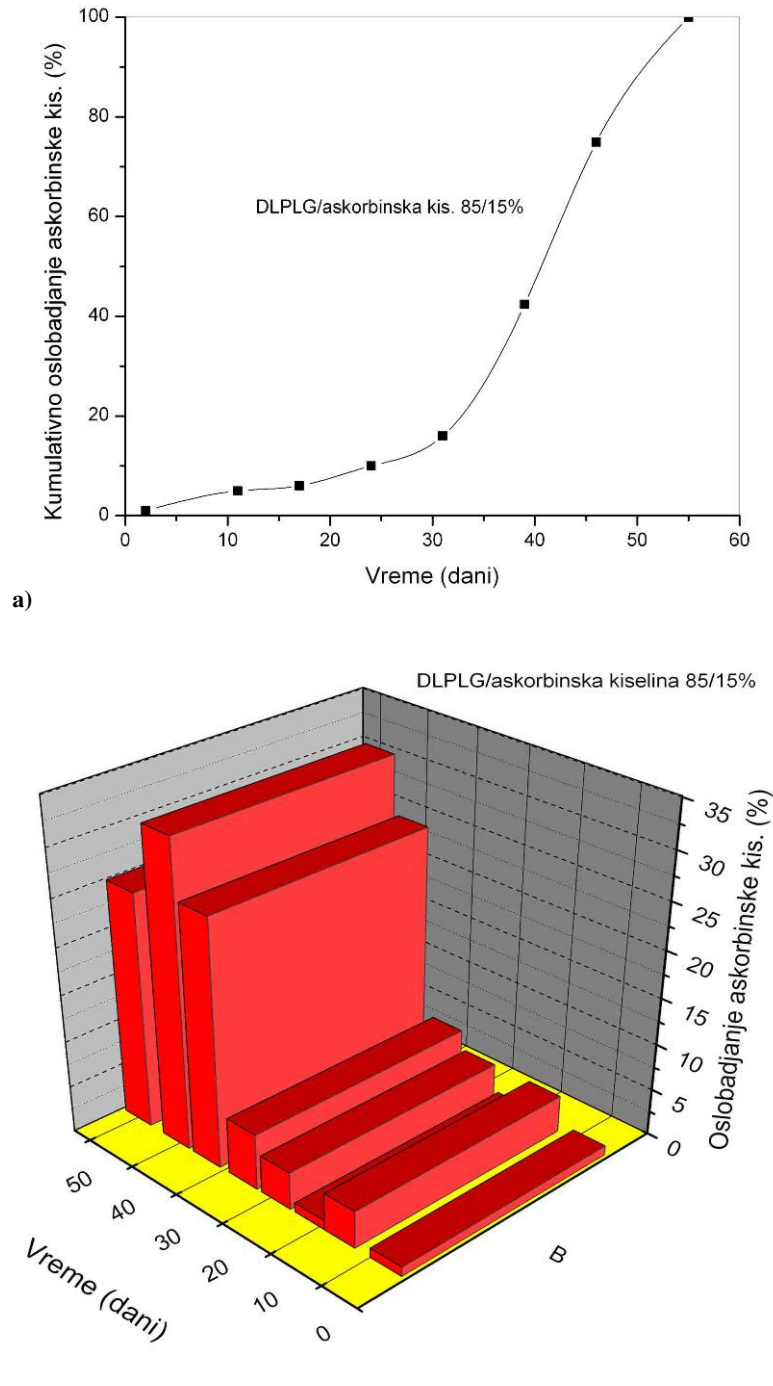
Na slici 4.6-4 su prikazani UV spektri rastvora iznad taloga čestica DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% nakon različitih perioda degradacije u fiziološkom rastvoru kao degradacionom medijumu



Slika 4.6-4 UV spektri rastvora iznad taloga čestica DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% nakon različitih perioda degradacije u fiziološkom rastvoru kao degradacionom medijumu

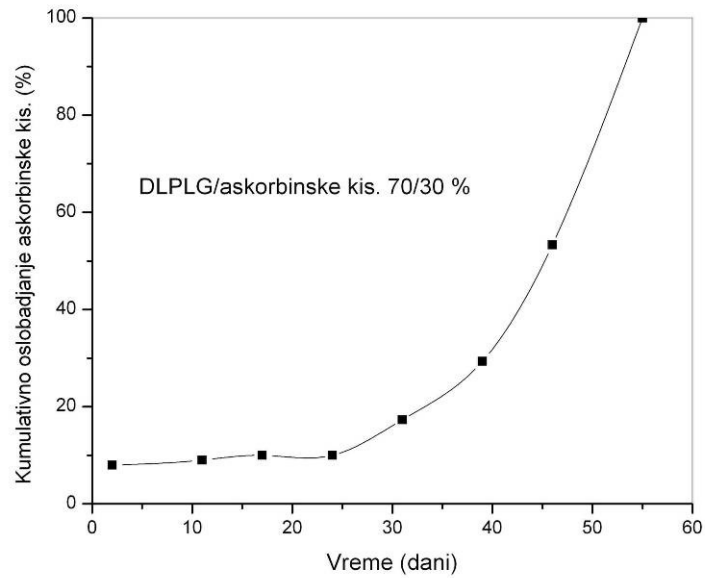
Metodom UV spektrofotometrije je praćeno i analizirano otpuštanje askorbinske kiseline iz polimerne matrice DLPLG-a. Najpre su snimani spektri rastvora sa poznatim koncentracijama vitamina C i na osnovu karakterističnog apsorpcionog maksimuma za askorbinsku kiselinu na $\lambda_{\max}=264\text{nm}$ je napravljena kalibraciona kriva. Apsorbancija vitamina, na 264nm, sa spektara snimljenih nakon dva, 11, 17, 24, 31, 39, 46 i 55 dana je korigovana za odgovarajuću apsorbanciju polimera na istoj talasnoj dužini a zatim je na osnovu ove apsorbancije sa kalibracione krive određivana masa otpuštenog vitamina. Prilikom izračunavanja procenata otpuštenog vitamina iz čestica DLPLG-a, tokom degradacije, u obzir je uzimana i efikasnost inkapsulacije askorbinske kiseline u čestice DLPLG-a.

Na slici 4.6-5 je data kumulativna kriva i relativni prikaz oslobađanja askorbinske kiseline iz nanočestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% izraženo u procentima.

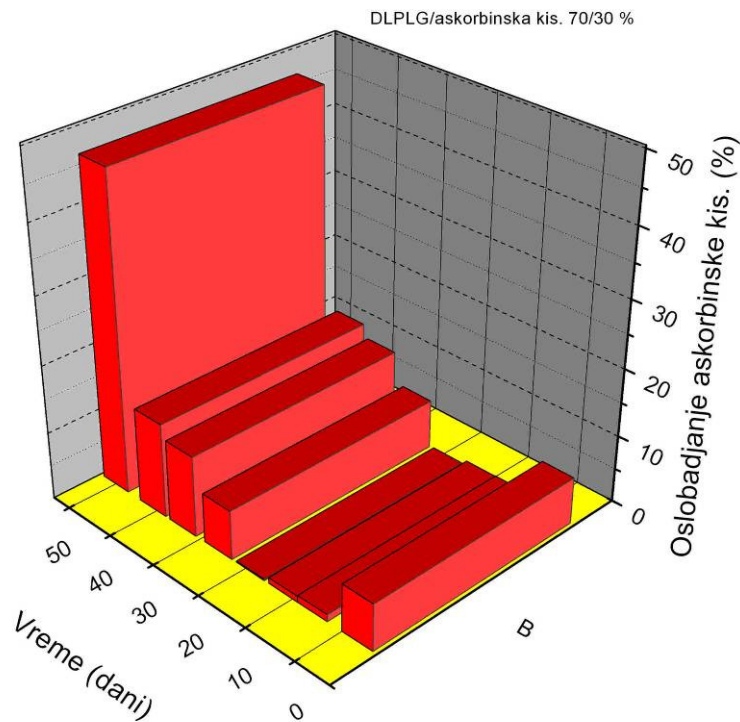


Slika 4.6-5 Oslobađanje askorbinske kiseline u procentima iz nanočestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% tokom vremena a) kumulativna kriva i b) relativni prikaz

Na slici 4.6-6 je data kumulativna kriva i relativni prikaz oslobađanja askorbinske kiseline iz čestica DLPLG/askorbinska kis 70/30% izraženo u procentima.



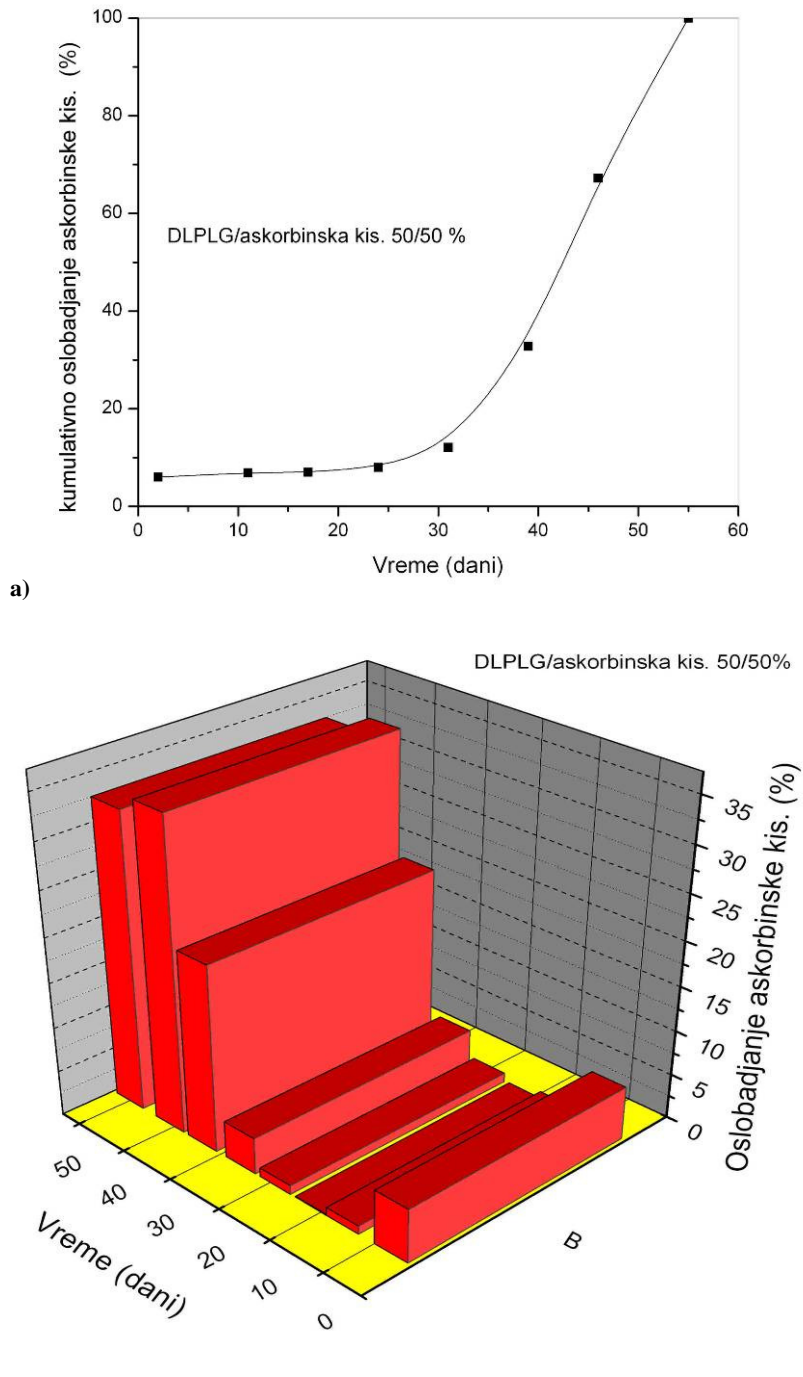
a)



b)

Slika 4.6-6 Oslobađanje askorbinske kiseline u procentima iz čestica DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% tokom vremena a) kumulativna kriva i b) relativni prikaz

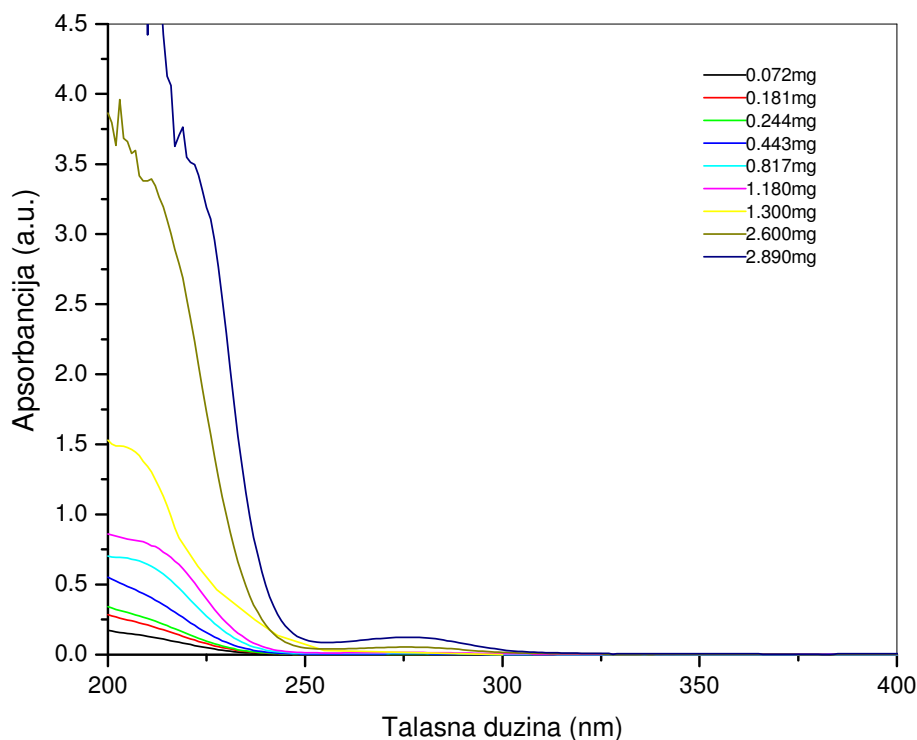
Na slici 4.6-7 je data kumulativna kriva i relativni prikaz oslobađanja askorbinske kiseline iz čestica DLPLG/askorbinska kis 50/50% izraženo u procentima.



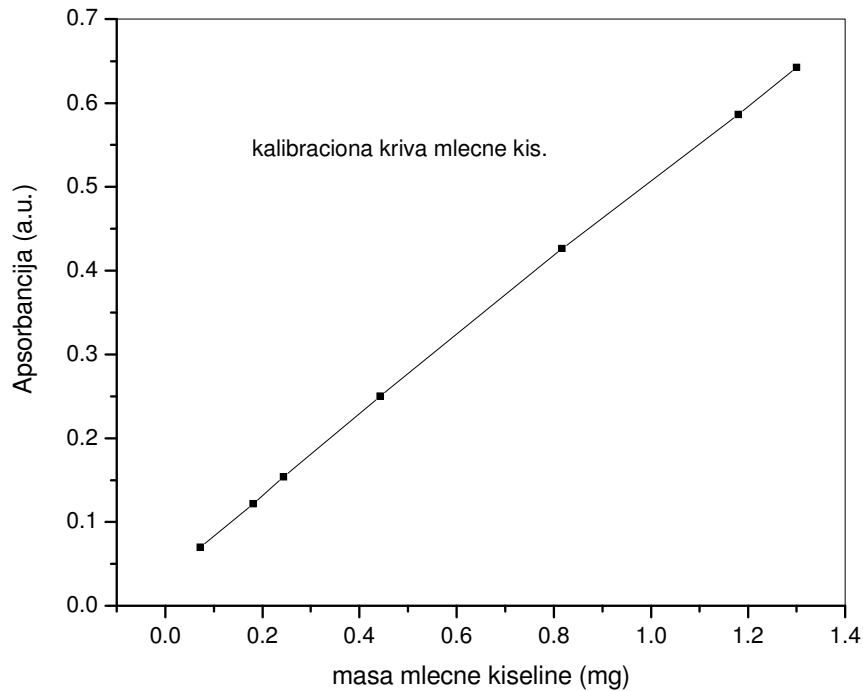
Slika 4.6-7 Oslobađanje askorbinske kiseline u procentima iz čestica DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% tokom vremena a) kumulativna kriva i b) relativni prikaz

Poli(DL-laktid-ko-glikolid) je kopolimer D,L laktida i glikolida (u ovom slučaju odnos DL-laktida i glikolida je 50/50). Krajnji produkti degradacije su mlečna i glikolna kiselina ali prethodno nastaju i oligomeri, trimeri, dimeri. Kopolimer DLPLG pokazuje apsorpcioni maksimum na $\lambda \sim 227$ nm dok glikolid ima apsorpcioni maksimum na $\lambda \sim 270$ nm i u skladu sa time, porast sadržaja glikolida, kao jednog od proizvoda degradacije kopolimera, vodi batahomromnom pomeranju apsorpcionog maksimuma spektra rastvora u kome je kopolimer degradirao [324]. DLPLG-a ima estarske veze a estri imaju apsorbciju na 220 nm dok aldehidi i ketoni imaju apsorbciju na >260 nm. Krajnje grupe lanca su oksidovane u aldehidnu ili keto strukturu. Kidanje lanaca poli(laktida) uzrokuje stvaranje ketona a kidanje lanaca poli(glikolida) nastajanje aldehida.

Do kraja eksperimenta, odnosno do 55 dana, kopolimer DLPLG je u potpunosti degradirao. Uzorak (talog) nije prisutan u kivetu. Uzimajući u obzir da su krajnji produkti degradacije kopolimera DLPLG-a mlečna i glikolna kiselina napravljena je kalibraciona kriva za mlečnu kiselinu (slike 4.6-8 i 4.6-9) i sa spektara snimanih u 55-tom danu je određivana apsorbcija na talasnoj dužini 220 nm na osnovu koje je određena masa mlečne kiseline prisutna u fiziološkom rastvoru (tabela 4.6.1).



Slika 4.6-8 UV spektri vodenih rastvora mlečne kiseline



Slika 4.6-9 Kalibraciona kriva mlečne kiseline

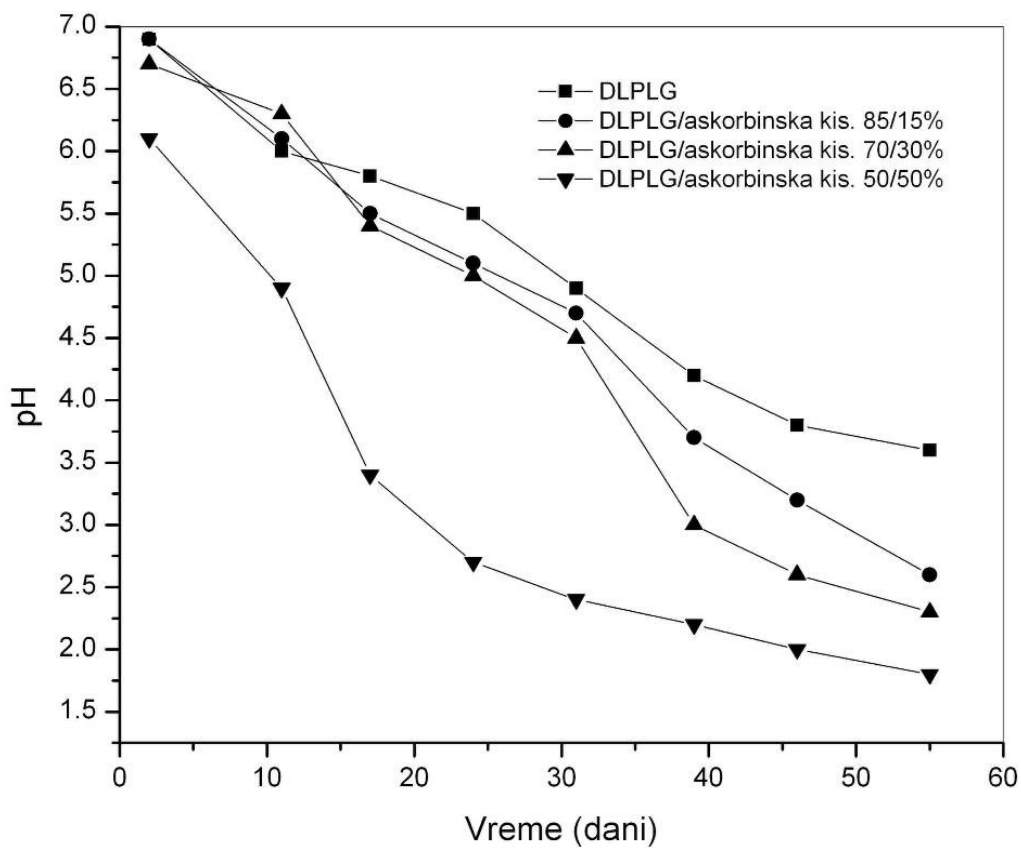
Tabela 4.6-1 Masa mlečne kiseline izračunata na osnovu apsorbancije na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije od 220nm sa spektara snimanih u 55-tom danu degradacije i kalibracione krive za mlečnu kiselinu

DLPLG/askorbinska kiselina %	Apsorbancija na 220nm	Masa (mg)
100/0%	0.617	1.230
85/15%	0.523	1.054
70/30%	0.445	0.870
50/50%	0.310	0.610

pH vrednost fiziološkog rastvora je merena korišćenjem pH indikatorskih traka (pH indicator strips Merck (KGaA, Germany)) tokom različitih perioda degradacije kako bi se pratila promena pH vrednosti, odnosno kiselost degradacionog medijuma sa vremenom.

Na slici 4.6-10 je data promena pH vrednosti fiziološkog rastvora sa vremenom tokom procesa degradacije čestica DLPLG-a bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline. pH vrednost rastvora počinje da opada nakon dva dana degradacije. Tokom 55 dana degradacije pH vrednost fiziološkog rastvora je snižena od vrednosti 7.0 do vrednosti 3.6 u slučaju nanočestica DLPLG-a bez askorbinske kiseline, od pH vrednosti 7.0 do 2.6 u slučaju nanosfera DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%, od pH 7.0 do 2.3 u slučaju DLPLG/askorbinska kiselina 70/30%, i od pH 7.0 do 1.8 u slučaju DLPLG/askorbinska kiselina 50/50%.

DLPLG degradira kidanjem hidrolitički nestabilnih veza ("bulk" erozijom) i produkti degradacije su oligomeri, trimeri, dimeri, monomeri, laktidna i glikolna kiselina. Očekuje se da brže degradiraju frakcije, prisutne u kopolimeru, manjih molekulskih masa pri čemu dolazi do povećanja kiselosti rastvora tj. pada pH vrednosti, čime se ubrzava hidroliza delova kopolimera veće molekulske mase. Drugim rečima, kada se akumulira kiselina u rastvoru usled degradacije kopolimera to snižava pH vrednost rastvora i tada dolazi do ubrzane (katalizovane) degradacije samog kopolimera. U slučaju čestica DLPLG-a sa askorbinskom kiselinom tokom procesa degradacije dolazi i do otpuštanja askorbinske kiseline pa je opadanje pH vrednosti rastvora i time dodatno i značajno indukovano.



Slika 4.6-10 Promena pH vrednosti fiziološkog rastvora sa vremenom tokom procesa degradacije čestica DLPLG-a bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline

4.7 Morfološke promene tokom degradacije DLPLG i DLPLG/askorbinska kiselina čestica u fiziološkom rastvoru kao degradacionom medijumu

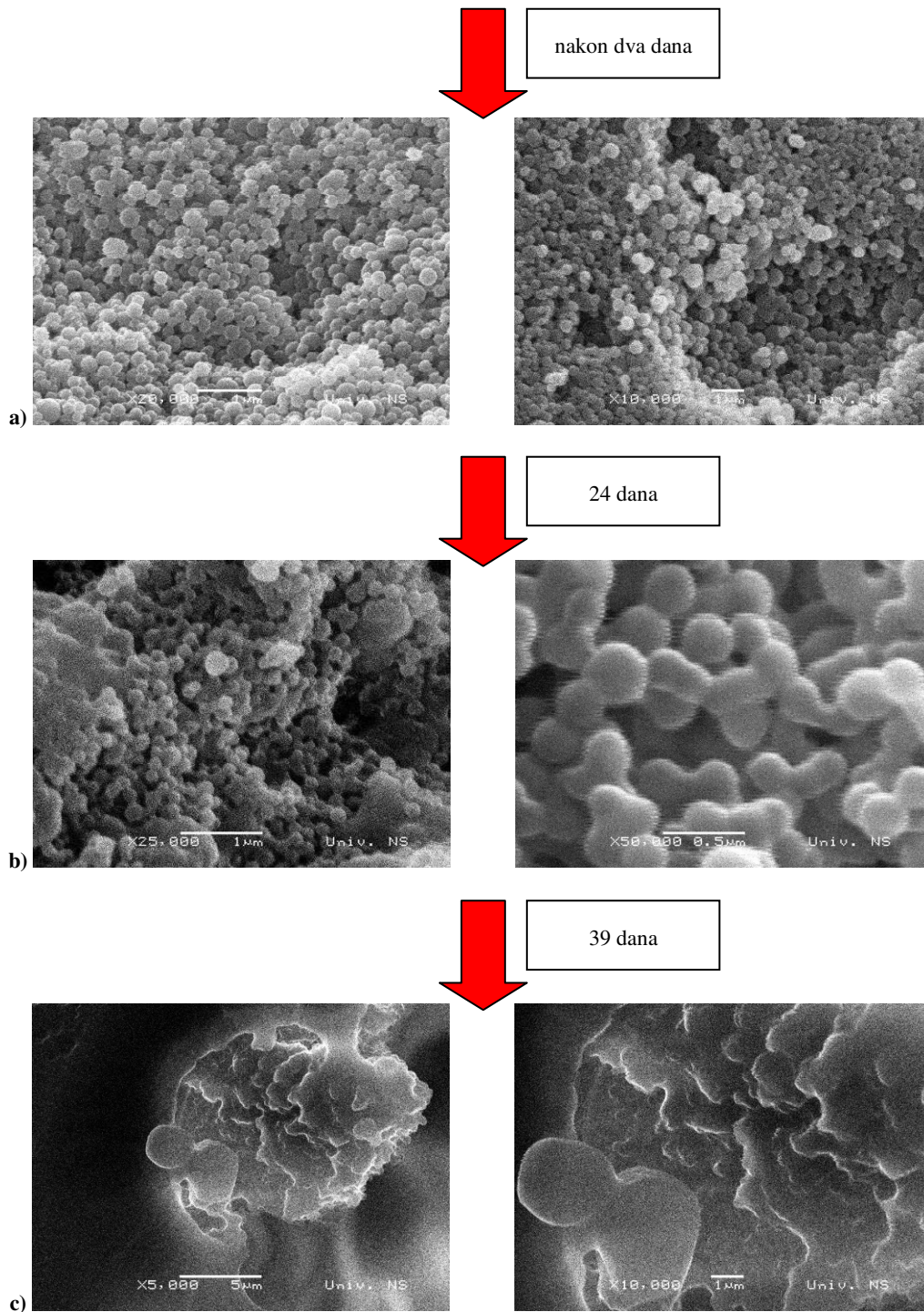
Morfološke promene čestica DLPLG-a sa i bez askorbinske kiseline nastale tokom procesa degradacije u in vitro uslovima ispitivane su metodom skenirajuće elektronske mikroskopije [325]. Uzorci su odvajani nakon dva, 24 i 39 dana degradacije, sušeni i analizirani. Sa SEM fotografija nanočestica DLPLG-a bez askorbinske kiseline se vidi da su čestice u početnoj fazi degradacije i dalje uniformne, sfernih oblika i submikronskih veličina, nakon 24 dana degradacije čestice su prilično aglomerisane dok se sa SEM fotografija čestica nakon 39 dana vidi da su čestice potpuno aglomerisane formirajući film (slika 4.7-1).

