



РЕПУБЛИКА СЕВЕРНА МАКЕДОНИЈА
УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВО СКОПЈЕ
ШКОЛА ЗА ДОКТОРСКИ СТУДИИ

ОЗО-И

Број: 11-20/189
Датум: 06.04.2023 година
Скопје

Врз основа на Правилникот за условите, критериумите и правилата за запишување и студирање на трет циклус студии - докторски студии на Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје (Универзитетски гласник бр. 530 од 31 декември 2020 година), се дава следнава

Изјава

Јас, проф. д-р Марија Главаш Додов, како ментор на Љубица Михаилова, изјавувам дека приложениот труд е финалниот и истиот може да биде објавен во Збирката дисертации од докторската школа на Репозиториумот на трудови на УКИМ.

Скопје, 06.04.2023 година.

Ментор



УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ – СКОПЈЕ

ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ

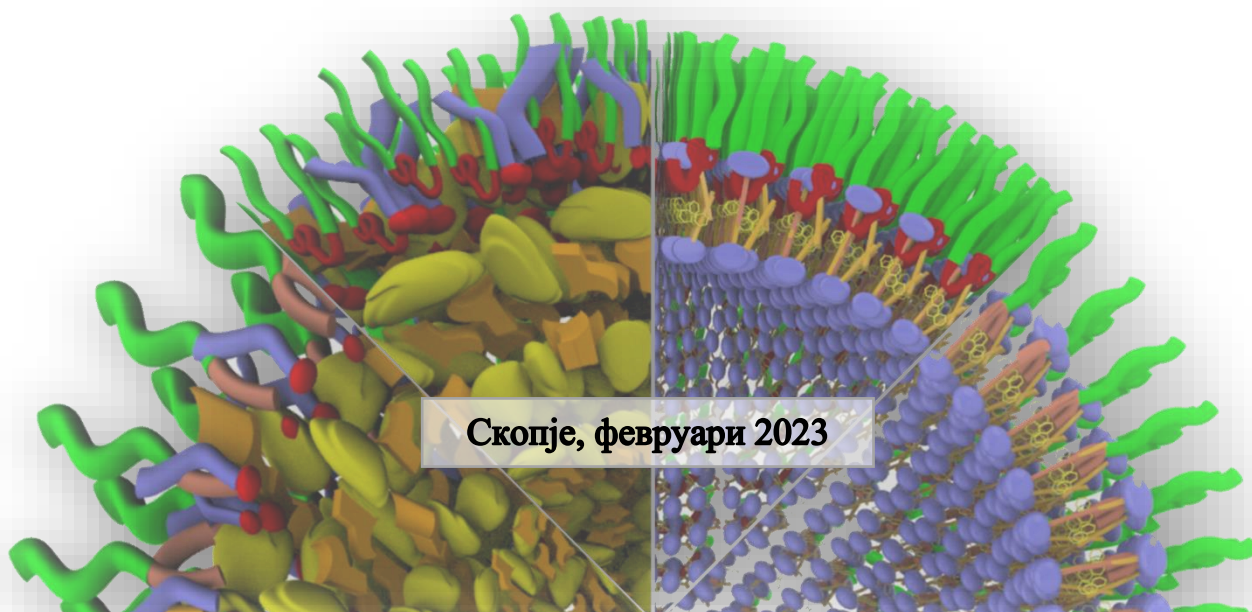
ИНСТИТУТ ЗА ФАРМАЦЕВТСКА ТЕХНОЛОГИЈА



Љубица Васил Михаилова

**ДИЗАЈН, ФОРМУЛАЦИЈА,
КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И *IN VIVO*
СТУДИИ НА ЕФИКАСНОСТ НА
ЛИПИДНИ НАНОСИСТЕМИ СО
ВГРАДЕН ЕКСТРАКТ ОД *CANNABIS*
SATIVA ЗА ПОТЕНЦИЈАЛЕН ТРЕТМАН
НА ЕПИЛЕПСИЈА**

- Докторски труд -



Скопје, февруари 2023



SS. CYRIL AND METHODIUS UNIVERSITY IN SKOPJE

FACULTY OF PHARMACY

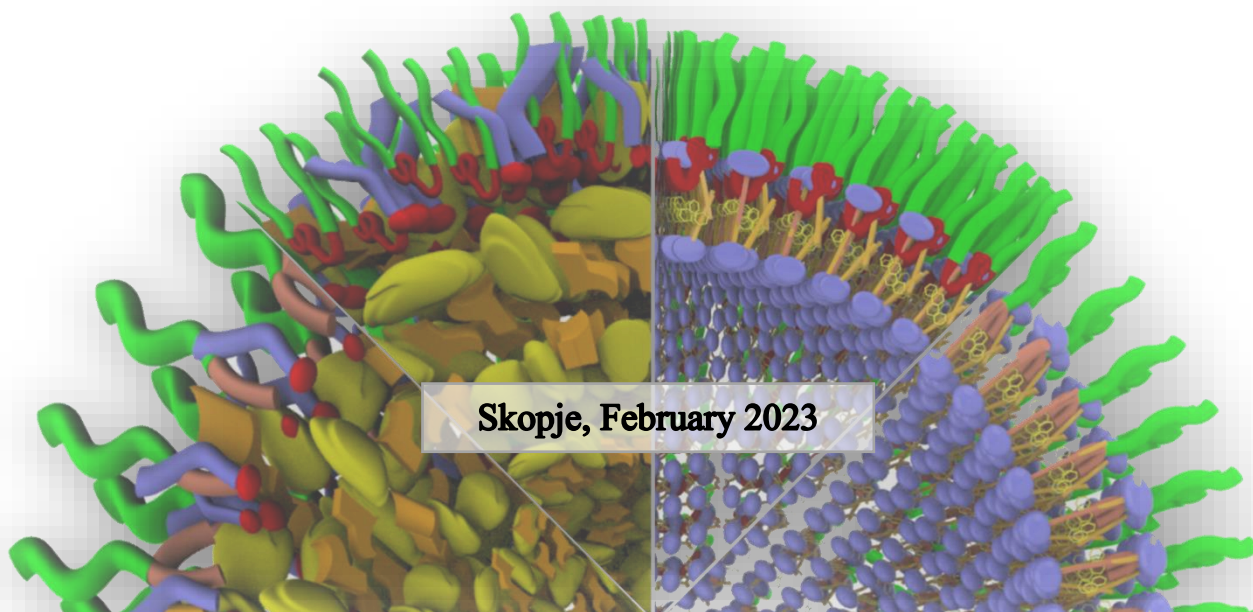
INSTITUTE OF PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY



Ljubica Vasil Mihailova

**DESIGN, FORMULATION,
CHARACTERIZATION AND *IN VIVO*
EFFICACY STUDIES OF LIPID
NANOSYSTEMS LOADED WITH
CANNABIS SATIVA EXTRACT FOR
POTENTIAL TREATMENT OF
EPILEPSY**

- Doctoral dissertation -



Докторанд: Љубица Васил Михаилова

Тема: Дизајн, формулација, карактеризација и *in vivo* студии на ефикасност на липидни наносистеми со вграден екстракт од *Cannabis sativa* за потенцијален третман на епилепсија

Научна област: Фармацевтска технологија

Ментор: Проф. д-р Марија Главаш Додов
Институт за фармацевтска технологија
Фармацевтски факултет
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ – Скопје

Рецензентска комисија: Проф. д-р Катерина Горачинова – претседател
Институт за фармацевтска технологија
Фармацевтски факултет
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ – Скопје

Проф. д-р Марија Главаш Додов – член ментор
Институт за фармацевтска технологија
Фармацевтски факултет
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ – Скопје

Проф. д-р Андреас Цимер – член
Оддел за фармацевтска технологија и биофармација
Институт за фармацевтски науки
Универзитет во Грац

Проф. д-р Ѓоше Стефков – член
Институт за фармакогнозија
Фармацевтски факултет
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ – Скопје

Проф. д-р Никола Гешковски – член
Институт за фармацевтска технологија
Фармацевтски факултет
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ – Скопје

Ден на одбрана: 9 февруари 2023 год.

*На моите родители,
за љубовта,
за поддршката,
за трпението.*

Посветено на Ѓорге и Елена (Аја).

Благодарност

Докторската дисертација е изработена во лабораториите на Фармацевтскиот факултет во Скопје. Дел од експерименталната работа беше спроведена во Одделот за фармацевтска технологија и биофармација при Универзитетот во Грац, Австрија како дел од СЕЕРУС – СЕКА мрежата за мобилност (СШ-RS-1113), како и во Институтот за невробиологија при Бугарската академија на науките како дел од проектот „*In vivo* студии за определување на потенцијалната активност на наносистеми со вграден екстракт од *Cannabis sativa* за третман на болести на централниот нервен систем“. Изразувам благодарност до сите кои директно или индиректно беа вклучени во организацијата и реализацијата на експерименталната работа.

Со најдлабока и искрена почит ја изразувам својата благодарност на мојот ментор и учител проф. д-р Марија Главаш Додов, за огромната поддршка, пренесените знаења и искуства, за размислувањата, советите и довербата изразена преку пружената слобода да ги реализирам моите научноистражувачки идеи. Огромно благодарам за Вашата несебична секојдневна борба за постигнување на нашите цели и замисли.

Посебна благодарност изразувам на мојот колега и пријател Душко Шалабалија чиј придонес за изработката на овој докторски труд е непроценлив. Благодарам за несебичната помош и другарската поддршка, за разбирањето и трпението. Ти благодарам што си дел од тимот од самиот почеток на нашите истражувања.

На проф. д-р Никола Гешковски за стручните совети и дискусии кои помогнаа во финалното обликување на трудот, како и за соработката и безрезервната поддршка при експерименталната работа. Неизмерно благодарам за пренесеното знаење и вештина за работа со клеточни култури.

Голема благодарност на проф. д-р Ѓоше Стефков за пренесеното знаење, за идејата, за сите сугестии и совети, за целокупната помош и поддршка кои се од огромно значење за мене и оваа докторска дисертација.

Благодарност до проф. д-р Катерина Горачинова за несебичната поддршка, за стручните совети и размислувања.

На проф. д-р Маја Симоноска Црцаревска за пренесеното знаење, за поддршката, несебичната помош и советите при изработката на докторскиот труд.

Благодарам на проф. д-р Петре Макрески од Природноматематичкиот факултет и на проф. д-р Марија Петрушевска од Медицинскиот факултет за научната соработка и корисните стручни совети.

Особена благодарност изразувам до проф. д-р Андреас Цимер за соработката, стручните совети и пружената можност дел од експериментите на оваа докторска дисертација да бидат сработени под Ваше менторство.

На проф. д-р Јана Чекаларова за одвоеното време во изработката и евалуацијата на антиконвулзивната активност, како и за научната соработка и стручните совети.

Им благодарам на колегите од Фармацевтскиот факултет за досегашната соработка и пријателство. Особено се заблагодарувам на колегите од Институтот за фармакогнозија за постојаната и несебична помош при изработката на аналитичкиот дел од ова истражување.

Најголема и искрена благодарност должам на Елена и Ѓорге, како и на целото мое семејство за секојдневната поддршка, за љубовта, за трпението, за разбирањето.

Изјавувам дека докторскиот труд е оригинален труд што го имам изработено самостојно.



Љубица Михаилова

Изјавувам дека електронската верзија на докторскиот труд е идентична со отпечатениот докторски труд.

Љубица Михаилова, с.р.

Мислењата во поглед на доставените авторезимеа на докторскиот труд под наслов „Дизајн, формулација, карактеризација и *in vivo* студии на ефикасност на липидни наносистеми со вграден екстракт од *Cannabis sativa* за потенцијален третман на епилепсија“ се дадени во Прилог 1.

Листа на објавени трудови поврзани со истражувањата во докторската дисертација (Прилог 2)

Mihailova, Lj., Tchekalarova, J., Shalabalija, D., Geskovski, N., Stoilkovska Gjorgievska, V., Stefkov, G., Krasteva, P., Simonoska Crcarevska, M., Glavas Dodov, M. (2022). Lipid nano-carriers loaded with *Cannabis sativa* extract for epilepsy treatment – *in vitro* characterization and *in vivo* efficacy studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 111(12):3384-3396. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.09.012> IF: 3.784.

Mihailova, Lj., Shalabalija, D., Geskovski, N., Simonoska Crcarevska, M., Glavas Dodov, M. (2022). Insight into the efficacy of lipid nano-systems for brain delivery – uptake and internalization pathways in different Cell culture lines. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin* 68 (Suppl 1), 219-220. DOI: <https://doi.org/10.33320/maCEd.pharm.bull.2022.68.03.104>

Shalabalija, D., **Mihailova, Lj.**, Simonoska Crcarevska, M., Geskovski, N., Glavas Dodov, M. (2022). Lipid nano-carriers with herbal extracts for targeted brain delivery and treatment of CNS disorders. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin* 68 (Suppl 1), 217-218. DOI: <https://doi.org/10.33320/maCEd.pharm.bull.2022.68.03.103>

Markova, E., Taneska, L., Kostovska, M., Shalabalija, D., **Mihailova, Lj.**, Glavas Dodov, M., Makreski, P., Geskovski, N., Petrushevska, M., Taravari, N.A., Simonoska Crcarevska, M. (2022). Design and evaluation of nanostructured lipid carriers loaded with *Salvia officinalis* extract for Alzheimer's disease treatment. *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials* DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.35006> IF: 3.43.

Shalabalija, D., **Mihailova, Lj.**, Simonoska Crcarevska, M., Cvetkovikj Karanfilova, I., Ivanovski, V., Kapedanovska Nestorovska, A., Novotni, G., Glavas Dodov, M. (2021). Formulation and optimization of bioinspired rosemary extract loaded PEGylated nanoliposomes for potential treatment of Alzheimer's disease using design of experiments. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* Volume 63, 102434. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102434> IF: 4.95.

Mihailova, Lj., Shalabalija, D., Zimmer, A., Geshkovski, N., Stefkov, G., Simonoska Crcarevska, M., Glavas Dodov, M., 2021. Cytotoxicity and Cellular uptake of *Cannabis sativa* extract loaded nanostructured lipid carriers on *hCMEC/D3* cells, Abstract book of 12th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Virtual meeting, May 11th – 14th, 2021.

Shalabalija, D., **Mihailova, Lj.**, Simonoska Crcarevska, M., Zimmer, A., Geshkovski, N., Glavas Dodov, M., 2021. *In vitro* cytotoxicity evaluation on nanoliposomes intended for brain drug delivery, Abstract book of 13th Central European Symposium on Pharmaceutical technology, Gdansk, Poland, September 16th – 18th, 2021.

Karakash, I., Vasileska, J., Shalabalija, D., **Mihailova, Lj.**, Glavas Dodov, M., Slaveska Raicki, R., Simonoska Crcarevska, M. (2020). Freeze-drying of nanostructured lipid

carriers loaded with *Salvia off.* extract for Alzheimer's disease treatment. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin* 66 (Suppl 1), 219-220.

DOI: <https://10.33320/maced.pharm.bull.2020.66.03.109>

Kostovska, M., Markova, E., Taneska, L., Shalabalija, D., **Mihailova, Lj.**, Glavash Dodov, M., Vranic, E., Simonoska Crcarevska, M. (2018). Nanostructured lipid carriers for Alzheimer's disease treatment: Influence of solid/liquid lipid ratio on physico-chemical properties. *Acta Pharmaceutica Hungarica* 3, 130-131.

Mihilova, Lj., Shalabalija, D., Simonoska Crcarevska, M., Vranic, E., Glavas Dodov, M. (2018). Determination of the protein corona stability complex of nanoliposomes in physiological mediums. *Acta Pharmaceutica Hungarica* 3, 174.

Учество во проекти и остварени престои/соработки поврзани со докторската дисертација

1. Формулациски развој на биоинспирирани нанолипозоми како носачи на активни супстанции за третман на Алцхајмерова болест (национален проект финансиран од Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје, 2016-2017 година).

2. Дизајн, развој и оптимизација на наноструктурирани липидни честички со енкапсулиран екстракт од жалфија за третман на Алцхајмерова болест (национален проект финансиран од Фармацевтскиот факултет во Скопје, 2018-2019 година).

3. СЕЕПУС мрежа за мобилност, СЕКА PharmTech CIP-RS-1113-02-1819-Central European Knowledge Alliance for Teaching, Learning and Research in Pharmaceutical Technology (престој на Универзитет во Грац, Австрија, Институт за фармацевтска технологија и биофармација, 2019 година).

4. *In vivo* студии за определување на потенцијалната активност на нано-системи со вграден екстракт од *Cannabis sativa* за третман на болести на централниот нервен систем (соработка помеѓу Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје и Бурарската академија на науките, 2019-2020 година).

5. Фармакогностички, фитохемиски, фармаколошко-биолошки и молекуларни испитувања на видови на коноп (*Cannabis spp.*) и соодветни биолошки преработки (II фаза), проект помеѓу Агенција за лекови и медицински средства – МАЛМЕД и Фармацевтски факултет во Скопје, 2020-2023 година.

6. СЕЕПУС мрежа за мобилност, СЕКА PharmTech CIP-RS-1113-02-1819-Central European Knowledge Alliance for Teaching, Learning and Research in Pharmaceutical Technology (престој на Универзитет во Грац, Австрија, Институт за фармацевтска технологија и биофармација, 2022 година).

7. Протеомичко профилирање на протеинската корона формирана на површината на наночестичките по нивна инкубација во *hCMC/D3* клеточен медиум (меѓународен проект финансиран од Joint Research Centre на Европската комисија, 2022-2023 година).

ДИЗАЈН, ФОРМУЛАЦИЈА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И *IN VIVO* СТУДИИ НА ЕФИКАСНОСТ НА ЛИПИДНИ НАНОСИСТЕМИ СО ВГРАДЕН ЕКСТРАКТ ОД *CANNABIS SATIVA* ЗА ПОТЕНЦИЈАЛЕН ТРЕТМАН НА ЕПИЛЕПСИЈА

– А п с т р а к т –

Многу истражувања се насочени кон испитување на патофизиологијата на епилепсијата како сложена невролошка болест, но и покрај тоа истата сè уште претставува главен предизвик при развојот на ефикасни терапевтски пристапи со цел контролирање на нападите. Имено, за успешно менаџирање на болестите на централниот нервен систем (ЦНС) како што се невродегенеративните болести, нападите на паника, менингитисот, туморите на мозокот и секако епилепсијата, потребно е постигнување на релативно високи концентрации на активната компонента на местото на делување. Дополнително, фармаколошкиот одговор од активната компонента зависи од бројни фактори, при што примарна улога има пенетрацијата преку крвно-мозочната бариера (КМБ) или способноста на активната компонента да се врзе за специфични протеински транспортери со цел да се олесни транспортот преку мембраната. Дополнително, за да го постигнат својот фармаколошки ефект, молекулите на активните компоненти потребно е да стигнат во доволна количина на целното место на делување. Оттука е јасно дека е потребно да се надминат повеќе препреки, а КМБ се смета како една од најкомплексните бариери за активните компоненти насочен кон мозокот.

Земајќи ги во предвид најновите податоци кои укажуваат на потенцијалните антиконвулзивни ефекти на канабидиол (*CBD*) и канабиодиолна киселина (*CBDA*), како и предностите на липидните наносистеми како носачи на активни компоненти за насочена испорака во мозокот, целта на оваа докторска дисертација беше во насока на подготовка и *in vitro* физичко-хемика и биофармацевтска карактеризација, како и *in vivo* евалуација на нанопозоми и наноструктурирани липидни носачи со екстракт од *Cannabis sativa* наменет за безбеден и ефикасен транспорт преку КМБ и третман на епилепсија.

Во текот на првата фаза од оваа докторска дисертација беа подготвени два различни типа на екстракти од *Cannabis sativa* и тоа: течен екстракт добиен без претходна декарбоксилација на растителниот материјал (од суви цветови (*FA*) и суви делови од целата херба (*CA*)) и сув екстракт добиен со лиофилизација (од суви цветови (*FE*) и суви делови од целата херба (*CE*)). Согласно добиените резултати од *in vitro* испитувањето на антиоксидативниот капацитет (*ORAC*) и *in vitro* евалуацијата на цитотоксичноста (*MTT*), како и фитохемиската карактеризација на подготвените екстракти со акцент на главните канабиноиди, *CE* беше селектиран да биде инкорпориран во липидни наносистеми. Во таа насока, беше направена целосна фитохемиска карактеризација на избраниот лиофилизиран сув екстракт од целата херба од растението *Cannabis sativa*, каде што *CBDA* беше избрана како маркер-компонента при евалуацијата на ефикасноста на енкапсулација, како и во одредувањето на брзината на ослободување на *CE* од подготвените формулации.

Во следната фаза од истражувањата, беа подготвени и целосно карактеризирани два различни типа на липидни формулации и тоа на празни и полни (со вграден *CE*) нанопозоми (*NL*) и наноструктурирани липидни носачи (*NLC*), соодветно. Формулациите се разликуваа по присуството и видот на полимерот за стерна стабилизација. Имено, во првата група на формулации, полиетилен гликол (*PEG*) беше употребен како стелт полимер (добиени се празни формулации *NL1* и *NLC1*, формулации со вграден *CE*, *NLICE* и *NLCICE*), а во втората група полксамер (*POL*) беше употребен

како стелт полимер (добиени се празни формулации *NL2* и *NLC2*, формулации со вграден *CE*, *NL2CE* и *NLC2CE*). Врз основа на добиените *TEM* прикази, сите формулации се карактеризираа со сферична форма и мазна површина, со z-просечен дијаметар од 105-120 nm за празните формулации и од 111-160 nm за формулациите со вграден *CE*, унимодална дистрибуција на честичките според големина ($PDI < 0,3$) и негативен зета потенцијал (~ -30 mV). Сите подготвени формулации покажаа висок процент на ефикасност на енкапсулација на *CE* ($>87\%$). Студиите на стабилност покажаа дека кога подготвените формулации беа инкубирани во физиолошки релевантен медиум, не доаѓа до значителна промена во средната големина на честичките на наносистемите. Од друга страна, по 24 часа време на инкубација во хумана плазма, промената во средната големина на честичките на подготвените формулации беше во насока на зголемување, што најверојатно се должи на процесот на формирање на протеинска корона. Примената на *ATR-FTIR* анализа го потврди присуството на стелт полимерите на површината на честичките на наносистемите. Дополнително, присуството на *PEG* и *POL* придонесе за помал процент на адсорбирани плазма протеини на површината на честичките, во споредба со подготвените формулации без полимер за стерна стабилизација.

Сите подготвени формулации резултираа со продолжено ослободување на *CE*, иако беа забележани разлики во зависност од типот на наносистемот, како и видот на полимерот за стерна стабилизација на честичките. Врз основа на добиените коефициенти на корелација, моделот кој најдобро ја опиша кинетиката на ослободување на *CE* беше моделот на *Peppas-Sahlin*. Што се однесува до антиоксидативниот капацитет, сите формулации покажаа статистички значајно поголем антиоксидативен потенцијал во споредба со *CE*.

Подготвените липидни наносистеми не покажаа цитотоксичност во испитуваниот концентрациски опсег, со исклучок намалувањето на вијабилноста на клетките по инкубација со најголемата концентрација на *NLC1* и *NLC2* ($100 \mu\text{g/mL}$), што најверојатно се должи на трошење на клеточната енергија, а со тоа и намалување на метаболната активност на клетките. Успешната интернализација на нанолипозоми и наноструктурирани липидни носачи во *hCMEC/D3* и *SH-SY5Y* клеточните линии беше потврдена со помош на флуоресцентна и конфокална микроскопија, која го поддржува нивниот потенцијал за безбеден транспорт преку КМБ, како и ефикасен третман на болести на ЦНС. Кога станува збор за евалуација на точниот механизам на интернализација на наносистемите во гореспоменатите клеточни култури, треба да се истакне дека наносистемите може да се транспортираат и интернализираат со повеќе механизми, а според добиените резултати липидните наносистеми најверојатно следат енергетски-зависен механизам на интернализација, како и транспорт со пасивна дифузија.

Добиените резултати од *in vivo* студиите за антиконвулзивна активност кај глувци покажаа дека сите наносистеми значително го зголемуваат времето на латенција за миоклонични, клонични и тонични напади. И двата типа на системи покажаа различен потенцијал во спречувањето на нападите. Најзабележителна беше помалата активност на *NL2CE* во споредба со другите наносистеми, што најверојатно се должи на полимерот за стерна стабилизација (*POL*) на честичките, структурата на наносистемот, како и неговите карактеристики.

Врз основа на сите истражувања направени во рамките на оваа докторска дисертација, инкорпорирањето на *CE* во нанолипозоми и наноструктурирани липидни носачи, каде што *CBDA* беше присутна како доминантен канабиноид, доведе до зголемување на антиконвулзивната активност со цел успешно менаџирање со различните типови на епилептични напади. Во таа насока, потребно е да се нагласи дека физичко-хемиските карактеристики на липидните наносистеми придонесуваат за нивното *in vivo* однесување. Имено, полимерот за стерна стабилизација на честичките не само што влијае врз стабилноста на системите, туку влијае и врз нивните биофармацевтски особини во насока на подобрување на биорасположливоста на системите, притоа намалувајќи ја

нивната токсичност *in vivo*, што е од особено значење кога станува збор за третман на епилепсија.

Клучни зборови: нанолипозоми, наноструктурирани липидни носачи, крвно-мозочна бариера, канабидиолна киселина, антиконвулзивна активност, епилепсија

DESIGN, FORMULATION, CHARACTERIZATION AND *IN VIVO* EFFICACY STUDIES OF LIPID NANOSYSTEMS LOADED WITH *CANNABIS SATIVA* EXTRACT FOR POTENTIAL TREATMENT OF EPILEPSY

– A b s t r a c t –

As a complex neurological disease, epilepsy is still remaining a major challenge for the development of therapeutic approaches to control the seizures, in spite of the fact that a lot of research has been done in order to examine and understand the epileptic pathophysiology. For successful management of central nervous system (CNS) diseases such as neurodegenerative diseases, epilepsy, panic attacks, meningitis and brain tumors, high drug concentrations at the site of action have been of utmost importance. Additionally, pharmacological response provoked by potentially active substances depends on numerous factors, like penetration through blood-brain barrier (BBB) or their ability to attach on specific protein transporters in order to facilitate their transfer across the membrane, uptake and efficacy. To achieve its pharmacological effect, the drug molecule needs to reach its target tissue in sufficient quantity upon administration. However, many obstacles need to be overcome along the way, and the BBB is considered the most challenging for the drugs acting on the CNS.

Taking into consideration the latest reported beneficial anticonvulsant effects of cannabidiol (*CBD*) and cannabidiolic acid (*CBDA*) for clinical applications and the advantages of lipid nanosystems as carriers for targeted brain delivery, the aim of this study was set in direction of *in vitro* physico-chemical and biopharmaceutical characterization and *in vivo* evaluation of nanoliposomes and nanostructured lipid carriers loaded with *Cannabis sativa* extract intended for safe and efficient transport via blood-brain barrier and treatment of epilepsy.

During the first phase of this doctoral dissertation, two different types of *Cannabis sativa* extracts were prepared: liquid extract obtained without prior decarboxylation of the starting material (from dry flowers (FA) and dry parts of the whole herb (CA)) and dry lyophilized extract (from dry flowers (FE) and dry parts of the whole herb (CE)). According to the obtained results from the *in vitro* antioxidant capacity assay (ORAC) and *in vitro* cytotoxicity test (MTT), as well as, the phytochemical characterization of the prepared extracts with emphasis on the main cannabinoids, CE was selected to be incorporated in the lipid nanosystems. In this sense, complete phytochemical characterization was done of the selected lyophilized dry extract of the whole herb of the *Cannabis sativa* plant, where *CBDA* was selected as marker compound which was further used in encapsulation efficacy evaluation as well as in determination of the release rate of CE from the prepared formulations.

In the next research phase, two different types of four formulations of blank and four formulations of CE loaded nanoliposomes (*NL*) and nanostructured lipid carriers (*NLC*) were prepared and thoroughly characterized. The formulations differed in the presence and type of the polymer for steric stabilization. Namely, in the first group of formulations polyethylene-glycol 2000 (*PEG*) was used as stealth polymer (blank formulations *NL1* and *NLC1*, CE loaded formulations *NL1CE* and *NLC1CE*), and in the second group poloxamer 407 (*POL*) was used as stealth polymer (blank formulations *NL2* and *NLC2*, CE loaded formulations *NL2CE* and *NLC2CE*). Based on the obtained TEM micrographs, all formulations were characterized with spherical form and smooth surface, with z-average diameter 105-120 nm for blank formulations and 111-160 nm for CE loaded formulations, following unimodal particle size distribution ($PDI < 0.3$) and negative zeta potential (~ -30 mV). CE loaded formulations were characterized

with high percent of encapsulation efficacy (>87%). The stability studies showed that when incubated in physiologically relevant medium the nanosystems did not change their mean size significantly. On the other hand, there was slight increase in the particle mean size of the prepared formulations after 24 h incubation time in human plasma, which is probably due to the process of protein corona formation. The ATR-FTIR analysis confirmed the presence of stealth polymers onto the nano-carriers' surface. Additionally, the presence of the *PEG* and *POL* contributed to lower plasma protein adsorption, when compared to the formulations with no stealth polymer.

All prepared samples resulted in prolonged CE release, which was dependent on the type of nano-carrier system and the type of stealth polymer used. Based on the obtained correlation coefficients, the model that best described the release kinetics of the CE was Peppas-Sahlin. Regarding the antioxidant capacity, all formulations showed statistically significant higher antioxidant capacity compared to CE.

The prepared lipid nanosystems did not show cytotoxicity, with the exception of the reduced percentage of cell viability by the highest concentration of *NLC1* and *NLC2*, which has been probably due to the consumption of cellular energy and decrease in metabolic activity of the cells. The successful internalization of nanoliposomes and nanostructured lipid carriers in *hCMEC/D3* and *SH-SY5Y* cell lines was confirmed using fluorescent and confocal microscopy, which supports their potential for safe targeting and transport through the BBB, as well as effective treatment of CNS diseases. When it comes to the evaluation of the exact uptake mechanism of the nanosystems by abovementioned cell culture lines, it should be highlighted that nanosystems could be transported and internalized by multiple pathways, where according to the obtained results they most likely follow ATP-dependent internalization mechanism as well as transport by passive diffusion.

Obtained results from the *in vivo* studies of the anticonvulsant activity in mice indicated that all nanosystems significantly elevated the latencies for myoclonic, clonic and tonic seizures. Both types of systems have shown different potential in preventing seizures. The most noticeable was the lower activity of *NL2CE* compared to the other nanosystems, which was probably affected by the type of stealth polymer, the structure of this nanosystem and its properties.

Based on all research done within this doctoral dissertation, the incorporation of CE into nanoliposomes and nanostructured lipid carriers, where *CBDA* was present as dominant cannabinoid, led to an increase in the anticonvulsant activity in order to successfully manage the different types of epileptic seizures. Moreover, it should be emphasized that, the physico-chemical characteristics of the lipid nanosystems contribute to their *in vivo* behaviour. Additionally, the polymer for steric stabilization of the particles not only affects the stability of the systems, but also affect their biopharmaceutical properties in order to improve the bioavailability of the systems, while reducing their toxicity *in vivo*, which is of particular importance when it comes to the treatment of epilepsy.

Key words: nanoliposomes, nanostructured lipid carriers, blood-brain barrier, neurons, cannabidiolic acid, anticonvulsant activity, epilepsy

Содржина

– АПСТРАКТ –	15
– АБСТРАКТ –	19
1. ВОВЕД	25
2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА	29
2.1. КРВНО-МОЗОЧНА БАРИЕРА	31
2.1.1. Транспортни механизми на КМБ	31
2.1.2. <i>In vitro</i> испитување на премиот на наносистемите и АК низ КМБ	33
2.2. ЕПИЛЕПСИЈА	35
2.2.1. Видови на напади	35
2.2.2. <i>In vitro</i> и <i>in vivo</i> модели на епилепсија	36
2.2.3. Терапевтски пристапи и конвенционална терапија	36
2.3. <i>CANNABIS SATIVA L.</i> (F. <i>CANNABACEAE</i>)	38
2.3.1. Хемиски состав	38
2.3.2. Фармакокинетика на канабиноидите	40
2.3.3. Фармаколошки ефекти на канабиноидите	40
2.3.4. Токсичност на канабиноидите	41
2.4. ЛИПИДНИ НАНОСИСТЕМИ	42
2.4.1. Липозоми како носачи на активни компоненти	43
2.4.2. Наноструктурирани липидни носачи	45
2.4.3. Полимери за стерна стабилизација на наносистемите	46
3. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО	49
4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДЕЛ	53
4.1. МАТЕРИЈАЛИ И ОПРЕМА ЗА ПОДОГOTOВКА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА НА ФОРМУЛАЦИИТЕ	55
4.1.1. Материјали	55
4.1.2. Опрема	57
4.2. МЕТОДИ ЗА ПОДГОТОВКА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА НА ФОРМУЛАЦИИТЕ	58
4.2.1. Подготовка на екстракти од <i>Cannabis sativa</i> (CSE)	58
4.2.1.1. Добивање на течен екстракт без претходна декарбоксилација на појдовниот материјал	58
4.2.1.2. Добивање на сув лиофилизиран екстракт	58
4.2.2. Подготовка на липидни наносистеми	58
4.2.2.1. Подготовка на нанолипозоми (NL)	59
4.2.2.2. Подготовка на наноструктурирани липидни носачи (NLC)	60
4.2.3. Фитохемиска карактеризација на избраниот екстракт од <i>Cannabis sativa</i>	61
4.2.4. Микроскопски изглед на подготвените формулации	61
4.2.5. Определување на големина, дистрибуција по големина и z-потенцијал на NL и NLC	62
4.2.6. <i>In vitro</i> испитување на физичката стабилност на подготвените липидни наносистеми	62
4.2.7. Фурие трансформна инфрацрвена спектроскопија (ATR-FTIR)	62
4.2.8. Диференцијална скенирачка калориметрија (DSC) на формулациите и CE	63
4.2.9. Определување на ефикасност на енкапсулација на CE во подготвените NL и NLC	63
4.2.10. <i>In vitro</i> постапка за определување на брзината и кинетиката на ослободување на фитоканабиноидите од подготвените липидни наносистеми	63
4.2.11. Квантитативна карактеризација на наносистем – протеин комплексите	64
4.3. Одредување на антиоксидативниот потенцијал на подготвените екстракти и формулации	65
4.4. <i>IN VITRO</i> ИСПИТУВАЊА НА ПОДГОТВЕНИТЕ ФОРМУЛАЦИИ НА ИЗБРАНИ КЛЕТОЧНИ КУЛТУРИ	66
4.4.1. Подготовка на hCMEC/D3 клеточна линија	66

4.4.2. Подготовка на SH-SY5Y клеточна линија	66
4.4.3. Испитување на инхибиција на раст на клетки од hCMES/D3 клеточна линија со подготвените екстракти и липидни наносистеми	67
4.4.4. Испитување на цитотоксичност на клетки од hCMES/D3 клеточна линија	67
4.4.5. Студии на интернализација на липидните наносистеми во живи клетки со флуоресцентна микроскопија	68
4.4.6. Студии на клеточна интернализација на липидните наносистеми со конфокална микроскопија.....	68
4.4.7. Квантитативни студии на клеточно преземање на липидните наносистеми во избрани клеточни култури.....	69
4.5. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА НА РЕЗУЛТАТИТЕ ДОБИЕНИ ОД <i>IN VITRO</i> ОПРЕДЕЛУВАЊЕТО НА АНТИОКСИДАТИВНИОТ ПОТЕНЦИЈАЛ И СТУДИИТЕ НА ИЗБАРИ КЛЕТОЧНИ КУЛТУРИ	69
4.6. <i>IN VIVO</i> СТУДИИ НА ЕФИКАСНОСТ НА ПОДГОТВЕНИТЕ ЛИПИДНИ НАНОСИСТЕМИ.....	69
4.6.1. Дозирање на подготвените формулации за примена кај ICR глвци.....	70
4.6.2. Испитување на антиконвулзивната активност на подготвените формулации преку индуцирање напад со тест за максимален електро шок (MES).....	70
4.6.3. Испитување на антиконвулзивната активност на подготвените формулации со индукција на психомотори напади со 6 Hz.....	70
4.6.4. Испитување на антиконвулзивната активност на подготвените формулации со индукција на напади преку субкутана администрација на пентилентетразол (scPTZ)	70
4.6.5. Испитување на антиконвулзивната активност на подготвените формулации со индукција на напади преку интравенска администрација на пентилентетразол (ivPTZ)...	71
4.6.6. Испитување на невротоксичноста на подготвените формулации со рота-род тест	71
4.6.7. Статистичка анализа	71
5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	73
5.1. КАРАКТЕРИЗАЦИЈА НА ЕКСТРАКТИ ПОДГОТВЕНИ ОД РАСТЕНИЕТО <i>CANNABIS SATIVA</i>	75
5.2. ФИЗИЧКО-ХЕМИСКА И БИОФАРМАЦЕВТСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА НА ПОДГОТВЕНИТЕ ЛИПИДНИ НАНОСИСТЕМИ... 79	
5.2.1. Морфолошки изглед.....	79
5.2.2. Големина на честички, дистрибуција на честички по големина и површински потенцијал на липидните наносистеми	80
5.2.3. Стабилност на формулациите во фосфатен пуфер pH 7,4 и хумана плазма.....	83
5.2.4. Квантитативна карактеризација на наносистем – протеин комплексите	87
5.2.5. Фурие трансформна инфрацрвена спектроскопија	92
5.2.6. Диференцијално скенирачка калориметрија (DSC).....	94
5.2.7. <i>In vitro</i> брзина на ослободување на CE од подготвените формулации и кинетика на ослободување	97
5.2.8. Одредување на антиоксидативниот потенцијал на подготвените екстракти и формулации	98
5.3. <i>IN VITRO</i> ИСПИТУВАЊЕ НА ЦИТОТОКСИЧНОСТА И КЛЕТОЧНАТА ИНТЕРНАЛИЗАЦИЈА НА ЛИПИДНИТЕ НАНОСИСТЕМИ НА ИЗБАРИ КЛЕТОЧНИ КУЛТУРИ.....	100
5.3.1. <i>In vitro</i> испитување на вијабилноста на hCMES/D3 клетките по инкубација со подготвените формулации.....	100
5.3.2. <i>In vitro</i> испитување на цитотоксичноста на hCMES/D3 клетките по инкубација со подготвените формулации.....	103
5.3.3. <i>In vitro</i> испитување на транспорт и дистрибуција на наносистемите во избрани клеточни култури.....	106
5.3.4. <i>In vitro</i> испитување на преземањето на наносистемите во избрани клеточни култури	119
5.4. <i>IN VIVO</i> СТУДИИ НА АНТИКОНВУЛЗИВНА АКТИВНОСТ НА ПОДГОТВЕНИТЕ ФОРМУЛАЦИИ	124

6. ЗАКЛУЧОК	129
7. ЛИТЕРАТУРА	135
Прилог 1 Мислења по доставено авторезиме од докторска дисертација	147
Прилог 2 Листа на објавени трудови поврзани со истражувањата во докторската дисертација	167

1. Вовед

Интензивните истражувања во областа на нанотехнологијата и примената во терапија нудат решенија на голем број прашања во врска со надминувањето на биолошките бариери и оттука постигнување на бараниот терапевтски ефект. Всушност, способноста да се дизајнираат и развијат наносистеми со различни својства и карактеристики, вклучително и подобрена биорасположливост на енкапсулираните активни компоненти (АК) со истовремено подобрување на нивната растворливост и стабилност, намалена токсичност, насочено и контролирано ослободување, како и можност за флуоресцентни или други видови на визуелизација на истите ги прави овие системи перспективни кандидати во третман и дијагностика на разни состојби/болести.

Хербалните лекови и најразличните растителни екстракти со години претставувале главен терапевтски пристап и го сочинувале најголемиот дел од монографиите во тогашните фармакопеи. Хербалната медицина која во голем дел се базирала врз искуството што е пренесувано со генерации, денес сè повеќе добива научна потврда за нејзината ефикасност и безбедност. Во последните години забележано е дека голем дел од популацијата се навраќа на традиционалната медицина, а употребата на хербалните лекови во третман на бројни заболувања е во постојан раст. Многу луѓе со заболувања на централниот нервен систем (ЦНС), како што се невродегенеративните заболувања (Алцхајмерова болест, Паркинсонова болест), епилепсија, мултиплекс склероза и др., се силно погодени од стигмата и дискриминацијата поврзани со здравјето (Sahoo and Marar, 2018). Токму несаканите ефекти кои ги покажуваат некои од синтетичките лекови поттикнале многу истражувачи да се насочат кон традиционалните методи на лекување. Имено, хербалните супстанции се одлични кандидати за безбедни лекови што е особено важно кога станува збор за третман на невролошките заболувања. Дополнително, многу од компонентите присутни во истите имаат директна фармаколошка активност врз организмот (Sandhya et al., 2010). И покрај тоа што во моментот бројни клинички податоци ја потврдуваат ефикасноста на хербалните супстанции и привлекуваат огромно внимание, потребно е да се спроведат детални истражувања за да се докажат придобивките од употребата на овие супстанции за пациентите.

Во последната декада направени се повеќе од 30 предклинички и клинички студии, меѓу кои и неколку рандомизирани плацебо-контролирани истражувања, каде се испитува ефектот односно дејството кое го пројавуваат екстракти од *Cannabis sativa*, како потенцијални кандидати за третман на пациенти со епилепсија резистентна на лекови. Податокот дека приближно 36% од пациентите кои примаат антиконвулзивна терапија, а притоа немаат соодветна контрола на нападите, зборува дека епилепсијата е заболување кое привлекува огромно внимание и претставува вистински предизвик за модерната медицина. Голем процент од пациентите (дури до 50%) доживуваат и бихевиорални коморбидитети, како што се когнитивно нарушување, анксиозност и депресија, што понекогаш претставува и поголем проблем од самите напади (Téllez-Zenteno et al., 2020). Имајќи ги предвид овие факти, како и потенцијалот на канабиноидите во третман на епилепсија, потребни се дополнителни студии со цел да се испитат и дефинираат терапевтските бенефити на екстрактите добиени од растението *Cannabis sativa*.

Познато е дека некои од канабиноидите, особено дериватите на тетрахидроканабидиолот (THC), имаат способност да ја поминат крвно-мозочната бариера (КМБ) и да го покажат својот психоактивен ефект. Меѓутоа, кога станува

збор за фитоканабиноидните киселини, низ литературата се среќаваат податоци дека истите се подложни на слаба пенетрација во мозокот, што најверојатно се должи на делот од молекулата со карбоксилна киселина која има негативна наелектризираност во физиолошки услови, што го спречува нивниот транспорт низ КМБ (Anderson et al., 2019).

Благодарение на специфичната анатомија и физиологија на цереброваскуларното ткиво, КМБ претставува главен предизвик за развој на лекови за третман на болести на ЦНС. Успешното менаџирање на заболувањата на ЦНС, како што се деменција, епилепсија, панични напади, менингитис и тумори на мозокот, главно зависи од одржувањето на повисоки концентрации на лекот на местото на делување. Имено, фармаколошкиот одговор предизвикан од страна на потенцијанлните активни компоненти зависи од многубројни фактори како што се: ефикасноста, преземањето и пенетрацијата преку КМБ или способноста истите да се врзат за специфични протеински носачи со цел транспорт низ мембраната (Zeeshan et al., 2020).

Земајќи ги во предвид овие факти, АК би требало да бидат дизајнирани на таков начин да поседуваат оптимална липидна растворливост со цел пенетрација низ КМБ и одржување на терапевтски концентрации во мозокот. Меѓутоа, со зголемување на липофилноста на молекулите доаѓа до промени во фармакокинетските параметри кои што придонесуваат за намалена системска растворливост и биорасположливост (Begley, 2004).

Овие проблеми доведуваат до потреба од развивање на различни формулациски пристапи со цел ефикасен транспорт низ КМБ и одржување на оптимални концентрации на АК на местото на делување. Интензивните истражувања во областа на нанотехнологијата се насочени кон дизајнирање на биокомпатибилни наносистеми кои нудат решение на голем број прашања поврзани со насочено и контролирано ослободување на активните компоненти во дијагностиката и третманот на различни заболувања на ЦНС и секако поефикасен нивен транспорт.

2. Преглед на литературата

2.1. Крвно-мозочна бариера

Крвно-мозочната бариера (КМБ) се состои од капиларни ендотелни клетки и притоа има двојна улога, заштита на мозокот од потенцијално штетни супстанции присутни во циркулацијата ограничувајќи го транспортот во мозокот преку физички (тесните јазли) и метаболички (ензимски) бариери и истовремено соодветна пропустливост за хранливите материи кои се неопходни за негова нормална функција. Физичко-хемиските и молекуларните карактеристики што доведуваат до намалена способност за дистрибуција на АК во клетките на КМБ се: значителна поларност, висок потенцијал за формирање на водородни врски, молекуларна маса поголема од 500 kDa и присуство на ротабилни врски или многу разгранета молекуларна структура (Naque et al., 2012). Од друга страна пак, истражувањата покажуваат дека и голем процент од новооткриените мали молекули со потенцијално дејство врз ЦНС не ја поминуваат КМБ, што доведува до отсуство на ефикасни терапевтски концентрации во мозокот и соодветен одговор.

Во таа насока, се поголем е интересот за развој на различни нанопартикулирани системи со цел транспорт на АК низ КМБ. Преминот на наносистемите низ КМБ главно зависи од големината на честичките на системот и природата на површината на честичката, како и нејзината наелектризираност. Дополнително, потребно е наносистемите да се движат низ клеточната цитоплазма, да се селективни за мозочниот ендотел, да имаат способност да го поминат мозочниот ендотел интактни, да бидат преземени од таргет клетката на ЦНС и да имаат ниска токсичност и имуногеност (Gromnicova et al., 2013).

2.1.1. Транспортни механизми на КМБ

Постојат неколку механизми на транспорт и интернализација на молекулите низ КМБ, како што се пасивна дифузија зависна од концентрацискиот градиент, олеснета дифузија, дифузија преку водните канали во рамките на мембраната, активен транспорт со помош на транспортни протеини и рецептори, како и клеточно посредувана трансцитоза (de Lange, 2012).

Пасивната или едноставна дифузија во главно е зависна од концентрацискиот градиент, односно од концентрацијата на супстанцијата од двете страни на мембраната, како и од големината на честичките и липофилноста односно партициониот коефициент. Кога станува збор за олеснета дифузија, брзината на дифундирање на компонентите низ КМБ е ограничена и зависи од присуството на помошни молекули. Имено, доколку дојде до заситување на капацитетот на помошните молекули, зголемувањето на концентрацијата на АК не ја зголемува брзината на премин низ КМБ. Овој тип на механизам најчесто служи за транспорт на супстанции како што се хексози, амини, аминокиселини, нуклеозиди, глутатион, мали пептиди и слично (de Lange, 2012).

Транспортот посредуван со носач може да се одвива и во насока спротивна од концентрацискиот градиент бидејќи за транспорт на АК задолжени се одредени носачи и рецептори што се лоцирани на мембраната на ендотелните клетки на КМБ. Овој транспорт е најчесто зависен од аденозин трифосфат (АТП), а самите системи за транспорт може да бидат *influx* или *efflux* системи кои всушност служат за пренос

на ендогени молекули и одржување на хомеостазата во мозокот. Во таа насока и самите АК може да претставуваат лиганди за овие транспортери.

Ендоцитозата како везикуларен транспорт, претставува енергетски зависен процес на клеточно преземање во кој плазматската мембрана се вдлабнува навнатре за да внесе екстрацелуларни молекули внатре во клетката (Doherty and McMahon, 2009). Главната функција на механизмот на ендоцитоза е всушност транспорт на хранливи материи, но истовремено има и улога да ја одржува комуникацијата со останатите клетки и околната средина. Ендоцитозата може да се класифицира како фагоцитоза, присутна само кај одредени клетки кај цицачи и пиноцитоза, која се јавува кај сите типови на клетки. Фагоцитозата всушност се однесува на преземање на цврсти честички со дијаметар од неколку микрометри, а пиноцитозата е преземање на течности кои содржат честички во опсегот на нано големина. Во таа насока, како позначајни особено за транспорт на наносистемите се издвојуваат клатрин-посредувана ендоцитоза и кавеолин-посредувана ендоцитоза.

