

Januar 2013



MASTER  
RAD

SINTEZA, KARAKTERIZACIJA I  
CITOKOMPATIBILNOST LIOFILIZIRANIH  
SFERNIH ČESTICA POLI(EPILON  
KAPROLAKTONA) I ISPITIVANJE NJIHOVOG  
UTICAJA NA NASTANAK REAKTIVNIH RADIKALA  
KISEONIKA

Fakultet za fizičku hemiju | **Stupar Petar**

## MENTORI:

**dr Magdalena M. Stevanović** - viši naučni saradnik, Institut tehničkih nauka, SANU

**dr Gordana Ćirić-Marjanović** - vanredni profesor, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu

## ČLANOVI KOMISIJE:

**dr Nikola Cvjetičanin** - vanredni profesor, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu

**dr Miloš Mojović** - docent, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu

---

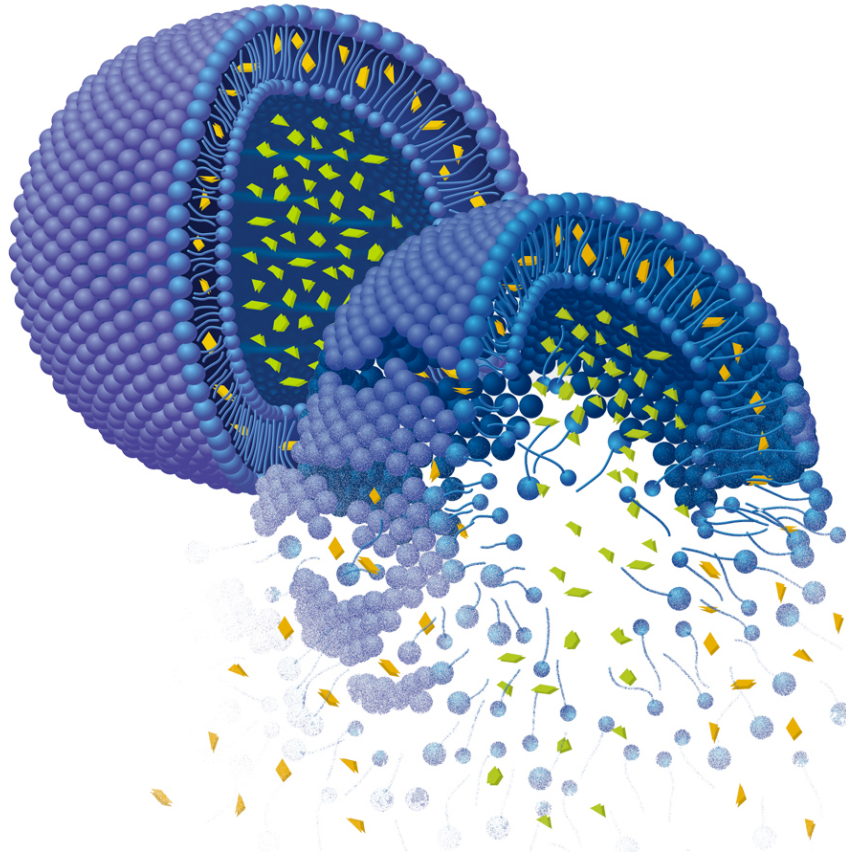
## ZAHVALNICA

---

Posebnu zahvalnost dugujem mentoru dr Magdaleni Stevanović, višem naučnom saradniku Instituta tehničkih nauka, na veoma korisnim savetima i samoj pomoći pri realizovanju i koncipiranju rada. Zahvaljujem se i mentoru dr Gordani Ćirić-Marjanović sa Fakulteta za fizičku hemiju (Univerziteta u Beogradu), na korisnim savetima i pomoći. Takođe sam zahvalan i članovima komisije - dr Nikoli Cvetićaninu, vanrednom profesoru Fakulteta za fizičku hemiju, kao i dr Milošu Mojoviću, docentu Fakulteta za fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu.

Zahvaljujem se i MSc Nenadu Filipoviću (Institut tehničkih nauka) za pomoć prilikom izvođenja eksperimenata. Infracrvena spektroskopska analiza, jednim delom rađena je na Institutu za opštu i fizičku hemiju, zahvaljujući pomoći mr Aleksandre Radulović i dr Branimira Kovačevića, dok je drugim delom obavljena na Tehnološkom fakultetu, zahvaljujući dr Aleksandru Marinkoviću. Jedan deo mikroskopske analize, odrađen je na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu (odsek za biologiju i ekologiju), zahvaljujući saradnji sa dr Milošem Bokorovim, a za ostale mikroskopske analize, zaslužan je dr Vladimir Pavlović, naučni savetnik u Institutu tehničkih nauka SANU i vanredni profesor Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Zahvaljujem se i dr Smilji Marković, sa Instituta tehničkih nauka, za merenja raspodele veličine čestica. Testovi citotoksičnosti i ispitivanja uticaja uzoraka na stvaranje reaktivnih radikala kiseonika, omogućeni su zahvaljujući dr Jani Nunić, prof. dr Metki Filipič i Sandri Cundrič iz Nacionalnog instituta za biologiju u Ljubljani. Ovom prilikom se zahvaljujem i prof. dr Draganu Uskokoviću (Institut tehničkih nauka SANU), rukovodiocu projekta III45004.

Teza se sastoji iz sedam celina. Prvo poglavlje pruža uvid u teorijske osnove biodegradabilnih polimera, alifatičnih poliestara, poli( $\epsilon$ -kaptoprolaktona) kao njihovog predstavnika, ali i osnovne osobine koje se moraju uzeti u obzir pri ispitivanju primene u biomedicini. Predstavljen je i opšti opis procesa liofilizacije. Drugo poglavlje ukratko predstavlja cilj rada, dok je u trećem dat pregled eksperimentalnih metoda odrađenih u okviru master rada. Četvrta celina sadrži sve dobijene rezultate, koji su u petoj celini detaljnije diskutovani. Šesto poglavlje sadrži kratak zaključak donešen na osnovu rezultata, dok je u sedmom poglavlju izlistana literatura korišćena u radu.



*The scientist does not study nature because it is useful to do so. He studies it because he takes pleasure in it, and he takes pleasure in it because it is beautiful. If nature were not beautiful it would not be worth knowing, and life would not be worth living. I am not speaking, of course, of the beauty which strikes the senses, of the beauty of qualities and appearances. I am far from despising this, but it has nothing to do with science. What I mean is that more intimate beauty which comes from the harmonious order of its parts, and which a pure intelligence can grasp.*

**Jules Henri Poincaré** - Science and Method (1908)

## SADRŽAJ

---

Zahvalnica .....	2
Apstrakt.....	6
Abstract.....	7
1 Teorijski Deo .....	8
1.1 Uvod .....	9
1.2 Biodegradabilni polimerni materijali .....	11
1.3 Alifatični poliestri .....	14
1.4 PCL u medicini.....	16
1.4.1 Kontrolisana dostava lekova .....	17
1.4.2 Tkivno inženjerstvo.....	18
1.4.3 Formulacije .....	20
1.4.4 Biodegradacija PCL.....	24
1.4.5 Biokompatibilnost.....	26
1.5 Liofilizacija.....	28
1.5.1 Stabilnost nanočestica.....	28
1.5.2 Proces liofilizacije .....	29
1.5.3 Liofilizacija nanočestica.....	31
2 Cilj istraživanja .....	38
3 Eksperimentalni deo .....	40
3.1 Eksperimentalni rad .....	41
3.1.1 Materijal .....	41
3.1.2 Sinteza.....	41
3.2 Eksperimentalne metode .....	43
3.2.1 Liofilizacija .....	43
3.2.2 FT Infracrvena spektroskopija (FT-IR) .....	43
3.2.3 Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) .....	44
3.2.4 Merenje raspodele veličina čestica (DLS) .....	46
3.2.5 Određivanje citotoksičnosti (MTT test) .....	47
3.2.6 Formiranje reaktivnih radikala kiseonika (DCFH-DA test) .....	47
4 Rezultati .....	49
4.1 FT-IR analiza.....	50
4.2 SEM analiza .....	55
4.3 Raspodela veličina čestica.....	60

4.4 MTT Test.....	62
4.5 DCFH-DA Test.....	64
5 Diskusija.....	68
5.1 Diskusija karakterizacije uzoraka.....	69
5.1.1 Saharoza kao krioprotektant.....	69
5.1.2 PGA kao krioprotektant.....	71
5.1.3 PVA kao krioprotektant.....	72
5.1.4 Glukoza kao krioprotektant.....	72
5.2 Biološki uticaji.....	73
5.2.1 MTT Test.....	73
5.2.2 Stvaranje ROS.....	74
6 Zaključak.....	75
7 Literatura.....	77
Bibliografija.....	85

## APSTRAKT

---

Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL) je biokompatibilan i biodegradabilan poliestar, koji se koristi za različite biomedicinske primene, kao što je kontrolisana dostava lekova, tkivno inženjerstvo, fiksacija koštanih fraktura i druge. Jedan od osnovnih uslova za primenu PCL polimera na polju kontrolisane dostave medikamenata, jesu odgovarajuće morfološke osobine čestica, tj. njihova sferičnost i velika uniformnost.

Liofilizacija se koristi u farmaceutskoj industriji prilikom dobijanja najrazličitijih medikamenata, a predstavlja postupak sušenja pri redukovanom pritisku i pri vrlo niskim temperaturama. Iako omogućuje dobijanje čestica dovoljne stabilnosti za distribuciju i skladištenje, ovaj proces generiše izvesne negativne uticaje na strukturu samih formulacija. U cilju prevazilaženja ovakvih nezgoda, formulaciji se dodaju krioprotektanti, supstance koje štite čestice tokom zamrzavanja. Odabir krioprotektanta ni malo nije lak zadatak. Radi obezbeđivanja maksimalne protekcije čestica, potrebno je odabrati pravi tip krioprotektanta i optimizovati njegovu koncentraciju.

U radu je opisana sinteza mikrosfera PCL-a fizičko-hemijskom rastvarač/nerastvarač metodom i data je komparacija morfoloških karakteristika čestica sušenih u liofilizatoru, uz korišćenje različitih krioprotektanata: poli(L-glutaminske kiseline) (PGA), poli(vinil alkohola) (PVA), saharoze ili glukoze. Uzorci su karakterisani metodama infracrvene spektroskopije sa Fourierovom transformacijom (FT-IR), skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) kao i metodom analize difrakcije laserske svetlosti na česticama (DLS). U analizi svojstava materijala koji je procesiran u cilju potencijalne primene u oblasti biomedicine, veoma je važno ispitati njegovu citokompatibilnost, odnosno meru u kojoj je materijal podesan da koegzistira u prisustvu ćelija, tako da ne utiče na njihov prirodni životni proces, u smislu podsticanja procesa degeneracije i umiranja. Takođe, veoma je važno ispitati i uticaj materijala na prekomerno obrazovanje reaktivnih kiseoničnih vrsta (reactive oxygen species - ROS) i nastanak oksidativnog stresa, koji se dovodi u vezu sa mnogim oboljenjima. Citokompatibilnost uzoraka je ispitana MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) testom, dok je ROS efekat ispitan DCFH-DA (2'-7'-dihlorodihidrofluorescein diacetat) testom.

**Ključne reči:** poli( $\epsilon$ -kaprolakton), kontrolisana dostava, liofilizacija, krioprotektant, FTIR, SEM, MTT, ROS.

## ABSTRACT

---

Poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) is a biocompatible and biodegradable polyester, extensively investigated for applications in controlled drug delivery, tissue engineering, bone fracture fixation etc. One of the crucial conditions for the application of polymers in controlled drug delivery are morphological characteristics of the particles, their sphericity and a high uniformity.

Freeze drying, also termed lyophilization, is a process of drying in conditions of reduced pressure and very low temperatures. Although this technique was considered as a good method to conserve the integrity of particulate systems, various stresses are generated during the process. To protect nanoparticles from stresses and subsequent aggregation, a cryoprotectant or lyoprotectant is generally used. The selection of a proper cryoprotectant is not straightforward. In some cases, increasing cryoprotectant concentration to a certain level may eventually reach a limit of stabilization or even destabilize nanoparticles. In general, the type of cryoprotectant must be selected and its concentration must be optimized to ensure a maximum stabilization of nanoparticles.

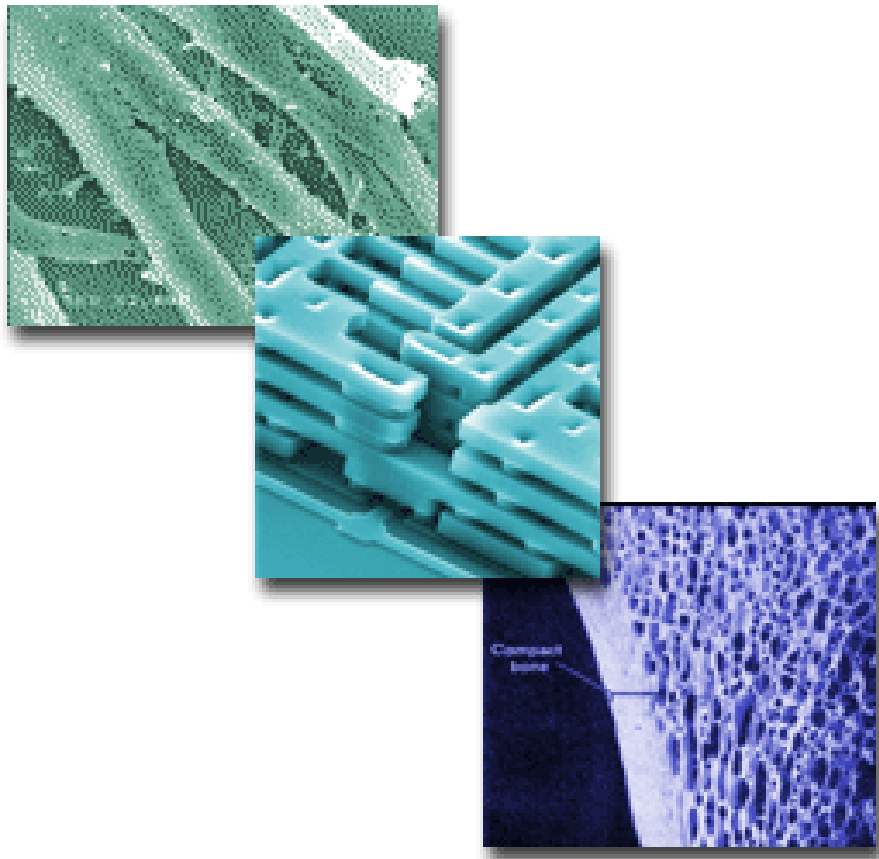
The aim of this study was to produce PCL spherical particles using physico-chemical solvent/nonsolvent method, and to evaluate different cryoprotective excipients that were used in order to increase stability of the particles and protect them from freezing stress. Sugars, such as glucose and sucrose, and polymers (PVA and PGA), were added to the formulation to test the effects on the outcome of freeze-dried poly( $\epsilon$ -caprolactone) micro- and nanospheres. Samples were characterized using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), Scanning Electron Microscopy (SEM) and Dynamic Light Scattering method (DLS). In the analysis of properties of materials processed for applications in biomedicine, it is of crucial importance to test its cytocompatibility, the extent at which the material is able to coexist in the presence of cells without interrupting their living process in terms of promoting degeneration and death. Furthermore, it is very important to investigate the effects on excessive production of reactive oxygen species (ROS) and the oxidative stress, which is responsible for many diseases. In vitro studies used, include MTT assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), testing cytotoxicity as the quality of being toxic to cells, and DCFH-DA assay (2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetate), testing the possible increase in ROS levels.

**Key words:** poly( $\epsilon$ -caprolactone), controlled release, drug delivery, lyophilization, freeze drying, cryoprotectant, SEM, FTIR, MTT, ROS



# 1 TEORIJSKI DEO

---





## 1.1 UVOD

---

Veliki broj klasa materijala je obuhvaćen pojmom "biomaterijali", a neke od njih su: metalni biomaterijali, keramički i staklasti biomaterijali, sintetički nedegradabilni i degradabilni polimeri, kompozitni biomaterijali, bioderivatni polimeri i tkiva, kao i pasivne i bioaktivne prevlake [1]. Sintetički polimeri su veoma atraktivni i korisni u oblasti biomaterijala, zbog prilagodljive hemijske strukture i fizičkih osobina. Regulisanjem strukturnih parametara polimera i njegove morfologije na različitim skalama veličina, postižu se kontrolisane fizičke osobine u cilju zadovoljavanja raznovrsnih kliničkih potreba i regulisanja ponašanja ćelija [2]. Pored toga što se mogu spajati sa drugim polimerima, polimerni biomaterijali se mogu praviti u sistemima zajedno sa prirodnim materijalima ili neorganskim nanočesticama, radi dobijanja novih, unikatnih, sinergijskih osobina i bolje primene [3].

Revolucionaran je koncept uvođenja polimera sposobnih da degradiraju unutar ljudskog tela, nakon što su poslužili kao strukturna potpora, kao matrice za kontrolisanu dostavu lekova ili kao zamena za vanćelijski matriks pri indukciji regeneracije tkiva [4]. Klasičan prilaz u dizajniranju degradabilnih polimera je da im se pripoje hemijske veze, koje su raskidive pod fiziološkim uslovima. Raskidanje veza može nastati usled hidrolize (npr. u poliestrima), uticaja enzima ili preko drugih mehanizama, poput redoks reakcija (npr. kod disulfidne veze) [5]. Kidanje veza rezultira polimernim fragmentima rastvornim u vodi, koji se izlučuju iz organizma metaboličkim putevima, čime se izbegava potreba za još jednim hirurškim zahvatom [6]. Iako je već nekoliko decenija razvoj medicinskih implanta, baziranih na biodegradabilnim polimerima, postao obećavajuća strategija za medicinsku industriju, pun potencijal tržišta još uvek nije ostvaren za primenjive biodegradabilne polimere. Trenutno, degradabilni materijali obuhvataju samo mali procenat svih biomaterijala u upotrebi. Jedan od razloga što većina ovakvih materijala još uvek nije stigla do faze kliničkih ispitivanja ili odobrenja za sigurnu kliničku upotrebu, jeste činjenica da je predviđanje dugotrajnih učinaka polimera *in vivo*, veoma izazovan posao [4].

Alifatični poliestri su među najvažnijim biokompatibilnim, biodegradabilnim materijalima pa se sve više pažnje usmerava ka njima. Njihova konvencionalna primena u poljoprivredi, industriji za izradu ambalaže i u biomedicini (u tkivnom inženjerstvu i kontrolisanoj dostavi lekova), poslednjih godina je u ogromnom porastu [7]. Veći broj degradabilnih polimera je od interesa za pomenute primene, sa stanovišta biokompatibilnosti, degradacije, bioaktivnosti i resorptivnosti. Među njima se posebno izdvaja poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL), koji ima široku primenu, uključujući sisteme za dostavu lekova, medicinske šavove i u tkivnom inženjerstvu [8].

Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) je jedan od najranije sintetisanih polimera i to 1930-ih godina. Može se sintetisati ili polimerizacijom otvaranja prstena  $\epsilon$ -kaprolaktona, korišćenjem različitih anjonskih, katjonskih ili koordinativnih katalizatora ili polimerizacijom 2-metilen-1,3-dioksepana, otvaranjem prstena slobodnim radikalom [9, 10]. PCL je hidrofoban i semikristalan polimer. Neke od prednosti primene ovog polimera u biomedicinske svrhe čine i njegova dobra rastvorljivost, niska tačka topljenja (59 - 64 °C), dobra permeabilnost za mnoge lekove i izuzetna kompatibilnost pri mešanju sa drugim polimerima [11]. Sedamdesetih i osamdesetih godina dvadesetog veka, PCL i njegovi kopolimeri su dosta istraživani u sistemima za dostavu lekova, zbog njegovih zapaženih prednosti u odnosu na prirodne polimere. Ove prednosti podrazumevaju kontrolisanu kinetiku degradacije i mehaničke osobine, poput lakoće oblikovanja, dobijanja porozne strukture i otpuštanja lekova iz unutrašnjosti polimerne matrice. Iako je ovaj polimer izazvao znatna interesovanja, tih godina se pažnja preusmerila na polimere koji degradiraju u relativno kratkom roku, od nekoliko dana ili

nedelja. Za primene u sistemima kontrolisane dostave, polilaktidi i poliglikolidi su tada bili u žiži istraživanja [12]. Istraživači na poljima biomedicinskih implanata i sistema za dostavu, smatrali su da polimeri koji se brže resorbuju, imaju veće prednosti od onih koji degradiraju duže. Zbog ovog, PCL je gotovo zaboravljen naredne dve decenije. Ponovni nalet interesovanja za PCL javlja se 1990-ih i 2000-ih, razvitkom polja tkivnog inženjerstva [9]. Uočeno je da PCL ima mnogo bolje reološke i viskoelastične osobine u odnosu na ostale resorptivne polimere. Još jedna od prednosti jeste relativno jeftinija proizvodnja, za razliku od ostalih alifatičnih poliestara.

Farmaceutska istraživanja su uglavnom fokusirana na sintetisanju i testiranju novih lekova, ali ne, u tolikoj meri, i na krajnju formu doziranja istih. Lekovi se skoro isključivo primenjuju oralno ili intravenozno, često na mestu udaljenom od ciljanog tkiva [13]. Komercijalni farmaceutski sistemi imaju dosta mana, kao što su: visok stepen neželjenih efekata, fluktuacija nivoa leka u telu, mala efikasnost leka i nemogućnost kontrolisanja koncentracije, trajanja i biološke aktivnosti leka. U cilju poboljšanja farmaceutskih sistema, osmišljena je tehnologija ciljanog i kontrolisanog otpuštanja lekova. Sistemi za dostavu lekova, koji često podrazumevaju makromolekule kao nosače lekova, imaju brojne prednosti u odnosu na pomenute konvencionalne forme doziranja [14]. Glavne mane hemoterapije su kratak *in vivo* polu život i često ponavljanje doza, ali i velika toksičnost, kao i mnogi drugi sporedni efekti [13]. Osnovna ideja sistema za dostavu lekova jeste da se terapijski aktivni molekuli transportuju u odgovarajućoj koncentraciji do mesta gde je njegovo dejstvo potrebno, u određeno vreme. Jedan od primera ovih sistema predstavlja ugrađivanje terapijskih agenasa u biodegradabilne polimerne čestice, iz kojih će se lek oslobađati na kontrolisan način i tokom dužeg vremenskog perioda [15].

Prednosti primene mikro- i nanočestica na polju farmacije su brojne, ali ipak, šira primena tih čestica može biti ograničena problemima kao npr. održanje integriteta tečne suspenzije tokom dužeg vremenskog perioda [16]. Površinski aktivni agensi se obično dodaju radi stabilizacije suspenzije, direktnom adsorpcijom na površinu čestica. Međutim, često je primećena aglomeracija tokom skladištenja. U prilog poboljšanju fizičke stabilnosti, i hemijske stabilnosti polimernog materijala, od kojeg su nanočestice, treba da se uzme u obzir. Stoga, poboljšanje stabilnosti nanočestica predstavlja veoma važan zadatak pri razvoju ovakvih nosača lekova. Liofilizacija je jedan od najpogodnijih metoda stabilizacije i olakšava rukovanje koloidnim sistemima, koji bi kao suspenzija tokom skladištenja pretrpeli izmene u relativno kratkom roku [17].

Liofilizacija je industrijski proces sušenja, zamrzavanjem i sublimacijom leda. Koristi se za konverziju rastvora labilnih materijala u čvrsto stanje dovoljne stabilnosti za distribuciju i skladištenje. Smatra se dobrom tehnikom za očuvanje integriteta koloidalnih čestica. Zamrzavanje je najvažniji, a i najagresivniji korak pri procesu liofilizacije [18, 19]. U ovom koraku može doći do aglomeracije ili destrukcije nanočestica. Radi sprečavanja ovakvih uticaja, formulacijama se dodaju različite supstance - krio- i lioprotektanti. U mnogim radovima, široko je diskutovana primena liofilizacije na liposome [16, 20, 21]. Međutim, kada su u pitanju polimerne nanočestice, istraživanja nisu toliko brojna. Takođe, neka od istraživanja se čak i suprotstavljaju [18]. Stoga, veoma je korisno sistematski istraživati ovaj proces i fokusirati se na optimizaciju liofilizacije mikro- i nanočestica. Mnogi smatraju da su aditivi neophodni, u formi protektanata, i od njih se najčešće koriste ugljeni hidrati. Ovaj rad se bazira na ispitivanju četiri potencijalna krioprotektanta - poli(vinil alkohola), poli( $\alpha$ ,  $\gamma$ , L-glutaminske kiseline), saharoze i glukoze.

## 1.2 BIODEGRADABILNI POLIMERNI MATERIJALI

---

Biodegradabilni polimeri imaju veoma široku primenu, ali je poslednjih godina najviše razvijena primena u biomedicinske svrhe. Primenuju se na polju farmakologije, kao mehanička potpora ili barijera, u razvitku veštačkih tkiva/organa, dostavi lekova itd [22]. Naravno, u ove svrhe se mogu primeniti i nedegradabilni ("stabilni") polimeri, ali kao takvi bi ostali u tkivu i za njihovo uklanjanje bi bio potreban naknadan hirurški zahvat. Najvažniji kriterijum primene ovakvih biomaterijala u pomenute svrhe, jeste toksikološki profil. Polimer, kao ni njegovi produkti degradacije, ne smeju izazvati nikakve nepoželjne toksične ili imunološke odgovore. Biodegradabilni polimeri mogu biti prirodni ili sintetički. Generalno, sintetički polimeri pružaju više prednosti u odnosu na prirodne, iz razloga što se mogu krojiti sa velikim brojem mogućnosti i sa različitim karakteristikama [23, 24]. Osobina polimera koja je privukla najviše pažnje jeste mogućnost kopolimerizacije, tj. dobijanja usrednjenih karakteristika dva ili više polimera, čime se sintetišu polimeri sa željanim karakteristikama.

Pri izboru polimera za određene biomedicinske svrhe, potrebno je obratiti pažnju i na mehaničku jačinu polimera, vreme biodegradacije, površinske osobine, fizičko-hemijske parametre, biokompatibilnost, stepen kopolimerizacije, prisustvo funkcionalnih grupa za modifikovanje, mogućnost izrade u kompleksnim oblicima sa pogodnom poroznošću, sposobnosti da potpomaže ćelijsku proliferaciju itd [25, 26, 27]. Biodegradabilni sintetički polimeri se primenjuju u više kliničkih sistema, uključujući izradu resorptivnih šavova, sistemima za kontrolisanu dostavu medikamenata, ortopedskih fiksacionih uređaja i u tkivnom inženjerstvu uopšte. Njihova uloga može biti npr [12]:

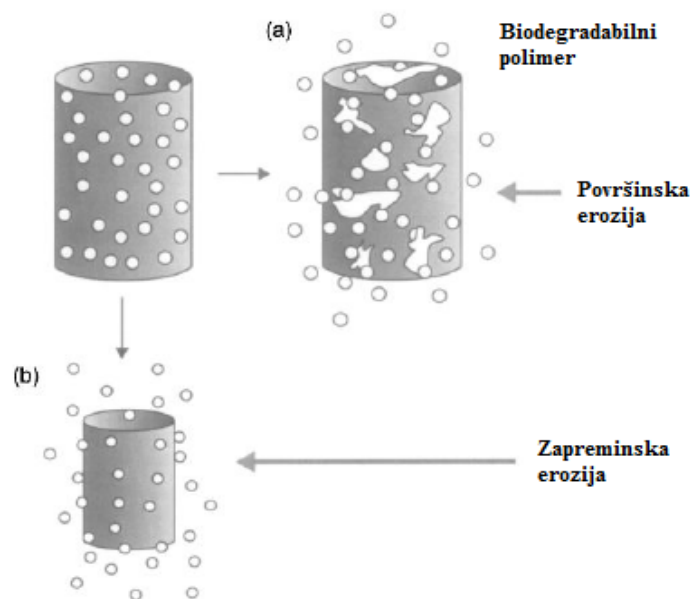
- da zamene tkiva, koja su obolela ili na drugi način postala nefunkcionalna, kao zamena za zglobove, veštački srčani zalisci i arterije, rekonstrukcije zuba i očna sočiva
- da potpomognu obnovu tkiva, uključujući šavove, ali i ploče pri lomu kostiju i implante za tetive i ligamente
- da zamene deo ili sve funkcije glavnih organa, uključujući hemodijalizu (zamenjuje funkciju bubrega), oksigenaciju (pluća), levu komoru ili celo srce, jetru ili gušteraču
- za kontrolisanu dostavu lekova na određena mesta u telu, tj. na ciljana mesta (npr. tkivo tumora) ili kao sistemi za dostavu medikamenta na duži vremenski period (npr. u slučaju insulina, pilokarpina, kontraceptiva)

U tkivnom inženjerstvu, velika pogodnost sintetičkih polimera leži u tome što se mogu izrađivati u različitim oblicima sa različitim morfološkim strukturama, porama, pogodnim za urastanje tkiva. U prilog tome, mogu se dizajnirati polimeri sa hemijskim funkcionalnim grupama koje promovišu urastanje tkiva [22]. Kriterijumi koje polimeri moraju da ispune u primeni u tkivnom inženjerstvu variraju, od sposobnosti da pruže mehaničku potporu u toku rasta tkiva i postepene degradacije u biokompatibilne produkte, sve do zahtevnijih kriterijuma, poput sposobnosti da stvori pogodne uslove za prisvajanje ćelija, faktora rasta itd. Izbor dimenzija određenog implanta nije jednostavan zadatak. Deblji slojevi implanta pružaju veću početnu snagu u odnosu na tanji, ali takođe i degradiraju brže. Ovo komplikovano ponašanje daje poteškoće u optimizaciji dizajna biodegradabilnog implanta. Tipično vreme degradacije implanta može biti i po nekoliko meseci, stoga, pristup probe i greške je dosta teško primeniti. Kompjuterski potpomognut pristup bi bio idealan za prevazilaženje ovakve poteškoće [28]. U kontrolisanoj dostavi medikamenata, na primer, idealno bi bilo da je kinetički profil polimera nultog reda. Smatra se da površinski erodirajući polimeri prate kinetiku prvog reda, međutim, takvi polimeri imaju prilično

labilne veze, pa ih to ne čini pogodnim kandidatima za sisteme dostave. Poliestri mogu da zadrže medikamente prilično dugo, dobro su istraženi na planu kliničke sigurnosti, pa se stoga najčešće koriste u razvoju sistema za dostavu [29].

Pre upotrebe u biomedicinske svrhe, veoma je važno prvo ispitati degradacioni profil polimera. Obično, polimerna matrica degradira hidrolitički ili pod dejstvom enzima. Potrebno je napomenuti da su biodegradacija i bioerozija dva odvojena pojma [23]. Degradacija podrazumeva razdvajanje polimernih lanaca, nakon čega se polimer raspada na oligomere i monomere. Sa druge strane, erozija je gubitak materijala koji se manifestuje smanjenjem mase polimera. Erozija zavisi od nekoliko procesa, uključujući brzinu degradacije, poroznost i lakoću difuzije oligomera i monomera sa polimerne matrice. Kada je reč o difuziji vode u polimernu matricu, proces degradacije se može podeliti na površinsku i zapreminsku eroziju (slika 1.2.1). U zapreminskoj, gubitak mase polimera je uniforman duž polimerne matrice i brzina erozije zavisi više od zapremine nego od debljine polimera. Nasuprot tome, površinska degradacija se manifestuje u gubitku materijala od spoljašnje strane ka unutrašnjoj strani matrice, pa je brzina erozije zavisna od debljine polimernog diska [29].

Biodegradacija polimera u organizmu je proces koji se sastoji od dve faze [28]. Prva, hemijska hidroliza polimernog lanca i druga, aktivni metabolizam. Tokom prve faze, voda difunduje u biodegradabilni implant, preferencijalno interagujući sa estarskim vezama amorfnе faze i obrazujući od dužih polimernih lanaca kraće, u vodi rastvorne fragmente (oligomere). U drugoj fazi, enzimi iz belih krvnih ćelija utiču i dovode do dalje degradacije polimera do monomerne kiseline, kao npr. laktidne kiseline u slučaju polilaktida. Ove kiseline ulaze u ciklus limunske kiseline i izlučuju se u obliku vode i ugljen dioksida. Drugi faktor, koji komplikuje biodegradaciju je taj što se nivo kristalčnosti često povećava tokom degradacije. Kako molekuli vode prodiru unutar amorfnе faze, uzrokujući kidanje polimernih lanaca, mobilnost tih lanaca se povećava, što ubrzava proces kristalizacije amorfnе faze.



**SLIKA 1.2.1** DOSTAVA LEKA IZ BIODEGRADABILNOG SISTEMA. (A) POVRŠINSKA EROZIJA, (B) ZAPREMINSKA EROZIJA SISTEMA [23]

Uopšteno, faktori koji utiču na degradaciju polimera su [29]:

- hemijska priroda: tip veze između monomera
- rastvorljivost u vodi i propustljivost polimera: hidrofilan/hidrofoban
- princip kidanja lanca: hidrolitički/enzimski
- mehanizam hidrolize: nekatalizovana/pH katalizovana/autokatalizovana
- rastvorljivost produkata degradacije u vodi
- molekulska masa i polidisperznost
- struktura: kristalna/amorfna
- temperatura staklastog prelaza
- morfologija: veličina/oblik/dimenzije/odnos površine i zapremine
- poroznost
- aditivi: lek/modifikatori/stabilizatori
- metod sterilizacije: temperatura/vlažnost/ozračivanje
- mesto primene

Svi ovi faktori utiču na ukupnu brzinu degradacije i srednji život polimera. Međutim, preovlađujući faktor je hemijska priroda polimernog lanca, kao i njegova hidrofilitnost/hidrofobnost. Na vreme degradacije najviše utiče hidrofilitnost polimera i njegovog lanca. Što je hidrofilitniji polimer, degradacija je brža, pri konstantnim ostalim faktorima. Rastvorljivost proizvoda degradacije je takođe važan faktor u njihovom otklanjanju iz tela. Manja molekulska masa oligomera i njihova dobra rastvorljivost dovode do brže degradacije i uklanjanja iz organizma.

Katalitičke efekte uzrokuju produkti degradacije, koji menjaju pH mikrookruženja, što dovodi ili do kisele ili do bazne katalize. Obrazovanje slobodnih radikala takođe katalizuje kidanje polimernog lanca. Povećanje molekulske mase je obično indirektno proporcionalno brzini degradacije. Sa druge strane, povećanje u raspodeli molekulske mase može povećati brzinu degradacije, pošto postoji više grupa za reakciju kidanja lanaca, i ako su slobodne grupe hidrofilne, dovode više vode u sistem, pa se time povećava degradacija. Samo se nekoliko polimera javlja u potpuno kristalnoj formi, mada dok su amorfni, temperatura ostakljivanja ( $T_g$ ) diktira degradaciono ponašanje. Polimeri sa većom  $T_g$ , obično imaju i veću molekulsku masu, pa će im time trebati i više vremena da degradiraju. Uticaji oblika ili faktora koji povećavaju odnos površine i zapremine, takođe variraju. Aditivi, uključujući i lekove, mogu da čine polimer više hidrofobnim ili hidrofilitnim, a time i da menjaju brzinu degradacije. Primenom toplotne energije, pritiska i sterilizacije, moguće je uticati na fizičke i hemijske osobine sistema, a time i na brzinu degradacije. Konačno, mesto primene sistema u telu utiče na degradaciju sekundarnim efektima, kao što su: tok krvi, pomeranje samog sistema, čvrstina tkiva i slično [29].