U slučaju čestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% sa SEM fotografija nakon dva dana degradacije, takođe se vidi da su čestice zadržale svoj inicijalni oblik, sferičnost i unifomnost, čak se može zapaziti i smanjenje veličine čestica. Nakon 24 dana je došlo do aglomeracije čestica a zatim do pravljenja poroznog filma pri čemu se može pretpostaviti da stepen poroznosti raste do kraja degradacije (slika 4.7-2).

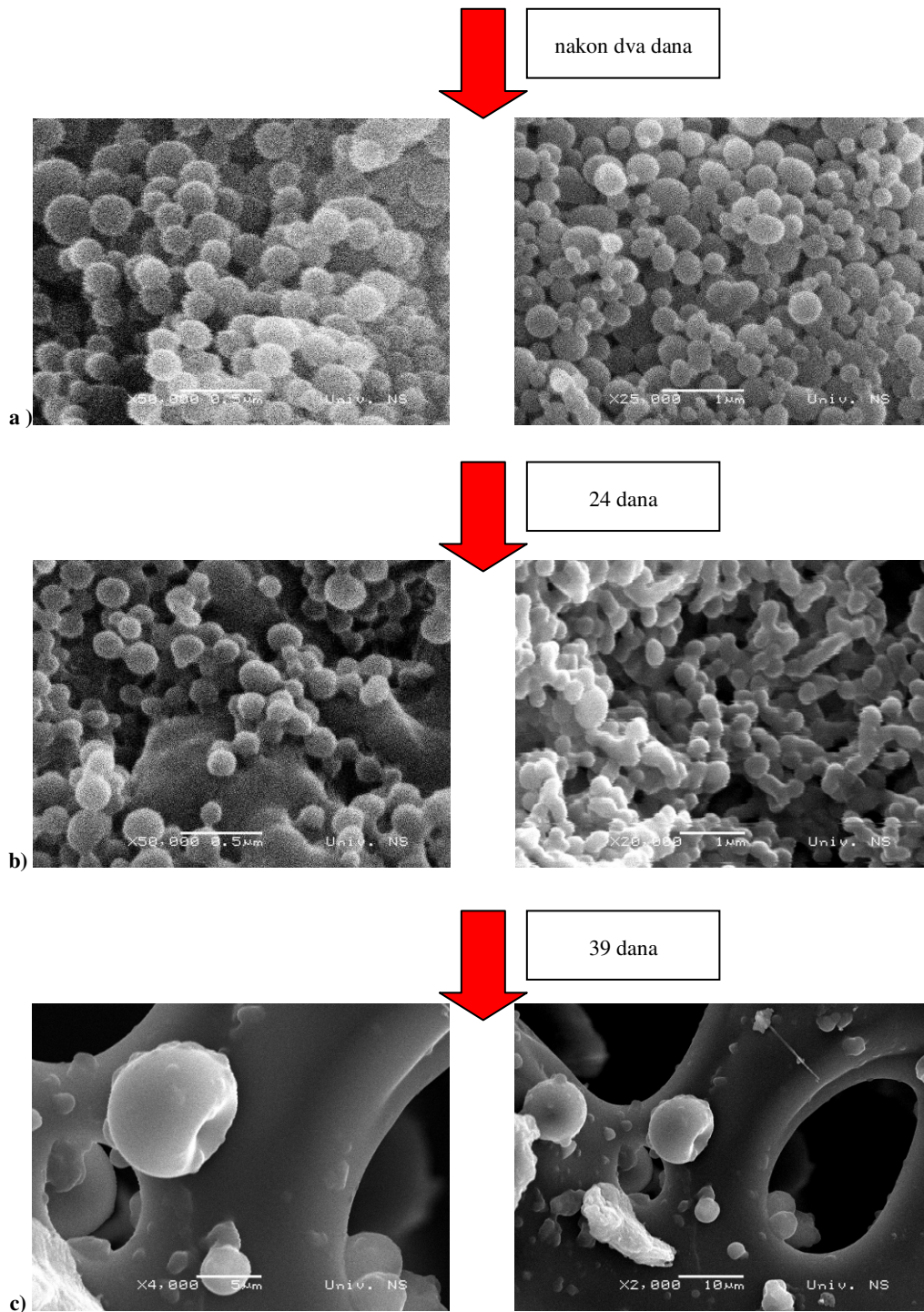
Sa SEM fotografija čestica DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% se vidi da slično prethodnim uzorcima, u početku degradacije dolazi do zadržavanja sferičnosti čestica, smanjenja veličine čestica, nakon 24 dana degradacije čestice su se aglomerisale, dok je nakon 39 dana formiran porozan film (slika 4.7-3).

U slučaju uzorka DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% čestice su nakon dva dana degradacije manjih dimenzija i više sfernih oblika, nakon 24 dana degradacije su aglomerisane a nakon 39 dana je formiran porozan film (slika 4.7-4).

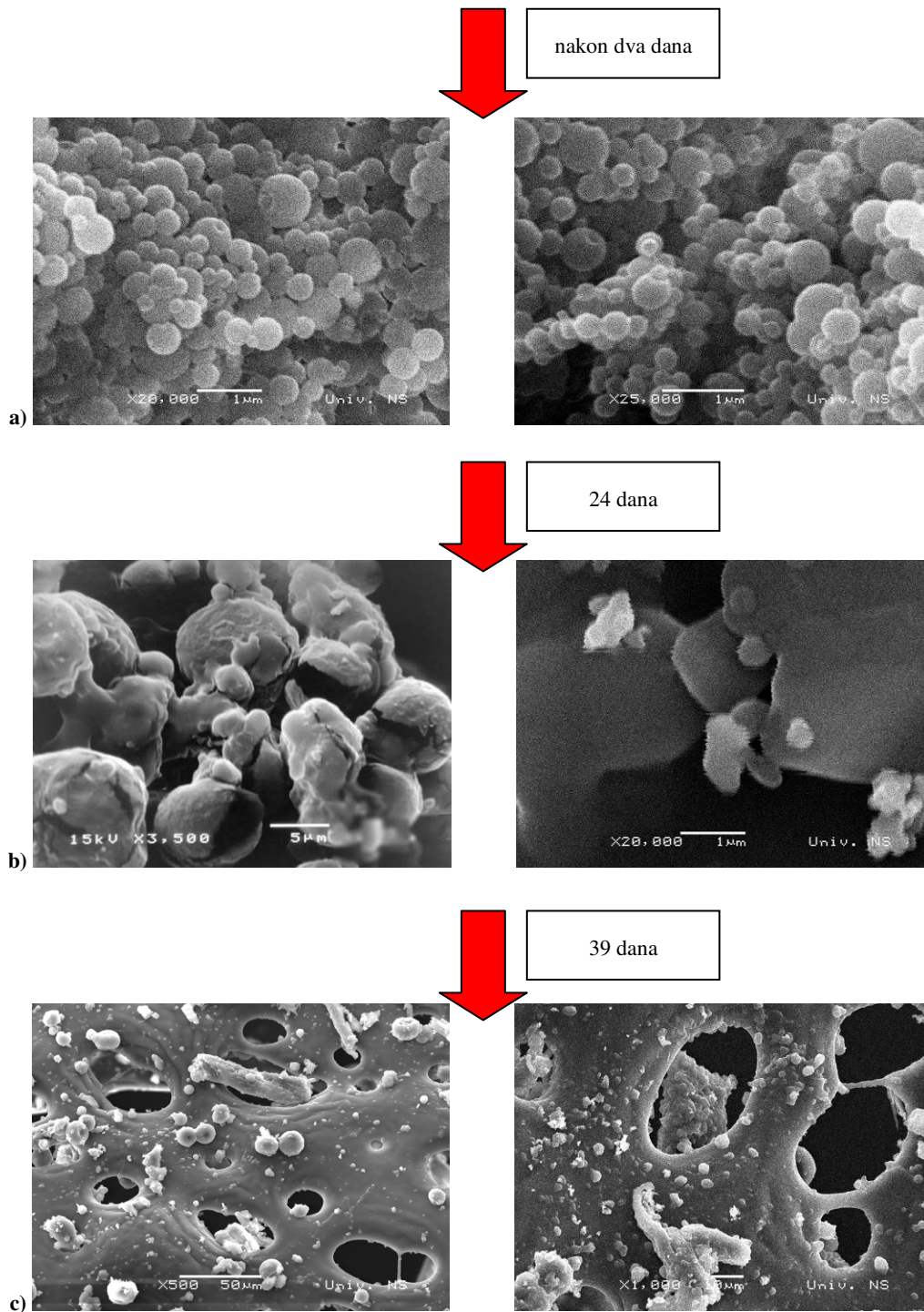
Tokom procesa degradacije uzorak nije mešan a i čestice su u bliskom kontaktu pa se pretpostavlja da iz tog razloga dolazi do njihove aglomeracije i kasnije pravljenja poroznog filma pri čemu stepen poroznosti raste do potpune degradacije uzorka.



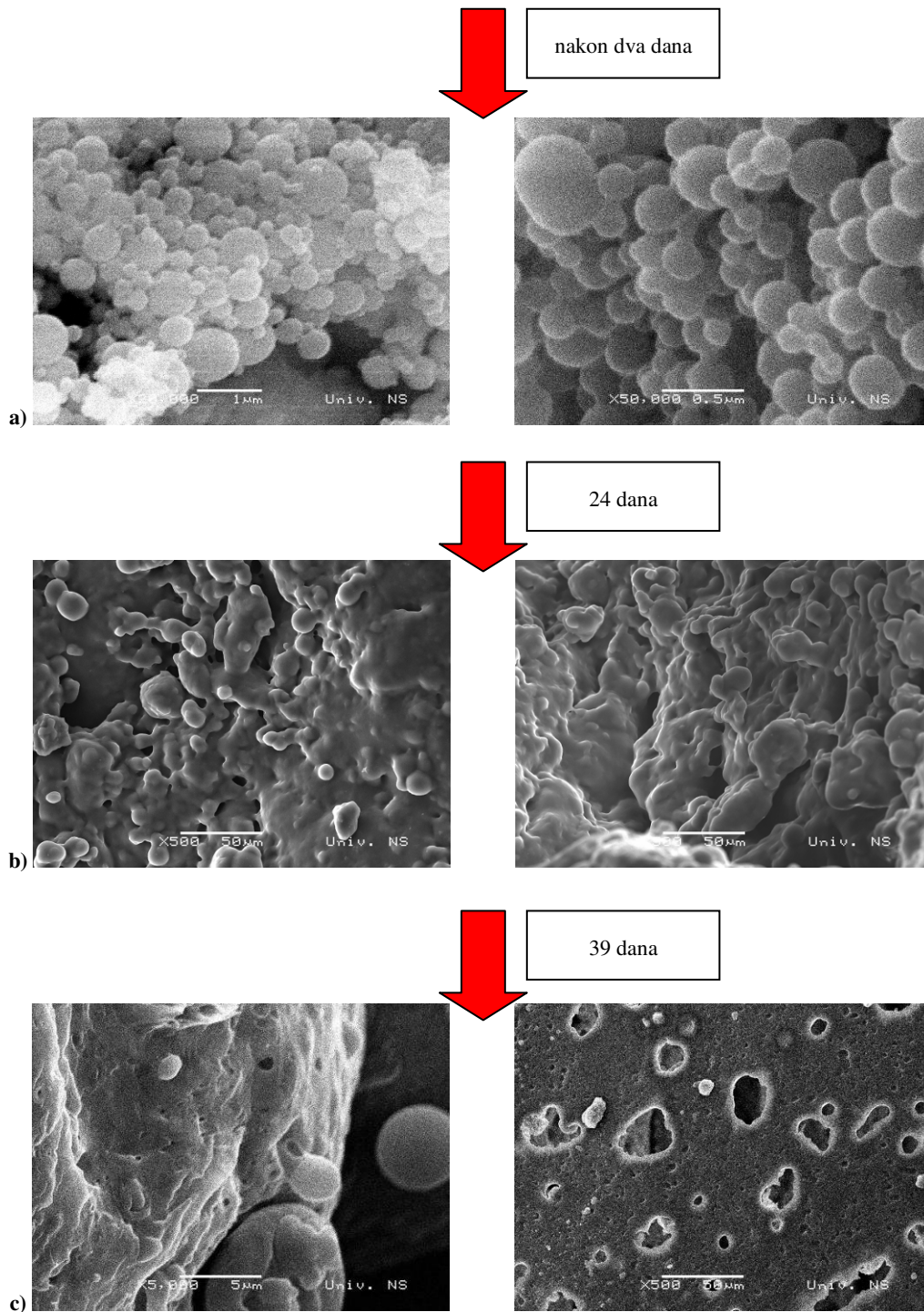
Slika 4.7-1 SEM slike nanosfera DLPLG nakon a) dva dana, b) 24 dana i c) 39 dana degradacije u fiziološkom rastvoru



Slika 4.7-2 SEM slike nanočestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% nakon a) dva dana, b) 24 dana i c) 39 dana degradacije u fiziološkom rastvoru



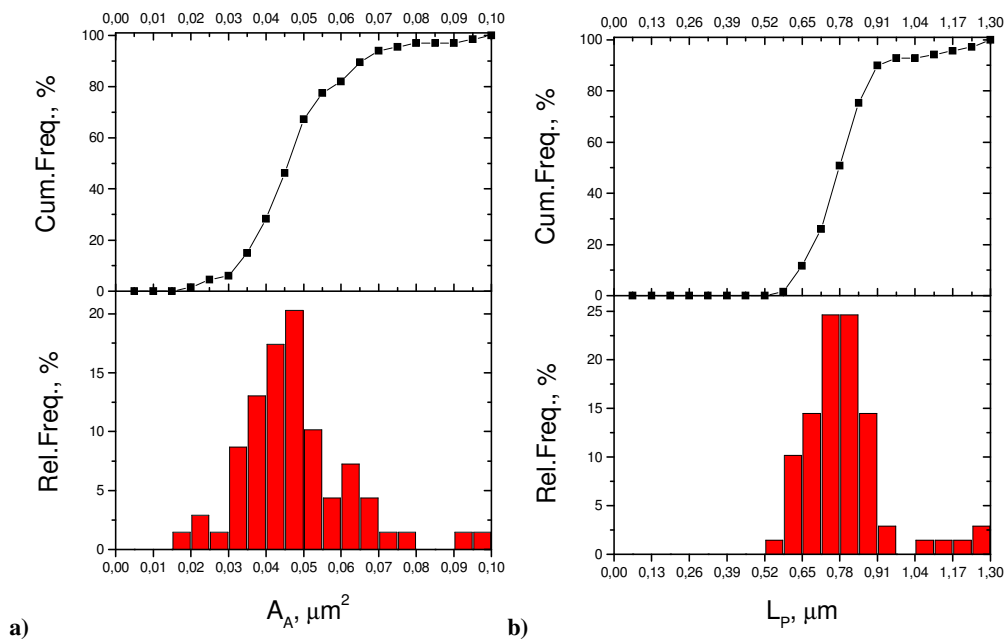
Slika 4.7-3 SEM slike čestica DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% nakon a) dva dana, b) 24 dana i c) 39 dana degradacije u fiziološkom rastvoru

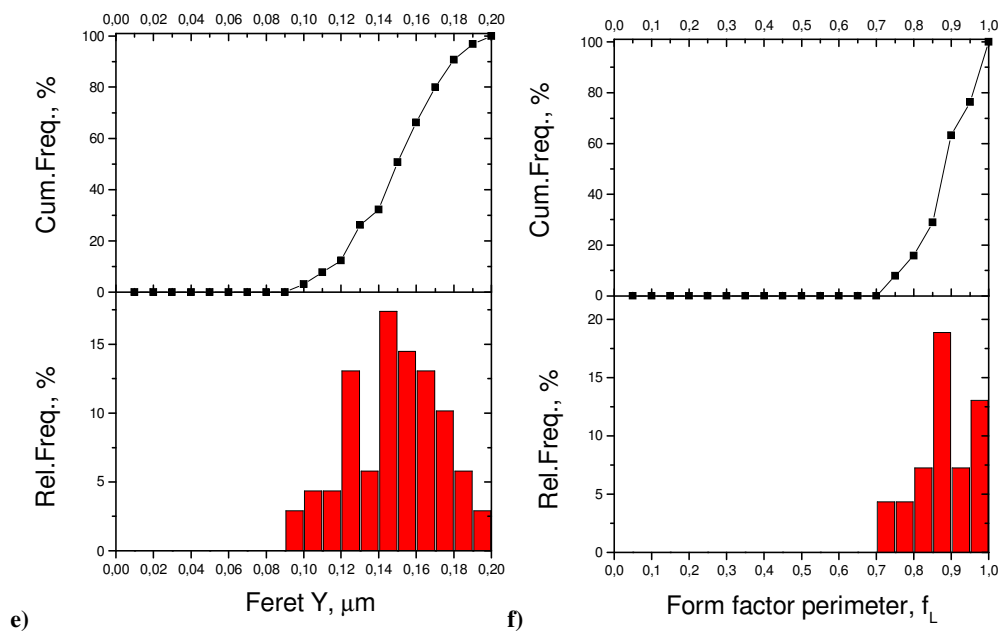
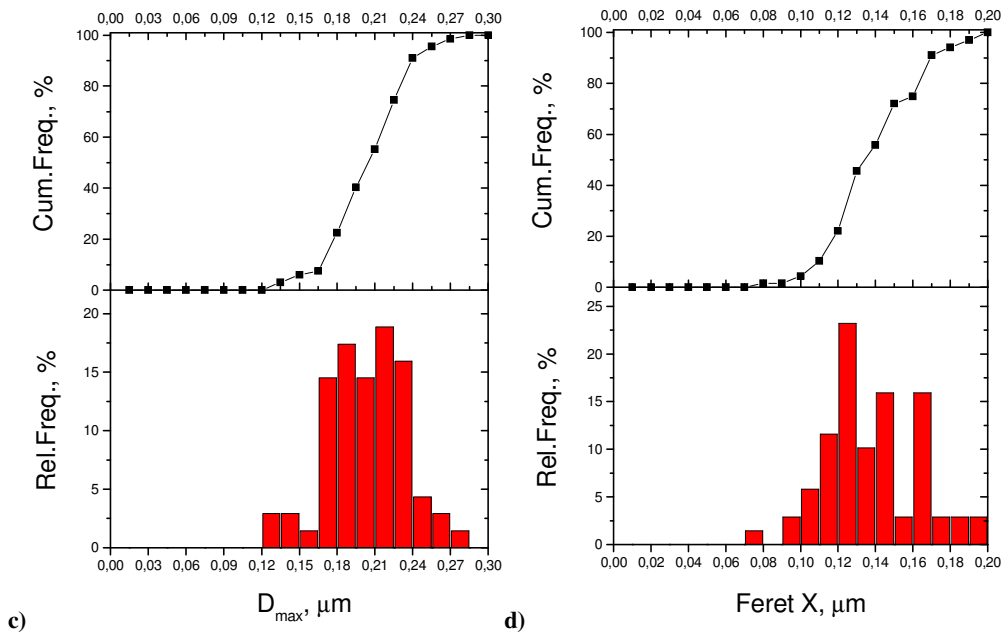


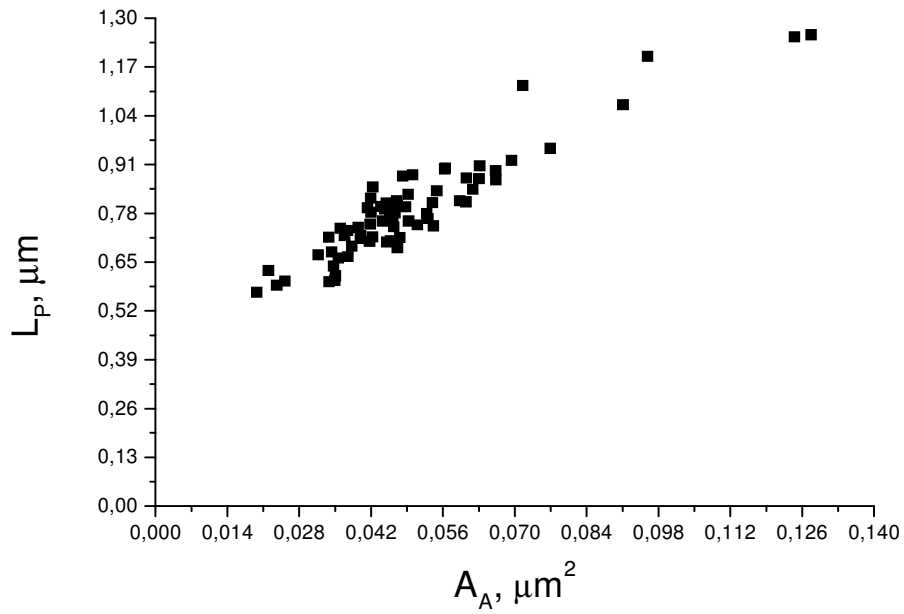
Slika 4.7-4 SEM slike čestica DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% nakon a) dva dana, b) 24 dana i c) 39 dana degradacije u fiziološkom rastvoru

4.8 Sterološka analiza čestica DLPLG-a bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline tokom degradacionog procesa u fiziološkom rastvoru kao degradacionom medijumu

Čestice DLPLG-a bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline, nakon dva dana degradacije u fiziološkom rastvoru, su ispitane stereološkom analizom radi dobijanja kvantitativnih informacija o morfološkim promenama čestica tokom procesa degradacije [325]. Za sve uzorke su određeni parametri: poprečni presek čestice- A_a , maksimalni prečnik čestice D_{max} , feret X, feret Y, i perimetar form faktor- f_L . Na slici 4.8-1 su prikazani rezultati stereološke analize nanosfera DLPLG-a, na slici 4.8-2 nanočestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15 %, na slici 4.8-3 čestica DLPLG/askorbinska kiselina 70/30 %, na slici 4.8-4 čestica DLPLG/askorbinska kiselina 50/50 %, nakon dva dana degradacije u fiziološkom rastvoru. U slučaju čestica DLPLG-a bez askorbinske kiseline dolazi do povećanja njihovih dimenzija i sferičnosti dok kod čestica DLPLG-a sa različitim sadržajem askorbinske kiseline dolazi do smanjenja dimenzija a povećanja sferičnosti.

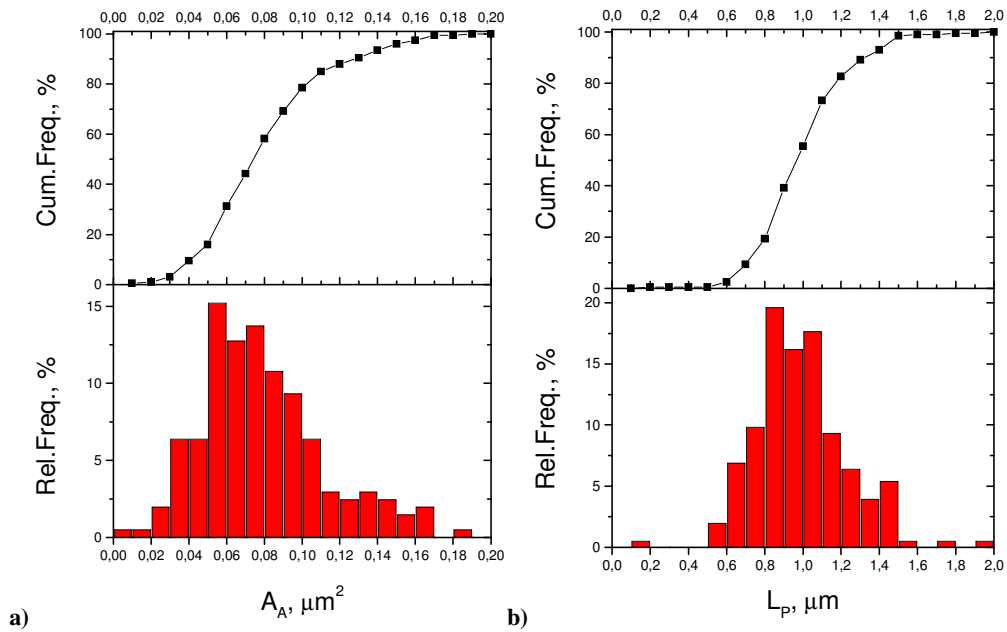


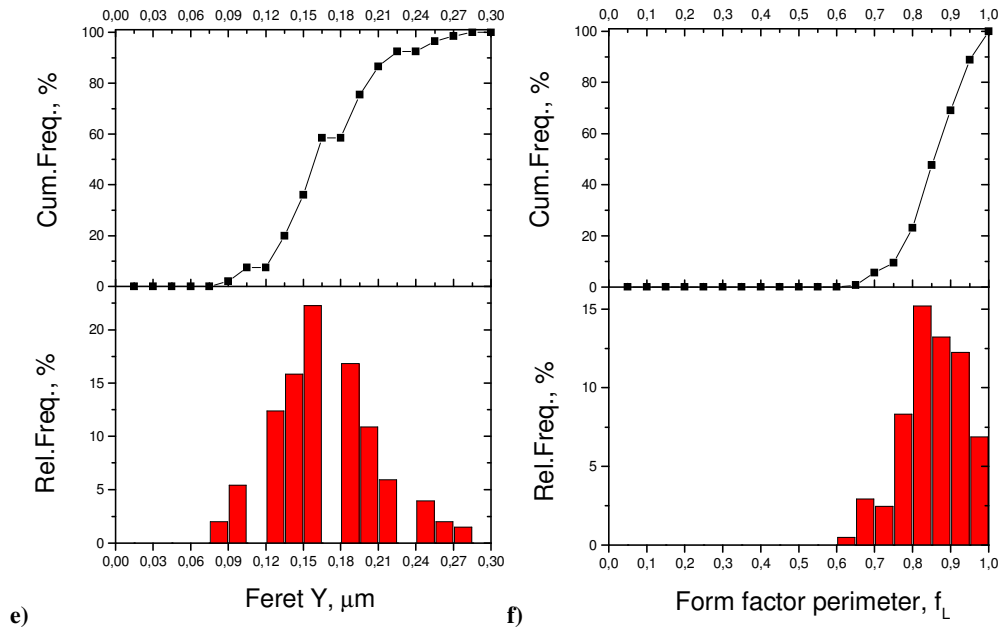
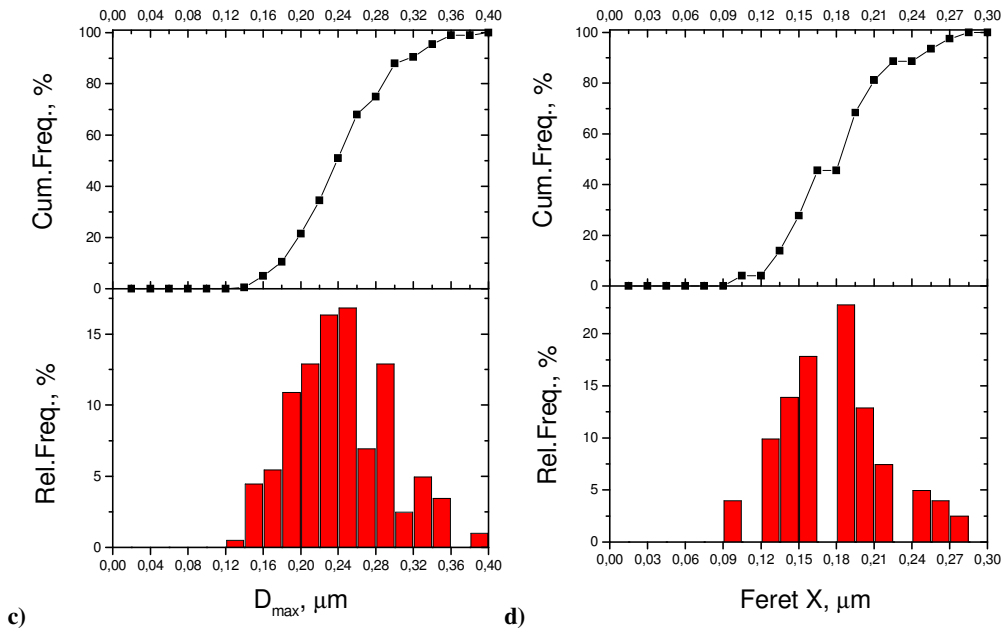