Клатрин-посредуваната ендоцитоза претставува везикуларен систем по морфологија и се наоѓа во нелипидните региони на клеточната мембрана. Клатринот е протеин кој ја опкружува везикулата која се формира при процесот на ендоцитоза чија големина се движи до 200 nm (McMahon and Boucrot, 2011). При клатрин-посредуваната ендоцитоза, компонентите најпрво се врзуваат за трансмембранскиот рецептор и потоа со помош на протеини се вградуваат во везикули обложени со клатрин, кои потоа се интернализираат. Најважниот адаптер протеин е AP2 (*adaptor protein complex*). Динаминот како мембрански протеин всушност претставува голема гванозин трифосфатаза, кој всушност ја посредува фисијата на формираната везикула од плазматската мембрана и помага во ослободувањето на везикулата обложена со клатрин во внатрешноста на клетката. Во цитоплазмата, везикулите почнуваат да го губат својот клатрински слој по формирањето на раниот ендозом (El-Sayed and Narashima, 2013), каде што компонентите ослободени внатре може да се рециклираат назад до клеточната мембрана или пак, раниот ендозом може да созрее во доцен ендозом. Потоа се случува фузија помеѓу доцниот ендозом и лизозомите за да се формира ендолизозом, каде што се случува процесот на деградација и ослободување во клетката.

Кавеолин-посредуваната ендоцитоза претставува чест механизам на интернализација особено кај фибробластите и ендотелните клетки. Ендоцитозата посредувана од кавеоли е везикуларна или тубуловезикуларна по морфологија. Кавеолите се во форма на колба, извонредно стабилни инвагинации на плазма мембраните во големина од 50-100 μm . Овие инвагинации се поврзани со липидните региони. Кавеолините како интегрални мембрански протеини, ја сочинуваат главната протеинска компонента на кавеолската мембрана и имаат структурна улога во формирањето на кавеолите. На клеточната површина, кавеолите формираат стабилна функционална единица која се генерира од олигомеризиран кавеолин и придружните протеини и липиди (Couet et al., 2001). Кај кавеолин-посредуваната ендоцитоза, кавеолите прво се стимулираат, а самиот процес е регулиран со динамин, протеин киназа Ц и тирозин кинази. Кавеолите формираат кавеоларни носачи кои се спојуваат со раниот ендозом или пак може да се спојат назад во плазматската мембрана без вклучување на ендозомалниот интермедиер и како резултат на тоа всушност ја покажува својата улога во трансцитозата (Tuma and Hubbard, 2003).

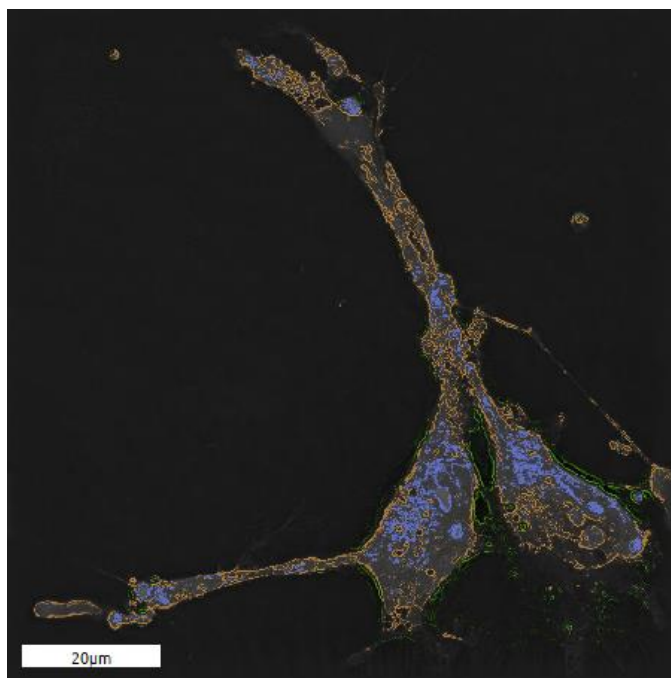
2.1.2. *In vitro* испитување на преминот на наносистемите и АК низ КМБ

Идеални карактеристики што треба да ги поседуваат наносистемите со цел премин низ КМБ и испорака на АК во мозокот се: биокомпатибилност и биодеградабилност, нетоксичност, големина на честички помала од 200 nm, стабилност во централна циркулација (да не дојде до агрегација или дисоцијација на системите), продолжено време на циркулација во крвта, насочено делување и продолжено ослободување на АК во текот на времето.

Со цел да се испита способноста на системите за премин низ КМБ и соодветна интернализација во клетките, постојат неколку *in vitro* тестови на модели на клеточни линии. Како еден од најчесто користените модели кои ја имитираат функцијата на хуманата КМБ претставува клеточната линија на човечки церебрални микроваскуларни ендотелни клетки (*hCMEC/D3*) (Сл. 1). Истите може лесно да се одгледуваат и да подлежат на клеточни и молекуларни студии за патолошки механизми и механизми за транспорт на АК што се од значење за третман на заболувања на ЦНС, како што се невродегенеративните заболувања, епилепсијата и др. Резултатите од повеќе студии покажуваат дека *hCMEC/D3* клетките ја задржуваат експресијата на најголем број на транспортери и рецептори кои ги има *in vivo* на КМБ кај човекот, вклучувајќи ги *MDR1* (*multidrug resistance protein 1*), *BCRP* (*breast cancer resistance protein*), *MRP4* (*multidrug resistance protein 4*), рецептор за трансферин, рецептор за инсулин, транспортер за глукоза изоформа 1 (*Glut-1*), некои метаболизирачки ензими, како и протеините со тесни јазли. Постојат релативно малку модели кои ја имитираат и моделираат функцијата на човечката КМБ, кои за разлика од *hCMEC/D3* клеточната линија, се минимално карактеризирани. Во таа насока може да се заклучи дека *hCMEC/D3* претставува единствен модел за истражување на биологијата на ендотелот на човечкиот мозок. Главната предност на *hCMEC/D3* клеточната линија е тоа што претставува стабилен, лесен за одгледување и за работење модел на популација на микроваскуларни ендотелни клетки на човечки мозок кој го задржува фенотипот на хуманата КМБ. Имено, оваа клеточна линија се користи најмногу за испитување на клеточното преземање и студии на активен транспорт, како и за анализирање на одговорот што го дава мозочниот ендотел како резултат на присуство на различни патогени и воспалителни агенси. Како најголем предизвик сè уште претставуваат тесните јазли на *hCMEC/D3* клеточниот монослој, кој истражувачите настојуваат да го решат со цел да се обезбеди оптимален *in vitro* модел кој би ги поседувал сите карактеристики на КМБ на човекот, вклучувајќи ја и ограничената пропустливост и соодветните *efflux* и *influx* транспортни системи. Сепак овој модел се користи во бројни истражувања и тестови кои се користат за испитување на безбедноста и ефикасноста на наносистеми наменети за третман на заболувања на нервниот систем (Weksler et al., 2013).

На луминалната страна на ендотелните клетки што ги формираат мозочните микросадови се експресирани *ABC efflux* транспортери, вклучувајќи го *P*-гликопротеинот (*P-gp*) (*ABCB1 / MDR1*), *BCRP* (*ABCG2*) и неколку *MRPs* (*ABCCs*), кои активно го ограничуваат влезот на бројни ендогени компоненти и ксенобиотици во мозокот. *P-gp* е најдобро познатиот од многуте транспортери на АК на КМБ и главно е експресиран на луминалната мембрана на мозочните ендотелни клетки и кај луѓето и кај животните. *BCRP* исто така е откриен во примарни култури од хумани мозочни ендотелни клетки и е имунолокализиран на луминалната мембрана на човечките ендотелни клетки. Од групата на *multidrug*

resistance protein кај примарни култури на говедски мозочни ендотелни клетки детектирани се: *MRP1*, *MRP4*, *MRP5* и *MRP6*, но само *MRP1*, *MRP4* и *MRP5* биле откриени кај ендотелни клетки на микросадови кај човечки мозок. Иако претходни студии покажале дека *P-gp*, *BCRP*, *MRP1* и *MRP5* се присутни кај *hCMEC/D3* клеточната линија, нивната експресија сè уште не е утврдена (Dauchy et al., 2009).



Слика 1. Приказ на живи *hCMEC/D3* клетки направен со помош на *NanoLive 3D Cell Explorer*.

Клеточната линија *hCMEC/D3* која е добиена од примарна култура на церебрални микроваскуларни ендотелни клетки е наменета да прикаже стабилен фенотип кој ги има најзначајните својства на КМБ. Клеточната линија е валидирана според повеќе критериуми. Сепак, многу малку податоци се достапни кои покажуваат дека овие клетки експресираат *efflux* транспортери на АК што се сметаат за фенотипски маркери на КМБ на човекот. Една студија ја споредувала експресијата на гени што кодираат некои *ABC*-транспортери, цитохром *P450* ензимите (*CYPs*) и нивните главни транскрипциони фактори во *hCMEC/D3* и не-церебрални ендотелни клетки, како што е *human umbilical vein endothelial CELL (HUVEC)* клеточната линија, со цел да се утврди дали *hCMEC/D3* имаат специфичен церебрално ендотелен профил што се разликува од оној на периферните ендотелни клетки. Студијата е изведена за да се детерминираат експресионите профили на гени кои ги кодираат *ABC*-транспортерите, *CYPs* и главните фактори кои ја регулираат нивната транскрипција (*PXR*, *CAR*, *AhR*) кај *hCMEC/D3*. Откриено е дека моделот на *ABC*-транспортери и *CYPs* генската експресија во *hCMEC/D3* се разликува од онаа во *HUVEC*. Ендотелните клетки на микросадовите во мозокот ги експресираат *efflux* транспортерите на нивната луминална мембрана *in vivo*. Профилот на генската експресија на *ABC*-транспортерите во *hCMEC/D3* е различна од онаа во немозочните *HUVEC*.

Најзначајна разлика е намалената *MDR1* експресија на гени во *HUVEC*. Покажано е дека *hCMEC/D3* имаат експресија на високи количини на *MDR1/P-gp*, *BCRP* и *MRP1 mRNAs* и протеини, чија релативна застапеност не е позната. Резултатите покажуваат дека нивоата на експресија на *MDR1* и *BCRP* во *hCMEC/D3* се слични, но пониски отколку во изолираните хумани мозочни микросадови, согледувања што се потврдени и на ниво на протеини. Исто така, потврдено е дека *P-gp* и *BCRP* се функционални во *hCMEC/D3* (Dauchy et al., 2009).

2.2. Епилепсија

Епилепсијата претставува заболување на ЦНС кое се карактеризира со епилептични напади. Во зависност од делот на мозокот кој е зафатен и типот на невронските празнења, нападите може да имаат различни облици и исходи. Согласно последните статистички анализи на Светската здравствена организација (СЗО), епилепсија имаат околу 50 милиони луѓе во светот, односно 0,5 до 1% од глобалното население. Сè уште не е добро познато како настанува епилепсијата, иако истата може да се развие по оштетување на мозокот после претрпена траума, инфекции или раст на тумори или некои други видови невролошки болести, вклучувајќи ги и наследните синдроми.

2.2.1. Видови на напади

Епилептичните напади се проследени со привремено празнење на импулсот, кое го врши група на неврони во мозокот. Какви симптоми ќе се појават за време на нападот, зависи од местото на празнење и опсегот на неговото ширење. Во зависност од тоа, може да има краткотрајно прекинување на вниманието, па се до целосно развиен напад со силни конвулзии кои траат и до неколку минути. Во таа насока, ако е зафатен дел од кортексот, настануваат конвулзии, ако е зафатен хипоталамусот доаѓа до периферни автономни празнења, а ако е зафатена ретикуларната формација на горниот дел од мозочното стебло, доаѓа до губење на свеста.

Постојат два типа на епилептични напади, кои согласно клиничката класификација може да бидат парцијални и генерализирани. Дополнително, доколку не доаѓа до губење на свеста нападите се означени како прости или пак сложени доколку доаѓа до губење на свеста. Кај парцијалните напади празнењето е локално и следствено на тоа симптомите ќе зависат од мозочната регија која е зафатена. Истите најчесто вклучуваат: неволни мускулни контракции, нарушени сетилни искуства или автономни празнења или влијаат на расположението и на однесувањето доколку станува збор за психомоторна епилепсија. За разлика од нив, генерализираните напади го зафаќаат целиот мозок, вклучувајќи го и ретикуларниот систем и затоа предизвикуваат нарушување на електричната активност во двете хемисфери. За овој тип на напади, губењето на свеста е главна карактеристика.

Постојат две главни категории на напади и тоа: тонично-клонични напади кои се карактеризираат со силни контракции на целата мускулатура, респирацијата престанува, често се јавува дефекација, миктурација и саливација – тонична фаза која обично трае околу една минута, а закрепнувањето на пациентот настанува постепено во текот на неколку минути; или апсансни напади кои најчесто се јавуваат кај децата и се помалку драматични од тонично-клоничните, меѓутоа може

почесто да се јавуваат и тоа по неколку напади во текот на денот. Карактеристично за овој тип на напади е што пациентот за време на нападот ненадејно престанува да го прави она што го правел до моментот на нападот, понекогаш престанува со зборување на сред реченица и празно гледа неколку секунди, со малку или без моторен немир. Закрепнувањето настанува наеднаш и без било какви последици (Rang et al., 2018).

Како посебна категорија се издвојува статус епилептикус, кој се однесува на продолжени непрекинати напади, за кои е потребен итен медицински третман.

2.2.2. *In vitro* и *in vivo* модели на епилепсија

Бидејќи не е позната точната причина за ексцитацијата на невроните при развојот на епилептичните напади, која природно тежнее да се шири низ мрежа на меѓусебно поврзани неврони, најчест механизам за спречување на оваа појава е инхибиција на истата. Затоа, најчесто моделите кои се предложени за тестирање на антиконвулзивни компоненти се насочени кон пренос или инхибиција на ексцитацијата. Постојат повеќе *in vitro* модели на епилепсија што главно служат за испитување на цитотоксичноста на АК или на дозираните форми како производи. Најчесто користени се: *ex vivo* пресек на хипокампадниот дел на стаорци; органотипни пресеци добиени од неонатални стаорци кои се одржуваат *in vitro* неколку недели; клеточни култури на примарни неврони; астроцити и останати глиални клеточни линии; човечко ткиво од пациенти со епилепсија резистентна на лекови; и клетки добиени со технологија на индуцирани плурипотентни матични клетки (Grainger et al., 2018).

Во однос на *in vivo* моделите, испитувањата се вршат на различни животински модели на епилепсија, затоа што е тешко да се спроведат детални проучувања на пациентите што боледуваат од епилепсија заради различната природа како на патофизиологијата, така и на настанувањето и видот на самите напади. Некои од моделите вклучуваат разновидни генетски видови со карактеристики слични на епилепсија, како што се глувци што имаат краткотрајни конвулзии како одговор на одредени звуци или светлосни сигнали. Понатаму, постојат и модели на неколку трансгени видови глувци со мутации на различни јонски канали, рецептори и други протеини, кај кои се јавуваат спонтани напади. При тестирање на антиконвулзивните компоненти, најчесто користени се *in vivo* испитувања кај глувчиња кај кои се предизвикуваат напади со помош на хемиски агенси односно конвулзивни компоненти како што е пентилентетразолот (PTZ) или напади предизвикани со електрична стимулација на целиот мозок. Утврдено е дека лековите кои ги инхибираат PTZ-индуцираните конвулзии притоа подигнувајќи го прагот на осетливост на електричните импулси, се ефикасни против апсанските напади, додека пак оние лекови кои што го намалуваат траењето и ширењето на електро-индуцираните конвулзии се ефикасни во фокалните типови епилепсија, како што се тонично-клоничните напади (Rang et al., 2018).

За жал, ниту еден модел на животни не може целосно да ја имитира и прикаже клиничката манифестација на епилепсијата.

2.2.3. Терапевтски пристапи и конвенционална терапија

Епилепсијата главно се третира со лекови, но во тешки случаи може да се извршат и хируршки зафати на мозокот. Значајно е да се истакне дека

антиепилептичните лекови што се наоѓаат на пазарот ефикасно ги контролираат нападите на епилепсија кај околу 70% од пациентите.

Постојат неколку механизми на дејство на антиепилептиците и тоа: засилување на дејството на гама-аминобутерна киселина (GABA), инхибиција на функцијата на натриумовите канали, инхибиција на функцијата на калиумовите канали и инхибиција на глутамат и блокада на глутаматните рецептори. Во групата на лекови кои подолго време се во употреба спаѓаат: фенитоин, карбамазепин, валпроат, етосуксимид и фенобарбитон, заедно со бензодиазепините (диазепам, клоназепам и клобазепам). Поновата генерација на антиепилептици ги вбројува: вигабатрин, габапентин, ламотригин, фелбамат, тиагабин, топирамат, леветирацетам и зонисамид. Предноста на поновата генерација антиепилептици во однос на претходната е во насока на намалување на несаканите ефекти и интеракции, иако нивното дејство во однос на контрола на нападите не е поголемо.

Во третата генерација на антиепилептици спаѓаат: бриварацетам, ценобамат, есликарбазепин ацетат, лакосамид и перампанел. Последните литературни податоци укажуваат на тоа дека оваа група лекови покажува огромен потенцијал како монотерапија во редуцијата на епилептичните напади кај возрасни пациенти (Mula, 2016), но сепак потребни се дополнителни клинички студии и постмаркетиншко следење, со цел подетално да се карактеризира нивниот клинички профил и терапевтски потенцијал во третман на епилепсија (Lattanzi, 2022).

И покрај тоа што моментално има одобрено повеќе од 25 антиконвулзиви за третман на епилепсија, приближно една третина од пациентите со епилепсија сè уште имаат проблеми со контролирањето на нивните напади. Од друга страна пак, изразените несакани ефекти и фармакокинетски интеракции на лековите кои веќе подолго време се во употреба, а и на поновите антиепилептици, доведуваат до потреба од развој на нови терапевтски решенија за третман на ова заболување. Пациентите што боледуваат од епилепсија лековите ги примаат како хронична терапија, заради што избегнувањето и намалувањето на несаканите ефекти од истата е од особено значење.

Во последните години вниманието е насочено токму кон развој на современи формулациски решенија како на пример нанопартикулирани системи, кои не само што ќе придонесат за надминување на проблемите поврзани со преминот низ КМБ и насочување до местото на делување, туку и би ги намалиле системските несакани ефекти. Такви формулации се на пример наноструктурирани липидни носачи со фенобарбитал, кои покажале извонредни резултати на *in vivo* модел на глувчиња (Scioli-Montoto et al., 2022), како и липидни наночестички со криптолепин кои покажале антиепилептична активност преку инхибиција на активноста на напон-зависните калциумови канали (Mante et al., 2021). Со инкорпорирање на алпразоламот во липидни наночестички, биорасположливоста се зголемила неколкукратно (Singh et al., 2012). Постојат повеќе формулациски решенија со карбамазепин каде истиот е инкорпориран во липидни и полимерни носачи, при што резултатите укажале дека истите имаат и до 30 пати поголема антиконвулзивна активност во споредба со карбамазепинот како конвенционален лек (Nair et al., 2012; Scioli-Montoto et al., 2022; Zybina et al., 2018). Дополнително, развиени се и системи за интраназална употреба со катехин хидрат инкорпориран во полимерни наночестички со што се овозможило намалување на дозата на катехин хидратот, како и избегнување на метаболизмот на прв премин (Ahmad et

al., 2020). Со вградување на окскарбазепин во полимерни наночестички од полимлечна-ко-гликолна киселина наменети за интраназална употреба, било постигнато намалување на дозата и фреквенцијата на дозирање, што исто така е од големо значење за пациентите кои примаат хронична терапија (Musumeci et al., 2018).

Иако низ литературата се среќаваат голем број на истражувања што се насочени кон развој и дизајн на мултифункционални носачи и нивна потенцијалната примена како ефикасни дозирани форми во третманот на епилепсијата, кога станува збор за употреба на растителни суровини инкорпорирани во наноносачи, податоците се релативно ограничени.

2.3. *Cannabis sativa* L. (f. *Cannabaceae*)

Cannabis sativa опишано како лековито растение уште во познатото дело *De Materia Medica*, е едно од најчесто употребуваните (на глобално ниво) и контролирани растенија што содржи психоактивни супстанции, чија регулирана примена во медицински и научни цели секојдневно зазема се поголеми територијални размери.

Во последните години направени се повеќе студии на животни и луѓе кои укажуваат на огромната терапевтска вредност на ова растение во третман на заболувања на ЦНС.

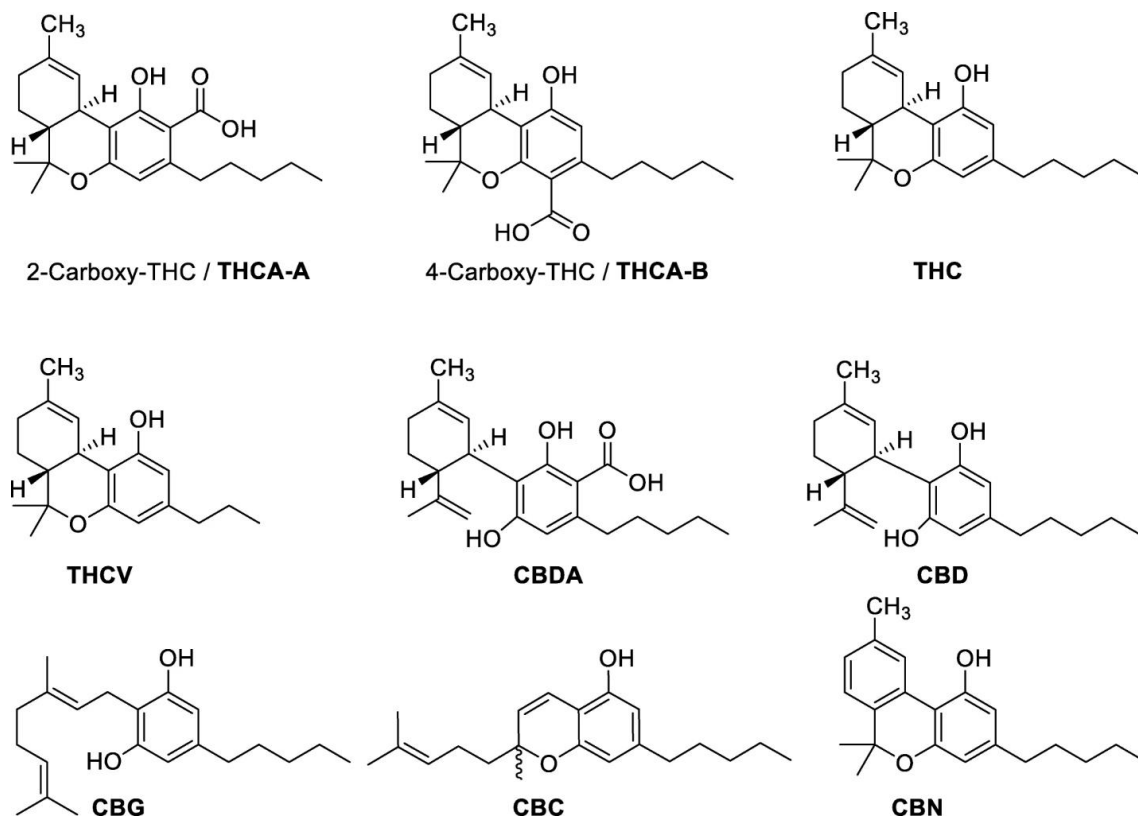
2.3.1. Хемиски состав

Cannabis sativa во својот состав содржи околу 500 различни компоненти, класифицирани во 18 хемиски класи од кои најзначајни се канабиноидите, флавоноидите, терпените и масните киселини (Alves et al., 2020; Hillig and Mahlberg, 2004).

Фармаколошки активните супстанции во *Cannabis sativa* – канабиноидите (Сл. 2), бројат повеќе од 70 различни фитоканабиноиди, а како главни компоненти се издвојуваат делта-9-тетрахидроканабинол (Δ^9 -THC, THC), канабинол (CBN), канабидиол (CBD), канабигерол (CBG), канабихромен (CBC), тетраhydroканабиварин (THCV) и други што имаат голем потенцијал во третманот на мултипла склероза, Алцхајмерова болест, повреди на рбетниот мозок, Туретов синдром, епилепсија, хипертензија, глауком и друго (Ben Amar, 2006). Хемискиот состав на екстрактот е многу важен, како и односот на главните канабиноиди во истиот (Percussa, 2017). Она што е значајно да се спомене е дека во свежо растение, односно нативно присутни се канабиноидите во облик на киселини, додека пак неутралните облици настануваат во текот на складирањето и при изложеност на повисока температура или сончева светлина (Fischedick et al., 2010).

Покрај канабиноидите, како што е наведено погоре, канабисот содржи една исто така многу битна група на компоненти – терпени. Во својот состав канабисот брои околу 140 различни терпени кои влегуваат во состав на етеричното масло како примарни компоненти, меѓу кои како доминантни монотерпени се издвојуваат: мирцен, α -пинен, α -терпинолен, *trans*-кариофилен и α -хумулен, а од сесквитерпените – β -кариофилен (Hanus and Hod, 2020). Од групата на флавоноиди најзастапени се: апигенин, лутеолин, кверцетин, кемферол, оријентин, витексин, лутеолин-7-*O*-гликозид, апигенин-7-*O*-гликозид и канфлавин А и Б (Vanhoenacker et al., 2002). Во маслото од канабис идентификувани се повеќе од 30 масни

киселини, од кои преовладуваат незаситените масни киселини и тоа: линолна, α -линоленска и олеинска киселина. Од заситените масни киселини најзастапени се: палмитинска, стеаринска, арахидонска, бехенска киселина и други (Brenneisen, 2007).



Слика 2. Структури на позначајните канабиноиди од *Cannabis sativa* (преземено од: Tahir et al., 2021).

Покрај овие четири групи на соединенија, во хемискиот состав на *Cannabis sativa* присутни се и околу 70 азотни соединенија од кои алкалоиди (канабисативен, анхидроканабисативен), холин, мускарин, изолеуцин, бетаин, неурин, амиди (*N-trans*-ферулоилтирамин, *N-p*-кумароилтирамин, *N-trans*-кафеоилтирамин), протеини, ензими и карактеристични аминокиселини за самото растение. Исто така содржи и околу 50 јагледородни соединенија (нонакозан, хептакозан, 2,6-диметилтетрадекан, пентакозан, хексакозан и хентриаконтан), јаглехидрати (глукоза, фруктоза, маноза, галактоза, арабиноза, сахароза, малтоза, рафиноза, целулоза, хемицелулоза, пектин, ксилан), шеќерни алкохоли (манитол, сорбитол, глицерол, инозитол) и аминокеќери (галактозамин, глукозамин). Исто така, присутни се и алкохоли, алдехиди, кетони и фитостероли. Од витамините присутен е витамин *K*, а од минералите *Na*, *K*, *Ca*, *Mg*, *Fe*, *Cu*, *Mn*, *Zn*, *Hg*. Исто така, ксантофилот и каротенот се пигментите кои влегуваат во составот на ова растение (Brenneisen, 2007).

2.3.2. Фармакокинетика на канабиноидите

Како и сите активни компоненти така и кај канабиноидите, фармакокинетиката главно зависи од формулацијата и начинот на администрација. Во однос на начинот на администрација, кога канабиноидите, генерално *THC* и *CBD*, се администрираат со инхалација покажуваат иста или слична кинетика како и при интравенска примена. Притоа, ефектот и пикот на плазма концентрација се достигнува многу брзо (3-10 минути), а максималните плазматски концентрации се далеку повисоки од оние кои се постигнуваат при перорална администрација. Биорасположливоста на *THC* после инхалација се движи од 10-35%, а на *CBD* во просек од околу 31%, со слични профили во односот плазма концентрација – време. Биорасположливоста зависи од многу фактори, почнувајќи од индивидуалните особини на организмот, како и од начинот и карактеристиките на инхалирање. Дополнително, значајна улога во биорасположливоста на канабиноидите што се од исклучителна важност се параметрите како големина на честички што се инхалираат и нивната депозиција во организмот, односно местото каде истите се задржуваат во респираторниот тракт (Lucas et al., 2018).

При перорална администрација, канабиноидите подлежат на метаболизам на прв премин, каде во значителен процент се метаболизираат. Заради големата липофилност на канабиноидните молекули, биорасположливоста е на навистина ниско ниво и согласно истражувањата се претпоставува дека е некаде околу 6% (Gaston and Friedman, 2017).

Трансдермалниот начин на администрација претставува една опција за избегнување на метаболизмот на прв премин, меѓутоа заради големата хидрофобност на канабиноидите истите имаат потешкотии при дифузија низ хидрираните слоеви на кожата.

Канабиноидите се дистрибуираат брзо во добро прокрвените ткива (бели дробови, срце, мозок и црн дроб). Се метаболизираат доминантно во хепарот под дејство на цитохром *P450* ензимите, а се елиминираат преку урина и фецес (Lucas et al., 2018).

Кога станува збор за канабиноидните киселини, литературните податоци укажуваат на брза апсорпција во плазмата и екстремно низок мозок/плазма однос, што зборува за фактот дека овие форми не можат да ја поминат КМБ и оттука да го покажат својот ефект (Formato et al., 2020).

2.3.3. Фармаколошки ефекти на канабиноидите

THC делува како депресор на ЦНС, при што влијае на когнитивните способности, како што се краткотрајна меморија, концентрација и учење, а исто така влијае и врз психомоторните способности. Преку *CB1* рецепторот влијае врз зголемување на толеранцијата за болка, а покажува и антиеметично дејство (Grotenhermen, 2003).

Антиоксидативните и антиинфламаторните карактеристики на *CBD* го објаснуваат потенцијалот за невропротективен ефект на ова растение (Scuderi et al., 2009). Независно од механизмот на дејство, постојат докази дека *CBD* може потенцијално да се користи за третман и намалување на симптомите на различни невролошки пореметувања како епилепсија и напади (Hofmann and Frazier, 2013; Jones et al., 2010), психози (Rohleder et al., 2016), анксиозност (Bergamaschi et al., 2011), пореметувања при движење (пр. Хантингтонова болест и амиотрофична

латерална склероза) (Fernández-Ruiz, 2009) и мултиплекс склероза (Lakhan and Rowland, 2009).

Механизмот на дејство на *CBD* во однос на антиконвулзивната активност сè уште не е добро објаснет, но предложени се неколку можни таргети на молекуларно ниво (Senn et al., 2020). Patel et al. (2016) во своите *in vitro* тестови покажале дека редукцијата на невронската екситабилност од страна на *CBD* се случува преку инхибиција на натриумски канали зависни од напон. Останатите механизми на дејство вклучуваат агонизам на серотонергични *5-HT1A* рецептори, модулација на *NMDA* рецептори, зголемување на сигнализацијата на аденозин и активација на *GABA* рецепторите.

Литературните податоци од последните неколку години за карбоксилираната форма - канабидиолна киселина (*CBDA*), односно природниот прекурсор на *CBD*, кои иако се оскудни укажуваат на можна серотонинска активност и дури до 100 пати поголем афинитет за *5-HT1A* рецепторот во споредба со *CBD* (Russo, 2018). Резултатите од испитувањата направени во последните години укажуваат на тоа дека *CBDA* ја подобрува активацијата и на рецепторите *5-HT1A* во мозок на стаорец, а истото е потврдено *in vitro* и кај човечките *5-HT1A* рецептори. Дополнително, *CBDA* предизвикува антиеметичен одговор посредуван од *5-HT1A* рецепторот кај стаорци *in vivo*. Имено, активирањето на рецепторот *5-HT1A* предизвикува реакции на хиперполаризација на мембраната поврзани со зголемена спроводливост на калиум и покажува антиконвулзивна активност при повеќе различни експериментални модели на напади (Theodore, 2003). Се претпоставува дека *CBDA* покажува антиконвулзивна активност, намалувајќи ја фреквенцијата на напади особено во третман на епилепсија кај деца кај кои не помогнала конвенционалната терапија, меѓутоа потребни се повеќе истражувања за потврда на овие претпоставки (Anderson et al., 2019). Од друга страна пак, добро документирани се антимикробните и анти-еметичните ефекти кои ги пројавува *CBDA*. Со двојна инхибиција на циклооксигеназите преку надолна регулација и ензимска инхибиција, како и со активација на каналите на ванилоид 1 и анкирин 1 транзиторните рецептори (*TRPV1* и *TRPA1*, соодветно) и антагонизам на транзиторниот рецепторски катјонски канал од субфамилија М член 8 (*TRPM8* – рецептор кој се активира за време на болка, воспалителни процеси и при чувство на ладно) *CBDA* го покажува и својот антиинфламаторен ефект (Formato et al., 2020; Pellati et al., 2018).

2.3.4. Токсичност на канабиноидите

Кога станува збор за токсичноста, досегашните *in vivo* студии направени кај животни покажале дека канабиноидите имаат широк терапевтски индекс, односно имаат поволен профил на безбедност со граница на експозиција поголема од 10000 (Lachenmeier and Rehm, 2015). *In vivo* студиите кај животни направени од страна на Thompson et al. (1973), покажале дека пероралната примена на доза од 3 g/kg кај кучиња и 9 g/kg кај мајмуни не доведува до смртни исходи. Дополнително, после интравенска доза од 92 mg/kg кај мајмуни не е забележан ниту еден смртен случај, додека пак доза од 127 mg/kg била летална за животните (Thompson et al., 1974).

Со оглед на тоа што *THC* има висок афинитет за канабиноидните рецептори, особено тип 1 (*CB1R*) кои се наоѓаат во ЦНС и тоа во терминалните делови на невроните на базалните ганглии, во церебелумот, хипокампусот, неокортексот,

хипоталамусот и лимбичкиот дел од кортексот, се очекува и несаканите ефекти, особено акутните, да бидат поврзани со улогата на овие делови на мозокот во моторната активност, координацијата, краткотрајната меморија, апетитот, седацијата и слично (Sachs et al., 2015).

Согласно СЗО (*Cannabidiol (CBD) Critical Review Report*, 2018), канабидиолот е означен како нискотоксично соединение. Направени се повеќе *in vitro* испитувања каде што резултатите укажуваат на про-апоптичниот ефект на *CBD* во лимфоцитите. Имено, ова соединение влијае на растот на малигните клетки, но нема влијание врз немалигните клетки. Дополнително, истражувањата покажале дека *CBD* влијае врз имуниот систем на тој начин што во ниски дози предизвикува имуностимулација, а во повисоки дози имуносупресија. Меѓутоа, точниот механизам на дејство сè уште не е разјаснет. Исто така, во однос на хормоналниот статус, во зависност од хормоните и применетите методи, резултатите од некои научни студии покажуваат дека *CBD* има влијание, а други дека нема влијание. Во извештајот од СЗО исто така е наведено дека *CBD* не предизвикува зависност за разлика од *THC*, не покажува психоактивни ефекти и не предизвикува несакани ефекти на кардиоваскуларниот систем и други системи во организмот.

Во однос на канабидиолната киселина, која се чини дека покажува слични фармаколошки ефекти како својот неутрален аналог (*CBD*), литературните податоци јасно покажуваат дека станува збор за молекула со огромен терапевтски потенцијал, меѓутоа во однос на токсичноста и можните несакани ефекти сè уште нема доволно информации (Formato et al., 2020).

2.4. Липидни наносистеми

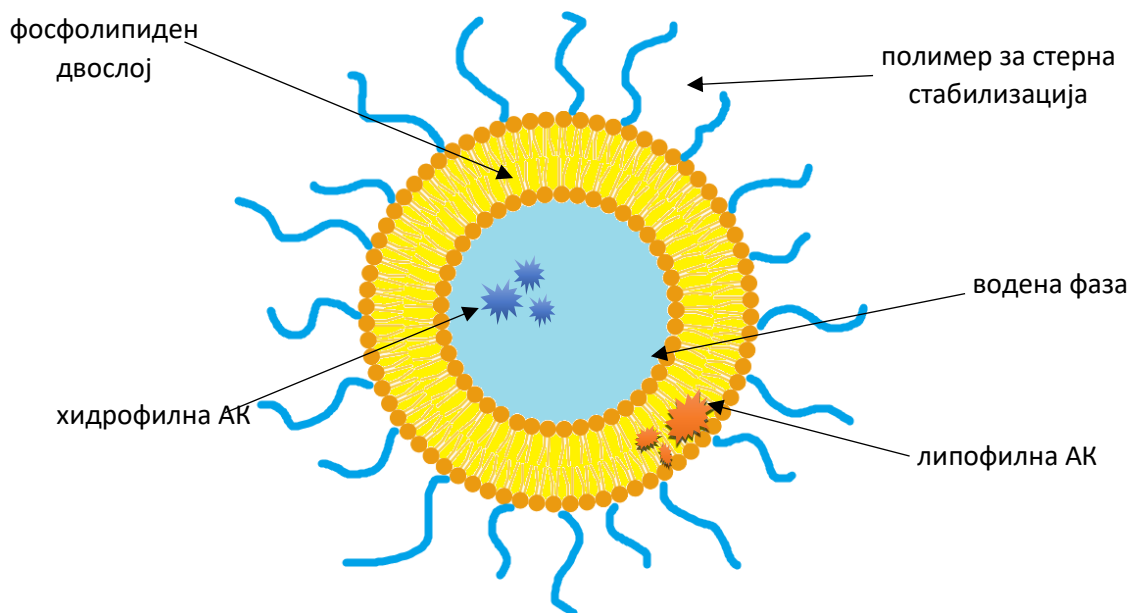
Уникатните физичко-хемики особини на наносистеми, меѓу кои и прилагодување на нивната големина (~100 nm), флексибилноста и големата специфична површина, ги прават потенцијални кандидати за надминување на бариерите со кои се среќаваат АК насочени кон мозокот. Познато е дека нанопартикулираните системи ефикасно и контролирано ги ослободуваат компонентите на целното место на делување (Adams et al., 2001). Благодарение на нивниот огромен потенцијал, истите постигнуваат релативно висока локална концентрација на местото на делување и можност за намалување на системските несакани ефекти, што е од особено значење за третман на болести на ЦНС (Mullis et al., 2018).

Изградени од најразлични материјали како полимери, липиди, амфифилни супстанции, метали, неоргански елементи, јаглеродни нанотуби, дендримери и сл., нанопартикулираните системи имаат моќ да пенетрираат низ КМБ, пасивно или активно и на тој начин значително да ја подобрат биорасположливоста и терапевтскиот ефект на АК во многу пониски концентрации што е важно од аспект на намалување на несаканите системски ефекти. Дополнително, истражувањата покажуваат дека наносистеми базирани на липиди доведуваат до намалување на невроваскуларните оштетувања и активацијата на каспаза-1 во микроглијалните клетки која е одговорна за локалната невроинфламација преку протеолитичко разградување и ослободување на интерлеукин-1 β и интерлеукин-18 (Huang et al., 2013).

Липофилните наносистеми, како што се липозомите и наноструктурираните липидни носачи, имаат способност да се фузираат со ендотелните клетки и да ги транспортираат АК со ендоцитоза или трансцелуларно. Овие системи се способни за транспорт на активни молекули преку КМБ, како и за таргетирање на специфични типови на клетки, а воедно обезбедуваат и контролирано ослободување на вградените компоненти со можност за постигнување на релативно повисоки концентрации во мозокот преку ефикасен премин низ КМБ (Saraiva et al., 2016).

2.4.1. Липозоми како носачи на активни компоненти

Липозомите претставуваат современи носачи за испорака на АК, составени од фосфолипиди кои при контакт со водена фаза формираат мали везикуларни, сферични системи. Можноста за енкапсулација на хидрофилни и липофилни АК ги прави овие системи едни од најбараните и најчесто употребуваните системи-носачи. Покрај амфифилниот карактер, липозомите се разликуваат во однос на составот на липидите, полнежот на површината на везикулите, големината на везикулите, како и методот на подготовка.



Слика 3. Шематски приказ на липозом и инкорпорирање на АК согласно растворливоста.

Фосфолипидите импулсивно формираат двослојна сферична, затворена структура во присуство на вода. Сферичната везикула се формира над температурата на фазна транзиција (T_c), при што поради амфифилните својства на фосфолипидите, поларните делови се ориентираат кон внатрешноста и кон надворешноста на двослојот, додека пак неполарните делови се свртени кон средината на двослојот и ја имобилизираат водената фаза. Поради ваквата структура, во липозомите може да се инкорпорираат и липофилни и хидрофилни АК (Сл. 3). Имено, доколку природата на АК е липофилна, тогаш таа се

инкорпорира во органската - липидна фаза. Доколку пак станува збор за компонента од хидрофилна природа, тогаш истата се додава при процесот на хидрирање и се инкорпорира во внатрешната водена фаза.

Генерално, липозомските везикули може да имаат големина од 30 nm па се до неколку микрометри. Биокомпатибилноста и структурната сличност со хуманите клетки, биодеградабилноста, ниската токсичност и имуногеност, флексибилноста, како и можноста за специфично и целно насочување, ги прават липозомите едни од најистражуваните системи и комерцијално најкористени како системи-носачи на АК (Табела 1) (Akbarzadeh et al., 2013).

Како што е наведено погоре, големината на липозомските везикули може да варира во широк опсег. Липозомите може да бидат составени од една или повеќе двослојни мембрани, што претставува параметар кој директно влијае на количината на енкапсулирана АК, а од друга страна пак големината на везикулите го детерминира времето на циркулација на истите во крвта (Beltrán-Gracia et al., 2019).

Табела 1. Предности и недостатоци на липозомите како системи-носачи

Предности	Недостатоци
Ја зголемуваат ефикасноста и терапевтскиот индекс на АК	Слаба растворливост
Ја зголемуваат стабилноста на АК	Краток полуживот
Нетоксични, флексибилни, биокомпатибилни, биоразградливи, неимуногени	Фосфолипидите може да подлегнат на реакции на оксидација и хидролиза
Ја намалуваат токсичноста на енкапсулираната АК	Истекување на вградената АК
Специфично и таргетирано делување	Скапо производство

Како резултат на големината и бројот на присутни двослојеви, липозомите се поделени во две основни класи и тоа: униламеларни везикули (УЛВ) и мутиламеларни везикули (МЛВ). Униламеларните везикули може да се класифицираат во две категории, како големи униламеларни везикули - ЛУВ (100-1000 nm) и мали униламеларни везикули - СУВ (<100 nm). Кај униламеларните везикули постои само една бифосфолипидна мембрана во вид на сфера, додека пак мутиламеларните везикули може да бидат составени од повеќе липидни слоеви со правилен распоред (МЛВ - мутиламеларни везикули со големина од 100 nm до неколку микрометри) или со неправилен распоред (МВВ - мултивезикуларни везикули поголеми од 1 μm).

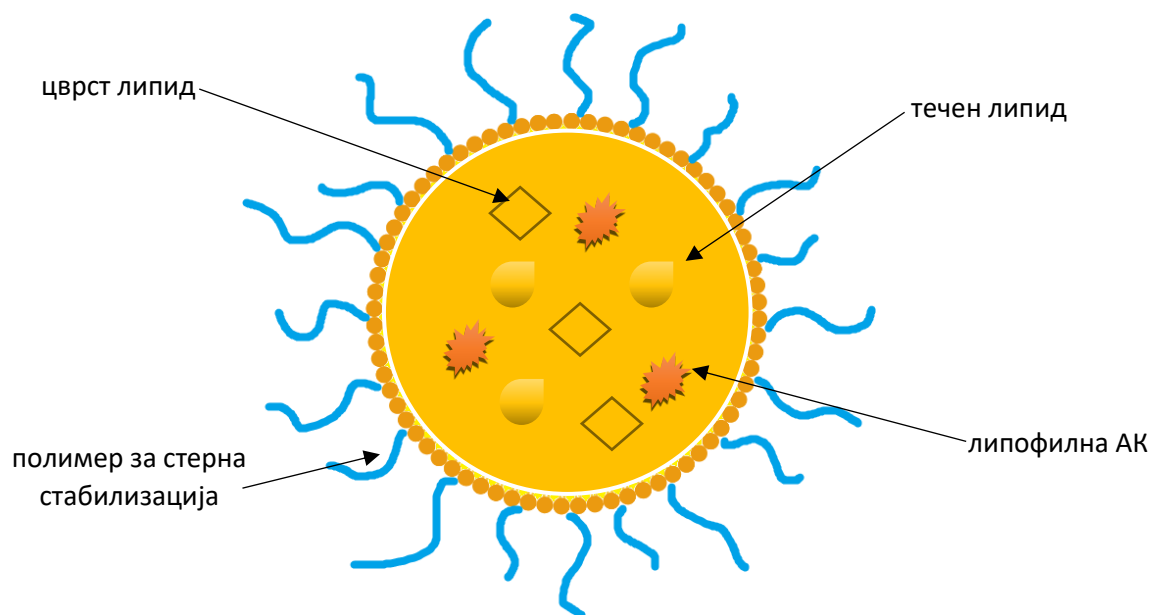
Како основни суровини за подготовка се користат липидите и тоа: фосфолипиди, сфинголипиди, гликофинголипиди, стероиди, синтетски фосфолипиди и други супстанции. Фосфолипидите се структури кои се составени главно од две основни групи и тоа: едната страна од молекулата е хидрофобна и е составена од ацилни јаглеводородни ланци, а другата страна е хидрофилна и ја претставува поларната фосфатна глава. Имено, истата не е водорастворлива,

меѓутоа во контакт со вода молекулите агрегираат и создаваат двослој. На тој начин хидрофилните поларни групи стапуваат во контакт со надворешната водена фаза, а хидрофобните ланци се заробени во средина. Исто така се смета дека хидрофобните ланци реагираат помеѓу себе и на тој начин помагаат во спонтано создавање на сферична везикуларна форма (Bozzuto and Molinari, 2015).

Формирањето на липозомите е поврзано со феноменот наречен критична мицеларна концентрација (CMC) на липидите во вода. Критичната мицеларна концентрација е дефинирана како концентрација на липиди во вода над која тие формираат мицели и двослојни структури (липозоми). Липидите исто така се карактеризираат со температура над која нивната флуидност се менува, односно температура на фазна транзиција на која настанува реверзибилен премин од гел во течно-кристална структура како последица на трансформацијата на јаглеродородните ланци на фосфолипидите. Оваа температура е директно пропорционална со должината на ацилните ланци, со тоа што колку што се подолги ланците толку е повисока T_c , а од друга страна и ригидноста на мембраната е поголема. Ригидноста на мембраната е одговорна за стабилноста на самите везикули, со тоа што колку што е поригидна мембраната толку повеќе енкапсулираната АК ја чува внатре во системот, со други зборови не дозволува истекување на истата (Sharma and Sharma, 1997).

2.4.2. Наноструктурирани липидни носачи

Липидните наночестички, како што се наноструктурираните липидни носачи (NLC), се колоидни системи составени од биокомпатибилен и биодеградабилен липиден матрикс кој на собна и телесна температура е во цврста состојба. Составени се од бинарна мешавина на цврста и течна липидна компонента (Сл. 4) и покажуваат поголема ефикасност на енкапсулација за разлика од нивните претходници – цврстите липидни наночестички (SLN).



Слика 4. Шематски приказ на наноструктурирани липидни носачи.

Споредено со *SLN*, *NLC* покажуваат поголема ефикасност на енкапсулација и капацитет на полнење, поради помалата подреденост на липидниот матрикс, во кој липидните АК лесно се инкорпорираат. Цврстиот матрикс ги штити вградените АК од хемиска деградација и дава флексибилност во модифицирање на брзината на нивното ослободување. Со модифицирање на физичко-хемиските и биофармацевтските карактеристики на *NLC* може да се обезбеди селективен таргетинг и намален клиренс на системот, како и ефективна терапевтска концентрација на местото на делување.

Постојат различни типови на липиди кои се користат при формулирање на *NLC*, како што се: триглицериди, глицериди, масни киселини, стероиди и восоци. Маслата (течните липиди) и мастите содржат мешавини од моно-, ди- и триглицериди на масни киселини со различна должина на ланецот и степен на незаситеност. Физичко-хемиските карактеристики на липидите инкорпирани во формулацијата всушност ја одредуваат нивната состојба на собна температура. Во делот на преформулација на *NLC*, од исклучителна важност е да се испита растворливоста на АК во липидите. Ако АК не е растворена и дистрибуирана во липидното јадро, истата ќе се прикачи или на површината на честичките или ќе се инкорпорира во мицели во водената фаза и оттука процентот на енкапсулација и вградување на АК во честичките ќе биде многу мал (Elmowafy and Al-Sanea, 2021).

