

## Ters Miseller : Özellikleri ve İlaç Teknolojisindeki Önemleri

Gönül HAKYEMEZ (\*)

Ters miseller, yüzey etken maddelerin polar-olmayan solvanlarda oluşturdukları küresel misellerdir. Ters miseller moleküler seviyede bir arayüze sahip olduklarından, arayüzeylerden geçiş olayı ile ilgilenen bilimciler, membranlardan biyolojik moleküllerin geçişi ile ilgili çalışmalarda misellerin ideal modeller olabileceğini düşünmüşler ve ters miselleri enzimatik çalışmalarda ve hidrofilik moleküllerin taşınması ile ilgili çalışmalarda başarıyla kullanmışlardır. Ayrıca, ters miseller bugün nanokapsüller şeklinde, ilaçlar için taşıyıcı olarak da kullanılmaktadırlar. Bu önemleri nedeniyle, makalede ters misellerin bazı özellikleri ve fonksiyonları tanıtılmıştır.

### **REVERSE MICELLES : THEIR PROPERTIES AND IMPORTANCE IN PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY**

Spherical micelles aggregates of surfactants in nonpolar solvents are named of reverse micelles. Since they have an interface on a molecular level, physical chemists interested in transport phenomena across interfaces have considered that they can give ideal models for the studies dealing with the transport of biomolecules by the membranes and used them in enzymatic reactions and to transport of some hydrophilic molecules successively. In addition, reverse micelles were also utilized as carriers for drugs, namely nanocapsules. Because of the importance of reverse micelles, their properties and functions are reviewed in this paper.

(\*) Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi.  
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

## GİRİŞ :

Yüzey etken maddelerin polar ortamlarda oluşturdukları normal miseller ve polar olmayan ortamlarda oluşturdukları ters miseller, özellikle biyolojik yapısal düzenle ilgilenen bilimcilerin ilgisini çekmiştir. Çünkü miseller, kendiliğinden oluşan ve dışkenarından farklı özelliklerde bir iç kenar tanımlayan moleküler seviyede bir arayüzey veren yapılardır. Bu nedenle biyolojik moleküllerin ve ilaçların arayüzeylerden geçişi ile ilgilenen fizikokimyacılar miselleri ideal modeller olarak kabul etmektedirler (1). Keza, in vitro enzim çalışmalarında şimdiki kadar sulu ortamda yapılan çalışmaların, gerçeği tam olarak yansıtamayacağı, onun yerine ters miseller çözeltilerde bu çalışmaların yapılmasının daha gerçekçi olduğu ifade edilmektedir (2, 3). Bu iddiaya gerekçe olarak da bir arayüzey kenarındaki yüzeye bağlı suyun özelliklerinin farklı olması verilmektedir. Bu düşünceden hareketle yapılan çalışmalarda kimotripsin, tripsin, ribonükleaz, pirofosfataz, peroksidaz vb enzimlerin ters miseller içerisinde aktivitelerini kaybetmedikleri ve bu çalışmalar için uygun modeller oldukları görülmüştür (1-3). Diğer taraftan miseller dinamik özellikleri sayesinde bazı molekülleri taşıma ve geçirme özelliğine de sahiptirler (1). Bu nedenle ters miseller ile çeşitli biyolojik moleküllerin ve ilaçların taşınmasını konu alan çalışmalar da yapılmaktadır (1-4).

Bazı ilaçların hedef organlara taşınması için denenen çeşitli kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerden olan nanopartiküllerin hazırlama yöntemlerinden biri de ters misellerin polimerizasyonu olmuştur (4-7).

1970'li yıllardan bu yana ters misellerin gördüğü bu çok yönlü ilgi nedeniyle, bu yazı kapsamında ters misellerin özellikleri ve onlarla yapılmış olan bazı çalışmaların tanıtılması amaçlanmıştır. Ancak ters misellerin özelliklerini anlayabilmek için misellerin özelliklerinin kısaca gözden geçirilmesi yararlı olacaktır.