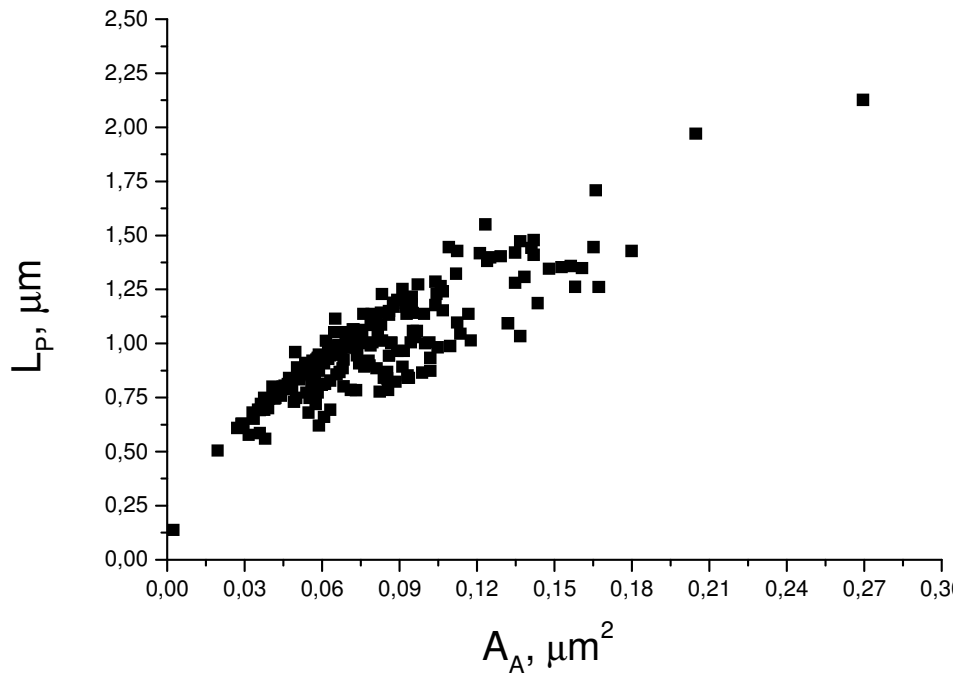


g)

Slika 4.8-1 Rezultati stereološke analize nanosfera DLPLG-a nakon dva dana degradacije u fiziološkom rastvoru

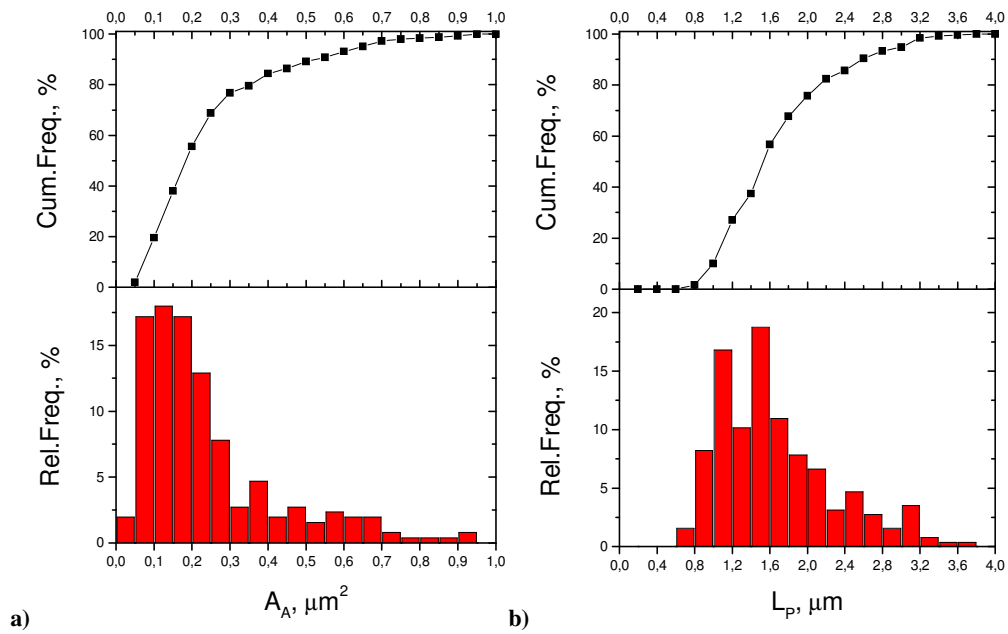






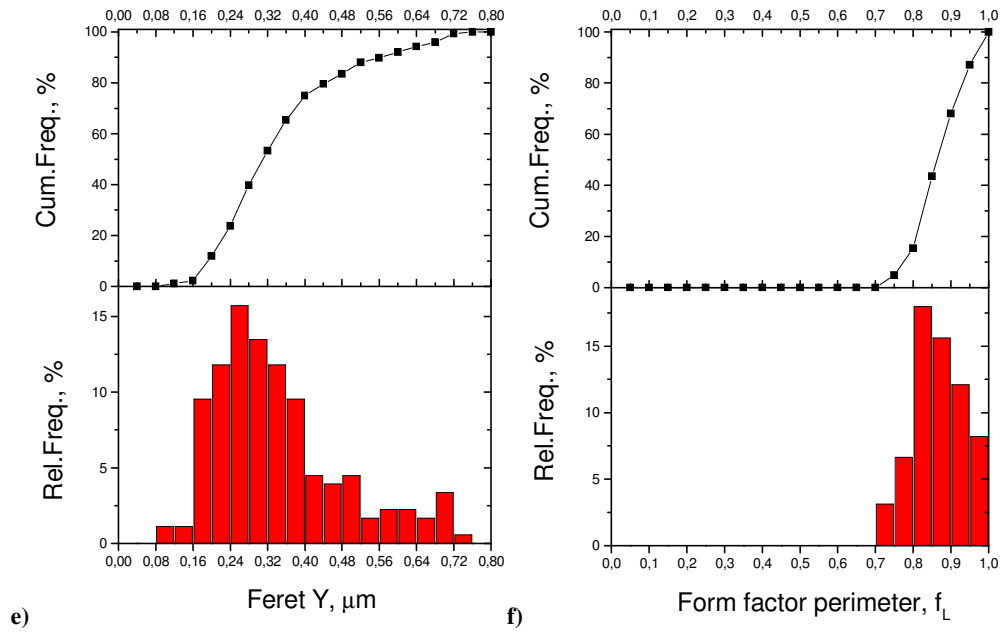
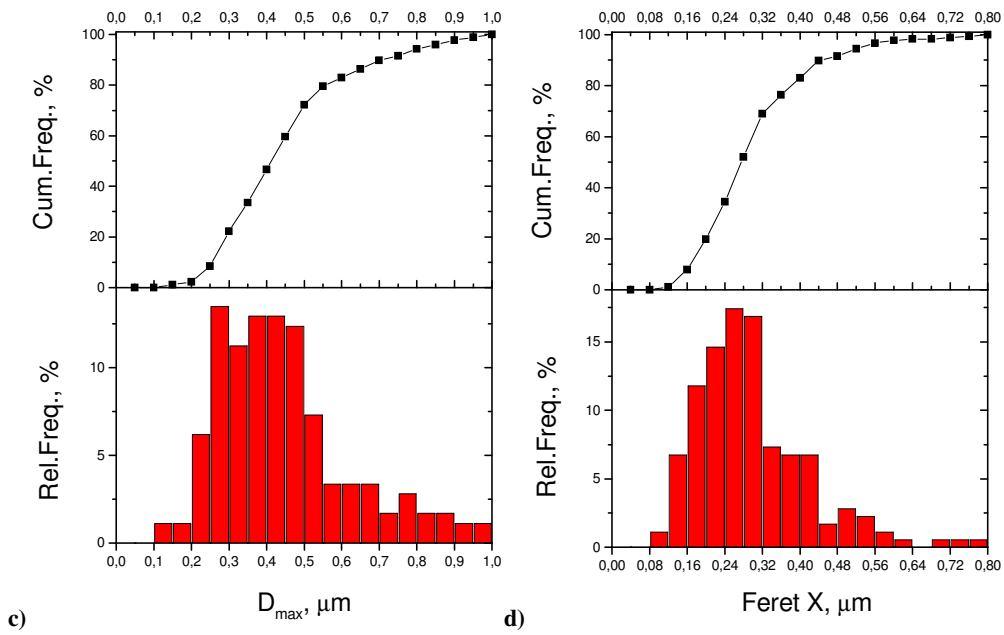
g)

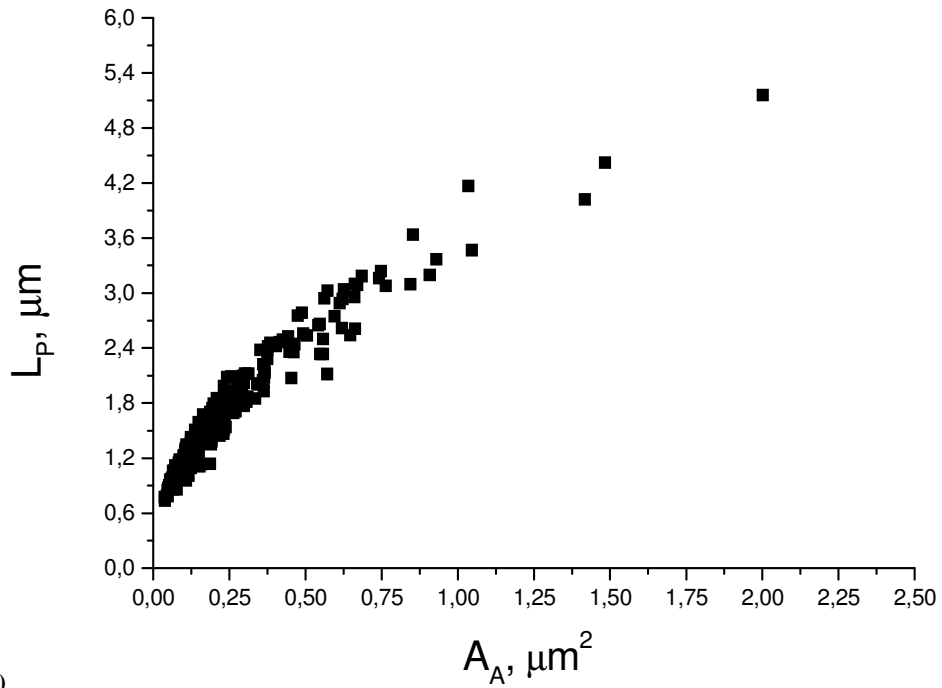
Slika 4.8-2 Stereologija nanočestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15 % nakon dva dana degradacije u fiziološkom rastvoru



a)

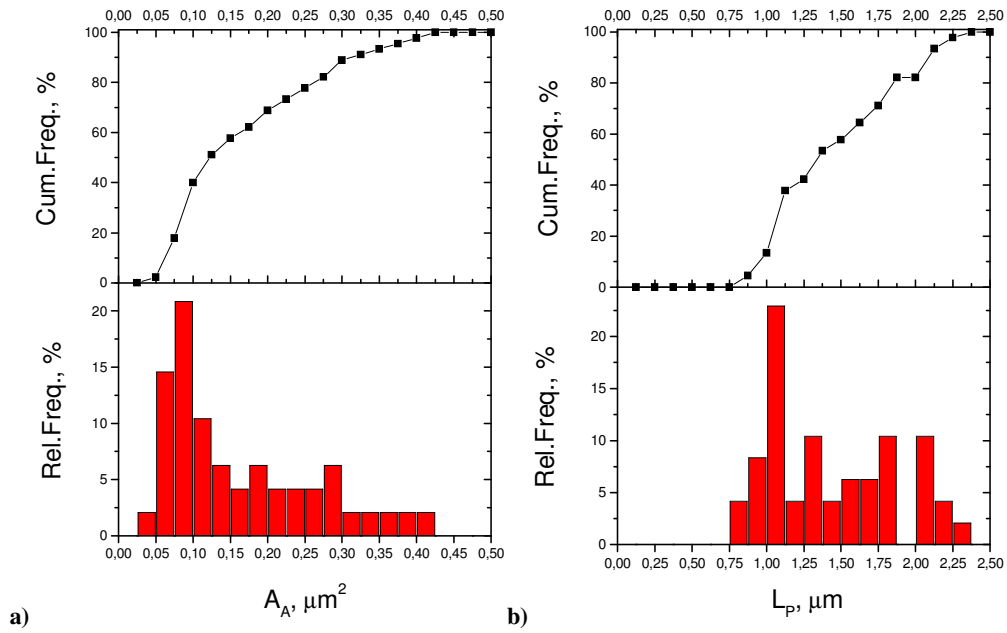
b)





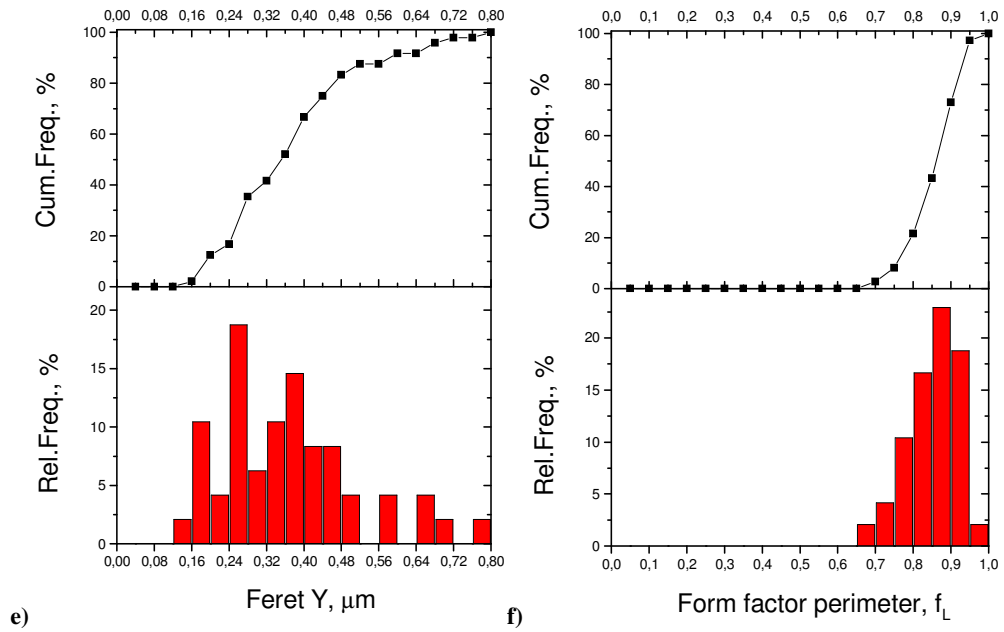
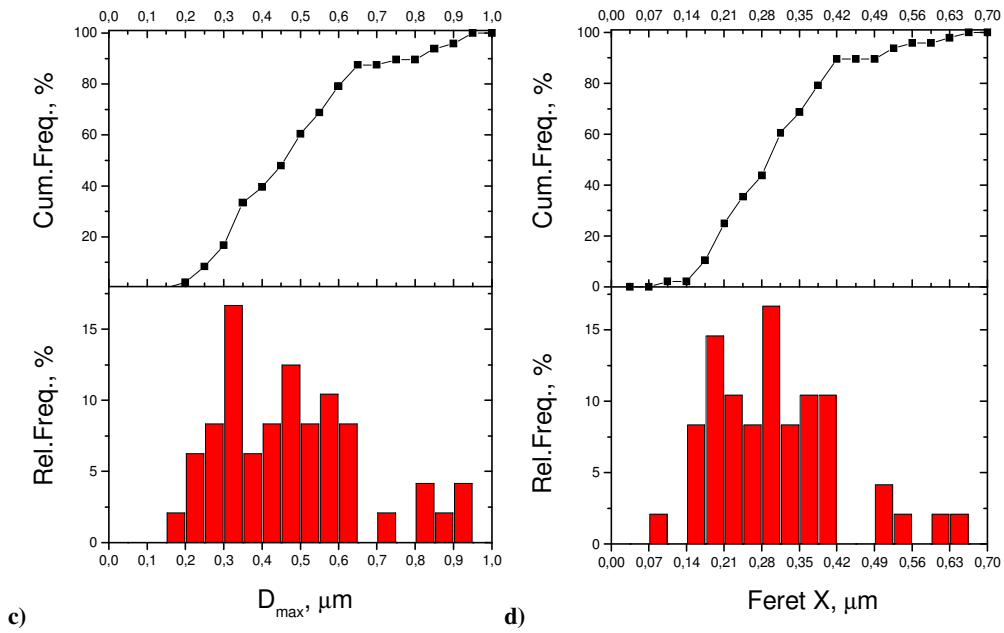
g)

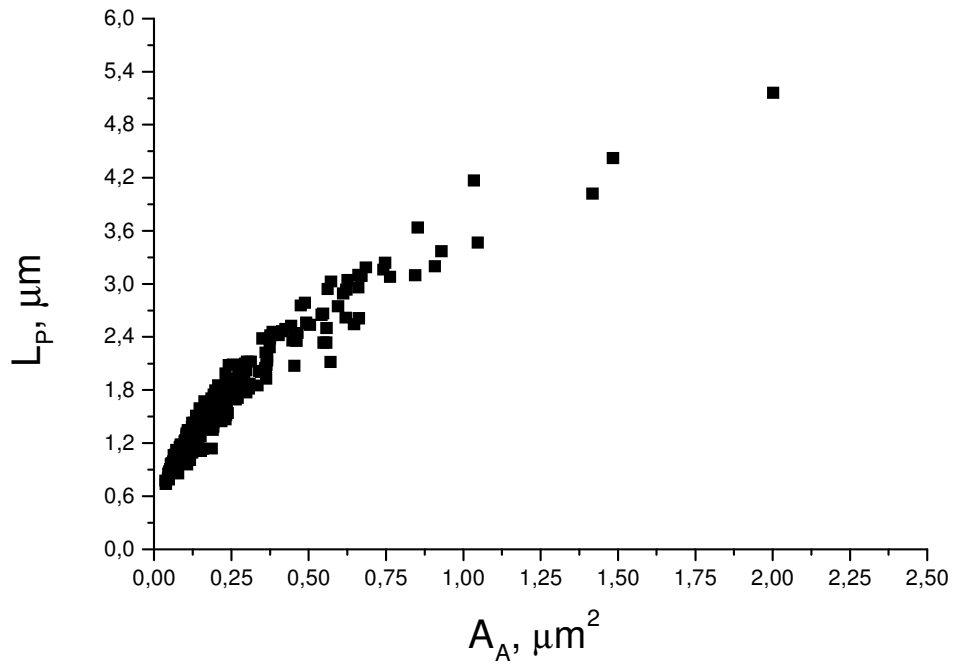
Slika 4.8-3 Stereologija čestica DLPLG/askorbinska kiselina 70/30 % nakon dva dana degradacije u fiziološkom rastvoru



a)

b)

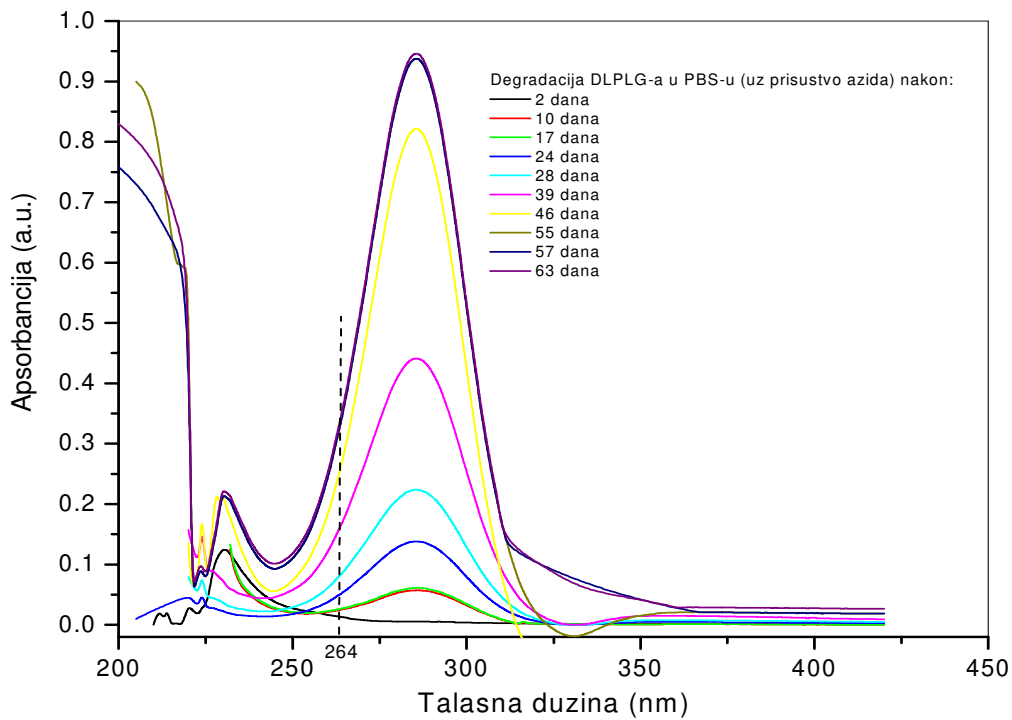




Slika 4.8-4 Stereologija čestica DLPLG/askorbinska kiselina 50/50 % nakon dva dana degradacije u fiziološkom rastvoru

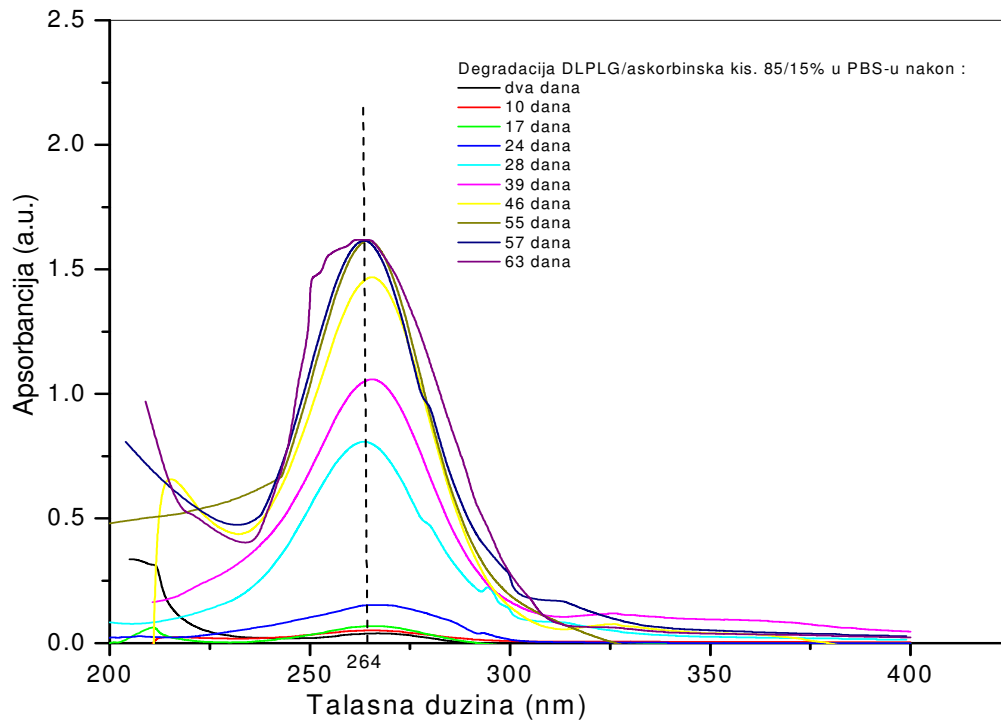
4.9 Degradacija nanosfera poli(DL-laktid-ko-glikolida) bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline u PBS-u kao degradacionom medijumu

Metodom UV spektrofotometrije je praćena degradacija čestica DLPLG-a i otpuštanje askorbinske kiseline iz polimerne matrice DLPLG-a tokom degradacije u PBS-u i to nakon dva, 10, 17, 24, 28, 39, 46, 55, 57 i 63 dana. Na slici 4.9-1 su prikazani UV spektri rastvora iznad taloga nanosfera DLPLG-a nakon različitih perioda degradacije u PBS-u kao degradacionom medijumu. Apsorbancija raste sa vremenom degradacije.