NLC се сметаат за генерално безбедни поради тоа што содржат биокомпатибилни и биоразградливи липиди, како и помали количини на сурфактанти и косурфактанти за разлика од емулзиите, кои особини секако придонесуваат кон нивниот безбедносен профил.

2.4.3. Полимери за стерна стабилизација на наносистемите

Со цел да се подобри фармакокинетиката и биодистрибуцијата на АК вградени во липидните наносистеми, потребно е истите да бидат функционализирани на површината. На пример, со додавањето на полиетилен гликол (*PEG*), полиоксиетиленски полимери или полисахариди, полиакрил амиди, поливинил алкохол, поли (N-винил-2-пиролидон), се формира заштитен слој на површината на наносистемите и на тој начин се спречува нивното врзување за плазма протеините, а следствено на тоа се намалаува или спречува и процесот на опсонизација и последователното превземање од макрофагите на ретикулоендотелниот систем (РЕС), односно се намалува клиренсот на липозомите и *NLC in vivo*. Иако овие полимери за стерна стабилизација на системите го продолжуваат времето на циркулација во телото, тие исто така овозможуваат и премин низ КМБ. Дополнително, најновите научни истражувања покажуваат дека со полимерите за стерна стабилизација се постигнува неспецифично клеточно заобиколување што резултира со зголемена биорасположливост на АК во паренхимот на ЦНС, што е од особен бенефит за насоченото делување (Jenkins et al., 2016).

Компонента која зазема важно место при подобрување на особините на липидните наносистеми е *PEG*, кој се користи како полимер за стерна стабилизација, а самиот процес се нарекува *PEG*-илација. Генерално, ковалентната поврзаност на липозомите и *NLC* со *PEG* овозможува заштита на овие везикуларни системи од имунолошкиот систем на организмот, што резултира со намалена имуногеност и антигеност. Исто така, промените кои ги предизвикува во физичко-

хемиските својства на системите, вклучувајќи ги и промените во хидродинамичната големина, доведуваат до дополнително намалување на реналниот клиренс, а на тој начин се продолжува и времето на циркулација на наночестичките во организмот (Vulbake et al., 2017).

Полоксамерот (*POL*) е хидрофилен нејонски сурфактант кој претставува три-блок кополимер на централно поставен хидрофобен блок на полипропилен оксид (*PPO*) врзан за два хидрофилни блока на полиетилен оксид (*PEO*). Како резултат на присуството на латералните *PEO* хидрофилни синцири, *POL* обезбедува стерична стабилизација и спречување на адсорпција на протеини, што резултира со помала опсонизација на наночестичките и следствено на тоа подолг полуживот во системската циркулација. Друга исклучително важна карактеристика е тоа што *POL* покажува инхибиторен ефект кон ефлуксната активност на *P*-гликопротеинот, кој всушност претставува еден од главните виновници поврзани со резистентноста на повеќе лековити супстанции (Moura et al., 2020).

Од друга страна, површинската функционализација со биолошки активните лиганди, како што се пептидите, антителата, аптамери и други, кои специфично се врзуваат за рецепторите кои се поставени на површината на ендотелните клетки на мозокот, го олеснува нивното врзување и транспорт низ КМБ, а исто така и испораката на АК на местото на делување.

Оттука, сметавме дека би бил интересен приодот кон испитување на *in vitro* и *in vivo* однесувањето на нанолипозомите и *NLC* како липидни наносистеми од избор, како и испитување на нивните физичко-хемиски и биофармацевтски карактеристики кога истите се обложени со *PEG* или *POL* како полимери за стерна стабилизација. Дополнително, со инкорпорирање на екстрактот од *Cannabis sativa* во гореспоменатите носачи, очекувано е да се подобри пенетрацијата и транспортот на фитоканабиноидите низ КМБ, односно да се постигне подобрена биорасположливост преку целно насочување кон мозокот што би требало да резултира со безбеден и ефикасен третман на епилепсија.

3. Цели на истражувањето

Имајќи ги предвид горенаведените проблеми и предизвици, основна цел на оваа докторска дисертација беше подготовка, карактеризација и *in vivo* студии на ефикасност на различни липидни наносистеми со вграден екстракт од *Cannabis sativa* за насочено делување кон ЦНС и потенцијален ефикасен третман на епилепсија.

За соодветно остварување на горенаведената цел, беа поставени следниве работни задачи, поделени во неколку фази од истражувањето и тоа:

ФАЗА 1: Подготовка, карактеризација и избор на екстракт од растението *Cannabis sativa* (CE)

- Добивање на екстракти со различен состав и однос на канабиноидните компоненти од интерес.
- *In vitro* скрининг-тестови на цитотоксичност на екстрактите испитани на нивни различни концентрации.
- *In vitro* скрининг-тестови за биоактивност на екстрактите.
- Фитохемиска карактеризација на екстрактот од избор.

ФАЗА 2: Подготовка и карактеризација на липидни наносистеми без енкапсулиран CE

- Подготовка на формулации на нанолипозоми (NL) со различен полимер за стерна стабилизација (полиетилен гликол 2000 (PEG) и полуксамер 407 (POL)) на системите.
- Подготовка на наноструктурирани липидни носачи (NLC) со различен полимер за стерна стабилизација (полиетилен гликол 2000 (PEG) и полуксамер 407 (POL)) на системите.
- Физичка карактеризација на подготвените липидни наносистеми (морфолошки изглед, големина и дистрибуција според големина, определување на површинска наелектризираност).
- Испитување на стабилноста на липидните наносистеми во физиолошки релевантен (фосфатен пуфер pH 7,4) и биолошки медиум (хумана плазма од здрави доброволци).
- Фурие трансформна инфрацрвена спектроскопија (ATR-FTIR) на поединечните компоненти и подготвените формулации на липидни наносистеми.
- Квантитативна карактеризација на наносистем - протеин комплексите со Брадфорд реакција.
- *In vitro* испитување на инхибицијата на раст на клетки (MTS) и цитотоксичноста (LDH) по инкубација на hCMEC/D3 клеточната линија со подготвените липидни наносистеми.
- *In vitro* испитување на избрани клеточни култури (hCMEC/D3 и SH-SY5Y) и следење на транспортот и дистрибуцијата на липидните наносистеми во истите.

ФАЗА 3: Подготовка и карактеризација на липидни наносистеми со енкапсулиран *CE*

- Подготовка на формулации на нанолипозоми (*NL*) со вграден екстракт од *Cannabis sativa* (формулации со *PEG (NL1CE)* и *POL (NL2CE)* како полимери за стерна стабилизација).
- Подготовка на две формулации на наноструктурирани липидни носачи (*NLC*) со вграден екстракт од *Cannabis sativa* (формулации со *PEG (NLC1CE)* и *POL (NLC2CE)* како полимери за стерна стабилизација).
- Физичко-хемика карактеризација на подготвените липидни наносистеми *CE*
 - морфолошка карактеризација со примена на ТЕМ,
 - големина и дистрибуција според големина со примена на динамично расејување на светлината (DLS),
 - определување на површинска наелектризираност,
 - диференцијална скенирачка калориметрија,
 - ефикасност на енкапсулација на *CE* со примена на HPLC метод.
- *In vitro* определување на брзината на ослободување на активните компоненти од подготвените формулации на липидни наносистеми, како и дефинирање на кинетиката и механизмот на ослободување.
- Испитување на стабилноста на липидните наносистеми во физиолошки релевантен (фосфатен пуфер рН 7,4) и биолошки медиум (хумана плазма од здрави доброволци).
- *In vitro* скрининг-тестови за биоактивност на подготвените формулации на липидни наносистеми со користење на модифициран ORAC тест.

ФАЗА 4: *In vivo* студии на испитување на ефикасноста на подготвените формулации на липидни наносистеми со вграден екстракт од *Cannabis sativa* преку следење на нивната антиконвулзивна активност на модел на глувчиња преку индуцирање на напади со електричен и хемиски стимул.

4. Експериментален дел

4.1. Материјали и опрема за подготовка и карактеризација на формулациите

4.1.1. Материјали

Со цел подготовка и испитување на изработените формулации беа употребени следните материјали:

- Соја лецитин (Vitalia, North MaCEdonia)
- LIPOID PE 18:0/18:0-PEG 2000 (PEG) (Lipoid, Germany)
- Хидрогениран фосфатидилхолин (LC-3) (Lipoid, Germany)
- Фосфолипон 90Н (Phospholipid, Germany)
- Tween 80 (Merck, Germany)
- Полоксамер 407 (POL) (BASF, Germany)
- Холестерол (Sigma Aldrich, USA)
- Олеинска киселина (Sigma Aldrich, USA)
- Cannabidiol (CBD) CRM метанолен раствор во концентрација 1mg/ml (CAS:13956-29-1, purity 98.66%) (CErilliant Corporation, USA)
- Cannabinol (CBN) CRM метанолен раствор во концентрација 1mg/ml (CAS:521-35-7, purity 99.50%) (CErilliant Corporation, USA)
- (-)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) CRM раствор во ацетонитрил со концентрација 1mg/ml (CAS:1972-08-3, purity 99.39%) (CErilliant Corporation, USA)
- (-)- Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid (THCA) CRM раствор во ацетонитрил со концентрација 1mg/ml (CAS:23978-85-0, purity 96.99%) (CErilliant Corporation, USA)
- cannabidiolic acid (CBDA) CRM раствор во ацетонитрил со концентрација 1mg/ml (CAS:1244-58-2, purity 97.88%) (CErilliant Corporation, USA)
- *Cannabis sativa* суви делови од растението (Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy – UKIM, North MaCEdonia)
- Хумана плазма (Institute of Neurology, Clinical Center – Мајка Tereza, Скопје, North MaCEdonia) – Протоколите за хумана плазма беа одобрени од етичка комисија при Медицински факултет – UKIM, Скопје, С. Македонија (25.05.2016, No. 03-2039/9)
- Бовин серум албумин (BSA) (Sigma Aldrich, USA)
- Bradford реагенс (Sigma Aldrich, USA)
- Dulbecco's фосфатен пуфер (DPBS) (Sigma Aldrich, USA)
- Колаген тип I (rat tail) (Sigma Aldrich, USA)
- Флуоресцеин исотиоцианат изомер I (FITC) (Sigma Aldrich, USA)
- Nile Red (Sigma Aldrich, USA)
- Хлорпромазин (Sigma Aldrich, USA)
- Индометацин (Sigma Aldrich, USA)
- Човечки церебрални микроваскуларни ендотелијални клетки (hCMEC/D3) (CELLutions, Biosystems/CEdarlane, Canada)
- Ендотелијален базален медиум – 2 (EBM-2) (Life Technologies)
- Фетален бовин серум (FBS) (Life Technologies)
- Хемиски дефиниран липиден концентрат (Life Technologies)

- HEPES 1M (Life Technologies)
- Пеницилин – стрептомицин (Life Technologies)
- Фактор на растење човечки фибробласт (bFGF) (Sigma Aldrich, USA)
- Аскорбинска киселина (Sigma Aldrich, USA)
- Хидрокортизон (Sigma Aldrich, USA)
- Трипсин – ЕДТА (GIBCO, Thermo Fisher Scientific)
- Клеточна линија од човечки невробластом (LCG Standards, Wesel, Germany)
- Неесенцијални аминокиселини (NEAA) (Sigma Aldrich, USA)
- *CELLtiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (MTS) (Promega, USA)
- *CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay* (LDH) (Promega, USA)
- *Alexa Fluor™ Phalloidin 488* (Thermo Fisher Scientific, USA)
- *Hoechst Fluorescent stain* (Thermo Fisher Scientific, USA)
- *Dil stain (1,1'-Diocadecyl-3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate ('DiI'; DiIC18(3)))* (Thermo Fisher Scientific, USA)
- *pHrodo™ Green dextran conjugate* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA)
- *CELLight™ ER-GFP* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA)

Сите користени хемикалии и реагенси беа со фармацевтска/аналитичка чистота и беа употребени без дополнителни модификации.

4.1.2. Опрема

За изработка и испитување на формулациите беше користена следнава опрема:

- Agilent 1200 Model HPLC (Agilent Technologies, USA)
- Ротавапор (Buchi 215, Switzerland)
- Лиофилизатор (Labconco, FreeZone 5L Freeze Dry System, USA)
- Ултрасонична бања (Ultrawave Limited, Cardiff, UK)
- Водена бања со хоризонтално мешање и термостат (Unitronic OR, Selecta, BarCELona, Spain)
- Хомогенизатор UltraTurax T25 basic (IKA – Werke GmbH & Co. KG, Germany)
- Магнетна мешалка (Jenway, UK)
- Магнетна мешалка со температурна сонда (IKA Plate – RCT Digital, IKA – Weke GmbH & Co. KG, Germany)
- Трансмисиона електронска микроскопија TEM (JEM-1400, Jeol, Japan) приклучен на дигитална камера (Veleta TEM Camera, Olympus, Germany)
- Zetasizer Nano Series (Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., UK)
- Кивети за ултрацентрифугирање 100 000 MWCO (Vivaspin 20, Sartorius, Germany)
- Центрифуга (Rotofix 32 – Hettich Zentrifugen, Germany)
- Полупропустлива мембрана (MEMBRA-CEL dialysis tubing; MWCO 7000 RC, Serva Feinbiochemica GmbH, Germany)
- Читач на микроплочи (VICTOR Perkin Elmer, USA)
- T-75 шишињата за клеточни култури (Greiner Bio-One GmbH, Germany)
- Плочи со 96 бунарчиња (CELLstar® 96 well CELL Culture Microplate, Greiner Bio-One GmbH, Germany)
- Читач на микроплочи (FLUOstar, BMG LabTechnologies, Germany)
- Бели плочи со 96 бунарчиња (Corning® 96 Well Solid POLystyrene Microplate)
- Zeiss Axio Observer Z1 инвертен микроскоп (Zeiss, Jena, Germany), опремен со епифлуоресцентен илуминатор и комора за загревање на плочи
- 35-милиметарски стаклени садови (μ -Dish 35 mm, POLymer coverslip uncoated)
- Конфокален микроскоп (Carl Zeiss, Axiovert 200M Inverted Microscope)
- Фурие трансформна инфрацрвена спектроскопија (FT-IR Perkin Elmer 2000, USA)
- Диференцијална скенирачка калориметрија (Phoenix DSC 204F1 Netzsch, UK)
- Спектрофотометар опремен со оптичка микросонда (Cary 60 UV-VIS, Agilent Instruments, Germany).

4.2. Методи за подготовка и карактеризација на формулациите

4.2.1. Подготовка на екстракти од *Cannabis sativa* (CSE)

Како материјал за подготовка на екстрактите беа користени суви делови од цветот (*F*) и суви делови од цела херба (*C*) од диворастечка *Cannabis sativa*, собрана од територијата на С. Македонија. Беа подготвени два вида на екстракти со помош на две различни методи/постапки и тоа: 1) течен екстракт добиен без претходна декарбоксилација на појдовниот материјал (од суви цветови (*FA*) и суви делови од цела херба (*CA*)) и 2) сув лиофилизиран екстракт (од суви цветови (*FE*) и суви делови од цела херба (*CE*)).

4.2.1.1. Добивање на течен екстракт без претходна декарбоксилација на појдовниот материјал

Одредена количина на одваган, спрашен и хомогенизиран растителен материјал од суви делови од цветот и суви делови од цела херба беше екстрахиран со метанол на ултрасонична бања во време од 15 минути. По филтрирањето, остатокот од растителната суровина беше екстрахиран уште еднаш според претходно опишаните услови.

4.2.1.2. Добивање на сув лиофилизиран екстракт

Суровиот течен екстракт од растението *Cannabis sativa* беше подготвен со постапка на мацерација. Имено, екстракцијата беше направена со 1,5 L метанол на 50 g сушен и мелен растителен материјал од диворастечки *Cannabis sativa*, во период од 3 часа под континуирано мешање на магнетна мешалка (60 °C, 250 вртежи во минута; Jenway, UK). По 3 часа, примерокот беше филтриран и на растителниот материјал дополнително беше додаден 1 L метанол и екстракцијата беше продолжена за уште 4 часа под горенаведените услови. Мацерацијата се одвиваше на собна температура во времетраење од 17 часа. Двата филтрата беа измешани заедно и отпарени на рота-вапор до константна маса (40 °C, 50 вртежи во минута, 50 mBar; Buchi 215, Switzerland). Добиениот примерок на густ екстракт беше замрзнат на -80 °C, по што истиот беше лиофилизиран (24 часа, 0,048 mbar, -45 °C; Labconco, USA).

4.2.2. Подготовка на липидни наносистеми

На почеток на овие истражувања значајно е да се истакне дека целта на оваа докторска дисертација не беше да се направи дизајн и формулациски развој на липидни наносистеми за насочено делување во ЦНС. Имено, за истражувањата беа одбрани две оптимални формулации на липидни наносистеми (липозоми и наноструктурирани липидни носачи) добиени како оптимални формулации од наши претходни истражувања (Markova et al., 2022; Shalabalija et al., 2021).

Со цел да се остварат предвидените истражувања, овие формулации беа дополнително модифицирани со полимери за стерна стабилизација (*PEG* и *POL*, соодветно).

Во насока на дизајнирање на наносистеми за ефикасен третман на епилепсија, беа подготвени и формулации со вграден екстракт од *Cannabis sativa*, кој претходно беше соодветно подготвен и карактеризиран. Имено, по извршените

in vitro студии за испитување на антоксидативниот потенцијал, како и испитувањето на вијабилноста на *hCMC/D3* клетките по 48 часа, при третман со горенаведените различни екстракти, најголем процент на вијабилни клетки третирани со различни концентрации од екстрактите се добиени со *CE*.

Врз основа на овие прелиминарни испитувања на сите четири подготвени екстракти, за понатамошните истражувања е избран лиофилизираниот сув екстракт од херба (*CE*). Истиот, понатаму беше користен при подготовка на липидните наносистеми со цел негово вградување во нанолипозоми и наноструктурирани липидни носачи со што би се обезбедило нивно ефикасно насочување, безбеден премин низ КМБ и целно делување во мозокот.

4.2.2.1. Подготовка на нанолипозоми (*NL*)

Празните липозомски везикули (примерок *NL0*) составени од лецитин, хидрогениран фосфолипид и холестерол во однос 17,3:1:1 беа подготвени со модифицирана техника на хидрирање на сув липиден филм (Сл. 5) (Mihailova et al., 2022). Дополнително, беа подготвени две различни формулации со цел да се увиди како различните полимери за стерна стабилизација влијаат врз физичко-хемиските и биофармацевтските особини на липозомите (Табела 2). Во првата формулација беа додадени 30 mg *PEG* (примерок *NL1*), а во втората беа додадени 30 mg *POL* (примерок *NL2*). Вака подготвената смеса беше додадена во 5 mL меша на органски растворувачи (метанол и хлороформ во однос 1:4 v/v).

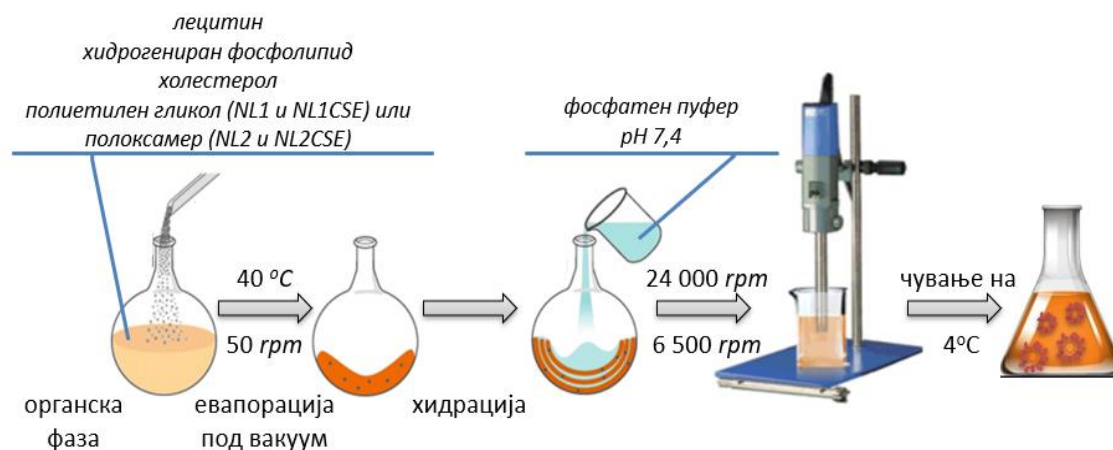
За подготовка на *NL* со енкапсулиран екстракт од *Cannabis sativa*, 200 mg од претходно избраниот сув лиофилизиран екстракт од цела херба (*CE*) беше растворен во мешата од органски растворувачи и додаден во масната фаза (примероци на формулации *NL1CE* и *NL2CE*, соодветно).

Табела 2. Состав на подготвени *NL* формулации изразен како масен однос на компонентите

Формулација	Соја лецитин	Хидрогениран фосфолипид	Холестерол	PEG	POL	CE
NL0	8,67	0,5	0,5	/	/	/
NL1	8,67	0,5	0,5	1	/	/
NL1CE	8,67	0,5	0,5	1	/	6,67
NL2	8,67	0,5	0,5	/	1	/
NL2CE	8,67	0,5	0,5	/	1	6,67

Потоа, органските растворувачи беа отстранети со помош на евапорација под вакуум користејќи ротавапор на температура од 40 °C и брзина на ротација од 50 rpm. Формируваниот тенок липиден филм беше хидриран со водената фаза, односно 10 mL фосфатен пуфер со pH 7,4. Хидрирањето беше направено во 3 последователни циклуси во тек на 15 минути, кои се состојат од 2 чекори и тоа ултрасонификација (50/60 Hz) на 40 °C во време од 10 минути и рачно мешање на 40 °C во водена бања, во време од 5 минути. Добиените липозоми беа хомогенизирани на Ултра-туракс во време од 3 минути на 24 000 rpm и истите беа

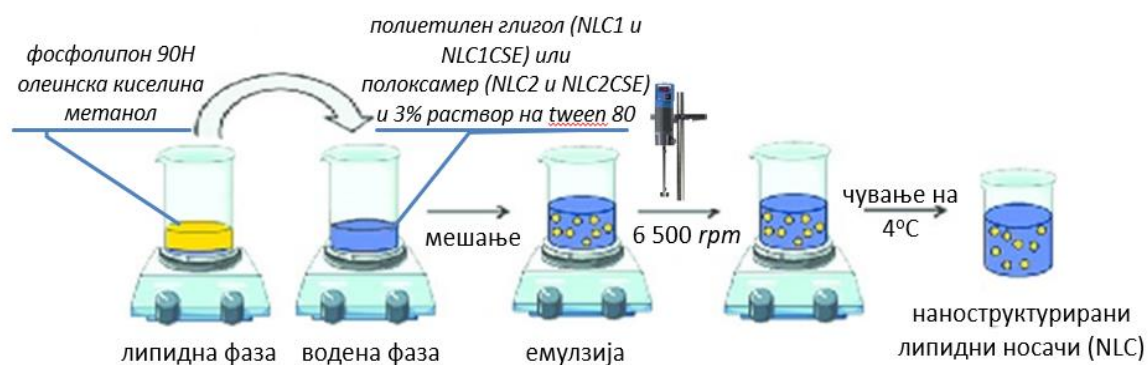
оставени во фрижидер на температура од 2-8 °C во период од 24 часа. Потоа, липозомската дисперзија повторно беше хомогенизирана во време од 3 минути на 6 500 rpm. Вака подготвените *NL* дисперзии се чуваат на температура од 2-8 °C.



Слика 5. Шематски приказ на подготовка на *NL*.

4.2.2.2. Подготовка на наноструктурирани липидни носачи (*NLC*)

NLC формулациите беа подготвени со метод на евапорација на растворувач (Сл. 6) (Mihailova et al., 2022). Беа подготвени различни формулации со цел да се увиди како различните полимери за стерна стабилизација влијаат врз физичко-хемиските и биофармацевтските особини на *NLC* (Табела 3).



Слика 6. Шематски приказ на подготовка на *NLC*.

Кај сите формулации, липидната фаза беше составена од фосфолипон 90H како цврст липид и олеинска киселина како течен липид во однос 1:1,15, соодветно, растворени во 10 g метанол на магнетна мешалка (60 °C, 250 rpm; Jenway, UK). Потоа липидната фаза беше додадена во водената фаза (однос на липидна/водена фаза 1:1 m/m) која беше составена од 3% воден раствор на *Tween 80* за формулацијата без полимер за стерна стабилизација (формулација *NLC0*).

Дополнително, беа подготвени две различни формулации со цел да се увиди како различните полимери за стерна стабилизација влијаат врз физичко-хемиските и биофармацевтските особини на *NLC*. Имено, во првата формулација водената фаза се состоеше од 3% воден раствор на *Tween 80* и 30 mg *PEG* (примерок *NLC1*), а во втората формулација од 3% воден раствор на *Tween 80* и 30 mg *POL* (примерок *NLC2*). Мешањето беше продолжено под претходно споменатите услови до комплетна евапорација на метанолот.

За подготовка на *NLC* со енкапсулиран екстракт од *Cannabis sativa*, 200 mg од претходно избраниот сув лиофилизиран екстракт од цела херба (*CE*) беше растворен во 10 g на метанол и беше додаден во масната фаза на соодветните формулации (примероци *NLC1CE* и *NLC2CE*, соодветно).

Табела 3. Состав на подготвени *NLC* изразен како масен однос на компонентите

Формулација	Фосфолипон 90Н	Олеинска киселина	Tween 80	PEG	POL	CE
NLC0	2,17	2,5	10	/	/	/
NLC1	2,17	2,5	10	1	/	/
NLC1CE	2,17	2,5	10	1	/	6,67
NLC2	2,17	2,5	10	/	1	/
NLC2CE	2,17	2,5	10	/	1	6,67

Добиената топла липидна емулзија беше хомогенизирана 5 минути на 6 500 rpm и потоа беше чувана на 2-8 °C преку ноќ, со цел да се овозможи рекристализација на липидот и комплетно формирање на честичките.

4.2.3. Фитохемиска карактеризација на избраниот екстракт од *Cannabis sativa*

Содржината на екстрахираните канабиноиди беше определена со помош на методот опишан во Германската фармакопеа (*DAD*) согласно тестот за одредување на потентноста на канабисот. Анализите беа направени на Agilent 1200 Model HPLC уред, опремен со *DAD G1315D*, кватернарна пумпа *G1311A*, термостат на колона *G1316A* и термостатиран автосемплер *G1329A* (Agilent Technologies, USA), користејќи колона (150 mm x 3 mm ID, 2,7 mm; Agilent Technologies, USA). Како мобилна фаза беше користена: А – воден раствор на ортофосфорна киселина (8,6 g/L) и В – ацетонитрил, по елуција на градиент на растворувач од 0 – 16 минути со 36% до 18% линеарен градиент, 16 – 17 минута со 18 до 36% линеарен градиент и од 17 – 30 минути со повторна рамнотежа на колоната со брзина на протосок од 0,7 mL/min. Мерењата беа спроведени на 225 nm и 306 nm бранова должина за детекција и квантификација на главните канабиноиди во неутрална и кисела форма, соодветно.

4.2.4. Микроскопски изглед на подготвените формулации

Морфологијата и површината на *NL* и *NLC* беше карактеризирана со трансмисиона електронска микроскопија TEM (JEM-1400, Jeol, Japan) со дигитална

камера (Veleta TEM Camera, Olympus, Germany), контролирана од страна на iTEM software v.5.2. Имено, 2 μL од секој примерок беше соодветно нанесен на сито обложено со бакар (100 mesh) со дополнителен јаглероден филм.

4.2.5. Определување на големина, дистрибуција по големина и z-потенцијал на *NL* и *NLC*

Определувањето на големината, дистрибуцијата по големина и z-потенцијалот на подготвените формулации беше направено со помош на Zetasizer Nano Series (Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., UK). За таа цел, свежо подготвените примероци беа претходно разредени 20 пати со фосфатен пуфер со ниска моларност (10 mM). Мерењата беа направени на 25 °C, при време на термостатирање од 120 секунди, вискозност на медиумот 0,8894 cP, диелектрична константа 78,5 и агол од 173 °, во провидни кивети за еднократна употреба, со рефрактивен индекс од 1,339 и 1,348 за *NL* и *NLC*, соодветно. Добиените резултати претставуваат просечни вредности од најмалку 3 различни примероци, секое од нив анализирано 3 пати со 12 последователни мерења.

Големината на честичките на подготвените *NL* и *NLC* е претставена како просечен z-диаметар (d_z nm), дистрибуцијата на честичките по големина како индекс на полидисперзност (PDI) и површинската наелектризираност преку измерениот зета потенцијал (mV). Имајќи во предвид дека средната големина на честичките на примероците е помала од 0,2 μm и дека истите се мерени во медиум со мала диелектрична константа, електрофоретските определувања на зета потенцијалот беа пресметани согласно *Huckel*-овата равенка:

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta}$$

каде, U_E ја претставува електрофоретска мобилност, ε се однесува на диелектричната константа, z го претставува z-потенцијалот на честичките, со η е означен вискозитетот на примерокот, а со $f(ka)$ е означена *Henry*-евата функција.

4.2.6. *In vitro* испитување на физичката стабилност на подготвените липидни наносистеми

Со цел да се испита *in vitro* физичката стабилност на сите подготвени *NL* и *NLC*, 200 μL од формулациите беа инкубирани со 800 μL физиолошки релевантен медиум (фосфатен пуфер pH 7,4) и хумана плазма, соодветно, на 37 °C во период од 1, 4, 6 и 24 часа. Во овие временски точки, определувањето на големината и дистрибуцијата по големина на честичките беше направено со помош на Zetasizer Nano Series (Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., UK), под претходно опишаните услови во дел 4.2.6.

4.2.7. Фурие трансформна инфрацрвена спектроскопија (*ATR-FTIR*)

Структурата на подготвените формулации, како и можните интеракции помеѓу структурните компоненти на истите, беа испитани со помош на снимање со атенуирана тотална рефлексија (*ATR*). Подготвените формулации (*NL* и *NLC*), како

и секоја компонента поединечно, најпрво беа оставени на $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ во време од 2 часа, а потоа беа лиофилизирани ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0.052 mBar ; FreeZone 2.5 Freeze Dry System – LABCONCO, USA). *ATR-FTIR* спектрите беа снимени на Perkin-Elmer System 2000 FTIR спектрометар, користејќи Golden Gate (Specac) како ATR додаток, опремен со дијамантски ATR кристал и ZnSe леќи, со агол на инциденца од 45 ° . Бројот на скенирања беше 64, како за позадинскиот спектар така и за спектрите на примероците. Спектрите беа анализирани со помош на соодветен софтвер за спектрални анализи (Grams32, Thermo, USA).

4.2.8. Диференцијална скенирачка калориметрија (DSC) на формулациите и CE

DSC кривите на NL и NLC, како и CE, беа снимени со користење на диференцијално скенирачки калориметар (Phoenix DSC 204 F1 - NETZSCH), во перфорирани алуминиумски садчиња ($40\text{ }\mu\text{L}$) со маса на примерок од $1,5\text{-}5\text{ mg}$, додека празен сад беше користен како референца. DSC кривите беа снимени во температурен ранг од $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, со брзина на загревање од $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, под атмосфера на N_2 од $20,0\text{ mL}/\text{min}$ до $70,0\text{ mL}/\text{min}$.

4.2.9. Определување на ефикасност на енкапсулација на CE во подготвените NL и NLC

Процентот на енкапсулиран CE во липидните наносистеми беше определен индиректно, преку определување на неенкапсулираната фракција на CE со помош на претходно опишаниот HPLC метод. За таа цел, точно определен волумен од подготвените формулации беше филтриран низ кивети за ултрацентрифугирање со големина на пори од $100\text{ }000\text{ MWCO}$ (Vivaspin 20; Sartorius, Germany). Примероците беа центрифугирани (4000 rpm , $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min ; Rotofix 32 – Hettich Zentrifugen, Germany) со 2 последователни миења по 15 минути со фосфатен пуфер рН 7,4 и дестилирана вода за NL и NLC, соодветно. Супернатантите беа филтрирани низ мембрански филтер $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (Ministar RC25; Sartorius, Germany) и анализирани со помош на наведениот HPLC метод, а количината на CE беше определена преку квантификација на CBD и CBDA канабиноидите од интерес. Празните формулации (без вграден CE) беа користени како слепа проба (примероци NL1, NL2, NLC1 и NLC2, соодветно).

4.2.10. In vitro постапка за определување на брзината и кинетиката на ослободување на фитоканабиноидите од подготвените липидни наносистеми

In vitro постапката за определување на брзината на ослободување на фитоканабиноидите од липидните наносистеми (3 mL нативна дисперзија) беше направена со користење на дијализен метод со полупропустлива мембрана (MEMBRA-CEL dialysis tubing; MWCO 7000 RC; Serva Feinbiochemica GmbH, Germany). Како дијализирачки медиум беше користен 30 mL на фосфатен пуфер со рН 7,4 на температура од $37 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ и 200 rpm . Во претходно дефинирани временски интервали (по 1, 2, 4, 8 и 24 часа), беа земени по 10 mL од медиумот и заменети со еднаков волумен на претходно загреан фосфатен пуфер. Концентрацијата на фитоканабиноиди во секој примерок беше определена спектрофотометриски на 225 и 306 nm бранова должина за CBD и CBDA, соодветно. Експериментите беа направени и на празни формулации со цел да се потврди соодветноста на методот

и да се обезбедат репрезентативни резултати. Добиените резултати за детекција и квантификација на горенаведените компоненти со помош на спектрофотометрија се покажаа дека се споредливи со резултатите добиени од претходно опишаниот *HPLC* метод.

Со цел да се определи кинетиката и механизмот на ослободување на *CE* од подготвените формулации, добиените резултати од брзината на ослободување беа математички моделирани со помош на компјутерски програм *DDSolver 1.0* (menu-driven add-in program for *Microsoft Excel*), при што беа испитани следниве модели:

о Кинетика од прв ред – го опишува ослободувањето на активната компонента кое е зависно од концентрацијата:

$$\log C_t = \log C_0 + K_1 * t/2.303$$

каде C_t е концентрација на АК ослободена во време t , C_0 е почетна концентрација на АК, а K_1 е константа на ослободување од прв ред.

о *Higuchi*-ев модел на дифузија – ја опишува дифузијата на АК низ хомоген матрикс:

$$C = K_h * t^{1/2}$$

каде C е концентрација на ослободена АК во време t , а K_h е константата на брзина на ослободување.

о *Peppas-Sahlin* – го опишува ослободувањето на АК со механизам на *Fick*-ова дифузија и полимерна релаксација:

$$F = K_1 * t^{0.5} + K_2 * t$$

каде K_1 е кинетичка константа на брзината на ослободување според *Fick*-ова дифузија, K_2 е кинетичка константа на брзината на ослободување според механизмот на полимерна релаксација, а t е контролирано ослободување со дифузија од различни геометриски форми.

о *Korsmeyer-Peppas* – го опишува ослободувањето на АК од системи со атипично однесување (не-*Fick*-ова дифузија). Моделот е соодветен за системи каде постојат различни кинетики на ослободување од една иста формулација:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k * t^n$$

каде M_t е количина на ослободена АК во време t , M_∞ е вкупна количина на АК, k е константа на брзина на ослободување, а n е експонент што го дефинира механизмот на ослободување на АК.

4.2.11. Квантитативна карактеризација на наносистем – протеин комплексите

Со цел да се испита ефектот на стерна стабилизација на полимерот (*PEG* или *POL*, соодветно) присутен на површината на честичките врз формирањето на

протеинската корона, како и да се предвиди стабилноста и биолошката судбина на формулираните наносистеми *in vivo*, беа направени експерименти за квантитативна карактеризација на наносистем – протеин комплексите.

Изведените експерименти се во согласност со претходно воспоставени експериментални услови (Dimchevska et al., 2017; Shalabalija et al., 2021). Во таа насока, количината на атсорбирани протеини на површината на подготвените празни формулации на *NL* и *NLC* беше споредена со количината на атсорбирани протеини на површината на нивните аналози без присутен полимер (примероци *NL0* и *NLC0*). Формацијата на протеинскиот комплекс помеѓу наносистеми и плазма протеините беше определен преку инкубација на подготвените примероци со хумана плазма од здрави доброволци.

За таа цел, *NL1* и *NL2*, како и *NLC1* и *NLC2* беа разредени со дестилирана вода до финална концентрација од 1 mM и последователно инкубирани со хумана плазма во однос 1:1 (v/v) во времетраење од 1 час на 37 °C на водена бања со хоризонтално мешање (75 rpm). Пред чекорот на инкубација, хуманата плазма беше чувана на 2-8 °C и потоа центрифугирана во време од 5 минути на 15 000 rpm со цел да се отстранат протеинските агрегати. Количината (mg) на атсорбиран протеин на површината на честичките од испитуваните формулации беше пресметан индиректно преку определување на преостанатата количина на протеини во филтратот после центрифугирање (15 min, 4000 rpm, 3 чекори на промивање) со помош на Bradford-ов метод (microtiter plate protocol; VICTOR Perkin Elmer, USA) и соодветно одземање од вкупната (почетната) количина на протеини во плазмата. Како контрола беше користена дилуирана плазма, инкубирана под истите, претходно опишани услови. Примероците и контролите беа аплицирани во трипликат.

Процентот на апсорбирани протеини на површината на *NL* и на *NLC* беше пресметан согласно равенката:

$$\begin{aligned} & \% \text{ на апсорбирани протеини} \\ & = \frac{mg \text{ апсорбирани протеини на } NL \text{ или } NLC}{\text{вкупни } mg \text{ на протеини во плазма}} * 100 \end{aligned}$$

4.3. Одредување на антиоксидативниот потенцијал на подготвените екстракти и формулации

Антиоксидативниот потенцијал на подготвените екстракти (*FA*, *FE*, *HA*, *HE*), празни формулации без полимер за стерна стабилизација (примероци *NL0* и *NLC0*), празни формулации што се стерно стабилизирани (*NL1* и *NL2*, како и *NLC1* и *NLC2*) и формулации со вграден екстракт (примероци *NL1CE*, *NL2CE*, *NLC1CE* и *NLC2CE*), беше испитан со помош на модифициран *ORAC* тест (*Oxygen radical antioxidant capacity*).

За проценка на антиоксидативната активност во плочи со 96 бунарчиња беа додадени 25 µL од екстрактите подготвени во 4 различни концентрации во опсег 0,1-5 mg/mL или од подготвените формулации и 150 µL на 10 nM раствор на флуоресцеин натриум, а генерирањето на слободни радикали со константна брзина беше поттикнато од 100 mM 2,2'-азобис (2-аминопропан) дихидрохлорид (*AAPH*)

(25 μ L). Како позитивна контрола беше користен раствор од флуоресцеин со *AAPH*, а како негативна контрола беше користен раствор од флуоресцеин без додаден *AAPH*. Флуоресценцијата беше измерена на почеток (F_0) и после 120 минути (F_{120}) (ексцитација на 492 nm, емисија на 535 nm; VICTOR, Perkin Elmer, USA). Сите експерименти беа изведени во четири репликати, а статистичка анализа беше направена со помош на *ANOVA* и мултиваријатен *PLS* модел. Резултатите беа пресметани како процент од почетната флуоресценција ($F_i(\%)$) во функција од времето.

$$F_i(\%) = \frac{F_{120}}{F_0} * 100$$

Резултатите за антиоксидативен потенцијал беа изразени како концентрација која инхибира 50% оксидација ($IC_{50\%}$).

4.4. *In vitro* испитувања на подготвените формулации на избрани клеточни култури

За последователните *in vitro* испитувања беа користени две клеточни линии и тоа клеточна линија на човечки церебрални микроваскуларни ендотелни клетки (*hCMEC/D3*) (*CELLutions Biosystems/CEdarlane*[®], Canada) и клеточна линија добиена од човечки неуробластом (*SH-SY5Y*) (*LCG Standards, Wesel, Germany*) кои ја имитираат и моделираат функцијата на хуманата КМБ и невроните, соодветно.

4.4.1. Подготовка на *hCMEC/D3* клеточна линија

Најпрво, Т-75 шишињата за клеточни култури (*Greiner Bio-One GmbH, Germany*) беа обложени со 0,05 mg/mL колаген тип I во *DPBS* во време од минимум еден час на 37 °C. Клетките беа култивирани во *EBM-2* клеточен медиум на 37 °C и 5% CO₂. Клеточниот медиум беше заменуван со нов на секои 2-3 дена, се до постигнување на конfluентност на клетките. Потоа, клеточниот медиум беше отстранет и клетките беа откачени од површината на шишињата за клеточни култури по инкубација со 0,1 mg/mL трипсин-ЕДТА раствор (37 °C во време од 8 минути). Суспензијата од клетките беше центрифугирана на 1500 rpm за време од 3 минути (*Hettich, Rotofix 32, Germany*) и супернатантот беше отстранет. Последователно, клетките беа суспендирани во 5 mL клеточен медиум, со што беа подготвени за понатамошни експерименти и истражувања. *hCMEC/D3* клеточната линија беше култивирана согласно водичот од производителот.

4.4.2. Подготовка на *SH-SY5Y* клеточна линија

Клетките беа култивирани во *DMEM* на 37 °C и 5% CO₂. Клеточниот медиум беше заменуван со нов на секои 2-3 дена до постигнување на конfluентност на клетките. За време на пресадувањето на клетките, најпрво медиумот се отстранува и клетките се откачуваат од површината на шишињата со помош на 0,1 mg/mL раствор на трипсин-ЕДТА во времетраење од 3 минути на 37 °C. Суспензијата од клетки беше центрифугирана на 800 rpm во време од 5 минути и супернатантот беше отстранет. Потоа клетките беа суспендирани во 5 mL медиум со што беа

подготвени за понатамошни експерименти. Сите останати процедури беа во согласност со водичот од производителот.

4.4.3. Испитување на инхибиција на раст на клетки од *hCMEC/D3* клеточна линија со подготвените екстракти и липидни наносистеми

In vitro студиите на инхибиција на раст на клетките беа изведени на култура од *hCMEC/D3*. Клетките беа засадени во плочи со 96 бунарчиња (CELLstar® 96 well CELL Culture Microplate; Greiner Bio-One GmbH, Germany), претходно обложени со колаген тип 1 во време од 1 час, со густина од 1×10^4 клетки/бунарче во соодветен клеточен медиум (200 μ L).

Во првата фаза од истражувањата, со цел да се направи скрининг на подготвените екстракти, експериментите беа изведени при нивни различни концентрации (0,1 μ g/mL, 10 μ g/mL и 100 μ g/mL) во период на експозиција од 48 часа во 6 бунарчиња/екстракт. Вијабилноста на клетките беше определена со *MTT* – тестот првпат опишан од страна на Mosmann (1983), преку квантификација на виолетовите растворливи кристали од формазан кои се добиваат при редукција на жолтиот *MTT* од страна на ензимскиот комплекс (*NAD(P)H*-зависни оксидоредуктази) имобилизиран во митохондриите на вијабилните клетки. Количината на формирани кристали од формазан зависи од процентот на метаболички активни т.е. живи клетки. Апсорбанцијата беше измерена на 490 nm со помош на читач за микроплочи (FLUOstar; BMG LabTechnologies, Germany), а вијабилноста на клетките беше изразена како процент во споредба со клетките инкубирани само со клеточен медиум (позитивна контрола). *Triton X-100* беше користен како негативна контрола, благодарение на неговите особини да го нарушува интегритетот на клеточната мембрана.

Истите експерименти беа изведени и со различни концентрации од подготвените празни липидни наносистеми (0,1 μ g/mL, 10 μ g/mL и 100 μ g/mL) дилуирани со *DPBS* и дополнително диспергирани во клеточен медиум. Експериментите беа изведени во период на експозиција од 4, 24 и 48 часа. Во секоја временска точка, медиумот од секое бунарче беше соодветно отстранет од клетките и складиран за испитување на цитотоксичноста на клетките со помош на тестот за определување на лактат дехидрогеназа. Потоа, клетките беа третирани со 20 μ L *MTS* раствор во време од 4 часа на 37 °C и 5% CO₂. Вијабилноста на клетките беше определена согласно горенаведениот принцип на реакцијата.

4.4.4. Испитување на цитотоксичност на клетки од *hCMEC/D3* клеточна линија

По инкубација на липидните наносистеми, цитотоксичноста на клетките беше испитана со помош на *LDH* тестот. Медиумот (25 μ L) добиен по инкубацијата на празните формулации на нанолипозоми (*NL1* и *NL2*) и наноструктурираните липидни носачи (*NLC1* и *NLC2*) беше соодветно префрлен во бели плочи со 96 бунарчиња (Corning® 96 Well Solid *POL*ystyrene Microplate). Ослободувањето на лактат дехидрогеназа во супернатантот беше детектирано со додавање на 25 μ L супстрат (CytoTox-ONE™). По инкубација во време од 20 минути на 37 °C и 5% CO₂, 13 μ L од растворот за стопирање на реакцијата и понатамошно создавање на флуоресценција беше додаден во секое бунарче. Флуоресценцијата беше измерена со помош на читач на микроплочи (FLUOstar; BMG LabTechnologies, Germany) на 560 nm ексцитација и 590 nm емисија. Цитотоксичноста беше претставена како

процент во споредба со максималното количество на ослободен лактат дехидрогеназа во присуство на *triton X-100* (позитивна контрола). *EBM-2* клеточниот медиум беше користен како негативна контрола, бидејќи под тие услови не беше детектирана цитотоксичност.

4.4.5. Студии на интернализација на липидните наносистеми во живи клетки со флуоресцентна микроскопија

Со цел да се испита интернализацијата на подготвените липидни наносистеми во живи клетки, *SH-SY5Y* клетките беа засадени претходно (2×10^5 клетки во бунарче) на 35-милиметарски стаклени садови (μ -Dish 35 mm, polymer coverslip uncoated) и инкубирани на 37 °C и 5% CO₂ во време од 48 часа со зелена флуоресценција за визуелизација на ендоплазматски ретикулум (*CellLight ER-GFP*, VacMam 2.0; Thermo Fisher). После тоа, клетките беа инкубирани во време од 1 час со свежо подготвените празни формулации (*NL1*, *NL2*, *NLC1* и *NLC2*) претходно маркирани со црвена боја Dil (*1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate*). За да се испита интернализацијата и ко-локализацијата на честичките, клетките беа инкубирани во време од 1 час со *pHrodo Green dextran conjugate* што дава зелена флуоресценција во кисела средина, односно боја карактеристична за визуелизација на ендоцитоза. Инкубацијата на клетките со Dil означени *NL* и *NLC* траеше 4 часа. По соодветната инкубација, клетките беа промиени двапати со фосфатен пуфер pH 7,4 и со помош на флуоресцентна микроскопија беа направени слики на 37 °C на Zeiss Axio Observer Z1 инвертен микроскоп (Zeiss, Jena, Germany), опремен со епифлуоресцентен илуминатор и комора за загревање на плочи. Понатаму сликите беа обработени со помош на софтверот Carl Zeiss (ZEN 2.6).

4.4.6. Студии на клеточна интернализација на липидните наносистеми со конфокална микроскопија

Со цел да се детерминира интернализацијата од страна на клетките на КМБ и невроните, клеточното преземање на *NL* и *NLC* од страна на *hCMEC/D3* и *SH-SY5Y* клеточните линии и нивната дистрибуција во истите, беше испитана со помош на конфокална микроскопија (Carl Zeiss, Axiovert 200M Inverted Microscope).

За таа цел, клетките беа засадени на 35-милиметарски стаклени садови (μ -Dish 35 mm, polymer coverslip uncoated) (2×10^5 клетки во бунарче) и инкубирани на 37 °C и 5% CO₂ во време од 24 часа со празните формулации на *NL* и *NLC* (*NL1*, *NL2*, *NLC1* и *NLC2*) претходно маркирани со црвена боја Dil (*1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate*). По инкубацијата, клетките беа промиени двапати со фосфатен пуфер pH 7,4 и фиксирани со 3,7% параформалдехид во време од 20 минути на собна температура. По промивање на клетките двапати со фосфатен пуфер pH 7,4, мембраната беше означена со 5 μ l зелена боја *Alexa Fluor™ Phalloidin 488* во 200 μ l 1% бовин серум албумин во време од 10 минути на 37 °C, проследено со бојење на јадрото кај *hCMEC/D3* со 0,5 μ l сина боја *Hoechst fluorescent stain*, а кај *SH-SY5Y* клеточната линија со 300 nM *DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)*, во време од 5 минути на собна температура. *Vectashield mounting medium* беше користен како медиум за одржување и чување, односно медиум што го спречува намалувањето на интензитетот на флуоресценцијата во

текот на чувањето на клетките. Сликите беа обработени со помош на Carl Zeiss software (ZEN 2.6).