Najobimnije ispitani sintetički degradabilni polimeri su alifatični poliestri. Oni su predstavnici sintetičkih biodegradabilnih polimera [30]. Najčešće su korišćeni poli( $\epsilon$ -kaprolakton), poli(laktidna kiselina) i poli(laktid-ko-glikolidna kiselina). Ova tri polimera su najčešći predmeti ispitivanja zbog njihovih jedinstvenih karakteristika biodegradacije, biokompatibilnosti i netoksičnih efekata, pa su odobreni od strane američke Agencije za kontrolu hrane i lekova (Food and drug administration - FDA). Oni su se primenjivali kao konci za ušivanje organa i rana, još 1960-ih godina. Ovi polimeri pokazuju zapreminsku eroziju, jer je brzina difuzija vode u polimer veća od brzine hidrolize [12]. Poliestri pružaju mnoge mogućnosti u dizajniranju polimera kombinacijama različitih monomera u cilju postizanja osobina koje zadovoljavaju kriterijume primene u biomedicini [22].

## 1.3 ALIFATIČNI POLIESTRI

---

Alifatični poliestri, zbog pogodnih osobina biodegradacije i biokompatibilnosti, predstavljaju jednu od veoma važnih klasa sintetičkih biodegradabilnih polimera i danas su komercijalno dostupni u različitim oblicima [31]. Ovo je klasa polimera koji sadrže alifatičnu estarsku grupu u svom glavnom lancu. Iako je veći broj poliestara komercijalno dostupan, i svi su teoretski degradabilni, hidrolitički stabilna priroda estarske veze znači da samo poliestri sa relativno kratkim alifatičnim lancima mogu biti iskorišćeni kao degradabilni polimeri u biomedicini. Iako su ovi polimeri često blago hidrofobni, stabilnost estarskih veza omogućava da podležu zapreminskoj eroziji. Zbog relativne lakoće njihove sinteze (preko kondenzacione polimerizacije ili polimerizacije otvaranjem prstena) i komercijalne dostupnosti, njihove bioresorptivnosti i citokompatibilnosti, poli( $\alpha$ -estri) su najviše istraženi degradabilni biomaterijali do danas [32].

Poliestri u biomedicinskoj primeni uglavnom potiču od glikolida, laktida,  $\epsilon$ -kapolaktona (slika 1.3.1),  $\beta$ -butirolaktona, 1,5 dioksepanona i trimetilkarbonata. Postoje tri glavna načina sinteze alifatičnih poliestara [33]. Prvi tip je polikondenzacija hidroksi kiseline ili mešavine diola i bikiselina. Međutim, ovaj metod ima određene mane, uključujući potrebu za visokim temperaturama, duge reakcije, nizak stepen polimerizacije (koji rezultuje u maloj molekularnoj težini polimera) i nemogućnost sinteze blok kopolimera. Drugi tip je preko polimerizacije otvaranjem prstena laktona i drugih cikličnih diestara, poput laktida i glikolida, koja pod određenim okolnostima može rezultirati u poliestrima velikih molekularnih masa. Polimerizacija enzimima je treći tip kojim se dobijaju poliestri i obavlja se pod blagim uslovima, izbegavajući korišćenje toksičnih reagenasa i sa mogućnošću recikliranja katalizatora. Osnovna mana ovog tipa sinteze je mala molekularna težina dobijenih polimera.

Kada su alifatični poliestri u pitanju, kontrola njihove brzine degradacije, adhezije, temperature staklastog prelaza i kristalčnosti, osobine su od posebnog značaja, a zavise od dostupnosti pogodnih sintetičkih procesa [34]. Voda se mora ukloniti iz polimerizacionog medijuma da bi se povećala konverzija i molekularna masa, što se postiže azeotropnom destilacijom rastvarača sa visokom tačkom ključanja. Međutim, korišćenje organskih rastvarača sa visokom tačkom ključanja ne ide u prilog sintezi polimera koji na kraju ostaje bez rastvarača, jer ga je jako teško ukloniti isparavanjem.

Što se katalizatora tiče, postoje anjonski, katjonski i kooordinativni. Generalno govoreći, jonski katalizatori su mnogo reaktivniji. U slučaju poliestara, oni su odgovorni za reakcije inter- i intramolekulske transesterifikacije, smanjujući molekularnu težinu polimera. Neki organometali služe kao katalizatori, kada aktiviraju monomer kompleksiranjem sa karbonilnom grupom. Polimerizacija je tada započeta bilo kojim nukleofilom (voda ili alkohol), prisutnim u polimerizacionom medijumu. A kada organometali igraju ulogu inicijatora, polimerizacija nastupa preko mehanizma insertacija - koordinacija. Metalni alkoksidi su tipični inicijatori, koji prvo koordinišu karbonilnu grupu monomera, što je dalje praćeno kidanjem acil - kiseonik veze monomera i simultanom insertacijom u vezu metal alkoksida [30, 34].

Degradacija alifatičnih poliestara se generalno odvija hidrolizom glavnog lanca estarskih veza, a brzina i obim degradacije zavise od karaktera polimera (na primer, hidrofilitnosti i kristalčnosti) [33]. Iako se alifatični poliestri koriste već dosta godina u biomedicinske i farmaceutske svrhe, i dalje postoji potreba za unapređenjima. PCL je ekstenzivno ispitivan u cilju razvoja za primenu kao biomedicinski implant i skafold u tkivnom inženjerstvu. Njegova spora

degradacija (2 - 4 godina) i unutrašnja hidrofobnost su glavne mane primene u tkivnom inženjerstvu, dok je u nekim slučajevima to prednost. U familiji poliestara, PCL zauzima jedinstveno mesto, u isto vreme je biodegradabilan i mešljiv sa raznim vrstama polimera i lako kristališe. Odsutnost toksičnosti i velika permeabilnost su veoma bitne prednosti korišćenja PCL u medicini [35].

Tip	Struktura	primer
Poliestri	$\text{H} \left[ \text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_m \text{OH}$	poli(laktid)
	$\text{H} \left[ \text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_m \left[ \text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_n \text{OH}$	poli(laktid-ko-glikolid)
	$\text{R} \left[ \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_5-\text{O} \right]_m \text{H}$	poli(ε-kapolakton)
	$\text{OH} \left[ \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\underset{\text{O}}{\text{C}}-\underset{\text{O}}{\text{C}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_m \left[ \text{O}-\underset{\text{H}}{\text{C}}-\underset{\text{H}}{\text{C}}-\text{O} \right]_n \text{H}$	politartarat

SLIKA 1.3.1 HEMIJSKE STRUKTURE NEKIH POLIESTARA [6]

Jedan od najčešće korišćenih katalizatora za polimerizaciju laktone i laktida je kalaj(II) 2-etilheksanoat ( $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ ). Međutim, mehanizam polimerizacije laktone sa  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  je često predmet rasprave. U seriji studija o mehanizmu polimerizacije laktone i laktida ovim katalizatorom, istražena je kinetika polimerizacije kaprolaktone u prisustvu 2,6-di-tert-butilpiridina ili 1,8-bis(dimetilamino)naftalena, koji su poznati kao protonski trapovi ili protonski sunderi [30]. Polimerizacije koje uključuju katjonska jedinjenja teško bi da su usporene ometajućim aminima. Zapravo, polimerizacija nije zaustavljena niti usporena, pa su iz tih studija zaključili da protoni ili produžene vodonične veze nisu aktivno uključeni u rast lanca poliestra u prisustvu  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ . Polimerizacija laktone je obično ispitana anjonskim ili koordinativnim jedinjenjima kao katalizatorima, dok se malo primenjuju katjonski katalizatori. Određene studije pokazuju praktični pristup korišćenjem skandijum trifluorometansulfonata ( $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ ) kao katalizatora. Jednim reaktivnim  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$  molekulom dobija se veliki broj molekula polimera.

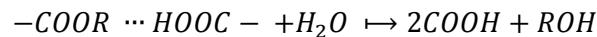


## 1.4 PCL U BIOMEDICINI

PCL je semikristalan hidrofobni polimer sa relativno polarnom estarskom grupom i pet nepolarnih metilenskih grupa u ponavljajućoj jedinici. Tokom poslednjih par decenija, privukao je veliku pažnju kao pogodan materijal za medicinske primene, posebno iz razloga što ga karakteriše visoka propustljivost za veliki broj lekova i odsutnost toksičnosti. Najčešće se sintetiše preko polimerizacije otvaranjem prstena od  $\epsilon$ -kapolaktonskih monomera. Međutim, zbog velikog stepena kristaličnosti i hidrofobnosti, PCL degradira dosta sporo i manje biokompatibilno sa mekim tkivom, što ograničava neke kliničke primene [36]. Kristaličnost PCL varira sa molekulskom težinom, i generalno, kristaličnost se povećava smanjenjem molekulske težine. Pored toga što je otporniji na hemijsku hidrolizu, on je i ahiralan (karakteristika koja ograničava mogućnost modulacije osobina preko strukture polimernog lanca). *In vivo* studije pokazuju da se degradacija PCL mnogo brže odvija nego što je to slučaj *in vitro*, zbog prisustva enzima lipaze [37].

Temperatura staklastog prelaza ovog polimera je na  $-60^{\circ}\text{C}$ , dok je tačka topljenja između  $59$  i  $64^{\circ}\text{C}$ , u zavisnosti od kristalne prirode. Prosečna molekulska težina uzoraka PCL varira od  $10000$  do  $42500$ . PCL se rastvara u hloroformu, dihlormetanu, benzenu, ugljen-tetrahloridu, toluenu i cikloheksanolu na sobnoj temperaturi. Ima slabu rastvorljivost u acetonu, 2-butanonu, etil-acetatu i dimetil-formamidu. Nerastvoran je u alkoholima i dietil-etru. PCL se može mešati sa drugim polimerima, u cilju poboljšanja otpornosti na stres, sposobnosti obeležavanja i adhezije [38]. Polikaprolakton je kombinovan sa polimerima kao što je celulozni propionat, hitozan, celulozni acetat-butirat, polilaktidna kiselina, polilaktid-ko-glikolid i drugi, u cilju kontrolisanja brzine otpuštanja leka i degradacije [39, 40, 41].

Degradacija PCL, u odnosu na ostale predstavnike poliestara, dosta je sporija, što omogućava primenu u dugotrajnoj dostavi lekova i to više od jedne godine. Biodegradacija ovog polimera može biti kontrolisana kopolimerizacijom. Degradacija PCL je zapreminski proces koji se može podeliti na dve faze [38]. Prva je gubitak u molekulskoj masi i do  $5000$  g/mol, zbog kidanja lanaca. Druga faza je intenziviranje gubitka molekulske težine. Degradacija je autokatalizovana. Kinetički profil degradacije PCL konzistentan je sa autokatalitičkim procesom, gde oslobođene grupe karboksilne kiseline katalizuju hidrolizu, na primer, dodatnim kidanjem estarskih grupa.



$$COOH = k(COOH)_0 \text{ (estara)}$$

$$\eta = \eta_0 \exp(-akt)$$

$$M_n = M_n^0 \exp(-kt)$$

$$\eta = KM_n^a$$

Ova jednačina predstavlja eksponencijalni pad unutrašnje viskoznosti ( $\eta$ ) i prosečne molekulske mase ( $M_n$ ). Druga faza degradacije polimera je okarakterisana smanjenjem brzine fragmentacije lanaca i nastupom intenzivnijeg gubitka mase. Ovakav gubitak mase se pridodaje povećanoj verovatnoći da će kidanje lanaca polimera dati dovoljno male fragmente da difunduju van polimerne matrice, što prati povećanje verovatnoće procesa fagocitoze. Smanjenje brzine fragmentacije polimernih lanaca se dovodi u vezu sa povećanjem kristaličnosti, zbog toga što se kidanje polimernog lanca prvenstveno odvija u amorfnoj fazi polimera.

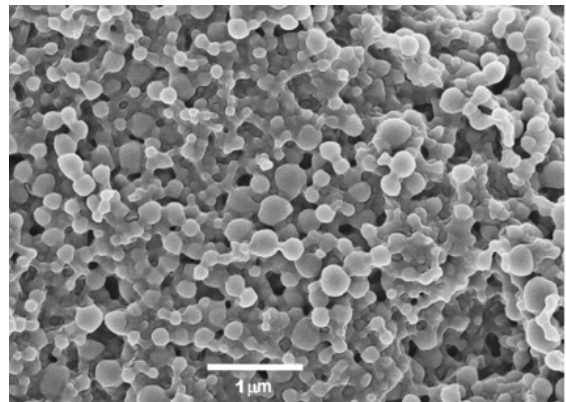
Pri degradaciji, fagocitoza segmentiranih i difundovanih fragmenata odvija se istovremeno sa uključivanjem produkata u ciklus limunske kiseline. Iz studija o degradaciji, može se zaključiti da lipaze ubrzavaju degradaciju PCL-a i to se dešava tokom treće i četvrte nedelje degradacije. U odsustvu lipaze, degradacija može biti odložena čak i nakon devet nedelja [42]. Kao što je ranije napomenuto, biodegradacija polimernih formulacija zavisi od prirode polimernog lanca, hidrofobičnosti, kristaličnosti, dužine polimera, prisutnosti enzima, parametara produkata poput veličine čestica, poroznosti površine, procesa fabrikacije i geometrije. Degradacioni mehanizmi polimera bilo koje formulacije indirektno utiču i menjaju profile otpuštanja lekova. Liofilni lekovi su generalno uniformno raspoređeni u polimernoj matrici, dok hidrofilni lekovi teže ka površini i ostaju na površini PCL-a, u adsorbovanom stanju. Iz literature o PCL-u, može se zaključiti da je difuzija jedini moguć mehanizam kojim se liofilni lekovi otpuštaju iz PCL materijala. Stoga, materijali bazirani na PCL-u otpuštaju lekove po dvofaznom šablonu, gde je otpuštanje mnogo veće za hidrofilne nego za liofilne lekove [43].

---

### 1.4.1 KONTROLISANA DOSTAVA LEKOVA

---

Kontrolisana dostava medikamenata podrazumeva da je polimer na određen način ukombinovan sa medikamentom, tako da se oslobađanje (otpuštanje) medikamenta odigrava na predvidljiv način. 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 potencijalno predoziranje kao i prevazilaženje nedovoljne, tj. neefikasne koncentracije medikamenta. Održavanjem koncentracije medikamenta na određenom nivou, izbegava se njegovo često unošenje u organizam i time se povećava komfornost pacijenata.



**SLIKA 1.4.1** SKENIRAJUĆA ELEKTRONSKA MIKROGRAFIJA ČESTICA PCL, PRIPREMLJENIH FIZIČKOHEMIJSKOM METODOM [79]

Za kontrolisano i ravnomerno otpuštanje leka unutar organizma osnovni je zahtev idealna sferičnost čestica kao i uska raspodela njihovih veličina. Veličina i oblik čestica igraju ključnu ulogu u njihovoj adheziji i interakciji sa ćelijom. Dinamika otpuštanja lekova (brzina i količina) zavisi od morfologije, odnosno strukture polimera. Hemijska struktura, molekulska masa, sastav kao i uslovi dobijanja su parametri koji utiču na krajnju morfologiju polimera. Ispitivanje degradacije polimernih čestica je takodje od esencijalnog značaja.

Jedan od glavnih problema, suočavajući se sa hemoterapijom pri lečenju tumora, jeste dostizanje cirkulacijom odgovarajuće koncentracije leka na mestu tumora, u okviru poželjnog vremenskog perioda i bez uzrokovanja nepoželjnih efekata na druga tkiva [37]. Da bi se prevazišli sporedni efekti leka i da bi se povećala koncentracija na mestu tumora, lek bi mogao da se inkorporira u nosače poput polimernih mikro- ili nanočestica, koji bi pružili bolje načine dostave u smislu poboljšane internalizacije od strane tumora i povišene lokalne koncentracije leka na mestima

receptora. Vaskulatura tumora je propustljiva i poseduje povećanu sposobnost internalizacije čestičnih nosača lekova, u odnosu na normalne krvne sudove. Ako bi nosač koji sadrži lek mogao da prevaziđe pomenutu barijeru, takav sistem bi ostao u tumoru duže vreme, oslobađajući lek iz nosača, internalizovanog u citoplazmi.

Poboljšani sistemi dostave lekova malih molekulskih masa, kao i makromolekula poput proteina, peptida ili gena, bazirani na sintetičkim polimerima, generalno podrazumevaju mikro- i nanočestice, nanokapsule, micelle, implante (uključujući hidrogelove) i vlakna. Lek je rastvoren, inkorporiran, zakačen ili adsorbovan na polimerni materijal, da bi se napravio sistem kontrolisane i lokalizovane dostave [44]. Submikronske veličine čestice imaju dosta prednosti u odnosu na mikronske čestice. Nanočestice generalno imaju veći stepen internalizacije u odnosu na mikronske čestice. Efikasnost internalizacije nanočestice od 1 - 100 nm, je 15 - 250 puta veća nego što je to slučaj sa česticama veličine 1 - 10  $\mu\text{m}$  [45]. U studiji sa miševima, pronađeno je da nanočestice prolaze kroz mukozni sloj, dok se mikročestice predominantno lokalizuju u epitelnoj postavi. Druge studije pokazuju da nanočestice u nekim slučajevima prevazilaze krv - mozak barijeru, prateći otvaranje uskih čvorića preko hiperosmotskog manitola [36]. Ovakva strategija bi mogla da pruži dostavu terapijskih agenasa u cilju lečenja nekih težih oboljenja poput tumora na mozgu.

Od sintetičkih polimera koji se koriste u sistemima za dostavu, biodegradabilni poliestri kao poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL), poli(laktidna kiselina) (PLA), poli(glikolidna kiselina) (PGA) i njihovi kopolimeri, oni su koji se najviše izučavaju.

U određenim studijama, proces *in vivo* degradacije je istražen obeležavanjem poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) male molekulske težine sa  $^{14}\text{C}$  u miševima i merenjem distribucije radioaktivnosti u telesnim tečnostima i radioaktivnosti na samom mestu implanta [38]. Primećeno je da je apsorpcija kompletna u roku od 60 dana, iako je samo 60% radioaktivnosti registrovano, i samo  $9\pm 4\%$  od prvobitne radioaktivnosti ostalo nakon 120 dana. Jedini detektovani metaboliti su radioaktivna voda (sa tritiumom) i  $\epsilon$ -hidroksikaproična kiselina, nastala od potpune hidrolize polimera. Ovo pruža uvid u prisutnost polimernih čestica unutar ćelije i ulogu fagocitoze u finalnoj fazi degradacije polimera.

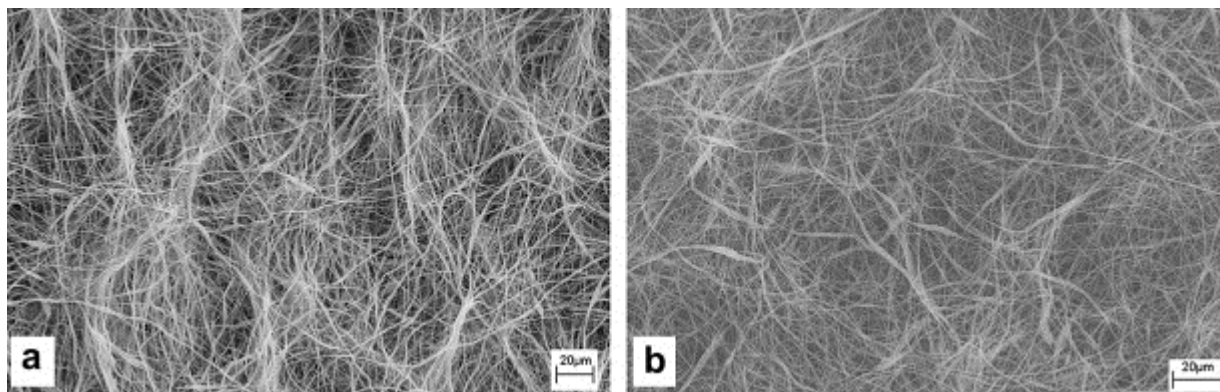
Prednost PCL je u njegovoj visokoj permeabilnosti za male molekule, u tome što ne smanjuje pH vrednost sredine pri degradaciji (u suprotnosti sa polilaktidima i glikolidima), odličnoj sposobnosti za formiranje kopolimera sa drugim polimerima i smanjenoj brzini degradacije, čime se omogućavaju dobre primene u sistemima za dugotrajnu dostavu lekova.

---

## 1.4.2 TKIVNO INŽENJERSTVO

---

Tkivno inženjerstvo je multidisciplinarno polje istraživanja, koje se fokusira na razvoj i primenu znanja iz hemije, fizike, inženjerstva, života i kliničkih nauka, na rešenja kritičnih medicinskih problema, kao što je gubitak tkiva ili nefunkcionisanje organa. Podrazumeva fundamentalno razumevanje odnosa struktura - funkcija, u normalnom i patološkom tkivu i razvoj bioloških zamena, koje obanvljaju, održavaju i poboljšavaju funkciju tkiva. Jedan od najkritičnijih problema u tkivnom inženjerstvu je realizacija skafolda sa specifičnim fizičkim, mehaničkim i biološkim osobinama. Skafoldi se ponašaju kao supstrati za rast ćelija, proliferaciju i potporu za formiranje novog tkiva. Biomaterijali i tehnologija fabrikacije igraju glavnu ulogu u tkivnom inženjerstvu [46].



**SLIKA 1.4.2** SEM MIKROGRAFIJE UREDNO OBRAZOVANIH PCL VLAKANA ELEKTROSPINING METODOM (A) I PCL VLAKANA ISPUNJENIH SA 1% CNF [46]

Materijali koji se koriste u tkivnom inženjerstvu moraju se dizajnirati tako da stimuliraju specifični ćelijski odgovor, na molekularnom nivou. Oni bi trebalo da izmame specifične interakcije sa ćelijama i tako usmere ćelijsku adheziju, proliferaciju, diferencijaciju, obrazovanje vanćelijskog matriksa i organizaciju. Fundamentalni zahtev biomaterijala za upotrebu u tkivnom inženjerstvu je biokompatibilna površina i pogodne mehaničke osobine. Osnovne funkcionalne podjedinice ćelija i tkiva su definisane na nanoskali, stoga razumevanja nanobiologije i primene nanotehnologije predstavlja novi pravac u tkivnom inženjerstvu. Nanotehnologija omogućava razvoj novih sistema koji imitiraju kompleksnu hijerarhijsku strukturu prirodnog tkiva [47].

Generalno, polimerni nanokompoziti su rezultat kombinacije polimera i neorganskog/organskog umetka na nanometarskoj skali. Interakcije između nanostrukture i polimerne matrice je osnova za poboljšanje mehaničkih i funkcionalnih osobina nanokompozita u odnosu na konvencionalne mikrokompozite. Mehaničke osobine dostupnih polimernih poroznih skafolda pokazuju nedovoljnu čvrstoću i kompresivnu snagu u odnosu na ljudsku kost, pa je mogućnost korišćenja neorganskih/organskih nanostrukture u uključivanju biodegradabilnog polimera važna mogućnost poboljšanja i modulacije mehaničkih, električnih i degradacionih osobina.

Polimeri su primarni materijali za fabrikanju skafolda u tkivnom inženjerstvu i mnogi tipovi biodegradabilnih polimernih materijala su već u upotrebi. Mnoge prednosti i mane karakterišu polimerne biomaterijale. Sintetički polimeri imaju relativno dobru mehaničku snagu i njihov oblik i brzina degradacije se mogu lako modifikovati, ali njihove površine su hidrofobne i karakterišu se odsustvom signala koji bi ćelije prepoznale. Prirodni polimeri imaju potencijalnu prednost biološkog prepoznavanja, koje pozitivno potpomaže ćelijsku adheziju i funkciju, ali ti polimeri imaju slabe mehaničke osobine. Mnogi od njih se teško dobijaju, i stoga mogu biti dosta skupi, dok se sintetički polimeri mogu proizvoditi na veliko, pod kontrolisanim uslovima, sa predvidivim i reproducibilnim mehaničkim osobinama, brzinom degradacije i mikrostrukturom.

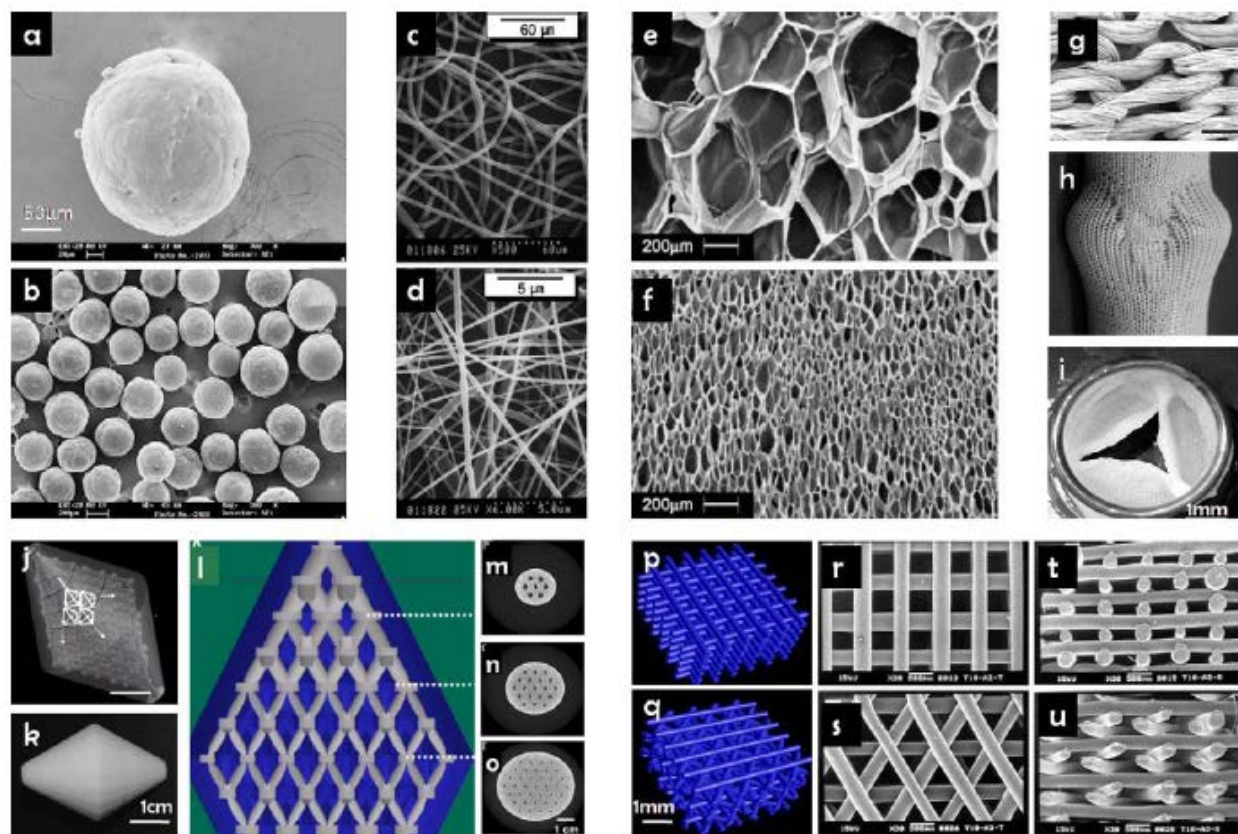
PCL je ranijih godina najviše korišćen kao materijal za medicinske konce, mada se poslednjih decenija dokazao i kao ozbiljan kandidat u tkivnom inženjerstvu kostiju, jer pokazuje odgovarajuće mehaničke osobine da posluži kao skafold gde fizičke osobine moraju da se održe najmanje šest meseci [48]. Zbog spore *in vivo* degradacije i visoke permeabilnosti za lekove, dosta se koristi kao dugotrajni implant. Capronor® je komercijalni kontraceptiv PCL produkt sposoban za dostavu levonorgestrola *in vivo* tokom više od jedne godine i na tržištu je više od 25 godina [32]. PCL ima malu vrednost čvrstoće zatezanja (oko 23 MPa), ali veoma veliku vrednost elongacije do pucanja, što



ga čini dobrim elastičnim biomaterijalom. PCL i kompoziti sa PCL-om se koriste u tkivnom inženjerstvu za regeneraciju kostiju, ligamenata, hrskavice, kože, nervnog i vaskularnog tkiva itd.

### 1.4.3 FORMULACIJE

Polikaprolakton se primenjuje u kontrolisanoj dostavi i tkivnom inženjerstvu u obliku nekoliko formulacija (slika 1.4.3).



**SLIKA 1.4.3** RAZLIČITE STRUKTURE OD PCL POLIMERA. NANOSFERE (A, B). NANOVLAČNA (C, D). PENE (E, F). ISPLETENE TEKSTURE (G, H, I). SKAFOLD SINTEROVAN LASEROM (J-O). SPOJENI, ISPREPLETENI SKAFOLDI (P-U) [9]

#### 1.4.3.1 PCL MIKROSFERE

Ovo su sferne čestice veličine preko  $1\mu\text{m}$ , u koje lek može biti ili fizički inkorporiran (imobilisan ili inkapsuliran) ili hemijski vezan [42]. Lekovi se u najvećoj meri oslobađaju erozijom polimerne matrice, mada kinetički profil otpuštanja zavisi od vrste polimera i njegovih osobina. Sferne mikročestice imaju prednost usled velikog odnosa površine i zapremine i rigidnosti oblika.

Polimerizacija dispergovanih monomera, postiže se mnogim metodama uključujući tehnike emulzije, suspenzije i disperzije [9]. Emulzije se obično koriste radi formiranja uniformnih sfera na nanometarskoj skali (10 - 100 nm). Disperziona polimerizacija rezultuje u mikrosferama veličine od 0.5 do  $10\mu\text{m}$ . Reagensi (uključujući monomer, inicijator i stabilizator), rastvaraju se u organskom medijumu i s obzirom da je inicijator rastvorljiv u monomeru, polimerizacija nastupa unutar kapljica monomera. Polimerne granule, nerastvorljive u organskom rastvaraču precipitiraju, dok

stabilizator sprečava njihovu flokulaciju. Poslednjih godina, dosta je rađeno na disperzionoj polimerizaciji u superkritičnom CO<sub>2</sub>, što može biti od velikog značaja za primenu u medicini, jer ne podrazumeva korišćenje toksičnih rastvarača. Suspenzionom polimerizacijom obično se dobijaju mikrosfere veličine od 50 do 500 μm. U ovakvoj polimerizaciji monomer se disperguje u vodenoj fazi sa stabilizatorom. Inicijator je rastvorljiv u fazi monomera, gde nastaje polimerizacija. Veličina i količina čestica određuje se veličinom i količinom dispergovanih monomernih kapljica i brzinom mehaničkog mešanja. Tehnika isparavanja rastvarača (takođe poznata i kao tehnika duple emulzije) i tehnika sušenja raspršivanjem (eng. Spray drying), ustanovljene su kao standardne za dobijanje mikrosfera iz linearnih polimera. Ukratko, mikrosfere se dobijaju isparavanjem organskog rastvarača iz dispergovanih kapljica ulja koje sadrže polimer i biomolekul. Često, tehnika duple emulzije vrši se tako što se biomolekul prvo rastvara u vodi, ovakva vodena faza se rastvara u organskom rastvaraču koji sadrži degradabilni polimer i formira se prva voda/ulje emulzija. Disperzija prve emulzije u stabilisanom vodenom medijumu, formira finalnu ulje/voda emulziju. Mikrosfere se dobijaju isparavanjem organskog rastvarača i polimer očvršćava, zahvatajući lek. Pored mnogih drugih, velika poteškoća prilikom inkapsulacije lekova u polimernu matricu jeste ostvarivanje dobrog prinosa (yield in preparation). Dosta je teško dobiti i visok procenat inkorporiranog leka (encapsulation efficiency) zbog rizika gubitka prevelike količine leka tokom procesa sinteze, što je dosta skupo. Iznenadujuće je koliko se malo detalja iznosi u mnogim studijama koje ispituju metode kvantifikacije efikasnosti inkapsuliranih lekova.

Metoda isparavanja voda/ulje rastvarača je najjednostavnija i najpogodnija metoda za inkapsuliranje liofilnih lekova, dok je voda/ulje/voda dobra za inkapsulaciju lekova rastvornih i u ulju i u vodi. Ove metode imaju nedostatak koji se ogleda u zaostalom organskom rastvaraču u finalnom produktu. Da bi se ovo izbeglo, koristi se tehnika topljenja i liofilizacija. Raspodela leka unutar mikrosfera zavisi od koeficijenta raspodele, na primer, liofilni lekovi se raspoređuju ravnomerno unutar polimerne matrice, dok su hidrofilni lekovi više zastupljeni pri površini.

Različite vrste lekova su do sada inkorporirane u PCL mikrosfere, radi njihovog efikasnijeg dostavljanja. Mikrosfere se mogu pripremiti ili samo sa PCL-om ili u mešavini sa drugim polimera (blok polimeri, kopolimeri itd.) radi dobijanja željanih osobina otpuštanja. Studije pokazuju da PCL ima dobru propustljivost za proteine, i pored toga što ne stvara kiselu sredinu (što bi nepovoljno uticalo na efikasnost vakcina), pa se stoga može koristiti kao nosač vakcina [49]. *In vitro* studije su pokazale inicijalno otpuštanje 10 - 12% proteina za vreme od 6 meseci, oko 60.5% proteina je otpušteno. Nije primećena razlika pH pufera inkubiranog sa PCL mikrosferama, za vreme od 6 meseci, što ukazuje da inkapsulacija nije uticala na antigenost. U literaturi su opisane *in vitro* studije koje pokazuju da je brzina oslobađanja leka iz mikrosfera dobijenih preparacionom tehnikom inkapsulacije rastopom, sporije u poređujući sa oslobađanjem iz mikrosfera dobijenih tehnikama isparavanja rastvarača. Pokazano je da su mikrosfere otporne na simuliranu želudačnu tečnost, pa stoga mogu da pruže zaštitu antigena od proteolitičke destrukcije u stomaku, omogućavajući inkorporiranom leku da prođe netaknut u digestivnom sistemu. *In vitro* studije su pokazale da je 25% leka oslobođeno tokom šest nedelja. Pokazano je da taksol oslobođen iz mikrosfera indukuje vaskularnu regresiju i inhibira angiogenezu [50].

U jednoj studiji, PCL mikrosfere sa ciklosporinom su sintetisane metodom isparavanja rastvarača. Pokazano je da su brzina mešanja i zapremina organske faze jedini parametri koji značajno utiču na veličinu mikrosfera. Utvrđeno je da se veličina mikrosfera smanjuje ili povećanjem zapremine unutrašnje faze ili brzine mešanja. Nakon 12 meseci skladištenja na temperaturi od 8°C ili na sobnoj temperaturi, PCL mikrosfere ostaju stabilne, mada je kristaličnost povećana za 35% na obe

temperature. Ovo pruža mogućnost administracije ciklosporina preko različitih formulacija [51]. PCL mikrosfere sa insulinom su razvijene u cilju održavanja konstante koncentracije leka u plazmi tokom dužeg vremenskog perioda za efektivnu kontrolu nivoa šećera u krvi. Ova studija pokazuje da su biodegradabilne PCL mikrosfere kontrolisale oslobađanje leka i nivo šećera efikasnije nego obična insulinska injekcija [52].

#### 1.4.3.2 PCL NANOSFERE

Nanomedicina podrazumeva primenu nanomaterijala u medicinske svrhe. Nanotehnologija, pored ostalog, ima veliki značaj i potencijal na polju medicine i farmacije, jer su nanoobjekti generalno sličnih dimenzija kao i biološki entiteti, npr. ćelija, organela, DNK i drugi. Prednosti posebnih osobina nanostrukture povećavaju efikasnost i preciznost medicinske dijagnostike, observacije i terapije na nivou pojedinačnih molekula ili molekulskih struktura. Veličina čestica, funkcionalizovana površina, mogućnost ravnomernog otpuštanja leka, poboljšana provodljivost, višefunkcionalnost poput ciljane dostave lekova, stabilizacija leka i produženo zadržavanje u cirkulaciji krvi, čine polimerne nanočestice unikatnim među formulacijama za dostavu lekova. Različite metode su prihvaćene za obrazovanje polimernih nanočestica, ali se najviše primenjuju metoda isparavanja rastvarača, zamenjivanja rastvarača, polimerna dispozicija, dijaliza i emulzija-rastvarač difuziona tehnika. Osobine nanočestica zavise od sastava polimera i korišćenog organskog rastvarača.