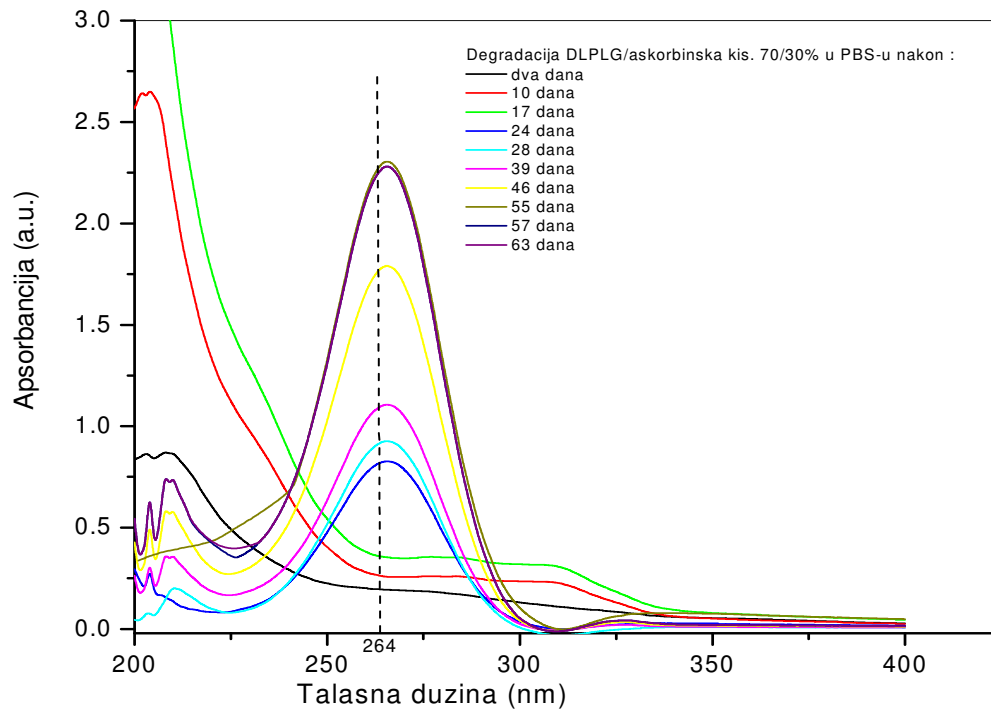
Slika 4.9-1 UV spektri rastvora iznad taloga nanosfera DLPLG-a nakon različitih perioda degradacije u PBS-u kao degradacionom medijumu

Na slici 4.9-2 su prikazani UV spektri rastvora iznad taloga čestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% nakon različitih perioda degradacije u PBS-u kao degradacionom medijumu



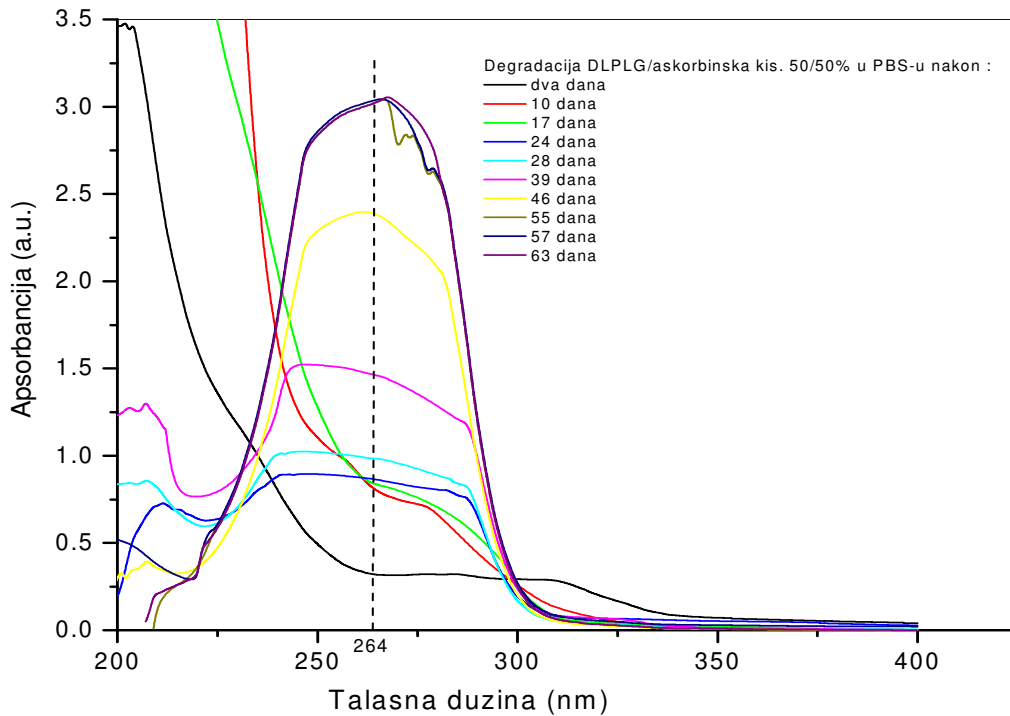
Slika 4.9-2 UV spektri rastvora iznad taloga nanočestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% nakon različitih perioda degradacije u PBS-u kao degradacionom medijumu

Na slici 4.9-3 su prikazani UV spektri rastvora iznad taloga čestica DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% nakon različitih perioda degradacije u PBS-u kao degradacionom medijumu



Slika 4.9-3 UV spektri rastvora iznad taloga čestica DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% nakon različitih perioda degradacije u PBS-u kao degradacionom medijumu

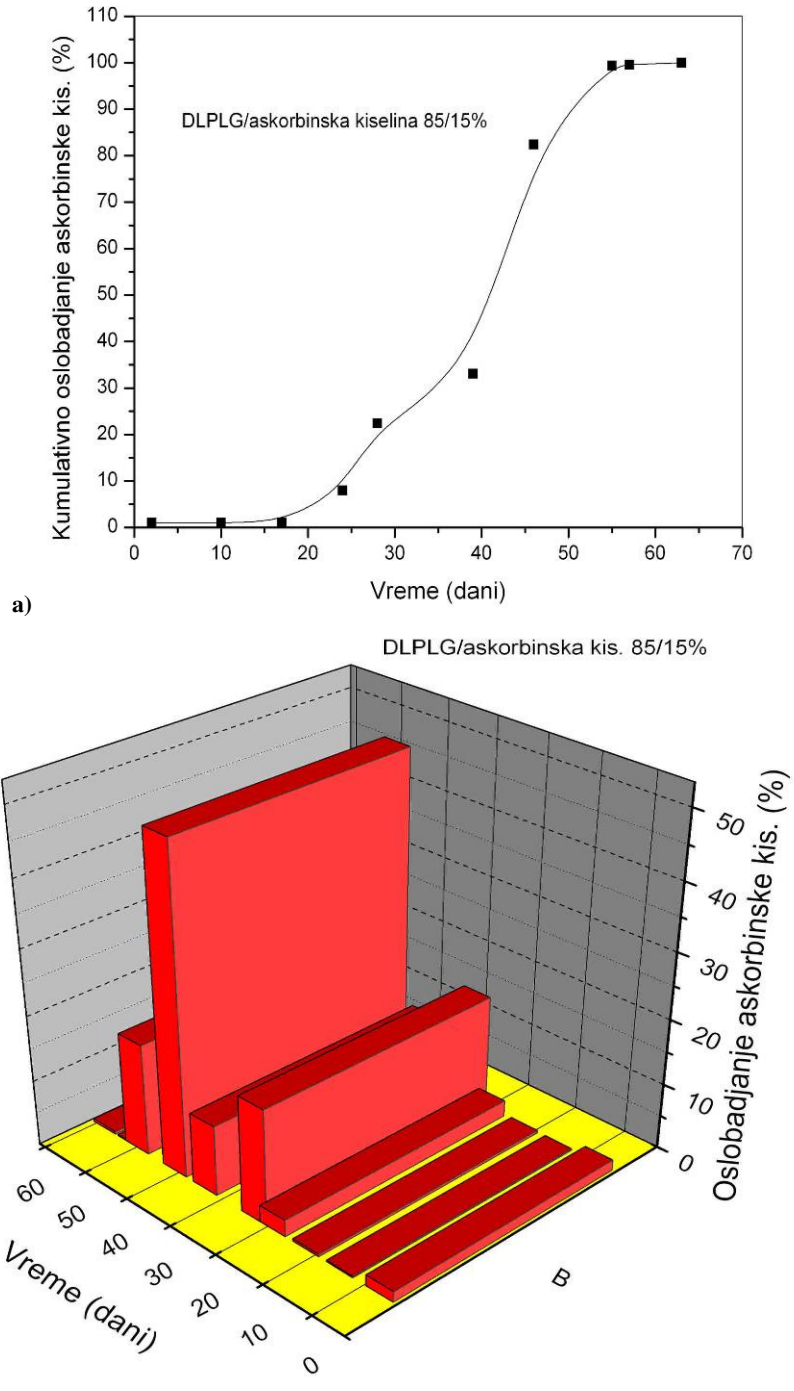
Na slici 4.9-4 su prikazani UV spektri rastvora iznad taloga čestica DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% nakon različitih perioda degradacije u PBS-u kao degradacionom medijumu



Slika 4.9-4 UV spektri rastvora iznad taloga čestica DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% nakon različitih perioda degradacije u PBS-u kao degradacionom medijumu

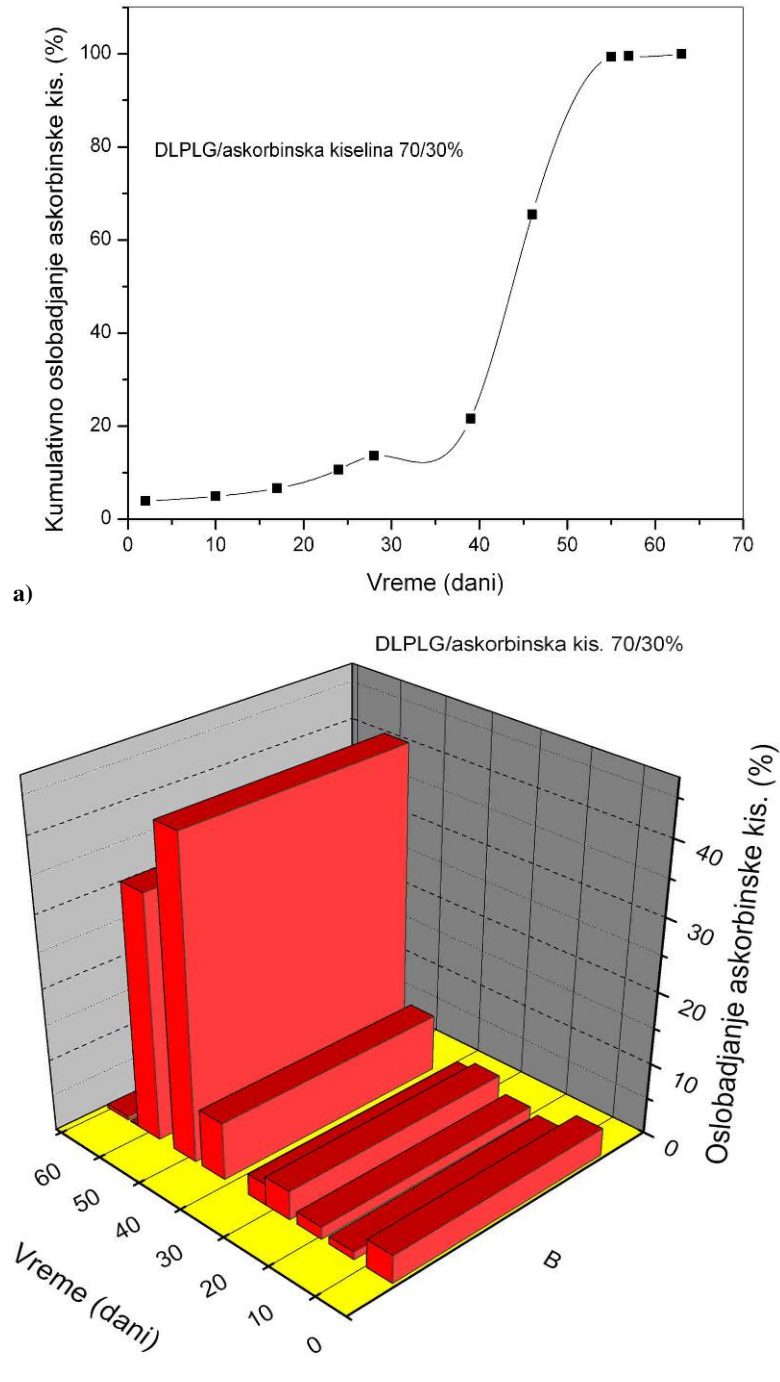
Otpuštanje askorbinske kiseline iz čestica DLPLG-a je praćeno metodom UV spektrofotometrije u PBS-u kao degradacionom medijumu tokom 63 dana. U PBS-u je radjen eksperiment i radi potvrde materijalnog bilansa prethodnog eksperimenta. U toku približno 55 dana otpuštena je sva količina askorbinske kiseline ali se dinamika otpuštanja blago razlikuje u slučaju fiziološkog rastvora i PBS-a. To se delom objašnjava time što pH vrednost rastvora opada sporije kod PBS-a nego u slučaju fiziološkog rastvora, a delom time da su u rastvoru prisutni azidi čime se sprečava bilo koja vrsta biološke degradacije (usled prisustva bakterija). PBS bi trebalo da ima stabilniji, odnosno održiviji pH rastvora od fiziološkog rastvora pa je zato otpuštanje vitamina C u početku sporije nego kod fiziološkog, a kasnije brže.

Na slici 4.9-5 je data kumulativna kriva i relativni prikaz oslobađanja askorbinske kiseline iz čestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% izraženo u procentima.



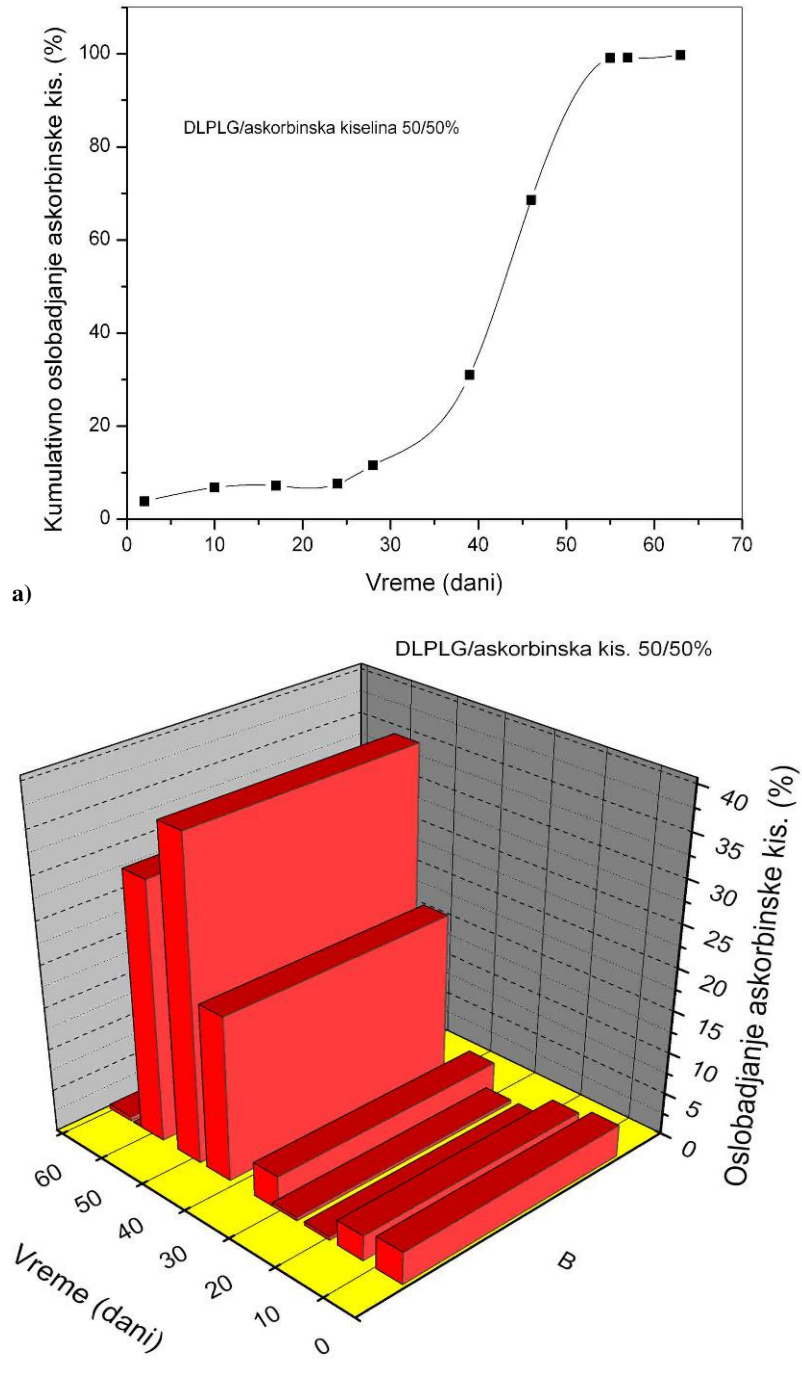
Slika 4.9-5 Oslobađanje askorbinske kiseline u procentima iz nanočestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% tokom vremena a) kumulativna kriva i b) relativni prikaz

Na slici 4.9-6 je data kumulativna kriva i relativni prikaz oslobađanja askorbinske kiseline iz čestica DLPLG/askorbinska kis 70/30% izraženo u procentima.



Slika 4.9-6 Oslobađanje askorbinske kiseline u procentima iz čestica DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% tokom vremena a) kumulativna kriva i b) relativni prikaz

Na slici 4.9-7 je data kumulativna kriva i relativni prikaz oslobađanja askorbinske kiseline iz čestica DLPLG/askorbinska kis 50/50% izraženo u procentima.



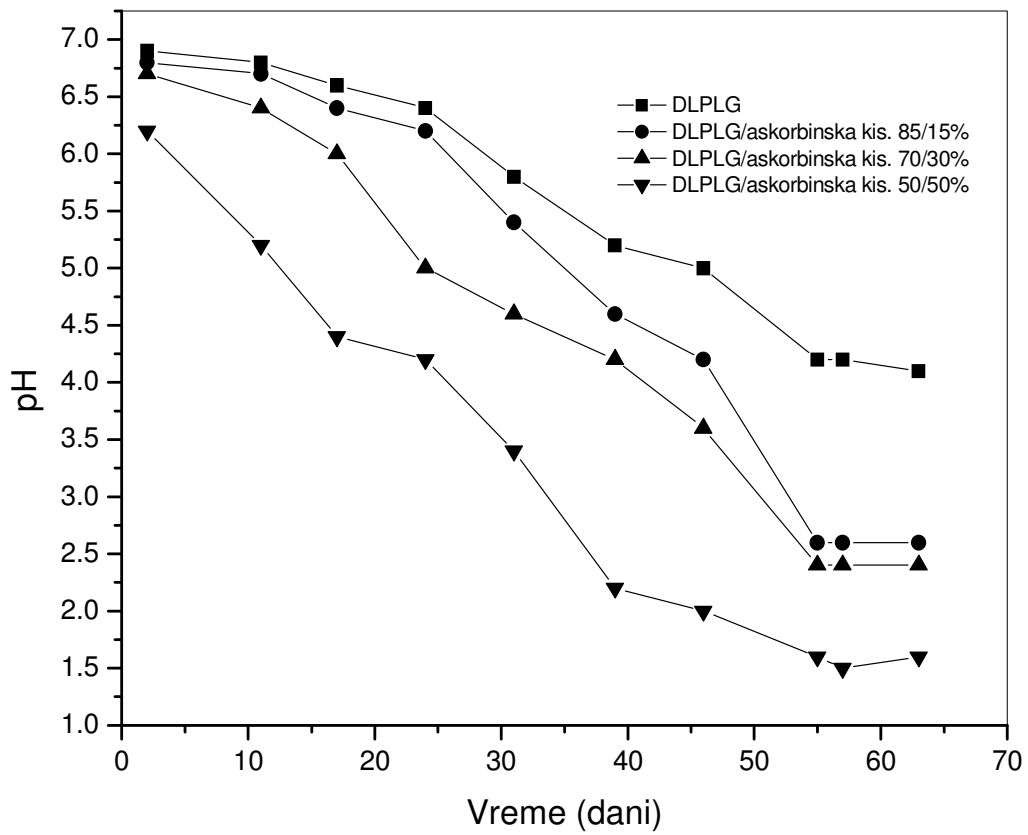
Slika 4.9-7 Oslobađanje askorbinske kiseline u procentima iz čestica DLPLG/askorbinska kiseline 50/50% tokom vremena a) kumulativna kriva i b) relativni prikaz

Masa mlečne kiseline, krajnjeg produkta degradacije DLPLG-a, je u eksperimentu u kome je kao degradacioni medijum korišćen PBS izračunavana sa spektara snimanih u 63-ćem danu a na isti način kao i u eksperimentu u kome je kao degradacioni medijum korišćen fiziološki rastvor (tabela 4.9-1).

Tabela 4.9-1 Masa mlečne kiseline izračunata na osnovu apsorpcije na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije od 220nm sa spektara snimanih u 63-ćem danu degradacije i kalibracione krive za mlečnu kiselinu

DLPLG/askorbinska kiselina	Apsorbancija na 220nm	Masa (mg)
100/0%	0.590	1.192
85/15%	0.531	1.050
70/30%	0.421	0.810
50/50%	0.317	0.587

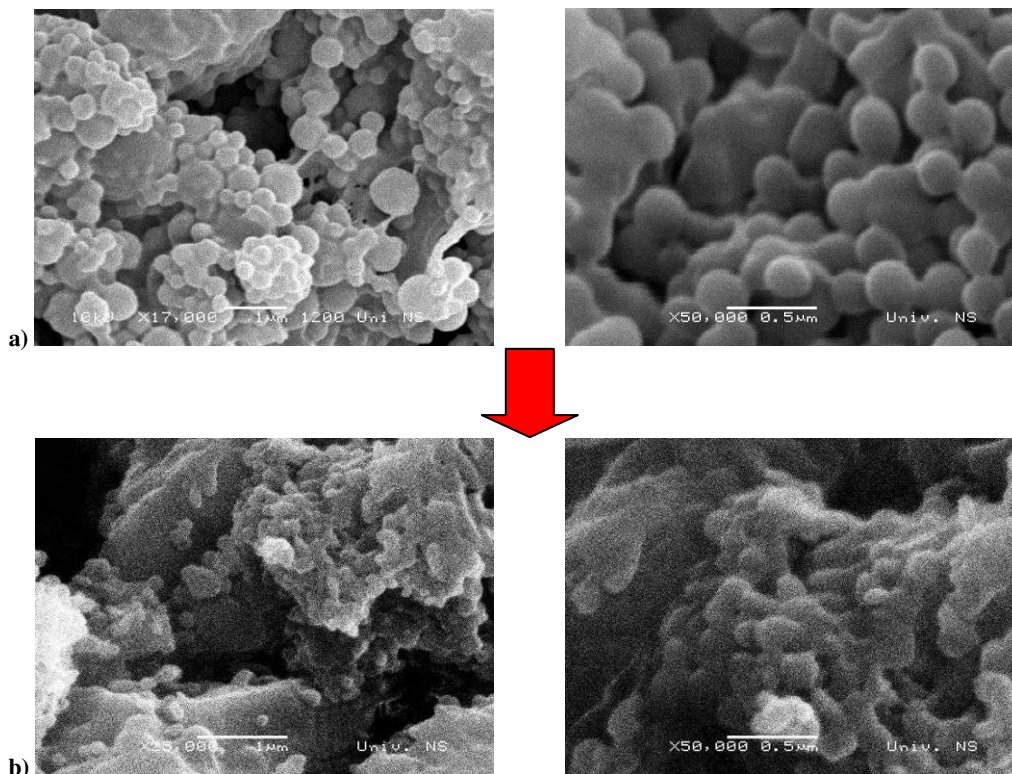
I u rastvoru PBS-a je praćena promena pH vrednosti rastvora sa vremenom degradacije čestica DLPLG-a bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline. Sa vremenom degradacije dolazi do opadanja pH vrednosti rastvora (slika 4.9-8).



Slika 4.9-8 Promena pH vrednosti PBS rastvora, sa vremenom, tokom procesa degradacije čestica DLPLG-a bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline

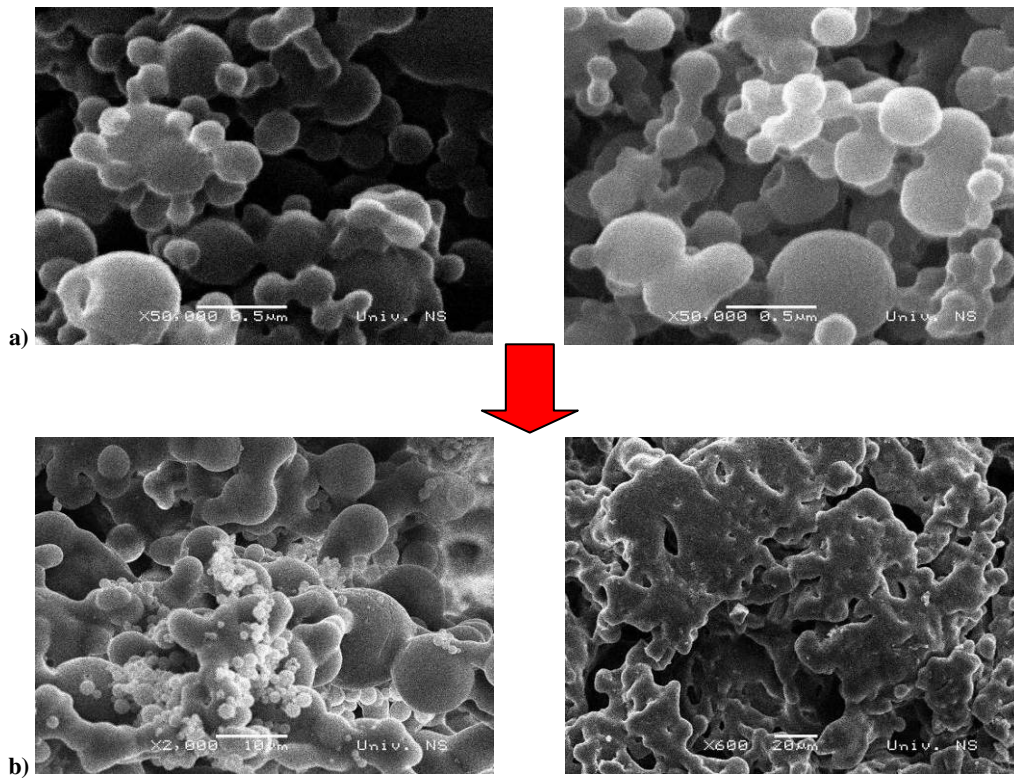
4.10 Morfološke promene tokom degradacije DLPLG i DLPLG/askorbinska kiselina čestica u PBS-u kao degradacionom medijumu

Morfološke promene čestica DLPLG-a sa i bez askorbinske kiseline nastale tokom *in vitro* degradacije u PBS-u kao degradacionom medijumu su ispitivane metodom skenirajuće elektronske mikroskopije. Uzorci su u prethodnom eksperimentu degradacije u fiziološkom rastvoru ispitivani nakon dva, 24 i 39 dana dok su tokom degradacije u PBS-u odvajani nakon 17 i 28 dana degradacije, sušeni i analizirani. Sa SEM fotografija nanočestica DLPLG-a bez askorbinske kiseline nakon 17 dana dana degradacije (slika 4.10-1 a)) se vidi da su čestice prilično aglomerisane dok se sa SEM fotografija čestica nakon 28 dana vidi da su čestice izrazito aglomerisane formirajući film (slika 4.10-1 b)) što je u skladu sa morfološkim promenama nastalim prilikom degradacije čestica u fiziološkom rastvoru (slika 4.7-1).