4.4.7. Квантитативни студии на клеточно преземање на липидните наносистеми во избрани клеточни култури

Со цел да се одреди квантитативно клеточното преземање на *NL* и *NLC*, *hCMEC/D3* и *SH-SY5Y* клеточните линии беа засадени на плочи од 96 бунари (10^4 клетки/бунарче) и беа култивирани во 0,2 ml *EBM-2* и *DMEM*, соодветно. После два дена на 37 °C во атмосфера од 5% CO₂ до постигнување на конфлуентност, клетките беа инкубирани со подготвените празни формулации (*NL1*, *NL2*, *NLC1* и *NLC2*) претходно означени со *Nil Red*, разредени во соодветниот клеточен медиум (10 µg/mL) во време од 2 часа на 37 °C во атмосфера од 5% CO₂. По инкубацијата, клетките беа промиени двапати со *PBS* и беа лизирани со 2% *Triton X-100* (2h, 37 °C, 5% CO₂). Флуоресценцијата беше измерена на ексцитација од 535 nm и емисија од 635 nm (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Клетките инкубирани само во медиумот беа користени како контрола. Количината на интернализирани наносистеми беше пресметана како процент од максималната флуоресценција добиена со истата концентрација на соодветните неинкубирани нативни *NL* и *NLC* формулации.

За да се испитаат механизмите на ендоцитното преземање, овие експерименти беа исто така спроведени во присуство на инхибитори за соодветните патеки на ендоцитоза. Пред инкубацијата, една група клетки беше претходно третирана со 15 µM хлорпромазин во време од 40 минути, проследена со инкубација со подготвените празни формулации (*NL1*, *NL2*, *NLC1* и *NLC2*), додека друга група клетки беше претходно третирана со 25 µM индометацин во време од 40 минути (37 °C, 5% CO₂). Третата група клетки беше изложена на 4 °C, 40 минути пред изведување на експериментот и последователно 2 часа инкубација со горенаведените липидни наносистеми, со цел да се набљудува ефектот на ниската температура како општ метаболички инхибитор.

4.5. Статистичка анализа на резултатите добиени од *in vitro* определувањето на антиоксидативниот потенцијал и студиите на избрани клеточни култури

Методологијата на најмали квадрати (*PLS*) беше применета со користење на валидиран статистички софтвер Simca 14.1 (Sartorius Stedim Biotech, Germany). Со цел да се истакнат доминантните фактори кои имаат значаен придонес во моделот, користен е VIP скор резултатот.

4.6. *In vivo* студии на ефикасност на подготвените липидни наносистеми

Со цел да се испита ефикасноста на подготвените формулации, беа користени машки *ICR* глувци (25-30 g), земени од одделот за животни при Институтот за невробиологија, БАН. По пристигнувањето, глувчињата беа адаптирани на новата средина најмалку една недела пред да бидат користени во студијата. Глувците беа сместени во група од 10-12 во стандардни кафези и под следните услови: температура од 21-24 °C, влажност од 40-50 %, при вештачки индуцирана светлина во циклус од 12 часа светлина и 12 часа темнина, со светла вклучени во 7:00 часот наутро. Вода и храна за животните беа испорачувани

согласно нивните потреби. Експерименталните процедури беа спроведени во согласност со Директивата 2010/63/EU на Советот на Европските заедници и беа одобрени од Бугарската агенција за безбедност и храна (Лиценца бр. No#58000183).

4.6.1. Дозирање на подготвените формулации за примена кај ICR глвци

Подготвените полни формулации (*NL1CE*, *NL2CE*, *NLC1CE*, *NLC2CE*) и диазепам како референтен антиепилептичен лек беа дисперзирани во 1% раствор на *Tween 80* и администрирани интраперитонеално (i.p.) во три различни дози (30, 100 и 300 mg/kg во волумен од 0,1 mL на 10 g телесна тежина) во временски интервал од 30 минути пред да се започне со тестовите. Останатите референтни лекови, како фенитоин и карбамазепин, беа администрирани во дози од 30 и 10 mg/kg, соодветно, 60 минути пред да се стимулира напад. Во насока на експериментите, беа инјектирани и соодветни контроли.

4.6.2. Испитување на антиконвулзивната активност на подготвените формулации преку индуцирање напад со тест за максимален електро шок (*MES*)

MES тестот беше изведен согласно претходно опишана постапка (Angelova et al., 2019; Todorov et al., 2020). Накратко, одговорот на напад беше индуциран со стимулација со транскорнеални електроди (Constant Current Shock Generator; 50 mA, 60 Hz испорачани за 0,2 секунди). Превенцијата на тонични напади придружени со екстензија на задните екстремитети кај 50 % од глвчињата беше прифатено како антиконвулзивен ефект.

4.6.3. Испитување на антиконвулзивната активност на подготвените формулации со индукција на психомоторни напади со 6 Hz

Психомоторните напади беа евалуирани согласно критериумите објаснети претходно (Angelova et al., 2019; Todorov et al., 2020). Нападите беа карактеризирани како *Straub* опашка (дорзална флексија на опашката), вибрирање на телото, трепкање со око/очи, локомоторни движења, кимање со главата, клонус на предните екстремитети. Животното кое ја вратило нормалната положба во рок од 10 секунди по стимулот, беше сметано за заштитено.

4.6.4. Испитување на антиконвулзивната активност на подготвените формулации со индукција на напади преку субкутана администрација на пентилентетразол (*scPTZ*)

За *scPTZ* тестот, доза од 85 mg/kg предизвикува клонични напади кај 97% (CD97) од тестираните контролни животни (Angelova et al., 2019). Тестираните глвци беа набљудувани во период од 30 мин, при што беше детектиран периодот на латентност до појава на првите миоклонични, клонични и тонични напади.

4.6.5. Испитување на антиконвулзивната активност на подготвените формулации со индукција на напади преку интравенска администрација на пентилентетразол (*ivPTZ*)

Преку континуирана интравенска администрација (0,01 mL/s) во вената на опашката на тестираното животно беше внесен 1% раствор на пентилентетразол (*PTZ*) со цел да се детектираат трите фази на миоклонични, клонични и тонични напади. Прагот на појава на напади беше пресметан во mg/kg од волуменот на инфундиран *PTZ* во mL, телесната тежина и концентрацијата на *PTZ*.

4.6.6. Испитување на невротоксичноста на подготвените формулации со рота-род тест

Како невротоксична доза беше прифатена доза од подготвените формулации што предизвикува губење на моторната координација на глувчето при изложување на истото на ротирачко тркало (3,2 cm во дијаметар со брзина од 10 вртежи во минута) за помалку од 1 минута во три последователни сесии.

4.6.7. Статистичка анализа

Резултатите од *in vivo* тестовите за испитување на ефикасноста на липидните наносистеми со вграден екстракт од *CE* се претставени како средна вредност \pm стандардна грешка (S.E.M.). Дозите кои ги заштитуваат 50% од глувците во *MES* и 6 Hz – тестовите (ED50), како и дозата која предизвикува токсични ефекти кај 50% од тестираните животни (TD50) добиена од рота-род тестот, беа пресметани преку *log-probit* методот (Litchfield and Wilcoxon, 1949). Еднонасочна анализа на варијанса (*ANOVA*) проследена со *Dunnnett*-ов пост хок тест беше користена за *ivPTZ* тестот. Податоците кои не беа нормално дистрибуирани беа пресметани со помош на *Kruskal-Wallis* проследено со *Mann-Whitney*-ов *U*-тест. Статистичката сигнификантност беше прифатена при $p \leq 0,05$. Анализите беа направени со помош на Graph Pad Prizm Version 7.04 за Windows (GraphPad Software, San Diego, Ca, USA).

5. Резултати и дискусија

Целта на оваа докторска дисертација беше подготовка и карактеризација на различни липидни наносистеми со вграден екстракт од *Cannabis sativa*, како и *in vivo* студии на ефикасност на истите со цел да се потврди насочувањето кон ЦНС и потенцијалот за ефикасен третман на епилепсија.

5.1. Карактеризација на екстракти подготвени од растението *Cannabis sativa*

За остварување на целите на ова истражување, во првата фаза од испитувањата потребно беше да се селектира најсоодветен екстракт од *Cannabis sativa* кој понатаму ќе биде енкапсулиран во липидните наносистеми со цел поефикасна и безбедна испорака на истиот преку КМБ и третман на болести на ЦНС, односно третман на епилепсија.

Како што беше наведено во методологијата на ова истражување, подготвени беа два вида на екстракти со помош на две различни постапки и тоа: течен екстракт добиен без претходна декарбоксилација на појдовниот материјал (од суви цветови (FA) и суви делови од цела херба (CA)) и сув лиофилизиран екстракт (од суви цветови (FE) и суви делови од цела херба (CE)).

Резултатите од определувањето на количината на канабиноиди во подготвените екстракти укажаа дека најголем процент на екстрахирани канабиноиди од интерес се добиени кај сувите лиофилизирани екстракти и тоа 56,96 mg и 17,95 mg CBDA на g екстракт за CE и FE, соодветно. Од друга страна, кај екстрактите добиени од суви делови од цветот (FA и FE) беше определена и голема количина на Δ^9 -тетрахидроканабинолна киселина (188,57 и 357,82 mg THCA на g екстракт, соодветно). Имајќи го во предвид психоактивниот ефект кој го покажува истата, како екстракт од избор за вградување во липидните наносистеми во оваа фаза беше одбран сувиот лиофилизиран екстракт од суви делови на цела херба (CE).

Дополнително, за определување на антиоксидативниот ефект на подготвените екстракти беше изведен модифициран ORAC тест. Добиените резултати изразени како концентрација која предизвикува 50% инхибиција на оксидација (IC_{50%}), се прикажани во Табела 4.

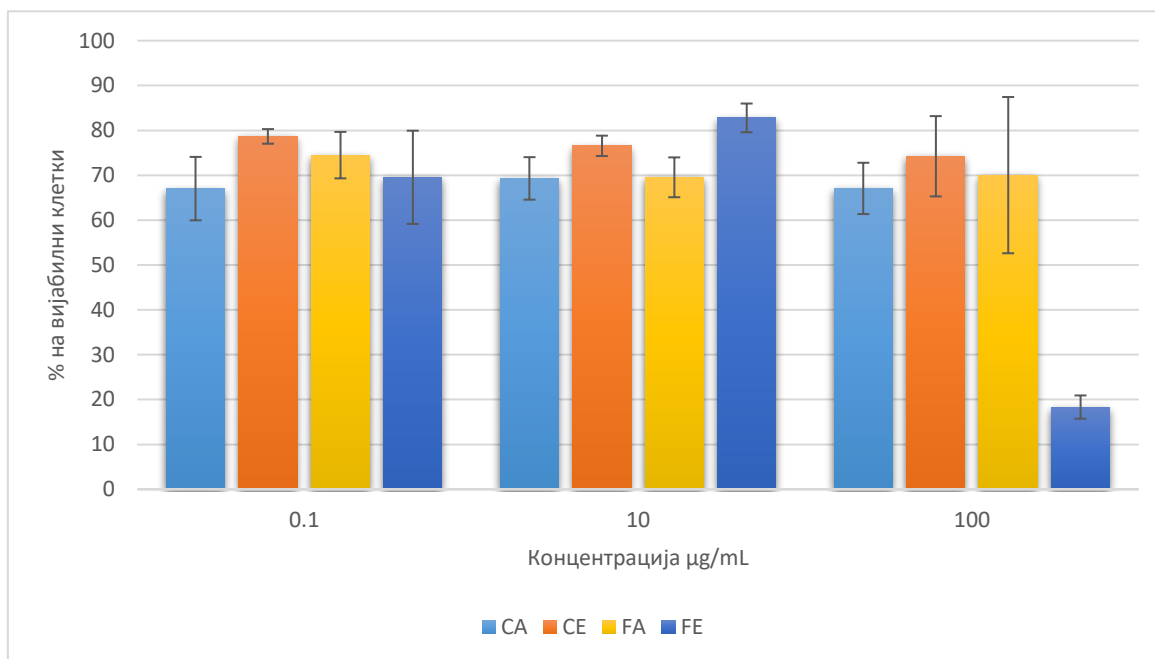
Табела 4. IC_{50%} вредности на подготвените екстракти изразени во mg/mL

Примероци на екстракти	CA	CE	FA	FE
IC _{50%}	0,108	0,052	0,058	0,052

Врз база на добиените резултати може да се заклучи дека екстрактите CE и FE имаат најголем антиоксидативен потенцијал (Табела 4), но заради големата содржина на THCA во FE, екстракт од избор во оваа фаза од истражувањата повторно беше CE.

Со цел да се испита цитотоксичниот ефект на подготвените екстракти, односно да се определи безбедносниот концентрациски опсег во кој истите не ја намалуваат вијабилноста на клетките, беше направено *in vitro* испитување на вијабилноста на hCMC/D3 клетките по 48 часа време на инкубација со подготвените екстракти. На Слика 7 се прикажани добиените резултати од

испитувањето на вијабилноста на клетките третирани со 3 различни концентрации (0,1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ и 100 $\mu\text{g/mL}$) од подготвените екстракти (*CE*, *CA*, *FE* и *FA*). Како што може да се забележи од графичкиот приказ, по третирање на клетките со највисоката концентрација на екстракт (100 $\mu\text{g/mL}$) најголем процент на вијабилни клетки беше забележан при инкубација со *CE* (сув лиофилизиран екстракт од цела херба), а најмал кај *FE* (сув лиофилизиран екстракт од цвет).



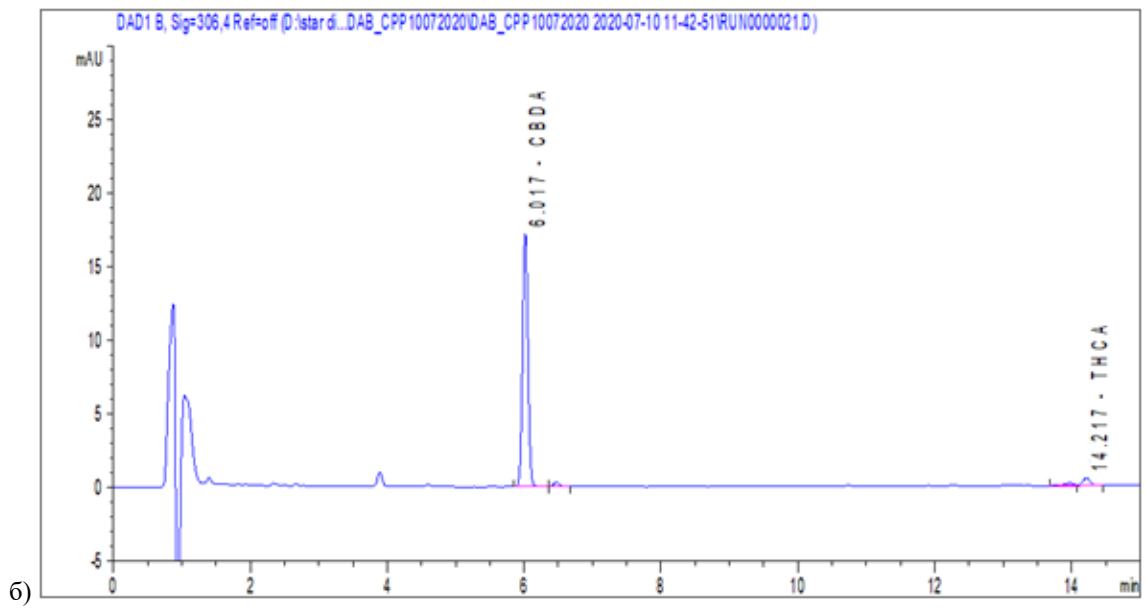
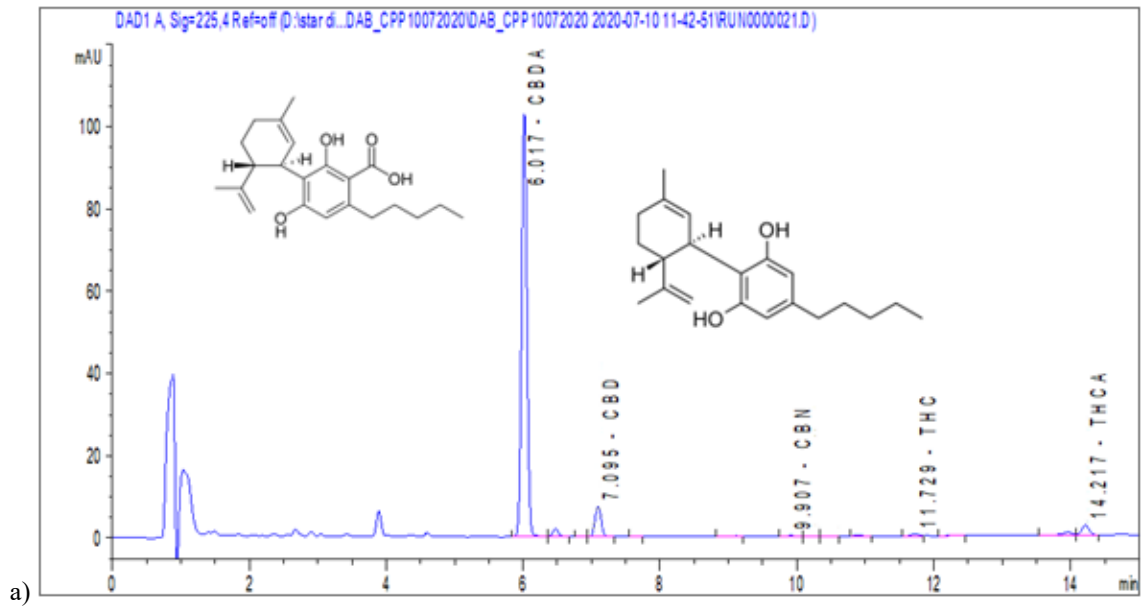
Слика 7. Процент на вијабилност на клетки по 48 часа третирани со три концентрации (0,1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$) од подготвените екстракти ($n=6$).

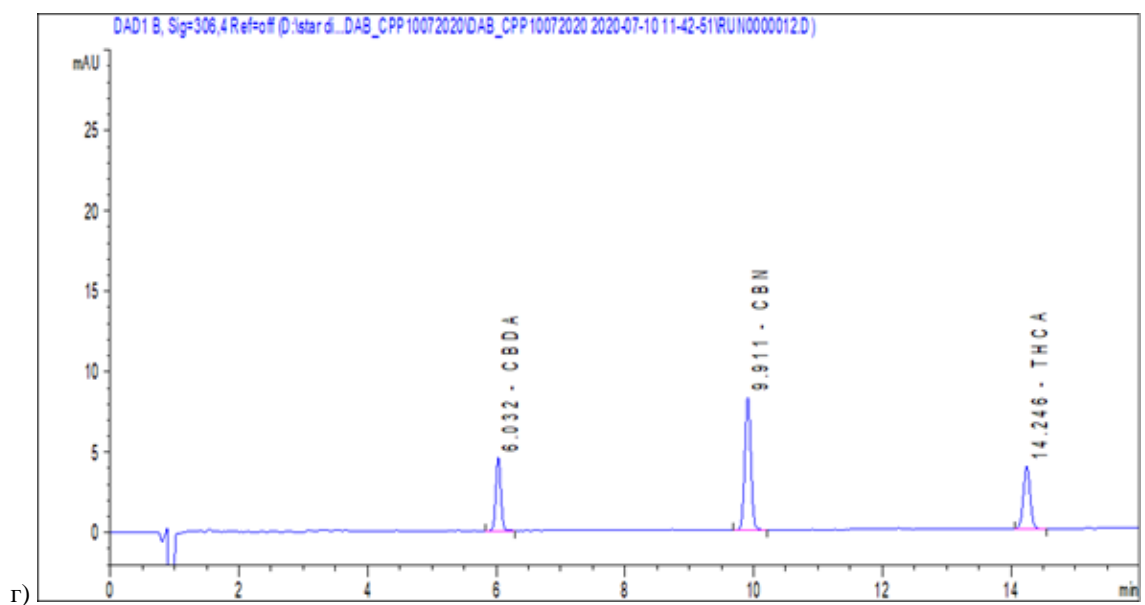
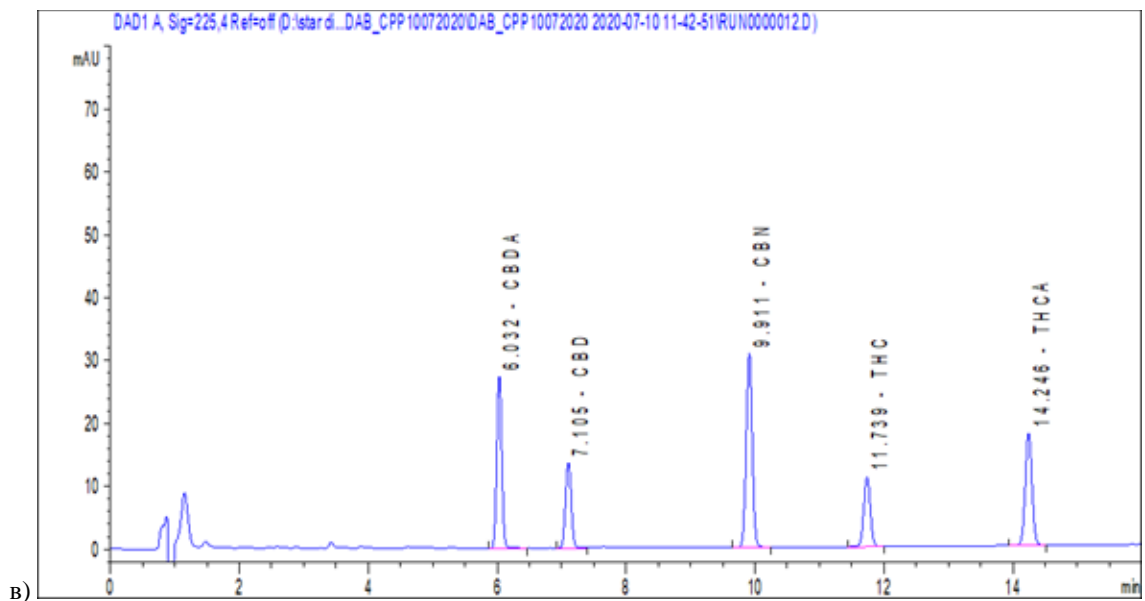
Врз база на претходно изнесените резултати односно количината на екстрахирана *CBDA* од подготвените екстракти, како и психоактивните ефекти кои ги предизивкуваат дериватите на Δ^9 -тетрахидроканабинолот и резултатите од испитувањата на антиоксидативниот потенцијал и инхибицијата на раст на клетки, за понатамошните експерименти беше избран *CE* (сув лиофилизиран екстракт добиен од цела херба).

Затоа, во последователните истражувања беше направен целосен фитохемиски профил на избраниот лиофилизиран сув екстракт од цела херба од растението *Cannabis sativa* (примерок *CE*).

Со примена на претходно валидиран *HPLC* метод, следниве канабиноиди беа детектирани и соодветно квантифицирувани: на $t_R=7,095$ min канабидиол (0,524% m/m) и канабидиолна киселина (5,696 % m/m) на $t_R=6,017$ min (Сл. 8).

Канабидиолната киселина (*CBDA*) беше избрана како маркер-компонента и понатаму се користеше при испитувањето на ефикасноста на енкапсулацијата и одредувањето на брзината на ослободување на *CE* од подготвените формулации.





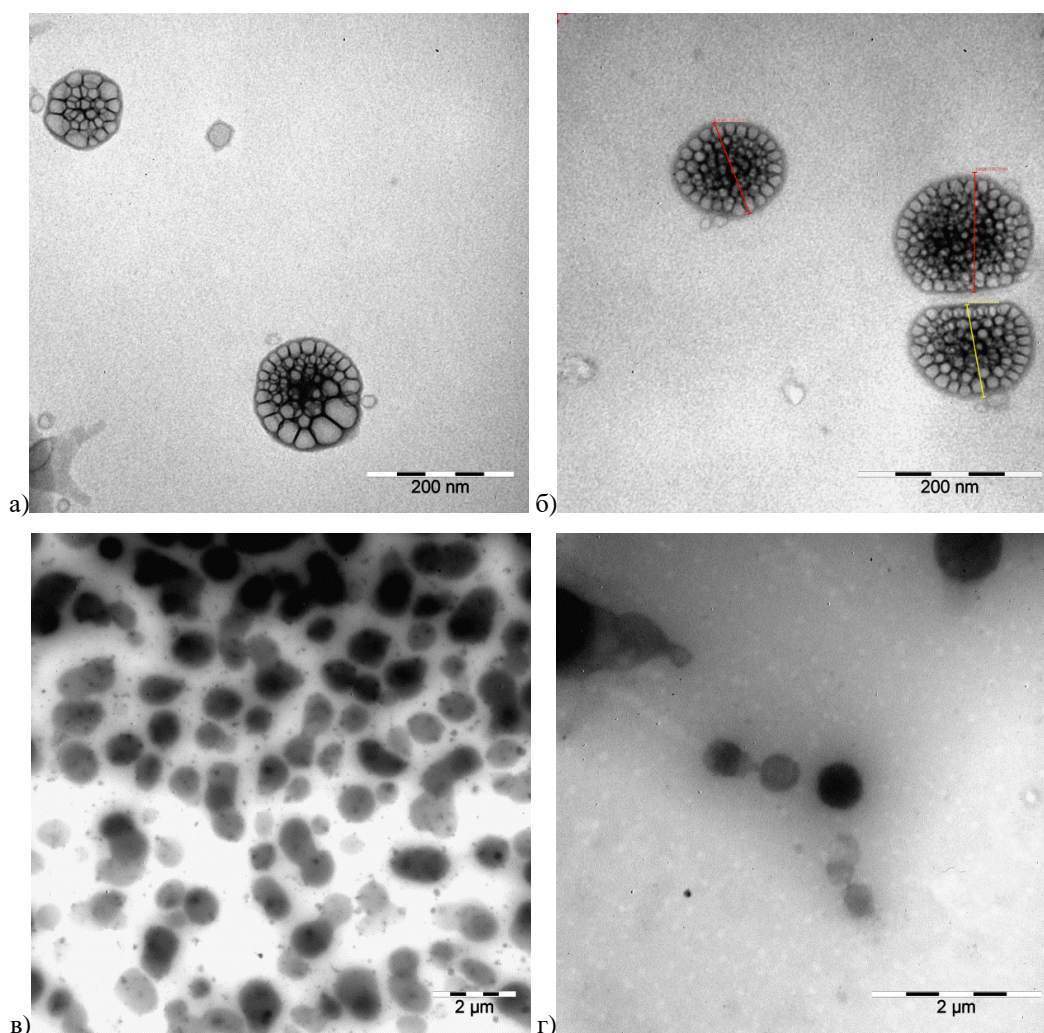
Слика 8. HPLC хроматограм на *Cannabis sativa* екстракт снимен на: а) 225 и б) 306 nm за CBD и CBDA, соодветно. Хемиските структури кои беа избрани за квантитативна анализа се претставени на сликите; Стандард микс беше снимен на в) 225 и г) 306 nm.

5.2. Физичко-хемика и биофармацевтска карактеризација на подготвените липидни наносистеми

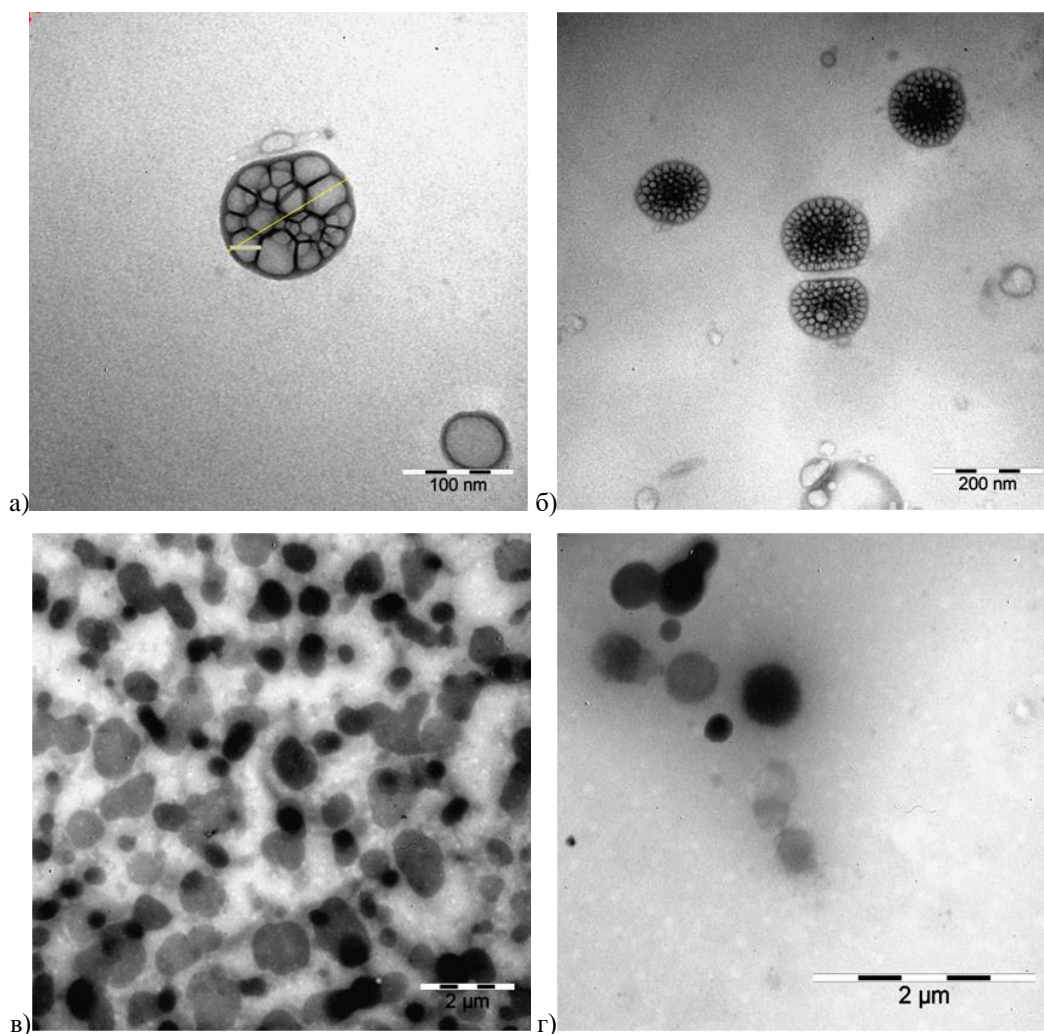
5.2.1. Морфолошки изглед

Морфолошките карактеристики на наносистемите претставуваат едни од параметрите што значајно влијаат на нивната судбина во организмот и биолошкото однесување, покрај големината и површинскиот полнеж (Bozzuto and Molinari, 2015). Во таа насока, од огромно значење е подготвените наносистеми да бидат детално карактеризирани пред нивната употреба и да се направи корелација помеѓу нивните физичко-хемики карактеристики и перформансите *in vitro* и *in vivo*.

Фотомикрографските прикази со примена на *TEM* покажуваат дека сите четири формулации се карактеризираат со сферична форма и релативно воедначена големина на честичките (Сл. 9 и 10).



Слика 9. TEM прикази од наносистемите без вграден СЕ: а) *NL1*, б) *NL2*, в) *NLC1* и г) *NLC2*.



Слика 10. TEM прикази од наносистемите со вграден CE: а) *NL1CE*, б) *NL2CE*, в) *NLC1CE* и г) *NLC2CE*.

5.2.2. Големина на честички, дистрибуција на честички по големина и површински потенцијал на липидните наносистеми

Липидните наносистеми претставуваат едни од најкористените и најперспективните носачи на АК со цел контролирано ослободување на местото на делување, благодарение на нивната сличност со хуманите клетки и биолошките мембрани.

Подготвените празни нанолипозомски формулации (*NL1* и *NL2*) беа карактеризирани со *z*-просечен дијаметар од околу 120 nm, унимодална дистрибуција според големината и *PDI* вредности од $0,235 \pm 0,035$ и $0,270 \pm 0,006$ за *NL1* и *NL2*, соодветно (Сл. 11а). Од друга страна пак, празните наноструктурирани липидни носачи (формулации *NLC1* и *NLC2*) беа карактеризирани со *z*-просечен дијаметар околу 105 nm и *PDI* околу 0,190 (Сл. 11а).

Кај нанолипозомските формулации со вграден екстракт од *CE* (примероци *NL1CE* и *NL2CE*) имаше зголемување на *z*-просечниот дијаметар на честичките во однос на празните формулации и истиот изнесуваше $130,70 \pm 2,526$ и $159,80 \pm 3,230$

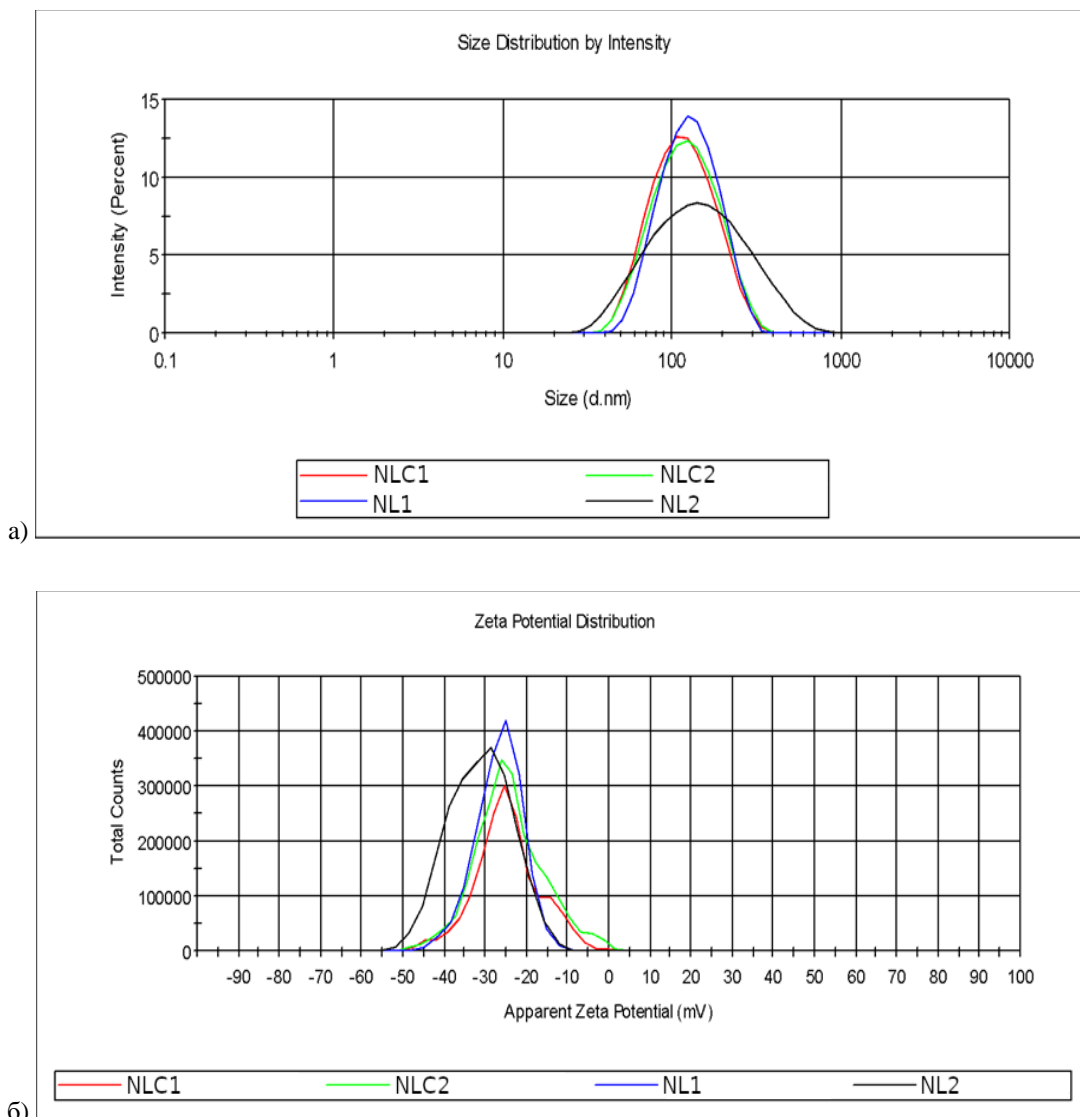
nm за *NL1CE* и *NL2CE*, соодветно (Сл. 12а). Кога станува збор за формулациите на наноструктурирани липидни носачи со вграден *CE*, истите беа проследени со мало зголемување на големината на честичките и тоа $111,80 \pm 1,256$ и $133,40 \pm 2,319$ за *NLC1CE* и *NLC2CE*, соодветно (Сл. 12а).

Она што дополнително беше увидено од добиените резултати (Табела 5) е дека кај формулациите на чија површина е присутен *POL* како полимер за стерна стабилизација (формулации *NL2CE* и *NLC2CE*) имаат поголем дијаметар на честичките во споредба со формулациите кои на површината имаат *PEG* (формулации *NL1CE* и *NLC1CE*).

Табела 5. Физичко-хемиски карактеристики на подготвените наносистеми

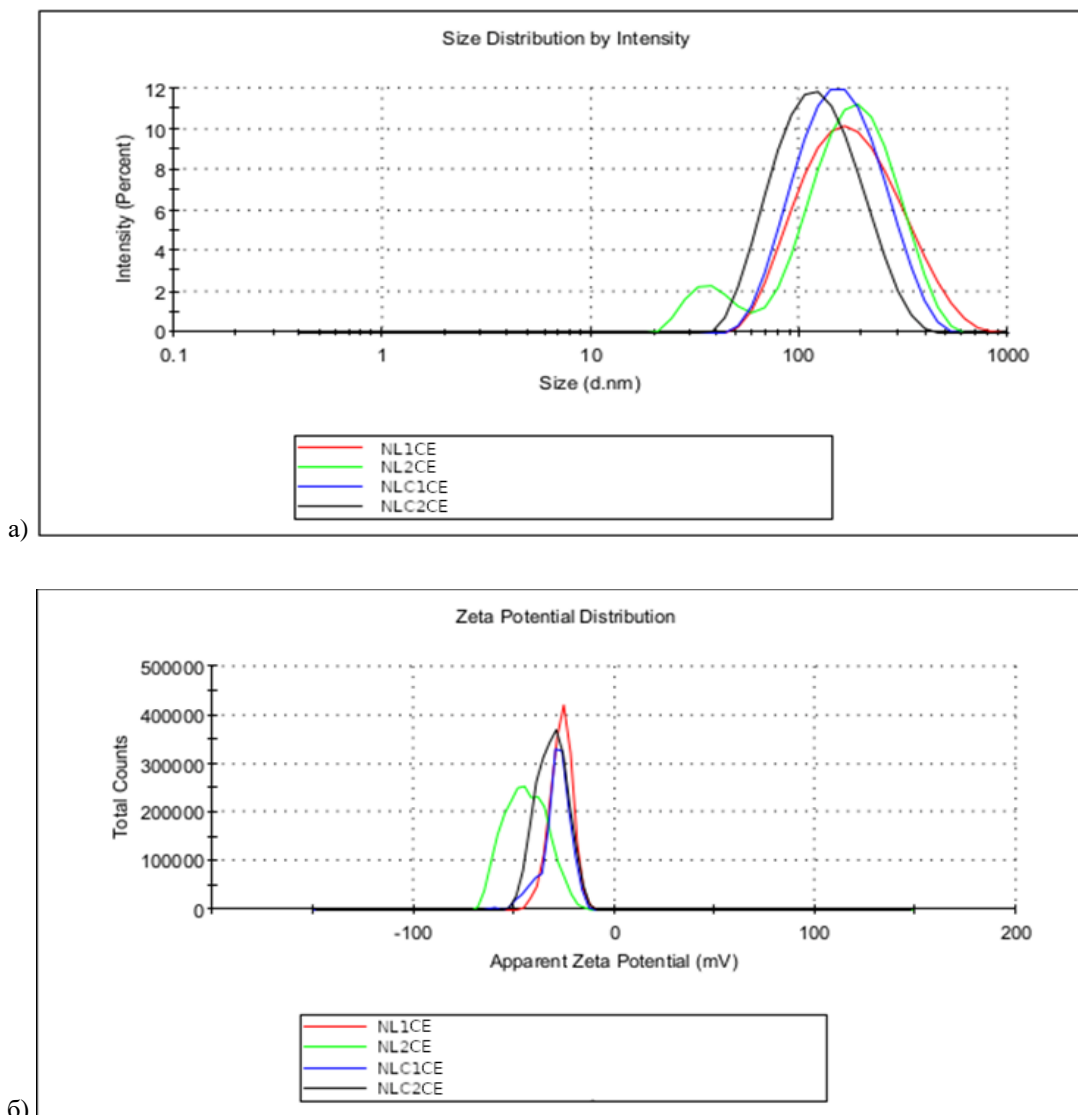
Формулација	z-просечен				DL±SD (mg CE/100 mg липид)
	дијаметар±SD (nm)	PDI±SD	ZP±SD (mV)	EE±SD (%)	
NL1	112,90±4,726	0,164±0,035	-26,50±2,928	/	/
NL1CE	130,70±2,526	0,285±0,024	-28,90±3,269	99,86±1,01	65,48±0,69
NL2	123,00±1,365	0,270±0,006	-31,20±3,326	/	/
NL2CE	159,80±3,230	0,253±0,017	-43,80±2,387	99,89±0,76	65,50±0,52
NLC1	104,00±3,200	0,191±0,065	-24,60±0,833	/	/
NLC1CE	111,80±1,256	0,213±0,053	-24,60±0,763	98,02±0,62	105,97±0,88
NLC2	106,70±2,612	0,181±0,024	-24,30±0,850	/	/
NLC2CE	133,40±2,319	0,202±0,047	-31,20±1,117	87,19±0,42	94,26±0,61

Добиените резултати од големината на честичките се во прилог на целите за ефикасен премин низ КМБ и делување во ЦНС, имајќи ги во предвид литературните податоци кои сугерираат дека сферичните наносистеми со големина на честички <200 nm резултираат со намален PEC клиренс и продолжено време на циркулација (Liu et al., 2012), што од друга страна доведува до поголема можност истите да интерреагираат со специфичните структури на луминалната страна на ендотелијалните клетки на КМБ и следствено на тоа, успешен транспорт низ истите. Покрај тоа, литературните податоци укажуваат на тоа дека наносистеми со просечен дијаметар на честички од 100 до 200 nm се можеби и најпогодни како носачи на АК кои би постигнале и највисок процент на клеточно преземање (Wang et al., 2018).



Слика 11. Дистрибуција по а) големина на честички и б) површински потенцијал на подготвените формулации без вграден СЕ.

Сите подготвени формулации беа карактеризирани со негативен површински потенцијал (-26 до -43 mV и -24 до -31 mV за *NL* и *NLC*, соодветно) (Сл. 11б и 12б), што најверојатно се должи на негативно наелектризираните групи на структурните липиди во формулациите (Singh and Gupta, 2016). Имено, z-потенцијал околу |30| mV генерално укажува на стабилност на примерокот без присуство на агрегати (Németh et al., 2022). Дополнително, добиените резултати се во прилог на заклучоците од истражувањата на Patil et al. (2007), кои укажуваат дека негативно наелектризираните наночестички покажуваат пониска адсорпција на протеини на нивната површина, што условува и постигнување на поефикасна и поуспешна испорака низ КМБ.



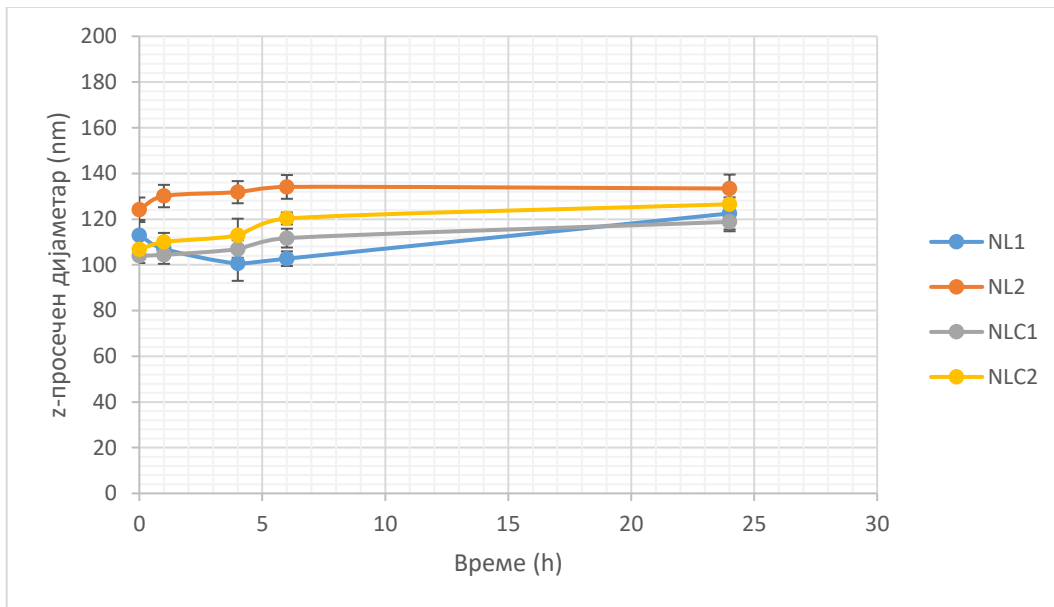
Слика 12. Дистрибуција по а) големина на честички и б) површински потенцијал на подготвените формулации со вграден екстракт *CE*.

Во однос на процентот на енкапсулација, може да се забележи дека сите подготвени формулации беа карактеризирани со висок процент на енкапсулација (>85%) (Табела 5).

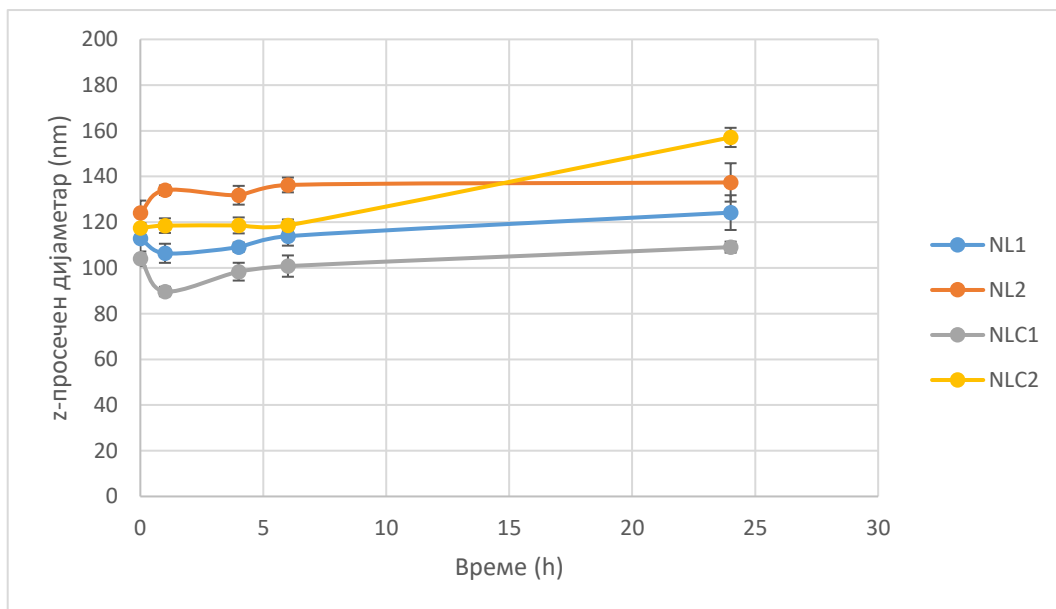
5.2.3. Стабилност на формулациите во фосфатен пуфер pH 7,4 и хумана плазма

Со цел да се добијат формулации што ќе постигнат висока акумулација *in vivo* во мозокот со пасивно таргетирање, како и соодветна брзина на ослободување на АК на местото на делување, од суштинско значење беше да се испита *in vitro* стабилноста на различните формулации на *NL* и *NLC* во физиолошки релевантен медиум (фосфатен пуфер pH 7,4) и во хумана плазма. Имајќи предвид дека мерењето на просечниот дијаметар на честичките е ефективна алатка за набљудување на процесот на агрегација, како и за предвидување на стабилноста на наноформулациите во даден временски период, *z*-просечниот дијаметар (nm) и

PDI на подготвените празни формулации, како и на формулациите со вграден *CE* беа определени на почетокот на експериментот и во различни временски интервали (по 2, 4, 6 и 24 часа) од нивната инкубација во горенаведените медиуми.