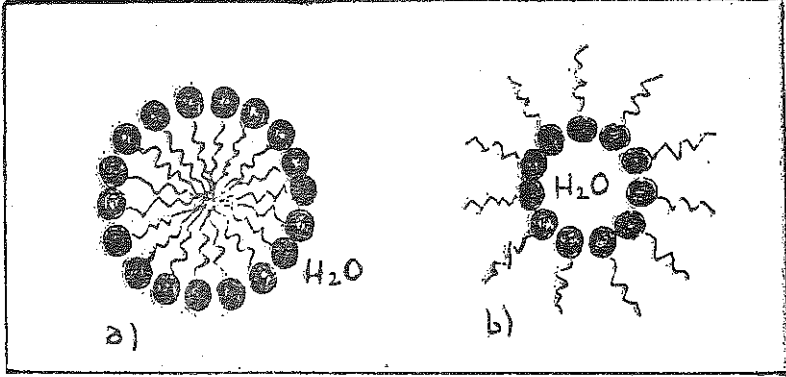
### MİSELLER ve ÖZELLİKLERİ :

Moleküllerinde taşıdıkları polar ve polar-olmayan gruplar nedeniyle yüzey etken maddeler, buldukları ortamlardaki arayüzeylerde özel bir diziliş ile yerleşerek arayüzey gerilimi düşürmektedirler. Bu maddeler çözeltilerinin derişimlerine bağlı olarak farklı şekil ve özelliklerde misellerin oluşmasına neden olmaktadırlar. Seyreltik yüzey etken madde çözeltilerin kritik misel konsantrasyonu denilen derişimlerinde oluşmaya başlayan miseller küreseldirler. Ancak derişimin daha da artması ile bu misellerin önce silindirik veya çubuk şeklinde büyüme gösterdikleri, daha sonra ise hegzagonal veya tabakalı bir dizilişe (sıvı kristaller) geçtikleri polarizan mikroskoplar veya X ışınları kırınımı yöntemi ile kanıtlanmıştır (8, 9).

Ters miseller polar - olmayan ortamlardaki küresel misellerdir.

Ortam su olduğunda yüzey etken madde molekülleri polar grupları su ile, hidrofobik uçları ise birbirleri ile temasta olacak şekilde kümelenmektedirler. Bu küresel yapıya misel (normal misel) (Şekil 1a) denilmektedir. Ancak çözücü polar

-olmayan bir solvan olduğunda, moleküllerin hidrofob uçları ortama doğru yönelirken hidrofilik uçları miselin iç kısmında kümelenirler. Bu tip misellere ise ters misel (reverse misel) denmektedir (Şekil 1b) (1, 4).



Şekil 1 : a) Normal misel ve b) ters misel.

Miseller bir çözelti içine, solvan ile karışmayan az miktarda ikinci bir sıvı ilave edildiğinde, ilave edilen sıvı miseller içerisinde tutulur. Örneğin böyle bir durumda, ters miseller bir sistemde misellerin çok küçük bir su çekirdeği olmaktadır. Eğer sisteme çok az su ilave edilmişse, surfaktanın hidrofil başları adeta bir yapıştırıcı gibi görev yapan su molekülleri sayesinde hidrojen bağları oluşturarak bir araya gelmektedir (1). NMR, IR ve diğer spektroskopik yöntemlerle böyle bir sistemde serbest su molekülü tesbit edilememiştir (11, 12). Ancak sistemde daha fazla su solubilize edilmişse, surfaktan molekül-

lerinin oluşturduğu kesintisiz bir film tabakası bu su çekirdeğini kuşatmaktadır. Çekirdek büyüdükçe serbest su molekülleri de çekirdek içinde bulunabilmektedir. Ancak bu noktadan sonra sistem daha çok bir emülsiyon olmaktadır.

Bir misel içinde birleşen yüzey etken madde moleküllerinin sayısı (agregasyon sayısı) miselin büyüklüğünün bir ölçümüdür ve bu sayının 50-100 arasında olabileceği hesaplanmıştır. Misellerin çapı ise 30-80 Å olarak verilmektedir (8, 9). Misellerin bu koloidal boyutları ve yüzey etken madde moleküllerinin kendiliğinden oluşturdukları çeperlerinin daha sonra göreceğimiz özel-

likleri, onların hedeflenebilir ilaç taşıyıcı olarak kullanılmasını mümkün kılmıştır (1, 4).

Miseller sistemler, bir çok konudaki benzerlikleri nedeniyle çoğu zaman mikroemülsiyonlarla eş anlamlı olarak kullanılmışlardır (13). Ancak sınır çok kesin olmasa da partikül büyüklüğü yönünden aralarında fark olduğu belirtilmektedir. Bu konu literatürde tartışmalara neden olmuştur.