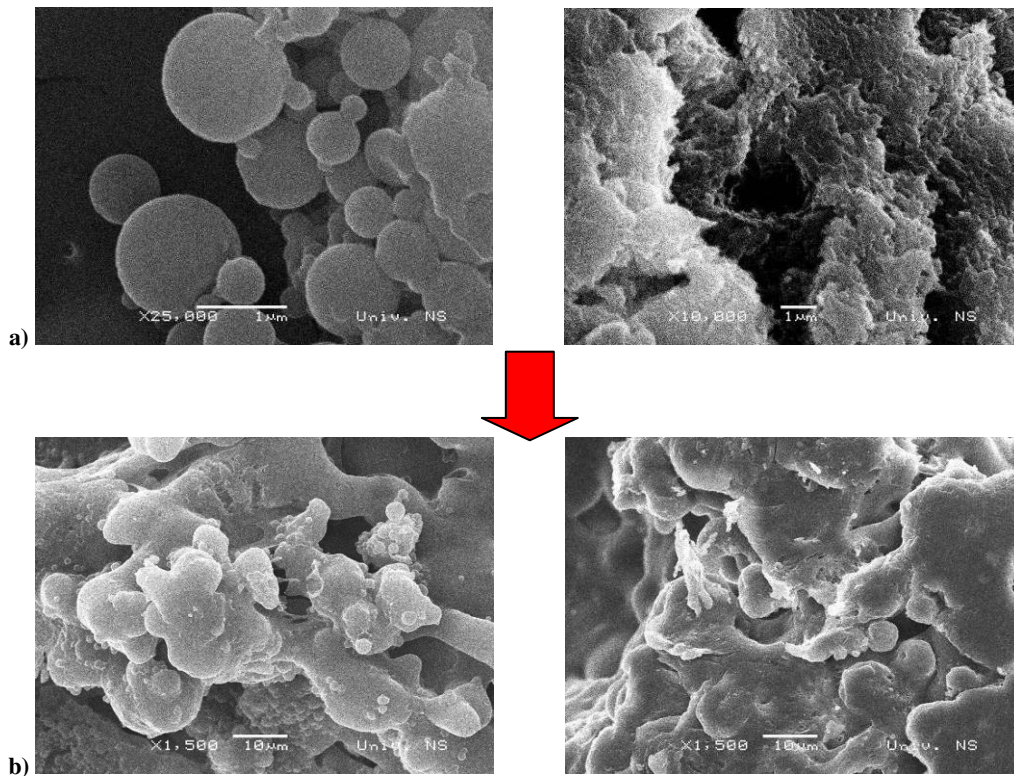
Slika 4.10-1 SEM slike nanosfera DLPLG-a nakon a) 17 dana i b) 28 dana degradacije u fosfatnom pufer rastvoru

Na slici 4.10-2 su prikazane SEM fotografije DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% čestica nakon 17 dana (4.10-2 a) i 28 dana (4.10-2 b) degradacije u PBS-u. Čestice su se aglomerisale obrazujući film.



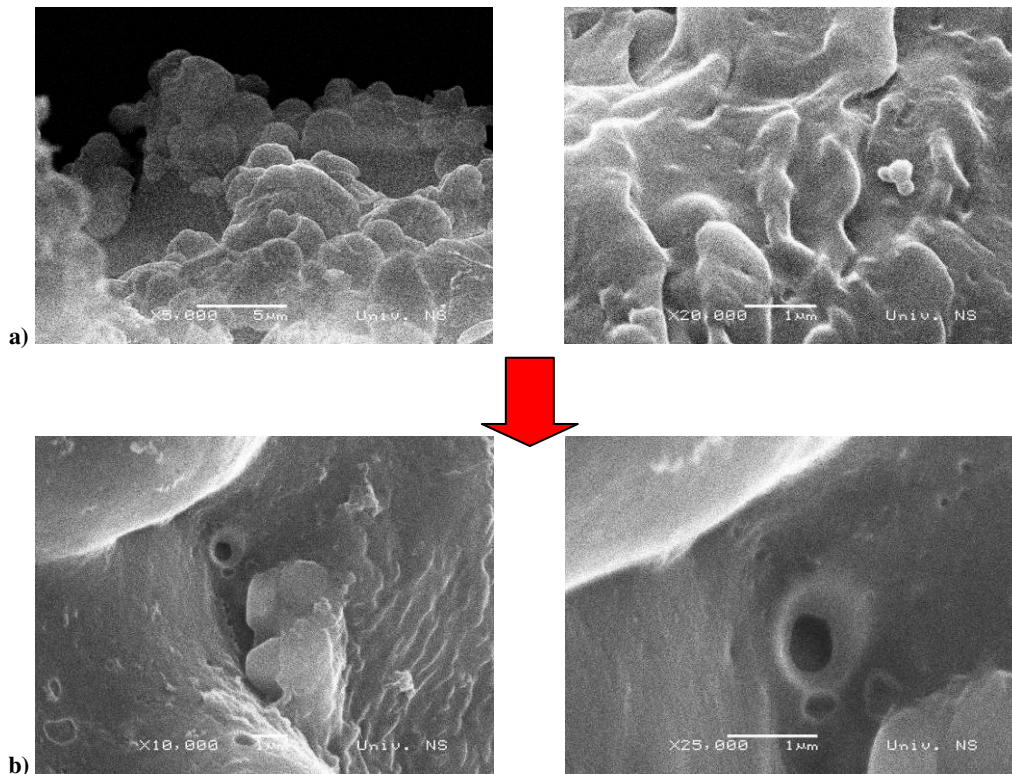
Slika 4.10-2 SEM slike nanočestica DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% nakon a) 17 dana i b) 28 dana degradacije u fosfatnom pufer rastvoru

Na slici 4.10-3 su prikazane SEM fotografije DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% čestica nakon 17 dana (4.10-2 a) i 28 dana (4.10-2 b) degradacije u PBS-u i kao i kod prethodnih uzoraka je došlo do njihove potpune aglomeracije.



Slika 4.10-3 SEM slike čestica DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% nakon a) 17 dana i b) 28 dana degradacije u fosfatnom pufer rastvoru

Na slici 4.10-4 se vide SEM slike uzorka DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% nakon 17 dana (4.10-2 a) i 28 dana (4.10-2 b) degradacije u PBS-u i kao i kod prethodnih uzoraka je došlo do njihove potpune aglomeracije. Na slikama nakon 28 dana degradacije se jasno vidi i stvaranje porozne strukture filma (4.10-2b).



Slika 4.10-4 SEM slike nanočestica DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% nakon a) 17 dana i b) 28 dana degradacije u fosfatnom pufer rastvoru

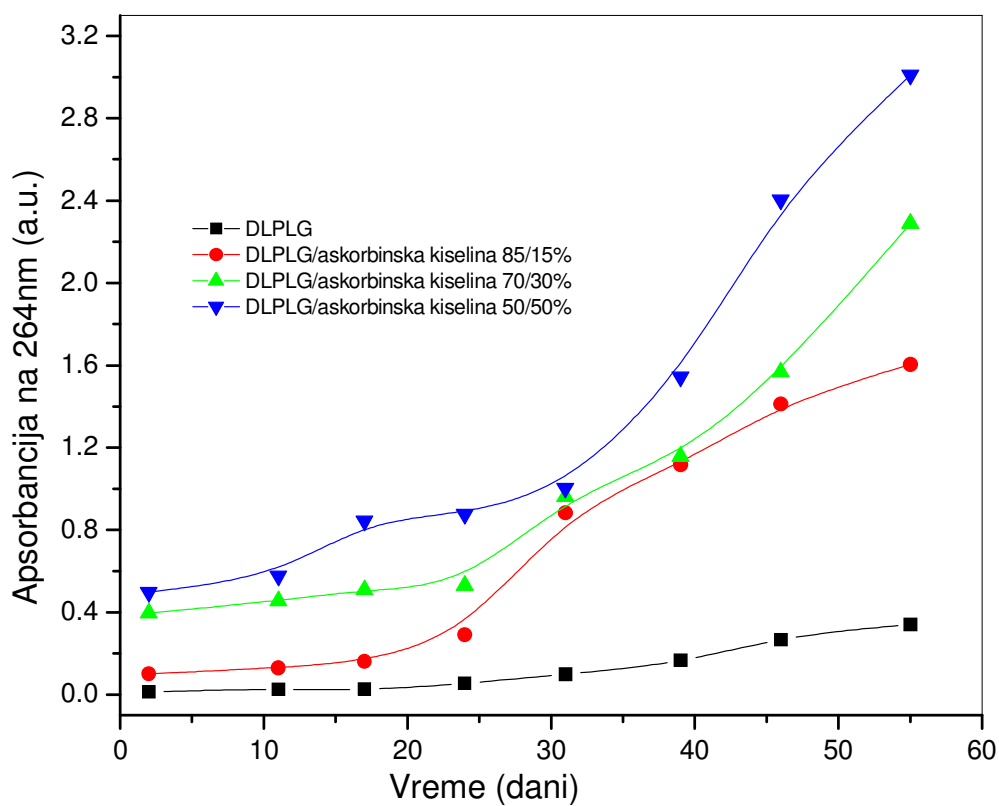
5 Diskusija

5.1 Diskusija rezultata

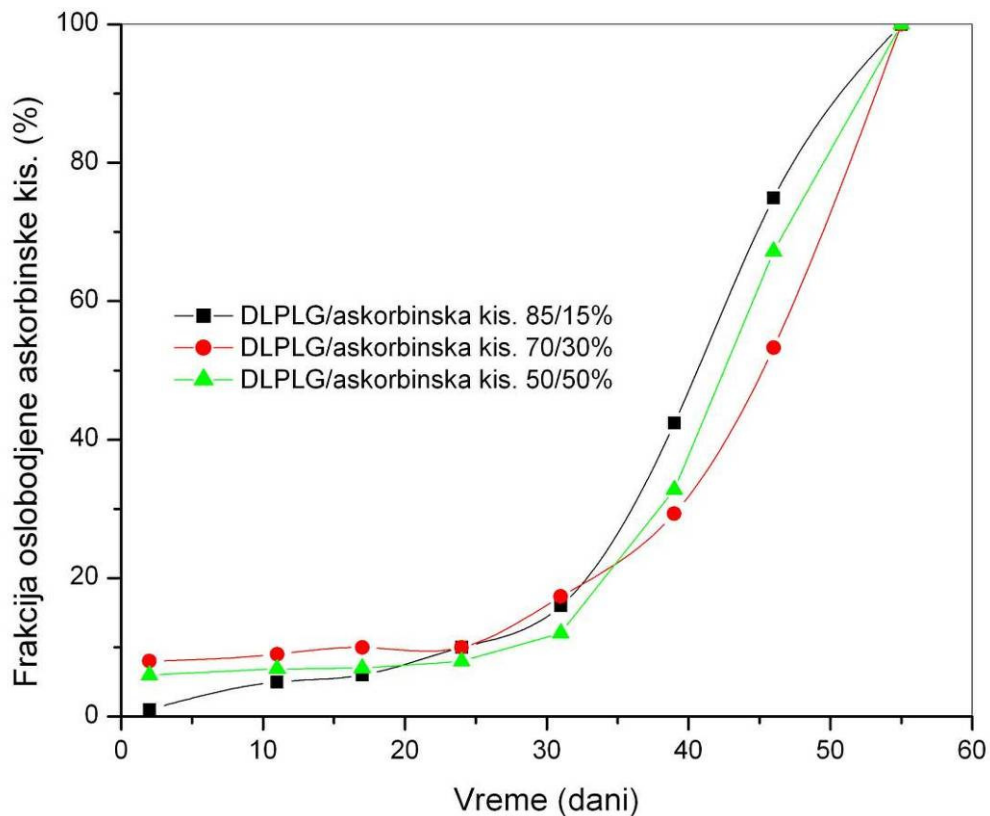
Čestice kopolimera poli(DL-laktid-ko-glikolida) sa i bez inkapsulirane askorbinske kiseline su dobijene fizičko-hemijskom metodom rastvarač/nerastvarač i uz korišćenje centrifugalnog procesiranja. Različite koncentracije askorbinske kiseline su inkapsulirane u čestice kopolimera homogenizacijom vodene i organske faze. Čestice sa različitim sadržajem askorbinske kiseline imaju različite morfološke karakteristike, aglomeraciju, različitu uniformnost, oblike i veličine. Morfološke karakteristike čestica takođe zavise i od vrste upotrebljenog stabilizatora. Srednje veličine čestica DLPLG-a dobijenih u slučaju kada je kao stabilizator korišćen polivinil alkohol iznose od 150 do 230nm dok srednje veličine čestica DLPLG-a dobijenih u eksperimentu u kome je kao stabilizator korišćen polivinil pirolidon iznose od 110 do 170nm (bazirano na stereološkim parametrima D_{max} , feret x i feret y). Unošenjem do 15% askorbinske kiseline u čestice DLPLG-a sačuvana je njihova sferičnost, veličina i uniformnost. Prinos čestica DLPLG-a sa i bez askorbinske kiseline je veći od 50% dok je efikasnost inkapsulacije askorbinske kiseline u čestice DLPLG-a veća od 90%.

Proces degradacije nanočestica DLPLG-a sa i bez inkapsulirane askorbinske kiseline kao i proces oslobađanja askorbinske kiseline iz čestica DLPLG-a je proučavan metodom UV-VIS spektrofotometrije. Na osnovu dobijenih rezultata je pokazano da čestice u periodu od dva meseca u potpunosti degradiraju a da je celokupna količina inkapsulirane kiseline oslobođena i do kraja ovog perioda vremena talog (čestice) više nije uočljiv. U prvih 24 dana degradacije DLPLG-a u fiziološkom rastvoru kao degradacionom medijumu, u slučaju svih uzoraka, manje od 10% askorbinske kiseline je otpušteno u rastvor. Celokupna koncentracija askorbinske kiseline je otpuštena u toku 8 nedelja u slučaju svih DLPLG/askorbinska kiselina uzoraka. Uočeno je da nije došlo do dekompozicije askorbinske kiseline. Različite jonizujuće forme askorbinske kiseline imaju različite redoks osobine, tako da je redoks-hemija askorbinske kiseline visoko pH zavisna. Askorbinska kiselina se razgrađuje u biološki neaktivne komponente, auto-oksidacijom samo na povišenim pH odnosno u alkalnoj sredini [277, 325, 326]. Na nižim pH askorbinska kiselina se razlaže enzimskom oksidacijom. Pošto u rastvoru nisu prisutni enzimi a polimer degradacijom daje mlečnu i glikolnu kiselinu, to je i pH vrednost niža od neutralne. UV spektri (slika 4.6-2; 4.6-3; 4.6-4) su karakterističani za askorbinsku kiselinu dok apsorpcioni maksimumi (koji bi odgovarali 2,3-diketo-L-gulonskoj kiselini (prvom

produktu razlaganja askorbinske kiseline) nisu uočeni. Na slici 5.1-1 su prikazane uporedno krive zavisnosti apsorbancije na talasnoj dužini apsorpcionog maksimuma ($\lambda=264\text{nm}$) od vremena degradacije, u fiziološkom rastvoru, u slučaju uzoraka DLPLG-a, DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%, DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% i DLPLG/askorbinska kiselina 50/50%. Na slici 5.1-2 su prikazane uporedno kumulativne krive oslobađanja askorbinske kiseline u procentima tokom vremena degradacije, u fiziološkom rastvoru, u slučaju uzoraka DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%, DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% i DLPLG/askorbinska kiselina 50/50%.



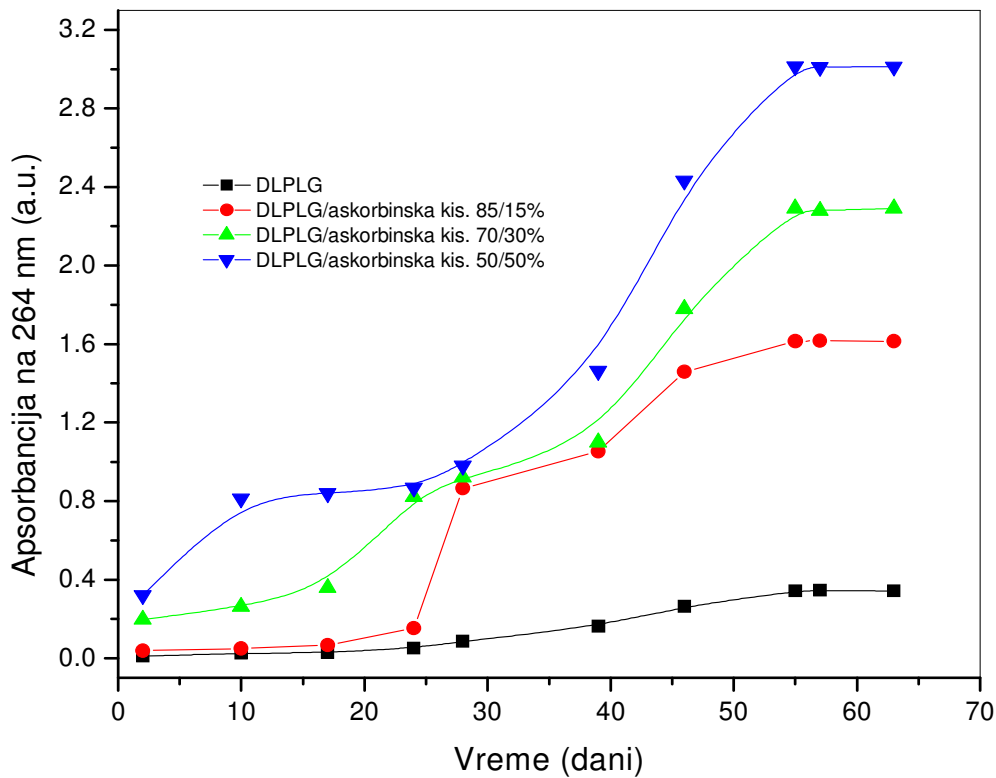
Slika 5.1-1 Uporedne krive zavisnosti apsorbancije na talasnoj dužini apsorpcionog maksimuma ($\lambda=264\text{nm}$) od vremena degradacije, u fiziološkom rastvoru, u slučaju uzoraka DLPLG-a, DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%, DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% i DLPLG/askorbinska kiselina 50/50%.



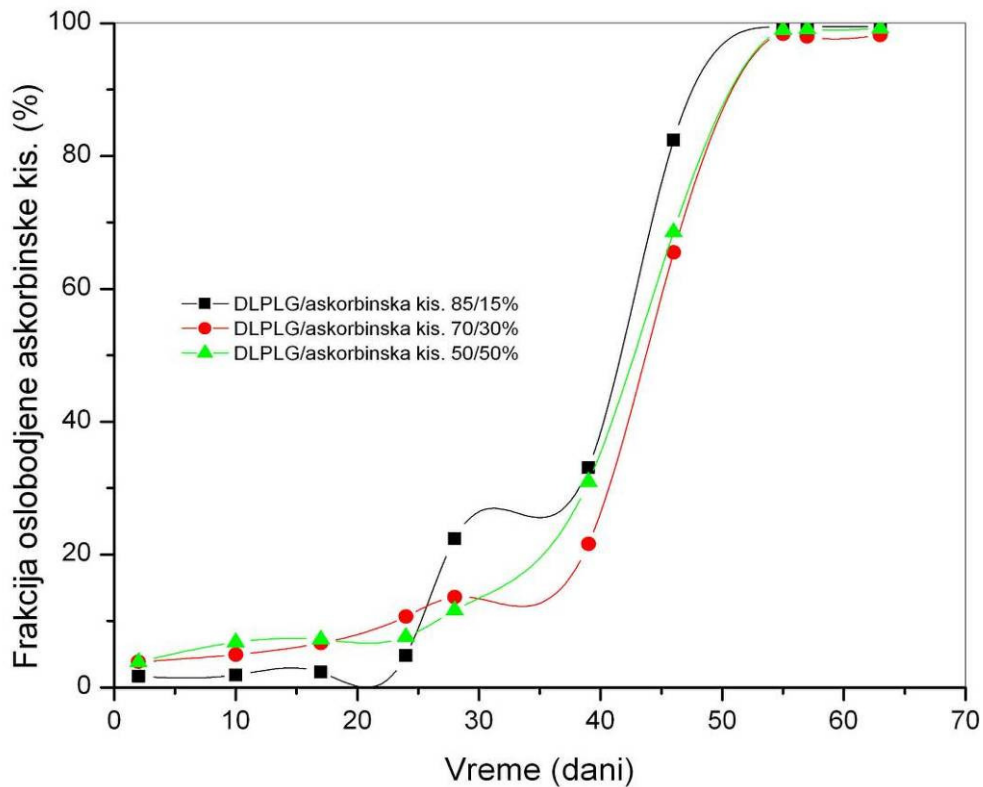
Slika 5.1-2 Kumulativne krive oslobađanja askorbinske kiseline u procentima tokom vremena degradacije, u fiziološkom rastvoru, u slučaju uzoraka DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%, DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% i DLPLG/askorbinska kiselina 50/50%.

Praćenje procesa degradacije čestica DLPLG-a je kao i praćenje procesa otpuštanja askorbinske kiseline iz čestica DLPLG-a rađeno i u fosfatnom pufer rastvoru (PBS) uz prisustvo azida. Azidi su prisutni u degradacionom medijumu kako bi se sprečilo bakterijsko delovanje. Eksperiment je rađen radi potvrde materijalnog bilansa prethodnog eksperimenta kao i radi ispitivanja uticaja degradacionog medijuma na sam proces degradacije. Uzorci su ispitivani periodično u približno istim vremenskim intervalima kako bi rezultati mogli biti upoređivani sa rezultatima prethodnog eksperimenta. U PBS-u je trajanje eksperimenta produženo i nakon 55 dana koliko je prethodni eksperiment degradacije u fiziološkom rastvoru trajao a gde je uočeno da je polimer u ovom vremenskom periodu u potpunosti degradirao a da je sav vitamin otpušten. To je i potvrđeno u eksperimentu sa PBS-om. Apsoorbancija rastvora vitamina C na $\lambda_{\max}=264\text{nm}$ raste tokom vremena degradacije i to do 55 dana a nakon toga (57 i 63 dana) ostaje ista, nepromenjena. Dinamika otpuštanja vitamina C je nešto drugačija u slučaju degradacije

čestica u PBS-u, odnosno, vitamin C se u početku sporije otpušta, što se objašnjava sporijom promenom pH rastvora kao i prisustvom azida. Na slici 5.1-3 su prikazane uporedno krive zavisnosti absorpcionog maksimuma od vremena degradacije, u PBS-u kao degradacionom medijumu, u slučaju uzoraka DLPLG-a, DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%, DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% i DLPLG/askorbinska kiselina 50/50%. Na slici 5.1-4 su prikazane uporedno kumulativne krive oslobađanja askorbinske kiseline u procentima tokom vremena degradacije, u PBS-u, u slučaju uzoraka DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%, DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% i DLPLG/askorbinska kiselina 50/50%.



Slika 5.1-3 Uporedne krive zavisnosti apsorbancije na talasnoj dužini apsorpacionog maksimuma ($\lambda=264\text{nm}$) od vremena degradacije, u PBS-u, u slučaju uzoraka DLPLG-a, DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%, DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% i DLPLG/askorbinska kiselina 50/50%.



Slika 5.1-4 Kumulativne krive oslobađanja askorbinske kiseline u procentima tokom vremena degradacije, u PBS-u, u slučaju uzoraka DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%, DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% i DLPLG/askorbinska kiselina 50/50%.

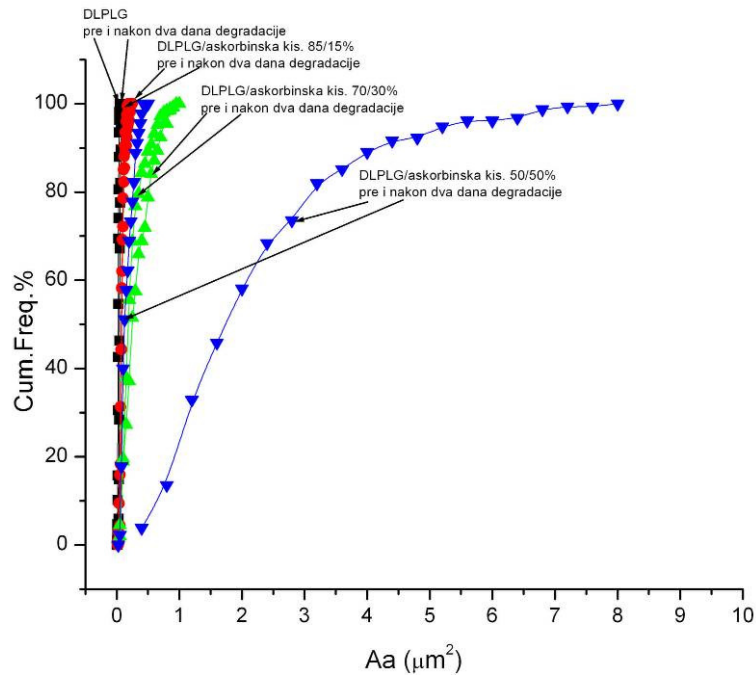
Na osnovu SEM fotografija uzorka DLPLG-a i uzorka DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%; 70/30% i 50/50% snimanih nakon dva dana degradacije u fiziološkom rastvoru je urađena stereološka analiza (tabela 5.1-1, slike 5.1-5; 5.1-6; 5.1-7; 5.1-8; 5.1-9; 5.1-10) i na osnovu rezultata je potvrđeno da u slučaju praha DLPLG-a bez inkapsulirane askorbinske kiseline inicijalno dolazi do povećanja dimenzija čestica ali i do povećanja sferičnosti čestica dok u slučaju uzorka sa različitim sadržajem askorbinske kiseline dolazi do smanjenja dimenzija čestica ali i kod njih je povećana sferičnost.

Na osnovu SEM fotografija kao i stereoloških rezultata mehanizam procesa degradacije bi bio sledeći: U početku degradacije dolazi do difuzije fiziološkog rastvora u polimernu česticu pri čemu dolazi do bubrenja čestice (povećanje čestica samog DLPLG-a) ali i istovremenog laganog otpuštanja askorbinske kiseline u slučaju uzorka koji sadrže askorbinsku kiselinu (smanjenje čestica). Nakon dva dana degradacije čestice i dalje imaju

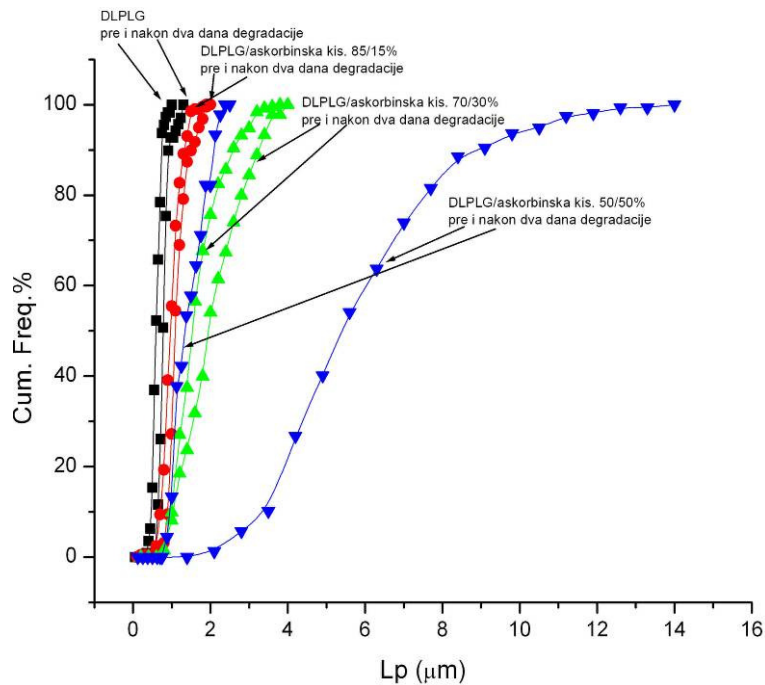
sferičan oblik čak je i perimeter form factor koji karakteriše oblik čestice bliži jedinici što znači da je sferičnost povećana. Nakon toga dolazi do usporavanja otpuštanja askorbinske kiseline jer dolazi do aglomeracije čestica koje su u vrlo bliskom kontaktu. S obzirom da uzorak nije mešan, polazne čestice koje su bile u bliskom kontaktu, su nadalje povećavale svoju kontaktnu površinu, došlo je do njihovog slepljivanja (sinterovanja) i stvaranja filma (koji se može posmatrati i kao jedna velika besporozna zona). Kako polimer nakon 24 dana degradira tako se na filmu javljaju pore i ponovo dolazi do naglijeg oslobađanja askorbinske kiseline. Sa vremenom degradacije stepen poroznosti se povećava do potpune degradacije uzoraka odnosno do potpunog oslobađanja askorbinske kiseline u rastvor.