Nanosfere su koloidni sistemi za dostavu lekova, koji imaju ulogu transportovanja lekova, ili drugih aktivnih molekula veličine između 10 i 1000 nm [39]. Molekuli lekova mogu biti inkapsulirani, dispergovani ili apsorbovani u nanosfere. Nanosfere se mogu koristiti za selektivno dopremanje lekova preko retikulo-endotelnog sistema do jetre i do ćelija koje su aktivne u procesu fagocitoze. Veličina nanosfera omogućava intravenoznu administraciju, preko injekcija, za razliku od mnogih drugih koloidnih sistema. Injektibilni nanočestični nosači imaju dobru primenu u specifičnoj dostavi lekova i imidžingu u medicini. Da bi se prevazišao problem brze eliminacije nanočestica nakon intravenozne injekcije od strane retikulo-endotelnog sistema, razvijaju se monodispergovane biodegradabilne nanosfere od amfifiličnih polimera. Efikasnost ovakvih koloidnih čestica, kao nosača lekova, u bliskoj je vezi sa njihovom interakcijom sa proteinima i enzimima u različitim telesnim tečnostima.

PCL nanosfere su u raznim studijama kombinovane sa različitim tipovima lekova. Određene grupe istraživale su sposobnost različitih nosača lekova da poboljšaju okularnu biodostupnost lekova kod zečeva. Rezultati pokazuju da su tri različita nanosistema, nanokapsule, nanočestice i emulzija, povećale koncentraciju indometacina više od tri puta, u rožnjači nakon trideset minuta i jednog sata od usađivanja. Štaviše, okularna biodostupnost indometacina je bila 300% nakon usađivanja ovakvog nanosistema, u poređenju sa vrednostima dobijenim primenom komercijalnog rastvora. PCL nanočestice i nanokapsule, kao i emulzije pokazale su se kao dosta dobri nosači za dostavu lekova do rožnjače oka i predstavljaju veoma koristan pristup za povećanje okularne biodostupnosti lekova. Pokazano je da je količina inkapsuliranog indometacina koja je prošla do rožnjače, više za oko tri puta od one komercijalnim kapima za oči [54].

PCL nanosfere primenjene u okularnoj dostavi, testirane su i za povećanje i produžavanje penetracije leka do rožnjače od strane epitelnih ćelija u rožnjači, bez oštećenja membrane. Osnovni cilj je bio oslobađanje flurbiprofena iz nanosfera. Ove studije pokazuju karakterističan bifazni trend u oslobađanju sa brzim oslobađanjem u početku ("burst" efekat), i dosta sporijim oslobađanjem leka



u kasnijoj fazi. Prvo brže oslobađanje se manifestuje oslobađanjem leka sa površine i difuzijom leka pri površini, dok je drugo, sporije, zbog difuzije leka iz unutrašnjosti nanosfere [54].

Biodegradabilne PCL nanočestice sa inkapsuliranim tamoksifenom u jednoj studiji su ispitivane kao antikancerogeni sistem. Rezultati pokazuju da je veliki deo primenjenih nanočestica internalizovan od strane MCF-7 ćelija preko ne-specifične endocitoze. Nanočestice su pronađene u perinuklearnoj regiji nakon jednog časa [55].

#### 1.4.3.3 PCL SKAFOLDI I KOMPOZITI

Skafoldi su biodegradabilne polimerne porozne strukture određenog oblika i uglavnom se koriste u tkivnom inženjerstvu. Ovi skafoldi se koriste u *in vivo* sistemima za reparaciju ili zamenu oštećenog tkiva u telu, ali takođe, pružaju i mehaničku potporu. Mogu se koristiti kao nosači faktora rasta ili antibiotika radi potpomaganja rasta tkiva i zaceljenja ili radi prevencije infekcije. Parametri koji ocenjuju korisnost skafolda su morfologija, poroznost, mehaničke osobine, profil otpuštanja leka, citokompatibilnost i ćelijski rast. Danas, skafoldi sa PCL-om koriste se u 3D ćelijskim kulturama. Ovakve 3D kulture oponašaju ćelijsko okruženje i koriste se za bolje razumevanje ponašanja obolelih ćelija i patogeneze. Ovakva primena *in vivo* za tkivno inženjerstvo i dostavu lekova je obećavajuća, zbog sposobnosti održavanja strukturnog integriteta tokom vremena preko mesec dana.

#### 1.4.3.4 PCL VLAKNA

Vlakna su polimerne strukture obrazovane korišćenjem biodegradabilnih polimera u cilju primene u medicini za hirurške šavove, baze za rast tkiva i dostavu lekova. Vlakna ispunjena lekovima su namenjena ravnomernoj dostavi tih lekova na određeno mesto, po određenom principu. Različita PCL vlakna sa različitim lekovima, napravljena iz rastvora suspenzije i emulzije, pokazuju da se PCL vlakna mogu koristiti u ciljanoj dostavi bilo koje vrste lekova [25].

#### 1.4.3.5 PCL FILM

Polimerni filmovi (filmovi od 200 nm do 1  $\mu\text{m}$ ) poželjni su zbog spore degradacije. Za ovakve strukture, bitna je debljina, površinska morfologija, stepen bubrenja, degradaciono ponašanje otpuštanja leka i terapijski efekat. Nekoliko studija je pokazalo efekat dugotrajnog otpuštanja lekova i primenljivost u inženjerstvu vaskularnog tkiva [42].

#### 1.4.3.6 PCL MICELE I HIDROGELOVI

Polimerne micelle su čestice nanoveličine, od 200 nm do 0.5  $\mu\text{m}$ , formirane privlačnim i odbojnim silama polarnih i nepolarnih krajeva amfifilnog polimera u monofaznoj ili bifaznoj tečnosti. Micelle se formiraju kao rezultat hidrofobnih interakcija između polimernih segmenata. Amfifilni polimeri, kada se mešaju u vodenom rastvoru, formiraju hidrofobno jezgro, grupisanih liofilnih delova. Ovo je najjednostavniji pristup dizajniranja nanososača za dostavu. PCL hidrogelovi su polimerne vlaknaste strukture u koje mogu da se postave lekovi, i koji se otpuštaju apsorpcijom velike količine vode, nakon suspendovanja u vodeni medijum. Rast ovih gelova vodi do porozne mrežaste strukture koja zahvata lek. Veličina pora zavisi od stepena umrežavanja, hemijske strukture polimera i okruženja u koji je hidrogel postavljen. Hidrogelovi se koriste uglavnom za dostavu lekova osetljivih na okruženje (uticaji temperature, pH, koncentracije glukoze, električnog signala, svetlosti, pritiska, koncentracije jona i antigena).

### 1.4.3.7 OSTALE FORMULACIJE

Osim najviše istraženih gore opisanih formulacija, ispitane su i neke druge PCL formulacije poput pena, vezikula itd.

PCL je jedan od najviše istraženih sintetičkih biodegradabilnih polimera u različitim formulacijama za dostavu lekova i tkivno inženjerstvo. Međutim, ovakva istraživanja su ograničena na eksperimente i nisu još uvek u širokoj komercijalnoj upotrebi. Hidrofobnost je glavna mana koja ovo ograničava. Do sada, PCL je pronašao primenu najviše u tkivnom inženjerstvu i neke od komercijalno dostupnih formulacija su: Osteoplug®, Teoplug®, Artelon Sportmesh®, Relison®, 3D Biotek 3D Insert® [42].

---

## 1.4.4 BIODEGRADACIJA PCL

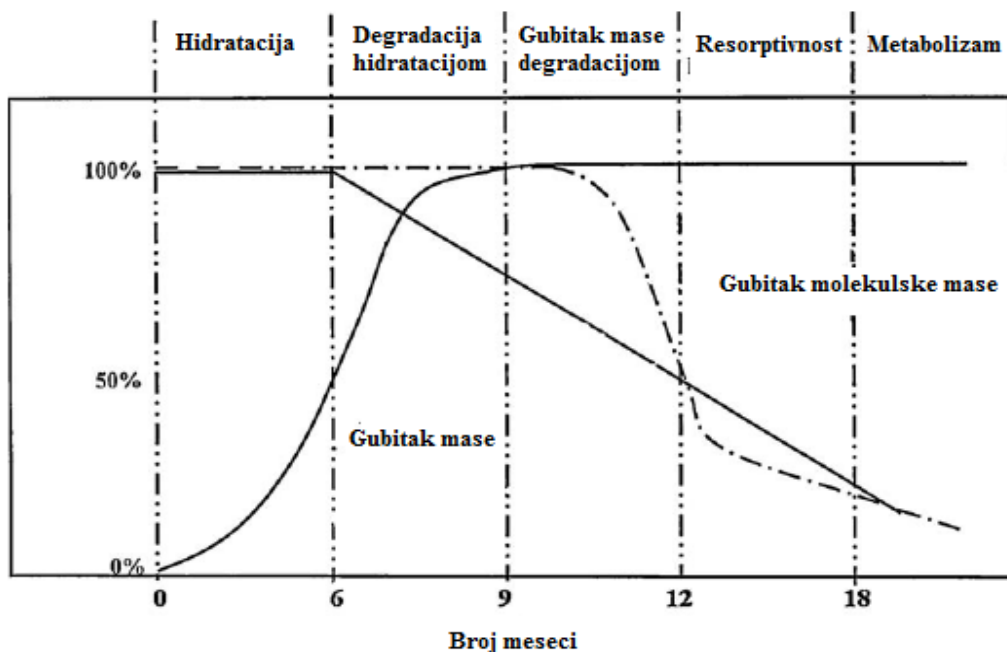
---

Biodegradabilni polimeri mogu biti prirodni ili veštački (sintetički). U osnovi, sintetički polimeri imaju prednost nad prirodnim jer ih je moguće modelovati i dobiti širi opseg određenih, željenih, predvidljivih i ponovljivih osobina. Postoji mnogo razloga zbog kojih je važno da materijal degradira, ali jedan od glavnih je postojanje težnje da se napravi implant koji nakon ugradnje ne zahteva još jedan hirurški zahvat radi njegovog uklanjanja. Biodegradacija je postignuta sintezom polimera koji u osnovi imaju hidrolitički nestabilne veze. Hemijska jedinjenja sa ovakvim karakteristikama su estri, anhidridi, ortoestri i amidi. Kada se govori o polimerima, važno je imati u vidu da kada je polimer biodegradabilan, ne znači automatski da je i bioresorptivan [9]. Ovo znači da kada degradira i udaljava se od mesta implantacije *in vivo*, nije podrazumevano uklonjen iz tela. Bioresorptivnost podrazumeva potpuno uklanjanje kako početnog stranog materijala, tako i njegovih produkata degradacije, bez rezidualnih štetnih efekata.

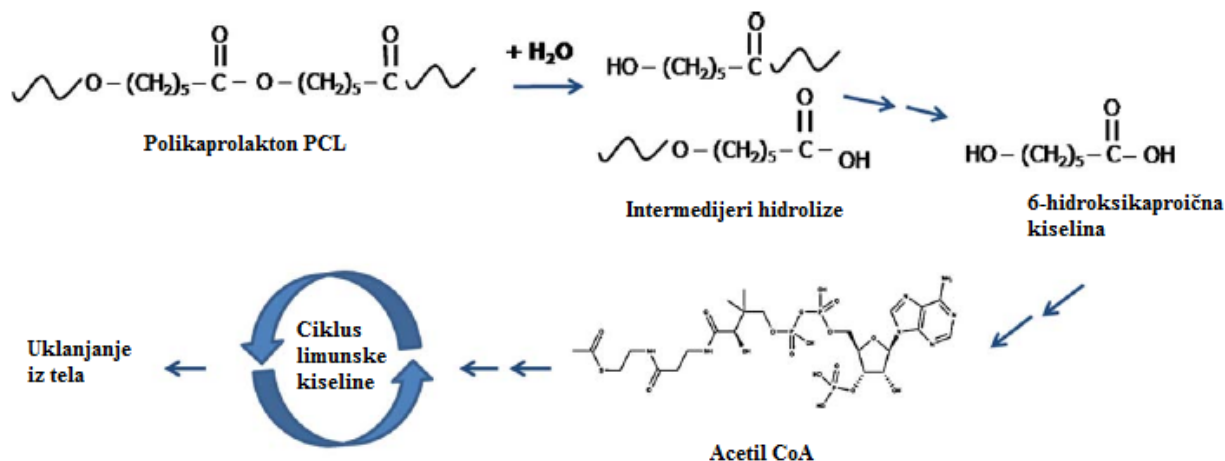
Neke studije sa PCL polimerom u različitim *in vitro* i *in vivo* uslovima, pokazuju da su brzine hidrolitičke degradacije veoma slične u oba slučaja, pa se zaključuje da enzimska degradacija u prvoj fazi (0 - 12 meseci) nije od velikog uticaja u procesu ukupne degradacije. Iz studija o degradaciji opisanim u literaturi, može se zaključiti da PCL podleže procesu degradacije iz dve faze: prva, neenzimsko hidrolitičko kidanje estarskih grupa i druga, kada polimer postaje više kristalan i manje molekulske težine (manje od 3000g/mol), podleže unutarćelijskoj degradaciji, što je dokazano posmatranjem internalizacije fragmenata PCL od strane makrofaga i velikih ćelija u fibroblastima. Druga faza dovodi do formiranja  $\epsilon$ -kaprolaktona (cikličnog monomera) kao rezultat depolimerizacije. Ova faza podupire teoriju da se PCL u potpunosti resorbuje i degradira unutarćelijskim mehanizmima kada se molekulska masa redukuje na 3000 ili manje. Takođe, primećeno je da je u prvoj fazi brzina degradacije identična *in vitro* hidrolizi na 40°C i prati kinetiku prvog reda. Zaključeno je da se mehanizam degradacije PCL može pripisati arbitrarnom hidrolitičkom raskidanju estarskih veza, što uzrokuje smanjenje molekulske težine [9, 14, 25, 27]. U dobro poznatoj studiji o PCL polimeru [9], navedeno je da je HO• radikal najverovatniji inicijator degradacije PCL-a u implantima. Takođe se spominje da fizički oblik PCL formulacije nema očiglednog uticaja na brzinu degradacije, što sugeriše da homogenost degradacije dominira u celokupnom procesu.

Studija o unutarćelijskoj i *in vivo* degradaciji PCL, ukazuje na degradaciju koja se prvo odigrava bez uticaja enzima, a zbog zapreminske hidrolize. U ovoj studiji, uočen je prolazan inflamatorni odgovor u toku prve dve nedelje. Nakon devet meseci, samo kada se molekulska masa redukovala na oko 5000 g/mol, nastao je gubitak mase nakon čega su se PCL implanti fragmentisali.

Slika 1.5.1 opisuje uzajamno dejstvo gubitka mase i molekulske težine kod tipičnog resorptivnog polimernog skafolda *in vivo* [9]. Navedeno je da je PCL prah potpuno degradirao i u celosti je apsorbovan u roku od 13 meseci u fagozomima makrofaga i velikih ćelija i da je jedini metabolit 6-hidroksi-kaproična kiselina. Slika isutruje mehanizam kojim PCL hidrolitički degradira. Intermedijeri degradacije 6-hidroksi-kaproična kiselina i acetil koenzim A, formiraju se, a potom ulaze u ciklus limunske kiseline, čime se eliminišu iz tela (slika 1.5.2).



**SLIKA 1.5.1** GRAFIČKA ILUSTRACIJA GUBITKA MASE I MOLEKULSKE MASE TOKOM VREMENA, ZA RESORPTIVNI POLIMER POPUT PCL. POČETNA HIDRATACIJA (0 - 6 MESECI), PREKO DEGRADACIJE I GUBITKA MASE (6 - 12 MESECI), RESORPCIJE (NAKON 12 MESECI) I METABOLIZMA (NAKON 18 MESECI) [9].



**SLIKA 1.5.2** DEGRADACIJA PCL POLIMERA PREKO INTERMEDIJERA HIDROLIZE, 6-HIDROSIKAPROIČNE KISELINE I ACETIL KOENZIMA A, KOJI SU, POTOM, ELIMINISANI IZ TELA CIKLUSOM LIMUNSKJE KISELINE [9].

---

## 1.4.5 BIOKOMPATIBILNOST

---

Biokompatibilnost je svojstvo materijala da ne izaziva negativne odgovore organizma (alergijske reakcije, negativni imunološki odgovor organizma, ne dovodi do zapaljenskih procesa i drugi). 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 ili membrane da podrži ćelijsku aktivnost u cilju optimizacije regeneracije tkiva, bez neželjenih i štetnih efekata na same ćelije i organizam, bilo lokalno ili sistemski.

*In vitro* biokompatibilnost, ili citotoksičnost, obično se ispituje preko različitih ćelijskih kultura. Kada je reč o *in vivo* istraživanjima, rade se ispitivanja histopatologije implanta i odgovora domaćina (imunogeni, karcinogeni i trombogeni odgovori). Kompleksnost ovih odgovora su rezultat različitih vremenskih i prostornih procesa, uključujući brojne usko povezane mehanizme materijal - tkivo interakcija. Ove reakcije kontrolišu konačno dejstvo i funkcionisanje materijala unutar tela. Ako se radi sa bionedegradabilnim materijalima ili trajnim implantima, primarni cilj je minimalizovanje i podešavanje materijal - tkivo interakcija [56]. Interakcije biološkog okruženja i materijala bi trebalo da budu prihvatljive i stabilne na duži vremenski period. Suprotno tome, na polju biodegradabilnih i bioresorptivnih polimera, situacija je obrnuta, sa dodatnom kompleksnošću koja potiče od degradacionih i resorpcionih produkata implanata, koji u velikoj meri interaguju sa biološkim sistemom [9]. Sa ove tačke gledišta, biodegradabilni i bioresorptivni polimeri bi trebalo da se dodatno i više ispituju sa farmakološke strane, pored ispitivanja sa strane nauke o materijalima. Stoga, biokompatibilnost je jedan od najvažnijih faktora koji se mora uzeti u obzir pri odabiru biodegradabilnog polimera za primenu u medicinskim implantima ili sistemima za kontrolisanu dostavu lekova.

Generalno, biološko tkivo dobro toleriše bioresorptivne polimere. Izdvajanje nekih produkata degradacije iz bioresorptivnih polimera koji su kiselog karaktera, nekada u velikoj meri doprinosi inflamatornim reakcijama. Jedan od faktora koji utiče na pojavu inflamacionog odgovora jeste mesto implantacije. Ako je kapacitet okolnog tkiva za eliminisanje ovakvih produkata mali, usled slabe vaskularizacije i male metaboličke aktivnosti, hemijski sastav produkata može dovesti do lokalnih kratkotrajnih poremećaja. Jedan od primera jeste povećanje osmotskog pritiska ili promena u pH vrednosti, koji se manifestuju u akumulaciji lokalnih fluida. Problemi biokompatibilnosti polimera, kao u slučaju kod alifatičnih poliestara, nesumljivo su povezani sa biodegradacijom i bioresorpcijom.

Određivanje brzine degradacije polimera je važno za određivanje koncentracije degradacionih produkata prisutnih u tkivu, kao i rezultujućeg tkivnog odgovora. U jednoj od studija, ispitan je inflamatorni odgovor kopolimera PCL i PLA, nakon implantacije u pacovima [57]. Injekcija mikrosfera unutar tela rezultovala je u aktivaciji neutrofila i izazvala slabu lokalizovanu inflamaciju. Ova brza aktivacija neutrofila od strane PCL mikrosfera je potvrđena merenjem stvaranja anjon superoksida merenog hemiluminescencijom. Aktivacija neutrofila oslobodila je određene faktore koji dovode do masivnog transporta neutrofila na mesto implantacije, što je izazvalo inflamaciju. Fagocitoza polimernih mikrosfera sa inkapsuliranim lekom od strane belih krvnih ćelija, glavni je mehanizam kojim se ovi materijali eliminiše iz tela. Inflamatorne reakcije u kostima su slabije izražene nego u mišićima, a pretpostavlja se da je razlog bolja vaskularizacija u mišićnom tkivu i veća količina implantovanog materijala.

U drugoj studiji, reakcija tkiva na PCL mikrosfere, sintetisane metodom isparavanja rastvarača, implantovane su u moždano tkivo pacova [9]. Nije primećena nekroza, implicirajući dobru biokompatibilnost mikrosfera unutar moždanog tkiva. U cilju sprečavanja fagocitoze mikrosfera, mogu se vršiti modifikacije površine tih mikrosfera sternom stabilizacijom. Rezultati te studije pokazuju da su PCL mikrosfere, pročišćene različitim načinima pokazale različite citokompatibilnosti, gde dobro pročišćene imaju najbolju citokompatibilnost.

Veoma je važno ispitati biokompatibilnost ne samo na kratak vremenski period, već i dugoročno. Na žalost, većina *in vivo* studija na polju tkivnog inženjerstva ne uključuje pomenuto, iz razloga što se studije okončavaju i pre nego što se PCL skafold ukloni sa mesta implantacije, radi dobijanja histoloških i mehaničkih podataka. Činjenica je da je dobijanje dugotrajnih *in vivo* podataka dosta skupo, ali ovo ne negira potrebu da se dobiju informacije koje se odnose na dugotrajnu degradaciju, biokompatibilnost, mehaničke osobine, odnos skafold/novo tkivo i krajnji ishod implantacije nakon više meseci, pa čak i godina. Postoje brojne studije koje podrazumevaju biokompatibilnost PCL polimera i njegovih kompozita bez štetnih efekata u periodu od 15 nedelja pa i do 2 godine.

---

## 1.5 LIOFILIZACIJA

---

Glavna prepreka koja ograničava korišćenje nanočestica je njihova fizička nesabilnost (aglomeracija/agregacija čestica) i/ili hemijska nestabilnost (hidroliza polimernog materijala koji sačinjava nanočesticu, otpuštanje leka iz nanočestica i hemijska reaktivnost leka tokom skladištenja), koje se naročito uočavaju prilikom skladištenja suspenzija nanočestica tokom dužeg vremenskog perioda [58].

U cilju poboljšanja fizičke i hemijske stabilnosti ovih sistema, potrebno je ukloniti vodu iz sistema, tj. materijala. Uobičajeni proces koji se na polju farmacije koristi za konverziju rastvora ili suspenzija u čvrstu fazu dovoljne stabilnosti za distribuciju i skladištenje, jeste liofilizacija. Liofilizacija (engl. Freeze Drying) je proces koji podrazumeva uklanjanje vode iz zamrznutog uzorka procesom sublimacije i desorpcije, pod vakuumom [59]. Uprkos tome, ovaj proces uzrokuje različite stresove tokom koraka zamrzavanja i sušenja. Stoga, obično se u formulaciju dodaju protektanti, u cilju zaštite nanočestica od ovih tipova stresa [58, 59, 60]. Najčešće, istraživanja nanočestica u procesu liofilizacije vrši se metodom probe i greške, bez proučavanja naučnih principa ovog kompleksnog procesa. Kada se uzmu u obzir fizički, hemijski i inženjerski principi, liofilizacija koloidnih sistema može biti kontrolisana.

Da bi se poboljšale osobine nanočestica, potrebno je postići:

- jednostavnu liofilizaciju i brzo rekonstituciono vreme suspenzije
- konverziju fizičko-hemijskih karakteristika liofiziranog produkta (mala ili nemodifikovana veličina čestica i nemodifikovana efikasnost inkapsulacije lekova)
- nizak stepen vlažnosti, manji od 2%
- dobru, odnosno, dugotrajnu stabilnost formulacije

---

### 1.5.1 STABILNOST NANOČESTICA

---

#### 1.5.1.1 FIZIČKA STABILNOST

---

Mnogi faktori mogu uticati na stabilnost nanočestica. Generalno, čestice koloidnih dimenzija poseduju određenu kinetičku energiju koja omogućava Braunovo kretanje takvih čestica i njihovu difuziju [61]. Ovakvo kretanje se karakteriše haotičnim, kontinualnim menjanjem pravca koloidnih čestica, usled brojnih sudara sa drugim česticama, zidom suda i molekulima disperzionog sredstva, odnosno rastvarača. Brzina kretanja koloidnih čestica je mala u odnosu na brzinu kretanja molekula rastvarača. Kao rezultat termalnog kretanja, koloidne čestice difunduju iz oblasti više koncentracije u oblast niže koncentracije, dok se koncentracije uniformno ne izjednače. Braunovo kretanje koloidnih čestica je jedan od razloga koji sprečava njihovo taloženje pod dejstvom sile zemljine teže i omogućava njihovu ravnomernu raspodelu u koloidnom rastvoru. Gravitaciona sila, koja uzrokuje sedimentaciju čestica, i Braunovo kretanje (difuzione sile), suprotstavljaju se jedna drugoj. Obe ove sile su u vezi sa veličinom čestica. Koloidi su opsega veličina pri kojima Braunove sile dominiraju gravitacionim silama, pa stoga teže da ostanu suspendovane. U cilju izbegavanja aglomeracije, mogu se upotrebiti pogodni stabilizatori u formulaciju. Međutim, koloidne čestične suspenzije mogu biti i destabilisane dodatkom nekih komponenata.

---

### 1.5.1.2 HEMIJSKA STABILNOST

---

Hemijska stabilnost koloidnih polimernih nosača zavisi od uslova skladištenja, temperature i pH vrednosti sredine, ali i od tačnog sastava skladištene formulacije (tip i molekulska težina polimera). Stoga, za svaku specifičnu formulaciju, potrebno je izvršiti pojedinačnu studiju o stabilnosti radi kvaliteta produkta.

#### 1.5.1.2.1 EFEKAT TIPA POLIMERA

Poznato je da nanočestice od hidrolitički degradabilnih polimera, degradiraju tokom vremena (slabije pri kontrolisanoj temperaturi i pH). Studije pokazuju da stabilnost nanočestica zavisi od tipa polimera, i to po sledećem redu povećavanja polimerne stabilnosti: poli(d, l laktid-ko-glikolid) (50% laktidne kiseline, 50% glikolidne kiseline) < poli(d, l - laktid-ko-glikolid) (75% laktidne kiseline, 25% glikolidne kiseline) < poli(d, l laktid) = poli( $\epsilon$ -kaprolakton) [62]. Štaviše, u istoj studiji je pokayano da kod PCL polimera, početna molekulska težina polimera nije uticala na degradacioni profil.

#### 1.5.1.2.2 HEMIJSKA STABILNOST INKAPSULIRANIH LEKOVA

Hemijski integritet lekova inkapsuliranih u nanočesticama još jedan je od fundamentalnih aspekta istraživanja ukupne stabilnosti ovakvih formulacija. Studije su pokazale da ako polimer sa inkapsuliranim lekom degradira u vodenom rastvoru, vreme kontakta sa vodom će uticati na količinu inkorporiranog leka u nanočesticama [58]. S obzirom da mnogima od ovih sistema degradacioni profil zavisi od pH, portebno je striktno kontrolisati ovu vrednost. Procedura proizvodnje bi trebalo da minimalizuje vreme tokom koga može započeti degradacija. Određen broj lekova je fotosenzitivan, pa se stoga i ovaj uticaj mora minimalizovati.

#### 1.5.1.2.3 EFEKAT TEMPERATURE SKLADIŠTENJA

Temperatura skladištenja ima krucijalni uticaj na dugotrajnu stabilnost nanočestica. Na primer, kada se nanočestice poli(d, l laktida) i poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) skladište 350 dana na 5°C, uočene su minimalne promene u molekulskoj težini polimera i veličini nanočestica [58]. Na 37°C, međutim, događa se brza degradacija oba polimera, u disperziji. Studije pokazuju da se PCL nanočestice mogu držati na 4°C i na sobnoj temperaturi tokom jedne godine, dok se nanočestice poli(laktid-ko-glikolida) moraju držati na 4°C.

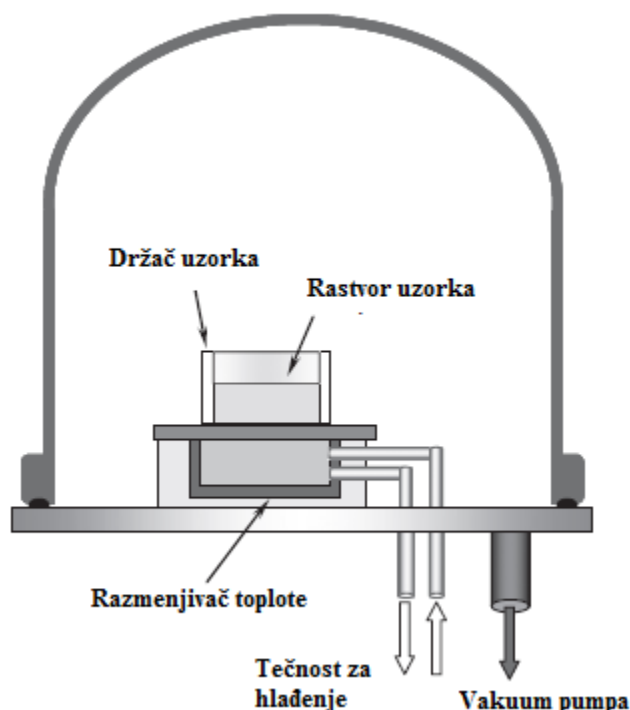
---

## 1.5.2 PROCES LIOFILIZACIJE

---

Liofilizacija je široko korišćen proces za sušenje i poboljšanje stabilnosti različitih farmaceutskih produkata, uključujući viruse, vakcine, peptide, proteine ili koloidne nosače: liposome, nanočestice, nanoemulzije. Ovaj proces je relativno spor i skup. Ciklus liofilizacije se može podeliti na tri koraka: zamrzavanje (solidifikacija), glavno sušenje (sublimacija leda) i finalno sušenje (desorpcija nesmrznute vode).



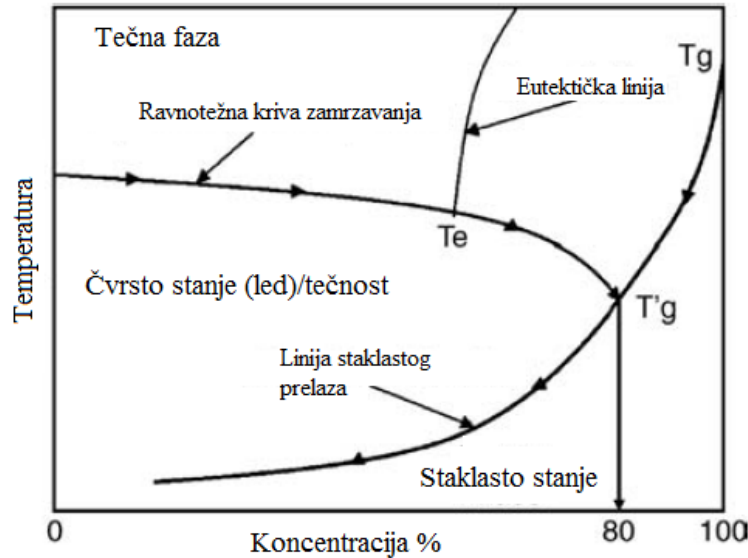


SLIKA 1.5.1 EKSPERIMENTALANA APARATURA LIOFILIZATORA [59]

Tipična konstrukcija liofilizatora podrazumeva postojanje komore za sušenje, koja sadrži police na kojima se kontroliše temperatura i koje su ventilima povezane za kondenzatorsku komoru (slika 1.5.1). Komora sa kondenzatorom sadrži seriju ploča sposobnih za održavanje na veoma niskim temperaturama (manjim od  $-50^{\circ}\text{C}$ ). Jedna ili serija vakuumskih pumpi, veže se za kondenzatorsku komoru, da bi se dostigli pritisci u opsegu od 4 do 40 Pa, u celom sistemu tokom operacije.

### 1.5.2.1 KORAK ZAMRZAVANJA

Zamrzavanje je prvi korak u procesu liofilizacije. Tokom ovog koraka, tečna suspenzija je ohlađena i formiraju se kristali čiste vode. Kako proces napreduje, sve više i više vode u ukupnoj tečnosti biva zamrznuto. Ovo rezultira u povećanju koncentracije preostale tečnosti. Dok tečna suspenzija postaje koncentrovanija, njena viskoznost se povećava, indukujući inhibiciju dalje kristalizacije. Ova visoko koncentrovana i viskozna tečnost očvršćava, dajući amorfnu kristalnu ili kombinovano amorfnu i kristalnu fazu. Mali procenat vode koji ostaje u tečnom stanju, i koji ne smrzava, naziva se vezana voda. Razumevanje procesa zamrzavanja olakšava fazni dijagram binarnog sistema voda - saharoza (slika 1.5.2) [58]. Ovaj dijagram pokazuje kako se razblaženom rastvoru saharoze povećava koncentracija tokom zamrzavanja, dok temperatura ne dostigne  $T'g$  vrednost ( $T'g$  je temperatura staklastog prelaza). U ovoj tački, koncentracija saharoze je 80% i dalje hlađenje ne menja koncentraciju. Bitno je napomenuti da bi temperatura pri zamrzavanju rastvora trebalo da bude  $T'g$  ili ispod nje.



SLIKA 1.5.2 FAZNI DIJAGRAM BINARNOG SISTEMA SAHAROZA - VODA [58]

### 1.5.2.2 KORAK GLAVNOG SUŠENJA

Faza glavnog sušenja podrazumeva sublimaciju leda i smrznutog produkta. U ovom procesu:

- 1) toplota se prenosi sa police do smrznutog rastvora, preko poklopca i bočice u kojoj se nalazi uzorak te se sprovodi do sublimacionog fronta,
- 2) led sublimuje i formirana vodena para prolazi kroz osušeni deo produkta do površine uzorka,
- 3) vodena para se prenosi od površine produkta, preko komore, do kondenzatora i
- 4) vodena para se na tom mestu kondenzuje.

Na kraju sublimacionog koraka, najčešće se javljaju pore. Pore predstavljaju prostor koji su zauzimali kristali leda.

### 1.5.2.3 FINALNO SUŠENJE

Finalno sušenje podrazumeva uklanjanje apsorbirane vode iz produkta. Ovo je voda koja se nije izdvojila u obliku leda tokom zamrzavanja i koja nije sublimovana.

---

## 1.5.3 LIOFILIZACIJA NANOČESTICA

---

Liofilizirane nanočestice bi trebalo da imaju željane karakteristike, uključujući: održanje primarnih fizičkih i hemijskih osobina produkta (kratko rekonstituciono vreme, stabilnu suspenziju, malu ili nemodifikovanu veličinu čestica, usku raspodelu veličina čestica u suspenziji i nepromenjenju aktivnost inkapsuliranog leka), zatim, prihvatljivu relativnu vlažnost i dugotrajnu stabilnost. Radi dobijanja produkata visokog kvaliteta, neophodno je obratiti pažnju na sledeće stvari: formulaciju, proces liofilizacije i uslove skladištenja.

### 1.5.3.1 ZNAČAJNOST FORMULACIJE

---

Mnoge komponente formulacije imaju veoma bitan uticaj na otpornost nanočestica pri različitim stresovima tokom liofilizacije, kao što je tip ili koncentracija krioprotektanata, priroda surfaktanta, priroda grupa na površini nanočestica ili polimera. U ove svrhe, mudar i pažljiv izbor svih komponenata formulacije je osnova za dobijanje dobrog produkta tokom liofilizacije.