### EMÜLSİYONLAR VE MİSELLER ÇÖZELTİLER :

Makroemülsiyonlar termodinamik olarak stabil olmayan sistemlerdir (14). Bu nedenle kısa ömürlüdürler ve süt beyaz renklidirler. Bir makroemülsiyon her iki fazın aynı kırma indisine sahip olduğu çok özel bir durumda şeffaf olabilirse de, böyle bir sistem stabil olmadığından kısa ömürlü olmaktadır.

Mikroemülsiyonlar ise makroemülsiyonlara göre daha küçük iç faz küreciklerine sahiptirler. Bir mikroemülsiyonda iç faz kürecikleri 100-1000°A arasında iken kinetik olarak stabil bir makroemülsiyonda iç faz partiküllerinin çapı 5000 A° olarak verilmektedir (13). Mikroemülsiyonlarda iç faz küreciklerinin çapları beyaz ışığın dalga boyunun 1/4'ünden (yaklaşık 1400 A°) daha az olduğundan sistemden ışık geçebilir, yani bunlar şeffaf görünmektedirler (15). Mikroemülsiyonların 1943'te Schulman (16) tarafından tanımlanma-

sından sonra, bu alandaki çalışmalar Schulman ve okulu ile sınırlı olmuştur. Schulman'a göre arayüzdeki negatif serbest enerji nedeniyle, yüzey etken madde moleküllerinin tek tabaka halinde bu arayüze adsorbe olmaları sonucu oluşturdukları film kendiliğinden sıfır yüzey gerilimi sağlamaktadır. Dolayısıyla mikroemülsiyonlar kendiliğinden oluşan stabil sistemler olmaktadır. Ancak daha sonraları yapılan çalışmalarla mikroemülsiyonların stabilitesinin bazı termodinamik faktörlere bağlı olduğu ve termodinamik olarak stabil olmayan mikroemülsiyonların da olduğu ifade edilmiştir (17). Ama yine de bu sistemler genellikle stabil olarak kabul edilmektedirler. Kolloidcilerin zamanla edindikleri bilgilere dayanılarak, mikroemülsiyonun tanımı «bir sıvının diğerinde kürecikler şeklindeki stabil ve şeffaf dağılımları» olarak verilmektedir (18). Bu tanım miseller çözeltileri de aynı kategoriye sokmaktadır. Oysa bazı yazarlar arada bazı farkların olduğunu ileri sürmüş ve mikroemülsiyonlar için şişmiş (swollen) miseller, miseller çözeltiler için ise solubilize edici (solubilizing) miseller adını vermişlerdir (11). Miseller çözeltilerin misellerini oluşturan surfaktan molekül dizilerinin su ve yağ ile şişmesinin % 10 gibi belli limitler içinde kaldığı, oysa mikroemülsiyonlarda bu oranın daha fazla olduğu ifade edilmektedir (14). Ancak bu konuda esas

kriter küreciklerin büyüklüğü ile ilgili olmaktadır. İç fazın surfaktanın olan molar oranı iç faz küreciklerinin çapını tayin ettiğinden, önemli bir parametre olarak kullanılmaktadır. Örneğin, izooktan/su/aerosol OT (AOT) ile hazırlanan bir ters miseller sistemde bu oran  $W_0 = [H_2O] / [AOT]$  dir.  $W_0 = 6.7$  iken ters misellerin iç çapı  $18 \text{ \AA}$ ,  $W_0 = 15$  iken  $30 \text{ \AA}$  ve  $W_0 = 40$  iken  $90 \text{ \AA}$  olarak ölçülmüştür (1, 11).  $W_0 = 10$ 'a kadar miseller sistemlerin daha çok bir mikroemülsiyonu tanımladıkları ifade edilmektedir.  $W_0$  değeri 60'ın üzerinde ise sistem transparan değil bulanıktır ve bu değer makroemülsiyonlar için sınır oluşturmaktadır (11).  $W_0 = 10$ 'a kadar miseller rijid makromoleküller gibi davranmaktadırlar. Bunun nedeni olarak surfaktan moleküllerinin hidrofilyk grupları ile az miktardaki su molekülleri arasında oluşan kuvvetli hidrojen bağları gösterilmiştir. Böyle bir durum ise miseller bir sistemi tanımlamaktadır (1). Su içeriği  $W_0 = 10-15$ 'den daha fazla olduğunda çekirdekte çepere bağlı olmayan serbest su molekülleri yer almaya başladığından sistem bir mikroemülsiyonu tanımlamaktadır (11).