Слика 13. Промени во средниот дијаметар на формулации без вграден *CE* во тек на 24 часа при нивна инкубација во фосфатен пуфер pH 7,4 ($n=3$).



Слика 14. Промени во средниот дијаметар на формулации без вграден *CE* во тек на 24 часа при нивна инкубација во хумана плазма ($n=3$).

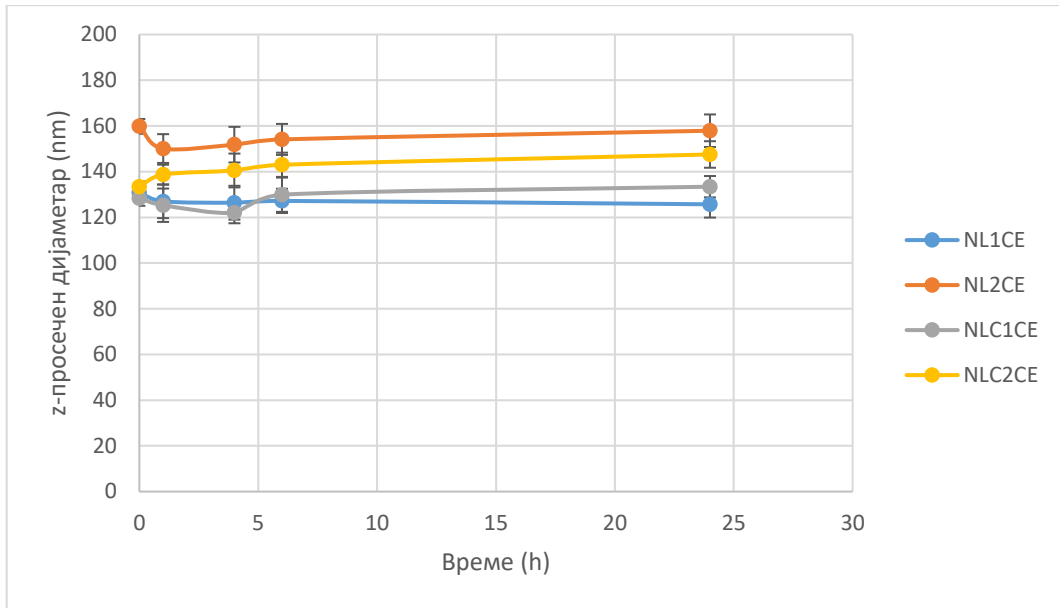
Од добиените резултати може да се заклучи дека сите формулации на празни липидни наносистеми покажаа соодветна стабилност во фосфатен пуфер рН 7,4, освен кај формулацијата на наноструктурирани липидни носачи обложена со *POL* (примерок *NLC2*), каде беше забележано сигнификантно зголемување во просечниот дијаметар на честичките по 24 часа ($p=0,0101$; $p<0,05$; ANOVA) (Сл.13). Слично однесување беше забележано при инкубација на истите формулации во хумана плазма, но повторно со исклучок на формулацијата *NLC2*, каде беше забележано значително зголемување на дијаметарот на честичките и тоа за ~25%, односно од 117,5 nm на 157,1 nm по изминати 24 часа ($p=0,0000$; $p<0,05$; ANOVA) (Сл. 14).

Кај формулациите на липидни наносистеми со енкапсулиран *CE* инкубирани во фосфатен пуфер рН 7,4, како и во хумана плазма, по 24 часа време на инкубација беше забележан истиот тренд како и кај празните формулации, односно беа добиени статистички значајни разлики во средниот дијаметар на честичките на наноструктурираните липидни носачи обложени со *POL* (примерок *NLC2*), но само по 24 часовна инкубација во наведените медиуми ($p=0,0174$ и $p=0,0178$ за фосфатен пуфер рН 7,4 и хумана плазма, соодветно; $p<0,05$; ANOVA) (Сл. 15 и 16).

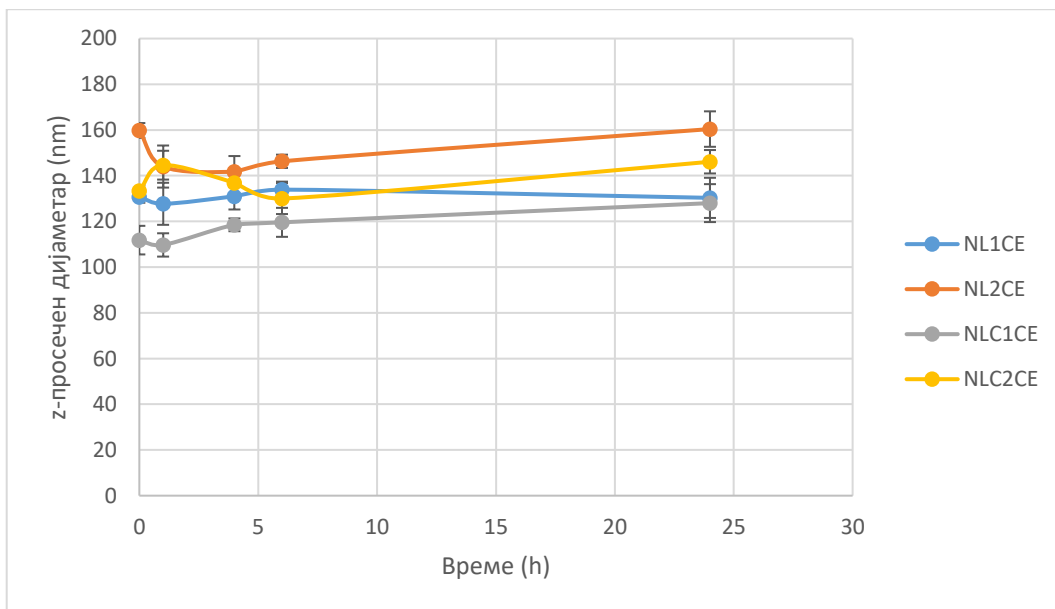
Од прикажаните резултати, може да се заклучи дека подготвените формулации на липидни наносистеми покажаа соодветна стабилност во испитуваните временски интервали при инкубација во фосфатен пуфер рН 7,4 што укажува на нивната стабилност во нативната дисперзија и при нивна администрација, како и во хумана плазма, со иклучок на празните и полни наноструктурирани липидни носачи стерно стабилизирани со *POL* (*NLC2* и *NLC2CE*). Овие резултати укажуваат на можното влијание на полимерот за стерна стабилизација врз стабилноста на наносистеми. Имено, кај формулациите кои содржат *PEG*, полиетилен гликолните групи се прицврстени за фосфолипидната опашка (*DSPE*), која што е поставена паралелно со фосфолипидните молекули од мембраната на формулациите, со што им дозволува на хидрофилните полиетилен гликолни ланци да се протегаат нанадвор. Оваа конфигурација се покажала дека ја намалува хидрофобноста на површината на честичките и на тој начин всушност се редуцира и адсорпцијата на плазма протеините (Shalabali et al., 2021). Од друга страна пак, големите хидрофобни полипропилен оксидни блокови на *POL* најверојатно се поставени подлабоко и поблиску до липидниот слој на нанолипозомите и наноструктурираните липидни носачи, со што го ограничуваат степенот до кој неговите ланци би се поставиле и прошириле на површината на наносистеми (Alayoubi et al., 2013).

Согласно литературните податоци, при контакт на наносистеми со биолошките течности веднаш настанува нивно препознавање и натрупување на протеини и други биомолекули на нивната површина, кои може да придонесат до промени во големината на честичките (Hadjidemetriou and Kostarelos, 2017). Во таа насока и промената во дијаметарот на честичките при инкубација во хумана плазма може да се должи на дестабилизација на системот од аспект на агломерација на честичките во текот на времето или поверојатно, формирање на протеинска корона (Wang et al., 2021). Оваа појава може да се забележи во првите временски точки од инкубацијата на формулациите, што упатува на динамичкиот процес на формирање на протеинска корона, односно на постојаната адсорпција и десорпција на протеини

од површината на честичките, што е особено изразена при настанувањето на почетната, „мека“ корона (Yu et al., 2022).



Слика 15. Промени во средниот дијаметар на формулации со вграден СЕ во тек на 24 часа при нивна инкубација во фосфатен пуфер рН 7,4 ($n=3$).

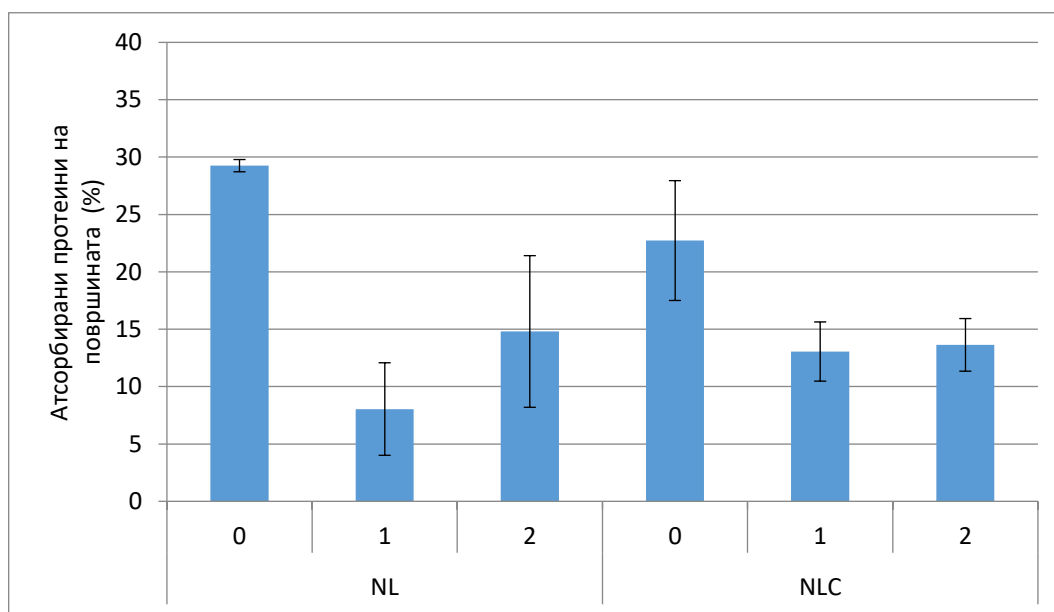


Слика 16. Промени во средниот дијаметар на формулации со вграден СЕ во тек на 24 часа при нивна инкубација во хумана плазма ($n=3$).

При интравенска примена на наносистемите, адсорпцијата на серумските биомолекули на нивната површина може да резултира со губење на самиот интегритет на честичките и може сериозно да ги промени особините на честичките, што секако има огромно влијание врз нивните клучни карактеристики (Abstiens et al., 2019). Во таа насока, потребно е да се истакне дека добиените резултати од испитувањето на стабилноста на подготвените формулации во физиолошки релевантен медиум, а особено во хумана плазма од здрави доброволци во период од четири часа се особено значајни, имајќи во предвид дека после системска администрација на липидни наносистеми периодот до четири часа се смета за доволен временски интервал за комплетна биодистрибуција на истите во организмот и соодветна акумулација во поедини органи (Mannucci et al., 2020).

5.2.4. Квантитативна карактеризација на наносистем – протеин комплексите

Во изминатите неколку децении, докажано е дека формирањето на протеинската корона на површината на честичките на наносистемите влијае на нивната судбина *in vivo* и истата може значително да интерферира со можноста за таргетирање, биодистрибуција и клеточна интернализација (Bros et al., 2018; Zhang et al., 2019). Дополнително, низ литературата е наведено дека формирањето и еволуцијата на протеинската корона генерално зависи од особините на наносистемите, како што се: големина, површински потенцијал, морфологија, хидрофобност, присуство на лиганди и слично (Tekie et al., 2020).



Слика 17. Процент на адсорбирани протеини на површината на испитуваните липидни носачи ($n=3$).

Затоа, во оваа фаза од истражувањата, потребно беше да се испитаат интеракциите помеѓу подготвените липидни наносистеми и протеините присутни во хуманата плазма со цел да се добијат порелевантни информации за процесот на

формирање на протеинска корона *in vivo*. За таа цел, формулации кои содржат *PEG* на површината (*NL1* и *NLC1*) и оние обложени со *POL* (*NL2* и *NLC2*), како и формулациите без полимер за стерна стабилизација (*NL0* и *NLC0*), беа инкубирани во време од 1 час со хумана плазма добиена од здрави доброволци. Резултатите од квантитативното определување на атсорпција на протеини на површината на честичките се презентирани на Слика 17.

Од резултатите прикажани на Слика 17 може да се заклучи дека формулациите подготвени без полимер за стерна стабилизација на нивната површина имаат тенденција за значително повисок процент на атсорбирани плазма протеини (29,3% и 22,7% за *NL0* и *NLC0*, соодветно) ($p=0,0031$ и $p=0,0290$ за *NL* и *NLC*, соодветно, $p<0,05$; ANOVA) во споредба со формулациите кои содржат *PEG* (примероци *NL1* и *NLC1*) или *POL* на површината (примероци *NL2* и *NLC2*).

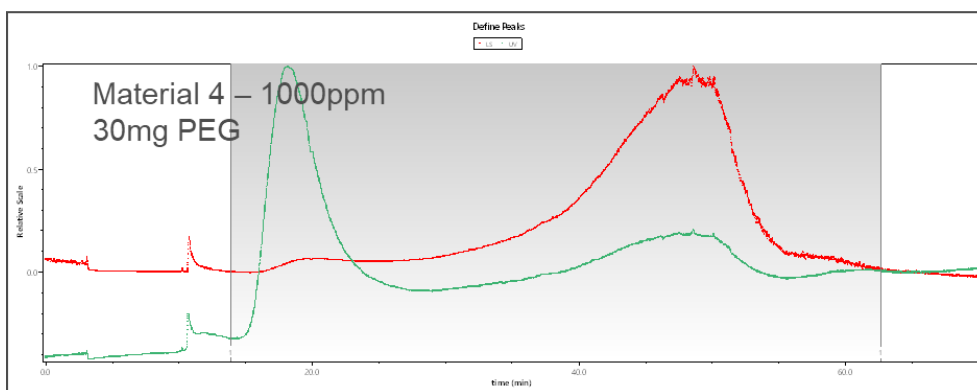
Добиените резултати беа очекувани бидејќи пегилацијата како метод за намалување на интеракциите помеѓу наносистемите и плазма протеините е конвенционален и традиционално се користи (Pelaz et al., 2015; Shalabaliya et al., 2021). Слично како кај *PEG*, хидрофилните блокови од *POL* се способни да формираат еден вид на бариера за атсорпција на протеини на хидрофобната површина на липидните наносистеми, резултирајќи со намалување на преземањето од страна на моноклеарниот фагоцитен систем и на тој начин постигнувајќи продолжено време на циркулација во крвта (Dimchevska et al., 2017; Göppert and Müller, 2005; Simonoska Crcarevska et al., 2013; Stolnik et al., 2001).

Во однос на влијанието на видот на полимерот за стерна стабилизација, не беа забележани сигнификатни разлики во процентот на атсорбирани плазма протеини помеѓу формулациите обложени со *PEG* ($p=0,1448$) и оние обложени со *POL* ($p=0,3950$) ($p<0,05$; T-test). Сепак, тенденцијата на честичките обложени со *POL* да имаат поголем процент на атсорбирани протеини за разлика од честичките обложени со *PEG* може да се објасни преку разликите во хемиската структура и просторната поставеност на двата полимери во склоп на липидните наносистеми, како што беше дискутирано и претходно во делот 5.2.3.

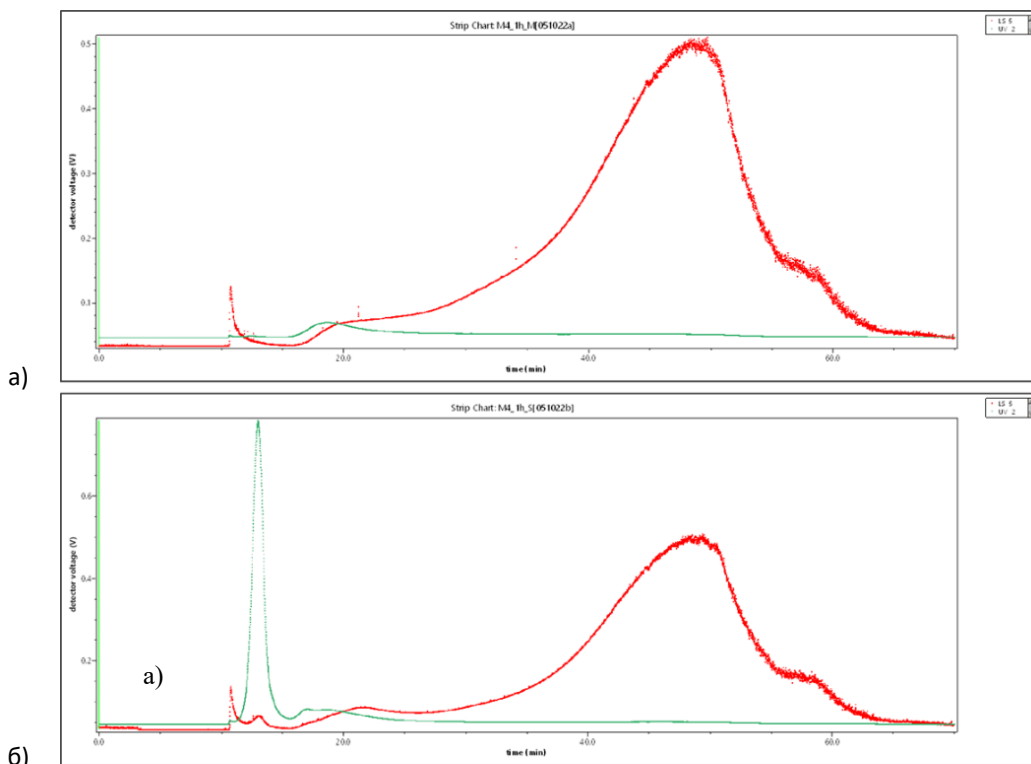
Резултатите од испитувањето на стабилноста преку определување на големината на честичките на *NL* и *NLC* по инкубација во физиолошки релеватен медиум и во хумана плазма, покажа дека нанопозомските формулации со и без вграден *CE* се карактеризираат со релативна стабилност на системите во споредба со формулациите на наноструктурирани липидни носачи со и без вграден *CE*, соодветно. Дополнително, резултатите од квантитативното определување на атсорбираните протеини на површината на честичките на системите покажаа дека формулациите со *PEG* на површината како полимер за стерна стабилизација се карактеризираат со помал процент на атсорбирани протеини за разлика од формулациите кои на својата површина имаат *POL* како полимер за стерна стабилизација.

Имајќи ги во предвид горенаведените податоци, логично беше селектирана формулација *NL1* (претставен како *Material 4* на Сл. 18) на која дополнително и беше испитана стабилноста после 1 и 4 часа инкубација во клеточен медиум за *hCMC/D3* и тоа во медиум без серум (M) и во медиум со 5% серум (S). Промените во големината на честичките на *NL1*, како функција од формирање и еволуција на протеинската корона, беа следени со *AF4-MALS/DLS* анализи (*Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation (AF4) coupled to Multiangle light scattering detector (MALS) and Dynamic light scattering (DLS)*).

На Слика 18 се претставени фрактограмите од свежо подготвена формулација *NLI*, каде зелената линија го претставува УВ-сигналот (230 nm), а црвената линија сигналот за расејување светлина на 90 °. И двата сигнали се нормализирани до највисокиот сигнал во секој од фрактограмите. Пикот на УВ-апсорбанцата кој може да се забележи на околу RT=20 минути, најверојатно се должи на присуството на *PEG* на површината на честичките.

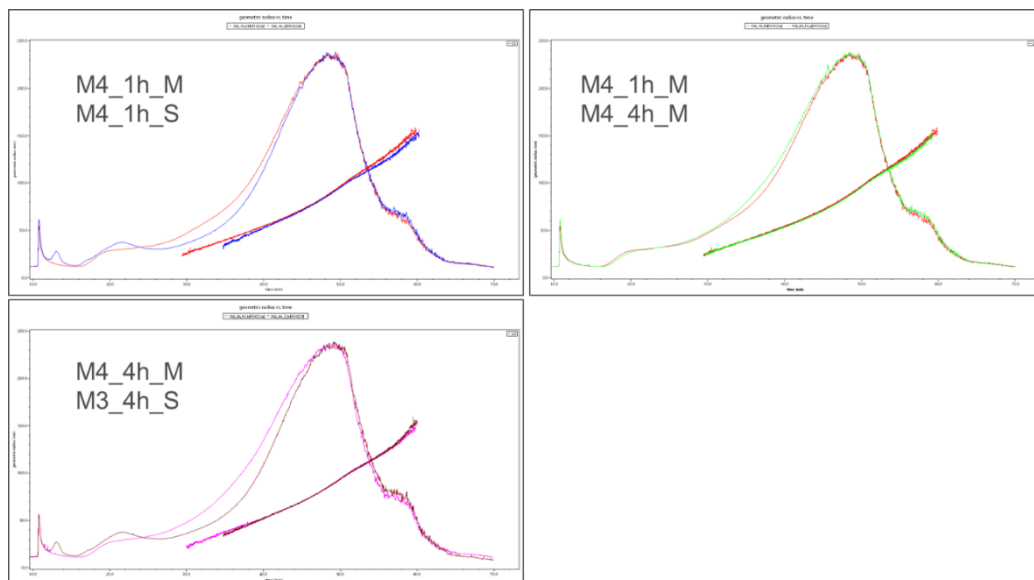


Слика 18. Свежо подготвена *NLI* анализирана со AF4 – УВ-сигнал (зелена линија) и сигнал на расејување на светлината на 90° (црвена линија).



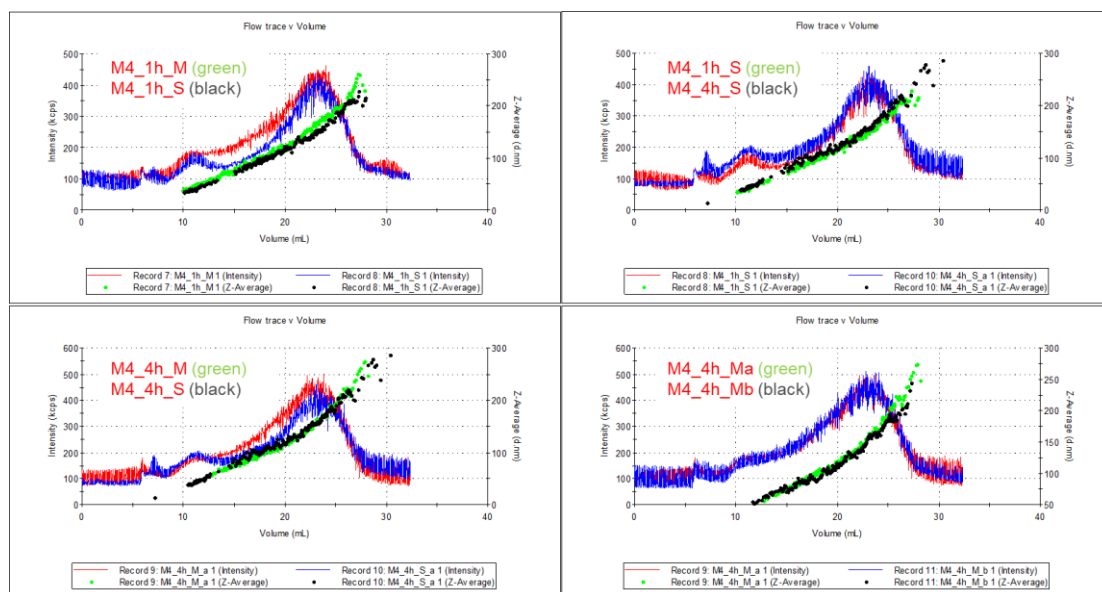
Слика 19. Формулација *NLI* по 1 час инкубација во клеточен медиум а) без медиум и б) медиум со 5% серум; каде зелената линија го означува УВ-сигналот, а црвената сигналот од расејување на светлината.

После инкубација на *NLI* во клеточен медиум со 5% серум и без серум, не беше забележана промена во големината на честичките со помош на *MALS* и *flow-DLS* (Сл. 19).

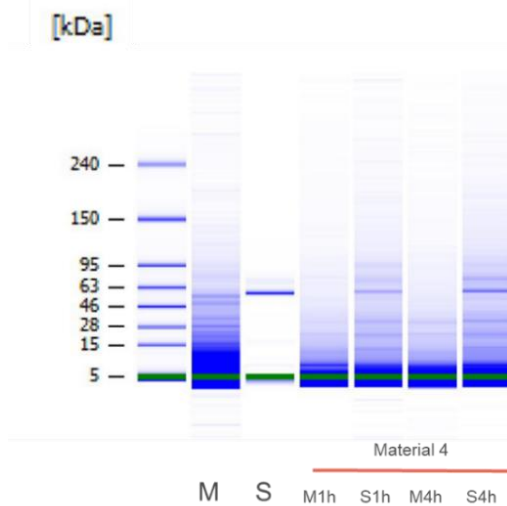


Слика 20. Комбинирани фрактограми на *NLI* добиени со помош на *flow-DLS* и *MALS*.

Дополнително, на Слика 20 и 21 се претставени комбинирани фрактограми од инкубација на *NLI* после 1 и 4 часа во клеточен медиум без и со 5% серум. Од истите јасно може да се воочи дека честичките се стабилни во испитуваниот временски период во присуство на серум протеини.

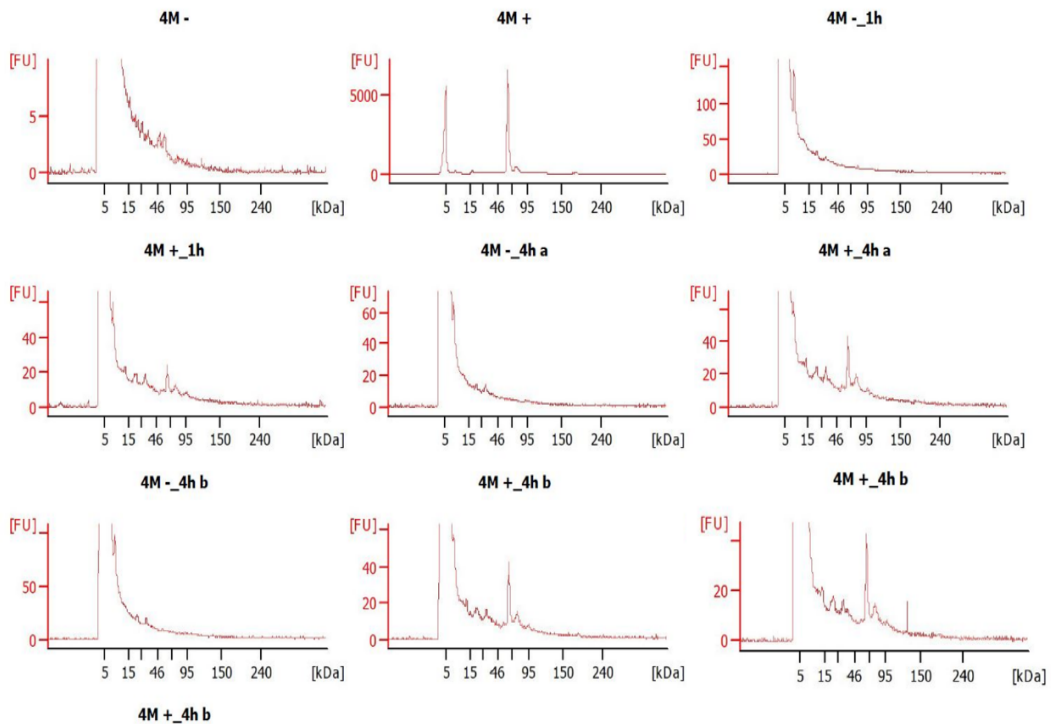


Слика 21. Формулација *NLI* фракционирана со *AF4*, со помош на *DLS* каде се прикажани УВ-сигналот и *z*-просечниот дијаметар на големината на честичките



Слика 22. Електрофореза на *NLI* по инкубација во клеточен медиум без (M) и со 5% серум (S).

Протеомското профилирање и промените во адсорбираните протеини на површината на честичките на формулацијата *NLI* беше извршено со помош на автоматизирана електрофореза со висока резолуција по изолација на протеините од сложените биолошки системи, нивна денатурација и соодветна подготовка за анализа и тоа по 1 и 4 часа.



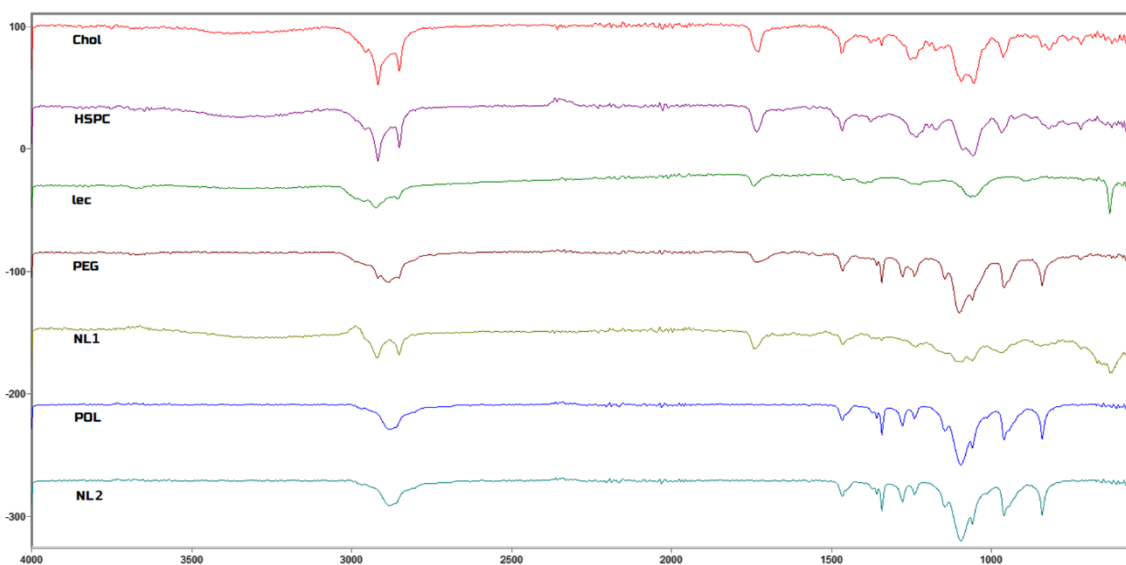
Слика 23. Електроферограм на *NLI* по 1 и 4 часа инкубација во клеточен медиум без (M-) и со серум (M+).

Резултатите јасно покажуваат дека адсорпцијата на протеините се случува веќе по 1 час инкубација на примерокот со клеточен медиум кој содржи 5% серум, претставено со силна лента на околу 60 KDa, што најверојатно потекнува од присуството на албумин како најзастапен протеин во серумот (Сл. 22 и 23).

Добиените резултати од испитувањето на стабилноста на нанолипозомската формулација со PEG на површината на честичките по 1 и 4 часа инкубација со клеточен медиум без и со 5% серум, како и резултатите од електрофорезата, можеме да заклучиме дека кај формулација NL1 не може да се забележи промена во големината во испитуваните временски интервали и во присуство на серум протеини (ниту со MALS, ниту со flow-DLS), што потврдува дека присуството на PEG на површината на честичките доведува до намалена количина на адсорбирани протеини, што резултира со спречување на формирање на протеинска корона.

5.2.5. Фурие трансформна инфрацрвена спектроскопија

Спектрите на подготвените формулации, како и спектрите на составните компоненти на формулациите, беа снимени со користење на атенуирана тотална рефлексија (ATR), снимени на FT-IR спектрометар.



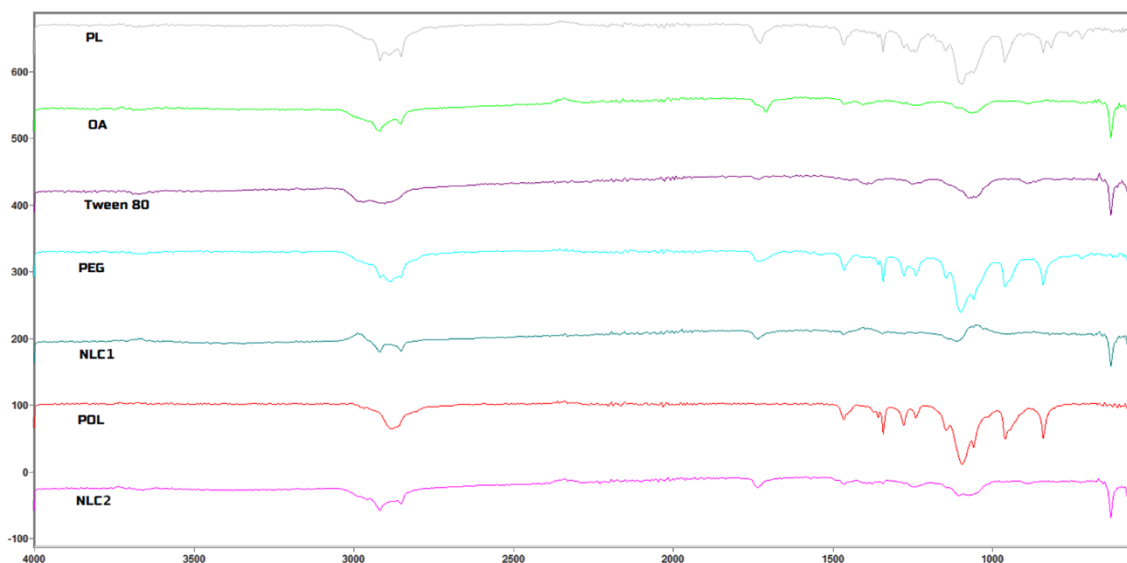
Слика 24. FTIR спектри од NL1 и NL2 и нивните составни компоненти.

Како што може да се забележи на Слика 24, спектралните компоненти на NL главно потекнуваат од соја лецитинот (доминантна компонента во формулацијата), хидрогенизираниот фосфатидилхолин, холестеролот и полимерот за стерна стабилизација PEG (NL1) или POL (NL2). Имено, лентите во регионот помеѓу 2960-2850 cm^{-1} што е карактеристичен за симетрични валентни вибрации на CH_2 , се присутни во сите компоненти, како и во спектрите на подготвените NL. Во регионот на 961 cm^{-1} може да се забележат спектралните ленти кои потекнуваат од чистата компонента на PEG каде што се присутни P-O-C алифатични вибрации и истите може да се забележат и во формулацијата NL1 но со мало поместување (970 cm^{-1}). Дополнително, на 1100 cm^{-1} каде што е присутна C-O секундарна алкохолна

вибрација може да се види и во *NL1* со мало поместување (1092 cm^{-1}) и со помал интензитет од оној карактеристичен за чистата компонента (*PEG*), што веројатно се должи на вклучување на соодветниот атом на кислород во интеракција со другите компоненти што ја ослабува јачината на C–O врската. Покрај тоа, C=O вибрациите кои потекнуваат од *PEG* може да се забележат и во спектрите добиени од формулацијата *NL1* на 1738 cm^{-1} .

Присуството на *POL* во формулацијата *NL2* беше потврдено од вибрациите на 841 cm^{-1} , што всушност се должи на PEO синџирот на полуксамерот (Guo et al., 1999). Овој спектрален прозорец во формулацијата не е попречен од која било друга лента од преостанатите ексципиенси (Сл. 24) (Markova et al., 2022).

FTIR спектрите на *NLC1* и *NLC2* (Сл. 25) покажуваат присуство на олеинска киселина и фосфолипон (и двете се карактеризираат со речиси идентични спектрални карактеристики во регионот од $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$). Доминантната апсорпција овде потекнува од острите ленти на околу 2916 и 2850 cm^{-1} што генерално потекнува од широките асиметрични и симетрични валентни вибрации на CH_2 . Дополнително, спектрите на гореспоменатите две компоненти се разликуваат во положбата на валентните вибрации кои отекнуваат од карбонилната група C=O на 1727 cm^{-1} (естерска група) во фосфолипонот и 1710 cm^{-1} (карбоксилна група) во олеинска киселина. Сепак, во спектрите на формулациите на *NLC* може да се забележи појава на поширока лента во овој регион (пикови на 1738 cm^{-1} и 1735 cm^{-1} за *NLC1* и *NLC2*, соодветно), што може да се објасни со преклопувањето на дискутираните валентни вибрации од карбоксилната врска (Markova et al., 2022). Присуството на *PEG* во *NLC1* и *POL* во *NLC2* може да се потврди со слабите ленти на 1115 cm^{-1} и 1061 cm^{-1} во *NLC1* и 1144 cm^{-1} во *NLC2* (горната лента од C–O и долната лента од C–C валентни вибрации). Треба да се спомене дека овие ленти се карактеризираат со помал интензитет во споредба со спектрите на чистите полимери за стерна стабилизација, што имплицира на можните конформациски промени на полимерите кога ќе се вградат во наноформулациите.



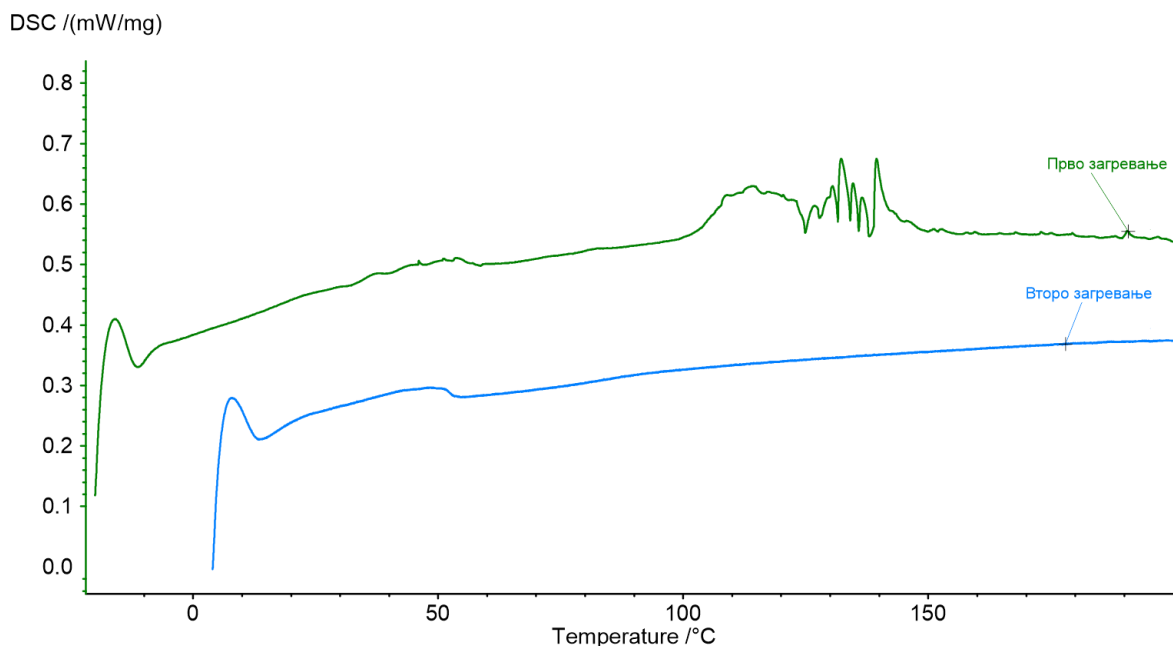
Слика 25. FTIR спектри од *NLC1* и *NLC2* и нивните составни компоненти.

5.2.6. Диференцијално скенирачка калориметрија (DSC)

DSC кривите на *NL* и *NLC*, како и *CE*, се прикажани на Слика 26-30.

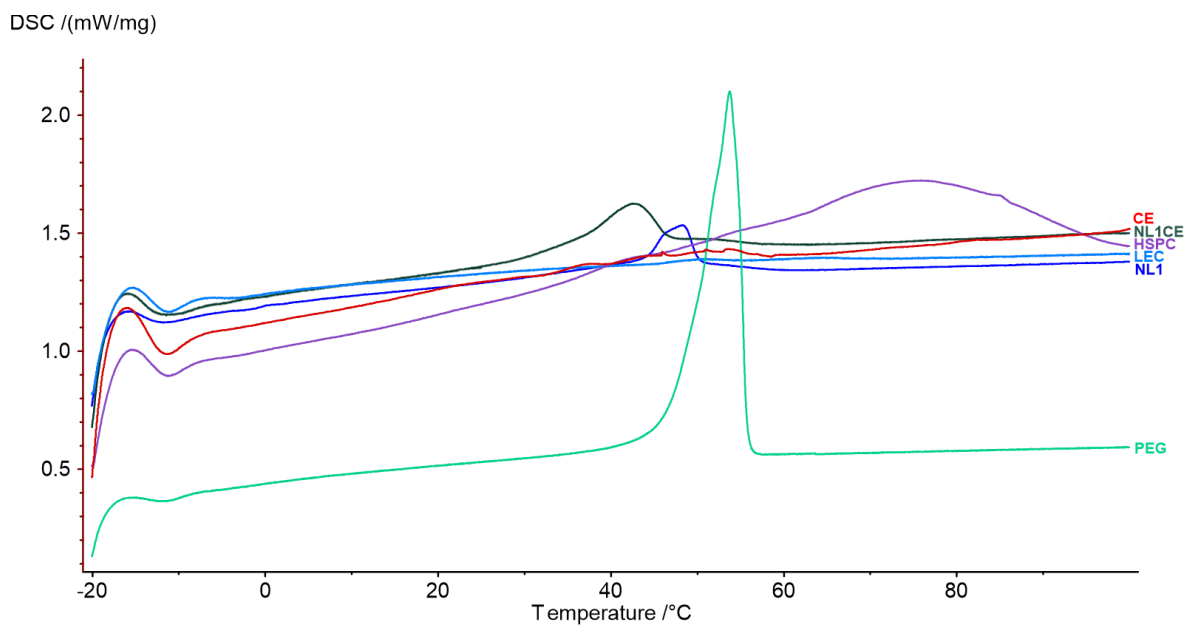
Она што може да се забележи од кривите добиени при првото загревање на *CE* е дека се појавуваат карактеристични ендотермни транзиции од 110 °C до 140 °C, кои при второто загревање исчезнуваат што најверојатно се должи на одредена трансформација или деградација на екстрактот при повишена температура (Сл. 26). Имено, во *CE* преовладува карбоксилува форма на канабидиол (*CBD*), што во посочениот температурен ранг се декарбоксилува и преминува во канабидиол (*CBD*). Ова исто така е потврдено и со фактот дека масата на примерокот варираше пред и по направените анализи ($m_{\text{пред}}=4,311 \text{ mg}$, $m_{\text{по}}=3,416 \text{ mg}$), односно беше намалена за ~20 % после второто загревање.

Карактеристичните ендотермни пикови кои потекнуваат од *CE* не беа детектирани при испитување на липидните наносистеми со вграден *CE* во горенаведениот температурен интервал, што најверојатно се должи на нејзиното комплетно инкорпорирање во истите. Потребно е да истакнеме дека, заради липидната природа на компонентите од формулациите, DSC кривите за формулациите и нивните составни компоненти се прикажани во температурен ранг од -20 до 100 °C.

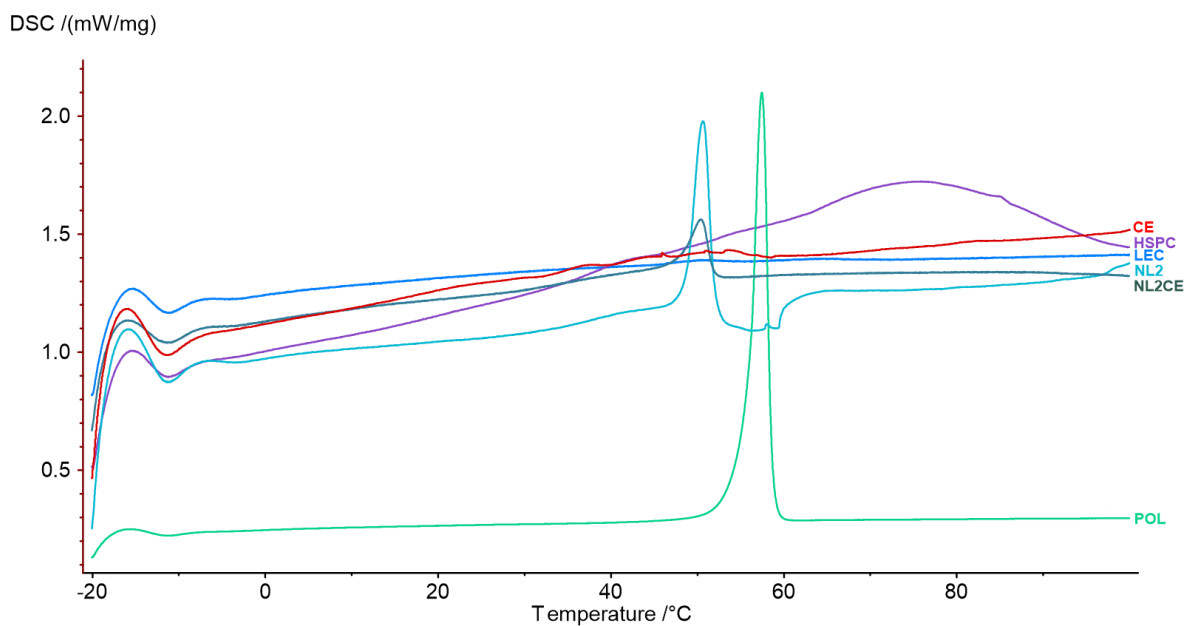


Слика 26. DSC криви на *CE*.

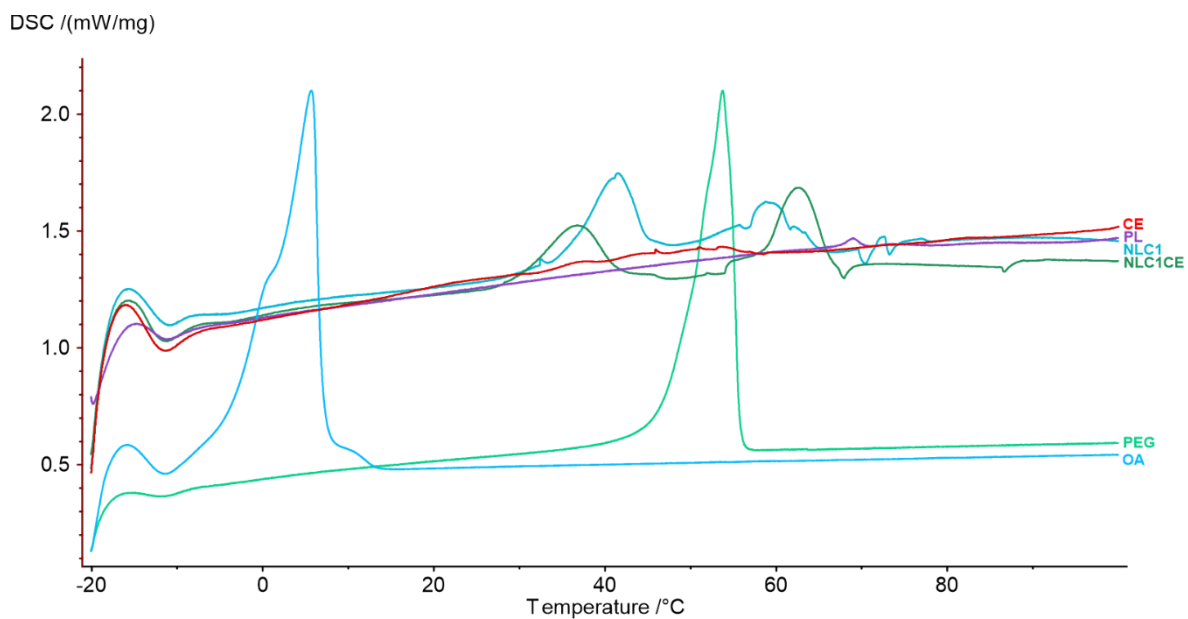
Од кривите прикажани на Слика 27 и 28 може да се види дека липозомските формулации покажуваат карактеристични ендотермни пикови во температурниот интервал од 42 °C до 50 °C, што најверојатно се должи на присуството на *PEG* (ендотермен пик на 53,8 °C) и *POL* (ендотермен пик на 57,5 °C) кај *NL1* и *NL2*, соодветно.