#### 1.5.3.1.1 KORIŠĆENJE KRIO- I LIOPROTEKTANATA

Liofilizacija može izazvati mnoge stresove (freezing stress, drying stress), a to podrazumeva uticaj koji bi destabilisao koloidne suspenzije nanočestica, posebno tokom zamrzavanja i dehidratacije. Dobro je poznato da tokom zamrzavanja uzorka, postoji fazna separacija leda i krio-koncentrovanog rastvora [58]. U slučaju suspenzije nanočestica, krio-koncentrovana faza se sastoji od nanočestica i drugih supstanci poput surfaktanata, pufera i neinkapsuliranih lekova. Ovako visoka koncentracija formulacije može indukovati aglomeraciju i, u nekim slučajevima, ireverzibilno slepljivanje nanočestica. Takođe, kristalizacija leda može izazvati mehanički pritisak na nanočestice, koji dalje vodi do destabilizacije. Iz ovih razloga, posebna jedinjenja moraju se dodati suspenziji nanočestica pre smrzavanja, radi zaštite ovako krhkih sistema. Ova jedinjenja se obično dodaju u cilju zaštite produkta od nepoželjnih uticaja zamrzavanja (krioprotektanti) ili sušenja (lioprotektanti) i mogu da poboljšaju stabilnost tokom skladištenja. Najpopularniji krioprotektanti opisani u literaturi za liofilizaciju nanočestica su šećeri: trehaloza, saharoza, glukoza i manitol [63, 64]. Poznato je da ovi šećeri prelaze u staklasto stanje na specifičnim temperaturama ( $T_g$ , temperatura staklastog prelaza). Imobilizacija nanočestica staklastim matriksom krioprotektanata, sprečava njihovu aglomeraciju i štiti ih od mehaničkog pritiska kristala leda. Generalno, zamrzavanje se mora obaviti na temperaturama ispod  $T_g$  zamrznutog amorfnog uzorka ili  $T_e$  (temperatura eutektičke kristalizacije komponenata kao što je mešavina sa ledom, ako je u kristalnom stanju, u cilju potpune solidifikacije uzorka).

U nekim slučajevima, povećanje koncentracije krioprotektanta do određenog nivoa može eventualno dostići granicu stabilizacije, ili čak destabilizovati nanočestice. Neki rezultati pokazuju da što je veća koncentracija nanočestica, veća je efikasnost lioprotektanata. Generalno, tip krioprotektanta, a i njegova koncentracija, moraju se odabrati tako da budu optimalni za obezbeđivanje maksimalne stabilizacije nanočestica.

Da bi se obezbedila maksimalna stabilnost koloidnih čestica, potreban je pažljiv izbor stabilizatora, koji bi trebalo da je lokalizovan na površini nanočestica. Takvi stabilizatori mogu da poboljšaju stabilnost nanočestica u suspenziji i spreče njihovu aglomeraciju. Mnogi stabilizatori agenci zadovoljavaju ove kriterijume, kao surfaktanti, modifikovani polimeri i kopolimeri. PVA je jedan od najčešće korišćenih stabilizatora i omogućava obrazovanje stabilnih nanočestica, jer poboljšava stabilnost i obrazovanje dovoljno malih čestica i njihove uzane raspodele. Ovakav polimerni sloj, formiran na polimernih nanočestica, stabilise ih i poboljšava otpornost na zamrzavanje. Mnoga istraživanja su pokazala uspešnost liofilizacije nanočestica sa PVA.

#### 1.5.3.1.2 MEHANIZMI PROTEKCIJE

Postoji više hipoteza kojima se objašnjava mehanizam delovanja krioprotektanta. U zavisnosti od uslova i rezultata eksperimenta, različiti autori navode i promovišu različita objašnjenja. Tri osnovna, opšte prihvaćena mehanizma uključuju: mehanizam prioritete izolacije (ekskluzije) čestica, mehanizam vitrifikacije i mehanizam supstitucije vode [63]. Mehanizam

prioritetne izolacije čestica podrazumeva prisustvo vodene faze, pa nije primenjiv pri krajnjem procesu sušenja uzoraka. Sa druge strane, dva predložena mehanizma koja ne podrazumevaju izolaciju čestica, mogu se smatrati i kao mehanizmi lioprotekcije.

#### 1.5.3.1.2.1 MEHANIZAM PRIORITETNE EKSKLUZIJE

Kako je opisano za mnoge čestične sisteme, faza zamrzavanja tokom liofilizacije određuje strukturu smrznute mase. Dodatak krioprotektivnih agenasa izaziva neregularno pakovanje molekula u intersticijalnu vitroznu masu, praveći dosta prostora, što dovodi do smanjenja gustine u poređenju sa uređenijom masom sačinjenom od kristala leda. Ovo čini da se zamrznuta masa ponaša više kao tečnost, nego kao čvrsto stanje i pruža bolju mehaničku zaštitu čestica. Zbog toga, izbegava se aglomeracija čestica ili bilo koja izmena strukture usled pritiska koji potiče od rasta kristala leda.

Krioprotektanti izoluju individualne čestice u nesmrznutu frakciju i time sprečavaju aglomeraciju i spajanje (slepljivanje) čestica tokom zamrzavanja. Ovo se još i naziva hipoteza o izolaciji čestica. Vitrifikacija nije potrebna za ovaj efekat, već je prostorna separacija čestica dovoljna za očuvanje integriteta. Prema hipotezi izolacije čestica, dovoljna količina bilo kog krioprotektanta može da postigne zadovoljavajuće rezultate. U jednoj studiji, tokom smrzavanja, inicijalna koncentracija krioprotektanta pri kojoj se može uočiti protekcija makromolekula, dramatično se menja ako je suspenzija razblaženija. Drugim rečima, nije početna koncentracija krioprotektanta ta koja određuje nivo protekcije tokom procesa zamrzavanja, već relativan odnos količine krioprotektanta prema količini makromolekula diktira očuvanju čestica.

#### 1.5.3.1.2.2 MEHANIZAM VITRIFIKACIJE

Staklasti prelaz se javlja u amorfim i semikristalnim polimerima i rezultat je smanjenja pokretljivosti velikih segmenata molekulskih lanaca, sniženjem temperature. Tokom hlađenja, staklasti prelaz odgovara postepenoj transformaciji iz gumastog stanja do staklastog stanja, a temperatura tog prelaza se naziva temperatura staklastog prelaza. Sniženjem temperature kod semikristalnih polimera, kristalična oblast kristališe, dok amorfna prolazi kroz staklasti prelaz.

Mehanizam vitrifikacije zasniva se na imobilizaciji molekula polimera, praćenom nastajanjem staklaste strukture krioprotektanata [65]. Neke studije tvrde da je imobilizacija u staklasti matriks dovoljna za sprečavanje aglomeracije. Prema tom rezonovanju, formiranje staklastog stanja bi bilo sasvim dovoljno za održanje makromolekulskog integriteta. Poznato je da tokom zamrzavanja, nastaje separacija faze kristala leda i krio-koncentrovane tečnosti. Krio-koncentrovana tečnost može vitrifikovati na određenim temperaturama  $T_g$  (temperatura staklastog prelaza maksimalno krio-koncentrovanog rastvora). Ugljeni hidrati se često koriste kao krioprotektanti jer su hemijski neškodljivi i vrlo lako vitrifikuju tokom procesa zamrzavanja. Kada se čestična disperzija zajedno sa krioprotektantom zamrzne ispod tačke staklastog prelaza, krioprotektanti formiraju staklast matriks oko čestica, štiteći ih od različitih uticaja poput mehaničkog uticaja kristala leda, a time i sprečavajući aglomeraciju. Ako je koncentracija krioprotektanta nedovoljna, dolazi do nepotpunog presvlačenja čestica staklastim matriksom, što ide u prilog aglomeraciji. Stoga se zamrzavanje mora odviti ispod  $T_g$ , da bi se obezbedila potpuno očvršćavanje uzorka.

#### 1.5.3.1.2.3 MEHANIZAM SUPSTITUCIJE VODE

Supstitucija vode podrazumeva obrazovanje vodoničnih veza između krioprotektanta i polimera, što rezultira u očuvanju integriteta polimernih lanaca. Amorfno stanje daje najbolje okruženje za maksimalno vezivanje vodoničnih veza između protektanta i čestica. Jedna od

posledica koncentrovanja formulacije tokom formiranja kristala leda, odnosi se na brzinu hemijskih reakcija u rezidualnoj fazi. Nasuprot predviđanju Arenijusove kinetike<sup>1</sup>, brzine se povećavaju obično za red veličine, tokom zamrzavanja vodenog rastvora [66].

U vodoničnoj vezi, ukupna interakcija je dominantno elektrostatička, što dovodi do izražene fleksibilnosti u dužini i uglu veze. One se obično ne pojavljuju kao pojedinačne i izolovane veze, već više formiraju mreže. Postoji i mogućnost vezivanja višestruke vodonične veze, kada donor formira vezu sa više akceptora u isto vreme. Ovo zahteva veliku lokalnu gustinu akceptora. Preko 25% svih O - H ... O vodoničnih veza u ugljenim hidratima su višestruke [66]. Jedna od standardnih metoda za istraživanje prisustva vodoničnih veza u čvrstom stanju je i metoda infracrvene spektroskopije. Formiranje vodonične veze utiče na vibracione modove grupa na više načina. Nedovoljna krioprotektivna funkcija nekog krioprotektanta se, prema ovoj hipotezi, može objasniti i nedovoljnom sposobnošću da vezuje vodu.

#### 1.5.3.1.2.4 OSTALI MEHANIZMI:

- Krioprotektanti su multi hidroksilne komponente koje mogu da grade eutektik u prisustvu vode, što bi dovelo do obrazovanja amorfni ili nesavršenih kristaloida leda. Obrazovanjem ovih kristaloida, sprečava se istiskivanje i mehanička destrukcija mikročestica tokom zamrzavanja [67].
- Dodatkom krioprotektanta, viskoznost rastvora se znatno povećava, usled interakcija hidroksilnih grupa krioprotektanta i molekula vode. Povećanje viskoznosti suspenzije može onemogućiti kristalizaciju leda i ograničiti mehaničku štetu.
- Više hidroksilne komponente mogu da održe prostornu orijentaciju i razmak između čestica nakon sublimacije leda. Stoga, čestice ne formiraju aglomerate.
- I površinski napon ima uticaja. Veliki površinski napon rastvora sa krioprotektantom, može izazvati koalescenciju suspendovanih čestica tokom zamrzavanja. Suprotno tome, relativno mali površinski napon koncentrovanih rastvora saharoze i glukoze može uticati na čestice da ostanu dispergovane u rastvoru šećera, izolovajući ih individualno i sprečavajući aglomeraciju. Potrebno je istaći da se viskoznost znatno povećava bližeći se T'g i formiranjem staklastog stanja. Kao rezultat, aglomeracija ne može da nastupi nakon vitrifikacije. Stoga se može reći da je relevantan onaj površinski napon kojem neposredno sledi vitrifikacija (npr. na T'g) [68].

#### 1.5.3.1.3 UTICAJ INKAPSULIRANIH LEKOVA

Inkapsulirani medikamenti (lekovi i druga terapijska sredstva) u nanočesticama mogu, u nekim slučajevima, uticati na liofilizaciju tih nanočestica. Sa druge strane, liofilizacija može izazvati otpuštanje medikamenta iz nanočestica ili denaturaciju, ako je to slučaj sa proteinima. U literaturi je opisana liofilizacija PCL nanosfera sa itrakonazolom, pri čemu je došlo do desorpcije leka adsorbovanog na površini nanočestica [69]. Za ovakav efekat odgovorna je kristalizacija poloksamera, koji je korišćen kao nejonski stabilizator. Kristalizacija stabilizatora je dovela do destabilizacije slabo adsorbovanog leka na površini nanosfera, što uzrokuje desorpciju leka.

---

<sup>1</sup> Arenijusova jednačina je jednačina koja daje zavisnost konstante brzine hemijske reakcije od temperature i energije aktivacije. Ima sledeći oblik:  $k = Ae^{\frac{-E_a}{RT}}$ , gde je: R - univerzalna gasna konstanta, A - predeksponencijalni faktor, E<sub>a</sub> - energija aktivacije i T - temperatura

Zamenjivanjem poloksamera anjonskim surfaktantom, natrijum dezoksiholatom, postignuta je potpuna stabilizacija nanosfera sa itrakonazolom, nakon liofilizacije, u prisustvu 10% rastvora saharoze.

U literaturi je opisano i dobijanje polimernih sistema sa inkapsuliranim ciklosporinom pri čemu je pokazano da je liofilizacija značajno poboljšala inkapsulaciju ciklosporina. Liofilizacija poli(laktida) i poli(laktid-ko-glikolida) sa ciklosporinom uzrokovala je blagi porast u veličini čestica. Ova modifikacija veličine može uticati na oralnu farmakokinetiku leka [16].

### 1.5.3.2 ZNAČAJNOST LIOFILIZACIJE

---

U tipičnom procesu liofilizacije nanočestica, vodena suspenzija sa nanočesticama i različita pomagala formulaciji, postavljaju se u staklenu bočicu, a bočica se stavlja na temperaturski kontrolisane police. Temperatura police se postavi na oko  $-40^{\circ}\text{C}$ , da bi se sva voda preobrazila u led. Neka jedinjenja, kao što su puferi soli i manitol, mogu delimično da kristališu tokom smrzavanja, ali većina krioprotektanata ostaje u amorfnom stanju. Nanočestice i pomenuta jedinjenja tipično prelaze u amorfno staklasto stanje, koje sadrži velike količine nesmrznute vode (15 - 30%). Nakon što se sva voda i supstanca koja se rastvara pretvore u čvrstu fazu, para leda se evakuiše vakuumskim pumpama i kontrolom željanog pritiska. Nakon toga, temperatura polica se povećava radi snabdevanja sistema energijom (potrebno za proces sublimacije) i time počinje korak glavnog sušenja. Uklanjanje kristala leda sublimacijom, stvara otvorenu mrežu pora, koja omogućava putanju vodene pare iz dobijenog produkta. Granica led - para, generalno se pomera sa vrha produkta ka dnu bočice tokom procesa primarnog sušenja. Ovaj proces je obično najduži deo procesa liofilizacije. Kada se primeti da je u svim bočicama uklonjen led, temperatura police se povećava, radi pružanja viših temperatura produktu, potrebnih za efikasno uklanjanje nesmrznute vode. Finalno sušenje se obično vrši na temperaturama polica u opsegu od  $25 - 50^{\circ}\text{C}$  na nekoliko sati.

Poznato je da su različite faze liofilizacije bazirane na veoma čvrstim fizičkim, hemijskim i inženjerskim principima i da se može kontrolisati do te mere, da se ishod procesa određenog produkta može dosta dobro proceniti. Stabilne liofilizirane nanočestice se mogu dobiti uklapanjem optimalnih formulacija sa njihovim pridruženim optimalnim procesom sušenja.

Da bi se odradio optimalni proces liofilizacije nanočestica, trebalo bi razumeti kritične osobine optimizovanih formulacija i kako primeniti ove informacije u dizajnu procesa. Kritične osobine formulacija uključuju temperaturu staklastog prelaza smrznutog uzorka ( $T_g$ ), temperaturu kolapsa formulacije ( $T_c$ ), stabilnost nanočestica i njihovih enkapsuliranih lekova i osobine korišćenih stabilizatora [70]. Temperatura kolapsa je maksimalna dozvoljena temperatura produkta tokom primarnog sušenja. Liofilizirani produkt gubi makroskopsku strukturu i dešava se kolaps tokom liofilizacije, kada je zagrejam iznad ove temperature (ona je obično dva stepena veća od  $T_g$  ili jednaka eutektičkoj temperaturi).

#### 1.5.3.2.1 KORAK ZAMRZAVANJA

Zamrzavanje je prva faza liofilizacije i to je faza kada se većina vode uklanja iz nanočestičnog sistema. Sistem je razdvojen na više faza i formira se površina između leda i nanočestica. Zamrzavanje često uzrokuje destabilizaciju nanočestica. Ovi uticaju podrazumevaju povećanje koncentracije nanočestica, što poboljšava interakcije između njih, dovodeći do aglomeracije ili fuzije. Da bi se obezbedilo totalno očvršćavanje smrznutog uzorka, faza nanočestica bi trebalo da se

ohladi na temperaturu nižu od  $T_g$  formulacije ako je amorfna, ili ispod  $T_{eu}$ , ako je u kristalnom stanju, gde je  $T_g$  temperatura staklastog prelaza maksimalno krio-koncentrovanog uzorka, a  $T_{eu}$  temperatura eutektičke kristalizacije kristalnog zamrznutog uzorka.

U literaturi korišćene su različite metode zamrzavanja, kao što je zamrzavanje tečnim azotom, punjenje bočica na prethodno ohlađene pločice ili pojačano hlađenje polica [58]. Ove različite metode zamrzavanja daju različite efekte superohlađenja. Normalno, najviši efekat superohlađenja postiže se zamrzavanjem malih zapremina tečnim azotom, a najniži je metod prethodno ohlađenih polica.

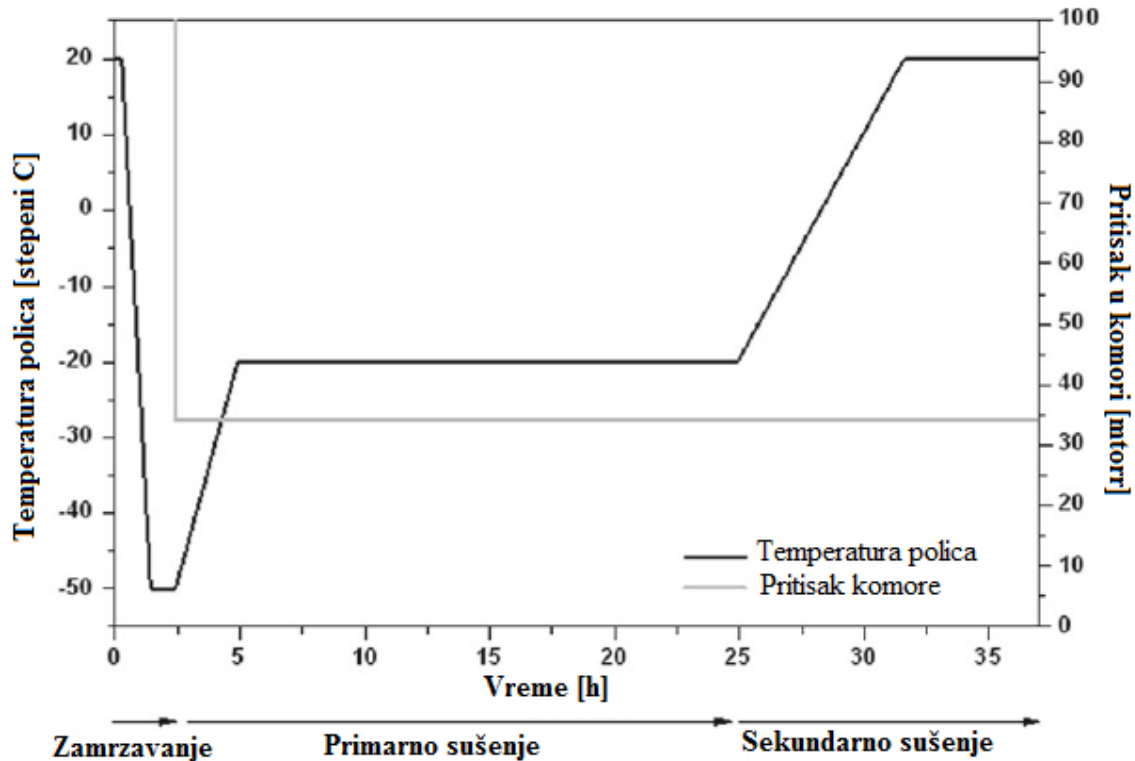
### TEORIJA ZAMRZAVANJA

Kada je vodeni rastvor zamrznut, rastu kristali leda i molekuli rastvorene supstance se isključuju iz sastava kristala [70]. Zbog toga što nečistoće imaju veoma malu rastvorljivost u kristalima leda, stvara se koncentracioni gradijent supstance koja se rastvara i krio-koncentracija ispred fronta leda se povećava. Povećanje koncentracije smanjuje tačku topljenja rastvora, što rezultira u formiranju konstitucione zone superohlađenja i konačno, ovo prati rast kristalnih ćelija leda. Ovaj fenomen se zove Mullins - Sekerka nestabilnost, prema kom primarni šablon strukture leda zavisi od koncentracije destabilizujuće supstance koja se rastvara i površinske energije koja se odupire formiranju ćelija kristala.

### KONTROLISANO ZAMRZAVANJE

Različiti uslovi zamrzavanja, uključujući temperaturu zamrzavanja, koncentraciju supstance, tipa rastvarača i smer zamrzavanja mogu imati veliki uticaj na obrazovanje materijala. Kada se vodeni rastvor zamrzava tečnim azotom, ekstremno velike temperature zamrzavanja ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) tečnog azota rezultiraju u brzom formiranju klica kristala leda i rasta malih ledenih kristala. Međutim, kada se zamrzavanje odigrava na višim temperaturama (npr.  $-20^{\circ}\text{C}$ ), nukleacija leda je sporija i klice streme rastu u veće kristale leda, što rezultira u velikim i nasumično raspoređenim porama u materijalu. Smer zamrzavanja ima veliki efekat na morfologiju pora. Kontrolisanjem smera zamrzavanja, rast kristala leda može biti orijentisan u jednom pravcu (proces nazvan usmereno zamrzavanje). Proces se realizuje primenom velikog temperaturskog gradijenta duž uzorka, gde kristali leda rastu sa kraja gde je temperatura niža do oblasti gde je viša. Potom, uklanjanjem orijentisanih kristala leda sušenjem, stvara se materijal sa usmerenim porama.





SLIKA 1.5.32 SHEMATSKI PRIKAZ KONZERVATIVNOG CIKLUSA LIOFILIZACIJE. CIKLUS SE MOŽE PODELITI NA TRI FAZE: ZAMRZAVANJE, PRIMARNO I SEKUNDARNO SUŠENJE.

#### 1.5.3.2.2 KORAK GLAVNOG SUŠENJA

Primarno sušenje podrazumeva uklanjanje leda sublimacijom (slika 1.5.3). Temperatura produkta tokom primarnog sušenja se mora podesiti ispod temperature kolapsa formulacije, stoga se moraju kontrolisati operacioni uslovi (pritisak i temperatura polica) [58].

#### 1.5.3.2.3 KORAK FINALNOG SUŠENJA

Podrazumeva uklanjanje apsorbirane vode iz produkta, koja se nije odvojila kao led tokom zamrzavanja i nije sublimovana. Nezamrznuta voda može biti adsorbirana na površini kristalnog produkta ili je u fazi supstance koja se rastvara. Takođe, može biti kao hidratirana voda u kristalnom hidratu ili rastvorena u amorfnoj čvrstoj fazi. Obično je prisutna u dovoljnim količinama da izazove brzu dekompoziciju produkta kada se skladišti na sobnoj temperaturi. Sekundarno sušenje počinje lokalno kada se ukloni sav led iz te oblasti. Sadržaj zaostale vlage u krajnjem produktu obično diktira dužinu sekundarnog sušenja. Za svrhe farmacije, izgleda da je poželjan sadržaj vlage manji od 1%.

#### 1.5.3.3 FIZIČKO-HEMIJSKE KARAKTERIZACIJE LIOFILIZIRANIH PRODUKATA

Veoma je važno okarakterisati matriks liofilizacije i istražiti održanje osobina nanočestica. Makroskopska vizuelizacija liofiliziranog produkta je direktan način da se posmatra mikrostruktura matriksa, da se dokaže održanje integriteta nanočestica i da se pruži uvid u eventualne modifikacije njihove morfologije. U ove svrhe koriste se mnoge visokorezolucione mikroskopske tehnike, kao što su cryo-TEM, TEM, SEM itd.

## 2 CILJ ISTRAŽIVANJA

---



**P**oslednjih nekoliko decenija, sve više i više napora se ulaže u razvoj biodegradabilnih polimernih materijala (mikro- i nanočestica), pogodnih za primenu u sistemima za kontrolisanu dostavu lekova i tkivnom inženjerstvu. Većina ovih materijala sintetiše se od alifatičnih poliestara, kao što je poli( $\epsilon$ -kaprolakton). Osim biokompatibilnosti, biodegradabilnosti i odgovarajućih morfoloških karakteristika, i fizička i hemijska stabilnost čestica su od izuzetne važnosti i ključni su uslovi za komercijalizaciju ovih sistema.

Morfološke osobine polimernih čestica imaju glavnu ulogu u biodistribuciji i prolasku kroz biološke barijere, a stoga i određuju krajnju efikasnost terapije. Među ovim osobinama, oblik i veličina čestica su neki od ključnih faktora koji utiču na važne biološke procese, uključujući adheziju i internalizaciju od strane ćelija. Iz studija o uticaju veličine sfernih čestica na njihov polu život u cirkulaciji krvi, može se zaključiti da čestice opsega veličina od 20 nm do 1  $\mu$ m izbegavaju većinu mehanizama uklanjanja iz organizma pa je samim tim i vreme njihovog boravka u cirkulaciji povećano. Iz literature je poznato i da se polimerne nanočestice sfernog oblika internalizuju mnogo više nego što je to slučaj sa cilindričnim i štapićastim česticama.

Liofilizacija je složen proces koji uključuje promene u temperaturi i fizičkom stanju materijala, kao i u koncentraciji različitih supstanci u tečnom okruženju, što lako narušava stabilnost čestične disperzije. Da bi se čestice zaštitile od različitih vrsta uticaja tokom liofilizacije, koriste se krio- ili lioprotektanti. Izbor pogodnog krioprotektanta nije uvek jednostavan zadatak. U nekim slučajevima, neodgovarajuća koncentracija krioprotektanta može čak i destabilisati čestice.

U analizi svojstava materijala koji je procesiran u cilju potencijalne primene u oblasti biomedicine, veoma je važno ispitati njegovu citokompatibilnost, odnosno meru u kojoj je materijal podesean da koegzistira u prisustvu ćelija, tako da ne utiče na njihov prirodni životni proces, u smislu podsticanja procesa degeneracije i umiranja. Takođe, veoma je važno ispitati i uticaj materijala na obrazovanje reaktivnih radikala kiseonika (reactive oxygen species - ROS) i nastanak oksidacionog stresa, jednog od mehanizama koji dovodi do nastanka mnogih bolesti.

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

- Dobijanje mikro- i nanosfera poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) (PCL) odgovarajućih morfoloških karakteristika, fizičko-hemijskom rastvarač/nerastvarač metodom.
- Ispitivanje uticaja različitih supstanci kao potencijalnih krioprotektanata, prilikom sušenja uzoraka u liofilizatoru. Istraživanje sposobnosti stabilizacije i protekcije sa: ugljenim hidratima - glukozom i saharozom i polimerima - poli(vinil alkoholom) i poli( $\alpha$ ,  $\gamma$ , L-glutaminskom kiselinom).
- Ispitivanje citotoksičnosti mikro- i nanosfera PCL polimera dobijenih uz korišćenje različitih krioprotektanata.
- Ispitivanje uticaja liofiliziranih PCL mikro- i nanosfera na nastanak reaktivnih radikala kiseonika (reactive oxygen species - ROS).

# 3 EKSPERIMENTALNI DEO

---



## 3.1 EKSPERIMENTALNI RAD

---

### 3.1.1 MATERIJAL

---

Lactel Absorbable Polymers (Birmingham, Alabama, SAD) je proizvođač poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) korišćenog u eksperimentima. Korišćeni polimer ima srednju molekulsku masu 50000 g/mol i viskoznost od 0.85 dL/g. Poli(L-glutaminska kiselina) (PGA, Mw = 20 - 40 kDa, 99.9% HPLC purity) je poklon Guilin Peptide Technology Limited (Kina). Saharoza je proizvod firme VWR BDH Prolabo, Belgija. Glukoza, PVA, rastvarač (hloroform) i nerastvarač (alokohol - etanol), kupljeni su od Superlaba (Superlab, Srbija). Svi reagensi i hemikalije upotrebljeni u eksperimentalnom radu bili su analitičke čistoće i korišćeni su bez dodatnog prečišćavanja. Sledeće hemikalije su korišćene za određivanje potencijalne citotoksičnosti i formiranja reaktivnih radikala kiseonika, a potiču iz firme Sigma Aldrich (St. Louis, USA): EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium), penicilin/streptomycin, L-glutamin, PBS (phosphate-buffered saline), tripsin, fetalni bovin serum, rastvor neesencijalnih aminokiselina (100x), MTT, dimetil sulfoksid, tert-butil hidroperoksid i 2,7-dihlorofluorescein diacetat (DCFH-DA).

---

### 3.1.2 SINTEZA

---

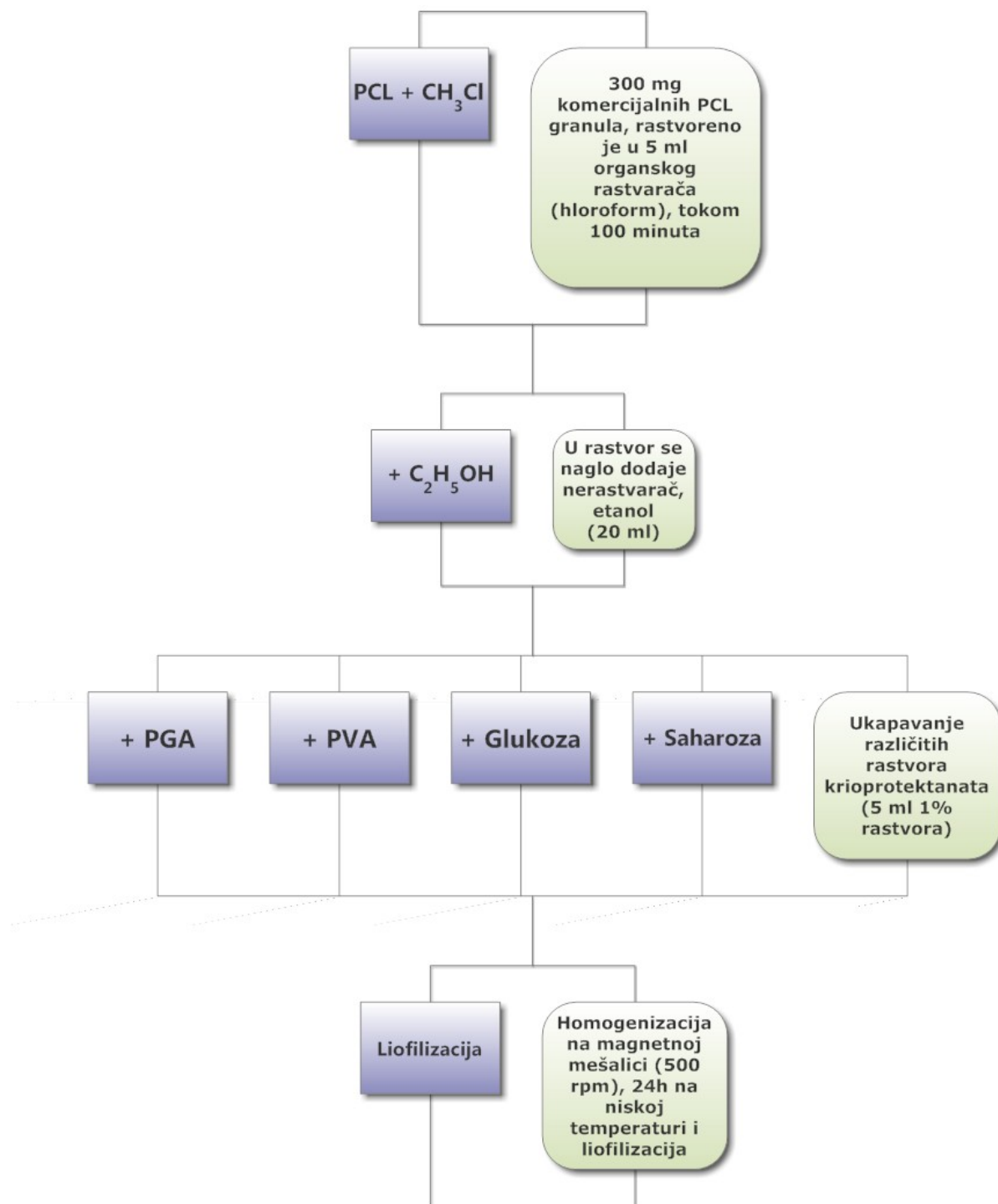
Sinteza čestica PCL rađena je fizičko-hemijskom rastvarač/nerastvarač metodom. Kao što je na shemi (slika 3.1.1) prikazano, 300 mg komercijalnih granula PCL rastvarano je tokom 100 minuta, na sobnoj temperaturi u organskom rastvaraču, hlороformu (5ml, CHCl<sub>3</sub>). Nakon potpunog rastvaranja naglo je dodat nerastvarač u višku, alkohol etanol (20 ml, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), uz istovremenu homogenizaciju na magnetnoj mešalici (500rpm), pri čemu dolazi do difuzije rastvarača u nerastvarač i rastvor se boji beličasto. Kao krioprotektanti, u eksperimentima su korišćene različite supstance i to: poli(L - glutaminska kiselina) (PGA), saharoza, glukoza ili poli(vinil alkohol) (PVA). PGA, saharoza, glukoza ili PVA (5ml, 1% vodeni rastvor) ukapavani su u suspenziju, uz istovremenu homogenizaciju na magnetnoj mešalici, a zatim je dobijena suspenzija izlivena u petrijeve šolje i ostavljena na temperaturi od -8°C tokom 24h, kako bi hlороform evaporisao, a čestice PCL-a u potpunosti precipitovale. Nakon toga čestice PCL-a su sušene na redukovanom pritisku (0.30 mbar) i niskoj temperaturi od -55°C u liofilizatoru (Freeze Dryer Christ Alpha 1-2/ LD plus, main drying t: 8.5h; final drying: 30 min). PGA i PVA su polielektroliti, pa u slučaju ovih uzorka, oni imaju dvojak u ulogu u sistemu, kao stabilizatori i kao krioprotektanti. Stabilizator stvara "zeta" potencijal čime se dodatno sprečava aglomeracija novo nastalih čestica.

Uzorci dobijeni fizičko-hemijskom rastvarač/nerastvarač metodom, liofilizirani i okarakterisani različitim metodama su:

1. PCL polimer bez dodatka krioprotektanta,
2. PCL sa dodatkom 1%-og vodenog rastvora PVA,
3. PCL sa dodatkom 1%-og vodenog rastvora PGA,
4. PCL sa dodatkom 1%-og vodenog rastvora glukoze i
5. PCL sa dodatkom 1%-og vodenog rastvora saharoze.

Ispitivanje strukturnih i morfoloških osobina praha PCL-a dobijenog bez i sa različitim krioprotektantima, rađeno je metodama infracrvene spektroskopije sa Fourierovom

transformacijom (FT-IR), skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) i metodom analize difrakcije laserske svetlosti na česticama (DLS). Citokompatibilnost uzoraka je ispitana MTT testom dok je ROS efekat ispitivan DCFH-DA testom.



**SLIKA 3.1.1** SHEMATSKI PRIKAZ DOBIJANJA ČESTICA PCL-A FIZIČKOHEMIJSKOM RASTVARAČ/NERASTVARČ METODOM

---

## 3.2 EKSPERIMENTALNE METODE

---

### 3.2.1 LIOFILIZACIJA

---

Liofilizacije uzoraka je rađena pri sniženom pritisku od 0.30 mbar i na temperaturi od -55°C tokom 9 h (Freeze Dryer Christ Alpha 1-2/ LD plus, main drying t: 8.5 h; final drying: 30 min).



SLIKA 3.2.1 LIOFILIZATOR CHRIST ALPHA 1-2/ LD PLUS

Glavni delovi sistema za liofilizaciju (slika 3.2.1) su:

- komora za sušenje, sa policama
- vakuumska pumpa
- sistem za hlađenje
- kondenzator

Rastvori uzoraka, nakon delimičnog zamrzavanja 24 h u zamrzivaču, postavljeni su u bočice, koje su zatvorene određenim propustljivim materijalom, nakon čega se postavljaju u liofilizator. Uzorci su prvo zamrznuti na dovoljno niskoj temperaturi da bi u potpunosti očvrsnuli. Nakon toga, komora je evakuisana dok pritisak nije dostigao vrednost manju od pritiska pare leda na temperaturi uzorka (0.3 mbar pri -55°C). Nakon dostizanja ovog pritiska, na police je dovedena toplota radi pružanja dovoljno energije potrebne za sublimaciju leda (primarno sušenje na -30°C). Nakon što je odigrana primarna faza sušenja, uzorci su ostavljeni dovoljno dugo za odigravanje sekundarne faze uklanjanja nezamrznute, adsorbovane i zahvaćene vode.