### **TERS MİSELLERİN TAŞIYICI ÖZELLİKLERİ :**

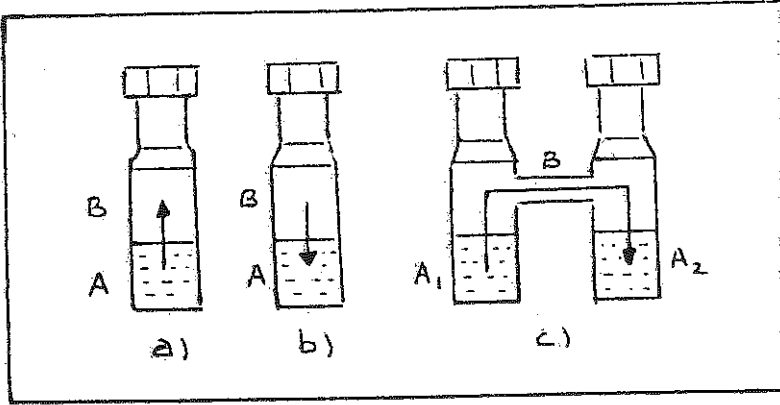
Ters misellerin en önemli özelliklerinden biri de hidrofilyk molekülleri, bu arada biyopolimerleri ve hidrofilyk ilaçları su çekirdek-

leri içinde misafir edebilmeleridir. Yani polar olmayan bir çözücü içindeki miseller çözeltiye hidrofilyk moleküller ilave edildiğinde, bu moleküller ters misellerin içindeki su moleküllerince sarılmaktadır. Örneğin proteinler, enzimler, nükleik asitler, plazmidler ve hidrofilyk ilaçlar bu şekilde ters miseller içinde tutulabilmektedirler. Bu çözeltiler şeffaf olduğundan, spektroskopik çalışmalara da olanak vermektedir (1-3). Ayrıca, ters miseller dinamik sistemlerdir (1). Brown hareketleri ile birbirine çarpan miseller geçici dimerler oluşturabilmekte ve ters misellerin surfaktan çeperlerinin esnek karakteri nedeniyle çarpışma sırasında oluşan iletişim kanalları aracılığı ile içlerinde alıkoydukları molekülleri değiştirebilmektedirler (1, 19).

Bu özellikleri nedeniyle ters misellerin makromoleküller ve ilaçlar için taşıyıcı olarak kullanılabileceği basit bir sistemle gösterilmiştir (1). Şekil 2'de görülen üç ayrı sistemde  $A, A_1$  ve  $A_2$  fazları sulu çözeltileri, B fazı ise AOT ters misellerini taşıyan miseller bir sistemi tanımlamaktadır. Şekil 2a'da başlangıçta A fazında bulunan biyopolimerlerin (bazı enzim ve proteinler) ya da ilaçların (pindolol) daha sonra B fazındaki ters misellerin içine transfer edildiği, Şekil 2b'de B fazındaki ters miseller içinde bulunan moleküllerin A sulu fazına kazanıldığı deneysel olarak gösterilmiştir. Keza Şekil 2c'

de gösterilen çift yönlü transferde,  $A_1$  fazında bulunan biyopolimerlerin B fazındaki ters miseller aracılığı ile  $A_2$  fazına geçirildiği de gözlenmiştir. Sulu çözeltilerin pH'sı, tuz konsantrasyonu ve cinsi, biyopolimerlerin yükleri gibi bazı parametreler optimize edilerek, bu

maddelerin hangi koşullarda ve ne oranda transfer edildiği çalışılmaktadır (1). Bazı maddelerin (tripsin, ribonükleaz, pindolol) çift yönlü transfer ile  $A_1$  ve  $A_2$  fazlarında eşit konsantrasyonların sağlandığı koşullar saptanabilmiştir (1).



Şekil 2 : AOT/isoooktan ters misel çözeltileri ile biyopolimer ve ilaçların a) ileriye doğru, b) geriye doğru ve c) çift yönlü transfer ile taşınması (1).