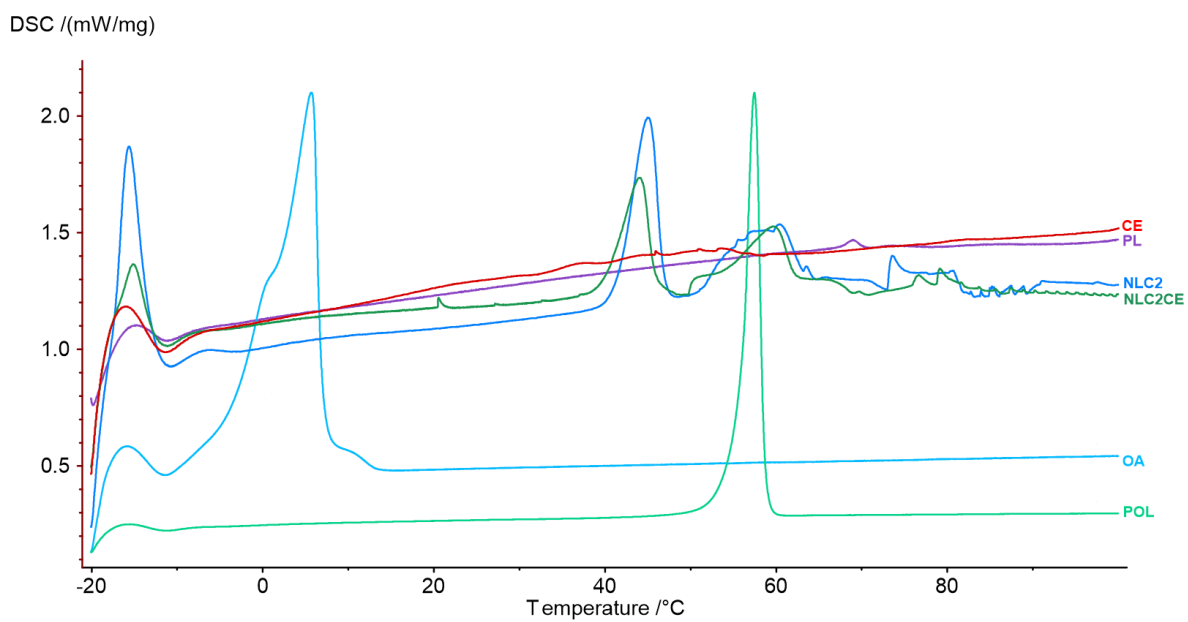
Слика 27. DSC крива на празна (*NL1*) и полна (*NL1CE*) липозомска формулација со *PEG*.



Слика 28. DSC крива на празна (*NL2*) и полна (*NL2CE*) липозомска формулација со *POL*.



Слика 29. DSC крива на празни (*NLC1*) и полни (*NLC1CE*) *NLC* со *PEG*.



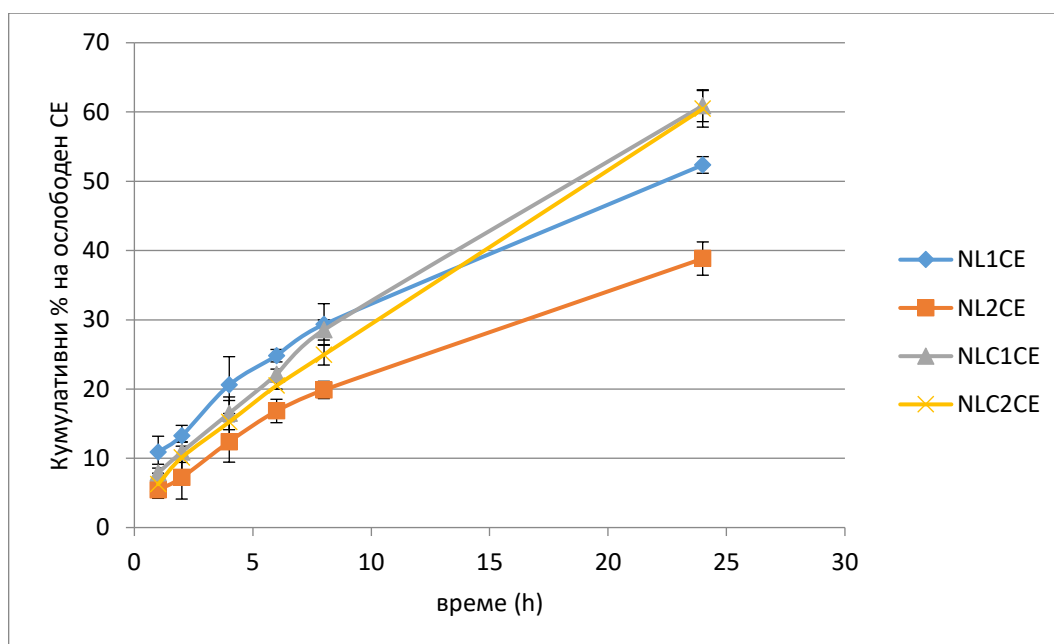
Слика 30. DSC крива на празни (*NLC2*) и полни (*NLC2CE*) наноструктурирани липидни носачи со *POL*.

Слично на ова, кај наноструктурираните липидни носачи се забележани пикови во опсегот од 36 °C до 45 °C и околу 60 °C (Сл. 29 и 30). Оваа појава може повторно да ја поврземе со присуството на гореспоменатите стелт полимери присутни на површината на честичките.

Резултатите од *DSC* анализите укажуваат на промена во термичкото однесување на составните полимери во липидните наносистеми, во однос на поединечните супстанции. Истите најверојатно се должат на интеракциите кои настануваат при формулирање на системите. Бидејќи подготвените формулации претставуваат сложени повеќекомпонентни смеси, очекувано е термичкото однесување да е изменето, во насока на поместување на ендотермот кон пониски температури или промени во неговиот облик и енталпијата, што се забележува и од прикажаните резултати.

5.2.7. *In vitro* брзина на ослободување на *CE* од подготвените формулации и кинетика на ослободување

Резултатите добиени од *in vitro* брзината на ослободување на *CE* (определена според маркер-компонента *CBDA*) укажаа дека сите подготвени формулации (*NL1CE*, *NL2CE*, *NLC1CE* и *NLC2CE*) покажуваат продолжено време на ослободување во период од 24 часа (Сл. 31).



Слика 31. Брзина на ослободување на *CE* од подготвените полни формулации на *NL* и *NLC* ($n=3$).

Иницијалното ослободување на *CE* од липозомската формулација што е стерно стабилизирана со *PEG* (10,89% за формулација *NL1CE*) е поголемо во споредба со формулацијата стабилизирана со *POL* (5,24% за формулација *NL2CE*). Исто така, добиените резултати покажуваат дека процентот на ослободен *CE* во

период од 24 часа е поголем кога истиот е инкорпориран во *NLC* во споредба со *NL* ($p < 0,05$; ANOVA).

Од сите подготвени липидни формулации, најспоро ослободување е забележано кај формулацијата *NL2CE*, која согласно претходно прикажаните резултати во делот на физичка карактеризација на честичките, имаше и најголем среден дијаметар на честичките (~160 nm), во споредба со останатите три формулации. Добиените резултати се во согласност со литературните податоци кои укажуваат дека ослободувањето на АК освен од големината на честичките зависи и од дебелината на слојот на полимерот за стерна стабилизација, при што присуството на *POL* на површината на честичките може да доведе до намалување на брзината на ослободување на АК (Shubhra et al., 2014).

Врз основа на добиените коефициенти на корелација од испитаните математички модели за ослободувањето на *CE* од подготвените формулации, моделот кој најдобро ја опишува кинетиката на ослободување од липидните наносистеми е *Peppas-Sahlin* ($R^2 > 0,996$ за сите четири испитувани формулации *NL1CE*, *NL2CE*, *NLC1CE* и *NLC2CE*).

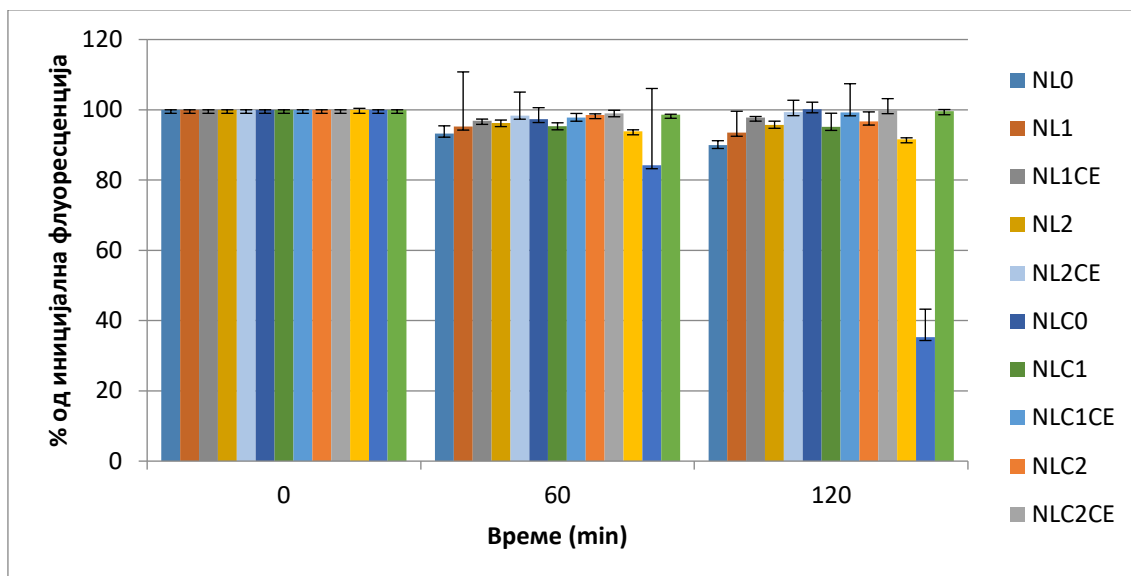
Добиените вредности за k_{1ps} (9,517 и 4,080 за *NL1CE* и *NL2CE*, соодветно) се поголеми во споредба со вредностите добиени за k_{2ps} (0,724 и 1,008 за *NL1CE* и *NL2CE*, соодветно), што укажува на тоа дека механизмот на ослободување од нанолипозомските формулации е најверојатно по пат на дифузија (Miricioiu et al., 2019; Paolino et al., 2019).

Од друга страна пак, резултатите добиени од испитувањето на кинетиката на ослободување на *CE* од наноструктурираните липидни носачи сугерираат дека ослободување на *CE* од истите може да биде по пат на дифузија, како и полимерна релаксација ($k_{1ps}=4,919$ и $3,213$, $k_{2ps}=2,316$ и $2,680$ за *NLC1CE* и *NLC2CE*, соодветно).

5.2.8. Одредување на антиоксидативниот потенцијал на подготвените екстракти и формулации

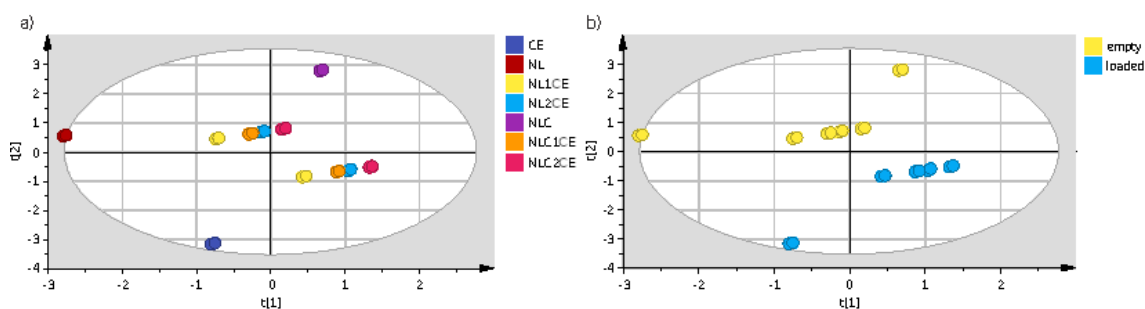
Со цел да се определи антиоксидативниот капацитет на *CE* и подготвените формулации на *NL* (формулација без полимер за стерна стабилизација *NL0*, празни формулации *NL1* и *NL2*, формулации со вграден *CE*, *NL1CE* и *NL2CE*) и *NLC* (формулација без полимер за стерна стабилизација *NLC0*, празни формулации *NLC1* и *NLC2*, формулации со вграден *CE*, *NLC1CE* и *NLC2CE*), беше изведен модифициран *ORAC* тест. Добиените резултати се претставени на Слика 32 и истите беа пресметани како процент од почетната флуоресценција на секој примерок во период од 120 минути ($n=4$).

Имено, антиоксидативниот капацитет на формулациите беше изразен како процент од почетната флуоресценција, која после 120 минути изнесуваше $97,78 \pm 0,65\%$, $99,32 \pm 1,84\%$, $99,28 \pm 2,85\%$ и $99,90 \pm 1,81\%$ за *NL1CE*, *NL2CE*, *NLC1CE* и *NLC2CE*, соодветно. Сите четири формулации покажаа статистички значајна поголема антиоксидативна активност во споредба со чистиот екстракт *CE* ($91,59 \pm 0,65$) ($p < 0,05$) (Сл. 32) што најверојатно се должи на продолженото ослободување на енкапсулираниот *CE* од наносистемите (Shalabali et al., 2021).



Слика 32. Антиоксидативен капацитет на формулациите изразен како процент од почетната флуоресценција ($n=4$).

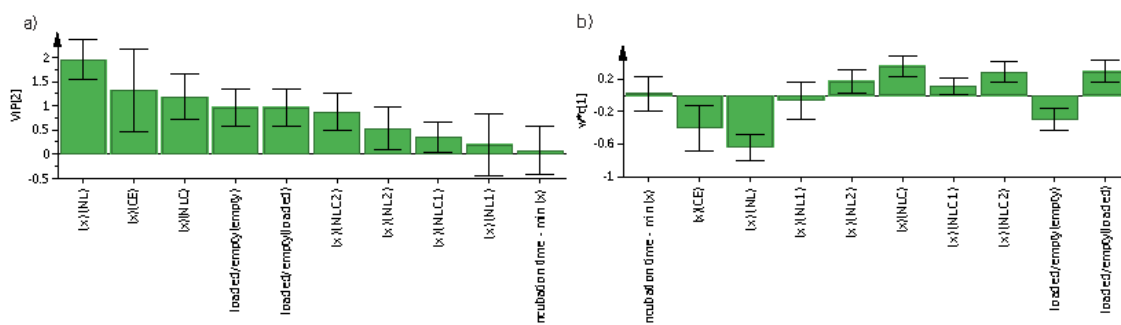
Добиените резултати беа статистички обработени, каде PLS моделот беше изграден на две главни компоненти со соодветни коефициенти на корелација и предвидување ($R^2Y=0,78$, $Q^2=0,68$), додека пак скетер плотот (Сл. 33) и VIP скорот (Сл. 34) укажаа на тоа дека типот на формулацијата, како и присуството на *CE*, се доминантни фактори кои влијаат на вијабилноста на у-вредностите, додека времето на инкубација нема статистички значаен ефект.



Слика 33. Скетер плот на скорвите означени по а) тип на формулација и б) празни/полни формулации.

Коефициентите на критичните променливи ја покажуваат важноста на површинските карактеристики на формулациите во однос на нивниот антиоксидативен капацитет. Дополнително, забележана е јасна разлика помеѓу *NL* (со негативен коефициент) и *NLC* (со позитивен коефициент), каде што нанолипозомите покажаа помала антиоксидативна активност што најверојатно се должи на помалку интеракции со генераторот на слободни радикали (*AAPH*),

потребни за да се спречи оксидацијата на флуоресцентната проба. Кај наноструктурираните липидни носачи забележан е спротивен ефект. Сепак, овие разлики се намалуваат бидејќи и двете формулации се обложени со полимери за стерна стабилизација (*PEG* или *POL*). Дополнително, присуството на *CE* во формулациите придонесува за зголемување на антиоксидативниот потенцијал, што е потврдено и преку големиот *VIP* опсег и неговиот позитивен коефициент.



Слика 34. а) *VIP* скор и б) loading score plot за дискримитивна анализа на формулациите и присуството на *CE* како и времето на инкубација.

5.3. *In vitro* испитување на цитотоксичноста и клеточната интернализација на липидните наносистеми на избрани клеточни култури

5.3.1. *In vitro* испитување на вијабилноста на *hCMEC/D3* клетките по инкубација со подготвените формулации

Широката и континуирана употреба на липидните наносистеми во лекувањето на различни болести мора да биде придружена со фундаментални студии во однос на согледување и испитување на потенцијалната токсичност на формулациите со цел да се утврдат безбедносните концентрации за нивна употреба. Имено, клеточната интернализација и преземање зависат од липидниот состав и хемиската структура на честичките, како и од нивната големина, што дополнително го зголемува интересот околу дефинирање и испитување на нивната токсичност на клеточно ниво (Strachan et al., 2020).

На Слика 35 се претставени резултатите добиени од *MTS* тестот за определување на процентот на вијабилни клетки после 4, 24 и 48 часа на инкубација во 3 различни концентрации од подготвените наносистеми.

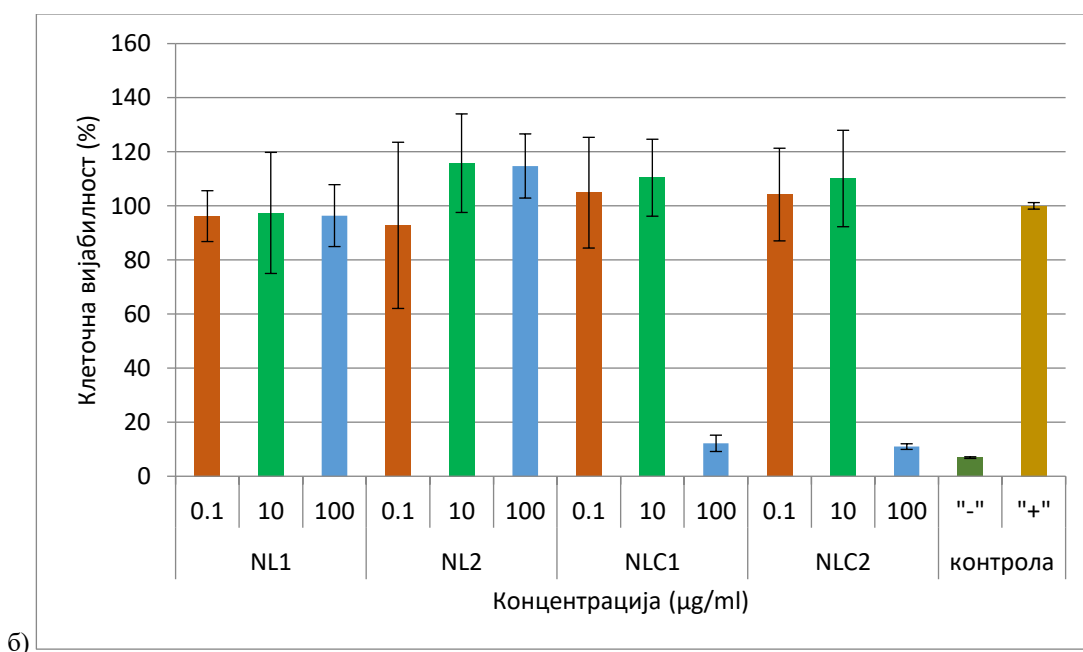
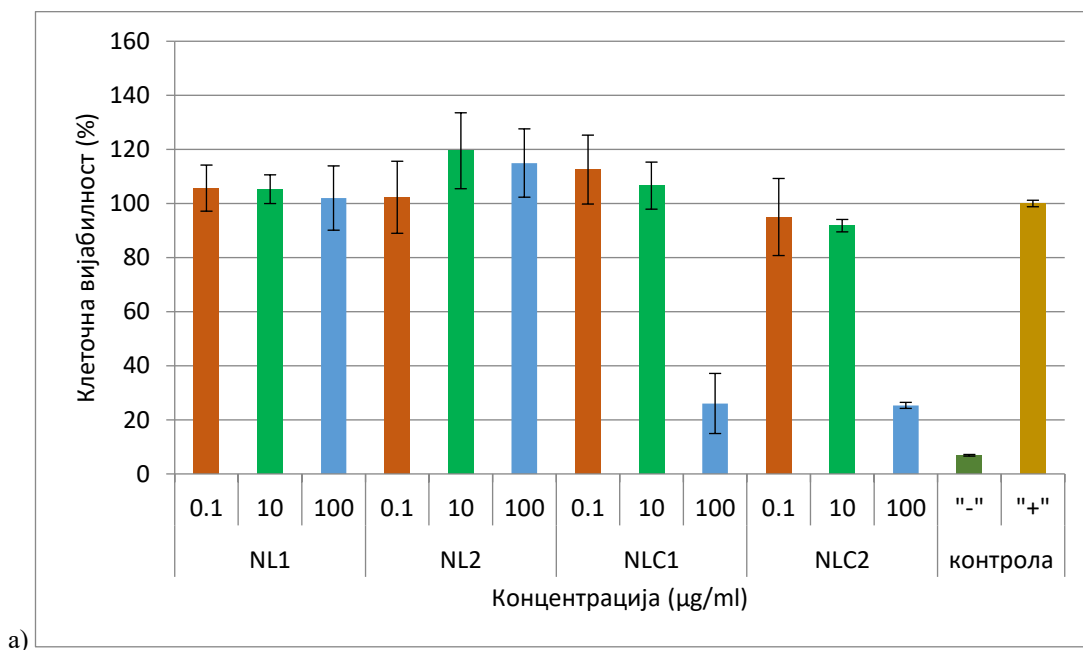
Клеточната вијабилност после 48 часа време на инкубација после највисоката испитана концентрација од *NL1* формулацијата (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Сл. 35в) изнесуваше $31,16 \pm 7,10\%$. Кога станува збор за *NL2*, не беше забележано намалување на вијабилноста на клетките и во трите испитувани концентрации по 48 часа време на инкубација ($>75\%$) (Сл. 35а, б, в).

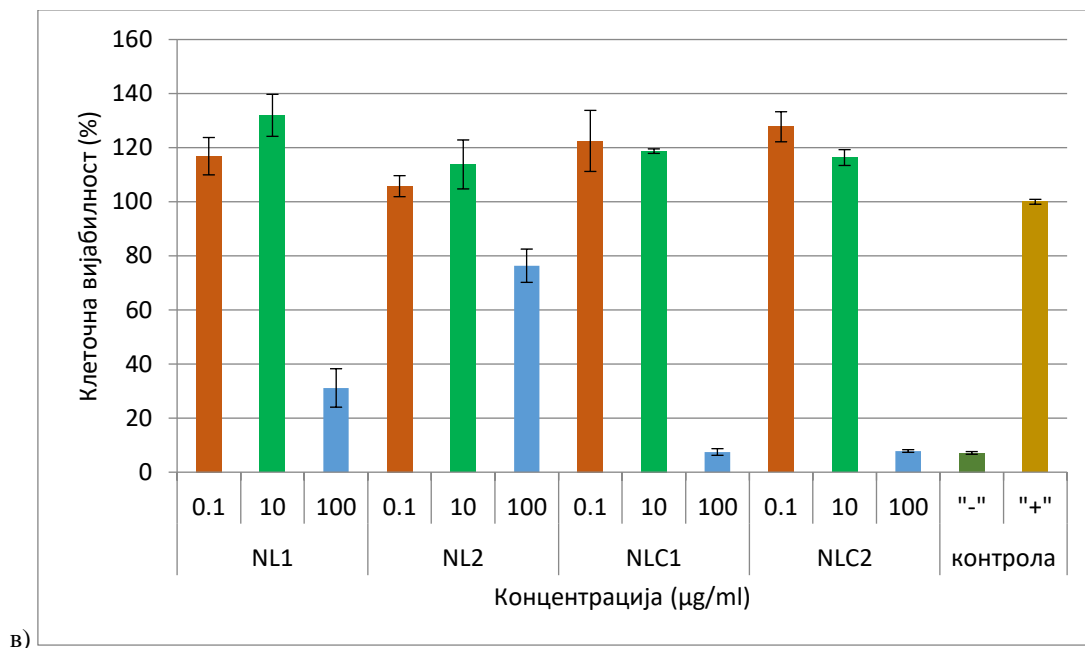
После третирање на клетките со највисоката концентарција на *NLC1* и *NLC2* (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) во сите 3 временски точки, клеточната вијабилност беше значајно намалена, односно изнесуваше $26,05 \pm 11,11\%$ и $25,34 \pm 1,12\%$ по 4 часа, $12,18 \pm 3,03\%$

и $10,96 \pm 1,04\%$ по 24 часа и најмногу по 48 часа $7,47 \pm 1,23\%$ и $7,83 \pm 0,49\%$, соодветно.

Врз основа на добиените резултати, може да се заклучи дека наноструктурираните липидни носачи (*NLC1* и *NLC2*) имаат тенденција да ја намалуваат клеточната вијабилност во поголем процент во однос на липозомските везикули (*NL1* и *NL2*).

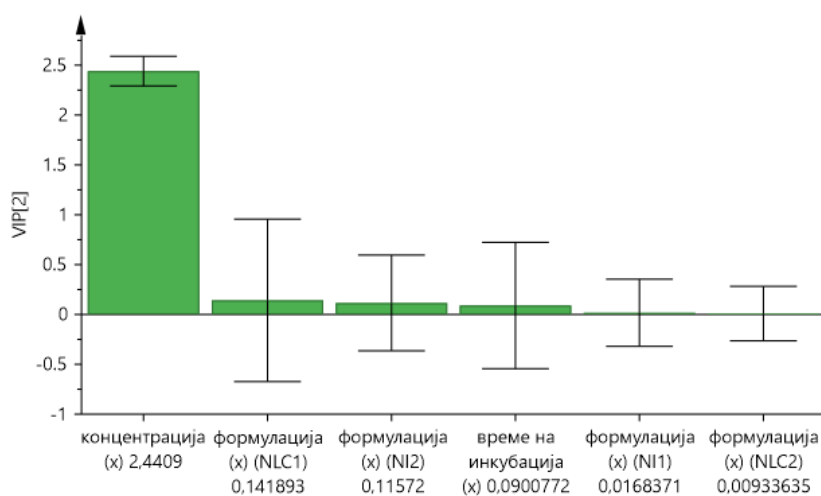
Ваквите ефекти би можеле да се должат на присуството на *Tween 80* (една од главните градивни компоненти во *NLC1* и *NLC2* формулациите), кој според литературните податоци значајно допринесува во целокупната токсичност на наночестичките (Gaspar et al., 2016; Silva et al., 2020).



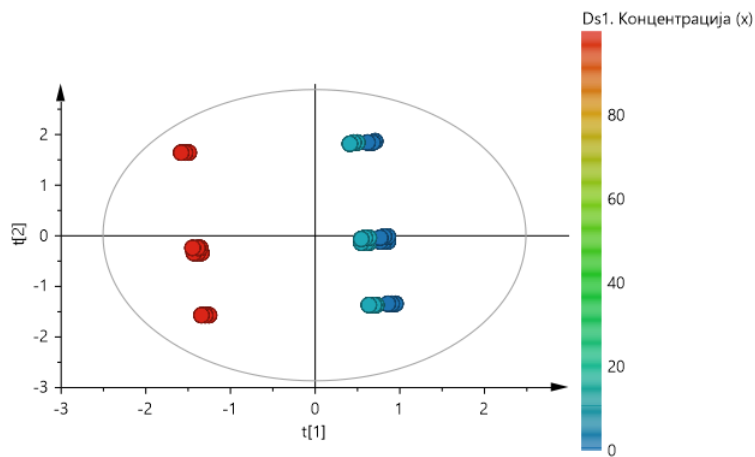


Слика 35. Клеточна вијабилност после а) 4 часа, б) 24 часа, в) 48 часа време на инкубација со подготвените формулации во 3 различни концентрации (0,1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL) ($n=6$).

Во однос на резултатите добиени од испитувањата на клеточната вијабилност со помош на MTS тестот, мултиваријантната анализа со PLS покажа дека концентрацијата на формулацијата е доминантниот фактор кој влијае на самите резултати од вијабилноста на клетките (Сл. 36). Ниту еден од другите експериментални услови, ниту пак видот на формулацијата немаа значително влијание на вијабилноста на клетките.



Слика 36. VIP плот од сигнификантните фактори во експериментите за испитување на клеточната вијабилност по инкубација на *hCMC/D3* со подготвените формулации.

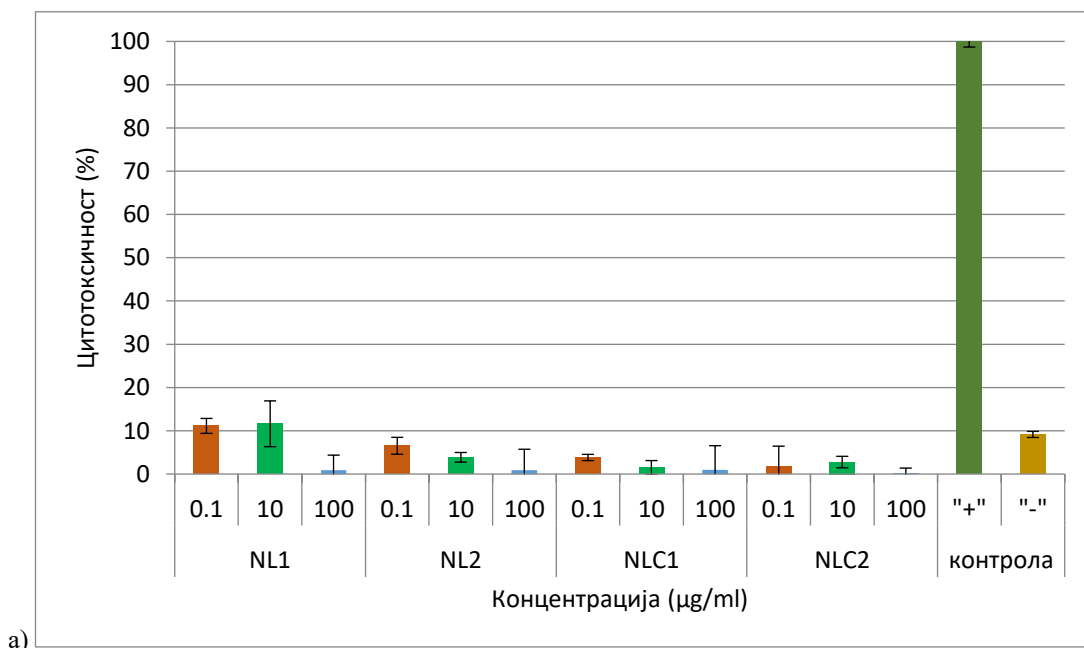


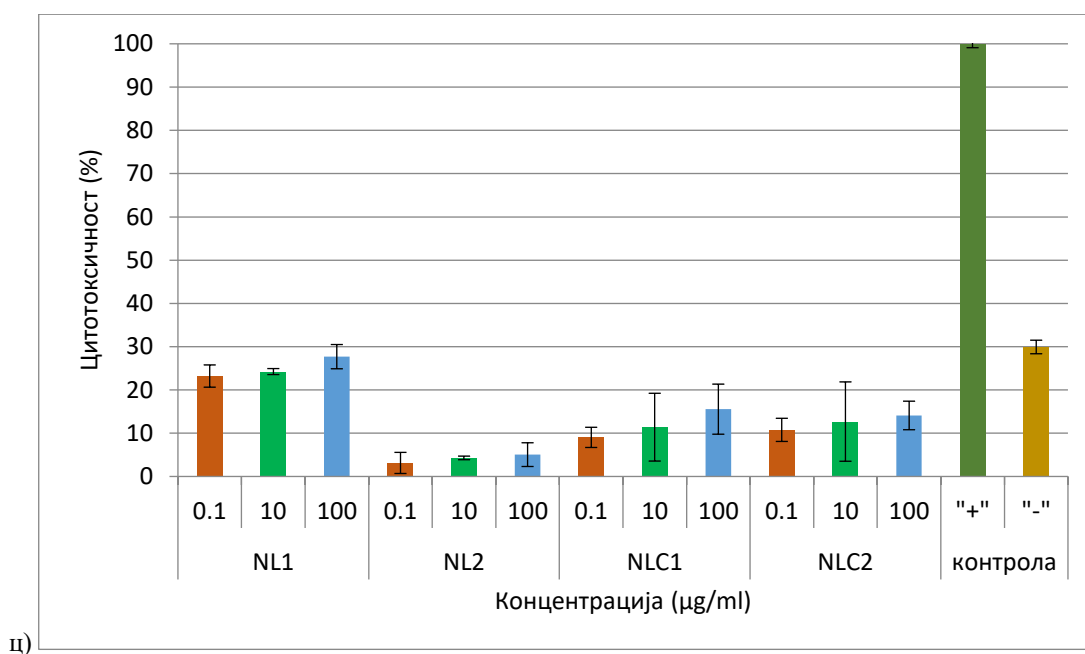
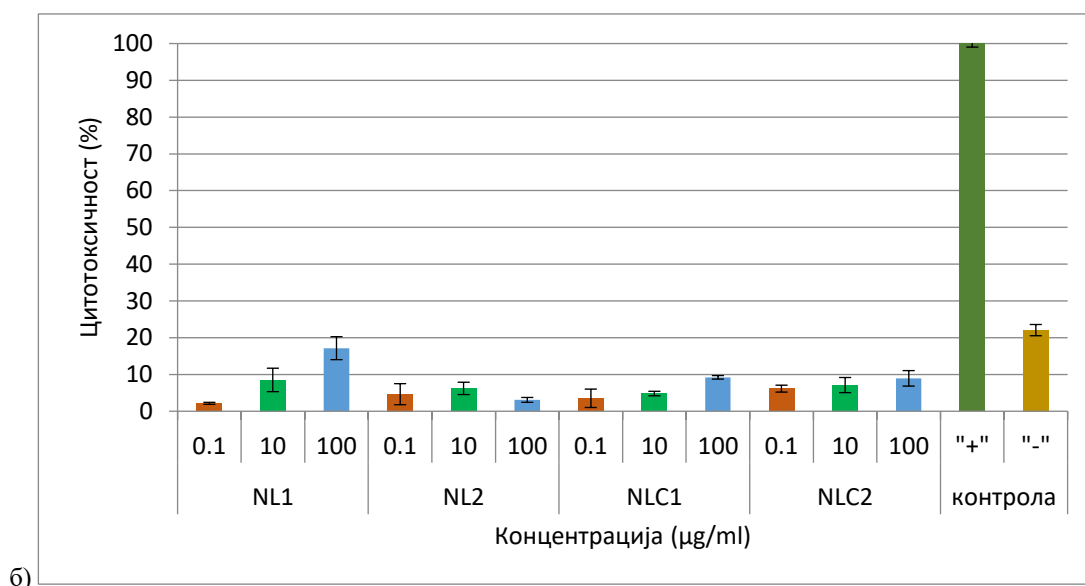
Слика 37. Скетер плот од анализираниите примероци обоени по време на инкубација.

Влијанието на концентрацијата на формулацијата врз вијабилноста на клетките може јасно да се види и од скетер плотот (Сл. 37), каде што со зголемување на концентрацијата на формулацијата се намалува скорот на резултатите во насока на првата доминантна компонента на моделот.

5.3.2. *In vitro* испитување на цитотоксичноста на *hCMEC/D3* клетките по инкубација со подготвените формулации

Резултатите од определувањето на цитотоксичноста на наносистемите (во 3 различни концентрации) по инкубација на истите со *hCMEC/D3* клеточната линија во време од 4, 24 и 48 часа се прикажани на Слика 38.





Слика 38. Цитотоксичност на *hCMEC/D3* клетки после а) 4 часа, б) 24 часа, ц) 48 часа време на инкубација со подготвените формулации во 3 различни концентрации (0,1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL) ($n=6$).

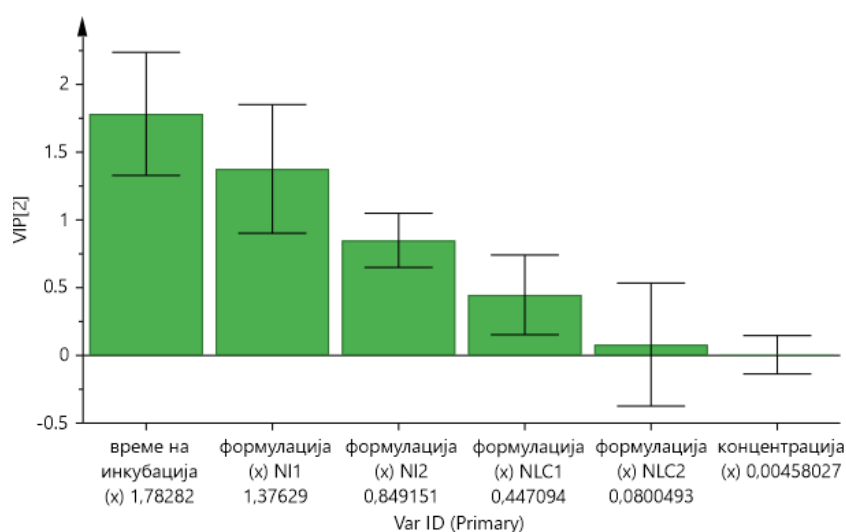
Од добиените резултати може да се забележи дека липидните наносистеми не покажуваат висок процент на цитотоксичност во сите испитани временски точки, што би можело да укаже дека при фузија на наносистемите со клеточната мембрана не настанува нејзино нарушување (Benson et al., 2015; Chan et al., 2013). Потребно е да се истакне дека со тестовите базирани на MTS и аденозин три фосфат

(АТР) се мери интензитетот на клеточниот метаболизам како индиректен параметар за клеточната вијабилност, меѓутоа овие тестови не даваат информација дали настанала клеточна смрт или инхибиција на раст на клетките (Rai et al., 2018; Smith et al., 2011). Од друга страна пак, малиот процент на цитотоксичност укажува на тоа дека не настанува нарушување на клеточната мембрана и соодветно на тоа не настанува некроза на клетките.

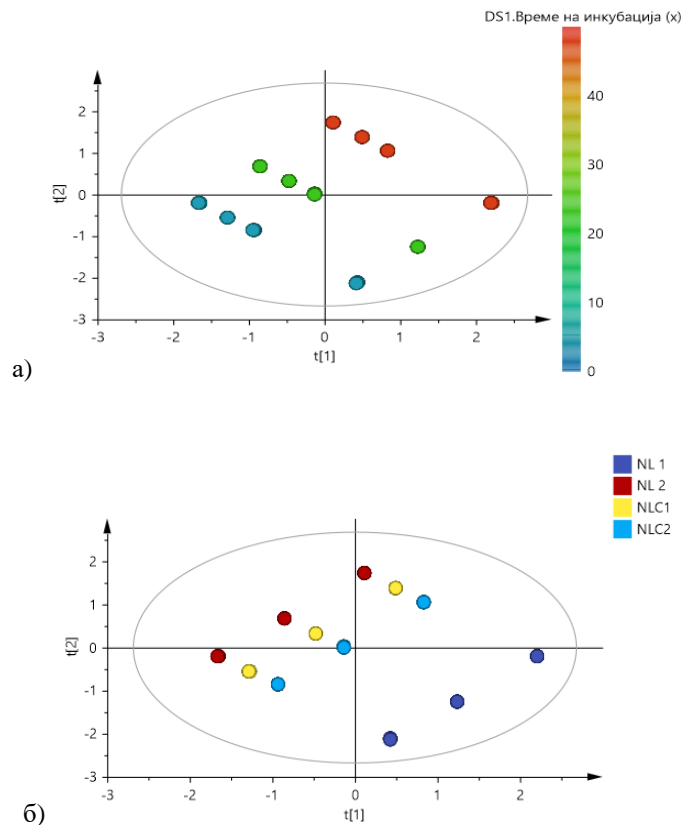
Доколку резултатите добиени за малиот процент на цитотоксичност се споредат со истовремено намалување на вијабилноста на клетките после 4, 24 и 48 часа период на инкубација со највисоката концентрација на *NLC1* и *NLC2*, како и по 48 часа период на инкубација со 100 µg/mL од формулацијата *NLI*, може да се претпостави дека намалувањето на вијабилноста на клетките најверојатно се должи на трошење на клеточната енергија, а со тоа и намалување на метаболната активност на клетките, што е клучен параметар при определувањето на нивната вијабилност.

Во согласност со претходно кажаното, резултатите добиени од испитување на цитотоксичноста на сите четири формулации (формулации *NLI*, *NL2*, *NLC1* и *NLC2*) беа анализирани со PLS модел со две главни компоненти. Согласно VIP плотот, доминантен фактор кој влијае на цитотоксичноста е времето на експозиција, но исто така значително влијание има и видот на формулацијата (Сл. 39).

Од скетер плотот може да се види дистинктивно однесување на примероците во однос на времето на инкубација при што и двете компоненти еднакво придонесуваат кон објаснување на овој ефект. Влијанието на формулацијата врз цитотоксичноста исто така е евидентно, при што може да се забележи дека липозомската формулација со *PEG* на површината како полимер за стерна стабилизација (*NLI*) се издвојува во посебен кластер и бележи поголема цитотоксичност од останатите формулации (Сл. 40б), меѓутоа споредено со негативната контрола, истата се дефинира како нетоксична.



Слика 39. VIP плот на сигнификантните фактори во испитувањето на клеточната цитотоксичност.

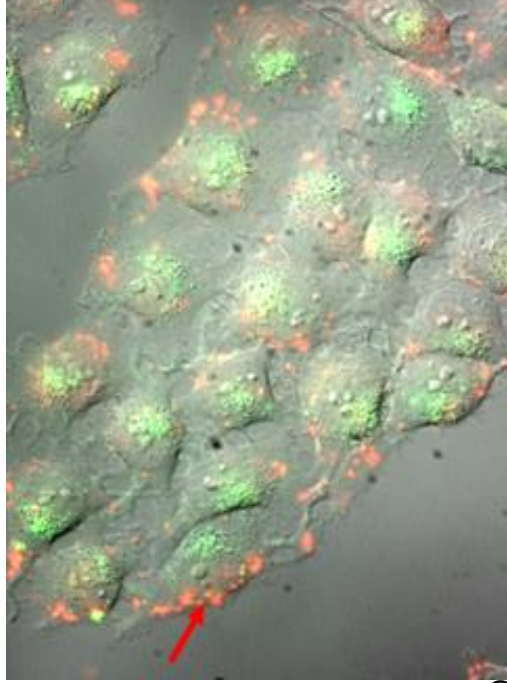


Слика 40. Скетер плот од скоровите на анализираниите примероци обоени по а) време на инкубација и б) вид на формулација.

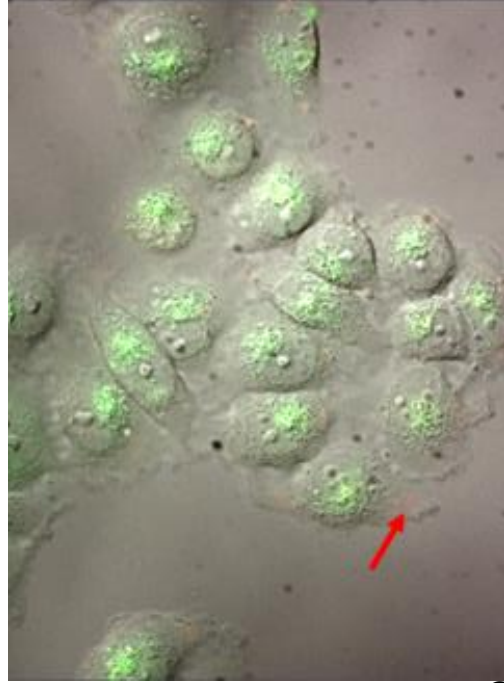
5.3.3. *In vitro* испитување на транспорт и дистрибуција на наносистемите во избрани клеточни култури

Како што беше и претходно наведено, способноста на нанолипозомите и наноструктурираните липидни носачи успешно да ги пренесат АК низ КМБ е документирана (Chenthamara et al., 2019). Генерално, составот на носачот и неговите физичко-хемики карактеристики, како што се: големината и обликот на честичките, површинскиот потенцијал, хидрофобноста/хидрофилноста на површината и функционализацијата со лиганди го контролираат механизмот и степенот на клеточно преземање.

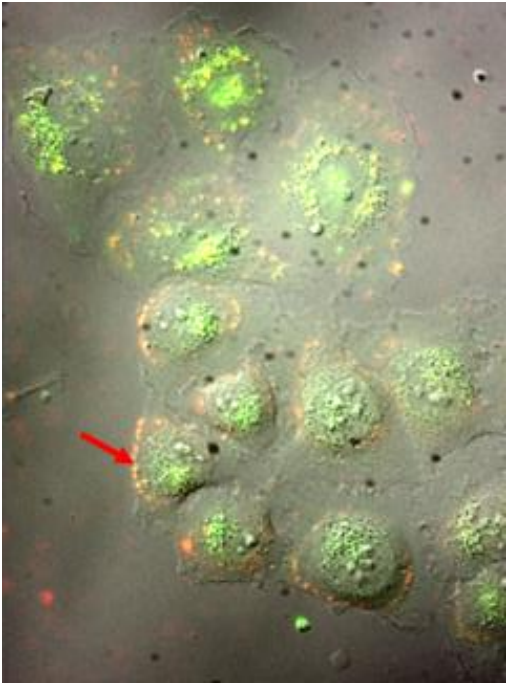
После фазата на клеточно преземање, од исклучителна важност беше да се испита интрацелуларната дистрибуција на наносистемите којашто на некој начин ја детерминира нивната финална дестинација во клеточните компартменти или органелите, нивната цитотоксичност и терапевтскиот ефект (Foroozandeh and Aziz, 2018). Со цел да се набљудува интернализацијата и последователната дистрибуција од страна на клетките на КМБ, како и неврните, клеточното преземање на нанолипозомите и наноструктурираните липидни носачи во *hCMEC/D3* и *SH-SY5Y* клеточните линии беше испитано со флуоресцентна и конфокална микроскопија.