Tabela 5.1-1 Rezultati stereološke analize pre i nakon dva dana degradacije u fiziološkom rastvoru za slučaj DLPLG, DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%, DLPLG/askorbinska kiselina 70/30%, DLPLG/askorbinska kiselina 50/50%. U tabeli su prikazane srednje vrednosti stereoloških parametara.

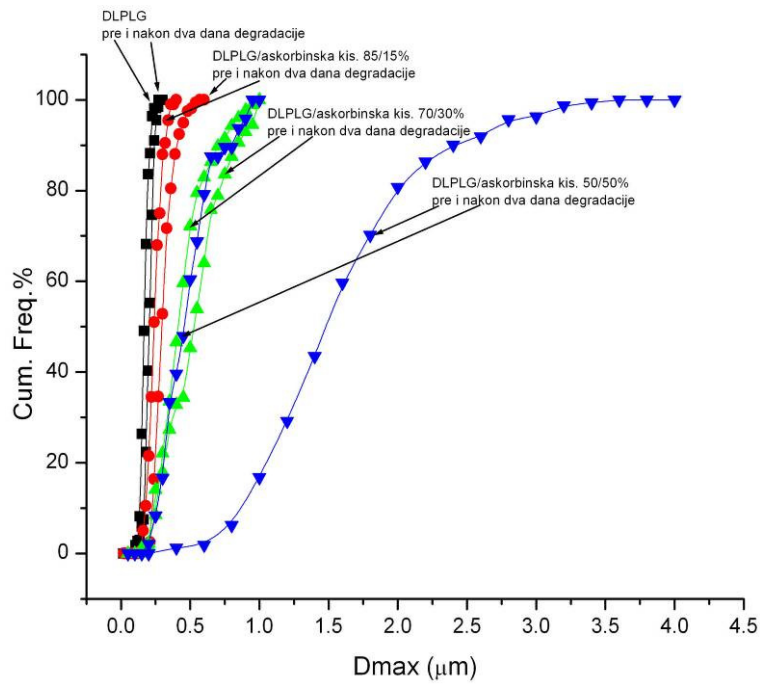
Odnos DLPLG/askorbinska kiselina	L_p (μm) (mean)	A_a (μm) (mean)	D_{max} (μm) (mean)	feret X (μm) (mean)	feret Y (μm) (mean)	f_L (mean)
100/0% (pre)	0.60	0.02	0.17	0.12	0.11	0.90
100/0 % (nakon dva dana degradacije)	0.79	0.05	0.21	0.10	0.15	0.97
85/15% (pre)	1.17	0.09	0.31	0.20	0.23	0.84
85/15% (nakon dva dana degradacije)	1.00	0.08	0.24	0.18	0.17	0.99
70/30% (pre)	2.05	0.33	0.55	0.38	0.40	0.83
70/30% (nakon dva dana degradacije)	1.72	0.27	0.45	0.29	0.34	0.97
50/50% (pre)	5.89	2.28	1.56	1.24	1.10	0.76
50/50% (nakon dva dana degradacije)	1.84	1.20	0.47	0.31	0.36	0.92



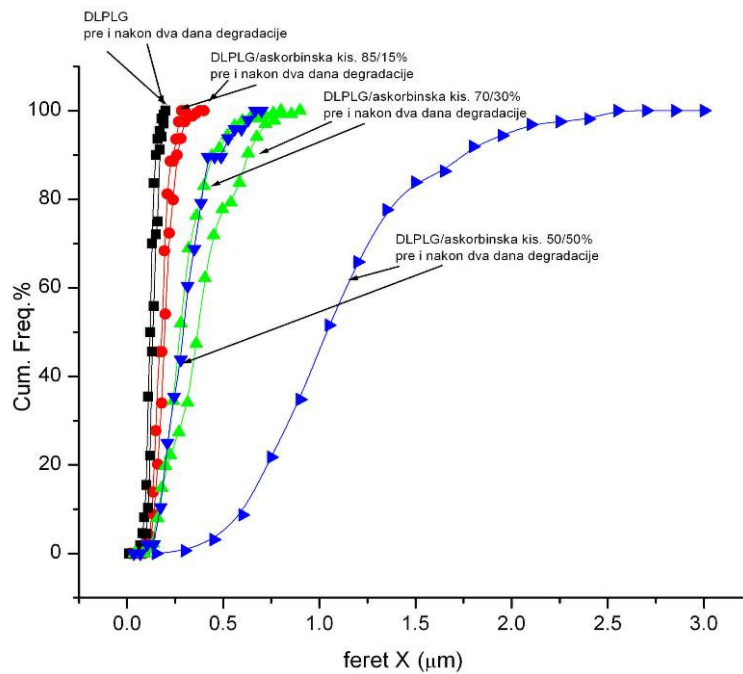
Slika 5.1-5 Uporedni rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG-a bez i sa askorbinskom kiselinom pre i nakon dva dana degradacije, u fiziološkom rastvoru, na osnovu poprečnog preseka čestice - A_a



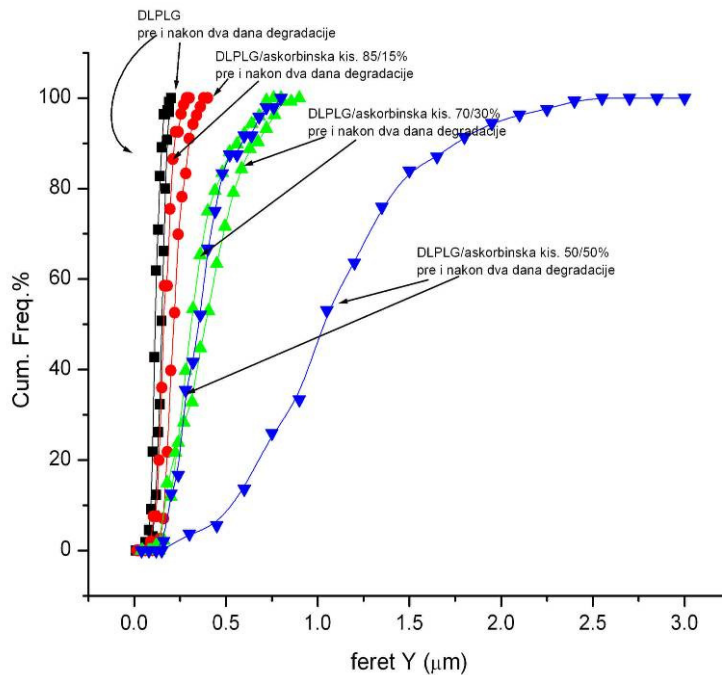
Slika 5.1-6 Uporedni rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG-a bez i sa askorbinskom kiselinom pre i nakon dva dana degradacije, u fiziološkom rastvoru, na osnovu obima čestice - L_p



Slika 5.1-7 Uporedni rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG-a bez i sa askorbinskom kiselinom pre i nakon dva dana degradacije, u fiziološkom rastvoru, na osnovu maksimalnog prečnika čestice - D_{max}



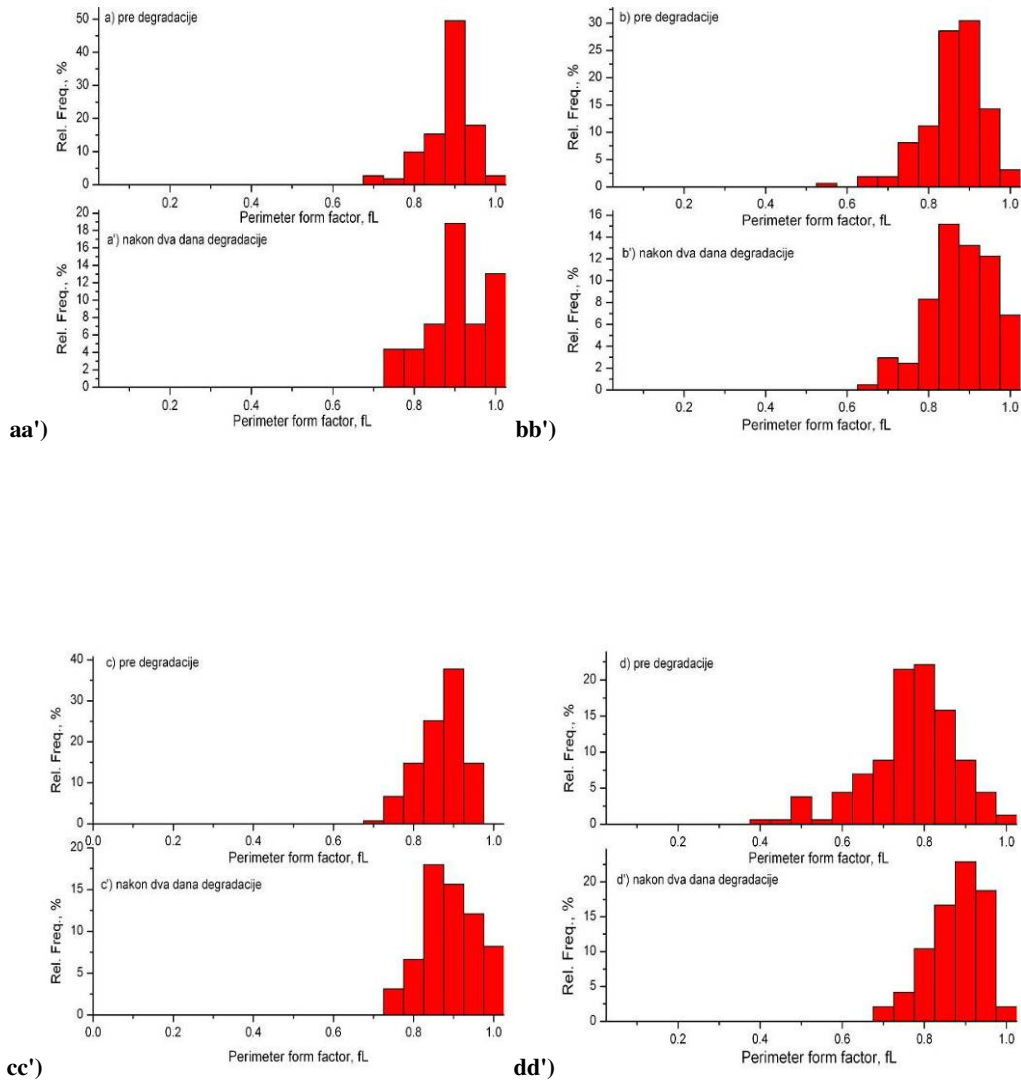
Slika 5.1-8 Uporedni rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG-a bez i sa askorbinskom kiselinom pre i nakon dva dana degradacije, u fiziološkom rastvoru, na osnovu feret X



Slika 5.1-9 Uporedni rezultati stereoloških ispitivanja čestica DLPLG-a bez i sa askorbinskom kiselinom pre i nakon dva dana degradacije, u fiziološkom rastvoru, na osnovu feret Y

Na slici 5.1-10 su prikazani uporedni rezultati stereoloških ispitivanja pre i nakon dva dana degradacije u fiziološkom rastvoru za uzorak nanosfera DLPLG-a DLPLG/askorbinska kiselina 85/15 %, DLPLG/askorbinska kiselina 70/30 % i DLPLG/askorbinska kiselina 50/50 % čestica; bazirano na perimetar form farkoru, f_L , na osnovu kojih se jasno vidi da je došlo do povećanja sferičnosti čestica nakon dva dana degradacije. Proces praćenja degradacije i otpuštanja askorbinske kiseline je radjen u statičkim uslovima (uzorak nije mešan).

U slučaju eksperimenta praćenja degradacije polimera DLPLG-a bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline i procesa otpuštanja askorbinske kiseline iz polimerne matrice u PBS-u kao degradacionom medijumu uzorci su analizirani skenirajućom elektronskom mikroskopijom nakon 17 i 28 dana kada je već došlo do njihove aglomeracije te stoga nije radena njihova stereološka analiza.



Slika 5.1-10 Uporedni rezultati stereoloških ispitivanja pre i nakon dva dana degradacije u fiziološkom rastvoru za uzorak aa') nanosfera DLPLG-a bb') DLPLG/askorbinska kiselina 85/15 %; cc') DLPLG/askorbinska kiselina 70/30 %; dd') DLPLG/askorbinska kiselina 50/50 % čestica; bazirano na perimetar form faktoru, f_L

6 Zaključak

- Rastvarač/nerastvarač fizičko-hemijskom metodom i uz korišćenje tehnike centrifugalnog procesiranja su dobijene sferne, uniformne, neaglomerisane nanočestice kopolimera poli(DL-laktid-ko-glikolida) (DLPLG-a) koje potencijalno mogu biti korišćene za kontrolisanu dostavu medikamenata.
- Različite koncentracije askorbinske kiseline (vitamina C) su novom metodom inkapsulirane u nanočestice DLPLG-a pri čemu su dobijene čestice različitih morfoloških karakteristika. Nanočestice DLPLG-a mogu imati potencijalnu upotrebu u transdermalnim sistemima za kontrolisanu dostavu vitamina C. U nanočestice DLPLG-a su inkapsulirane različite koncentracije askorbinske kiseline i dobijene su nanosfere DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%, DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% i DLPLG/askorbinska kiselina 50/50%. Čestice DLPLG-a u koje je dodavana askorbinska kiselina za odnos 30/70% su aglomerisane i dalja istraživanja sa njima nisu rađena.
- Ispitan je uticaj različitih stabilizatora na morfološke karakteristike čestica i to polivinil alkohola (PVA) i polivinil pirolidona (PVP). Srednje veličine čestica DLPLG-a dobijenih u eksperimentima u kojima je kao stabilizator korišćen polivinil alkohol iznose od 150 do 230nm dok srednje veličine čestica DLPLG-a dobijenih u eksperimentima u kojima je kao stabilizator korišćen polivinil pirolidon iznose od 110 do 170nm (bazirano na stereološkim parametrima feret X, feret Y i D_{max}).
- Izračunat je prinos čestica DLPLG-a sa i bez inkapsulirane askorbinske kiseline. Prinosi za čestice sa različitim odnosom kopolimerne komponente tj. DLPLG-a i askorbinske kiseline su slični i veći od 50%. Takođe su i rezultati za prinos čestica dobijenih uz korišćenje PVA ili PVP-a kao stabilizatora čestica za sve uslove procesiranja veći od 50%. Prinos čestica u slučaju uzoraka DLPLG/askorbinska kiselina 85/15%, DLPLG/askorbinska kiselina 70/30% i DLPLG/askorbinska kiselina 50/50% je veći kada je kao stabilizator čestica korišćen PVP i to za $\approx 2\%$.

- Efikasnost inkapsulacije je veća od 90% u slučaju dobijanja čestica kada je kao stabilizator čestica korišćen PVA kao i u slučaju kada je korišćen PVP.
- Kvalitativna analiza uzoraka nanočestica DLPLG-a i nanosfera DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% je urađena metodom infracrvene spektroskopije (IR). IR spektar dobijenih nanočestica DLPLG-a sadrži sve karakteristične trake za DLPLG dok IR spektar nanosfera DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% pored traka karakterističnih za DLPLG sadrži i sve trake askorbinske kiseline. Na DSC dijagramima nanočestica DLPLG-a, dobijenih u eksperimentu u kome je kao stabilizator čestica korišćen PVA kao i dobijenih u eksperimentu u kome je kao stabilizator čestica korišćen PVP, uočava se jedino pik ostakljivanja jer je kopolimer DLPLG amorfan. Na osnovu analize uzoraka skenirajućom elektronskom mikroskopijom je pokazano da čestice DLPLG/askorbinska kiselina sa manjim udelom askorbinske kiseline imaju veću uniformnost, manje su aglomerisane, veličine su im manje a sferičnost izraženija. Efikasnost inkapsulacije je veća kod čestica dobijenih sa PVP-om kao stabilizatorom čestica pa su nanosfere DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% dobijene u eksperimentu sa PVP-om srednjih veličina od 200 do 310nm dok nanosfere DLPLG/askorbinska kiselina 85/15% dobijene u eksperimentu sa PVA imaju srednje veličine od 130 do 200nm (bazirano na stereološkom parametru feret X, feret Y i D_{max}).
- Proces degradacije čestica DLPLG-a bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline kao i otpuštanje askorbinske kiseline iz polimerne matrice je ispitan *in vitro* u različitim degradacionim medijumima tj. u fiziološkom rastvoru i fosfatnom pufer rastvoru uz prisustvo azida. Degradacija nanočestica DLPLG-a bez i sa askorbinskom kiselinom je praćena u fiziološkom rastvoru tokom osam nedelja i utvrđeno je da do kraja ovog perioda vremena čestice u potpunosti degradiraju a da je celokupna količina inkapsulirane askorbinske kiseline otpuštena. U prvih 24 dana degradacije, uzorci sporije degradiraju dok se nakon toga proces degradacije i otpuštanja vitamina C intezivira. pH rastvora sa

vremenom degradacije opada usled akumuliranja mlečne, glikolne (krajnjih produkata degradacije DLPLG-a) i askorbinske kiseline.

- Morfološke promene nastale tokom *in vitro* degradacije DLPLG čestica bez i sa različitim sadržajem askorbinske kiseline su ispitane skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Inicijalno, veličine nanočestica DLPLG-a bez askorbinske kiseline se povećavaju dok se u slučaju čestica DLPLG-a sa askorbinskom kiselinom smanjuju. Na početku degradacionog procesa, i kod čestica DLPLG-a bez askorbinske kiseline kao i kod onih sa različitim sadržajem askorbinske kiseline, dolazi do povećanja sferičnosti čestica, ali nakon, aproksimativno, 24 dana dolazi do njihove aglomeracije, stvaranja poroznog filma pri čemu stepen poroznosti raste do potpune degradacije uzorka.
- U eksperimentu praćenja procesa degradacije nanočestica DLPLG-a i otpuštanja askorbinske kiseline iz polimerne matrice, u fosfatnom pufer rastvoru uz prisustvo azida, a koji je ciljano vremenski trajao duže od eksperimenta degradacije u fiziološkom rastvoru je potvrđen materijalni bilans prethodnog eksperimenta kao i da to što uzorak nije sterilisan nije imalo značajnijeg uticaja.

7 Literatura

1. N. P. Mahalik, *Micromanufacturing and Nanotechnology*, ISBN 3540253777, Springer (2006)
2. S. K. Sahoo, S. Parveen, J. J. Panda, The present and future of nanotechnology in human health care, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3 (2007) 20
3. H. Liu, T. J. Webster, Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools, *Biomaterials*, 28 (2007) 354
4. M. J. Pitkethly, Nanomaterials – the driving force, *Materials Today*, 7 (12) (2004) 20
5. A. V. Kabanov, H. E. Gendelman, Nanomedicine in the diagnosis and therapy of neurodegenerative disorders, *Progress in Polymer Science*, (2007) (doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.014)
6. S. M. Moghimi, A. C. Hunter, J. C. Murray, Nanomedicine: current status and future prospects, *The FASEB Journal*, 19 (2005) 311
7. V. J. Mohanraj, Y. Chen, Nanoparticles-A Review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5 1 (2006) 561.
8. Z. H. Israel, A. J. Domb, Polymers in gene therapy: antisense delivery systems, *Polymers for Advanced Technologies*, 9 (10-11) (1998) 799
9. F. Besenbache, D. S. Sutherland, M. B. Hovgaard, From nanoscience to nanotechnology: Utilising the nanoscale, *Toxicology Letters*, 172 (1) (2007) S34
10. F. X. Gu, R. Karnik, A. Z. Wang, F. Alexis, E. Levy-Nissenbaum, S. Hong, R. S. Langer, Targeted nanoparticles for cancer therapy, *Nano Today*, 2(3) (2007) 14
11. A. Cavalcanti, B. Shirinzadeh, T. Hogg, J. A. Smith, Hardware architecture for nanorobot application in cancer therapy, *IEEE-RAS ICAR International Conference on Advanced Robotics*, (2007) 200
12. O. C. Farokhzada, R. Langer, Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58 (14) (2006) 1456

13. N. Nafee, S. Taetz, M. Schneider, U. F. Schaefer, C.-M. Lehr, Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3 (3) (2007) 173
14. M. E. Greene, Understanding cell interactions is a snap: *Nanobiotechnology, Nano Today*, 2 (3) (2007) 11
15. B. Witkop, Paul Ehrlich and his magic bullets-Revisited, *Proceedings of the American Philosophical Society*, 143 (4) (1999) 540
16. J. K. Vasir, M. K. Reddy, V. D. Labhasetwar, Nanosystems in drug targeting: opportunities and challenges, *Current Nanoscience*, 1 (2005) 47
17. S. D. Caruthers, S. A. Wickline, G. M. Lanza, Nanotechnological applications in medicine, *Current Opinion in Biotechnology*, 18 (2007) 26
18. D. F. Emerich, C. G. Thanos, The pinpoint promise of nanoparticle-based drug delivery, *Biomolecular Engineering*, 23 (2006) 171
19. A. Kozubek, J. Gubernator, E. Przeworska, M. Stasiuk, Liposomal drug delivery, a novel approach: PLARosomes, *Acta Biochimica Polonica*, 47 (3) (2000) 639
20. T. Lian, R. J. Y. Ho, Trends and developments in liposome drug delivery systems, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90 (6) (2001) 667
21. O.P. Medina, Y. Zhu, K. Kairemo, Targeted liposomal drug delivery in cancer, *Current Pharmaceutical Design*, 10 (24) (2004) 2981
22. M. B. Yatvin, G. V. Betaqeri, Liposome drug delivery, US Patent 6 761 901, Jul 2004.
23. J. Bryan, What role will dendrimer-based drug technology have in the future?, *The Pharmaceutical Journal*, 273 (2004) 793
24. A. D'Emanuele, D. Attwood, R. Abu-Rmaileh, The use of a dendrimer-propranolol prodrug to bypass efflux transporters and enhance oral bioavailability, *Journal of Controlled Release*, 95 (2004) 447
25. M. Liu, J. M. Frechet, Designing dendrimers for drug delivery, *Pharmaceutical Sciences Technology Today*, 10 (1999) 393

26. H. Yang, W. J. Kao, Dendrimers for pharmaceutical and biomedical applications, *Journal of Biomaterials Science. Polymer edition*, 17 (1-2) (2006) 3
27. P. Singh, Dendrimers and their applications in immunoassays and clinical diagnostics, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 48 (2007) 1
28. P. Singh, Terminal groups in starburst dendrimers: activation and reactions with proteins, *Bioconjugate Chemistry*, 9 (1) (1998) 54
29. A. Ritzen, T. Frejd, Synthesis of a chiral dendrimer based on polyfunctional amino acids, *Chemical Communications*, (1999), 207
30. G. S. Kwon, T. Okano, Polymeric micelles as new drug carriers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 21 (2) (1996) 107
31. M. Jones, J. Leroux, Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 48 (2) (1999) 101
32. K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki, Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47 (1) (2001) 113
33. K. Kataoka, G. S. Kwon, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, Block copolymer micelles as vehicles for drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 24 (1993) 119
34. N. Rapoport, W. G. Pitt, H. Sun, J. L. Nelson, Drug delivery in polymeric micelles: from in vitro to in vivo, *Journal of Controlled Release*, 91 (2003) 85
35. K.S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni, W. E. Rudzinski, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *Journal of Controlled Release*, 70 (1-2) (2001) 1
36. C. Schmidt, R. Bodmeier, Incorporation of polymeric nanoparticles into solid dosage forms, *Journal of Controlled Release*, 57 (2) (1999) 115
37. C. X. Song, V. Labhasetwar, H. Murphy, X. Qu, W. R. Humphrey, R. J. Shebuski, R. J. Levy, Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 43 (2-3) (1997) 197

38. S. K. Lai, K. Hida, S. T. Man, C. Chen, C. Machamer, T. A. Schroer, J. Hanes, Privileged delivery of polymer nanoparticles to the perinuclear region of live cells via a non-clathrin, non-degradative pathway, *Biomaterials*, 28 (18) (2007) 2876
39. M. Gaumet, A. Vargas, R. Gurny, F. Delie, Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, In Press, Available online 7 August 2007
40. 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 (1) (2007) 34
41. L. Mu, P.H. Seow, Application of TPGS in polymeric nanoparticulate drug delivery system, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 47 (1) (2006) 90
42. D. E. Owens, N. A. Peppas, Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 307 (1) (2006) 93
43. P. Ahlin, J. Kristl, A. Kristl, F. Vrečer, Investigation of polymeric nanoparticles as carriers of enalaprilat for oral administration, *International Journal of Pharmaceutics*, 239 (1-2) (2002) 113
44. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons, (Eds.), *An Introduction to Biomaterials*, Elsevier Inc, (2004)
45. M. Stevanović, Dobijanje, morfologija i struktura prahova poli(DL-laktid-ko-glikolida) i biokompozita poli(DL-laktid-ko-glikolid)/bifazni kalcijum fosfat, Magistarska teza, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, (2006)
46. N. Ignjatović, Sinteza i dizajniranje strukture i osobina hidroksiapatit-polilaktid kompozitnih biomaterijala, Doktorska disertacija, Tehnološko- Metalurški fakultet, Beograd, (2001)
47. M. Vert, Polymeric biomaterials: Strategies of the past vs. strategies of the future, *Progress in Polymer Science*, 32 (8-9) (2007) 755-761
48. C. M. Agrawal, R. B. Ray, Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research*, 55 (2003) 141

49. D. T. O'Hogan, D. Rahman, J. P. Mcgee, H. Jeffery, M. C. Davies, P. Williams, S. S. Davis, Biodegradable microparticles as controlled release antigen delivery systems, *Immunology*, 73 (1991) 239
50. H. S. Yoo, Preparation of biodegradable polymeric hollow microspheres using O/O/W emulsion stabilized by Labrafil, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 52 (2006) 47
51. M. R. Virto, B. Elorza, S. Torrado, M. Elorza, G. Frutos, Improvement of gentamicin poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for treatment of osteomyelitis induced by orthopedic procedures, *Biomaterials*, 28 (2007) 877
52. R. Liu, S-S Huang, Y-H Wan, G-H Ma, Z-G Su, Preparation of insulin-loaded PLA/PLGA microcapsules by a novel membrane emulsification method and its release in vitro, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 51 (2006) 30
53. M. Dunne, I. Corrigan, Z. Ramtoola, Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials*, 21 (2000) 1659
54. C. Thomasin, H. P. Merkle, B. A. Gander, Physicochemical parameters governing protein microencapsulation into biodegradable polyesters by coacervation. *International Journal of Pharmaceutics*, 147 (1997) 173.
55. Y. Choi, S. Park, H. Suh, Adipose tissue engineering using mesenchymal stem cells attached to injectable PLGA spheres, *Biomaterials*, 26 (2005) 5855
56. M. Kaninski, Savremeni keramika/polimer biokompozitni materijali, Seminarski rad, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, (2003)
57. J. M. Oliveira, T. Miyazaki, M. A. Lopes, C. Ohtsuki, J. D. Santos, Bonelike®/PLGA hybrid materials for bone regeneration: Preparation route and physicochemical characterisation, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 16, (2005) 253
58. A. Daugherty, J. Cleland, E. Duenas, R. Mrsny, Pharmacological modulation of the tissue response to implanted polylactic-co-glycolic acid microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 44 (1997) 89.