### NANOKAPSÜL HAZIRLAMADA TERS MİSELLER :

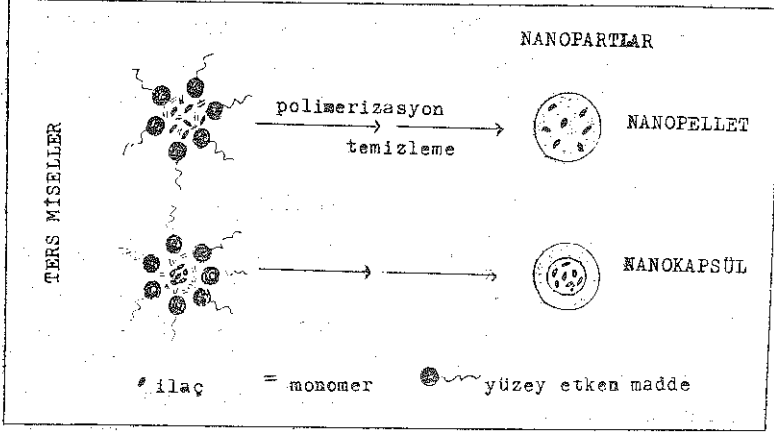
Speiser ve grubu (4) misellerden hareketle nanopartikül hazırlayarak organizmada belli hedeflere ilaç taşımak için kullanmayı denemişlerdir. Ters miselin içine ilaç sokulabildiği gibi, miselin çevresini oluşturan surfaktan moleküller arasına da kolay polimerize olan olefinik monomerler sokulabilmektedir. Daha sonra bu monomerlerin polimerize edilmesi ile

«nanopartiküller» ya da kısaca nanopartikül denilen ilaç taşıyıcı sistemler oluşturulabilmektedir (4). İlaç taşıyan misel polimerizasyon ile sertleştirildikten sonra polar olmayan dış faz elimine edilmekte, surfaktan ve monomer fazlası yıkanmakta ve küresel, çok dar partikül büyüklüğü dağılımına sahip beyaz bir toz elde edilebilmektedir. Bu nanopartikül bundan sonra sulu ortamda fonksiyon göstermeye hazır olmaktadır. Nanopartikülün 80 nm'den küçük olanları elektron

tarama mikroskopu ile ölçülebilir. Partikül çapı için alt limit 20-35 nm arasındadır (1, 4).

Birrenbach ve Speiser (4)'e göre polimerizasyon sırasında reaktanların sterik etkisi ve dielektrik

sabitine göre elde edilen nanopartiküller ya kabuğa benzer bir şekilde polimerleşme sonucu nanokapsül-leri ya da kütleli bir polimerleşmeyle kompakt polimer bir yapı olan nanopelletleri vermektedir (Şekil 3).



Şekil 3 : Nanopartiküllerin ters misellerden hazırlanma yöntemleri (4).

Bu tipteki nanopartikülleri hazırlayabilmek için suda çözünebilir ve polimerize olabilir monomerler ve kapsüllenecek olan ilaç ya da ön ilaç suda çözülür. Daha sonra küçük hacimdeki bu çözelti surfaktanların yardımıyla büyük hacimdeki hidrofobik bir sıvı (örneğin n-hekzan) içinde disperse edilmektedir. Böylece daha sonra yapılacak olan polimerizasyon için son derece ufak reaksiyon bölgeleri oluşturulmaktadır. Polimerizasyondan sonra oluşan sertleştirilmiş miseller çöktürme, ultra-

filtrasyon, dializ veya santrifüj ile ayrılarak temizlenmektedirler (4).

Ters miseller içinde hidrofilik ilaçları kapsüllemek için başka bir çalışma şekli de Luisi ve arkadaşları (1) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu nanopellet tipinde, jelatin matrisi olarak kullanılmıştır. Ters misellerin su çekirdeğinde jelatin ilaç ile birlikte misafir edilmekte ve jelatin daha sonra Gardi ve Nitschmann'ın (20) metoduna göre çapraz bağlanmaktadır. İlaç bu jelatin ağının içinde tutulu kaldığından, surfaktan ve polar

olmayan solvan uzaklaştırılınca, ilaç taşıyan globular bir proteine sahip olmaktadır. İlacın in vivo salımının ya da difüzyon prosesi ile veya proteolitik biyodegradasyon ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Değişik boyutlarda hazırlanabilen bu nanopelletlerden  $W_0 = 10.38$  arasında olanları birbirine yakın difüzyon sabitleri (yaklaşık  $3 \times 10$  cm/sn) vermişlerdir. Bu değer, jelatinin çapraz bağlanmasından önceki difüzyon sabitinden daha küçük bir değerdir ( $10 \times 10$  cm/sn) (1).