---

### 3.2.2 FT INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA (FT-IR)

---

Infracrvena spektroskopija pruža podatke o vibracijama atoma u molekulu. Pomoću nje se može izvršiti jednoznačna identifikacija čistih jedinjenja, kao i komponenata jednostavnijih smeša (kvalitativna analiza), a potom i kvantitativna analiza [71]. Vibracioni spektri takođe sadrže podatke o strukturi molekula, geometriji i detalje o načinu vezivanja atoma u molekulu. Na osnovu ovih spektara, mogu se odrediti podaci o mehanizmima odvijanja procesa, faznim transformacijama, dinamici protona itd. Vibracioni prelazi višeatomskih molekula mogu se javiti u IC spektru samo ukoliko je ispunjeno izborno pravilo da se dipolni momenat molekula tokom vibracija, pri promeni



međuatomskog rastojanja, menja po veličini ili pravcu, nezavisno od toga da li molekul u ravnotežnoj konfiguraciji ima ili nema permanentni dipolni moment [72].

Svi FT-IR spektrofotometri uglavnom koriste Majkelsonov interferometar sa dvostrukim snopom, što podrazumeva postojanje izvora, fiksnog i pokretnog ogledala, separatriše, detektora, dela elektronike: pojačivača, digitajzera, elektronskih filtera, kojima se signal sa detektora pojačava, demoduliše, digitalizuje i šalje na računar koji vrši Fourijeovu transformaciju interferograma i daje spektar u obliku:  $T = f(\nu)$  ili  $A = f(\nu)$ .

Modulisana svetlost iz izvora upravlja se na separatrisu, koja oko polovine intenziteta snopa reflektuje na fiksno ogledalo, a drugu polovinu propušta na pokretno ogledalo. Pokretno ogledalo reflektuje snop nazad na separatrisu, pa se ponovo deli i meša: polovina se vraća u izvor, dok druga polovina pada na uzorak i prolazi do detektora. Kada je rastojanje od separatriše do pokretnog, odnosno fiksnog ogledala isto (kada je optička putna razlika dva kraka interferometra) ravno nuli, javlja se konstruktivna interferencija, pa snop koji napušta separatrisu ima maksimalan intenzitet. Kada optičko kašnjenje nije nula, snopovi svetlosti iz oba kraka interferometra mogu da ne budu u fazi, pa se javlja destruktivna interferencija i dolazi do slabljenja intenziteta. Posle rekombinacije, svetlosni snop se sistemom sočiva fokusira na uzorak, a zatim, drugim sistemom na detektor. Posle detektora, svetlost se šalje na pojačivač, gde se vrši demodulacija signala, zatim u digitajzer koji kontinualni interferogram ili jednu analognu funkciju, prevodi u digitalnu i šalje na računar. U računaru se odvija Fourijerova transformacija, dajući spektar kao transparentiju (T%) ili apsorbciju (A%) u funkciji talasnog broja ( $\nu/\text{cm}^{-1}$ ), odnosno talasne dužine ( $\lambda/\text{nm}$ ).

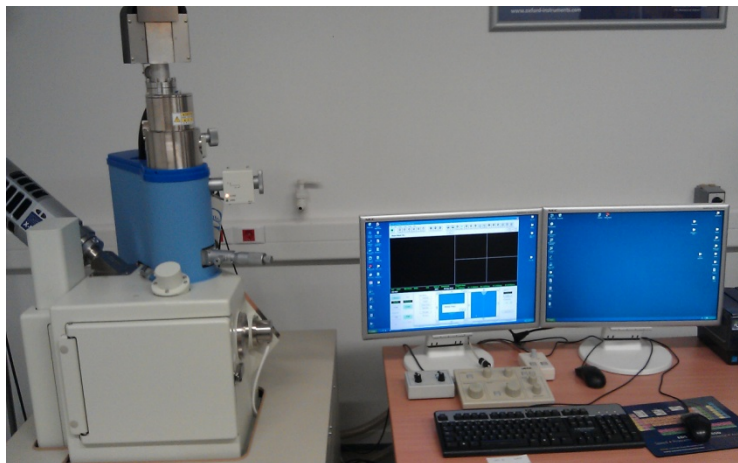
Kvalitativna analiza uzoraka odrađena je opisanom metodom spektroskopije. FT-IR spektri uzoraka, snimljeni su metodom KBr pastile, u opsegu  $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ , Carl Zeiss SPECORD 75 spektrometrom, pri rezoluciji od  $4 \text{ cm}^{-1}$ . FT-IR merenja su vršena u cilju ispitivanja mogućih interakcija između PCL polimera i različitih krioprotektanata (PVA, PGA, saharoze i glukoze).

---

### 3.2.3 SKENIRAJUĆA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (SEM)

---

Elektronski mikroskop je tip mikroskopa koji koristi interakciju elektrona sa materijom za stvaranje slike ispitivanog objekta. Uvećana slika objekta se formira difrakcijom visokoenergetskih elektrona. Pošto se povećanjem energije elektrona njihove De Brojjeve talasne dužine mogu učiniti dosta manjim od talasnih dužina vidljive svetlosti, elektronskim mikroskopom se mogu posmatrati objekti čija je veličina daleko ispod granice vidljivosti optičkim mikroskopom [73]. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) jedna je od najviše korišćenih metoda u karakterizaciji materijala. Ako postoji mogućnost programiranog šetanja elektronskog snopa (skeniranje) u cilju formiranja lika objekta na bazi reflektovanog snopa elektrona, tada se radi o skenirajućoj elektronskoj mikroskopiji. SEM uređaji rade na uvećanjima od 10 do preko 500.000, a osim morfologije ispitivanog materijala (topografija) u mogućnosti su da pruže preciznu informaciju o hemijskom sastavu materijala u blizini njegove površine.



**SLIKA 3.2.2** SKENIRAJUĆI ELEKTRONSKI MIKROSKOP I RAČUNAR KOJI GA KONTROLIŠE

U tipičnom SEM eksperimentu generiše se snop primarnih elektrona fokusiran u fini spot prečnika približno 5 nm, sa energijama elektrona koje variraju od 100 eV do 50 keV [74]. U slučaju neelastičnog rasejanja primarni elektroni predaju deo svoje energije elektronima u materijalu, čime se stvaraju uslovi za njihovu emisiju u vidu sekundarnih elektrona koji obično imaju energiju manju od 50 eV. Deo neelastično predate energije primarnih elektrona dovodi i do pobuđivanja elektrona iz elektronskih ljuski atoma, a tako pobuđeni atomi deeksituju se u osnovno stanje ili emisijom fotona karakterističnog X-zračenja ili emisijom Ožeovog elektrona. Deo elastično rasejanih primarnih elektrona vraća se iz materijala kroz površinu kao kontrarasejani elektroni sa verovatnoćom proporcionalnom atomskom broju regiona materijala različitog sastava [70]. SEM sistem formira sliku detektovanjem svih pomenutih tipova zračenja koji se javljaju kao rezultat interakcije primarnog elektronskog snopa sa materijalom. Reflektovani elektroni sa površine uzorka hvataju se elektronskim multiplikatorom, a dobijeni naponski impuls se vodi na rešetku katodne cevi. Ako tačka površine koju pogađa elektronski snop dobro reflektuje elektrone, preko pojačivača elektronskog multiplikatora izaziva dobru propustljivost rešetke katodne cevi, pa se na odgovarajućoj tački ekrana dobija jače osvetljenje. Brzim šetanjem elektronskog mlaza na ekranu se dobija trajna slika površine. Dobra ili loša reflektivnost pojedinačnih tačaka površine uzorka određena je hemijskim sastavom i uglom prema otvoru fotomultiplikatora, pa je formiranje slike funkcija ova dva faktora.

Moć razlaganja skenirajućih elektronskih mikroskopa zavisi od tri faktora [67]. Prvo, moć razlaganja ne može prevazići dijametar elektronskog snopa. Drugo, elektronski snop se donekle rastura po uzorku, čime se njegov efektivni dijametar nešto povećava. Treće, struja snopa mora biti dovoljna da se na ekranu vidi slika svake tačke uzorka. Uzorci za SEM moraju biti neisparljivi, da bi se unutar mikroskopa mogao održati visoki vakuum. U slučaju uzorka sa visokim naponom pare na sobnoj temperaturi, postoji mogućnost snižavanja korišćenjem držača uzorka koji se hladi tečnim azotom. Obavezno je da uzorci budu elektroprovodni. Neprovodni uzorci se lako mogu učiniti provodnim, neparavanjem ugljenika ili metala (zlata) u veoma tankom sloju, koji ne narušava topologiju uzorka.

Morfološke karakteristike uzoraka ispitivane su skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM). Za karakterizaciju uzoraka skenirajućom elektronskom mikroskopijom korišćen je elektronski mikroskop marke JEOL-JSM-6460LV Japan, sa energijom elektrona od 10 do 50 KeV-a.

Uzorci su najpre pripremljeni neparavanjem zlatom, pomoću uređaja za neparavanje 3AL-TEC SCD005, strujom od 30 mA sa udaljenosti od 50 mm tokom 180s.

### 3.2.4 MERENJE RASPODELE VELIČINA ČESTICA (DLS)



**SLIKA 3.2.3** UREĐAJ ZA LD ANALIZU MASTERSIZER 2000, MALVERN INSTRUMENTS, UK: OPTIČKI INSTRUMENT I MERNE ĆELIJE SCIROCCO, HYDROS I HYDROMP [75]

Značajnost merenja raspodele veličina čestica leži u tome što svojstva disperznih sistema zavise od veličine samih čestica i uniformnosti njihove raspodele. Primarna metoda za ispitivanje raspodele veličina u disperznim sistemima je metoda analize difrakcije laserske svetlosti na česticama [75]. Laserska difraktometrija se bazira na činjenici da je prostorni raspored difraktovane svetlosti funkcija veličine čestica uzorka koji se analizira. U suštini ona meri intenzitete i rastojanja difrakcionih prstenova (prostorne uglove i pravac upadne svetlosti). Za razliku od difraktovane svetlosti koja se prostire pod malim uglovima u odnosu na pravac prostiranja upadne svetlosti, rasejanje je kompleksnije - svetlost se prostire u svim pravcima. Prostorni raspored rasejane svetlosti zavisi od odnosa veličine čestice i talasne dužine upadne svetlosti.

Raspodela veličina čestica PCL sa 1% glukozom kao krioprotektantom, merena je instrumentom PSA Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., UK), koji ima granicu detekcije od nekoliko desetina nanometara. Ovaj instrument koristi tehniku rasejanja laserskog snopa. Ovo se postiže merenjem intenziteta rasejane svetlosti po karakterističnim prostornim uglovima, tokom prolaska fokusiranog laserskog snopa kroz čestičnu disperziju. Ovi podaci se, potom, analiziraju radi kalkulacije veličina čestica koje su napravile šablon rasejanja. Standardan sistem se sastoji od tri elementa: optički instrument, jedinice za dispergovanje uzorka i računar sa odgovarajućim softverskim paketom. Mastersizer 2000 koristi dva izvora svetlosti: HeNe laser, kao izvor crvene svetlosti talasne dužine 633 nm i LED, koji emituje plavu svetlost talasne dužine 455 nm. Uzorak dispergovan u izopropanolu, nakon čega se unosi u mernu zonu instrumenta putem Hydro disperzione jedinice. Tokom merenja, instrument je beležio oko 2000 snimaka, jedan snimak svaki milisekundu, koji se usrednjavaju u konačan rezultat. Nakon toga, neobrađeni podaci su analizirani u programskom paketu.

---

### 3.2.5 ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOSTI (MTT TEST)

---

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) test je kolorimetrijski test merenja aktivnosti ćelijskih enzima koji redukuju tetrazolijumsku boju, MTT, do njenog nerastvorljivog formazana, dajući ljubičastu boju. Ovakav test meri ćelijsku metaboličku aktivnost preko NAD(P)H zavisnih ćelijskih enzima, oksidoreduktaza, i može, pod određenim okolnostima, da odražava broj ćelija sposobnih za preživljavanje i proliferaciju [72]. MTT test se gotovo uvek koristi u ispitivanju citotoksičnosti ili citostatičke aktivnosti potencijalnih medicinskih agenasa i toksičnih materijala. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid, žuti tetrazol), redukuje se do ljubičastog formazana u živim ćelijama.

### ĆELIJSKA KULTURA

---

Jetra ima veoma važnu ulogu u metabolizmu čoveka, jer obavlja mnoštvo funkcija, uključujući detoksifikaciju, odlaganje glikogena i proizvodnju krvnih belančevina. Eksperimentalne metode ispitivanja citotoksičnosti se baziraju, najčešće, na korišćenju ljudskih ćelija jetre HepG2. Ove ćelije su dobijene iz Evropske kolekcije za ćelijske kulture (ECACC). Drže se u rastvoru EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium) sa dodatkom 10% goveđeg seruma, 1% rastvora neesencijalnih aminokiselina, 2 mM L-glutamina i 100 U/ml penicilina sa 100 µg/ml streptomocina, pri 37°C na vlažnoj atmosferi i 5% CO<sub>2</sub>.

Pri ispitivanju citotoksičnosti uzoraka PCL polimera sa različitim krioprotektantima, korišćena je pomenuta metoda. HepG2 ćelije su postavljene na standardnom mikrosudu od 96 otvora (Nunc, Naperville IL, USA), gustine od 40 000 ćelija po mililitru i inkubirane narednih 20 sati na temperaturi od 37 °C. Tečnost u kojoj se ćelije nalaze je potom zamenjena svežom tečnošću, koja sadrži 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 i 1 % (zapreminski) različitih uzoraka PCL čestica (PCL bez krioprotektanta, PCL sa PGA i PCL sa glukozom kao krioprotektantima) i inkubirani 24 časa. U svaki eksperiment je uključena i negativna kontrola (ćelije koje nisu tretirane). Potom je dodat MTT (krajnje koncentracije od 0.5 mg/ml), inkubiran dodatna tri sata, nakon čega je tečnost sa MTT uklonjena, a formirani kristali formazana su rastvoreni u dimetil sulfoksidu (DMSO). Merena je optička gustina na 570 nm (referentni filter 690 nm) korišćenjem mikrofluorimetra (Tecan GENios, Austria). Sposobnost preživljavanja ćelija (engl. viability) određuje se upoređujući vrednosti optičke gustine otvora mikrosuda koji sadrže tretirane ćelije, sa onim u kojima su netretirane ćelije. Odrađeno je po pet ponavljanja za svaku tačku koncentracije i po tri nezavisna eksperimenta za svaki uzorak.

Rezultati su prikazani kao srednja vrednosti tri nezavisna eksperimenta. Radi određivanja statističke značajnosti (pouzdanosti), odrađen je studentov T test između tretiranih i kontrolnih ćelija. S obzirom da je poznato da će broj ćelija opadati, rađen je jednosmerni test. Pri vrednostima  $P < 0.05$  (sa 95% pouzdanosti), rezultati su smatrani značajnim.

---

### 3.2.6 FORMIRANJE REAKTIVNIH RADIKALA KISEONIKA (DCFH-DA TEST)

---

Reaktivne kiseonične vrste, (engl. Reactive Oxygen Species - ROS), predstavljaju atome, molekule ili jone sa jednim ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi. Nastaju kao međuproizvod u toku metabolizma kiseonika, jako su nestabilne i veoma reaktivne [76]. Ove čestice, zbog nesparenih elektrona u spoljnoj orbiti, veoma agresivno "traže" druge molekule, u nastojanju da iz njih ukradu njihove elektrone, stvarajući tako nove radikale, i na taj način održe oksidativni

ciklus. Reaktivne vrste kiseonika u organizmu ispoljavaju pozitivna i negativna dejstva. Nastale kao sporedni proizvod normalnog metabolizma kiseonika, oni igraju važnu ulogu u ćelijskoj signalizaciji, leukociti ih koriste kao odbrambeni mehanizam u borbi protiv raznih mikroorganizama itd. Sa druge strane, izloženost organizma negativnim uticajima sredine (neki od njih su duvanski dim, lekovi, način ishrane, neka terapijska i okolna zračenja) može doprineti povećanju koncentracije ovih jedinjenja, što izaziva obimna oštećenja ćelijskih struktura (oksidativni stres). Iako je količina ROS u organizmu jako mala, njeni efekti su razorni, jer lančana reakcija omogućava da jedna vrsta izazove promene na hiljadama molekula. Poremećaje koje tom prilikom mogu da izazovu reaktivne vrste kiseonika u ćeliji su: stvaranje bočnih veza, preoksidacija lipida, oštećenje lizozoma, oštećenje ćelijske membrane i nagomilavanje pigmenta starenja. Poremećaji i bolesti, koje mogu nastati kao posledica štetnog delovanja reaktivnih vrsta kiseonika su brojne, a samo neke od njih su: prevremeno starenje, tumori, šećarna bolest, ateroskleroza, katarakta, neurodegenerativne bolesti, reumatski artritis, hipoksija itd.

Obrazovanje unutarćelijskih reaktivnih kiseoničnih vrsta mereno je spektrofotometrijski, korišćenjem fluorescentne probe, 2',7'-dihlorodihidrofluorescein diacetata (DCFH-DA) [77]. Ovaj relativno nefluorescentan molekul se najčešće koristi pri ispitivanju redoksnog stanja ćelija. DCFH-DA lako difunduje kroz ćelijsku membranu, nakon čega se hidrolizuje unutarćelijskim esterezama do nefluorescentnog 2',7'-dihlorodihidrofluoresceina (DCFH<sub>2</sub>). Peroksidaze, citohrom c i Fe<sup>2+</sup> su sposobni da oksiduju DCFH<sub>2</sub> do veoma fluorescentnog 2',7'-dihlorofluoresceina (DCF) u prisustvu vodonik peroksidaza. Akumulacija DCF unutar ćelija se može meriti povećanjem fluorescencije na 530 nm, kada se uzorak eksituje na 485 nm. Intenzitet fluorescencije DCF (meri se protočnom citometrijom) proporcionalan je količini reaktivnih kiseoničnih vrsta formiranih unutar ćelije. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je principijalna reaktivna kiseonična vrsta odgovorna za oksidaciju DCFH<sub>2</sub> do DCF.

HepG2 ćelije (ista kultura, gore opisana), postavljene su na crnu mikroposudu sa 96 otvora za ćelije, pri gustini od 75 000 ćelija po mililitru (Nunc, Naperville IL, USA) u pet ponavljanja za svaki uzorak. Nakon 20h od inkubacije na 37°C u 5 % CO<sub>2</sub>, ćelije su inkubirane sa 20 μM DCFH-DA. Nakon 30 min, DCFH-DA je uklonjen i ćelije su tretirane sa 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 i 1 % (zapreminski) uzorka PCL bez krioprotektanta, PCL sa 1% PGA i PCL sa 1% glukoze, u PBS. U svakom eksperimentu, uključena je negativna kontrola (netretirane ćelije) i pozitivna kontrola (0.5 mM t-BOOH). Radi kinetičkih ispitivanja, sudovi su održavani na 37°C i intenzitet fluorescencije je meren na svakih 30 min tokom 5 sati inkubacije, korišćenjem spektrofluorimetra (Tecan, Genios, Austrija) pri talasnoj dužini ekscitacije na 485 nm i emisije na 530 nm.

Za svaki uzorak su rađena dva nezavisna eksperimenta sa po pet ponavljanja. Statistička značajnost između tretirane grupe i kontrole, određena je dvosmernim studentovim T testom, korišćenjem ANOVA. Pri P vrednosti manjoj od granične (0.05), podaci se statistički značajno razlikuju.

# 4 REZULTATI

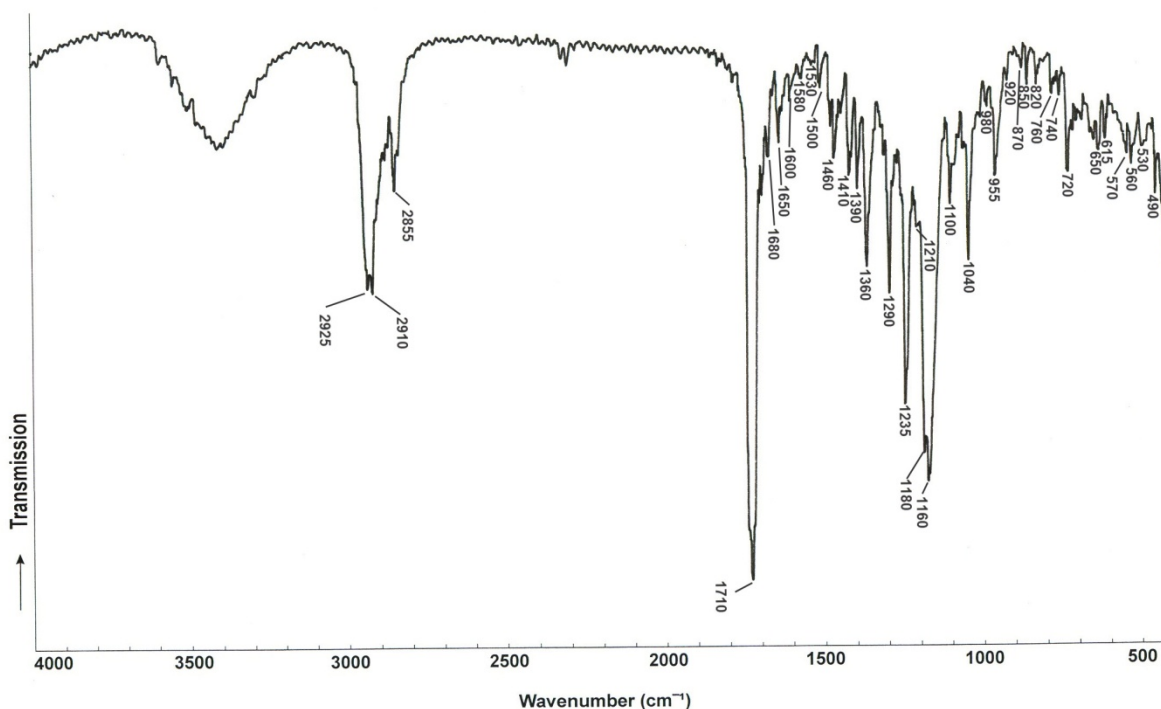
---





## 4.1 FT-IR ANALIZA

Metodom infracrvene spektroskopije sa Fourier-ovom transformacijom, ispitani su svi uzorci.



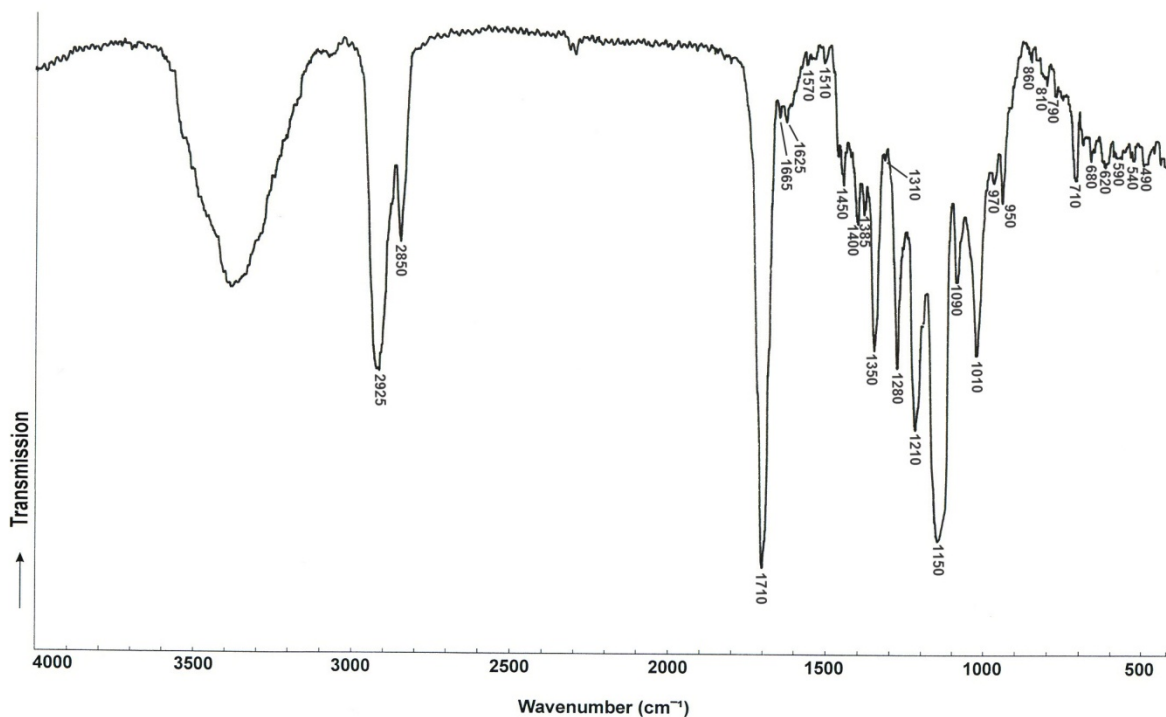
**SLIKA 4.1.1** FT-IR SPEKTAR PCL POLIMERA LIOFILIZOVANOG BEZ DODATKA KRIOPROTEKTANTA

Posmatrajući spektar PCL uzorka liofiliziranog bez dodatka krioprotektanta (slika 4.1.1), lako se uočava najintenzivnija traka na  $1710\text{ cm}^{-1}$ , koja predstavlja karakterističnu istežuću vibraciju karbonilne grupe ( $\text{C} = \text{O}$ ) [78]. Trake slabijeg intenziteta na  $1160\text{ cm}^{-1}$ ,  $1180\text{ cm}^{-1}$  i  $1235\text{ cm}^{-1}$ , predstavljaju vibracije cele karboksilne grupe ( $\text{O} = \text{C} - \text{O}$ ) [79]. Veći intenzitet pomenutih apsorpcionih traka u odnosu na ostale u spektru, objašnjava se činjenicom da su te grupe polarnije, jer je aktivnost molekularnih vibracija u IC spektru usko povezana sa oscilujućim dipolnim momentom molekula. U delu spektra ka većim talasnim brojevima zapaža se dublet koji je nastao usled kuplovanja trake  $\text{sp}^3$  hibridizovane ( $\text{C} - \text{H}$ ) veze, simetrične i asimetrične vibracije, na  $2910\text{ cm}^{-1}$  i  $2925\text{ cm}^{-1}$ . Pomenuti dublet može i da potiče od Fermijeve rezonancije pomenute trake i overtone makazaste vibracije  $\text{CH}_2$  grupe sa  $1460\text{ cm}^{-1}$  [68]. Antisimetrična istežuća  $\text{CH}_2$  traka, javlja se na  $2855\text{ cm}^{-1}$ . Pikovi koji su na  $1100\text{ cm}^{-1}$ ,  $1040\text{ cm}^{-1}$  i  $955\text{ cm}^{-1}$  potiču od vibracija ( $\text{C} - \text{O}$ ) veze, dok su svi ostali ispod  $900\text{ cm}^{-1}$  usled deformacionih ( $\text{C} - \text{H}$ ) vibracija [80].

Infracrveni spektri su osetljivi na konformaciju i pakovanje molekularnih lanaca, a ova osetljivost se dosta upotrebljava u korist karakterizacije semikristalnih polimera, prema stepenu kristalnosti. ( $\text{C} - \text{O}$ ) i ( $\text{C} - \text{C}$ ) veze karakteristične za kristalno stanje, apsorbuju na  $1360\text{ cm}^{-1}$  i  $1290\text{ cm}^{-1}$ , dok je

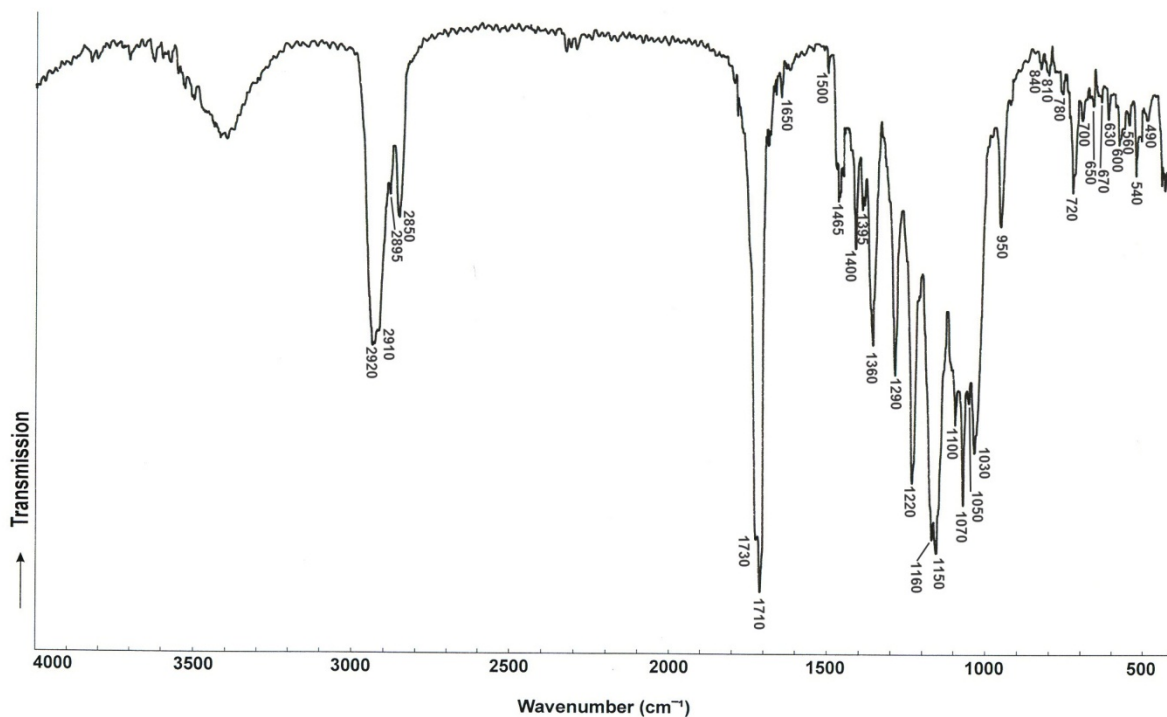


pomenuta traka na  $1160\text{ cm}^{-1}$  reprezentacija amorfno stanja [81]. Ovo nije začuđujuće s obzirom da je PCL polimer semi-kristalan.  $\text{CH}_2$  deformacione vibracije pokazuju maksimume na  $1460\text{ cm}^{-1}$ ,  $1410\text{ cm}^{-1}$  i  $1390\text{ cm}^{-1}$ . Široka oblast sa maksimumom na  $3425\text{ cm}^{-1}$  ukazuje na kombinaciju traka ( $\text{C} = \text{O}$ ) overtona i OH grupa vezanih vodoničnom vezom [72]. S obzirom da je traka dosta niskog intenziteta, može se reći da nije ostalo mnogo rezidualne vezane vode u uzorku.



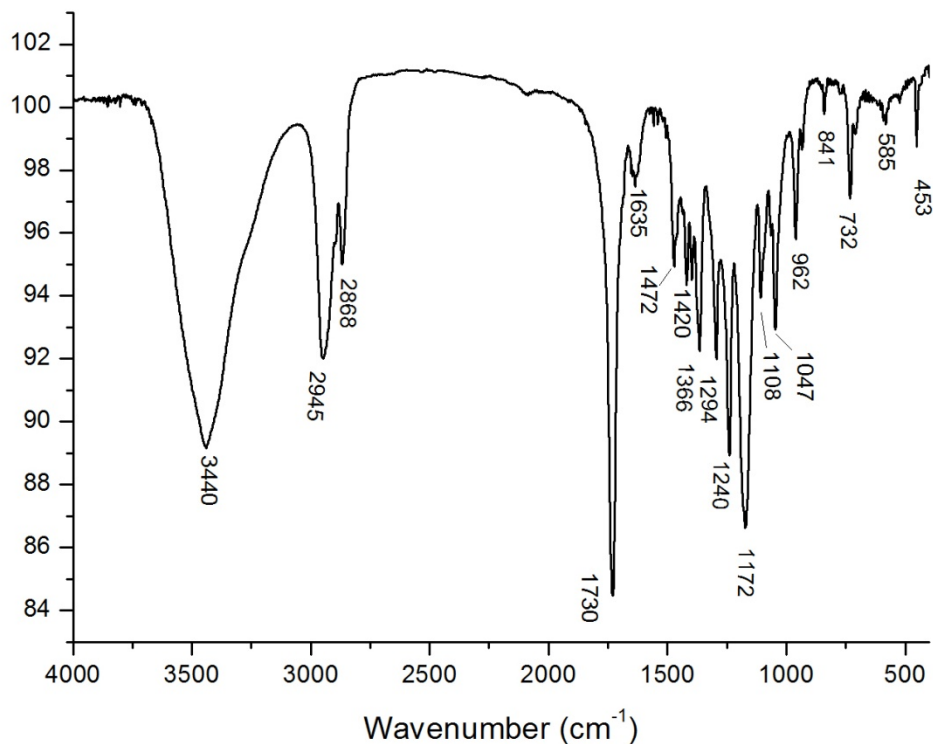
**SLIKA 4.1.2** FT-IR SPEKTAR PCL POLIMERA SA DODATKOM 1%-OG RASTVORA SAHAROZE TOKOM LIOFILIZACIJE

U spektru PCL čestica liofiliziranih sa dodatkom saharoze kao krioprotektanta (slika 4.1.2), uočava se isti trend traka kao i kod spektra čistog PCL polimera. Određeni maksimumi su pomereni na stranu manjih talasnih brojeva za približno  $10\text{ cm}^{-1}$ . Prvo što se uočava je veoma intenzivna traka valentne ( $\text{C} = \text{O}$ ) vibracije na  $1710\text{ cm}^{-1}$ . Valentne ( $\text{C} - \text{H}$ ) veze su i u ovom spektru prisutne na  $2925\text{ cm}^{-1}$ , dok je traka karakteristična za asimetrične valentne  $\text{CH}_2$  vibracije pomerena za  $5\text{ cm}^{-1}$ , na  $2850\text{ cm}^{-1}$ . I deformacione  $\text{CH}_2$  vibracije su pomerene na trake  $1460\text{ cm}^{-1}$ ,  $1410\text{ cm}^{-1}$  i  $1390\text{ cm}^{-1}$  [68]. Grupne vibracije ( $\text{O} = \text{C} - \text{O}$ ) su na talasnim brojevima  $1150\text{ cm}^{-1}$  i  $1210\text{ cm}^{-1}$  [78], a ( $\text{C} - \text{C}$ ) i ( $\text{C} - \text{O}$ ) trake karakteristične za kristalno stanje su za  $10\text{ cm}^{-1}$  na manjim maksimumima nego što je to slučaj kod čistog PCL. Intenzivnija traka ( $\text{C} - \text{O}$ ) veze je u ovom spektru na  $1010\text{ cm}^{-1}$  potiče od molekula saharoze [82]. Posmatrajući intenzitet trake u oblasti od  $3200\text{ cm}^{-1}$  do  $3600\text{ cm}^{-1}$ , može se zaključiti da je došlo do značajnijeg građenja vodoničnih veza između OH grupa saharoze i PCL polimera i/ili da ima veću količina rezidualne vode u uzorku.