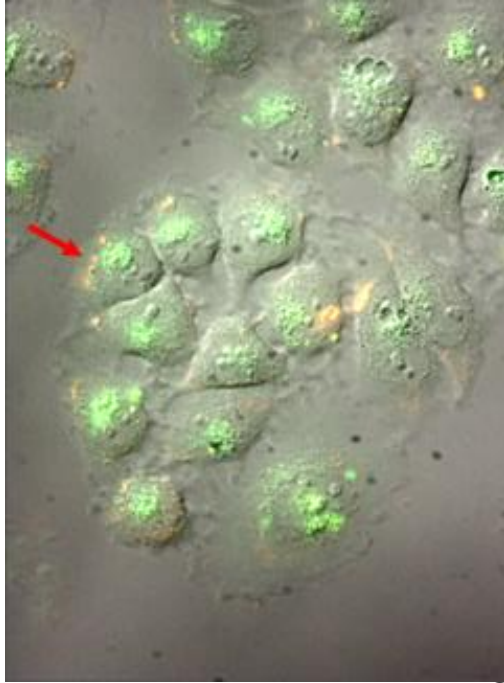
б)



г)

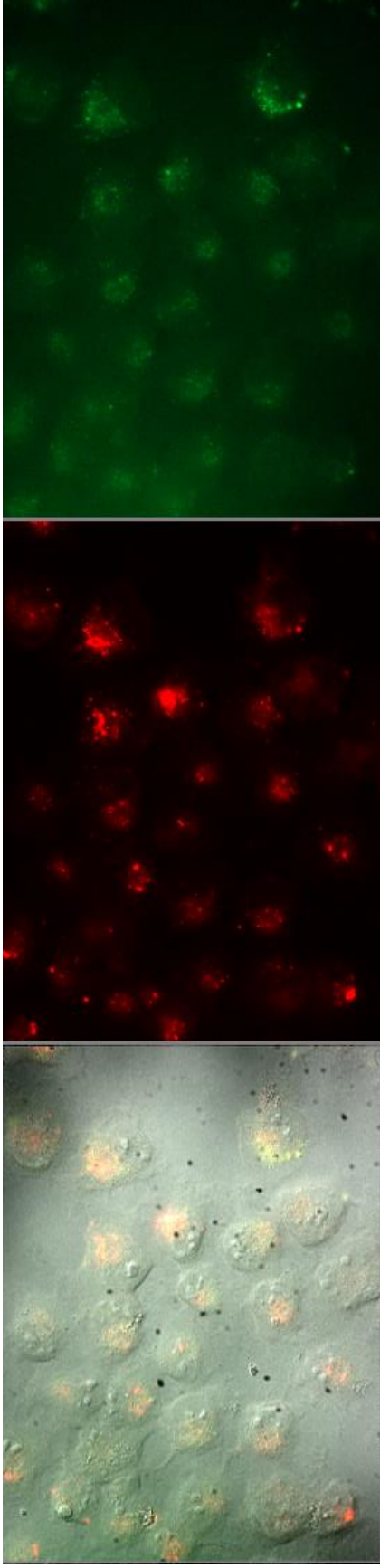


а)

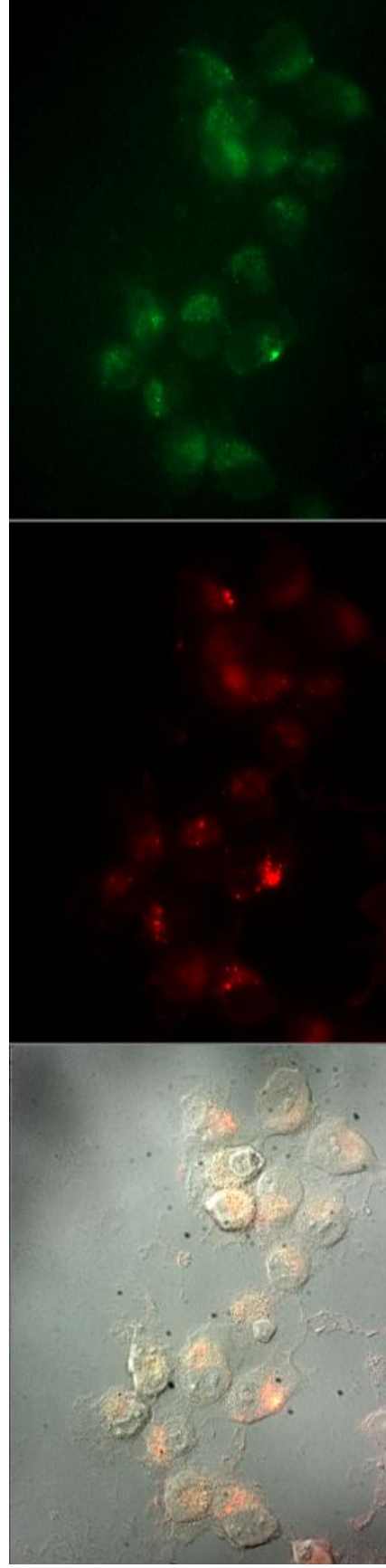


в)

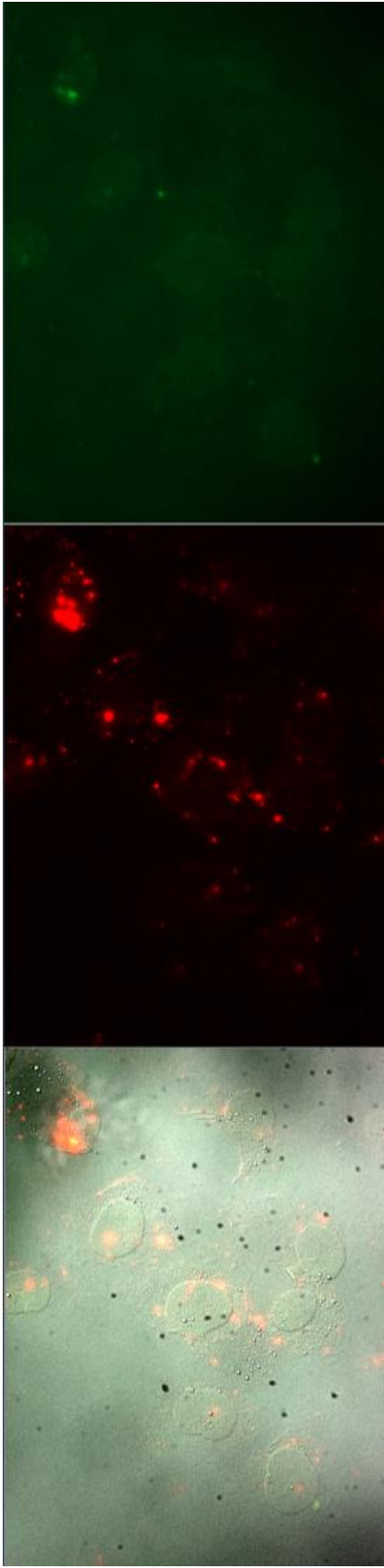
Слика 41. Интернализација на наносистемите по 1 час инкубација во живи *SH-SY5Y*; а) *NL1*, б) *NL2*, в) *NLС1* и г) *NLС2*.



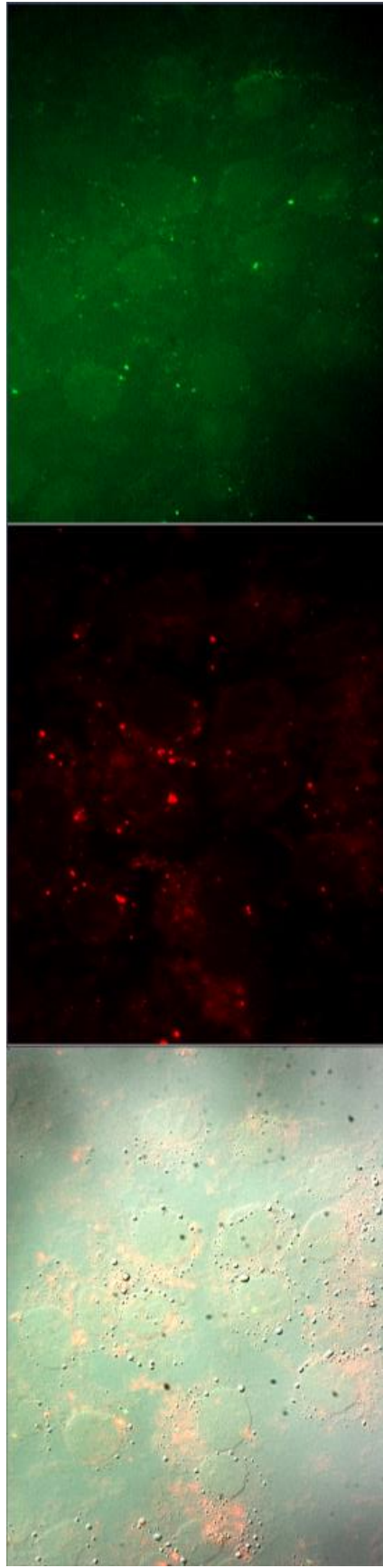
Слика 42. *NLI* после 4 часа период на инкубација во живи *SH-SY5Y*, каде со црвена флуоресценција се означени наночестичките, а со зелена ендозоми/лизозоми.



Слика 43. *NLI* после 4 часа период на инкубација во живи *SH-SY5Y*, каде со црвена флуоресценција се означени наночестичките, а со зелена ендозоми/лизозоми.



Слика 44. *NLC1* после 4 часа период на инкубација во живи *SH-SY5Y*, каде со црвена флуоресценција се означени наночестичките, а со зелена ендозоми/лизозоми.



Слика 45. *NLC2* после 4 часа период на инкубација во живи *SH-SY5Y*, каде со црвена флуоресценција се означени наночестичките, а со зелена ендозоми/лизозоми.

Сликите добиени со флуоресцентна микроскопија на живи *SH-SY5Y* клетки покажаа дека по 1 час време на инкубација сè уште наносистемите не се комплетно интернализирани во клетките, меѓутоа јасно е видно дека процесот на преземање е започнат и истите се концентрирани и се натрупуваат околу клеточната мембрана (Сл. 41).

На Сликите 42-45 прикажана е инкубацијата на подготвените формулации во период од 4 часа со живи *SH-SY5Y* клетки. Она што може да се забележи е дека сите четири формулации успешно се интернализирале во период од 4 часа во клетките. Дополнително, може да се констатира и потврди ко-локализацијата на нанолипозомите и наноструктурираните липидни носачи во живите *SH-SY5Y*, каде со црвена флуоресценција се означени наночестичките, а со зелена ендозоми/лизозоми.

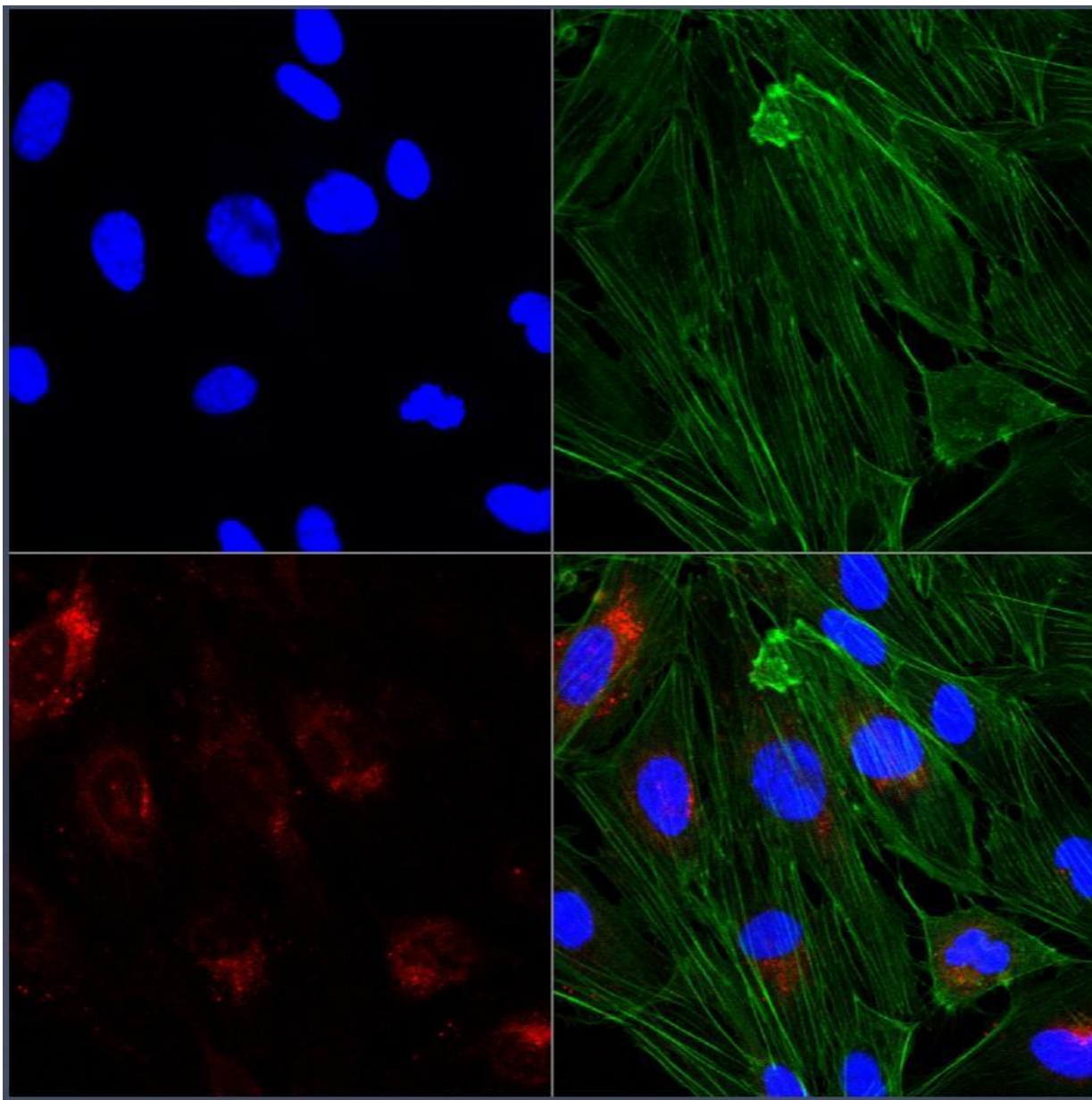
3Д реконструкција на сликите добиени од конфокалната микроскопија исто така потврди дека стерно стабилизирани нанолипозоми и наноструктурирани липидни носачи успешно пенетрираат низ клеточните мембрани со цел нивна интернализација во *hCMC/D3* (Сл. 46-49) и *SH-SY5Y* клетките (Сл. 50-53).

Кај нанолипозомите (примероци *NL1* и *NL2*) беше забележана значителна фракција од везикулите акумулирана околу перинуклеарната зона со редуцирана цитоплазматска дистрибуција. Овој феномен најверојатно се должи на потврдената способност на нанолипозомите (Сл. 46 и 47) да ја преминат КМБ притоа избегнувајќи го ендозомалниот/лизозомалниот пат и последователно, наоѓајќи начин да интерреагираат со комплексната мембрана на јадрото (Torchilin et al., 2003; Wang and Wang, 2014).

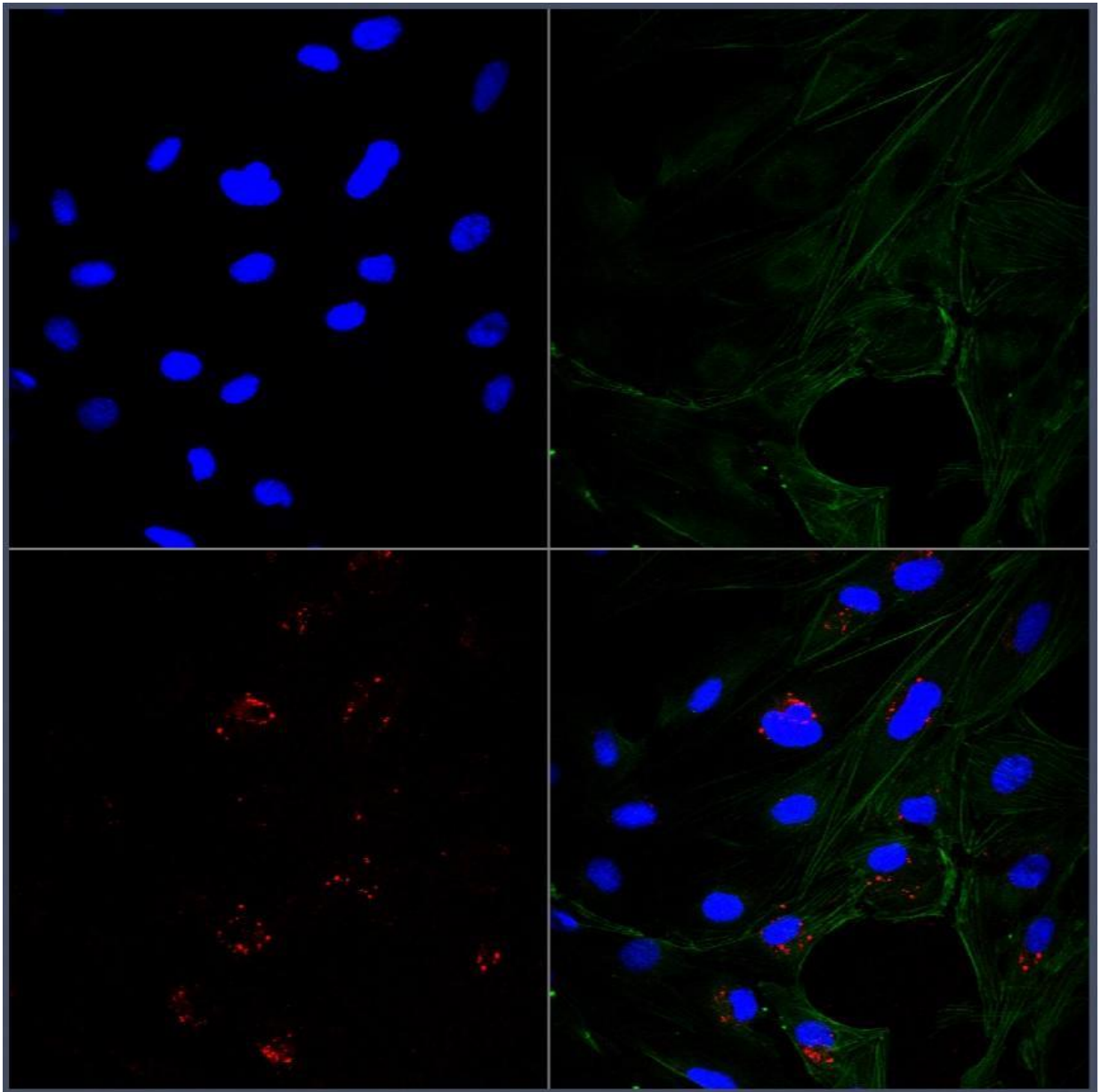
Кај наноструктурираните липидни носачи (примероци *NLC1* и *NLC2*) (Сл. 48 и 49) беше забележано нивно присуство во цитоплазмата на клетките, најверојатно концентрирани во интрацелуларните везикули (ендозоми или лизозоми) што укажува за нивен можен механизам на интернализација по пат на ендоцитоза (Neves et al., 2017). Имајќи во предвид дека просечниот дијаметар на *NLC 1* и *NLC2* беше околу 100 nm, добиените резултати се во согласност со литературните податоци кои укажуваат на тоа дека ендоцитозата е процес зависен од големината на наночестичките и дека наносистеми со големина на честички од ~100 nm и помали може многу лесно да бидат преземени со ендоцитоза од страна на клетките (Lombardo et al., 2020; Shang et al., 2014; Wu et al., 2019).

Согласно литературните податоци, стерната стабилизација на различни наносистеми резултира со успешна интернализација од страна на клетките на КМБ, како и невроните. При стерна стабилизација на наносистемите со *PEG* освен намалената опсонизација и продолженото време на циркулација, зголемената површинска наелектризираност на честичките влијае на подобрување на нивната интернализација во негативно наелектризираните клетки (Li et al., 2011; Shalabalija et al., 2021). Исто така, Nie et al. (2011) воочиле дека интернализацијата е поврзана со површинската активација на клеточната мембрана од страна на амфифилниот *POL*. Дополнително, Shubhra et al. (2014) заклучиле дека *POL* на површината на честичките при нивна пенетрација може да ја променат микровискозноста на клеточната мембрана, како и да го намалат нивото на *ATP* со што се намалува и активноста на *efflux* транспортерите, што од друга страна може да резултира со олеснет транспорт низ клетките на КМБ.

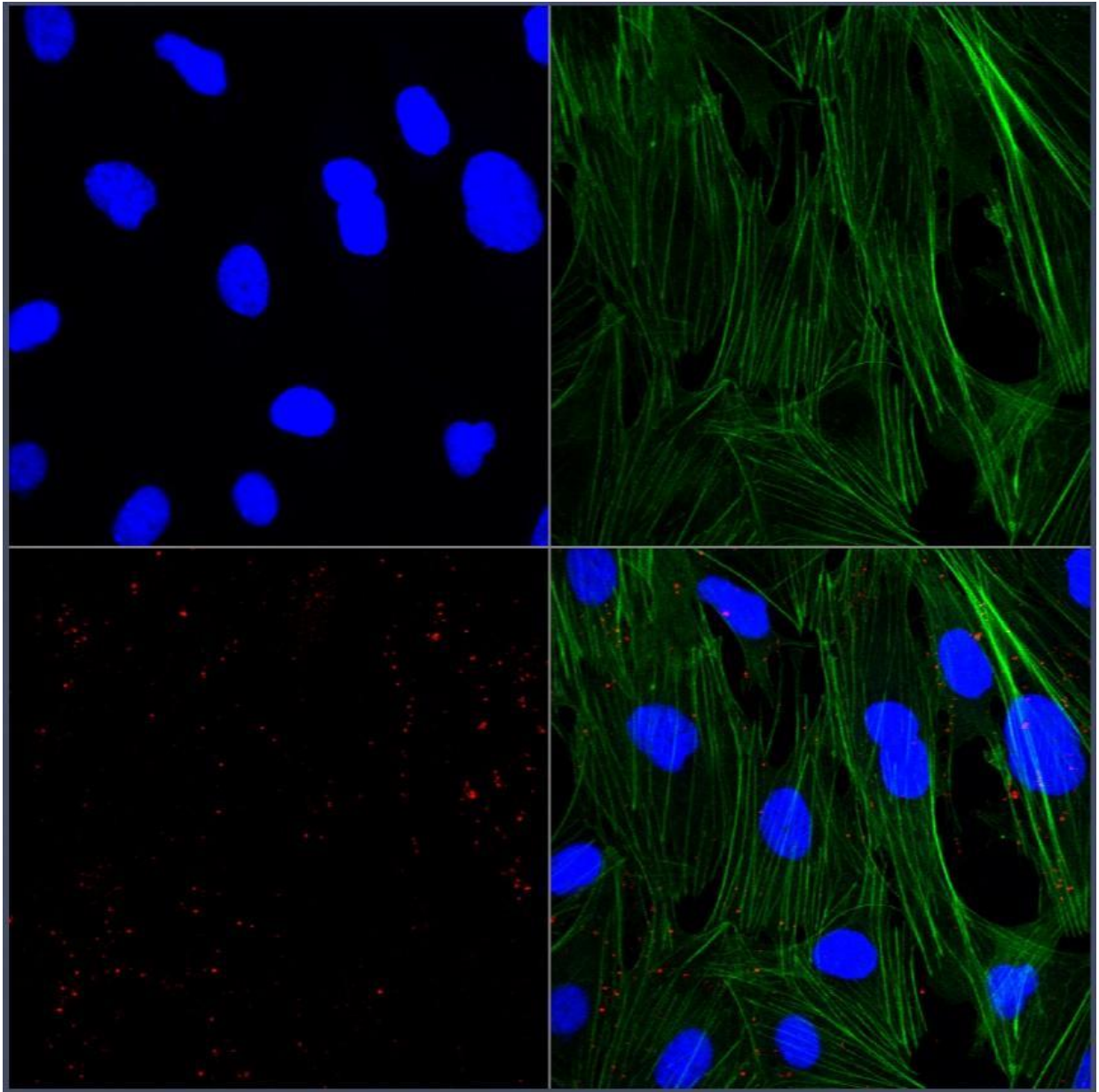
Досега не се пријавени слични експериментални резултати поврзани со овој феномен. Затоа, потребни се дополнителни квантитативни истражувања со цел да се открие природата на овој феномен.



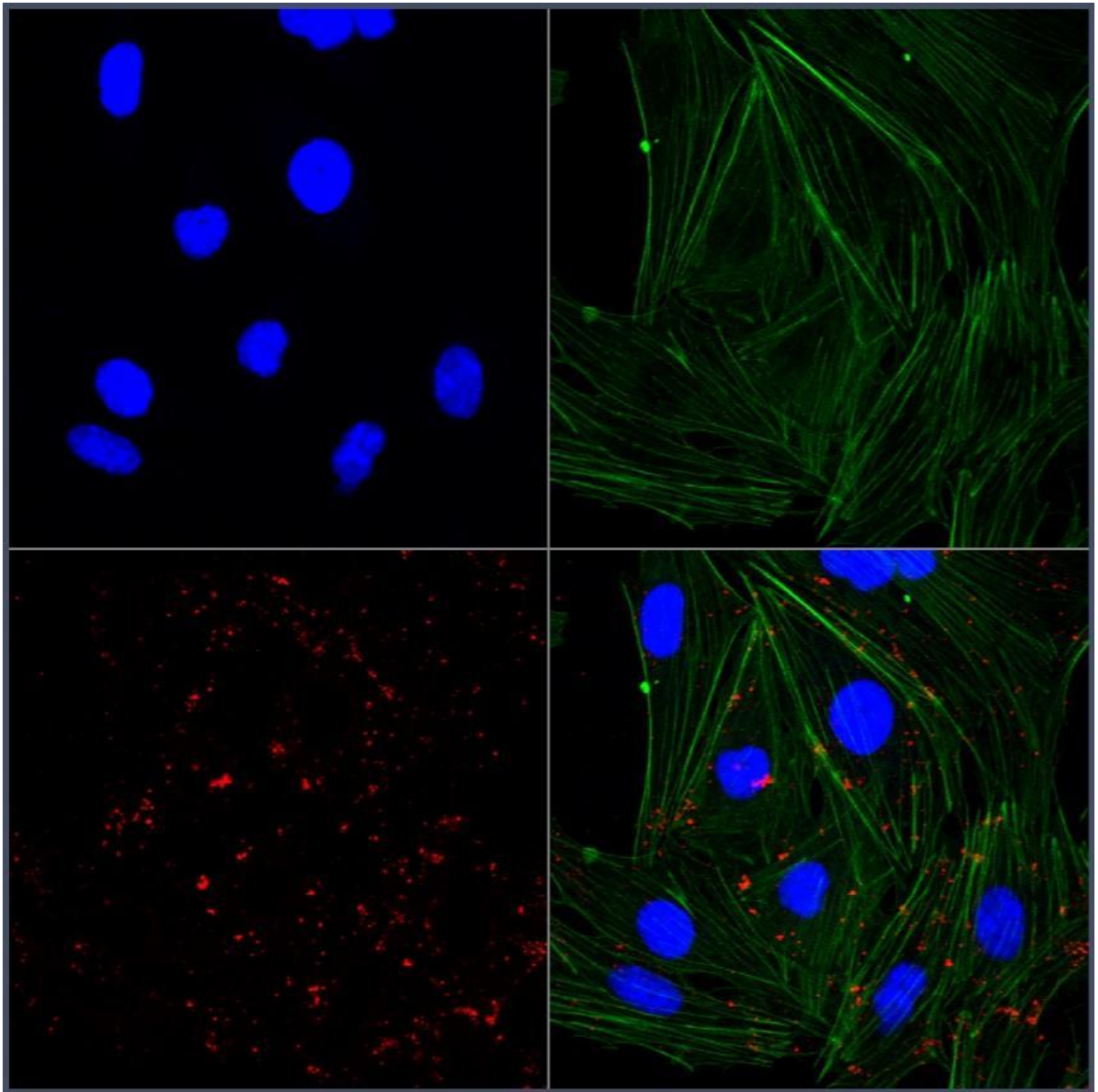
Слика 46. Конфокална микроскопија од интернализација и дистрибуција на *NLI* во *hCMEC/D3* клеточна линија, каде цитоскелетот е означено со зелена боја, јадрото со сина, а честичките со црвена боја, соодветно.



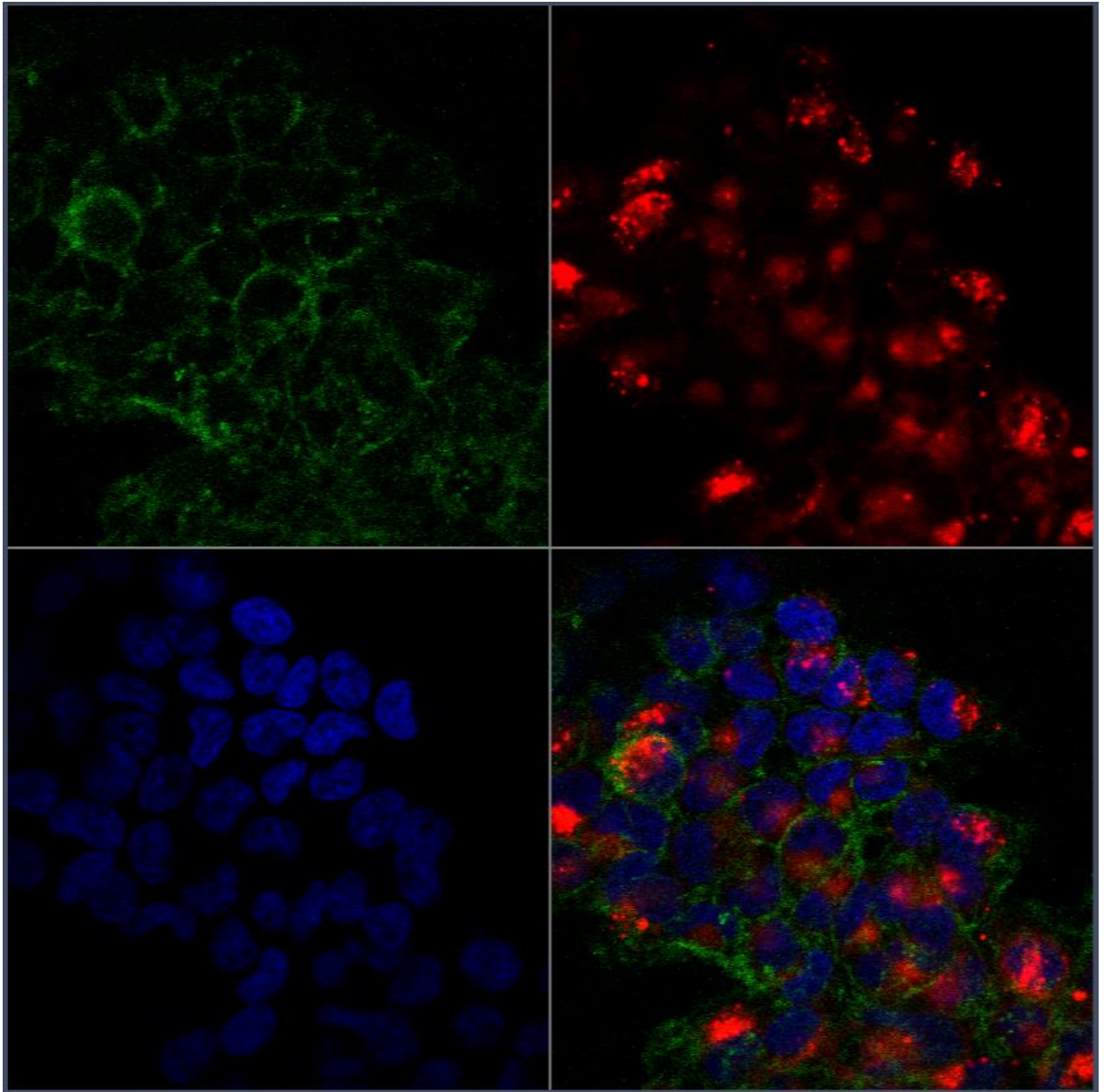
Слика 47. Конфокална микроскопија од интернализација и дистрибуција на *NL2* во *hCMEC/D3* клеточна линија, каде цитоскелетот е означено со зелена боја, јадрото со сина, а честичките со црвена боја, соодветно.



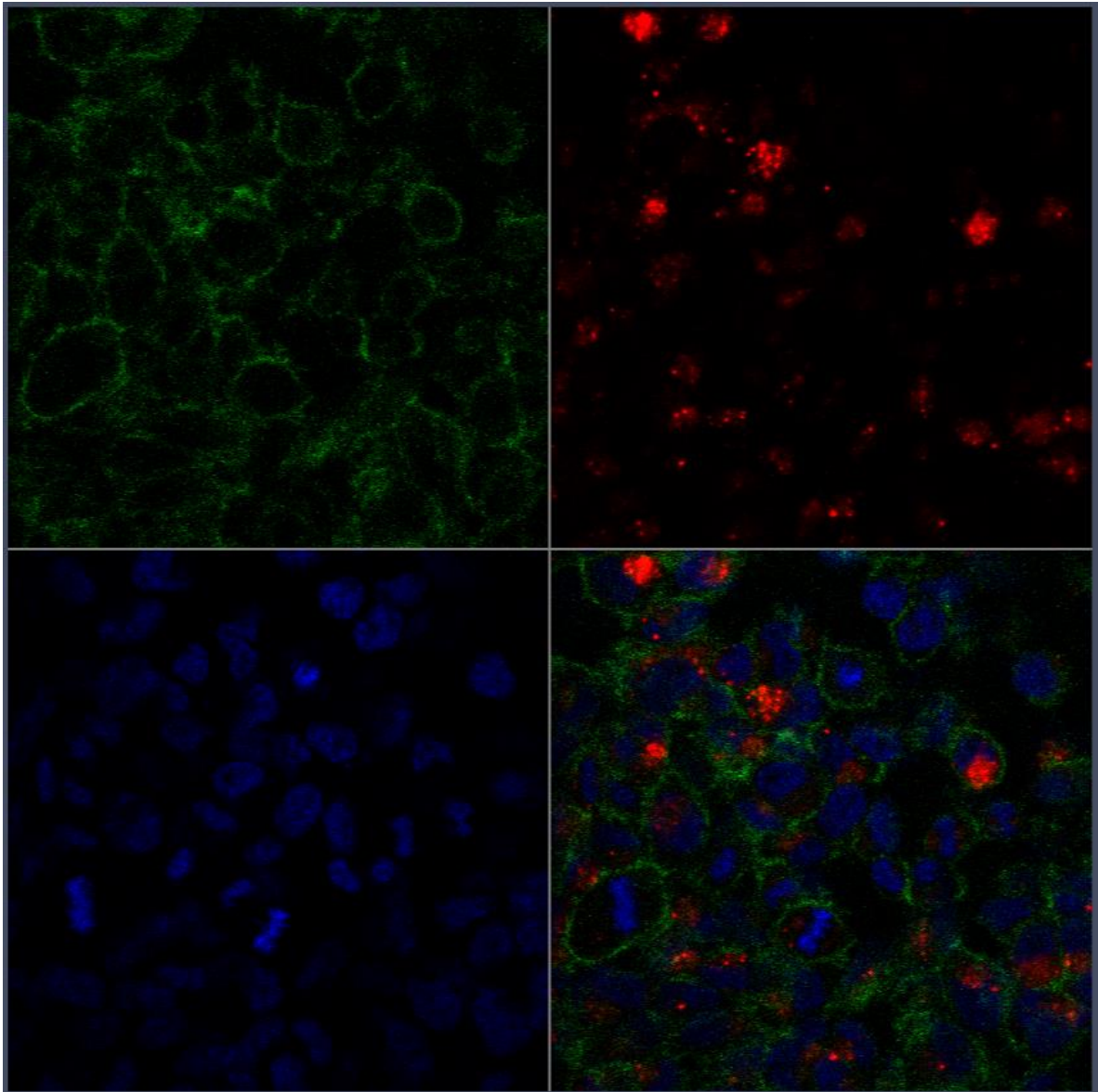
Слика 48. Конфокална микроскопија од интернализација и дистрибуција на *NLC1* во *hCMC/D3* клеточна линија, каде цитоскелетот е означено со зелена боја, јадрото со сина, а честичките со црвена боја, соодветно.



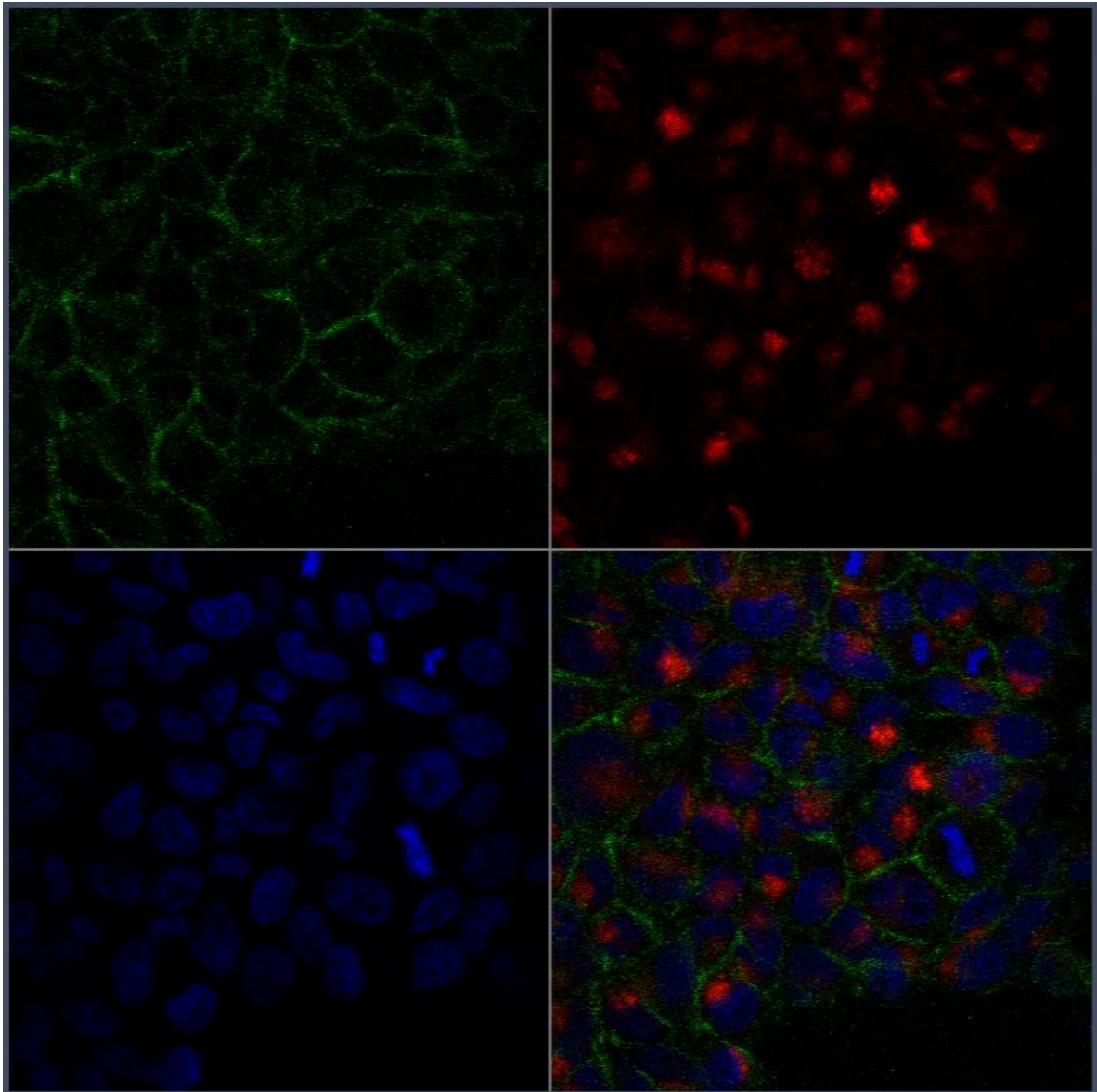
Слика 49. Конфокална микроскопија од интернализација и дистрибуција на *NLC2* во *hCMEC/D3* клеточна линија, каде цитоскелетот е означено со зелена боја, јадрото со сина, а честичките со црвена боја, соодветно.



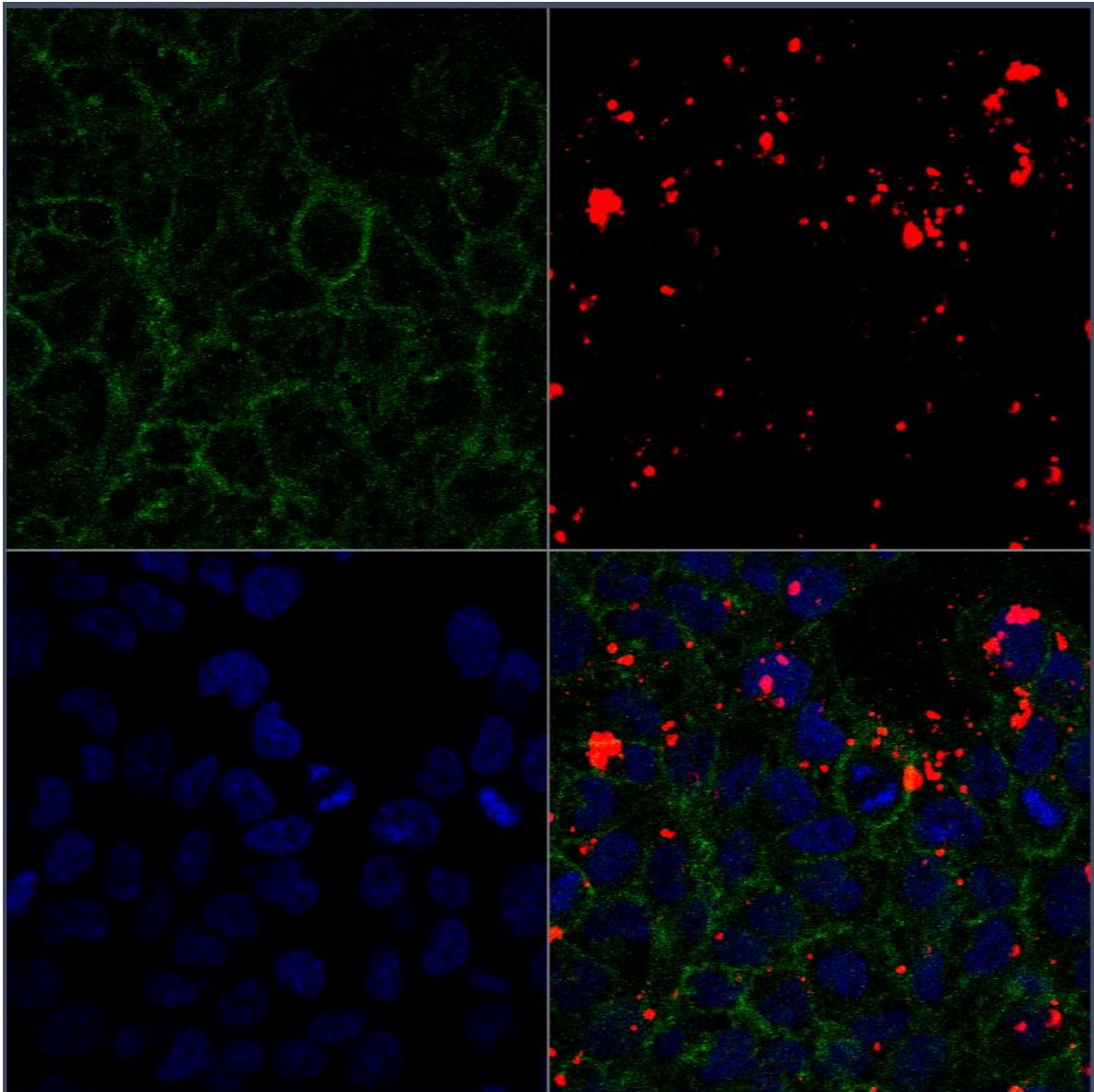
Слика 50. Конфокална микроскопија од интернализација и дистрибуција на *NLI* во *SH-SY5Y* клеточна линија, каде цитоскелетот е означено со зелена боја, јадрото со сина, а честичките со црвена боја, соодветно.



Слика 51. Конфокална микроскопија од интернализација и дистрибуција на *NL2* во *SH-SY5Y* клеточна линија, каде цитоскелетот е означено со зелена боја, јадрото со сина, а честичките со црвена боја, соодветно.



Слика 52. Конфокална микроскопија од интернализација и дистрибуција на *NLC1* во *SH-SY5Y* клеточна линија, каде цитоскелетот е означено со зелена боја, јадрото со сина, а честичките со црвена боја, соодветно.



Слика 53. Конфокална микроскопија од интернализација и дистрибуција на *NLC2* во *SH-SY5Y* клеточна линија, каде цитоскелетот е означено со зелена боја, јадрото со сина, а честичките со црвена боја, соодветно.

5.3.4. *In vitro* испитување на преземањето на наносистемите во избрани клеточни култури

Клеточното преземање на нанолипозомите и наноструктурираните липидни носачи беше испитано на *hCMEC/D3* и *SH-SY5Y* клеточните линии, како едни од најдобро карактеризираните клеточни култури кои успешно ги имитираат главните карактеристики на клетките на КМБ и невронската функција, соодветно (Markoutsas et al., 2011; Strother et al., 2021).

Резултатите од студиите на преземање во *hCMEC/D3* клетките покажаа значителна разлика во количината на интернализирани нанолипозоми ($>0,2 \mu\text{g}$) во споредба со наноструктурирани липидни носачи ($\sim 0,17 \mu\text{g}$) (Табела 6). Имено, при квантитативното определување на клеточно преземање на формулација *NL1* на 4°C во *hCMEC/D3* клеточната линија, не беше забележана разлика во однос на промена на количината на преземени честички на 37°C . За разлика од тоа, кај *NL2* процентот на преземање на 4°C во *hCMEC/D3* клеточната линија беше 71,05% изразен како релативен процент од вкупната количина на интернализирани честички на 37°C (Сл. 54). Оваа разлика најверојатно се должи на полимерот за стерна стабилизација. Имено, *POL* како стелт полимер покажува поголема тенденција кон следење на ендоцитниот механизам на интернализација, отколку на пасивна дифузија (Ottenbrite and Javan, 2005).

Табела 6. Количина на интернализирани честички на 37°C со

hCMEC/D3 и *SH-SY5Y* клеточните линии

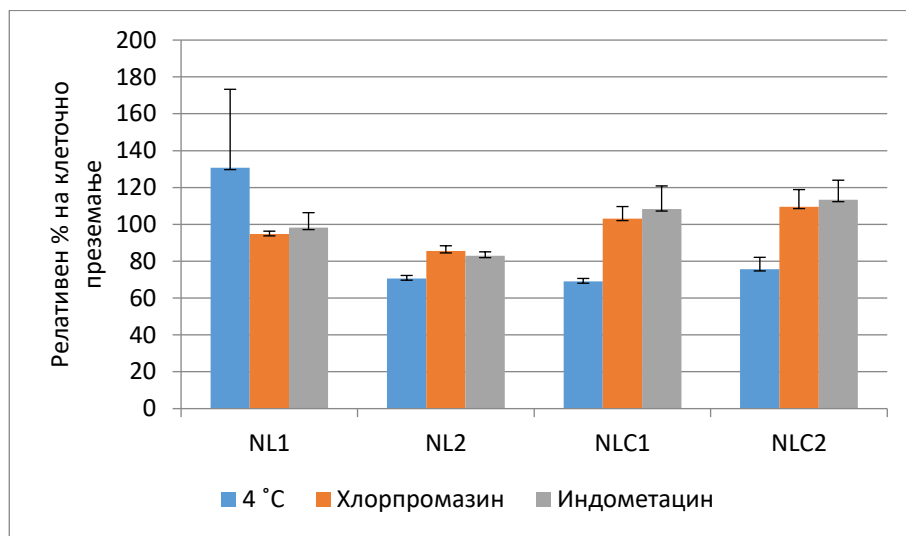
Формулации	<i>hCMEC/D3</i> (μg) \pm SD	<i>SH-SY5Y</i> (μg) \pm SD
NL1	0,2067 \pm 0,013	0,3851 \pm 0,068
NL2	0,2442 \pm 0,012	0,3209 \pm 0,039
NLC1	0,1769 \pm 0,009	0,3173 \pm 0,023
NLC2	0,1695 \pm 0,004	0,3112 \pm 0,012

Кога станува збор за наноструктурираните липидни носачи, може да се забележи дека количината на клеточно преземање се намалува како што и двете формулации *NLC1* и *NLC2* се инкубирани на 4°C , при што беа добиени 70,39% и 76,99% изразени како релативни проценти од вкупната количина на интернализирани честички на 37°C , соодветно, што најверојатно се должи на фактот дека клеточното преземање кај наноструктурираните липидни носачи следи *ATP*-зависен механизам на интернализација, што всушност претставува и главна причина за трошење на *ATP* и редуцирање на енергетскиот метаболизам, како што беше и претходно потврдено во презентираниите резултати од *MTS* тестот за испитување на вијабилноста на клетките.

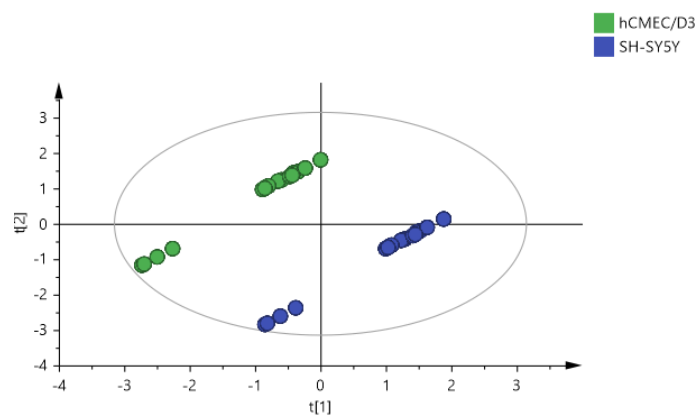
Со цел подобро да се разбере точниот механизам на клеточна интернализација на системите, студиите на преземање беа направени и во присуство на инхибитори за клатрин и кавеолин – посредувана ендоцитоза. Од добиените резултати (Сл. 54) може да се забележи дека нема значително

намалување на клеточното преземање кога липидните наносистеми се инкубирани со хлорпромазин и индометацин, со исклучок на *NL2*.