Yoshiako ve arkadaşları (21) benzer şekilde fakat miseller çözelti yerine S/Y tipi emülsiyondan hareketle, jelatin partiküler sistemleri hazırlamada partikül büyüklüğünün emülsiyon hazırlama tekniğine bağlı olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada S/Y tipi jelatin emülsiyonunun sonikasyonla hazırlanması ile nanopartiküller (280 nm), kuvvetli çalkalama ile hazırlama da ise daha büyük mikroküreler (14.9  $\mu$ m) elde edilmiştir.

Ters misellerin polimerizasyonu ile nanopartikül hazırlama tekniğine benzer bir teknikle S/Y tipi emülsiyonların polimerizasyonu yapılarak fibrinojen ve albumin mikroküreleri de hazırlanmıştır (22-25). Bu şekilde, 5-fluorourasil (22) ve adriamisin (23-24) gibi toksitesi yüksek ilaçların kanser kemoterapisinde hedeflendirilerek kullanıma çalışmaları da sürdürülmektedir.

Albumin mikrokürelerinin hazırlanmasında, S/Y tipi emülsiyonlarda ilaç ve proteinden oluşan iç faz kürecikleri, ya ısıtılarak ya da formaldehit, glutaraldehit veya 2,3-butadion gibi çapraz bağlayıcı maddeler yardımı ile sertleştirilmektedir (7). Suda çözünen ilaçlar için ilacın partiküllere yüklenmesi bu yöntemde oldukça iyi sonuç vermiştir. Albumin mikrokürelerine, taşıyıcının ağırlık olarak % 35'i kadar ilaç yüklenebilmektedir (26).

### SONUÇ :

Ters misellerde nanokapsülleme influenزا antijeni, tetanus toksoidi ve insan immunoglobulini için başarılı ile kullanılmıştır (4). Biyomoleküller ve ilaçlar için taşıyıcı olarak misellerin kullanımı ile ilgili çalışmalar henüz gelişme safhasındadır. Ne ilaçların miseller içine alım mekanizması iyi anlaşılmıştır, ne de kapsülleme çalışmaları rutin çalışma için yeterince ilerlemiştir. Ancak buna rağmen nanopartiküller, diğer hedeflendirilmiş koloidal ilaç şekilleri arasında ilgi çekici bir alternatif olarak kabul edilmektedirler (26-29).

### KAYNAKLAR

1. Lissant, P.L., Imre, V.E., Jaecle, H., Pande, A., «Microemulsions : Proteins and Nucleic Acids as Guest Molecules», Breimer, D.D., Speiser, P. (eds.), Topics in Pharmaceutical Sci-



- ences 1983, Elsevier Science Publishers B.V., 423-455, (1983).
2. Barbaric, P.L., Luisi, P.L., «Micellar Solubilization of Biopolymers in Organic Solvents-5: Activity and Conformation of -chymotrypsin in: Isooctane-AOT Reverse Micelles» **J. Am. Chem. Soc.**, 103, 4239-4244 (1981).
  3. Martinek, K., Levashov, A.V., Khmel'nitsky, Y.L., Klyachko, N.L., Berezin, I.V. «Colloidal Solution of Water in Organic Solvents: A Microheterogeneous Medium of Enzymatic Reactions» **Science**, 218 (26) 889-890 (1982).
  4. Birrenbach, G., Speiser, P.P., «Polymerized Micelles and Their Use as Adjuvants in Immunology» **J. Pharm. Sci.** 65 (12) 1763-1766 (1976).
  5. Marty, J.J., Oppenheim, R.C., Speiser, P., **Pharma. Acta. Helv.**, 53, 17, (1978).
  6. Öner, F., «Nanopartiküller: Katı Kolloidal İlaç Taşıyıcı Sistemler», **FABAD Farm. Bil. Der.**, 8, 250-260, (1983).
  7. Kreuter, J., «Evaluation of Nanoparticles as Drug Delivery Systems 1. Preparation Method» **Pharm. Acta. Helv.**, 58, 196 (1983).
  8. Shaw, D.J., «Introduction to Colloid and Surface Chemistry», Butterworths and Co. Ltd., London, 71 (1970).
  9. Becher, P., «Emulsions: Theory and Practice», Robert E. Krieger, Publishing Co., Malabar, Florida, 32 (1977).
  10. Rawlins, E.A., «Bentley's Textbook of Pharmaceutics», Baillière, Tindall, London, 44-63 (1982).
  11. Zulauf, M., Eicke, H.F., «Inverted Micelles and Microemulsions in the Ternary System H<sub>2</sub>O/Aerosol-OT/Isooctane as Studied by Foton Correlation Spectroscopy», **Phys. Chem.**, 83 (4), 480-486 (1979).
  12. Wong, M., Thomas, J.K., Nowak, T., «Structure and State of H<sub>2</sub>O in Reversed Micelles-3», **J. Am. Chem. Soc.**, 99: 14 (6), 4730-4736 (1977).
  13. Bhargava, H.N., Narurkar, A., Lieb, L.M., «Using Microemulsions for Drug Delivery», **Pharm. Technology**, 11 (3), 46-54 (1987).
  14. Weiner, N., «Strategies for Formulation and Evaluation of Emulsions and Suspensions: Some Thermodynamic Considerations», **Drug Dev. Ind. Pharm.**, 12 (7), 933-951 (1986).
  15. Prince, L.M., «Microemulsions: Theory and Practice», Academic Press, Inc., New York, 7 (1977).
  16. Hoar, T.P., Schulman, J.H., «Transparent Water-in-Oil Dispersions: The Oleaphathic Hydro-Micelle», **Nature**, 152 3847, 102-103 (1943).
  17. Friberg, S.E., «Microemulsions», **J. Dispersion Science and Technology**, 6 (3), 317-337, (1985).