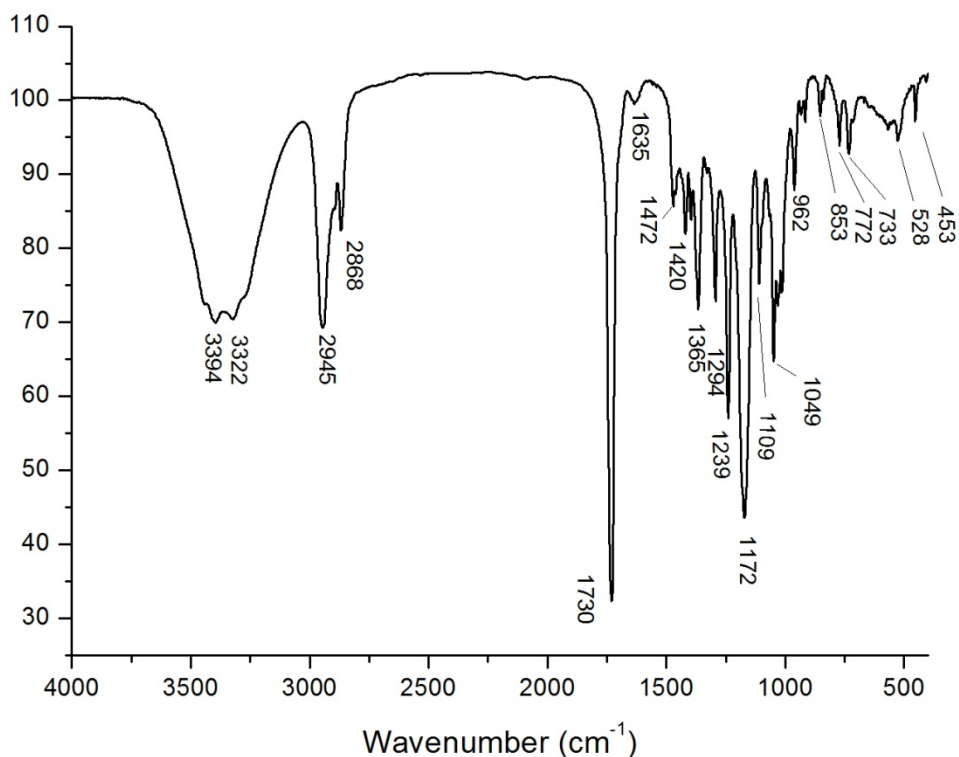
**SLIKA 4.1.3** FT-IR SPEKTAR PCL POLIMERA SA DODATKOM 1%-OG RASTVORA PGA TOKOM LIOFILIZACIJE

I u spektru na slici 4.1.3 (spektar PCL uzorka liofiliziranog sa 1% PGA), primećuje se najintenzivnija traka na  $1710\text{ cm}^{-1}$  i odmah uz nju, vibracija na  $1730\text{ cm}^{-1}$  [78]. Ove dve trake ukazuju na prisustvo oba polimera, PCL i PGA. Trake slabijeg intenziteta koje predstavljaju vibracije cele karboksilne grupe, kao celine ( $\text{O} = \text{C} - \text{O}$ ), nalaze se na nešto manjim talasnim brojevima u odnosu na one u spektru čistog PCL. U delu spektra ka većim talasnim brojevima zapaža se dublet koji nije znatno pomeren. Asimetrična istežuća  $\text{CH}_2$  traka, javlja se na  $2850\text{ cm}^{-1}$ , dok je deformaciona na  $1465\text{ cm}^{-1}$ ,  $1400\text{ cm}^{-1}$  i  $1395\text{ cm}^{-1}$ . ( $\text{C} - \text{O}$ ) i ( $\text{C} - \text{C}$ ) veze karakteristične za kristalno stanje u ovom spektru ostaju nepromenjene. Ni trake deformacionih ( $\text{C} - \text{H}$ ) vibracija ispod  $900\text{ cm}^{-1}$  nisu mnogo promenjene. Jedina uočljiva promena na spektru potiče od povećanja intenziteta traka zaslužnih za ( $\text{C} - \text{O}$ ) vibracije, na  $1100\text{ cm}^{-1}$  i  $1030\text{ cm}^{-1}$ , ali i nova traka na  $1070\text{ cm}^{-1}$  [83]. Uočava se povećanje intenziteta od  $1000\text{ cm}^{-1}$  do  $1150\text{ cm}^{-1}$ , što odgovara jakoj, karakterističnoj ( $\text{C} - \text{N}$ ) vibraciji od PGA polimera.



**SLIKA 4.1.4** FT-IR SPEKTAR PCL POLIMERA SA DODATKOM 1%-OG RASTVORA PVA TOKOM LIOFILIZACIJE

Na spektru liofiliziranih PCL čestica 1% poli(vinil alkoholom) (slika 4.1.4), uočava se ista struktura traka kao i u prethodnim spektrima. Međutim, postoje određene promene, a najviše u poziciji maksimuma. Istežuće vibracije (C = O) veze se nalaze na  $1730\text{ cm}^{-1}$ , i ta traka je najdominantnija u spektru [72].  $sp^3$  hibridizovana (C - H) veza koja vibrira istežući se, u ovom spektru pripada talasnom broju od  $2945\text{ cm}^{-1}$ , a u rezonanciji sa njom, na  $2868\text{ cm}^{-1}$  nalazi se asimetrično istežanje metilenske grupe [78]. Posmatrajući spektar ka manjim talasnim brojevima, zapažaju se trake na  $1472\text{ cm}^{-1}$  i  $1420\text{ cm}^{-1}$ , koje pripadaju deformacionim vibracijama pomenute grupe, dok je na  $1366\text{ cm}^{-1}$  i  $1294\text{ cm}^{-1}$  reprezentovana valentna vibracija (C - C) i (C - O) veza. Drugi maksimum po intenzitetu je na  $1172\text{ cm}^{-1}$ , koji se zajedno sa onim na  $1240\text{ cm}^{-1}$  pridodaje vibracijama cele estarske grupe. Preostale trake u spektru, na manjim talasnim brojevima i manjeg intenziteta, potiču od valentnih (C - O) vibracija ( $1108\text{ cm}^{-1}$ ,  $1047\text{ cm}^{-1}$  i  $962\text{ cm}^{-1}$ ) i od deformacionih (C - H) vibracija (na  $841\text{ cm}^{-1}$ ,  $732\text{ cm}^{-1}$ ,  $585\text{ cm}^{-1}$  i  $453\text{ cm}^{-1}$ ). Veći intenzitet trake na  $962\text{ cm}^{-1}$  dovodi se u vezu sa alkilnim grupama PVA polimera [84]. Intenzivna, i donekle oštra, traka na  $3440\text{ cm}^{-1}$  ukazuje na znatnu prisutnost vodoničnom vezom vezanih OH grupa. Građenje intramolekulskih i intermolekulskih vodoničnih veza se i očekuje između samih lanaca PVA, ali i sa PCL, zbog njegovih jakih hidrofilnih sila.

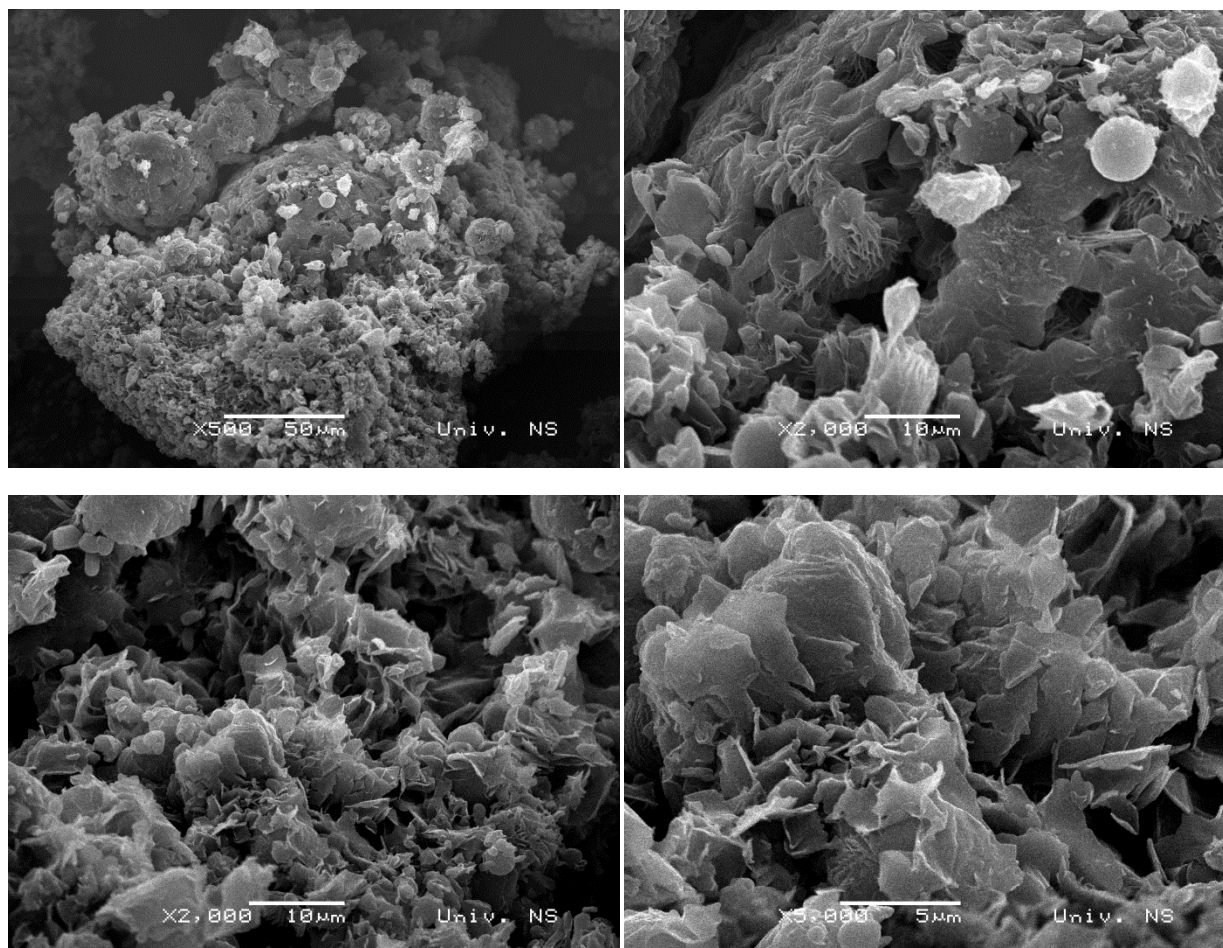


**SLIKA 4.1.5** FT-IR SPEKTAR PCL POLIMERA SA DODATKOM 1%-OG RASTVORA GLUKOZE TOKOM LIOFILIZACIJE

I spektar glukozom liofiliziranih čestica PCL (slika 4.1.5) ima isti trend traka, kao i prethodni. Primećuje se da su pozicije traka vibracija mnogo sličnije onima na spektru PVA. Istežuće vibracije (C = O) veze se takođe nalaze na  $1730 \text{ cm}^{-1}$  [72]. Istezanja metilenske grupe i  $\text{sp}^3$  hibridizovana (C - H) veza su na istim talasnim brojevima kao i kod prethodnog spektra. Posmatrajući spektar ka manjim talasnim brojevima, vibracije cele karboksilne grupe i valentne (C - O) vibracije na istim talasnim brojevima kao i kod uzorka sa PVA. Preostale trake u spektru, na manjim talasnim brojevima i manjeg intenziteta, potiču od deformacionih (C - H) vibracija (dublet sa  $853 \text{ cm}^{-1}$  i  $841 \text{ cm}^{-1}$ ,  $772 \text{ cm}^{-1}$ ,  $733 \text{ cm}^{-1}$ ,  $528 \text{ cm}^{-1}$  i  $453 \text{ cm}^{-1}$ ). Traka na  $772 \text{ cm}^{-1}$  dovodi se u vezu sa (C - C - O + C - C - H) vibracijama glukoze [85]. Takođe, tipičan za glukozu jeste i triplet -  $1048 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1032 \text{ cm}^{-1}$  i  $1015 \text{ cm}^{-1}$ . Uočljiva je i široka traka sa dva maksimuma na  $3394 \text{ cm}^{-1}$  i  $3322 \text{ cm}^{-1}$ , koja se dovodi u vezu sa građenjem vodoničnih veza i OH grupama.

## 4.2 SEM ANALIZA

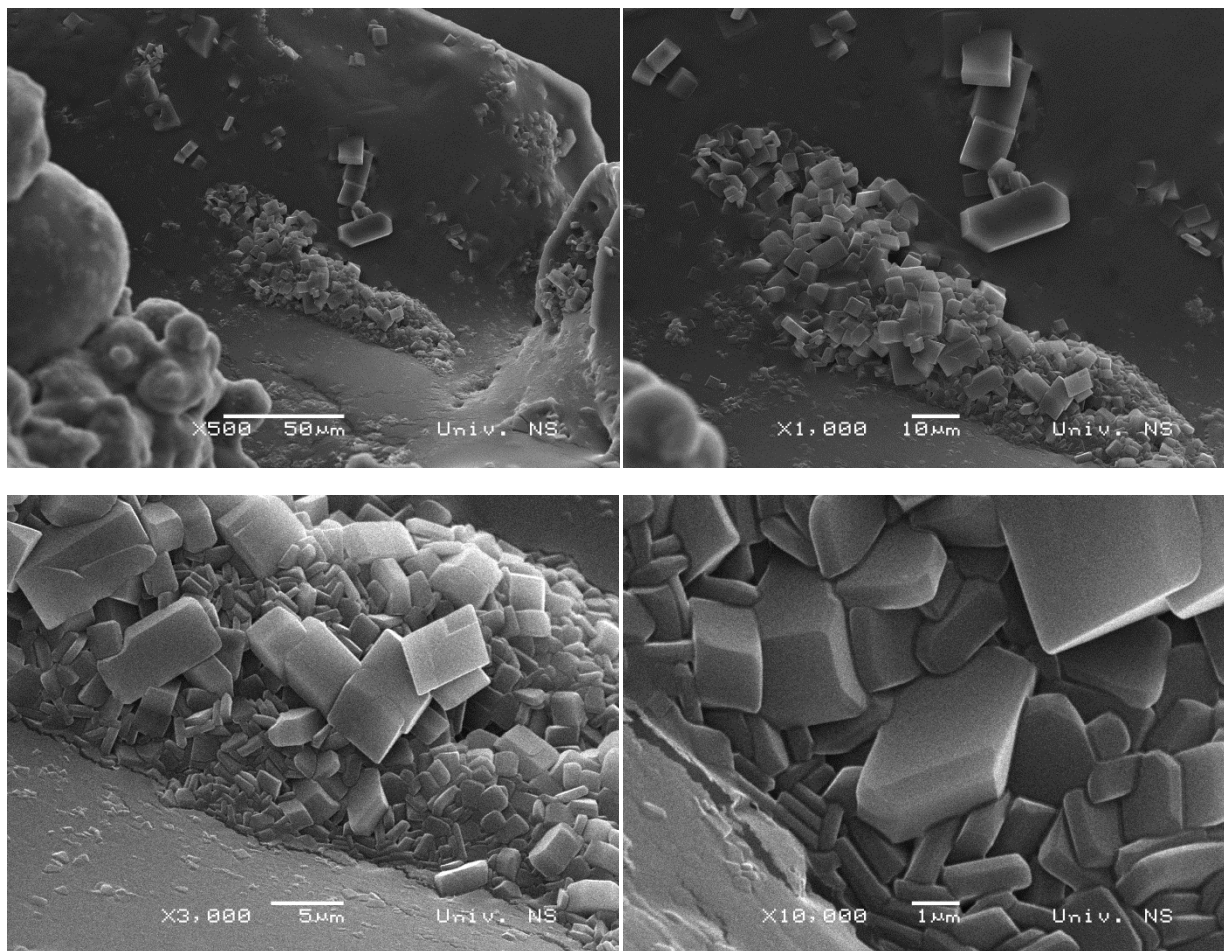
Skenirajućom elektronskom mikroskopijom ispitane su morfološke karakteristike svih uzoraka.



**SLIKA 4.2.1 SEM SLIKE PCL ČESTICA LIOFILIZIRANIH BEZ DODATKA KRIOPROTEKTANTA**

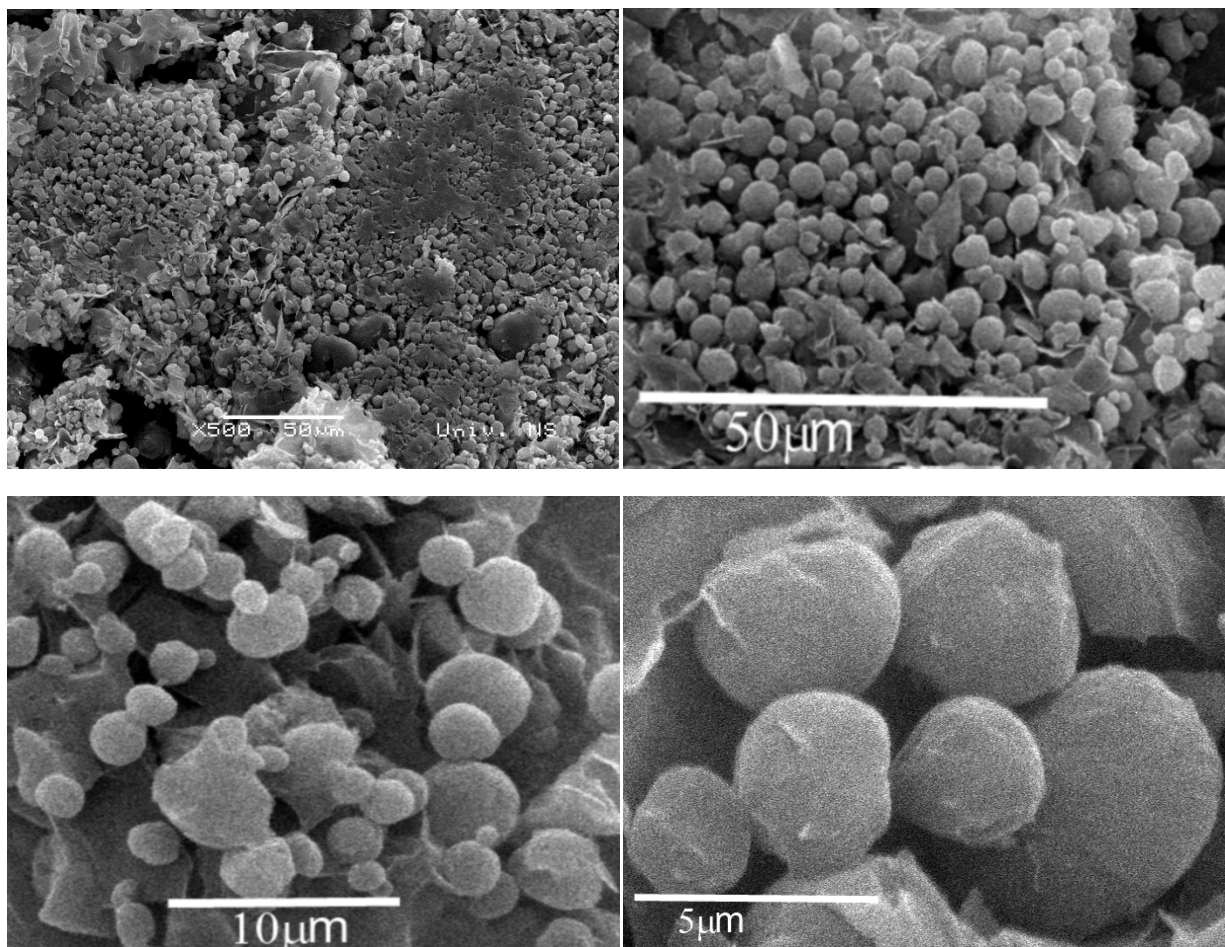
Sa SEM slika PCL polimera liofiliziranog bez dodatka krioprotektanta (slika 4.2.1), može se primetiti da su nakon liofilizacije, čestice uzorka izuzetno aglomerisane. Iz posmatranja ovih mikrografija, postaje jasna potreba za korišćenjem krioprotektanta radi očuvanja integriteta čestica. Čestice uzorka PCL-a dobijene bez korišćenja krioprotektanata tokom liofilizacije, imaju veoma nepravilan oblik, ali se u uzorku mogu uočiti sporadične sfere.





**SLIKA 4.2.2 SEM SLIKE PCL ČESTICA LIOFILIZIRANIH SA DODATKOM 1%-OG RASTVORA SAHAROZE**

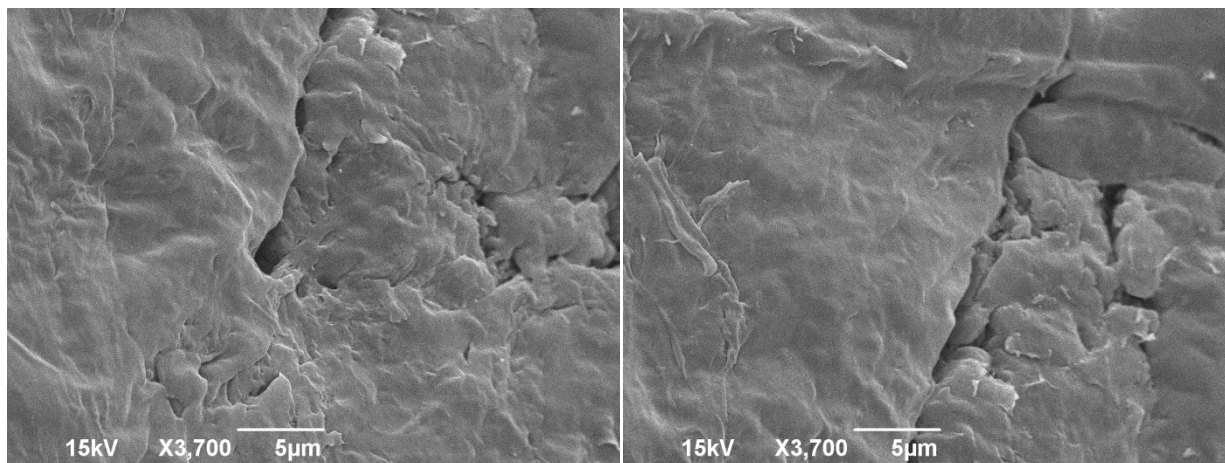
Sa slike 4.2.2 može se videti da se kod uzoraka PCL čestica liofiliziranih sa dodatkom 1%-og rastvora saharoze uočavaju čestice kubnih oblika, kao i da su prilično aglomerisane.



**SLIKA 4.2.3 SEM SLIKE PCL ČESTICA LIOFILIZIRANIH SA DODATKOM 1%-OG RASTVORA PGA**

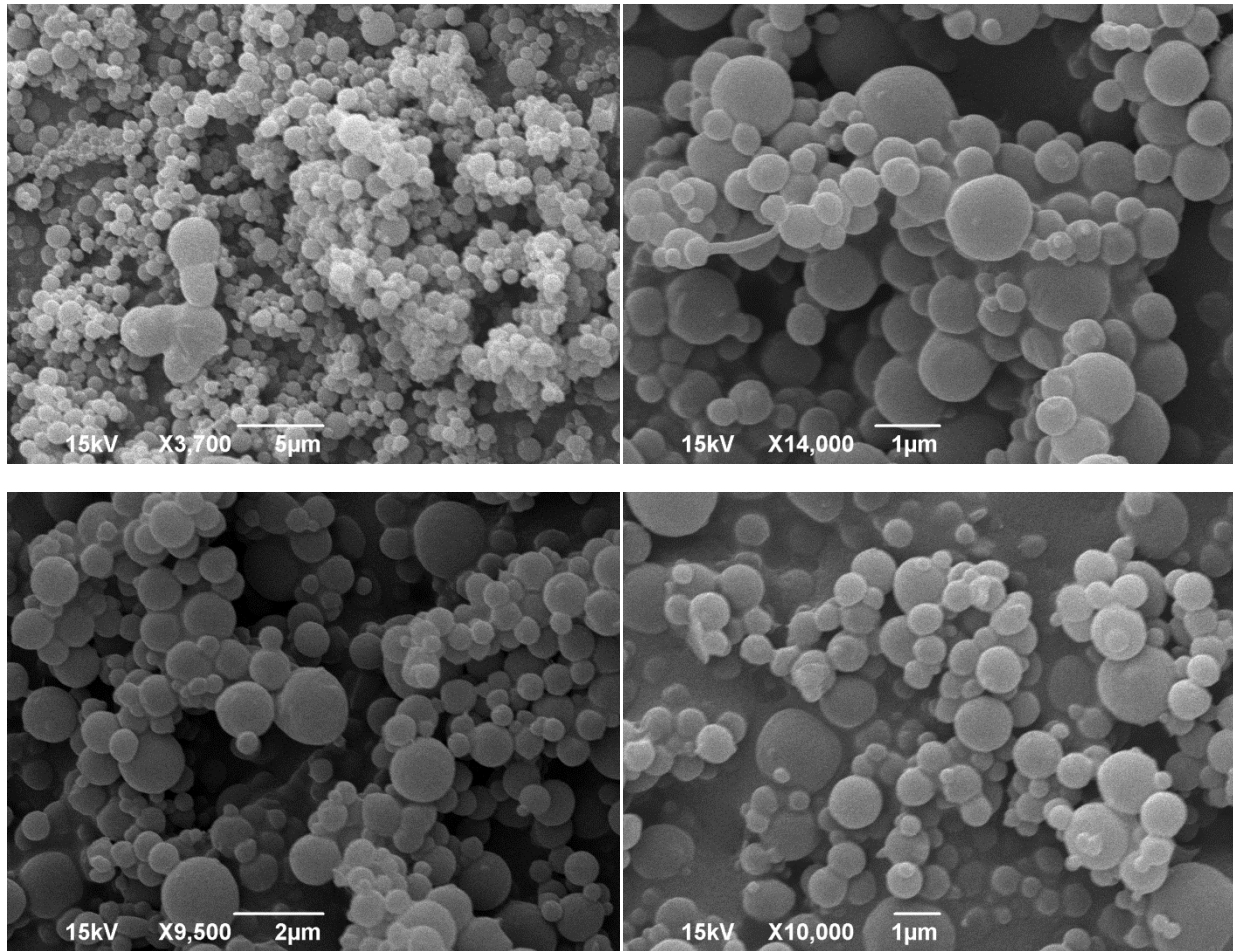
U uzorku PCL-a dobijenog sa 1% PGA kao krioprotektantom (slika 4.2.3) dominiraju sferoidne čestice koje su značajno manje aglomerisane nego što je to bio slučaj kod uzoraka PCL-a bez krioprotektanta ili dobijenog sa 1% saharozom kao krioprotektantom.





**SLIKA 4.2.4** SEM SLIKE PCL ČESTICA LIOFILIZIRANIH SA DODATKOM 1%-OG RASTVORA PVA

Poli(vinil alkohol) (PVA) je jedan od najčešće korišćenih emulgatora u formulacijama poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA) čestica, iz razloga što se dobijaju relativno uniformne i dovoljno male čestice. U mnogim istraživanjima autori navode da PVA ostaje na površini čestica čak i nakon nekoliko procesa spiranja. Pokazano je da se PVA adsorbuje na površinu nanokapsula sintetisanih od PCL polimera [18]. Ovaj stabilizator se dosta dobro vezuje za površinu i formira sloj presvučen preko čestica. U slučaju našeg uzorka PCL-a dobijenog liofilizacijom i uz korišćenje 1%-og rastvora PVA (slika 4.2.4), može se videti da je uzorak u potpunosti aglomerisan i da je u obliku filma.

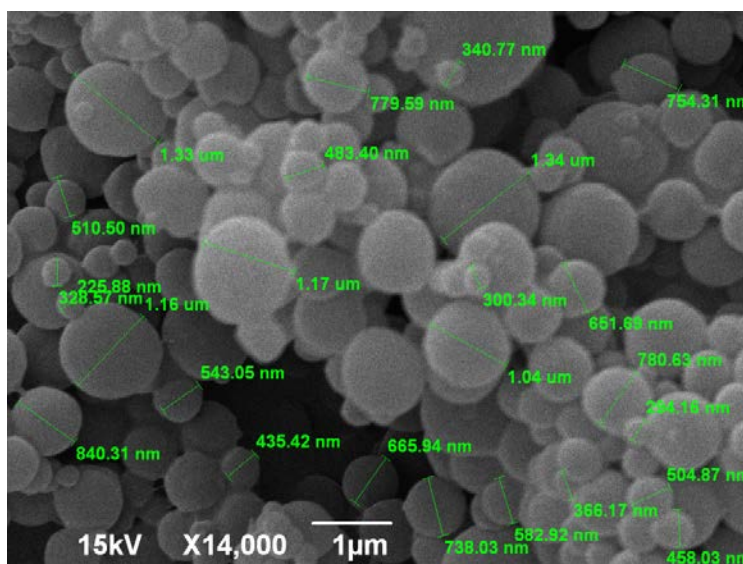


**SLIKA 4.2.5 SEM SLIKE PCL ČESTICA LIOFILIZIRANIH SA DODATKOM 1%-OG RASTVORA GLUKOZE**

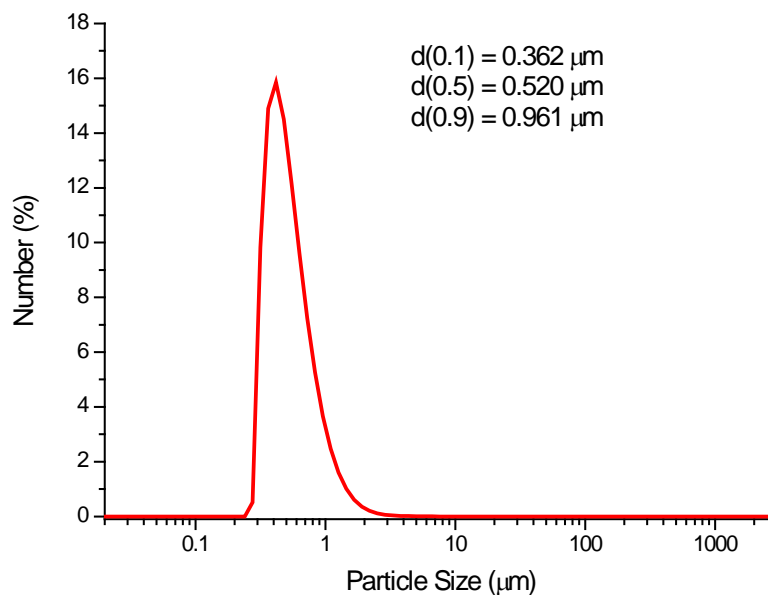
Sa SEM snimaka praha PCL čestica liofiliziranih sa dodatkom 1%-og rastvora glukoze (slika 4.2.5), vidimo da su čestice znatno uniformnije, sfernog oblika kao i da dominiraju sitnije čestice, za razliku od čestica uzoraka prethodnih serija. Čestice su veličina oko i ispod jednog mikrona, glatkih površina i prilično neaglomerisane.

### 4.3 RASPODELA VELIČINA ČESTICA

Sa SEM fotografija uzorka PCL-a dobijenog sa 1% glukozom kao krioprotektantom (slika 4.3.1), primećuje se da ovaj uzorak ima čestice sfernog oblika, da ima najveću uniformnost i nizak stepen aglomeracije. Veličine čestica su na submikronskoj skali pa je ovaj uzorak dalje karakterisan i metodom DLS-a, kako bi se odredila i raspodela veličina čestica (slika 4.3.2).



SLIKA 4.3.1 SEM SLIKA PCL ČESTICA LIOFILIZIRANIH SA DODATKOM 1%-OG RASTVORA GLUKOZE



SLIKA 4.3.2 RASPODELA VELIČINA PCL ČESTICA LIOFILIZIRANIH SA DODATKOM 1%-OG RASTVORA GLUKOZE

<b>Particle Name:</b> PCL	<b>Accessory Name:</b> Hydro 2000 $\mu$ P (A)	<b>Analysis model:</b> General purpose	<b>Sensitivity:</b> Enhanced
<b>Particle RI:</b> 1.467	<b>Absorption:</b> 0	<b>Size range:</b> 0.020 to 2000.000 $\mu$ m	<b>Obscuration:</b> 2.84 %
<b>Dispersant Name:</b> Propan-2-ol	<b>Dispersant RI:</b> 1.390	<b>Weighted Residual:</b> 1.074 %	<b>Result Emulation:</b> Off
<b>Concentration:</b> 0.0049 %Vol	<b>Span :</b> 1.152	<b>Uniformity:</b> 0.374	<b>Result units:</b> Number
<b>Specific Surface Area:</b> 5.12 $m^2/g$	<b>Surface Weighted Mean D[3,2]:</b> 1.171 $\mu$ m	<b>Vol. Weighted Mean D[4,3]:</b> 2.145 $\mu$ m	

Size ( $\mu$ m)	Number In %	Size ( $\mu$ m)	Number In %	Size ( $\mu$ m)	Number In %	Size ( $\mu$ m)	Number In %	Size ( $\mu$ m)	Number In %	Size ( $\mu$ m)	Number In %
0.010	0.00	0.105	0.00	1.096	2.47	11.482	0.00	120.226	0.00	1258.925	0.00
0.011	0.00	0.120	0.00	1.259	1.60	13.183	0.00	138.038	0.00	1445.440	0.00
0.013	0.00	0.138	0.00	1.445	1.01	15.136	0.00	158.489	0.00	1659.587	0.00
0.015	0.00	0.158	0.00	1.660	0.61	17.378	0.00	181.970	0.00	1905.461	0.00
0.017	0.00	0.182	0.00	1.905	0.36	19.953	0.00	208.930	0.00	2187.762	0.00
0.020	0.00	0.209	0.00	2.188	0.20	22.909	0.00	239.883	0.00	2511.886	0.00
0.023	0.00	0.240	0.00	2.512	0.11	26.303	0.00	275.423	0.00	2884.032	0.00
0.026	0.00	0.275	0.00	2.884	0.06	30.200	0.00	316.228	0.00	3311.311	0.00
0.030	0.00	0.316	0.51	3.311	0.06	34.674	0.00	363.078	0.00	3801.894	0.00
0.035	0.00	0.363	9.82	3.802	0.04	39.811	0.00	416.869	0.00	4365.158	0.00
0.040	0.00	0.417	14.89	4.365	0.02	45.709	0.00	478.630	0.00	5011.872	0.00
0.046	0.00	0.479	15.85	5.012	0.01	52.481	0.00	549.541	0.00	5754.399	0.00
0.052	0.00	0.550	14.50	5.754	0.01	60.256	0.00	630.967	0.00	6606.934	0.00
0.060	0.00	0.631	12.14	6.607	0.00	69.183	0.00	724.436	0.00	7585.776	0.00
0.069	0.00	0.724	9.61	7.586	0.01	79.433	0.00	831.764	0.00	8709.636	0.00
0.079	0.00	0.832	7.24	8.710	0.00	91.201	0.00	954.993	0.00	10000.000	0.00
0.091	0.00	0.955	5.25	10.000	0.00	104.713	0.00	1096.478	0.00		
0.105	0.00	1.096	3.66	11.482	0.00	120.226	0.00	1258.925	0.00		

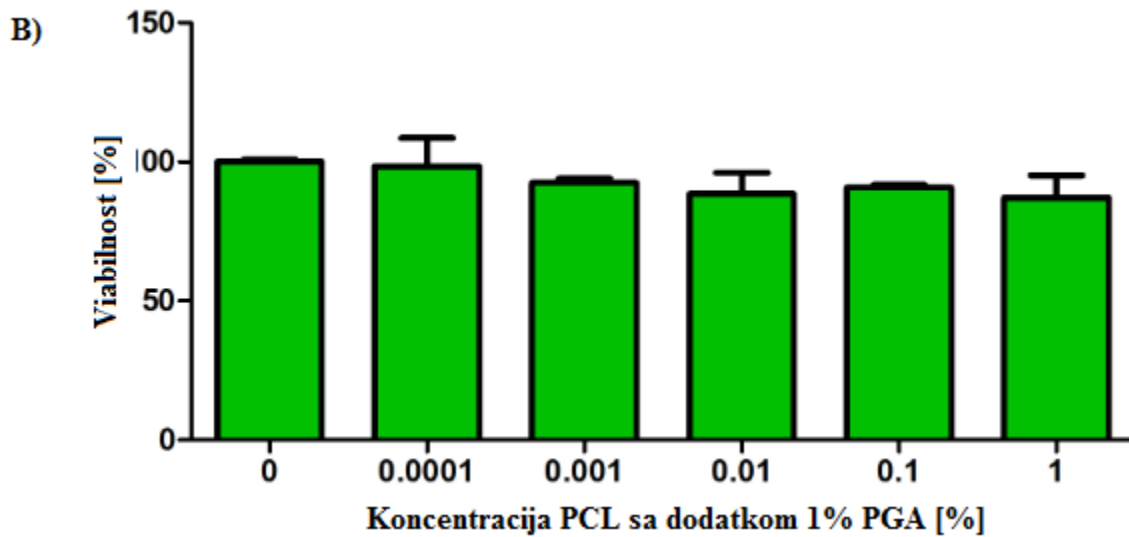
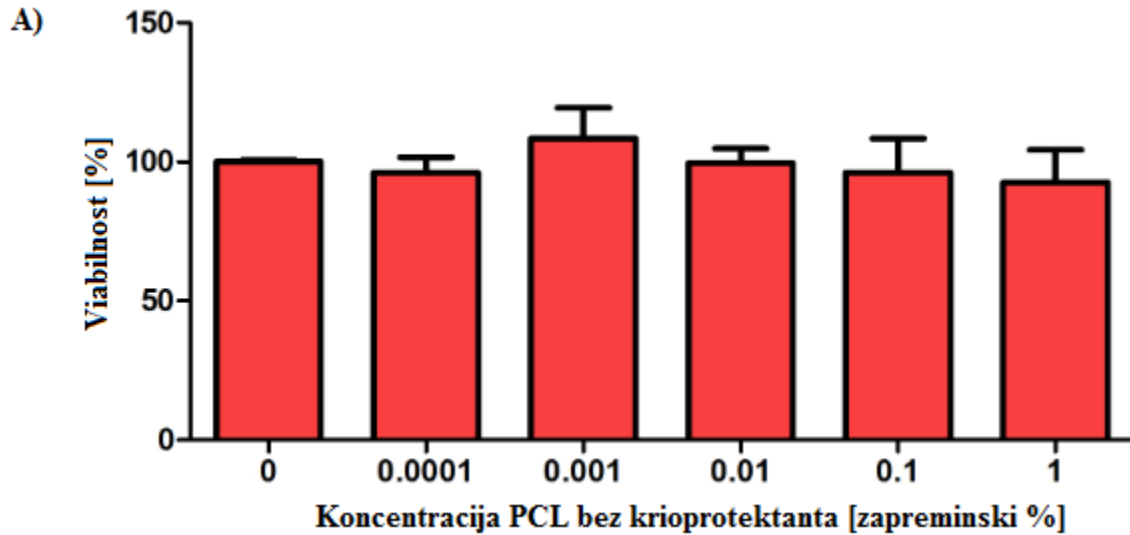
**SLIKA 4.3.3** PARAMETRI MERENJA RASPODELE VELIČINA ČESTICA LIOFILIZIRANIH SA GLUKOZOM

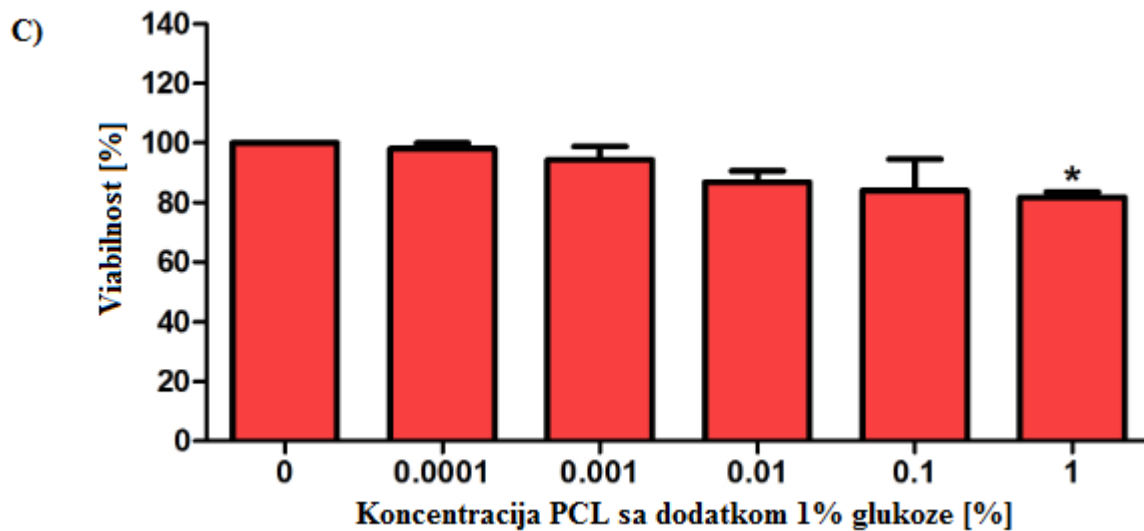
Rezultati merenja raspodele veličina PCL čestica liofiliziranih 1%-im rastvorom glukoze (slika 4.3.2) pokazuju da: 10% čestica ima prečnik manji od 362 nm, 50% čestica ima prečnik manji od 520 nm, dok 90% čestica ima prečnik manji od 961 nm.