59. K.Y. Suh, J. Seong, A. Khademhosseini, P. Laibins, R. Langer, A simple soft lithographic route to fabrication of poly(ethyleneglycol) microstructures for protein and cell patterning, *Biomaterials*, 25 (2004) 557
60. G. Colombo, R. Langer, D.S. Kohane, Effect of excipient composition on the biocompatibility of bupivacaine-containing microparticles at the sciatic nerve, *Journal of Biomedical Materials Research*; 68A (2004) 651
61. N. Ignjatović, Z. Ajdukovic, D. Uskokovic, New biocomposite [biphasic calcium phosphate/ poly-DL-lactide-co-glycolide/biostimulative agent] filler for reconstruction of bone tissue changed by osteoporosis, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16 (2005) 621
62. 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
63. M. Radić, N. Ignjatović, M. Mitrić, M. Miljković D. Milicević, D. Uskoković, Uticaj masenog udela polimera u kompozitu HAp/PLLA na termička svojstva kompozita, *BILTEN Vinča*, 1-4 (2004) 56
64. M. Radić, N. Ignjatović, D. Jugović, Z. Nedić, M. Mitrić, M. Miljković, Synthesis of BCP and BCP/PLGA biomaterials by ultrasonic spray pyrolysis, *Proceedings of the 7th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Editors A. Antic-Jovanovic, S. Anic, Volume II (2004.) 487
65. M. Stevanović, N. Ignjatović, D. Miličević, D. Uskoković, Preparation of composite material BCP/DLPLG with a different content of ceramic and polymer component, *Proceedings of the 8th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Editors Prof dr A. Antić-Jovanović, Volume II (2006.) 498
66. A. Khademhosseini, K.Y. Suh, J. M. Yang, G. Eng, J. Yeh, S. Levenberg, R. Langer, Layer-by-layer deposition of hyaluronic acid and poly-L-lysine for patterned cell co-cultures, *Biomaterials*; 25 (2004) 3583

67. T. Thomas, D. Kohane, A. Wang, R. Langer, Microparticulate formulations for the controlled release of interleukin-2, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93 (2004) 1100
68. Y. Jeong, J. Song, S. Kang, H. Ryu, Y. Lee, C. Choi, B. Shin, K. Kim, K. Ahn, S. Jung, Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres encapsulating all-trans retinoic acid, *International Journal of Pharmaceutics*, 259 (2003) 79.
69. R. Ribeiro-Costa, A. Alves, N. Santos, S. Nascimento, E. Goncalves, N. Silva, N. Honda, N. Santos-Magalhaes, In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 21 (2004) 371.
70. S. Zhou, B. Song, X. Li, In vitro degradation and release profiles for poly-dl-lactide film containing paracetamol, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18 (2007) 1623
71. 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
72. R. Pouliot, R. Azhari, H.F. Qanadilo, T. Mahmood, S. Triantafyllou, R. Langer, Tissue engineering of fish skin: Behavior of fish cells on PEGT/PBT copolymers in relation to the composition of the polymer substrate as an initial step in constructing a robotic/living tissue hybrid, *Tissue Engineering*, 10 (2004) 7
73. M. Stevens, H. Qanadilo, H. Langer, V. Shastri, A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering, *Biomaterials*, 25(2004) 887
74. L. Meinel, V. Kareourgiou, R. Fajardo, B. Snyder, V. Shinde-Patil, L. Zichner, D. Kaplan, R. Langer, G. Vunjak-Novakovic, Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: Effects of scaffold material and medium flow, *Annals of Biomedical Engineering*, .32 (2004) 112
75. K. Avgoustakis, J. R. Nixon, Biodegradable controlled tablets 1. Preparative variables affecting the properties of poly(lactide-co-glycolide) copolymers as matrix forming material, *International Journal of Pharmaceutics*, 70 (1991) 77

76. S. Li, H. Garreau, M. Vert, Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly-(alpha-hydroxyacids) in aqueous media, Part 1: Poly(D,L-lactic acid), *Journal of Material Science Material in Medicine*, 1 (1990) 123
77. D. P. Link, J. van den Dolder, W. J. F. M. Jurgens, J. G. C. Wolke, J. A. Jansen, Mechanical evaluation of implanted calcium phosphate cement incorporated with PLGA microparticles, *Biomaterials* 27 (2006) 4941
78. S-S Kim, M. S. Park, O. Jeon, C. Y. Choi, B-S Kim, Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* 27 (2006) 1399
79. Y-C Wu, S-Y Shaw, H-R Lin, T-M Lee, C-Y Yang, Bone tissue engineering evaluation based on rat calvaria stromal cells cultured on modified PLGA scaffolds, *Biomaterials* 27 (2006) 896
80. J. Vandervoort, A. Ludvig, Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study. *International Journal of Pharmaceutics*, 238 (2002) 77
81. H. J. Sung, J. Su, J. D. Berglund, B. V. Russ, J. C. Meredith, Z. S. Galis, The use of temperature-composition combinatorial libraries to study the effects, *Biomaterials*, 26 (2005) 4557
82. D. G. Anderson, D. Putnam, E. B. Lavik, T. A. Mahmood, R. Langer, Biomaterial microarrays: rapid, microscale screening of polymer-cell interaction, *Biomaterials*, 26 (2005) 4892
83. R. M. Day, A. R. Boccaccini, V. Maquet, S. Shurey, A. Forbes, S. M. Gabe, R. Jerome, In vivo characterisation of a novel bioresorbable poly(lactide-co-glycolide) tubular foam scaffold for tissue engineering applications, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15 (6) (2004) 729
84. C. C. Lin, C. C. Co, C. C. Ho, Micropatterning proteins and cells on polylactic acid and poly(lactide-co-glycolide), *Biomaterials*, 26 (2005) 3655
85. J. Zhang, H. Zhang, L. Wu, J. Ding, Fabrication of three dimensional polymeric scaffolds with spherical pores, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 41 (6) (2006) 1725

86. K. Uematsu, K. Hattori, Y. Ishimoto, J. Yamauchi, T. Habata, Y. Takakura, H. Ohgushi, T. Fukuchi, M. Sato, Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold, *Biomaterials*, 26 (2005) 4273
87. G. E. Park, M. A. Pattison, K. Park, T. J. Webster, Accelerated chondrocyte functions on NaOH-treated PLGA scaffolds, *Biomaterials*, 26 (2005) 3075
88. G. H. Ryu, W-S. Yang, H-W. Roh, I-S. Lee, J. K. Kim, G. H. Lee, D. H. Lee, B. J. Park, M. S. Lee, J. -C. Park, Plasma surface modification of poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) (65/35) film for tissue engineering, *Surface & Coatings Technology*, 193 (2005) 60
89. K. D. Newman, M. W. McBurney, Poly (DL lactic –co-glycolic acid) microspheres as biodegradable microcarriers for pluripotent stem cells, *Biomaterials*, 25 (2004) 5763
90. J. J. Lee, S.-G. Lee, J. C. Park, Y. I. Yang, J. K. Kim, Investigation on biodegradable PLGA scaffold with various pore size structure for skin tissue engineering, *Current Applied Physics*, 7S1 (2007) e37
91. G. Scott, (Ed), *Degradable Polymers-Principles and Applications*, (2nd edition), Kluwer Academic Publishers, (2002)
92. Bleeding and blood clotting, *Encyclopedia Britannica*, (eleventh edition), Encyclopedia Britannica Inc. Publisher
93. M. Ahlers, V. Krone, A. Walch, Microparticles from biodegradable polymers, *Advanced Materials*, 4 (1992) 230
94. J. Eldridge, J. Staas, J. Meulbroek, T. McGhee, R. Tice, R. Gilley, Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system, *Molecular Immunology*, 28 (1991) 287
95. S. K. Lai, E. D. O'Hanlon, S. Harrold, S. T. Man, Y. Y. Wang, R. Cone, J. Hanes, Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted mucus, *PNAS*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (5) (2007) 1482
96. G. Schliecker, Biodegradable polyesters for veterinary drug delivery systems: characterization, in vitro degradation and release behavior of oligolactides and

- polytartrate, Doctoral Dissertation, Vom Fachbereich der Pharmazie der Philipps-Universität Marburg, Marburg/ Lahn 2003
97. R. A. Jain, The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices, *Biomaterials*, 21 (2000) 2475
 98. F. von Burkersroda, L. Schedl, A. Göpferich, Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion, *Biomaterials*, 23 (2002) 4221
 99. D. O'Hagan, M. Singh, R. Gupta, Poly(lactide-co-glycolide) microparticles for the development of single-dose controlled-release vaccines, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 32 (1998) 225
 100. A. Goepferich, J. Tessmar, Polyanhydride degradation and erosion, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54 (2002) 911
 101. C. R. Bunt, V. G. Woodward, M. J. Rathbone, C. Burggraaf, C.R Ogle, C.R. Burke, K. Pickering, A poli(epsilon-caprolactone) bovine intravaginal insert for the delivery of progesterone, *Proceedings of the International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials* (1999) 70
 102. C. Shih, J. Fix, R. Seward, In vivo and in vitro release of ivermectin from poly(ortho ester) matrices. I. Crosslinked matrix prepared from ketene acetal end-capped prepolymer, *Journal of Controlled Release*, 25 (1993) 155
 103. J Heller, J. Barr, S. Y. Ng, K. Schwach-Abdellaoui, R. Gurny, Poly(ortho esters) synthesis, characterization, properties and uses, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54 (2002) 1015
 104. S-J. Park, K-S. Kim, Effect of oxygen plasma treatment on the release behaviors of poly(ε-caprolactone) microcapsules containing tocopherol, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 43 (2005) 138
 105. P.A. Guanatillake, R. Adhikari, Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering, *European Cells and Materials*, 5 (2003) 1
 106. J. C. Middleton, A. J. Tripton, Synthetic biodegradable polymers as orthopaedic devices, *Biomaterials*, 21 (2000) 2335
 107. T. Hayashi, Biodegradable polymers for biomedical applications, *Progres in Polymer Science*, 19 (1994) 663

108. D. O'Hagan, Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 34 (1998) 305
109. P. K. Gupta, H. Johson, C. Allexon, In vitro and in vivo evaluation of clarithromycin PLA microspheres for intramuscular drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 26 (1993) 229
110. W. W. Thompson, D.B. Anderson, M.L. Heiman, Biodegradable microspheres as a delivery system for rismorelin porcine, a porcine-growth-hormone-releasing-hormone, *Journal of Controlled Release*, 43 (1997) 9
111. Meredith L. Hans, Synthesis , characterization and application of biodegradable polymeric prodrug micelles for long-term drug delivery, Doctoral Dissertation, Faculty of Drexel University, October (2005)
112. H. Ertl, I. Varga, Z. Xiang, K. Kaiser, L. Stephens, L. Otvos, Poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres as carrier for peptide vaccines, *Vaccine*, 14 (1996) 879
113. M. Allonso, S. Cohen, T. Park, R. Gupta, G. Siber, R. Langer, Determinants of release rate of tetanus from polyester microspheres, *Pharmaceutical Research*, 10 (1993) 945
114. H.Bengs, U. Bayer, V. Krone, N. Lill, J. Sandow, A. Walch, Polytartrate-a new biodegradable polymer, *Proceedings of the International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials*. 23 (1996) 114
115. J. Heller, J. Barr, S. Y. Ng, H. R. Shen, K. Schwach-Abdellaoui, S. Emmahl, A. Rothen-Weinhold, R. Gurny, Poly(ortho esters) - their development and some recent applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50 (2000) 121
116. S. Einmahl, S. Capancioni, K. Schwach-Abdellaoui, M. Moeller, F. Behar-Cohen, R. Gurny, Therapeutic applications of viscous and injectable poly(ortho esters), *Advanced Drug Delivery Reviews*, 5 (2001) 45
117. V.P Shastri, R. F. Padera, P.J. Tarchand, R.Langer, A preliminary report on the biocompatibility of OrthoCure photopolymerization anhydride networks, *Biomaterials*, 25 (2004) 715

118. V. Tangpasuthadol, S. M. Pendharkar, R. C. Peterson, J. Kohn, Hydrolytic degradation of tyrosine-derived polycarbonates, a class of new biomaterials. Part II: Study of model compounds, *Biomaterials*, 21 (2000), 2379
119. R. J. Zdrahala, I. J. Zdrahala, Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities, and a vibrant future. *Journal of Biomaterials Applications*, 14 (1999) 67
120. M. L. Hans, A. M. Lowman, Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6 (2002) 319
121. J. M. Anderson, M. S. Shive, Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres, *Advanced Drug Reviews*, 28 (1997) 5
122. L. Wu, J. Ding, In vitro degradation of three-dimensional porous poly(d,l-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials*, 25 (2004) 5821
123. T. T. Park, Degradation of poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres: Effect of copolymer composition, *Biomaterials*, 16 (1995) 1123
124. E. Kiss, E. I. Vargha-Butler, Novel method to characterize the hydrolytic decomposition of biopolymer surfaces, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 15 (1999) 181
125. J. Y. Cassim, E. W. Taylor, The effects of solvent environment on the optical rotatory dispersion parameters of polypeptides II. Studies on poly-L-glutamic acid, *Biophysical Journal*, 5 (1965) 573
126. W. Jiang, R. K. Gupta, M. C. Deshpande, S. P. Schwendeman, Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (2005) 391
127. M. Dunne, O. Corrigan, Z. Ramtoola, Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles, *Biomaterials*, 21 (2000) 1659
128. S.J. de Jong, E. A. Arias, D. Rijkers, C.F. van Nostrum, J.J. Kettenes-van den Bosch, W. E. Hennink, New insights into the hydrolytic degradation of poly(lactic acid): participation of the alcohol terminus, *Polymer*, 42 (7) (2001) 2795

129. M. Vert, J. Mauduit, S. Li, Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity, *Biomaterials*, 15 (1994) 1209
130. I. Grizzi, H. Garreau, S. Li, M. Vert, Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence, *Biomaterials*, 16 (1995) 305
131. G. Spenlehauer, M. Vert, J.P. Benoit, A. Boddart, In vitro and in vivo degradation of poly(DL-lactide/glycolide) type microspheres made by solvent evaporation method, *Biomaterials*, 10 (1989) 557
132. S. Shah, Y. Cha, C. Pitt, Poly(glycolic acid-co-DL-lactic acid): diffusion or degradation controlled drug delivery ?, *Journal of Control Release*, 18 (1992) 261
133. M. Vert, S.M. Li, H. Garreau, Attempts to map the structure and degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids, *Journal of Biomaterials Science Polymer Ed*, 6 (7) (1994) 639
134. M. Therin, P. Christel, S. Li, H. Garreau, M. Vert, In vivo degradation of massive poly(alpha-hydroxy acids): validation of in vitro findings, *Biomaterials*, 13(9) (1992) 594
135. M. Vert, G. Schwach, R. Engel, J. Coudane, Something new in the field of PLA/GA bioresorbable polymers?, *Journal of Control Release*, 53 (1-3) (1998) 85
136. S Li, H Garreau, M. Vert, Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly-(alpha-hydroxyacids) in aqueous media, Part 2: Degradation of lactide-glycolide copolymers: PLA37.5GA25 and PLA75GA25, *Journal of Material Science Material in Medicine*, 1 (1990) 131
137. R. Langer, Perspectives: Drug delivery - drugs on target, *Science*, 293 (2001) 58
138. L. Brannon-Peppas, *Biomaterials: Polymers in Controlled Drug Delivery*, Medical Plastics and Biomaterials Magazine, (1997)
139. S. S. Feng, L. Mu, K. Yin Win, G. Huang, Nanoparticles of biodegradable polymers for clinical administration of paclitaxel, *Current Medicinal Chemistry*, 11 (2004) 413
140. M. N. V. Ravi Kumar, U. Bakowsky, C. M. Lehr, Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers, *Biomaterials*, 25 (2004) 1771

141. H. Murakami, M. Kobayashi, H. Takeuchi, Y. Kawashima, Further application of a modified spontaneous emulsification solvent diffusion method to various types of PLGA and PLA polymers for preparation of nanoparticles, *Powder Technology*, 107 (2000) 137
142. R. Mainardes, R. Evangelista, PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution, *International Journal of Pharmaceutics*, 290 (2005) 137
143. F. Ito, H. Fujimori, K. Makino, Incorporation of water-soluble drugs in PLGA microspheres, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 54 (2007) 173
144. I. Bala, S. Hariharan, M. R. Kumar, PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 21 (2004) 387
145. R. Langer, Drug delivery and targeting, *Nature*, 392 (5-10) 19986
146. H. Murakami, M. Kobayashi, H. Takeuchi, Y. Kawashima, Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method, *International Journal of Pharmaceutics*, 187 (1999) 143
147. J. W. Nah, Y. Jeong, J. J. Koh, Drug release from nanoparticles of poly(DL-lactide-co-glycolide), *Korean Journal of Chemical Engineering*, 17 (2000) 230
148. D. Edwards, J. Hanes, G. Caponetti, J. Hrkach, A. Ben-Jebria, M. Eskew, J. Mintzes, D. Deaver, N. Lotan, R. Langer, Large porous aerosols for pulmonary drug delivery, *Science*, 276 (1997) 1868
149. M. Prausnitz, S. Mitragotri, R. Langer, Current status and future potential of transdermal drug delivery, *Nature Reviews Drug Discovery*, 3 (2004) 115
150. C. Wang, Q. Ge, D. Ting, D. Nguyen, H. Shen, J. Chen, H. Eisen, J. Heller, R. Langer, D. Putnam, Molecularly engineered poly(ortho ester) microspheres for enhanced delivery of DNA vaccines, *Nature Materials*, 3 (2004) 190
151. F. Qian, A. Szymanski, J. Gao, Fabrication and characterization of controlled release poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles, *Journal of Biomedical Materials Research*, 55 (2002) 512
152. J. Panyam, V. Labhasetwar, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55 (2003) 329

153. S. Y. Wong, J. M. Pelet, D. Putnam, Polymer systems for gene delivery-past, present and future, *Progres in Polymer Science*, 32 (2007) 79
154. Y. Wang, Y. Wang, J. Yang, R. Pfeffer, R. Dave, B. Michniak, The application of a supercritical antisolvent process for sustained drug delivery, *Powder Technology* 164 (2006) 94
155. A. J. Thote, R. B. Gupta, Formation of nanoparticles of a hydrophilic drug using supercritical carbon dioxide and microencapsulation for sustained release, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 1 (2005) 85
156. J-H Park, S-O Choi, R Kamath, Y-K Yoon, M. Allen, M. Prausnitz, Polymer particle-based micromolding to fabricate novel microstructures, *Biomedical Microdevices*, 9 (2) (2007) 223
157. S. Mao, J. Xu, C. Cai, O. Germershaus, A. Schaper, T. Kissel, Effect of WOW process parameters on morphology and burst release of FITC-dextran loaded PLGA microspheres, *International Journal of Pharmaceutics*, 334 (2007) 137
158. A. G. A. Coombes, S. S. Davis, E. H. Schacht, Polymer microspheres and a method of production thereof, USA Patent 5,922,357, (1996)
159. S. H. Choi, T. G. Park, G-CSF loaded biodegradable PLGA nanoparticles prepared by a single oil-in-water emulsion method, *International Journal of Pharmaceutics Pharmaceutical Nanotechnology*, 311 (2006) 223
160. 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
161. Z. Jelcic, Solvent molecular descriptors on poly(D, L-lactide-co-glycolide) particle size in emulsification–diffusion process, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 242 (2004) 159
162. J. Liu, D. Meisner, E. Kwong, X. Y. Wu, M.R. Johnston, A novel trans-lymphatic drug delivery system: Implantable gelatin sponge impregnated with PLGA–paclitaxel microspheres, *Biomaterials*, 28 (21) (2007) 3236
163. 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 (7) (2007) 1339
164. U. Bilati, E. Allemann, E. Doelker, Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24 (2005) 67
165. Y. Takashima, R. Saito, A. Nakajima, M. Oda, A. Kimura, T. Kanazawa, H. Okada, Spray-drying preparation of microparticles containing cationic PLGA nanospheres as gene carriers for avoiding aggregation of nanospheres, *International Journal of Pharmaceutics Pharmaceutical Nanotechnology*, xxx (2007) xxx–xxx
166. C. Jin, L. Bai, H. Wu, F. Tian, G. Guo, Radiosensitization of paclitaxel, etanidazole and paclitaxel+etanidazole nanoparticles on hypoxic human tumor cells in vitro, *Biomaterials*, 28 (25) (2007) 3724
167. C. E. Astete, C. S. S. R. Kumar, C. M. Sabliov, Size control of poly(d,l-lactide-co-glycolide) and poly(d,l-lactide-co-glycolide)-magnetite nanoparticles synthesized by emulsion evaporation technique, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 299 (2007) 209
168. J. Siepmann, N. Faisant, J. Akiki, J. Richard, J. P. Benoit, Effect of the size of biodegradable microparticles on drug release: experiment and theory, *Journal of Controlled Release*, 96 (2004) 123
169. K. Y. Win, S. S. Feng, Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs, *Biomaterials*, 26 (2005) 2713
170. V. M. Tatard, M. C. Venier-Julienne, P. Saulnier, E. Prechter, J. P. Benoit, P. Menei, C. N. Montero-Menei, Pharmacologically active microcarriers: a tool for cell therapy, *Biomaterials*, 26 (2005) 3727
171. D. Kim, H. El-Shall, D. Dennis, T. Morey, Interaction of PLGA nanoparticles with human blood constituents, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 40 (2005) 83
172. J. C. Olivier, Drug transport to brain with targeted nanoparticles, *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2 (2005) 108

173. S. Schenderlein, M. Luck, B. W. Muller, Partial solubility parameters of poly(d,l-lactide-co-glycolide), *International Journal of Pharmaceutics*, 286 (2004) 19
174. K. C. Song, H. S. Lee, I. Y. Choung, K. I. Cho, Y. Ahn, E. J. Choi, The effect of type of organic phase solvents on the particle size of poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 276 (2006) 162
175. F. Mohamed, C. F. van der Walle, PLGA microcapsules with novel dimpled surfaces for pulmonary delivery of DNA, *International Journal of Pharmaceutics*, 311 (2006) 97
176. K. Tomoda, S. Kojima, M. Kajimoto, D. Watanabe, T. Nakajima, K. Makino, Effects of pulmonary surfactant system on rifampicin release from rifampicin-loaded PLGA microspheres, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45 (2005) 1
177. T. Feczko, J. Toth, J. Gyenis, Comparison of the preparation of PLGA-BSA nano- and microparticles by PVA, poloxamer and PVP, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, (2007), (doi:10.1016/j.colsurfa.2007.07.011)
178. S. Diez, C. Tros de Ilarduya, Versatility of biodegradable poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for plasmid DNA delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 63 (2006) 188
179. F. Mohamed, C. F. van der Walle, PLGA microcapsules with novel dimpled surfaces for pulmonary delivery of DNA, *International Journal of Pharmaceutics*, 311 (2006) 97
180. T. Musumeci, C. A. Ventura, I. Giannone, B. Ruozi, L. Montenegro, R. Pignatello, G. Puglisi, PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel, *International Journal of Pharmaceutics Pharmaceutical Nanotechnology*, 325 (2006) 172
181. A-M Torche, M. Le Dimna, P. Le Corre, A. Mesplede, S. Le Gal, R. Cariolet, M.-F. Le Potier, Immune responses after local administration of IgY loaded-PLGA microspheres in gut-associated lymphoid tissue in pigs, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 109 (2006) 209

182. A. Budhian, S. J. Siegel, K. I. Winey, Controlling the in vitro release profiles for a system of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics Pharmaceutical Nanotechnology*, xxx (2007)xxx-xxx
183. V. I Saxena, M. Sadoqi, J. Shao, Polymeric nanoparticulate delivery system for Indocyanine green: Biodistribution in healthy mice, *International Journal of Pharmaceutics Pharmaceutical Nanotechnology*, 308 (2006) 200
184. X. Luan, R. Bodmeier, Influence of the poly(lactide-co-glycolide) type on the leuprolide release from in situ forming microparticle systems, *Journal of Controlled Release*, 110 (2006) 266
185. X. Luan, R. Bodmeier, In situ forming microparticle system for controlled delivery of leuprolide acetate: Influence of the formulation and processing parameters, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27 (2006) 143
186. S-J Liu, P-S. Chi, S-S Lin, S. W.-N. Ueng, E-C Chan, J –K Chen, Novel solvent-free fabrication of biodegradable poly-lactic-glycolic acid (PLGA) capsules for antibiotics and rhBMP-2delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 330 (2007) 45
187. K. Dillen, J. Vandervoort, G. Van den Mooter, A. Ludwig, Evaluation of ciprofloxacin-loaded Eudragit RS100 or RL100/PLGA nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 314 (2006) 72
188. D.-H. Kim, D. C. Martin, Sustained release of dexamethasone from hydrophilic matrices using PLGA nanoparticles for neural drug delivery, *Biomaterials*, 27 (2006) 3031
189. E. Ricci-Junior, J. Maldonado Marchetti, Zinc(II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use, *International Journal of Pharmaceutics Pharmaceutical Nanotechnology*, 310 (2006) 187
190. L. Feng, X. R. Qi, X. J. Zhou, Y. Maitani, S. C. Wang, Y. Jiang, T. Nagai, Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-dose hepatitis B vaccine using PLGA microspheres, *Journal of Controlled Release*, 112 (2006) 35-42
191. A. Sapin, E. Garcion, A. Clavreul, F. Lagarce, J. P. Benoit, P. Menei, Development of new polymer-based particulate systems for anti-glioma vaccination, *International Journal of Pharmaceutics*, 309 (2006) 1

192. J. K. Vasir, V. Labhasetwar, Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics, *Advanced Drug Delivery Reviews*, (2007) (doi: 10.1016/j.addr.2007.06.003)
193. R. Lin, L. S. Ng, C. H. Wang, In vitro study of anticancer drug doxorubicin in PLGA-based microparticles, *Biomaterials*, 26 (2005) 4476
194. H. Cai, X. D. Hu, D. H. Yu, S. X. Li, X. Tian, Y. X. Zhu, Combined DNA vaccine encapsulated in microspheres enhanced protection efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* infection of mice, *Vaccine*, 23 (2005) 4167
195. S. Ribeiro, N. Hussain, A. T. Florence, Release of DNA from dendriplexes encapsulated in PLGA nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics Pharmaceutical Nanotechnology*, 298 (2005) 354
196. N. L. Bennewitz, J. E. Babensee, The effect of the physical form of poly(lactic-co-glycolic acid) carriers on the humoral immune response to co-delivered antigen, *Biomaterials*, 26 (2005) 2991
197. I-S. Kim, S-K. Lee, Y-M. Park, Y-B Lee, S-C. Shin, K. C. Lee, I-J. Oh, Physicochemical characterization of poly(l-lactic acid) and poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles with polyethylenimine as gene delivery carrier, *International Journal of Pharmaceutics Pharmaceutical Nanotechnology*, 298 (2005) 255
198. S-J. Liu, Y-E. Tsai, S. W.-N. Ueng, E.-C. Chan, A novel solvent-free method for the manufacture of biodegradable antibiotic-capsules for a long-term drug release using compression sintering and ultrasonic welding techniques, *Biomaterials*, 26 (2005) 4662
199. T. Ishihara, M. Higaki, E. Shimada, N. Izumo, T. Hagi, L. Mine, Y. Ogawa, Y. Mizushima, Role of zinc in formulation of PLGA/PLA nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate and its release profile, *Journal of Controlled Release*, 105 (2005) 68
200. M. Teixeira, M. J. Alonso, M. M. M. Pinto, C. M. Barbosa, Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59 (2005) 491