18. Prince, L.M., «Microemulsions», Lissant, K.Y. (ed.), **Emulsions and Emulsion Technology-Part I**, Marcel Dekker, Inc., New York, 125-177 (1974).
19. Eicke, H.F., Shepherd, J.C.W., Steinemann, A., Exchange of Solubilized Water and Aqueous Electrolyte Solutions Between Micelles in Apolar Media», **J. Coll. Interface Sci.**, 56 (1), 168-176 (1976).
20. Gardi, A., Nitschmann, H., «Intracatenare Vernetzung von Gelatine mit Carbodiimid», **Helv. Chim. Acta**, 55 : 7 (247), 2468-2486 (1972).
21. Yoshioka, T., Hashida, M., Muranishi, C., Sezaki, H. «Specific Delivery of Mitomycin C to the Liver, Spleen and Lung : Nano-and Microspherical Carriers of Gelatin.» **Int. J. Pharm.**, 8, 131 (1981).
22. Miyazaki, S., Hashiguchi, N., Sugiyama, M., Takada, M., Morimoto, Y. «Fibrinogen Microspheres as Novel Drug Delivery Systems for Antitumor Drugs» **Chem Pharm. Bull.** 34, 1370-1375 (1986).
23. Miyazaki, S., Hashiguchi, N., Hou, W., Yokouchi, C., Takada, M., «Antitumor Effect of Fibrinogen Microparticles Containing Adriamycin on Ehrlich Ascites Carcinoma in Mice» **Chem. Pharm. Bull.**, 34, 2632-2636 (1986).
24. Miyazaki, S., Hashiguchi, N., Hou, W., Yokouchi, C., Takada, M., «Preparation and Evaluation in Vitro and in Vivo of Fibrinogen Microspheres Containing Adriamycin» **Chem. Pharm. Bull.**, 34, 3384-3393 (1986).
25. Ishizaka, T., Motojima, M., Kounosu, S., Koishi, M., «In Vitro Release of Poly (ethylene oxides) from Serum Albumin Microspheres», **Chem. Pharm. Bull.** 34, 3341-3347 (1986).
26. Douglas, S.J., Davis, S.S., Illum, L. «Nanoparticles in Drug Delivery» **CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems.** 3, 3, 233-261 (1987).
27. Davis, S.S., «Colloids as Drug-Delivery Systems», **Pharm. Technology**, 2, 5, 71-88 (1981).
28. Singh, M., Ravin, L.J., «Parenteral Emulsions as Drug Carrier Systems», **J. Pharm. Sci. Tech.**, 40 (1), 34-39 (1986).
29. Gurny, R., Boye, T., Ibrahim, «Ocular Therapy with Nanoparticulate Systems for Controlled Drug Delivery» **J. Controlled Release**, 2, 353-361 (1985).