Sa slike 4.3.3 se vide različiti parametri merenja, kao i tabelarno predstavljena raspodela veličina po broju čestica. Potrebno je napomenuti da tačnost merenja zavisi od stepena disperzije. Parametar fita, od 1.074 % ukazuje na dobro slaganje proračunatih podataka u odnosu na eksperimentalne. Zapreminski srednji prečnik, prema proračunima, iznosi 2.145  $\mu$ m, dok je površinski 1.171  $\mu$ m. Širina raspodele je 1.152, dok je Lamber-Berovim zakonom izračunata koncentracija od  $4.9 \cdot 10^{-3}$  % (zapreminskih). Uniformnost raspodele iznosi 0.347 i mera je apsolutnog odstupanja od sredine raspodele. Izračunata je i specifična površina čestica, što je ukupna površina čestica podeljena ukupnom masom čestica i ona iznosi  $5.12 \frac{m^2}{g}$ .

## 4.4 MTT TEST

Citotoksičnost uzoraka je ispitana MTT testom, izlaganjem HepG2 ćelija različitim koncentracijama uzoraka u periodu od 24h. Ispitane su zapreminske koncentracije od 0, 0.0001, 0.001, 0.1 i 1 % uzorka PCL liofiliziranog bez krioprotektanta, PCL liofiliziranog sa 1% rastvorom PGA i onog liofiliziranog sa 1% rastvorom glukoze.



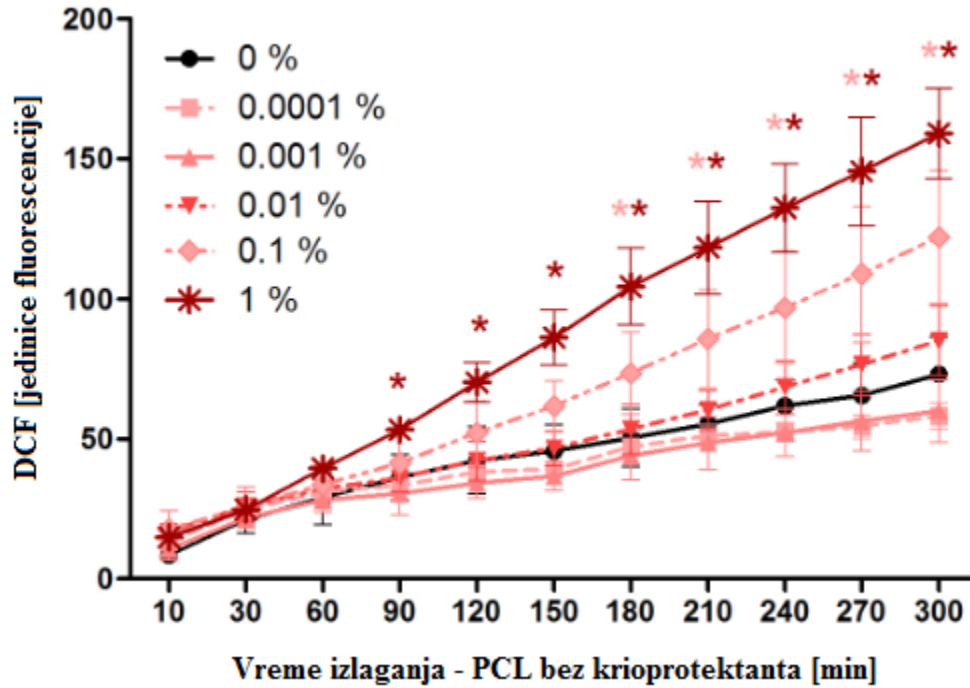


**SLIKA 4.4.1** TEST VIABILNOSTI HEPG2 ĆELIJA. ĆELIJE SU 24h TRETIRANE PCL POLIMEROM SUŠENIM BEZ DODATKA KRIOPROTEKTANTA (A), PCL SUŠENIM SA 1% PGA (B) I PCL SUŠENIM SA 1% GLUKOZE (C). PODACI U GRAFICIMA SU USREDNJENA VREDNOST TRI NEZAVISNA EKSPERIMENTA (SVAKI SA PET REPLIKA)  $\pm$  S.D. (\*) OZNAČAVA ZNAČAJNIJU RAZLIKU IZMEĐU KONTROLNIH I TRETIRANIH ĆELIJA.

Uzorci PCL bez krioprotektanta i sa 1% PGA nisu značajno uticali na sposobnost preživljavanja HepG2 ćelija (slike A i B), dok su PCL čestice sušene sa dodatkom glukoze izazvale blag pad broja preživelih ćelija, ali samo pri najvećoj koncentraciji, od 1% (slika C).

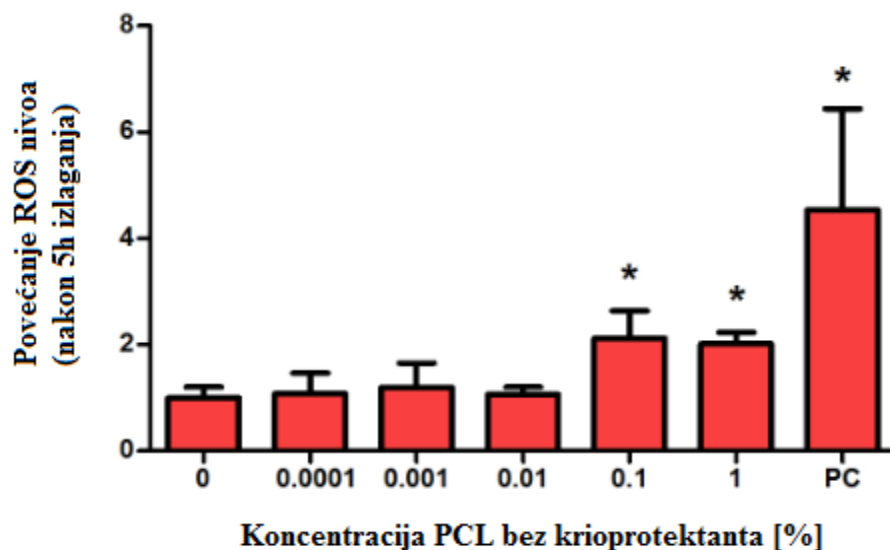
## 4.5 DCFH-DA TEST

HepG2 ćelije su tretirane sa DCFH-DA ( $20 \mu\text{M}$ ) na 30 minuta, isprane i potom izložene različitim koncentracijama PCL uzoraka (PCL bez krioprotektanta, PCL liofiliziran sa PGA ili glukozom) ili sa  $0.5 \text{ mM}$  t-BOOH, kao pozitivna kontrola (PC). Intenzitet fluorescencije DCF, meren je narednih 5h inkubacije, u intervalu od 30 minuta.

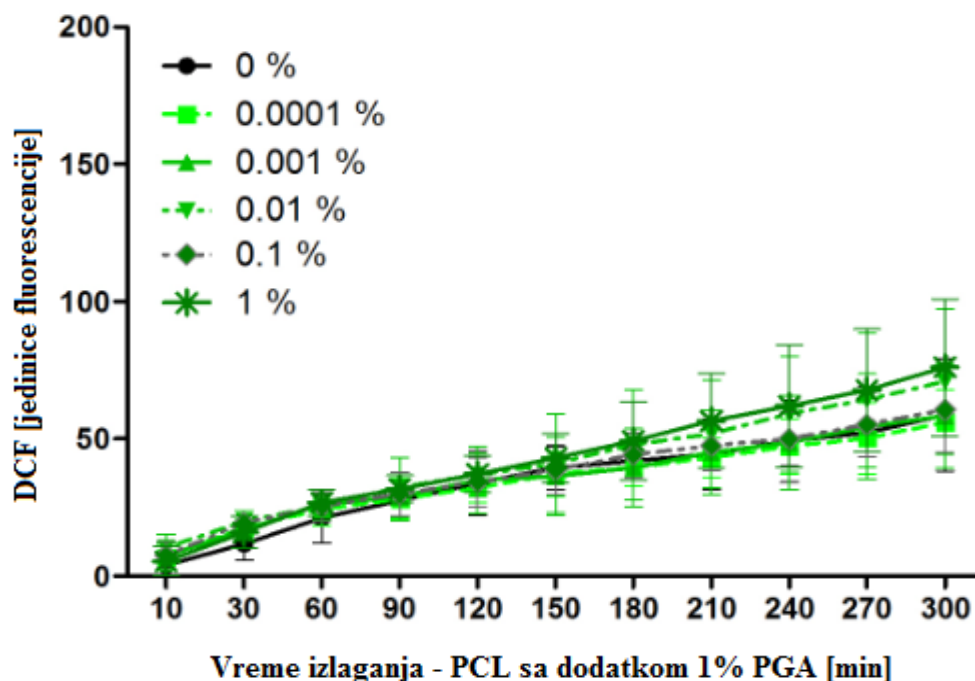


**SLIKA 4.5.1** PCL-INDUKOVANO (PCL BEZ DODATKA KRIOPROTEKTANTA) STVARANJE ROS VRSTA U HepG2 ĆELIJAMA. ĆELIJE SU TRETIRANE  $20 \mu\text{M}$  DCFH-DA 30 MINUTA, ISPRANE I IZLOŽENE RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA (0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 i 1 %) ILI  $0.5 \text{ mM}$  t-BOOH, KAO POZITIVNA KONTROLA (PC). SLIKA PREDSTAVLJA KINETIKU OBRAZOVANJA ROS TOKOM IZLAGANJA OD 5h, SVAKA TAČKA PREDSTAVLJA USREDNJENU VREDNOST PET PONAVLJANJA ( $\pm\text{SD}$ ) REPREZENTATIVNIH EKSPERIMENATA. (\*) OZNAČAVA ZNAČAJNIJU RAZLIKU IZMEĐU KONTROLNIH I TRETIRANIH ĆELIJA.

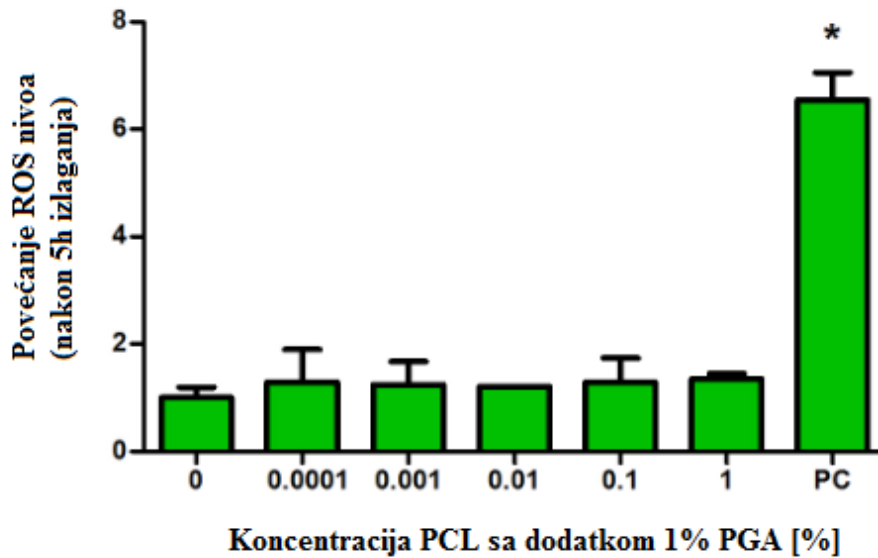




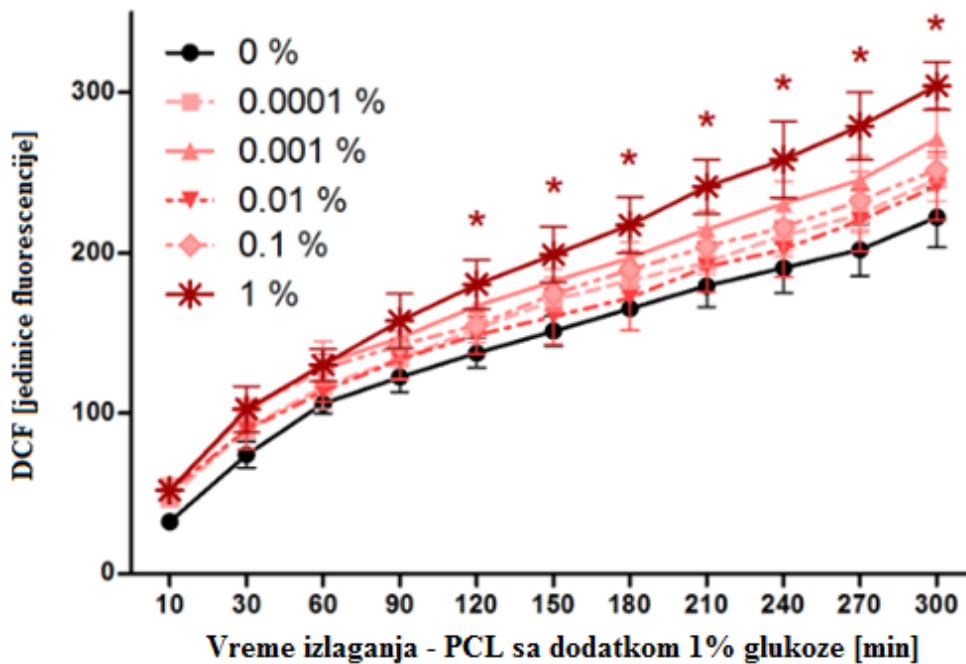
**SLIKA 4.5.2** PCL-INDUKOVANO (PCL BEZ KRIOPROTEKTANTA) STVARANJE ROS VRSTA U HepG2 ĆELIJAMA. GRAFIK PREDSTAVLJA KOLIKO JE PUTA POVEĆAN NIVO ROS VRSTA U TRETIRANIM ĆELIJAMA, U ODNOSU NA POZITIVNU KONTROLU, NAKON 5h. PRI SVAKOJ KONCENTRACIJI (I KONTROLI), RAĐENA SU TRI EKSPERIMENTA I SREDNJA VREDNOST JE PREDSTAVLJENA NA GRAFIKU ( $\pm$ SD).



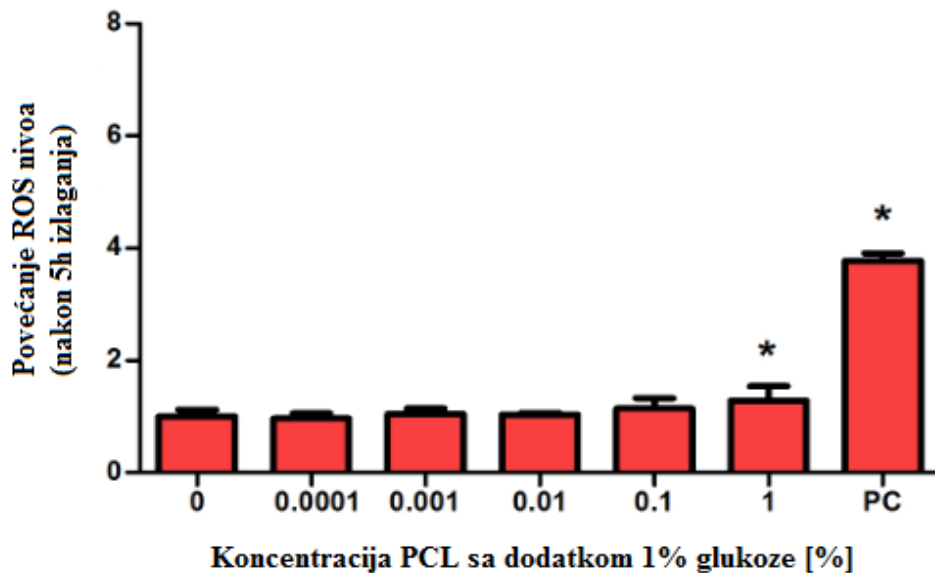
**SLIKA 4.5.3** PCL-INDUKOVANO (PCL BEZ SA 1% PGA) STVARANJE ROS VRSTA U HepG2 ĆELIJAMA. KINETIKA OBRAZOVANJA ROS TOKOM IZLAGANJA OD 5h, SVAKA TAČKA PREDSTAVLJA USREDNJENU VREDNOST PET PONAVLJANJA ( $\pm$ SD) REPREZENTATIVNIH EKSPERIMENTA. (\*) OZNAČAVA ZNAČAJNIJU RAZLIKU IZMEĐU KONTROLNIH I TRETIRANIH ĆELIJA.



**SLIKA 4.5.4** PCL-INDUKOVANO (PCL SA DODATKOM 1% PGA) STVARANJE ROS VRSTA U HepG2 ČELIJAMA. GRAFIK PREDSTAVLJA KOLIKO JE PUTA POVEĆAN NIVO ROS VRSTA U TRETIRANIM ČELIJAMA, U ODNOSU NA POZITIVNU KONTROLU, NAKON 5h. PRI SVAKOJ KONCENTRACIJI (I KONTROLI), RAĐENA SU TRI EKSPERIMENTA I SREDNJA VREDNOST JE PREDSTAVLJENA NA GRAFIKU ( $\pm$ SD).



**SLIKA 4.5.5** PCL-INDUKOVANO (PCL SA DODATKOM 1% GLUKOZE) STVARANJE ROS VRSTA U HEPG2 ČELIJAMA. KINETIKA OBRAZOVANJA ROS TOKOM IZLAGANJA OD 5h, SVAKA TAČKA PREDSTAVLJA USREDNJENU VREDNOST PET PONAVLJANJA ( $\pm$ SD) REPREZENTATIVNIH EKSPERIMENTA. (\*) OZNAČAVA ZNAČAJNIJU RAZLIKU IZMEĐU KONTROLNIH I TRETIRANIH ČELIJA.



**SLIKA 4.5.6** PCL-INDUKOVANO (PCL SA DODATKOM 1% PGA) STVARANJE ROS VRSTA U HepG2 ČELIJAMA. GRAFIK PREDSTAVLJA KOLIKO JE PUTA POVEĆAN NIVO ROS VRSTA U TRETIRANIM ČELIJAMA, U ODNOSU NA POZITIVNU KONTROLU, NAKON 5h. PRI SVAKOJ KONCENTRACIJI (I KONTROLI), RAĐENA SU TRI EKSPERIMENTA I SREDNJA VREDNOST JE PREDSTAVLJENA NA GRAFIKU ( $\pm$ SD).

Koristeći se fluorescentnom probom i protočnom citometrijom, uočava se da je uzorak PCL čestica liofiliziranih bez dodatka krioprotektanta indukovao vremenski zavisno formiranje ROS vrsta u upotrebljenoj ćelijskoj kulturi. Pri koncentracijama od 0.1% i 1%, izazvao je znatno povišenje intenziteta fluorescencije, koji je nakon pet časova tretiranja bio dva puta veći od onog u kontrolnim ćelijama. Uzorak PCL liofilizovan sa PGA, pak, nije značajno uticao na intenzitet DCF fluorescencije. Uzorak liofilizovan sa glukozom pokazuje vremenski zavisni rast nivoa reaktivnih kiseoničnih vrsta, ali je intenzitet fluorescencije manje od dva puta povećan pri najvećoj koncentraciji - od 1% uzorka.

# 5 DISKUSIJA

---



Osnova odrađenih eksperimenata je fizičko-hemijska metoda dobijanja mikro- i nanočestica PCL polimera. Metoda se zasniva na difuziji rastvarača (PCL se potpuno rastvara u hloroformu) u nerastvarač u višku (PCL je nerastvoran u alkoholima). Prisustvom etanola, kao nerastvarača, ubrzava se precipitacija polimera i povećava se fazna separacija polimera tokom difuzije hloroforma. Visok viskozitet etanola ima pozitivan uticaj na formiranje čestica PCL. Isparavanje rastvarača i parcijalno smrzavanje uzoraka, pripremna je faza za liofilizaciju. Pri liofilizaciji čestica, samo se tri parametra procesa mogu kontrolisati: temperatura polica i kondenzatora, pritisak komore i vreme. Parametar od najvećeg značaja, temperatura produkta, ne može se direktno kontrolisati. Pri koraku zamrzavanja, u sistemu je održana temperatura oko  $-55^{\circ}\text{C}$ , što je iznad temperature staklastog prelaza PCL polimera, a ispod staklastog prelaza krioprotektanta. Korak primarnog sušenja je održan na povišenoj temperaturi od  $-30^{\circ}\text{C}$ , radi snabdevanja dovoljnom količinom energije za početak procesa sublimacije. Bitno je napomenuti da je pokretačka sila liofilizacije razlika u parcijalnim pritiscima vode na površini sublimujućeg leda ( $p_i$ ) i kondenzatora ( $p_c$ ), prateći:  $\log \frac{p_c}{p_i}$ . Dovođenjem vakuuma u sistem utiče samo na brzinu sušenja, ali ne predstavlja pokretačku silu.

Više puta je pomenuto da proces liofilizacije može dovesti do modifikacije strukture materije koja se suši. Na SEM slici 4.2.1, primećuje se potpuno nepravilna morfologija čestica PCL, kao produkta liofilizacije bez dodatka protektanta. Dodatkom saharoze, poli(glutaminske kiseline), poli(vinil alkohola) ili glukoze kao krioprotektanta, dobijeni su prahovi PCL-a različitih morfoloških karakteristika (slike 4.2.2, 4.2.3, 4.2.4 i 4.2.5).

Tri generalna, opšte prihvaćena mehanizma u liofilizaciji su: mehanizam prioritetne ekskluzije, mehanizam vitrifikacije i mehanizam supstitucije vode. Mehanizam prioritetne ekskluzije se objašnjava time da dodatak krioprotektivnih agenasa izaziva neregularno pakovanje molekula u veliku prostornu masu, što dovodi do smanjenja gustine u poređenju sa uređenijom masom kristala leda. Ovo čini da se pomenuta masa ponaša više kao tečnost i pruža bolju mehaničku zaštitu čestica. Vitrifikacija nije potrebna za ovaj efekat, ali je za hipotezu mehanizma vitrifikacije od ključnog značaja. Ovom hipotezom, imobilizacija čestica u staklasti matriks je dovoljna za sprečavanje aglomeracije. Nasuprot tome, rezultati u ovom radu ukazuju da je došlo do vitrifikacije, ali ne i potpune protekcije. Ovi rezultati ne isključuju potpuno ulogu i doprinos vitrifikacije u krioprotekciji čestica, već ukazuju da se odvijaju i drugi izvesni procesi. Treća pretpostavka kaže da je očuvanje integriteta polimernih lanaca rezultat obrazovanja vodoničnih veza između krioprotektanta i polimera. Jedna od standardnih metoda za istraživanje prisustva vodoničnih veza u čvrstom stanju je i metoda infracrvene spektroskopije. Dalje opisana obrazloženja FT-IR spektara, moguća su usled činjenice da formiranje vodonične veze utiče na vibracione modove grupa na više načina.

## 5.1 DISKUSIJA KARAKTERIZACIJE UZORAKA

---

### 5.1.1 SAHAROZA KAO KRIOPROTEKTANT

Stepen kristalčnosti polimera zavisi od brzine hlađenja tokom solidifikacije, kao i od konfiguracije lanaca polimera. Nukleacija započinje na malim, nanometarskim mestima, gde se kao rezultat termalnog kretanja, neki lanci ili njihovi segmenti orijentišu paralelno. Ovakve klice mogu ili da se distanciraju, ako termalno kretanje naruši molekulsku uređenost, ili da rastu dalje, ako klica dostigne određenu kritičnu vrednost veličine. Pored termalnih mehanizama, na nukleaciju dosta utiče i prisustvo nečistoća, boja ili nekih drugih aditiva polimeru. Ovakva nukleacija se naziva

heterogena i taj efekat je slabo objašnjen i nedovoljno istražen [86]. Isti aditivi mogu da promovišu nukleaciju u jednom polimeru, dok se u drugom ništa ne dešava. Mnogi od takvih aditiva su organskog porekla i kristalni su na temperaturi solidifikacije polimera. U slučaju liofilizovanog PCL polimera sa dodatkom saharoze, postoji mogućnost da je saharoza izazvala nukleaciju i rast kristala polimera (koji se vide na SEM slikama 4.2.2). Međutim, uprkos predikcijama klasične fazne ravnoteže, saharoza ne precipituje kao kristalna faza, kada se njen rastvor ohladi do eutektičke tačke, već rastvor postaje prezasićen [87]. Važno je napomenuti da je prezasićen rastvor termodinamički nestabilan, pa se oslanja na veoma visok stepen viskoznosti. Moguće je da je na nukleaciju i rast kristalita polimera, saharoza uticala preko elektrostatičkog preklapanja, sternih efekata i strukturnog prepoznavanja, viskoznim dvoprstenastim molekulima [88]. Sterni efekti nastaju usled činjenice da svaki atom unutar molekula zauzima određeni prostor. Ako su atomi previše blizu, dolazi do određenih gubitaka u energiji usled preklapanja elektronskih oblaka (Paulijevo ili Bornovo odbijanje) i to može imati uticaja na oblik molekula (konformaciju) i reaktivnost. Sterno ometanje ili sterna otpor se javlja kad veličina grupa unutar molekula sprečava hemijsku reakciju koja se odvija sa srodnim molekulima manjih grupa ili ograničava torzione uglove veza. Sterno ometanje proizvodi dupli prsten strukture molekula saharoze.

Snižena temperatura favorizuje nukleaciju i manja termalna energija segmenata lanaca polimera održava klice i sprečava njihovo nestajanje, pa je kao krajnji rezultat povećanje broja klica i povećanje ukupne brzine kristalizacije. Na progresivno sniženim temperaturama, međutim, ukupna energija polimernog sistema teži brzom padu, tako da segmenti uglavnom gube mobilnost, pa je stoga depozicija na oformljenu klicu dosta više ometena, rezultujući u oštrom padu brzine kristalizacije.

Rastom kristala iz razblaženih rastvora, dobijaju se pravilno oblikovani kristali lamelnog, slojevitog oblika, debljine od 10 nm do 20 nm i dužine od po 10-ak  $\mu\text{m}$ . Često, takvi oblici obrazuju višeslojne strukture [86]. Teorija kaže da se na svakoj lameli, polimerni lanci presavijaju tako da su mesta prevoja na naličju ploče - model savijenih lanaca. Svaka pločica će se sastojati od određenog broja molekula, međutim, prosečna dužina polimernog lanca će biti mnogo veća nego debljina same lamele. Prateći kristalizaciju, tokom faze rasta kristala, klice rastu kontinualnim ređanjem i usmeravanjem dodatnih molekulskih lanaca, pa se slojevi savijenih lanaca povećavaju po lateralnoj dimenziji. Za odvijanje tog procesa, potrebno je određeno vreme za usmeravanje lanaca, pa je to razlog zavisnosti od brzine hlađenja.

Rast kristala u koloidnoj suspenziji je poznato kao Ostvaldovo dozrevanje i odgovorno je za promene veličine čestica i njihove raspodele [89]. Ovaj termodinamički spontan proces nastaje usled veće energijske pogodnosti manjih čestica, jer su molekuli na površini čestica energetski manje stabilni od onih u unutrašnjosti čestice. Kako sistem nastoji da smanji ukupnu energiju, molekuli na površini malih čestica teže otkidanju sa čestice i difuziji u rastvor. Kada se ovo dogodi za veći broj čestica, dolazi do povećanja slobodnih molekula u rastvoru oko malih čestica. Kada su ti molekuli prezasićeni, stvara se koncentracioni gradijent između malih i velikih čestica. Kao posledica, molekuli difunduju iz mesta veće koncentracije oko malih čestica, do mesta manje koncentracije, do velikih čestica. Sve male čestice se skupljaju, gubeći molekule, dok velike čestice rastu, primajući sve više i više molekula. Ovo stvara prezasićen rastvor oko velikih čestica, što dovodi do kristalizacije.

Na osnovu FTIR analize (slika 4.1.2), povećan intenzitet traka u oblasti gde se javljaju OH grupe sugeriše, pored prisustva vodoničnih veza, prisustvo veće količine rezidualne vode. Ovo se može objasniti činjenicom da je korak primarnog sušenja tokom liofilizacije odrađen pri

temperaturi od  $-30^{\circ}\text{C}$ . Kao što je već napomenuto,  $T_c$  je maksimalna dozvoljena temperatura produkta tokom koraka primarnog sušenja. Generalno, dodatak rastvoru nanočestica ne menja mnogo vrednosti ovog parametra. Rastvor saharoze ima temperaturu kolapsa oko  $-31^{\circ}\text{C}$ . Produkt doživljava kolaps ako se temperatura poveća iznad  $T_c$ , ali je povećanje temperature neophodno, radi početka faze sublimacije leda. Kolaps liofilizata ne utiče na aglomeraciju, ali postoji mogućnost smanjenja kvaliteta produkta i povećane vlažnosti.

### 5.1.2 PGA KAO KRIOPROTEKTANT

Poli(glutaminska kiselina) (PGA) je anjonski polimer sa širokom primenom u biomedicini. Ponavljajuće jedinice (glutaminska kiselina) su povezane peptidnom vezom između  $\alpha$ -amino i  $\gamma$ -karboksilne grupe. PGA je hidrofilan, biodegradabilan, netoksičan, biokompatibilan i dostupan biopolimer, koji nastaje fermentacijom bakterije *Bacillus subtilis*. Pri pH vrednosti većoj od pK kiseline (4.2), karboksilna grupa glutaminske kiseline se deprotonizuje, pa je negativno naelektrisana. Navedena osobina, polimernoj kiselini, omogućuje primenu kao stabilizator različitih formulacija. Dobro je poznat uticaj PGA kao surfaktanta, međutim, u ovom radu, istražen je uticaj poli(glutaminske kiseline) na očuvanje sferičnosti PCL čestica pri koraku zamrzavanja, tokom liofilizacije.

Posmatrajući SEM mikrofografije sa PGA kao krioprotektantom (slika 4.2.3), uočava se sferoidni oblik čestica. Iako se može reći da su čestice prilično uniformne, pored sfera mikronskih dimenzija, primećuju se i neregularne strukture. Može se zaključiti da je PGA nedovoljno dobar krioprotektant pri koncentraciji od 1% u vodenom rastvoru. S obzirom na strukturu i osobine bočnog lanca PGA, lako je obrazložiti mehanizam delovanja kao protektanta.

Velika specifična površina nanočestica stvara veliku ukupnu površinsku energiju, što je termodinamički nepovoljno. Stoga, čestice teže aglomeraciji u cilju smanjenja površinske energije. Da bi se sprečila aglomeracija, u formulaciju se dodaju stabilizatori. Postoje dva osnovna mehanizma kojima se koloidne suspenzije stabilišu u vodenom i nevodenom okruženju: elektrostatičko odbijanje i sterna stabilizacija [89]. Ova dva mehanizma se postižu dodatkom jonskih i nejonskih stabilizatora, respektivno.

Stabilizacija elektrostatičkim odbijanjem se najbolje opisuje klasičnom DLVO teorijom (Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek). Ova teorija važi za vodeno okruženje, dok primena za nevodene medijume još uvek nije razjašnjena. DLVO teorija pretpostavlja da sile koje deluju na česticu u rastvoru uključuju odbojne elektrostatičke sile i privlačne Van der Waalove sile. Odbojne sile su prisutne usled preklapanja dvojnih električnih slojeva, koji okružuju česticu u rastvoru te sprečavaju aglomeraciju. Ovaj sloj podrazumeva: sterna sloj sastavljen od kontra jona privučenih na površini čestice radi očuvanja elektroneutralnosti sistema i difuzni sloj jona. Ukupna potencijalna energija čestica-čestica interakcija je suma potencijala odbijanja, nastalog od dvojnog električnog sloja i potencijala privlačenja, od Van der Waalovih sila. Privlačni potencijal zavisi od veličine čestica i njihovog rastojanja, dok odbojni potencijal zavisi od oba i još od zeta potencijala i koncentracije jona.