201. S-J. Lee, J.-R. Jeong, S.-C. Shin, J.-C. Kim, Y.-H. Chang, K.-H. Lee, J.-D. Kim, Magnetic enhancement of iron oxide nanoparticles encapsulated with poly(D,L-lactide-co-glycolide), *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 255 (2005) 19
202. P. K. Narahariseti, M. D. N. Lew, Y.-C. Fu, D.-J. Lee, C.-H. Wang, Gentamicin-loaded discs and microspheres and their modifications: characterization and in vitro release, *Journal of Controlled Release*, 102 (2005) 345
203. 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
204. E. L. Hedberg, C. K. Shih, L. A. Solchaga, A. I. Caplan, A. G. Mikos, Controlled release of hyaluronan oligomers from biodegradable polymeric microparticle carriers, *Journal of Controlled Release*, 100 (2004) 257
205. B. K. Kang, S. K. Chon, S. H. Kim, S. Y. Jeong, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, G. Khang, Controlled release of paclitaxel from microemulsion containing PLGA and evaluation of anti-tumor activity in vitro and in vivo, *International Journal of Pharmaceutics Pharmaceutical Nanotechnology*, 286 (2004) 147
206. K. J. Whittlesey, L. D. Shea, Delivery systems for small molecule drugs, proteins, and DNA: the neuroscience/biomaterial interface, *Experimental Neurology*, 190 (2004) 1
207. K. A. Howard, X. W. Li, S. Somavarapu, J. Singh, N. Green, K. N. Atuah, Y. Ozsoy, L. W. Seymour, H. O. Alpar, Formulation of a microparticle carrier for oral polyplex-based DNA vaccines, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1674 (2004) 149
208. M. Cegnar, J. Kos, J. Kristl, Cystatin incorporated in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: development and fundamental studies on preservation of its activity, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22 (2004) 357
209. A. Fernández-Carballido, R. Herrero-Vanrell, I. T. Molina-Martinez, P. Pastoriza, Biodegradable ibuprofen-loaded PLGA microspheres for intraarticular administration Effect of Labrafil addition on release in vitro, *International Journal of Pharmaceutics*, 279 (2004) 33

210. D-H. Kim, D. C. Martin, Sustained release of dexamethasone from hydrophilic matrices using PLGA nanoparticles for neural drug delivery, *Biomaterials*, 27 (2006) 3031
211. N. Ahmad, K. Arif, S. M. Faisal, M. K. Neyaz, S. Tayyab, M. Owais, PLGA-microsphere mediated clearance of bilirubin in temporarily hyperbilirubinemic rats: An alternate strategy for the treatment of experimental jaundice, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760 (2006) 227
212. A. Matsumoto, Y. Matsukawa, Y. Horikiri, T. Suzuki, Rupture and drug release characteristics of multi-reservoir type microspheres with poly(dl-lactide-co-glycolide) and poly(dl-lactide), *International Journal of Pharmaceutics*, 327 (2006) 110
213. 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
214. A. Khademhosseini, Nanobiotechnology drug delivery and tissue engineering, *Nanobiotechnology, SBE Special Section*, (2007) 38
215. F. Esmaeili, M. H. Ghahremani, B. Esmaeili, M.-R. Khoshayand, F. Atyabi, R. Dinarvand, PLGA nanoparticles of different surface properties: Preparation and evaluation of their body distribution, *International Journal of Pharmaceutics*, (2007) (doi:10.1016/j.ijpharm.2007.07.038)
216. P. N. Thanki, E. Dellacherie, J.-L. Six, Surface characteristics of PLA and PLGA films, *Applied Surface Science*, 253 (2006) 2758
217. J. M. Goddard, J. H. Hotchkiss, Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds, *Progress in Polymer Science*, 32 (2007) 698
218. A. P. Zhu, N. Fang, M. B. Chan-Park, V. Chan, Adhesion contact dynamics of 3T3 fibroblasts on poly(lactide-co-glycolide acid) surface modified by photochemical immobilization of biomacromolecules, *Biomaterials*, 27 (2006) 2566
219. Y. F. Zheng, C. Li, C. J. Li, W. Cai, L. C. Zhao, Surface characteristics and biological properties of paclitaxel-embedding PLGA coatings on TiNi alloy, *Materials Science and Engineering A*, 438–440 (2006) 1119

220. G. Tosi, F. Rivasi, F. Gandolfi, L. Costantino, M. A. Vandelli, F. Forni, Conjugated poly(D,L-lactide-co-glycolide) for the preparation of in vivo detectable nanoparticles, *Biomaterials*, 26 (2005) 4189
221. M. E. Keegan, S. M. Royce, T. Fahmy, W. M. Saltzman, In vitro evaluation of biodegradable microspheres with surface-bound ligands, *Journal of Controlled Release*, 110 (2006) 574
222. Z. Zhang, S. H. Lee, S-S. Feng, Folate-decorated poly(lactide-co-glycolide)-vitamin ETPGS nanoparticles for targeted drug delivery, *Biomaterials*, 28 (2007) 1889
223. H. S. Yoo, T. G. Park, Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles, *Journal of Controlled Release*, 96 (2004) 273
224. X. Wang, E. Wenk, X Hu, G. R. castro, L. Meinel, X. Wang, C. Li, D. L. Kaplan, Silk coatings on PLGA and alginate microspheres for protein delivery, *Biomaterials*, 28 (28) (2007) 4161
225. S-W Choi, J-H. Kim, Design of surface-modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for targeted drug delivery to bone, *Journal of Controlled Release*, (2007) in press
226. S. Fischer, C. Foerg, S. Ellenberger, H. P. Merkle, B. Gander, One-step preparation of polyelectrolyte-coated PLGA microparticles and their functionalization with model ligands, *Journal of Controlled Release*, 111 (2006) 135
227. M Müller, J Vörös, G Csúcs, E Walter, G Danuser, H.P. Merkle, N. D. Spencer, M. Textor, Surface modification of PLGA microspheres, *Journal of Biomedical Materials Research A*, 66 (1) (2003) 55
228. H. Shen, X. Hu, F. Yang, J. Bei, S. Wang, Combining oxygen plasma treatment with anchorage of cationized gelatin for enhancing cell affinity of poly(lactide-co-glycolide), *Biomaterials*, article in press, (2007) (doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.06.004)
229. M. T. Khorasani, H. Mirzadeh, S. Irani, Plasma surface medication of poly(L-lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) films for improvement of nerve cells

- adhesion, Radiation Physics and Chemistry, (2007), (doi:10.1016/j.radphyschem.2007.05.013)
230. X-J. Xu, J. C. Sy, V. P. Shastri, Towards developing surface eroding poly(α -hydroxyacids), *Biomaterials*, 27 (2006) 3021
231. A. Santovena, J. T. Garcia, A. Oliva, M. L. Llabres, J. B. Farina, A mathematical model for interpreting in vitro rhGH release from laminar implants, *International Journal of Pharmaceutics*, 309 (2006) 38
232. M. L. T. Zweers, G. H. M. Engbers, D. W. Grijpma, J. Feijen, In vitro degradation of nanoparticles prepared from polymers based on dl-lactide, glycolide and poly(ethyleneoxide), *Journal of Controlled Release*, 100 (2004) 347
233. L. Wang, S. Venkatraman, L. Kleiner, Drug release from injectable depots: two different in vitro mechanisms, *Journal of Controlled Release*, 99 (2004) 207
234. J. A. M. Namur, C. S. Takata, A. M. Moro, M. J. Politi, P. S. de Araujo, I. M. Cuccovia, M. H. B. da Costa, Lactic acid triggers, in vitro, thiomersal to degrade protein in the presence of PLGA microspheres, *International Journal of Pharmaceutics*, 273 (2004) 1
235. L. Li, S. P. Schwendeman, Mapping neutral microclimate pH in PLGA microspheres, *Journal of Controlled Release*, 101 (2005) 163
236. B. S. Zolnik, D. J. Burgess, Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release, *Journal of Controlled Release*, (2007) (doi: 10.1016/j.jconrel.2007.05.034)
237. N. Faisant, J. Akiki, F. Siepmann, J. P. Benoit, J. Siepmann, Effects of the type of release medium on drug release from PLGA-based microparticles: Experiment and theory, *International Journal of Pharmaceutics*, 314 (2006) 189
238. Y. Cao, G. Mitchell, A. Messina, L. Price, E. Thompson, A. Penington, W. Morrison, A. O'Connor, G. Stevens, J. Cooper-White, The influence of architecture on degradation and tissue ingrowth into three-dimensional poly(lactico-glycolic acid) scaffolds in vitro and in vivo, *Biomaterials*, 27 (2006) 2854
239. N. Higashi, T. Shosu, T. Koga, M. Niwa, T. Tanigawa, pH-responsive, self-assembling nanoparticle from a fullerene-tagged poly(L-glutamic acid) and its

- superoxide dismutase mimetic property, *Journal of Colloid and Interface Science*, 298 (2006) 118
240. H. Zhang, W. Cui, J. Bei, S. Wang, Preparation of poly(lactide-co-glycolide-co-caprolactone) nanoparticles and their degradation behavior in aqueous solution, *Polymer Degradation and Stability*, 91 (2006) 1929
241. K. Y. Win, S-S. Feng, In vitro and in vivo studies on vitamin ETPGS-emulsied poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for paclitaxel formulation, *Biomaterials*, 27 (2006) 2285
242. S. C. J. Loo, C. P. Ooi, Y. C. F. Boey, Influence of electron-beam radiation on the hydrolytic degradation behaviour of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), *Biomaterials*, 26 (2005) 3809
243. S. C. J. Loo, C. P. Ooi, S. H. E. Wee, Y. C. F. Boey, Effect of isothermal annealing on the hydrolytic degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), *Biomaterials*, 26 (2005) 2827
244. J. S. C. Loo, C. P. Ooi, F. Y. C. Boey, Degradation of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and poly(L-lactide) (PLLA) by electron beam radiation, *Biomaterials*, 26 (2005) 1359
245. M. J. Alonso, S. Cohen, T. G. Park, R. K. Gupta, G. R. Siber, R. Langer, Determinants of release rate of tetanus vaccine from polyester microspheres, *Pharmaceutical Research*, 10 (1993) 945
246. M. D. Blanco, R. L. Sastre, C. Teijon, R. Olmo, J. M. Teijon, Degradation behaviour of microspheres prepared by spray-drying poly(d,l-lactide) and poly(d,l-lactide-co-glycolide) polymers, *International Journal of Pharmaceutics*, 326 (2006) 139
247. S. J. Siegel, J. B. Kahn, K. Metzger, K. I. Winey, K. Werner, N. Dan, Effect of drug type on the degradation rate of PLGA matrices, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 64 (2006) 287
248. M. L. Houchin, S. A. Neuenswander, E. M. Topp, Effect of excipients on PLGA film degradation and the stability of an incorporated peptide, *Journal of Controlled Release*, 117 (2007) 413

249. D. Klose, F. Siepman, K. Elkharraz, S. Krenzlin, J. Siepman, How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 314 (2006) 198
250. J-T He, H-B Su, G-P Li, X-M Tao, W Mo, H-Y Song, Stabilization and encapsulation of a staphylokinase variant (K35R) into poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres, *International Journal of Pharmaceutics*, 309 (2006) 101
251. H. K. Kim, H. J. Chung, T. G. Park, Biodegradable polymeric microspheres with “open/closed” pores for sustained release of human growth hormone, *Journal of Controlled Release*, 112 (2006) 167
252. L. A. Dailey, T. Kissel, New poly(lactic-co-glycolic acid) derivatives: Modular polymers with tailored properties, *Drug Discovery Today: Technologies/ Drug delivery/formulation and nanotechnology*, 2 (1) (2005) 7
253. A. T. Raiche, D. A. Puleo, Modulated release of bioactive protein from multilayered blended PLGA coatings, *International Journal of Pharmaceutics*, 311 (2006) 40
254. Y. Waeckerle-Men, E. Uetz-von Allmen, B. Gander, E. Scandella, E. Schlosser, G. Schmidtke, H. P. Merkle, M. Groettrup, Encapsulation of proteins and peptides into biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres prolongs and enhances antigen presentation by human dendritic cells, *Vaccine*, 24 (2006) 1847
255. M. L. Houchin, K. Heppert, E. M. Topp, Deamidation, acylation and proteolysis of a model peptide in PLGA films, *Journal of Controlled Release*, 112 (2006) 111
256. J. Yin, Y. Noda, T. Yotsuyanagi, Properties of poly(lactic-co-glycolic acid) nanospheres containing protease inhibitors: Camostat mesilate and nafamostat mesilate, *International Journal of Pharmaceutics Pharmaceutical Nanotechnology*, 314 (2006) 46
257. C. Wischke, D. Lorenzen, J. Zimmermann, H.-H. Borchert, Preparation of protein loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles for the antigen delivery to dendritic cells using a static micromixer, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 62 (2006) 247

258. U. Bilati, E. Allemann, E. Doelker, Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59 (2005) 375
259. J. Khandare, T. Minko, Polymer–drug conjugates: Progress in polymeric prodrugs, *Prog. Polym. Sci.*, 31 (2006) 359
260. K. S. Jaganathan, S. P. Vyas, Strong systemic and mucosal immune responses to surface-modified PLGA microspheres containing recombinant Hepatitis B antigen administered intranasally, *Vaccine*, 24 (2006) 4201
261. 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
262. L. S. Liu, Y. J. Won, P. H. Cooke, D. R. Coffin, M. L. Fishman, K. B. Hicks, P. X. Ma, Pectin/poly(lactide-co-glycolide) composite matrices for biomedical applications, *Biomaterials*, 25 (16) (2004) 3201
263. E. L. Hedberg, H. C. Kroese-Deutman, C. K. Shih, R. S. Crowther, D. H. Carney, A. G. Mikos, J. A. Jansen, In vivo degradation of porous poly(propylene fumarate)/poly(DL-lactic-co-glycolic acid) composite scaffolds, *Biomaterials*, 26 (2005) 4616
264. N. Csaba, P. Caamano, Alejandro Sanchez, F. Dominguez, M. J. Alonso, PLGA:Poloxamer and PLGA:Poloxamine blend nanoparticles: new carriers for gene delivery, *Biomacromolecules*, 6 (2005) 271
265. M. J. Santander-Ortega, N. Csaba, M. J. Alonso, J. L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-Gonzalez, Stability and physicochemical characteristics of PLGA, PLGA:poloxamer and PLGA:poloxamine blend nanoparticles A comparative study, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 296 (2007) 132
266. G. Shi, M. Rouabhia, Z. Wang, L. H. Dao, Z. Zhang, A novel electrically conductive and biodegradable composite made of polypyrrole nanoparticles and polylactide, *Biomaterials*, 25 (13) (2004) 2477

267. C. Martínez-Sancho, R. Herrero-Vanrell, S. Negro, Optimisation of aciclovir poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres for intravitreal administration using a factorial design study, *International Journal of Pharmaceutics*, 273 (2004) 45
268. S. D. Patil, F. Papadimitrakopoulos, D. J. Burgess, Dexamethasone-loaded poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres/poly(vinyl alcohol) hydrogel composite coatings for inflammation control, *Diabetes Technology and Therapy*, 6(6) (2004) 887
269. U. Westedt, M. Kalinowski, M. Wittmar, T. Merdan, F. Unger, J. Fuchs, S. Schaller, U. Bakowsky, T. Kissel, Poly(vinylalcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for local delivery of paclitaxel for restenosis treatment, *Journal of Controlled Release*, 119 (2007) 41
270. J. Cheng, B. A. Teply, I. Sheri, J. Sung, G. Luther, F. X. Gu, E. Levy-Nissenbaum, A. F. Radovic-Moreno, R. Langer, O. C. Farokhzad, Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery, *Biomaterials*, 28 (2007) 869
271. S. Q. Liu, Y. W. Tong, Y. Y. Yang, Incorporation and in vitro release of doxorubicin in thermally sensitive micelles made from poly(N-isopropylacrylamide-co-N,N-dimethylacrylamide)-b-poly(D,L-lactide-co-glycolide) with varying compositions, *Biomaterials*, 26 (2005) 5064
272. A. Beletsi, Z. Panagi, K. Avgoustakis, Biodistribution properties of nanoparticles based on mixtures of PLGA with PLGA-PEG diblock copolymers, *International Journal of Pharmaceutics Pharmaceutical Nanotechnology* 298 (2005) 233
273. M. Bivas-Benita, S. Romeijn, H. E. Junginger, G. Borchard, PLGA-PEI nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58 (2004) 1
274. E. Gryparis, M. Hatziapostolou, E. Papadimitriou, K. Avgoustakis, Anticancer activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles on LNCaP prostate cancer cells, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67 (1) (2007) 1
275. M. L. T. Zweers, G. H. M. Engbers, D. W. Grijpma, J. Feijen, Release of anti-restenosis drugs from poly(ethyleneoxide)-poly(DL-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles, *Journal of Controlled Release*, 114 (2006) 317

276. D. J. Brown, J. Goodman, A review of vitamins A, C and E and their relationship to cardiovascular disease, *Clin Excell nurse Pract.*, 2 (1) (1998) 10
277. W. Bors, G. R. Buettner, The Vitamin C Radical and Its Reactions in Vitamin C in Health and Disease, eds. L. Packer and J. Fuchs, Marcel Dekker, New York, (1997), 75
278. L. J. Machlin, *Handbook of vitamins: nutritional, biochemical, and clinical aspects*. Ed.; Marcel Dekker, New York Inc., 1989.
279. D. Venkat Ratnam, D. D. Ankola, V. Bhardwaj, D. K. Sahana, M. N. V. Ravi Kumar, Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective, *Journal of Controlled Release*, 113 (2006) 189
280. K. A. Naidu, Vitamin C in human health and disease is still a mystery ? An overview, *Nutrition Journal*, 2 (2003) 1
281. S. H. Rubin, E. DeRitter, J.B. Johnson, Stability of vitamin C (ascorbic acid) in tablets, *Journal of Pharmaceutical Science*, 65 (1976) 963
282. N. Smirnoff, The function and metabolism of ascorbic acid in plants, *Annals of Botany*, 78 (1996) 661
283. M. M. Van Duijin, J. Van der Zee, J. Van Steveninck, P.J.A. Van den Broek, Ascorbate stimulates ferricyanide reduction in HL-60 cells through a mechanism distinct from the NADH-dependent plasma membrane reductase, *Journal of Biological Chemistry*, 273 (22) (1998) 13415
284. S. Ikeda, Reduction of dehydro-L-ascorbic acid in green leaves, *Plant and Cell Physiology*, 2 (3) (1961) 291
285. A. M. Bode, L. Cunningham, R. C. Rose, Spontaneous decay of oxidized ascorbic acid (dehydro-L-ascorbic acid) evaluated by high-pressure liquid chromatography, *Clinical Chemistry*, 36 (10) (1990) 1807
286. R. Austri, A. Semenzato, A. Bettero, Stability of vitamin C derivatives in solution and topical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15 (1997) 795
287. M. Niwa, Y. Saito, Y. Ishii, H. Hayashi, Method for producing 2-keto-L-gulonic acid, USA patent 5 834 263 (1998)

288. M. Gallarate, M. E. Carlotti, M. Trotta, S. Bovo, On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use, *International Journal of Pharmaceutics*, 188 (1999) 233
289. J. H. Yang, S. Y. Lee, Y. S. Han, K. C. Park, J. H. Choy, Efficient transdermal penetration and improved stability of L-ascorbic acid encapsulated in an inorganic nanocapsule, *Bulletin of the Korea Chemical Society*, 24 (2003) 499
290. P. Spiclin, M. Gasperlin, V. Kmetec, Stability of ascorbyl palmitate in topical microemulsions, *International Journal of Pharmaceutics*, 222 (2001) 271
291. A. Semenzato, R. Austria, C. Dall'Aglio, A. Bettero, HPLC determination of ionic compounds in cosmetic emulsions: Application to magnesium ascorbyl phosphate, *Journal of Chromatography A*, 705 (2) (1995) 385
292. K. G. H. Desai, H. J. Park, Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying, *Journal of Microencapsulation*, 22 (2005) 179
293. B. Y. Chen, Y. H. Lee, W. C. Lin, F. H. Lin, K. F. Lin, Understanding the characteristics of L-ascorbic acid-montmorillonite nanocomposite: chemical structure and biotoxicity, *Biomedical Engineering, Applications, Basis & Communications*, 18 (2006) 30
294. T. Yokoyama, C. C. Huang, Nanoparticle technology for the production of functional materials, *KONA*, 23 (2005) 7
295. S. Giovagnoli, G. Luca, I. Casaburi, P. Blasi, G. Macchiarulo, M. Ricci, M. Calvitti, G. Basta, R. Calafiore, C. Rossi, Long-term delivery superoxide dismutase and catalase entrapped in poly(lactide-co-glycoide) microspheres: in vitro effect on isolated neonatal porcine pancreatic cell clusters, *Journal of Controlled Release*, 107 (2005) 65
296. C. Martinez-Sancho, R. Herrero-Vanrell, S. Negro, Vitamin A palmitate and aciclovir biodegradable microspheres for intraocular sustained release, *International Journal of Pharmaceutics*, 326 (2006) 100
297. M. Hashida, H. Hirabayashi, M. Nishikawa, Y. Takakura, Targeted delivery of drugs and proteins to the liver via receptor-mediated endocytosis, *Journal of Controlled Release*, 46 (1997) 129

298. L. Mu, S. S. Feng, A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS, *Journal of Controlled Release*, 86 (2003) 33
299. Z. Zhang, S-S. Feng, Self-assembled nanoparticles of poly(lactide)-vitamin E TPGS copolymers for oral chemotherapy, *International Journal of Pharmaceutics Pharmaceutical Nanotechnology*, 324 (2006) 191
300. L. Mu, S. S. Feng, Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol), *Journal of Controlled Release*, 80 (2002) 129
301. T. Suzuki, Z. Matsukawa, A. Suzuki, Method and apparatus for preparing microspheres, US Patent 7 011 776, March 2006.
302. M. E. Kafriksen, G. Oakley, Pharmaceutical methods of delivering folic acid, US Patent 6 190 693, Februar 2001.
303. N. Kanthamneni, S. Prabhu, Formulation development of targeted nanoparticle-based drug delivery systems for the chemoprevention of colon cancer, AAPS Annual Meeting Exposition, (2006)
304. H. S. Yoo, T. G. Park, Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles, *Journal of Controlled Release*, 96 (2) (2004) 273
305. S. Mentus, U. Mioč, "Odabrane metode fizičko-hemijske analize", Fakultet za fizičku hemiju, (1992), p 41-69, p 113-121, p. 193-208.
306. S. Milosavljević, "Strukturne instrumentalne metode", Hemijski fakultet, Beograd (1994), p. 39-107.
307. W. Lohmann, D. Pagel, V. Penka, Structure of ascorbic acid and its biological function. Determination of the conformation of ascorbic acid and isoascorbic acid by infrared and ultraviolet investigations, *European Journal of Biochemistry*, 138 (1984) 479
308. E. E. Underwood, Quantitative stereology, Wesley A., Reading M. A. editors. 1969, p.330

309. H. Exner, H. Hougardy, Quantitative image analysis of microstructures, DGM informazions-Gesellschaft Gmbh Verlag, 1988; p. 11-12
310. P.van de Witte, A. Boorsma, H. Esselbrugge, P. J. Dijkstra, J. W. A. van den Berg and J. Feijen, Differential Scanning Calorimetry Study of Phase Transitions in Poly(lactide)-Chloroform-Methanol Systems, *Macromolecules*, 29, (1996) 212
311. I. Jovanović, M. Stevanović, B. Nedeljković, N. Ignjatović, The effect of processing parameters on characteristics of PLLA microspheres, *Material Science Forum*, 555 (2007) 453
312. 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
313. Y-I Jeong, Y-H. Shim, K-C Song, Y-G Park, H-W Ryu, J-W Nah, Testosterone-encapsulated surfactant-free nanoparticles of poly(DL-lactide-co-glycolide): preparation and release behavior, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 23 (11) (2002) 1579
314. D. Uskoković, M. Stevanović, Postupak dobijanja mikrosfera bioresorbilnog polimera poli(DL-laktid-ko-glikolida) koje sadrže askorbinsku kiselinu, *Zavod za intelektualnu svojinu Patent -2006/0542* (2006)
315. 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*, in press, (2007) (doi:10.1155/2007/84965)
316. G. J. Thompson, D. Hansford, S. Higgins, C. Rostron, G.A. Hutcheon, D.L. Munday, Evaluation of ibuprofen-loaded microspheres prepared from novel copolyesters *International Journal of Pharmaceutics*, 329 (2007) 53
317. 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
318. Y. Liu, N. Tsapis, D. A. Edwards, Investigating Sustained-release Nanoparticles for Pulmonary Drug Delivery, Harvard University, MRSEC REU Program, (2003)

319. A. J. Gomes, A. S. Faustino, C. N. Lunardi, L. O. Lunardi, A. E. Machado, Evaluation of nanoparticles loaded with benzopsoralen in rat peritoneal exudate cells, *International Journal of Pharmaceutics*, 332 (2007) 153
320. A. F. Holleman, E. Wiberg, *Inorganic Chemistry*, Academic Press: San Diego, (2001)
321. M. Kiremitci-Gumusderelioglu, G. Deniz, Synthesis, characterization and *in vitro* degradation of poly(D,L-lactide-co-glycolide) films, *Turkish Journal of Chemistry*, 23 (1999) 153
322. T. H. Yang, A. Dong, J. Meyer, O. Johnson, J. Cleland, J. Carpenter, Use of infrared spectroscopy to assess secondary structure of human growth hormone within biodegradable microspheres, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88 (2000) 161
323. A. Grant, T. J. Wilkinson, D. R. Holman, M.C. Martin, Identification of recently handled materials by analysis of latent human fingerprints using infrared spectromicroscopy, *Spectroscopic Techniques*, 59 (2005) 1182
324. E. Catiker, M. Gumusderelioglu, A. Guner, Degradation of PLA, PLGA homo- and copolymers in the presence of serum albumin: a spectroscopic investigation, *Polymer International*, 49 (2000) 728
325. M. M. Stevanović, B. Jordović, D. P. Uskoković, Stereological analysis of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles containing ascorbic acid during *in vitro* degradation process, *Journal of Microscopy*, (2007), submitted
326. F. Rozario, *In vivo* and *in vitro* studies on heavy doses and fluorescent-labelled vitamin C using ESR and fluorescence spectroscopy, Doctoral Dissertation, Vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern, (2005)

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Магдалена Стевановић

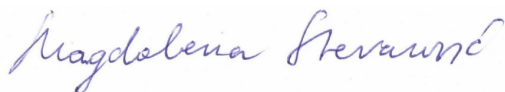
број индекса теза је одбрањена 2007. године

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Синтеза, карактеризација и деградација наносфера поли(ДЛ-лактид-ко-гликолида) које садрже аскорбинску киселину

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



Потпис докторанда

У Београду, 06. 11. 2013.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Синтеза, карактеризација и деградација наносфера поли(ДЛ-лактид-ко-гликолида) које садрже аскорбинску киселину

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

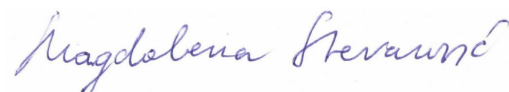
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда



У Београду, 06. 11. 2013.

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.