Sa FT-IR spektra PCL polimera liofilizovanog sa PGA (slika 4.1.3), automatski se uočava prisustvo rezidualne polimerne kiseline. Slab intenzitet traka u oblasti vibracija OH grupa ukazuje na to da vodonične veze nisu u velikoj meri relevantne za mehanizam protekcije ovog jedinjenja, već su to opisane elektrostatičke interakcije.



### 5.1.3 PVA KAO KRIOPROTEKTANT

U prisustvu vode, PVA stvara film, koji bubri i natapa se vodom [90]. Kada se koristi kao adhezivan agens, nizak nivo hidrolize pruža bolju adheziju na hidrofobne površine (poput lanca PCL polimera), dok visok nivo hidrolize dovodi do adhezije na hidrofilne površine. Pri smanjenoj vlažnosti, PVA filmovi su kruti i lako se lome, dok sa povećanjem vlage postaju meki i fleksibilni, jer voda ima ulogu plasticizera.

Vezivanje PVA na površinu čestica se dešava pri difuziji organskog rastvarača u nerastvarač, nakon čega se odvija interpenetracija molekula PVA i PCL. Sa SEM slika liofiliziranog PCL dodatkom 1%-og vodenog rastvora PVA (slika 4.2.4), uočava se kontinualan film, koji potiče od PVA. Ovaj tanki film ne dozvoljava osmatranje individualnih čestica PCL polimera, koje se nalaze unutar samog filma. U relativno obimnim reološkim ispitivanjima, pokazano je da PVA dosta dobro reaguje sa poli laktidnom kiselinom pri površini čestica. Autori su zaključili da je ova površinska adsorpcija PVA ireverzibilna i da je njenu eliminaciju sa nanočestica veoma teško postići [18]. Mehanizam vezivanja PVA na PCL polimer se može objasniti interpenetracijom PVA i PCL molekula, tokom preparacije nanočestica. Hidrofobni vinil acetatni segmenti, delimično hidrolizovanog PVA, prodiru u PCL molekule, kada molekuli etanola difunduju dodatkom vodene faze. U cilju dobijanja slike čestica u ovom slučaju, najbolje bi bilo koristiti ESEM. ESEM je tehnika kojom se uzorci mogu posmatrati u hidratisanom stanju, bez potpunog sušenja ili pripreme uzorka.

U FT-IR spektru (slika 4.1.4), očigledno je prisustvo vodene faze, a s obzirom da je traka dosta uža od uobičajene, zaključuje se znatno prisustvo intermolekulskih vodonočnih veza. Ovo ide u prilog opisanom mehanizmu interakcije dva polimera.

### 5.1.4 GLUKOZA KAO KRIOPROTEKTANT

Najbolji rezultati, posmatrajući sposobnost očuvanja veličine i oblika nanočestica sa aspekta liofilizacije, dobijeni su sa 1% rastvorom glukoze (slike 4.2.5, 4.3.1 i 4.3.2). Koji god da je tip nanosfera, T'g vrednost koncentrovanog rastvora u prisustvu glukoze je za 10°C manja nego ona sa dodatkom saharoze. Ovo je moglo dovesti do različitog preuređivanja krio-koncentrovanog rastvora u amorfno stanje, tokom procesa liofilizacije, i do različite količine nesmrznute vode, za koju se zna da ima ulogu plasticizera, smanjujući T'g.

Dobri krioprotektivni rezultati sa glukozom se najbolje objašnjavaju sinergijskim doprinosom sve tri, opšte prihvaćene, hipoteze. Uvođenjem glukoze u rastvor već počinje preferencijalno građenje mreža vodoničnih veza između karbonilnih grupa polimernih segmenata na površini čestica i hidroksilnih grupa glukoze. Takođe, u građenju vodoničnih veza učestvuju i molekuli vode. Relativno mali površinski napon koncentrovanog rastvora glukoze može uticati na čestice da ostanu dispergovane u rastvoru šećera. Progresivnim sniženjem temperature, počinje razdvajanje faza. Tada, čestice okružene molekulima glukoze, izoluju se u visoko viskoznu tečnost koja ne zamrzava, povlačeći sa sobom i izvesnu količinu vode. Ovo pruža bolju mehaničku zaštitu čestica polimera. Dostizanjem T'g, glukoza doživljava staklasti prelaz, imobilizujući čestice unutar svog vitrozno matriksa, sve dok se temperatura sistema ne poveća radi začetka sublimacije. Deo vode u zamrznutoj glukozu ostaje nezamrznut (i do 30%). Ta količina vode deluje kao plasticizer i kao razdvajajući matriks, smanjujući pritisak kristala leda na čestice formulacije i sprečavajući aglomeraciju izazvanu koncentrovanjem. Više-hidroksilne komponente mogu da održe prostornu orijentaciju i razmak između čestica nakon sublimacije leda.

Na osnovu FTIR analize (slika 4.1.5), slično objašnjenje onom za uzorak sa saharozom, važi i u ovom slučaju, a tiče se veće količine rezidualne vode. Što je manja T<sub>g</sub>, tim više liofilizati teže kolapsu. Temperatura staklastog prelaza, a i temperatura kolapsa glukoze su oko -43°C. Široke i intenzivne trake sa IR spektra idu u prilog objašnjenju mehanizma delovanja glukoze pri krioprotekciji.

## 5.2 BIOLOŠKI UTICAJI

---

Cilj ovih istraživanja je bio i da se ispita potencijalna toksičnost dobijenih liofiliziranih PCL čestica bez i sa različitim krioprotektantima. Iako *in vitro* studije nisu potpuna zamena za studije sa životinjskim modelima, korišćenje jednostavnih *in vitro* modela pruža uvid u generalne mehanizme toksičnosti i može biti baza za dalja ispitivanja.

### 5.2.1 MTT TEST

Redoks aktivnost mitohondrija HepG2 ćelija jetre, pri dodatku različitih uzorka PCL čestica, ispitana je redukcijom MTT do formazana, mitohondrijalnim sukcinat dehidrogenazama u kompleksu II (kompleks sukcinat:ubikvinon oksidoreduktaza), koji igraju ključnu ulogu u oksidativnoj fosforilaciji i Krebsovom ciklusu. U testu preživljavanja i proliferacije, samo žive ćelije mogu transformisati MTT, dok su mrtve ćelije potpuno negativne u signalu. Samo su žive ćelije sa aktivnim mitohondrijama sposobne da generišu jak signal.

Rezultati pokazuju (slika 4.4.1) da izlaganje ćelija formulaciji PCL mikro- i nanočestica liofiliziranih sa PGA, kao i PCL bez krioprotektanta, ne prouzrokuje znatnu citotoksičnost, pri testiranim dozama (koncentracijama uzoraka). Vidi se da nema većih promena u MTT merenjima, ukazujući na to da funkcija mitohondrija nije znatno izmenjena pri različitim dozama. Međutim, uočava se dosta slab pad aktivnosti mitohondrija pri najvećoj koncentraciji od 1% uzorka PCL sfera liofiliziranih sa dodatkom 1% glukoze. Ovo se može objasniti na sledeći način.

Kada su u pitanju istraživanja toksičnih osobina nanočestica, nije uvek poznato kako se te čestice ponašaju u izloženoj okolini. Da li ćelije vrše endocitozu čestica i kojim mehanizmima, samo su neki od problema na koji je potrebno obratiti pažnju. Glukoza kao krioprotektant, doprinela je obrazovanju prilično uniformnih sfernih čestica. U poređenju sa uzorkom liofilizovanog sa PGA, čestice imaju mnogo uniformniju morfologiju i dosta glatke sfere. Osim toga što dramatično utiče na biodistribuciju, oblik igra važnu ulogu u internalizaciji makromolekula preko ćelijske endocitoze. Važni putevi endocitoze u ćelijskom transportu makromolekula, uključujući fagocitozu, makropinocitozu, klatrinski posredovanu endocitozu, endocitozu putem kaveola i klatrin/kaveolin nezavisnu endocitozu. Koji od ovih puteva je prisutan, dosta zavisi od oblika endocitotske vezikule, prirode materije koja se internalizuje i mehanizma obrazovanja same vezikule. Poznato je da sferne čestice bolje podležu klatrinski zavisnom mehanizmu endocitoze. Čestice koje bivaju internalizovane od strane ćelija, imaju veće mogućnosti da utiču na funkcionalnost samih ćelija. Nije samo oblik zaslužan za stepen internalizacije čestice od strane ćelije. U jednoj studiji, ispitani su mehanizmi endocitoze fluorescentnih proba u melanoma B16 ćelijama [93]. Pokazano je da internalizacija čestica sa dijametrom manjim od 200 nm uključuje klatrinski zavisan put. Kako je rastao dijametar čestica, primećena je promena internalizacije putem kaveolarne endocitoze te je taj put ostao dominantan za čestice od 500 nm. Prema ovome, pravilnije sfere i uža raspodela čestica liofilizovanih sa glukozom, u odnosu na one sa PGA, više su doprinele internalizaciji u ćelije, a time i štetnom uticaju.

Međutim, nije uvek lako opisati generalnu tendenciju internalizacije. To se može objasniti predominantnošću drugih faktora, poput prirode čestice, veličine, naelektrisanja itd. Takođe, više mehanizama endocitoze može da nastupi istovremeno. Uprkos značajnim otkrićima u skorije vreme, koja se tiču oblika čestica, postoje brojni izazovi na biološkom nivou, koje bi trebalo prevazići pre ocrtavanja kompleksnog odnosa između oblika čestice i biološkog efekta u kontekstu drugih parametara kao što su: veličina, zeta potencijal, površinska hemija, mehaničke osobine itd.

## 5.2.2 STVARANJE ROS

Ćelije tretirane sa DCFH-DA inkubirane su sa različitim koncentracijama PCL uzoraka. Intenzitet fluorescencije DCF je meren tokom 5h inkubacije, na svakih 30 min. Statistički značajan porast intenziteta DCF fluorescencije se uočava u ćelijama tretiranim PCL česticama liofilizovanim bez dodatka krioprotektanta, pri koncentracijama od 0.1% i 1%. Nakon 5h inkubacije, intenzitet fluorescencije ove dve doze bio je oko dva puta veći od onog u kontrolnim ćelijama.

U slučaju uzorka PCL-a liofiliziranog bez krioprotekcije (slike 4.5.1 i 4.5.2), primećuje se porast intenziteta fluorescencije DCF u ćelijama, gotovo linearno sa vremenom izlaganja. Pri 0.1 i 1 zapreminskih procenata uzorka, dolazi do obrazovanja duplo veće količine reaktivnih kiseoničnih vrsta. Na slikama 5.4.3 i 5.4.4, gde su prikazani rezultati primene ove metode na uzorak PCL-a sa dodatkom 1%-og rastvora PGA, vidi se da nije došlo do značajnije promene u intenzitetu fluorescencije u odnosu na negativnu kontrolu. Takođe, nivo reaktivnih kiseoničnih vrsta ostaje približno isti pri svim koncentracijama. Kada se posmatra uzorak PCL-a liofiliziran dodatkom 1%-og rastvora glukoze (slike 4.5.5 i 4.5.6), na prvi pogled se primećuje visoka fluorescencija u odnosu na ostale uzorke. Međutim, kako negativna kontrola takođe proizvodi visoku fluorescenciju, zaključuje se da nema većih promena nivoa kiseoničnih vrsta u ćelijama, što slika 4.5.6 potvrđuje. Primetan blagi porast pri najvišoj koncentraciji od 1% uzorka, objašnjava se poboljšanom internalizacijom pravilnijih sfernih čestica uzorka i interagovanjem sa ćelijskim organelama u većoj meri, menjajući njihovu funkcionalnost.

Stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta od strane ćelija u *in vitro* kulturi, nakon izlaganja mikro- i nanočesticama, poznat je fenomen. Većina ćelija ima odbranbene mehanizme koji mogu da stvore određenu količinu ROS. Kada je povećanje ROS vrsta znatno, ćelije su podložne različitim negativnim efektima. Međutim, veza između nivoa količine ROS vrsta i indukcije toksičnih efekata, zavisi od tipa ćelija i nije dosta istražena. Generalno, malo i prolazno povećanje količine ROS vrsta toleriše većina ćelija, ali veći nivoi, koji se održavaju duži vremenski period, proizvode štetu u ćelijama. Velika specifična površina nanočestica i reaktivni površinski molekuli dovode do masivnijih oksidacionih sposobnosti. Opisano je da nanočestice dovode do stvaranja ROS preko nekoliko mehanizama:

- direktno stvaranje ROS vrsta kao rezultat izlaganja kiseloj sredini lizozoma
- interakcijama nanočestica sa ćelijskim organelama poput mitohondrija, uticajem na njihovu funkcionalnost
- interakcijama nanočestica sa redoks aktivnim proteinima poput NADPH oksidaza
- interakcijama nanočestica sa receptorima na površini ćelija i aktivacijom određenih unutarćelijskih signalnih puteva

# 6 ZAKLJUČAK

---



Seveobuhvatno gledajući, može se zaključiti da različite farmaceutske formulacije zahtevaju optimizaciju različitih, ali unikatnih kombinacija osobina polimera i same arhitekture, da bi se obezbedio najefektivniji sistem dostave. Zahtevi uslova fabrikacije i karakteristika, variraju za različite lekove, u zavisnosti od njihovih fizičko-hemijskih i farmakoloških profila. Usklađivanje ovih osobina, obavlja se različitim modifikacijama, kako površinskim i strukturnim, tako i modifikacijama u sastavu. Pored hemijskog sastava polimera, drugi veoma važni parametri podrazumevaju, između ostalog, veličinu i oblik čestice. Dijametar čestice se kontroliše ili preko fizičkih osobina materijala, poput koncentracije polimera ili surfaktanta (protektanta) ili preko eksperimentalnih parametara metode fabrikacije. U radu je predstavljena fizičko-hemijska metoda, koja zajedno sa procesom liofilizacije i pažljivo odabranim dodatkom izvesnih supstanci, pruža mogućnost dobijanja glatkih sfernih čestica, široke primene. Kada se govori o veličini samih sfera, potrebno je istaći da mnoge sfere, tradicionalno nazvane "nanonosfere", prelaze opseg veličina na nanoskali, definisan od strane Nacionalnog naučnog fonda (< 100 nm) i ulaze u širi, prihvatljiviji opseg (< 1000 nm).

Liofilizacija čestica je dosta kompleksan proces, koji zahteva detaljna ispitivanja formulacije i uslova procesa. Mnogi od parametara formulacije mogu da utiču i odrede uspeh liofilizacije. Poli(glutaminska kiselina) liofilizacijom omogućuje dobijanje sfernih čestica. Međutim, imajući u vidu i prisutnost neregularnih struktura, može se zaključiti da polimerna kiselina sama ili pri koncentraciji od 1%, nije dovoljno pogodan krioprotektant za čestice od PCL. Sa druge strane, *in vitro* studije svedoče o prilično kompatibilnim strukturama, jer su citotoksičnost i proizvodnja reaktivnih kiseoničnih vrsta neznatne. Saharoza, pri istoj koncentraciji, na izvesan način utiče na obrazovanje kristala PCL polimera. U slučaju dodatka PVA formulaciji, primećuje se kvašenje PVA polimera i obrazovanje filma, koji onemogućuje osmatranje čestica PCL skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Infracrvenom spektroskopijom je utvrđeno da nije došlo niti do narušavanja, niti do građenja novih veza unutar polimernog lanca (izuzev dalekosežnih mreža vodoničnih veza), čime se potvrđuje očuvanje strukture.

Posmatrajući rezultate predstavljenih eksperimenata, lako je zaključiti da je za potrebe sistema dostave lekova, pri liofilizaciji PCL čestica, najproduktivnije koristiti 1% rastvor glukoze. Kao krajnji rezultat se dobija uska raspodela glatkih, sfernih čestica PCL polimera, bez promene hemijske strukture. Tim što je morfologija čestica dosta pravilnija, poboljšava se i stepen internalizacije čestica od strane ćelija jetre. Čestice koje bivaju internalizovane, imaju veće mogućnosti da utiču na funkcionalnost samih ćelija. U prilog napisanom svedoči i blag porast nekroze HepG2 ćelija, dodatkom dobijenih sfera u toksikološkim ispitivanjima. Ovakvo ponašanje, pored toga što se ogleda znatno poboljšanom internalizacijom, ukazuje i na potrebu površinske modifikacije u cilju smanjenja štetnog uticaja na ćelijske funkcije.

# 7 LITERATURA

---



- [1] Tian, Huayu, et al. "Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application." *Progress in Polymer Science* 37.2 (2012): 237-280.
- [2] Park, J., Mingli Ye, and Kinam Park. "Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs." *Molecules* 10.1 (2005): 146-161.
- [3] Wang, Shanfeng, et al. "Polymeric Biomaterials for Tissue Engineering Applications 2011." *International Journal of Polymer Science* (2011): 180-250.
- [4] Lendlein, Andreas, et al. "Why are so few degradable polymeric biomaterials currently established in clinical applications?." *The International journal of artificial organs* 34.2 (2011): 71.
- [5] Kumari, Avnesh, Sudesh Kumar Yadav, and Subhash C. Yadav. "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 75.1 (2010): 1-18.
- [6] M. Stevanović, J. Savić, B. Jordović, D. Uskoković, "Fabrication, in vitro degradation and the release behaviours of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanospheres containing ascorbic acid", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 59 (2007): 215-223
- [7] Pan, Pengju, and Yoshio Inoue. "Polymorphism and isomorphism in biodegradable polyesters." *Progress in Polymer Science* 34.7 (2009): 605-640.
- [8] Maiti, Pralay. "Nanostructure Controlled Anti-Cancer drug delivery using Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) based Nanohybrids." *Journal of Materials Chemistry* (2012): 17853-17863
- [9] Woodruff, Maria Ann, and Dietmar Werner Hutmacher. "The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century." *Progress in Polymer Science* 35.10 (2010): 1217-1256.
- [10] M. Stevanović, I. Savanović, V. Uskoković, S. Škapin, I. Bračko, U. Jovanović, D. Uskoković. "A new, simple, green, and one-pot four-component synthesis of bare and poly( $\alpha$ , $\gamma$ ,L-glutamic acid)-capped silver nanoparticles." *Colloid & Polymer Science* 290, 3 (2012) 221-231.
- [11] Dash, Tapan K., and V. Badireenath Konkimalla. "Polymeric modifications and its implication in drug delivery: Poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) as a model polymer." *Molecular Pharmaceutics* (2012).
- [12] Chandra, R., and Renu Rustgi. "Biodegradable polymers." *Progress in polymer science* 23.7 (1998): 1273-1336.
- [13] M. Stevanović, D. P. Uskoković, "Poly(lactide-co-glycolide)-based micro and nanoparticles for the controlled drug delivery of vitamins", *Current Nanoscience*, Vol. 5, No. 1 (2009) 1-14.
- [14] R. Gupta, U. Kompella. "Nanoparticle Technology for Drug Delivery". Taylor & Francis, New York (2006).
- [15] Prakash, Satya, et al. "Polymeric nanohybrids and functionalized carbon nanotubes as drug delivery carriers for cancer therapy." *Advanced drug delivery reviews* 63.14 (2011): 1340-1351.
- [16] Saez, A., et al. "Freeze-drying of polycaprolactone and poly (D, L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs." *European Journal of pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50.3 (2000): 379-387.



- [17] Varshosaz, Jaleh, Sharareh Eskandari, and Majid Tabbakhian. "Freeze-drying of nanostructure lipid carriers by different carbohydrate polymers used as cryoprotectants." *Carbohydrate Polymers* (2012).
- [18] Abdelwahed, Wassim, Ghania Degobert, and Hatem Fessi. "A pilot study of freeze drying of poly (epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly (vinyl alcohol): formulation and process optimization." *International journal of pharmaceutics* 309.1 (2006): 178-188.
- [19] Chacon, M., et al. "Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly (D, L lactide-glycolide) carriers." *European journal of pharmaceutical sciences* 8.2 (1999): 99-107.
- [20] Crowe, John H., Samuel B. Leslie, and Lois M. Crowe. "Is vitrification sufficient to preserve liposomes during freeze-drying?." *Cryobiology* 31.4 (1994): 355-366.
- [21] Schwarz, C., and W. Mehnert. "Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN)." *International journal of pharmaceutics* 157.2 (1997): 171-179.
- [22] Gunatillake, Pathiraja A., and Raju Adhikari. "Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering." *Eur Cell Mater* 5.1 (2003): 1-16.
- [23] Kalia, Susheel, and Luc Averous. *Biopolymers: Biomedical and Environmental Applications*. Vol. 77. Wiley-Scrivener, 2011.
- [24] Gurav, N., and S. Downes. "A qualitative in vitro evaluation of the degradable materials poly (caprolactone), poly (hydroxybutyrate) and a poly (hydroxybutyrate)-(hydroxyvalerate) copolymer." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 5.11 (1994): 784-787.
- [25] Pachence, James M., and Joachim Kohn. "Biodegradable polymers." *Principles of tissue engineering* 3 (2000): 323-339.
- [26] Thomson, R., et al. "Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs." *Biopolymers* 11 (1995): 245-274.
- [27] Piskin, Erhan. "Biodegradable polymers as biomaterials." *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 6.9 (1995): 775-795.
- [28] Wang, Ying, et al. "A phenomenological model for the degradation of biodegradable polymers." *Biomaterials* 29.23 (2008): 3393-3401.
- [29] Domb, Abraham J., and Neeraj Kumar, eds. *Biodegradable polymers in clinical use and clinical development*. Wiley, 2011.
- [30] M. Stevanović, S. D. Škapin, I. Bračko, M. Milenković, J. Petković, M. Filipič, D. P. Uskoković, Poly(lactide-co-glycolide)/silver nanoparticles: Synthesis, characterization, antimicrobial activity, cytotoxicity assessment and ROS-inducing potential, *Polymer* 53, 14 (2012) 2818-2828.
- [31] Bikiaris, Dimitrios, Vassilios Karavelidis, and Evangelos Karavas. "Novel biodegradable polyesters. Synthesis and application as drug carriers for the preparation of raloxifene HCl loaded nanoparticles." *Molecules* 14.7 (2009): 2410-2430.

[32] Ulery, Bret D., Lakshmi S. Nair, and Cato T. Laurencin. "Biomedical applications of biodegradable polymers." *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 49.12 (2011): 832-864.

[33] Seyednejad, Hajar, et al. "Functional aliphatic polyesters for biomedical and pharmaceutical applications." *Journal of Controlled Release* 152.1 (2011): 168-176.

[34] Jérôme, Christine, and Philippe Lecomte. "Recent advances in the synthesis of aliphatic polyesters by ring-opening polymerization." *Advanced drug delivery reviews* 60.9 (2008): 1056-1076.

[35] M. Stevanović, A. Radulović, B. Jordović, D. Uskoković, "Poly(DL-lactide-co-glycolide) Nanospheres for the Sustained Release of Folic Acid", *Journal Biomedical Nanotechnology* Vol. 4, No. 3 (2008) 349-358

[36] Panyam, Jayanth, and Vinod Labhasetwar. "Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue." *Advanced drug delivery reviews* (2012): 329-347

[37] Chawla, Jugminder S., and Mansoor M. Amiji. "Biodegradable poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen." *International journal of pharmaceutics* 249.1 (2002): 127-138.

[38] Sinha, V. R., et al. "Poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview." *International journal of pharmaceutics* 278.1 (2004): 1-23.

[39] Wang, Yu-Cai, et al. "Functionalized micelles from block copolymer of polyphosphoester and poly ( $\epsilon$ -caprolactone) for receptor-mediated drug delivery." *Journal of Controlled Release* 128.1 (2008): 32-40.

[40] Neves, Sara C., et al. "Chitosan/Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) blend scaffolds for cartilage repair." *Biomaterials* 32.4 (2011): 1068-1079.

[41] Zhu, K. J., et al. "Preparation, characterization and in vitro release properties of ibuprofen-loaded microspheres based on polylactide, poly ( $\epsilon$ -caprolactone) and their copolymers." *Journal of microencapsulation* 22.1 (2005): 25-36.

[42] Dash, Tapan K., and V. Badireenath Konkimalla. "Poly- $\epsilon$ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review." *Journal of Controlled Release* 158.1 (2012): 15-33.

[43] Wang, Xudong, et al. "Drug distribution within poly ( $\epsilon$ -caprolactone) microspheres and in vitro release." *Journal of materials processing technology* 209.1 (2009): 348-354.

[44] Wei, XiaWei, et al. "Biodegradable poly ( $\epsilon$ -caprolactone)-poly (ethylene glycol) copolymers as drug delivery system." *International journal of pharmaceutics* 381.1 (2009): 1-18.

[45] Desai, Manisha P., et al. "Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size." *Pharmaceutical Research* 13.12 (1996): 1838-1845.

[46] Armentano, I., et al. "Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review." *Polymer Degradation and Stability* 95.11 (2010): 2126-2146.

- [47] Gercek, I., R. S. Tıgılı, and M. Gümüşderelioğlu. "A novel scaffold based on formation and agglomeration of PCL microbeads by freeze-drying." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 86.4 (2008): 1012-1022.
- [48] Porter, Joshua R., Andrew Henson, and Ketul C. Popat. "Biodegradable poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanowires for bone tissue engineering applications." *Biomaterials* 30.5 (2009): 780-788.
- [49] Jameela, S. R., N. Suma, and A. Jayakrishnan. "Protein release from poly ( $\epsilon$ -caprolactone) microspheres prepared by melt encapsulation and solvent evaporation techniques: a comparative study." *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 8.6 (1997): 457-466.
- [50] Dordunoo, Stephen K., et al. "Taxol encapsulation in poly ( $\epsilon$ -caprolactone) microspheres." *Cancer chemotherapy and pharmacology* 36.4 (1995): 279-282.
- [51] Aberturas, M. R., et al. "Development of a new cyclosporine formulation based on poly (caprolactone) microspheres." *Journal of microencapsulation* 19.1 (2002): 61-72.
- [52] Shenoy, Dinesh B., et al. "Potential applications of polymeric microsphere suspension as subcutaneous depot for insulin." *Drug development and industrial pharmacy* 29.5 (2003): 555-563.
- [53] Calvo, Pilar, José L. Vila-Jato, and María J. Alonso. "Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers." *Journal of pharmaceutical sciences* 85.5 (1996): 530-536.
- [54] Gamisans, F., et al. "Flurbiprofen-loaded nanospheres: analysis of the matrix structure by thermal methods." *International journal of pharmaceutics* 179.1 (1999): 37-48.
- [55] Chawla, Jugminder S., and Mansoor M. Amiji. "Biodegradable poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen." *International journal of pharmaceutics* 249.1 (2002): 127-138.
- [56] Serrano, M. C., et al. "In vitro biocompatibility assessment of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts." *Biomaterials* 25.25 (2004): 5603-5611.
- [57] Woodward, So C., et al. "The intracellular degradation of poly ( $\epsilon$ -caprolactone)." *Journal of biomedical materials research* 19.4 (1985): 437-444.
- [58] Abdelwahed, Wassim, et al. "Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations." *Advanced drug delivery reviews* 58.15 (2006): 1688-1713.
- [59] Nakagawa, Kyuya, et al. "Dispersibility of freeze-dried poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules stabilized by gelatin and the effect of freezing." *Journal of Food Engineering* 102.2 (2011): 177-188.
- [60] Hirsjärvi, Samuli, Leena Peltonen, and Jouni Hirvonen. "Effect of sugars, surfactant, and tangential flow filtration on the freeze-drying of poly (lactic acid) nanoparticles." *AAPS PharmSciTech* 10.2 (2009): 488-494.
- [61] M. Dragojević, M. Popović, S. Stević, V. Šćepanović. "Opšta hemija." *Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd* (1999): 263

[62] Lemoine, D., et al. "Stability study of nanoparticles of poly ( $\epsilon$ -caprolactone), poly (d, l-lactide) and poly (d, l-lactide-co-glycolide)." *Biomaterials* 17.22 (1996): 2191-2197.

[63] Santivarangkna, C., B. Higl, and P. Foerst. "Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures." *Food microbiology* 25.3 (2008): 429-441.

[64] Abdelwahed, Wassim, Ghania Degobert, and Hatem Fessi. "Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage." *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 63.2 (2006): 87-94.

[65] Date, Praveen V., Abdul Samad, and Padma V. Devarajan. "Freeze thaw: a simple approach for prediction of optimal cryoprotectant for freeze drying." *AAPS PharmSciTech* 11.1 (2010): 304-313.

[66] Franks, Felix. "Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45.3 (1998): 221-229.

Steiner, Thomas. "The hydrogen bond in the solid state." *Angewandte Chemie International Edition* 41.1 (2002): 48-76.

[67] Zhang, Lijuan, et al. "The effects of cryoprotectants on the freeze-drying of ibuprofen-loaded solid lipid microparticles (SLM)." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69.2 (2008): 750-759.

[68] Allison, S. Dean, and Thomas J. Anchordoquy. "Stabilization of lipid/DNA complexes during the freezing step of the lyophilization process: the particle isolation hypothesis." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1468.1 (2000): 127-138.

[69] Chasteigner, Stephanie, et al. "Freeze-drying of itraconazole-loaded nanosphere suspensions: a feasibility study." *Drug development research* 38.2 (1996): 116-124.

[70] Qian, Lei, and Haifei Zhang. "Controlled freezing and freeze drying: a versatile route for porous and micro-/nano-structured materials." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 86.2 (2011): 172-184.

[71] S. Mentus, U. Mioč. "Odabrane metode fizičko-hemijske analize". Fakultet za fizičku hemiju, Beograd (1993).

[72] J. Dimitrić Marković. "Praktični aspekti odabranih poglavlja molekulske spektrohemijske". Fakultet za fizičku hemiju, Beograd (2008).

[73] Scanning electron microscope. Wikipedia, The Free Encyclopedia. Wikimedia Foundation, Inc. 13 December 2012. Web. 15 December 2012. ([http://en.wikipedia.org/wiki/Scanning\\_electron\\_microscope](http://en.wikipedia.org/wiki/Scanning_electron_microscope)).

[74] Goldstein, Joseph, et al. *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. Springer, 2003.

[75] Stojanović, Zoran, Smilja Marković, and Dragan Uskoković. "Measurement of particle size distribution using laser light diffraction." *Tehnika-Novi materijali* 19.5 (2010): 1-15.

- [76] Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* (1983) 65:55–63.
- [77] Osseni RA, Debbasch C, Christen MO, Rat P, Warnet JM. "Tacrine-induced reactive oxygen species in a human liver cell line: The role of anethole dithiolethione as a scavenger." *Toxicology in Vitro* (1999) 13:683–688.
- [78] Ankica Antić-Jovanović. "Molekulska spektroskopija: Spektrohemijski aspekt". Fakultet za fizičku hemiju, Beograd (2006).
- [79] N. Filipović, M. Stevanović, A. Radulović, V. Pavlović, D. Uskoković. "Facile synthesis of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) micro and nanospheres using different types of polyelectrolytes as stabilizers under ambient and elevated temperature." *Composites Part B: Engineering* (2012): 1471–1479
- [80] Dhanarajua, Magharla Dasaratha, et al. "Preparation of poly (epsilon-caprolactone) microspheres containing etoposide by solvent evaporation method." *Asian J. Pharm. Sci* 5 (2010): 114-122.
- [81] Yu, Jing, and Peiyi Wu. "Crystallization process of poly ( $\epsilon$ -caprolactone)–poly (ethylene oxide)–poly ( $\epsilon$ -caprolactone) investigated by infrared and two-dimensional infrared correlation spectroscopy." *Polymer* 48.12 (2007): 3477-3485.
- [82] Predoi, D. "Physico-chemical studies of sucrose thin films." *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. Vol. 5 (2010): 373 – 377
- [83] Stevanović, Magdalena, Branimir Kovačević, Jana Petković, Metka Filipič, Dragan Uskoković. "Effect of poly- $\alpha$ ,  $\gamma$ , L-glutamic acid as a capping agent on morphology and oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles." *International journal of nanomedicine* 6 (2011): 2837.
- [84] Reis, Elizabeth Fonseca dos, et al. "Synthesis and characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogels and hybrids for rMPB70 protein adsorption." *Materials Research* 9.2 (2006): 185-191.
- [85] Ibrahim, Medhat, et al. "Analysis of the structure and vibrational spectra of glucose and fructose." *Eclat Quím* 31.3 (2006).
- [86] Callister, William D., and David G. Rethwisch. *Fundamentals of materials science and engineering: an integrated approach*. Wiley, 2011.
- [87] Franks, Felix. "Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45.3 (1998): 221-229.
- [88] Yao, Cheng-Li, et al. "Sucrose/bovine serum albumin mediated biomimetic crystallization of calcium carbonate." *Journal of chemical sciences* 121.1 (2009): 89-93.
- [89] Wu, Libo, Jian Zhang, and Wiwik Watanabe. "Physical and chemical stability of drug nanoparticles." *Advanced drug delivery reviews* 63.6 (2011): 456-469.
- [90] Goodship, Vannessa, and D. K. Jacobs. *Polyvinyl alcohol: materials, processing and applications*. Vol. 16. No. 12. Smithers Rapra Technology, 2009.

[91] Liao, Yong-Hong, et al. "Protective mechanism of stabilizing excipients against dehydration in the freeze-drying of proteins." *Pharmaceutical research* 19.12 (2002): 1854-1861.

[92] Engel, A., et al. "Freeze drying of liposomes with free and membrane-bound cryoprotectants—the background of protection and damaging processes." *International journal of pharmaceutics* 107.2 (1994): 99-110.

[93] Hillaireau, Hervé, and Patrick Couvreur. "Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery." *Cellular and molecular life sciences* 66.17 (2009): 2873-2896.

[94] M. Stevanović, Maksin T., Petković J., Filipič M., Uskoković D. 2009. "An innovative, quick and convenient labeling method for the investigation of pharmacological behavior and the metabolism of poly(DL-lactide-coglycolide) nanospheres." *Nanotechnology*, 20, 335102/1–335102/12

[95] Simone, Eric A., Thomas D. Dziubla, and Vladimir R. Muzykantov. "Polymeric carriers: role of geometry in drug delivery." (2008): 1283-1300.

[96] Champion, Julie A., Yogesh K. Katare, and Samir Mitragotri. "Particle shape: a new design parameter for micro-and nanoscale drug delivery carriers." *Journal of Controlled Release* 121.1 (2007): 3-9.

[97] M. Stevanović, V. Pavlovic, J. Petkovic, M. Filipic, D. Uskokovic, "ROS-inducing potential, influence of different porogens and in vitro degradation of poly (D,L-lactide-co-glycolide)-based material." *Express Polymer Letters* 5 (2011) 996-1008

## BIBLIOGRAFIJA

---

### **M34 (0,5): Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu**

Nenad Filipović, Magdalena Stevanović, Petar Stupar, Jana Petković, Metka Filipič, Dragan Uskoković, "Freeze-drying method to produce a range of PCL particles with tailored morphological properties", The fourteenth annual Materials Research Society Conference YUCOMAT 2012, Book of Abstract (2012), p.124

Petar Stupar, Magdalena Stevanović, Nenad Filipović, Vladimir Pavlović, Jana Nunić, Sandra Cundrič, Metka Filipič, Dragan Uskoković, "Effects of different cryoprotectants on morphology of lyophilized poly( $\epsilon$ -caprolactone) micro- and nanospheres". Joint Event of the 11th Young Researchers' Conference: Materials Science and Engineering and the 1st European Early Stage Researches' Conference on Hydrogen Storage, Belgrade, December 3rd-5th, 2012 Serbia, Program and the Book of Abstracts, p.104