Во таа насока, важно е да напоменеме дека кога се анализираат и интерпретираат резултатите од клеточно преземање со употреба на инхибитори за ендцитоза, треба да се земе во предвид дека блокирањето на една патека на преземање може да резултира со активација на друг ендцитен механизам, што повторно доведува до мешање на резултатите (Ivanov, 2008). Попрецизно, важно е да се спомене дека nano-лековите може да бидат преземени и интернализирани преку различни ендцитни патеки (и активно и пасивно) и затоа идентификацијата и испитувањето на точниот механизам за клеточна интернализација претставува вистински предизвик (Akinc and Battaglia, 2013).

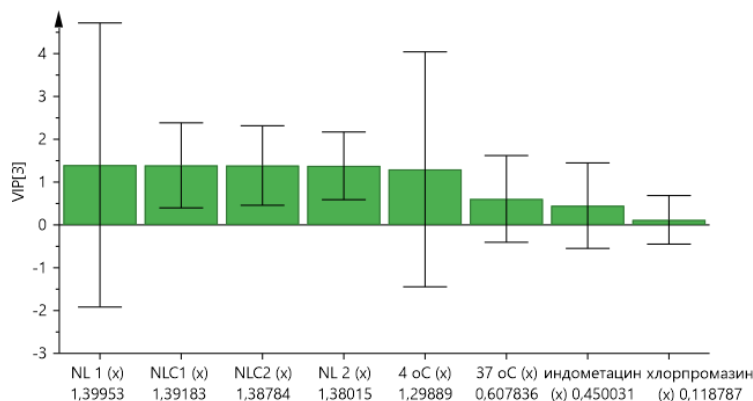


Слика 54. Ефектот на различни инхибитори врз клеточната интернализација на подготвените формулации после 2 часа инкубаицја со *hCMC/D3* клетките; на 4 °C со цел да се инхибираат сите енергетски-зависни механизми; со хлорпромазин за да се инхибира клатрин-посредувана ендцитоза; и со индометацин за да се инхибира кавеолин-посредувана ендцитоза ($n=4$).



Слика 55. Скетер плот на анализирани резултати обоени по тип на клеточна линија.

PLS моделот од резултатите на студиите на клеточно преземање на липидните формулации на двете клеточни линии покажа дека видот на клетките претставува значајна независна варијабла која што има влијание врз преземањето на честичките (Сл. 55), заради што беше одлучено да се примени дискриминаторен *PLS* за секоја клеточна линија посебно.

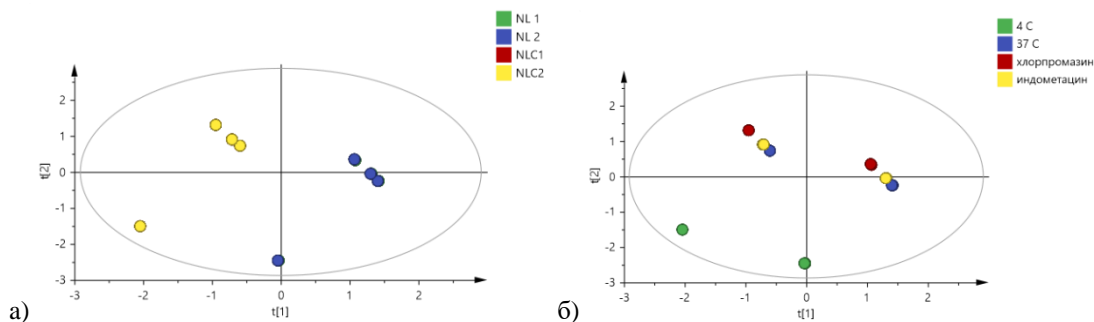


Слика 56. VIP плот на сигнификантните фактори кои влијаат врз клеточното преземање на наносистемите од *hCMC/D3* клеточната линија.

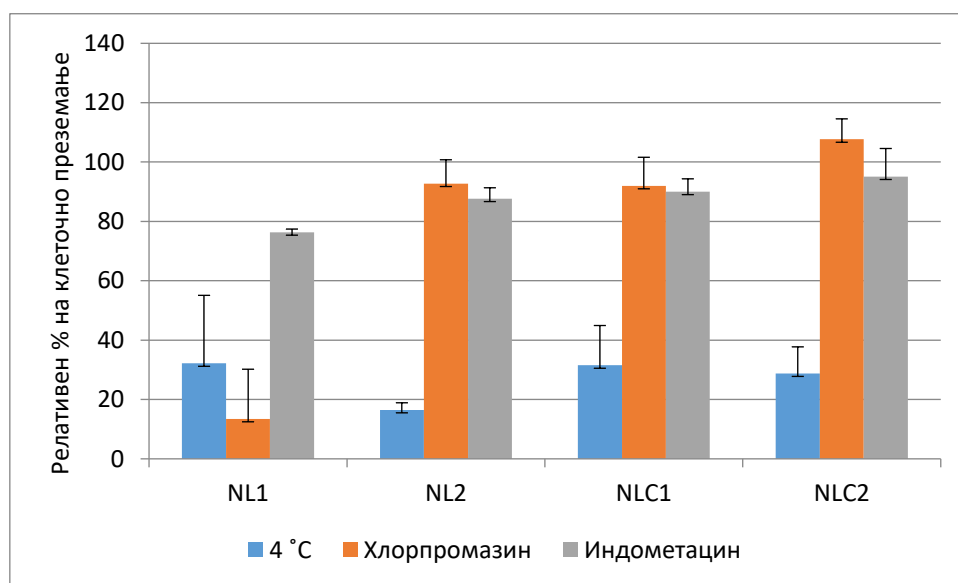
Разликата во преземањето на наносистемите од *hCMC/D3* и *SH-SY5Y* клеточните линии најверојатно се должи на одредени специфични карактеристики за дадената клеточна линија, земајќи ја во предвид различната анатомска и физиолошка функција на двете клеточни линии што понатаму секако придонесува и влијае врз нивниот механизам и количина на интернализација. Имено, *hCMC/D3* клеточната линија успешно се користи како модел за КМБ во повеќе истражувања, што само го потврдува високиот квалитет и потенцијалот за замена на примарни клетки за *in vitro* истражувања. Овие мозочни ендотелијални клеточни линии ги имаат задржано најкритичните карактеристики на примарните клетки, како што се експресијата на клеточните маркери, транспортерите и протеинските тесни јазли (Vu et al., 2009), што силно влијаат врз транспортот и преземањето на различни видови на наночестички. Од друга страна пак, во недиференцираната форма, *SH-SY5Y* клетките се карактеризирани морфолошки како неуробластома клетки, неполаризирани клеточни тела со неколку процеси во скратена форма. Недиференцираните *SH-SY5Y* клетки континуирано пролиферираат, експресирајќи незрели невронски маркери и недостаток на зрели невронски маркери и на тој начин овој тип на клетки се сметаат дека најмногу потсетуваат на незрели, позитивни на тироксин хиидрозилаза и допамин- β -хидроксилаза карактеристични катехоламинергични неврони (Kovalevich and Langford, 2013).

Анализата на податоците од моделот на *hCMC/D3* укажа дека доминантно влијание има видот на формулацијата (Сл. 56). При анализата на скетер плотот (Сл. 57) може да се види дека доминантно влијание има видот на формулацијата, додека површината (*PEG* или *POL*) нема значително влијание врз клеточното преземање.

Од Слика 57 може да се забележи дека енергетската депривација значително влијае на преземањето на сите формулации, додека инхибиторите на ендцитоза немаат значително влијание врз клеточното преземање.



Слика 57. Скетер плот од скоровите на анализираниите примероци од *hCMEC/D3* клеточната линија обоени по а) вид на формулација и б) експериментални услови.

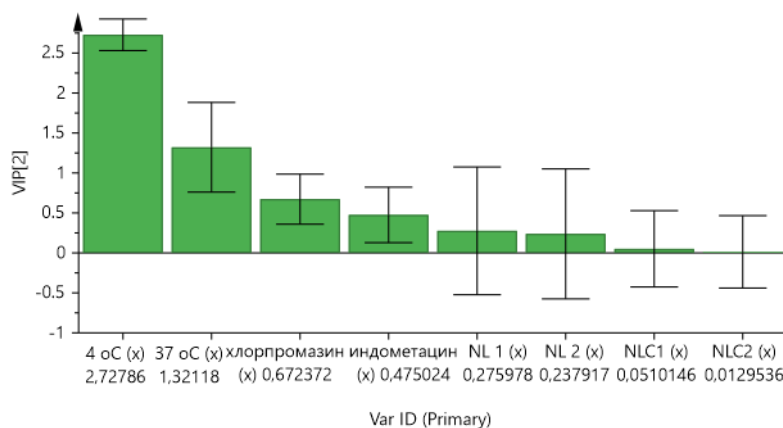


Слика 58. Ефектот на различни инхибитори врз клеточната интернализација на подготвените формулации после 2 часа инкубаицја со *SH-SY5Y* клетките; на 4 °C со цел да се инхибираат сите енергетски-зависни механизми; со хлорпромазин за да се инхибира клатрин-посредувана ендоцитоза; и со индометацин за да се инхибира кавеолин-посредувана ендоцитоза ($n=4$).

Клеточната линија *SH-SY5Y* покажа значително повисоки вредности на пермеабилност на формулациите по инкубација на 37 °C, во споредба кога истите се инкубирани со *hCMEC/D3* клеточната линија (Табела 6). Бидејќи мембраните на неврните содржат високо ниво на холестерол (Harris and Milton, 2010), повисоката количина на клеточно преземање за нанолипозомите во споредба со наноструктурираните липидни носачи се должи најверојатно поради присуството на холестеролот во составот на нанолипозомските формулации. Ова е исто така во согласност со резултатите добиени од страна на Lee et al. (2013) каде е покажано дека *SH-SY5Y* неврните покажуваат јасна преференција за липозоми кои во својот состав содржат холестерол. Од Слика 58 може да се забележи дека процентот на клеточна интернализација после 2 часа време на инкубација со формулациите на 4 °C значително се намалува (21,45%, 16,53%, 24,09%, 23,24% за *NL1*, *NL2*, *NLC1*,

NLC2, соодветно), што укажува на тоа дека овие наносистеми следат *ATP*-зависен механизам на клеточна интернализација.

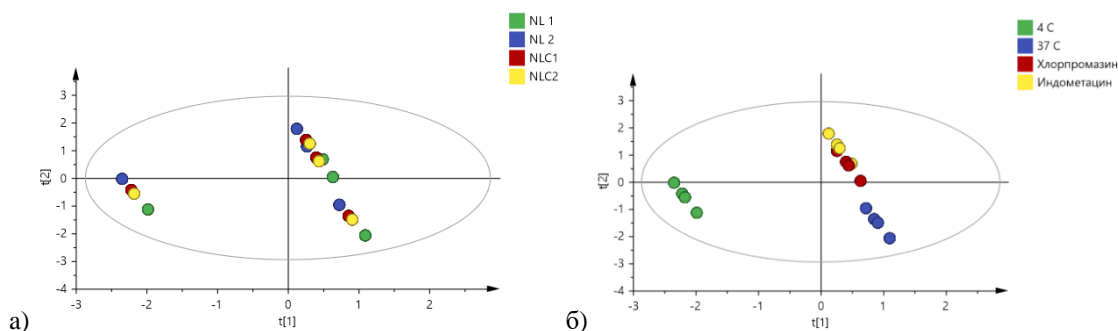
Моделот кој ги опишува експериментите на *SH-SY5Y* клетките покажа дека условите на експериментот имаат најголемо влијание на количината на преземени честички, при што енергетската депривација покажа најголем VIP фактор (Сл. 59).



Слика 59. VIP плот на сигнификантните фактори кои влијаат врз клеточното преземање на наносистемите од *SH-SY5Y* клеточната линија.

На скетер плотот од моделот може да се видат дистинктивно одвоени групи согласно условите на изведување на експериментите, при што експериментите под енергетска депривација даваат најниски скорови. Може да се забележи и ефектот на инхибиторите на ендоцитоза, но тој е далеку помал.

Што се однесува до влијанието на видот на формулацијата, може да се заклучи дека експериментите на *SH-SY5Y* клеточната линија покажаа дека формулацијата нема дистинктивно различно однесување во однос на интернализацијата, што може да се види и од VIP плотот и од скетер плотот (Сл. 60).



Слика 60. Скетер плот од скоровите на анализирани примероци од *SH-SY5Y* клеточната линија обоеени по а) вид на формулација и б) експериментални услови.

5.4. *In vivo* студии на антиконвулзивна активност на подготвените формулации

Предложената антиконвулзивна активност на подготвените наносистеми со енкапсулиран *CE* беше испитана на *battery* - тестови на напади кај глувчиња со користење на електричен или хемиски стимул. *MES* тестот, *6-Hz* тестот, *scPTZ* тестот, како и *ivPTZ* тестот беа селектирани како „златни стандарди“ од препорачаните водичи од Програмата за развој на антиепилептични лекови (*ADD*) од страна на Националниот Институт за здравје (*USA*) (*Krall et al., 1978*).

Невротоксичноста на наносистемите беше оценета преку рота-род тест. Во првата фаза од евалуацијата, примероците беа администрирани интраперитонеално во дози од 30, 100 и 300 mg/kg, 30 минути пред изведување на *MES* или рота-род тестот, соодветно.

Резултатите од фаза I се сумирани во Табела 7. Прелиминарните фармаколошки резултати укажуваат на тоа дека сите четири формулации покажуваат заштита кај половина или повеќе од тестираните глувчиња во *MES* тестот. Потентноста на формулациите беше во следниот редослед: *NL1CE=NLC2CE=NLC1CE>NL2CE* кај *MES* тестот, која беше споредлива и со референтниот лек фенитоин. Не беше детектирана невротоксичност по изведба на рота-род тестот и со највисоката доза од 300 mg/kg, за разлика од фенитоинот кадешто концентрацијата е лимитирана на 100 mg/kg (фаза I).

Табела 7. Антиконвулзивна активност и невротоксичност на наносистемите

Формулации	MES ^a	Рота-род ^b
	0,5 часа	0,5 часа
NL1CE	30	-
NL2CE	300	-
NLC1CE	30	-
NLC2CE	30	-
фенитоин ^d	30	-
дијазепам ^e	-	30

Во табелата претставените вредности се однесуваат на минималните дози од тестираните формулации, каде биоактивност или невротоксичност беше потврдена кај најмалку 50 % од тестираните животни. (-) укажува дека не е регистрирана појава на активност или невротоксичност кај примероците или референтните лекови кога биле администрирани во највисоката концентрација од 300 mg/kg

^aMaximal electroshock test (MES)

^bРота-род тест

Во следната квантитативна фармаколошка анализа од скрининг-фазата беа определени просечните ефективни дози (*ED*₅₀) пресметани преку *MES* и *6-Hz* тестовите, соодветно, средната невротоксична доза (*TD*₅₀) пресметена преку рота-род тестот, како и индексите на заштита (*PI*) за сите четири формулации кои покажаа задоволителна активност во фаза I. Како референтен лек за *MES* тестот беше употребен фенитоин. Квантитативната евалуација од тестираните примероци

во фаза II покажа дека потентноста на испитаните формулации е во следниот редослед $NLC1CE > NLC2CE > NL1CE > NL2CE$ по изведување на *MES* тестот и $NL2CE > NL1CE > NLC2CE > NLC1CE$ по изведување на 6-Hz тестот (Табела 8). *NLC1CE* формулацијата покажа активност која може да биде споредена со онаа на референтниот лек – фенитоин по изведување на *MES* тестот ($NLC1CE:ED_{50}=11,85$ во споредба со фенитоин: $ED_{50}=7,15$), додека нејзиниот PI беше повисок за разлика од PI на фенитоинот ($NLC1CE:PI=25,31$ во споредба со фенитоин: $PI=13,99$).

Како што беше наведено и претходно, досегашните литературни податоци укажуваат на тоа дека големината на честичките и површинската наелектризираност играат клучна и многу важна улога која силно влијае врз фармакокинетиката и биолошката дистрибуција на наносистемите *in vivo*. Попрецизно, овие карактеристики влијаат врз времето на циркулација и клиренсот на наносистемите *in vivo* и од друга страна, исто така влијаат врз успешниот транспорт низ ендотелните клетки кај специфични ткива, како што е КМБ. Повеќе истражувања укажуваат на тоа дека големина на честички помеѓу 20 и 150 nm може значително да го редуцира клиренсот *in vivo*, а во исто време да го зголеми времето на циркулирање на системите во крвта. Исто така, докажано е дека фагоцитозата на наносистемите е зголемена со зголемување на вредноста на површинскиот потенцијал, без разлика на полнежот, што доведува до забрзано чистење или зголемен клиренс на системите *in vivo* (Di et al., 2021). Од ова произлегува дека, честички со поголем дијаметар (>160 nm) и многу негативни вредности за зета потенцијал (> -44 mV) како кај *NL2CE*, во споредба со останатите три формулации, се карактеристики кои може парцијално да придонесат за помал терапевтски потенцијал на оваа формулација во гореспоменатите *in vivo* тестови.

Табела 8. Квантитативен скрининг на наносистемите со помош на *MES* и 6-Hz тестови кај глувчиња

Формулации	Тест	TPE ^a (h)	ED ₅₀ ^b (mg/kg)	95% интервал на доверба	Hill slope	TD ₅₀ ^c (mg/kg)	PI ^d
NL1CE	MES	0,5	66,90	29,20 - 153,3	0,18	>300	>4,48
	6-Hz	0,5	43,01	1,279 - 1,988	0,78	>300	>6,97
NL2CE	MES	0,5	96,97	36,58 - 257,1	0,66	>300	>3,09
	6-Hz	0,5	33,33	1,385 - 1,661	1,14	>300	>9,0
NLC1CE	MES	0,5	11,85	7,491 - 18,75	1,17	>300	>25,31
	6-Hz	0,5	84,19	1,743 - 2,107	1,24	>300	>3,56
NLC2CE	MES	0,5	30,79	20,88 - 45,43	0,1	>300	>9,74
	6-Hz	0,5	67,38	1,551 - 2,106	0,94	>300	>4,45
фенитоин	MES	0,5	7,15	2,911 - 17,59	1,04	>100	>13,99

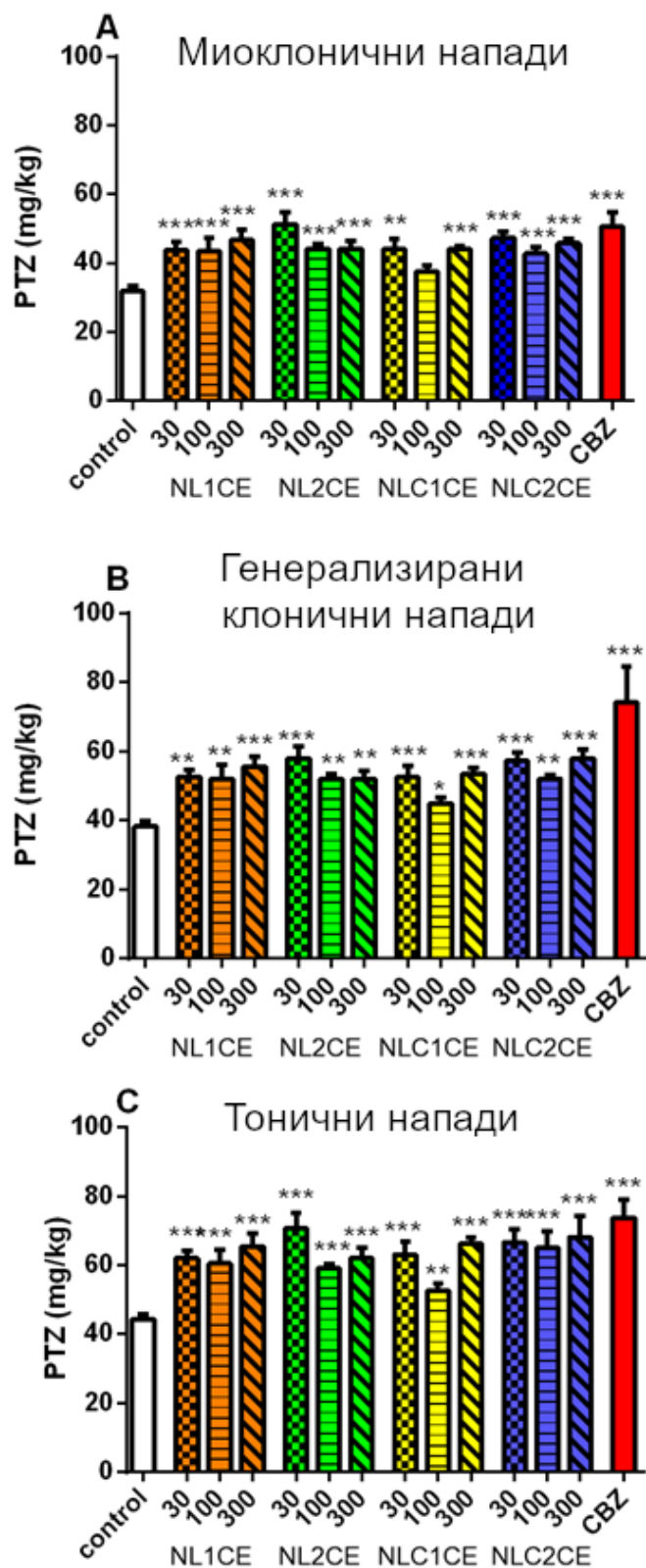
Претставените резултати се во 95 % интервалот на доверба.

^aTime to peak effect – TPE;

^bMedian effective doses (ED₅₀);

^cMedian minimal neurotoxic doses (TD₅₀);

^dProtective index (PI) (Rotarod TD₅₀/ED₅₀).



Слика 61. Ефекти од *NL1CE*, *NL2CE*, *NLC1CE* и *NLC2CE* и позитивна контрола *CBZ* (30 mg/kg i.p.) на прагот за трите фази на напади: миоклонични (A), генерализирани клонични (B) и тонични (C) напади предизвикани со *ivPTZ* инјекција (1 %) кај глувчиња. Свездичките означуваат дека постои значителна разлика помеѓу испитаните формулации и контролите. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

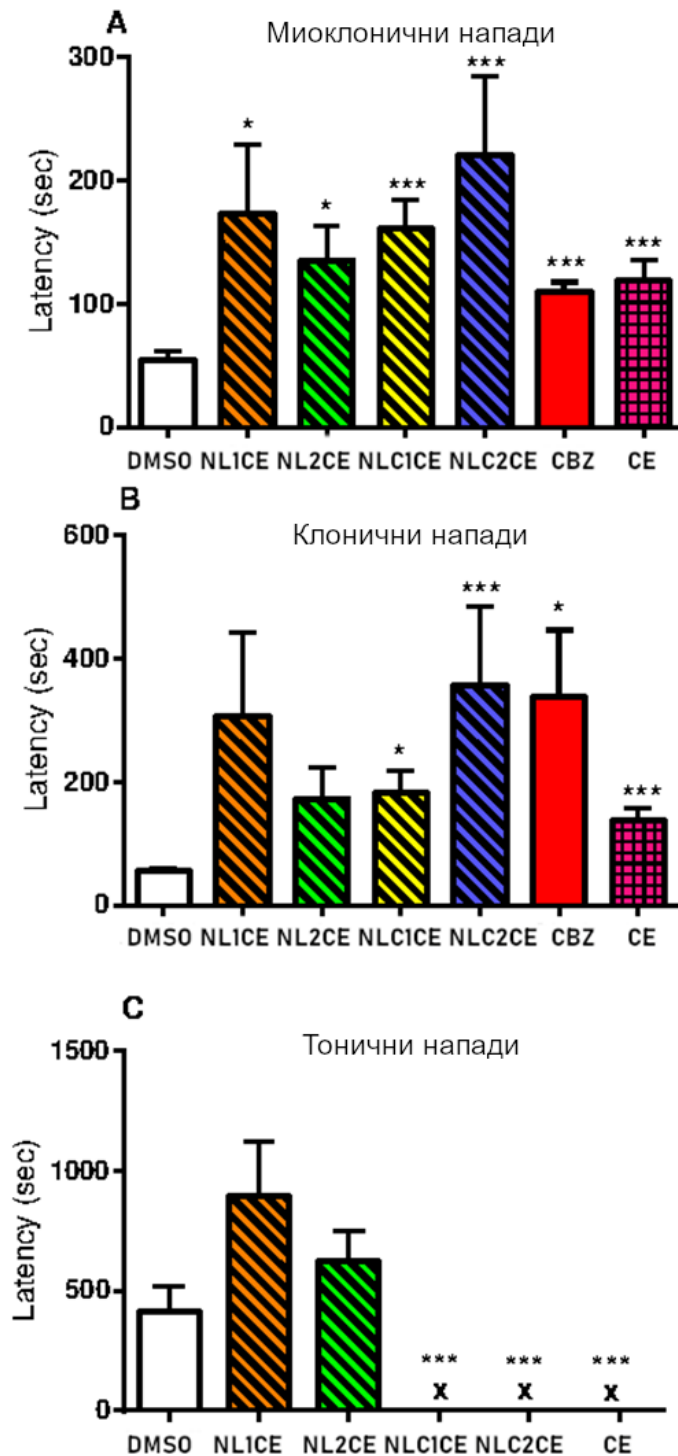
Во следната скрининг-фаза беа испитувани миоклоничните, генерализираните клонични и тоничните напади по примена на испитуваните формулации, како и *CE*.

При интравенска администрација на 1% *PTZ* кај глувчиња (со цел да се предизвика епилептичен напад) сите четири испитувани формулации со вграден *CE* покажаа активност во трите фази на напади (миоклонични, генерализирани клонични и тонични напади) и тоа при сите администрирани дози (30, 100 и 300 mg/kg), соодветно. Резултатите од еднонасочна ANOVA укажаа дека сите формулации покажуваат значителни ефекти на прагот за појава на миоклонични, генерализирани клонични и тонични напади, соодветно. Пост хок тестот покажа дека сите четири формулации покажуваат ефекти кои се споредливи со ефектот на карбамазепинот како референтен лек, во сите 3 испитани дози и во сите три фази на напади ($p < 0,01$ и $p < 0,001$) (Сл. 61а, б, в).

Од добиените резултати (Сл. 62) може да се забележи дека сите подготвени формулации го зголемуваат времето на латенција за појава на различни видови на епилептични напади.

Кај глувчиња кај кои им беа администрирани формулациите *NLICE*, *NLCICE* и *NLC2CE*, во доза од 30 mg/kg, покажаа значително зголемување на времето на латенција до појава на првите миоклонични напади во споредба со контролната група [Kruskal-Wallis еднонасочна анализа на варијансата со следните ранкови: $H=16,132$, $p=0,003$]. Пост хок тестот покажа дека *NLICE*, *NL2CE*, *NLCICE* и *NLC2CE* значително го зголемуваат времето на латенција за миоклонични напади ($p=0,0447$, $p=0,043$, $p=0,0007$, $p=0,0002$, соодветно) (Сл. 62а). Времето на латенција за првите клонични напади беше исто така значително зголемено по администрација на наносистемите [$H=12,383$, $p=0,015$]. Слично како и за миоклоничните напади, времето на латенција за клоничните напади беше значително зголемено при администрација на *NLCICE* и *NLC2CE* формулациите ($p=0,02$, $p < 0,001$, соодветно) (Сл. 62б). Кај времето на латенција за тоничната фаза, при администрација на *NLCICE* и *NLC2CE* формулациите, како и на *CE*, по 0,5 часа целосно беа супримираны тоничните напади, односно покажаа изразен антиконвулзивен ефект, што во истиот временски период не може да се забележи кај нанолипозомските формулации (Сл. 62в), иако истите покажуваат одреден ефект. Антиконвулзивната активност на сите формулации беше споредлива со позитивната контрола – карбамазепин.

За да се објасни овој феномен, комплексната етиологија, патофизиологија и големиот број на механизми вклучени во развојот и прогресијата на различните видови на напади, како и бројните разлики во структурата и физичко-хемиските и биофармацевтските карактеристики помеѓу липозомите и наноструктурираните липидни носачи треба да биде земена во предвид. Бидејќи во литературата не се пронајдени слични експериментални резултати поврзани со оваа појава, потребно е да се спроведат дополнителни истражувања, како продолжување на оваа скрининг-фаза од експериментите.



Слика 62. Ефекти од *NLICE*, *NL2CE*, *NLCICE* и *NLC2CE* и позитивна контрола *CBZ* (30 mg/kg i.p.) на времето на латенција на миоклонични (A), клонични (B) и тонични (C) напади предизвикани со *scPTZ* инјекција (85 mg/kg) кај глущиња. Свездичките означуваат дека постои значителна разлика помеѓу испитаните формулации и контролите. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

6. Заклучок

Во рамките на оваа докторска дисертација беа приготвени формулации на липидни наносистеми (нанолипозоми и наноструктурирани липидни носачи) со вграден екстракт од *Cannabis sativa* и беше направена целосна физичко-хемика и биофармацевтска карактеризација, проследена со *in vitro* компаративни студии на две клеточни линии и *in vivo* студии на ефикасност на наносистемите за потенцијален третман на епилепсија.

Врз база на добиените резултати беа изведени следните заклучоци:

- Во првата фаза од истражувањата на оваа докторска дисертација, беа подготвени четири екстракти од *Cannabis sativa*. Истите беа карактеризирани од аспект на присуството на главните канабиноиди. Најголема концентрација на *THCA* беше определена во екстрактите добиени од суви цветови (188,57 и 357,82 mg *THCA*/g екстракт за течен екстракт добиен без претходна декарбоксилација на цветовите – *FA* и лиофилизиран сув екстракт од цветови – *FE*, соодветно), додека пак најголема концентрација од *CBDA* (56,96 mg *CBDA*/g екстракт) беше определена во екстракт од суви делови од херба (*CE*). Резултатите од спроведениот *ORAC* тест покажаа дека сувите екстракти добиени со лиофилизација на суви цветови (*FE*) и суви делови од цела херба (*CE*) имаат најголем антиоксидативен потенцијал ($IC_{50\%} = 0,052$ mg/mL за двата екстракти соодветно). Испитувањата на цитотоксичноста на сите подготвени екстракти покажаа дека најголем процент на вијабилни *hCMC/D3* клетки се добиени по инкубација со *CE* (>75%) во испитаниот концентрациски опсег.

- За понатамошните истражувања како активна компонента во формулациите на липидните наносистеми, беше селектиран сувиот лиофилизиран екстракт од цела херба од растението *Cannabis sativa* (*CE*).

- Подготвени беа четири формулации на нанолипозоми и четири формулации на наноструктурирани липидни носачи, кои помеѓу себе се разликуваат по полимерот за стерна стабилизација (празни формулации *NL1* и *NLC1* и соодветно формулации со вграден *CE*, *NL1CE* и *NLC1CE*, кои на својата површина содржат *PEG*; празни формулации *NL2* и *NLC2* и соодветно формулации со вграден *CE*, *NL2CE* и *NLC2CE*, кои на својата површина содржат *POL* како полимер).

- Подготвените формулации се карактеризираа со z-просечен дијаметар од 105-160 nm, унимодална дистрибуција на честичките по големина и негативен зета потенцијал. Не беа забележани промени во големината на честичките на подготвените формулации без и со вграден *CE* при нивна инкубација во фосфатен пуфер pH 7,4, како и во хумана плазма во текот на 24 часа, што укажува на нивната стабилност во нативната дисперзија и при нивна администрација, освен кај формулациите на наноструктурирани липидни носачи стерно стабилизирани со *POL*, што може да се должи на дестабилизација на системот од аспект на агрегација на честичките или поверојатно на поголем процент на адсорбирани протеини при процесот на формирање на протеинската корона.

Дополнително, резултатите од испитувањето на стабилноста на избраната формулација *NL1* со помош на *AF4-MALS/DLS* (при инкубација во клеточен медиум без и со 5% серум) покажаа дека не доаѓа до промена

во големината на честичките, што е дополнителна потврда за стабилноста на овој систем во присуство на серум протеини.

○ Сите подготвени формулации резултираа со продолжено ослободување на *CE* во текот на 24 часа, иако беше забележана разлика во однос на видот на наносистемот, како и во зависност од полимерот за стерна стабилизација. Како најсоодветен модел што ја опишува кинетиката на ослободување на *CE* од подготвените системи е моделот на *Peppas-Sahlin*, при што ослободувањето на *CE* од нанолипозомите се одвиваше со механизам на проста дифузија, а кај наноструктурираните липидни носачи со комбинација од проста дифузија и полимерна релаксација.

○ Сите формулации со вграден *CE* покажаа статистички значаен поголем антиоксидативен капацитет во споредба со чистиот екстракт *CE*.

○ При спроведените *in vitro* клеточни студии, подготвените липидни наноситеми (формулации *NL1* и *NL2*) не покажаа токсичност во испитуваниот концентрациски опсег (0,1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL) освен формулациите *NLC1* и *NLC2* и тоа само при највисоката концентрација (100 µg/mL) што најверојатно се должи на трошење на клеточната енергија, а со тоа и намалување на метаболната активност на клетките.

○ Интернализацијата на нанолипозомите и наноструктурираните липидни носачи во *hCMEC/D3* и *SH-SY5Y* клеточните линии беше потврдена со помош на флуоресцентна и конфокална микроскопија, што е во прилог на нивниот потенцијал за безбедно насочување и транспорт преку КМБ, како и ефикасен третман на болести на ЦНС. Дополнително, преку студиите на интернализација беше увидено дека по навлегување во клетката нанолипозомите имаат тенденција да се акумулираат околу перинуклеарната зона, додека пак наноструктурираните липидни носачи низ цитоскелетот.

○ При квантитативното испитување на клеточното преземање на наносистеми, забележана беше поголема количина на интернализирани честички во *SH-SY5Y* клеточната линија (0,3112 - 0,3851 µg) за разлика од *hCMEC/D3* (0,1695 – 0,2067 µg). Дополнително, резултатите од студиите на клеточно преземање во присуство на инхибитори за клатрин и кавеолин – посредувана ендоцитоза, покажаа дека сите формулации следат *ATP*-зависен механизам на интернализација во *hCMEC/D3* клеточната линија, со исклучок на *NL1* каде интернализацијата се одвива доминантно со механизам на пасивна дифузија. При инкубација со *SH-SY5Y* клеточната линија, енергетската депривација значително влијаеше на преземањето на сите наносистеми.

○ *In vivo* испитувањата на антиконвулзивната активност на подготвените формулации на *ICR* глувчиња, покажаа значителен потенцијал во превенција на миоклонични, клонични и тонични напади, кој беше споредлив со позитивната контрола (карбамазепин и фенитоин, соодветно). Значајно е да се истакне дека формулацијата *NL2CE*, покажа значителна пониска антиконвулзивна активност во споредба со останатите формулации, што може да се должи на типот на полимерот за стерна стабилизација (*POL*), како и структурата на системот и неговите евалуирани физичко-хемиски и биофармацевтски карактеристики.

Врз основа на сите погоре наведени заклучоци од оваа докторска дисертација, може да се потврди антиконвулзивната активност на лиофилизиран сув екстракт добиен од цела херба на растението *Cannabis sativa* (каде *CBD* е присутен како доминантен канабиноид) и неговата успешна *in vitro* и *in vivo* испорака при негово енкапсулирање во липидните наносистеми (нанолипозоми и наноструктурирани липидни носачи). Во насока на понатамошни истражувања, особено би биле значајни дополнителни *in vivo* студии со цел подобро да се разбере и разјасни како различните физичко-хемиски и биофармацевтски карактеристики на липидните наносистеми придонесуваат во менаџирањето на различните видови на епилептични напади.

7. Литература

Abstiens, K., Maslanka Figueroa, S., Gregoritz, M., Goepferich, A.M., 2019. Interaction of functionalized nanoparticles with serum proteins and its impact on colloidal stability and cargo leaching. *Soft Matter* 15, 709–720. <https://doi.org/10.1039/c8sm02189a>

Adams, G.P., Schier, R., McCall, A.M., Simmons, H.H., Horak, E.M., Alpaugh, R.K., Marks, J.D., Weiner, L.M., 2001. High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules. *CanCER Res.* 61, 4750–4755.

Ahmad, N., Ahmad, R., Alrasheed, R.A., Almatar, H.M.A., Al-Ramadan, A.S., Amir, M., Sarafroz, M., 2020. Quantification and Evaluations of Catechin Hydrate Polymeric Nanoparticles Used in Brain Targeting for the Treatment of Epilepsy. *Pharmaceutics* 12, 203. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030203>

Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., Nejati-Koshki, K., 2013. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res. Lett.* 8, 102. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>

Akinc, A., Battaglia, G., 2013. Exploiting Endocytosis for Nanomedicines. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a016980. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016980>

Alayoubi, A., Alqahtani, S., Kaddoumi, A., Nazzal, S., 2013. Effect of PEG Surface Conformation on Anticancer Activity and Blood Circulation of Nanoemulsions Loaded with Tocotrienol-Rich Fraction of Palm Oil. *AAPS J.* 15, 1168–1179. <https://doi.org/10.1208/s12248-013-9525-z>

Alves, P., Amaral, C., Teixeira, N., Correia-da-Silva, G., 2020. Cannabis sativa: Much more beyond Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Pharmacol. Res.* 157, 104822. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104822>

Anderson, L.L., Low, I.K., Banister, S.D., McGregor, I.S., Arnold, J.C., 2019. Pharmacokinetics of Phytocannabinoid Acids and Anticonvulsant Effect of Cannabidiolic Acid in a Mouse Model of Dravet Syndrome. *J. Nat. Prod.* 82, 3047–3055. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00600>

Angelova, V.T., Rangelov, M., Todorova, N., Dangalov, M., Andreeva-Gateva, P., Kondeva-Burdina, M., Karabeliov, V., Shivachev, B., Tchekalarova, J., 2019. Discovery of novel indole-based aroylhydrazones as anticonvulsants: Pharmacophore-based design. *Bioorganic Chem.* 90, 103028. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103028>

Begley, D.J., 2004. Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacol. Ther.* 104, 29–45. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.08.001>

Beltrán-Gracia, E., López-Camacho, A., Higuera-Ciapara, I., Velázquez-Fernández, J.B., Vallejo-Cardona, A.A., 2019. Nanomedicine review: clinical developments in liposomal applications. *Cancer Nanotechnol.* 10, 11. <https://doi.org/10.1186/s12645-019-0055-y>

Ben Amar, M., 2006. Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *J. Ethnopharmacol.* 105, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.02.001>

Benson, B.A., VerCELLotti, G.M., Dalmaso, A.P., 2015. IL-4 and IL-13 induce protection from complement and melittin in endothelial cells despite initial loss of cytoplasmic proteins:

Membrane resealing impairs quantifying cytotoxicity with the lactate dehydrogenase permeability assay. *Xenotransplantation* 22, 295–301. <https://doi.org/10.1111/xen.12172>

Bergamaschi, M.M., Queiroz, R.H.C., Chagas, M.H.N., de Oliveira, D.C.G., De Martinis, B.S., Kapczinski, F., Quevedo, J., Roesler, R., Schröder, N., Nardi, A.E., Martín-Santos, R., Hallak, J.E.C., Zuardi, A.W., Crippa, J.A.S., 2011. Cannabidiol ReduCEs the Anxiety Induced by Simulated Public Speaking in Treatment-Naïve Social Phobia Patients. *Neuropsychopharmacology* 36, 1219–1226. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.6>

Bozzuto, G., Molinari, A., 2015. Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomedicine* 10, 975–999. <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>

Brenneisen, R., 2007. Chemistry and Analysis of Phytocannabinoids and Other Cannabis Constituents, in: ElSohly, M.A. (Ed.), *Marijuana and the Cannabinoids, Forensic Science And Medicine*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 17–49. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-947-9_2

Bros, M., Nuhn, L., Simon, J., Moll, L., Mailänder, V., Landfester, K., Grabbe, S., 2018. The Protein Corona as a Confounding Variable of Nanoparticle-Mediated Targeted Vaccine Delivery. *Front. Immunol.* 9.

Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N., Khan, W., 2017. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics* 9, 12. <https://doi.org/10.3390/pharmaCEutics9020012>

Chan, F.K.-M., Moriwaki, K., De Rosa, M.J., 2013. Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 979, 65–70. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-290-2_7

Chenthamara, D., Subramaniam, S., Ramakrishnan, S.G., Krishnaswamy, S., Essa, M.M., Lin, F.-H., Qoronfleh, M.W., 2019. Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration. *Biomater. Res.* 23, 20. <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0166-x>

Couet, J., Belanger, M.M., Roussel, E., Drolet, M.C., 2001. Cell biology of caveolae and caveolin. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 49, 223–235. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00139-9](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00139-9)

Dauchy, S., Miller, F., Couraud, P.-O., Weaver, R.J., Weksler, B., Romero, I.-A., Scherrmann, J.-M., De Waziers, I., Declèves, X., 2009. Expression and transcriptional regulation of ABC transporters and cytochromes P450 in hCMEC/D3 human cerebral microvascular endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* 77, 897–909. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.11.001>

de Lange, E.C.M., 2012. The physiological characteristics and transcytosis mechanisms of the blood-brain barrier (BBB). *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13, 2319–2327. <https://doi.org/10.2174/138920112803341860>

Di, J., Gao, X., Du, Y., Zhang, H., Gao, J., Zheng, A., 2021. Size, shape, charge and “stealthy” surface: Carrier properties affect the drug circulation time in vivo. *Asian J. Pharm. Sci.* 16, 444–458. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2020.07.005>

Dimchevska, S., Geskovski, N., Koliqi, R., Matevska-Geskovska, N., Gomez Vallejo, V., Szczupak, B., Sebastian, E.S., Llop, J., Hristov, D.R., Monopoli, M.P., Petruševski, G., Ugarkovic, S., Dimovski, A., Goracinova, K., 2017. Efficacy assessment of self-assembled PLGA-PEG-PLGA nanoparticles:

Correlation of nano-bio interface interactions, biodistribution, internalization and gene expression studies. *Int. J. Pharm.* 533, 389–401. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.054>

Doherty, G.J., McMahon, H.T., 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 857–902. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>

Elmowafy, M., Al-Sanea, M.M., 2021. Nanostructured lipid carriers (NLCs) as drug delivery platform: Advances in formulation and delivery strategies. *Saudi Pharm. J.* 29, 999–1012. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2021.07.015>

El-Sayed, A., Harashima, H., 2013. Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 21, 1118–1130. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.54>

Fernández-Ruiz, J., 2009. The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction. *Br. J. Pharmacol.* 156, 1029–1040. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2008.00088.x>

Fischedick, J.T., Hazekamp, A., Erkelens, T., Choi, Y.H., Verpoorte, R., 2010. Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry* 71, 2058–2073. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.10.001>

Formato, M., CresCEnte, G., Scognamiglio, M., Fiorentino, A., Pecoraro, M.T., Piccolella, S., Catauro, M., Pacifico, S., 2020. (–)-Cannabidiolic Acid, a Still Overlooked Bioactive Compound: An Introductory Review and Preliminary Research. *Molecules* 25, 2638. <https://doi.org/10.3390/molecules25112638>

Faroozandeh, P., Aziz, A.A., 2018. Insight into cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* 13, 339. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2728-6>

Gaspar, D.P., Faria, V., Gonçalves, L.M.D., Taboada, P., Remuñán-López, C., Almeida, A.J., 2016. Rifabutin-loaded solid lipid nanoparticles for inhaled antitubercular therapy: Physicochemical and in vitro studies. *Int. J. Pharm.* 497, 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.11.050>

Gaston, T.E., Friedman, D., 2017. Pharmacology of cannabinoids in the treatment of epilepsy. *Epilepsy Behav.* EB 70, 313–318. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.11.016>

Göppert, T.M., Müller, R.H., 2005. Protein adsorption patterns on poloxamer- and poloxamine-stabilized solid lipid nanoparticles (SLN). *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* 60, 361–372. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.02.006>

Grainger, A.I., King, M.C., Nagel, D.A., Parri, H.R., Coleman, M.D., Hill, E.J., 2018. In vitro Models for Seizure-Liability Testing Using Induced Pluripotent Stem cells. *Front. Neurosci.* 12.

Gromnicova, R., Davies, H.A., Sreekanthreddy, P., Romero, I.A., Lund, T., Roitt, I.M., Phillips, J.B., Male, D.K., 2013. Glucose-Coated Gold Nanoparticles Transfer across Human Brain Endothelium and Enter Astrocytes In Vitro. *PLOS ONE* 8, e81043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081043>

Grotenhermen, F., 2003. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids. *Clin. Pharmacokinet.* 42, 327–360. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342040-00003>

- Hadjidemetriou, M., Kostarelos, K., 2017. Evolution of the nanoparticle corona. *Nanotechnol.* 12, 288–290. <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.61>
- Hanuš, L.O., Hod, Y., 2020. Terpenes/Terpenoids in Cannabis: Are They Important? *Med. Cannabis Cannabinoids* 3, 25–60. <https://doi.org/10.1159/000509733>
- Haque, S., Md, S., Alam, M.I., Sahni, J.K., Ali, J., Baboota, S., 2012. Nanostructure-based drug delivery systems for brain targeting. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 38, 387–411. <https://doi.org/10.3109/03639045.2011.608191>
- Harris, J.R., Milton, N.G.N., 2010. Cholesterol in Alzheimer's disease and other amyloidogenic disorders. *Subcell. Biochem.* 51, 47–75. https://doi.org/10.1007/978-90-481-8622-8_2
- Hillig, K.W., Mahlberg, P.G., 2004. A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in Cannabis (Cannabaceae). *Am. J. Bot.* 91, 966–975. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.6.966>
- Hofmann, M.E., Frazier, C.J., 2013. Marijuana, endocannabinoids, and epilepsy: Potential and challenges for improved therapeutic intervention. *Exp. Neurol.*, Special Issue: Epilepsy 244, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.11.047>
- Huang, J., Lu, Y., Wang, H., Liu, J., Liao, M., Hong, L., Tao, R., Ahmed, M.M., Liu, P., Liu, S., Fukunaga, K., Du, Y., Han, F., 2013. The effect of lipid nanoparticle PEGylation on neuroinflammatory response in mouse brain. *Biomaterials* 34, 7960–7970. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.009>
- Ivanov, A.I., 2008. Exocytosis and Endocytosis. Humana Totowa, NJ.
- Jenkins, S.I., Weinberg, D., Al-Shakli, A.F., Fernandes, A.R., Yiu, H.H.P., Telling, N.D., Roach, P., Chari, D.M., 2016. “Stealth” nanoparticles evade neural immune cells but also evade major brain cell populations: Implications for PEG-based neurotherapeutics. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 224, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.013>
- Jones, N.A., Hill, A.J., Smith, I., Bevan, S.A., Williams, C.M., Whalley, B.J., Stephens, G.J., 2010. Cannabidiol displays antiepileptiform and antiseizure properties in vitro and in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 332, 569–577. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.159145>
- Kovalevich, J., Langford, D., 2013. Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma cells in Neurobiology. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1078, 9. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5_2
- Krall, R.L., Penry, J.K., Kupferberg, H.J., Swinyard, E.A., 1978. Antiepileptic Drug Development: I. History and a Program for Progress. *Epilepsia* 19, 393–407. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1978.tb04506.x>
- Lachenmeier, D.W., Rehm, J., 2015. Comparative risk assessment of alcohol, tobacco, cannabis and other illicit drugs using the margin of exposure approach. *Sci. Rep.* 5, 8126. <https://doi.org/10.1038/srep08126>
- Lakhan, S.E., Rowland, M., 2009. Whole plant cannabis extracts in the treatment of spasticity in multiple sclerosis: a systematic review. *BMC Neurol.* 9, 59. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-9-59>

- Lattanzi, S., 2022. New evidence in adjunctive treatment of focal-onset seizures in adults: a critical appraisal. *Glob. Reg. Health Technol. Assess.* 9, 14–19. <https://doi.org/10.33393/grhta.2022.2420>
- Lee, S., Ashizawa, A.T., Kim, K.S., Falk, D.J., Notterpek, L., 2013. Liposomes to target peripheral neurons and Schwann cells. *PLoS One* 8, e78724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078724>
- Li, Y., Wang, J., Gao, Y., Zhu, J., Wientjes, M.G., Au, J.L.-S., 2011. Relationships between Liposome Properties, cell Membrane Binding, Intracellular Processing, and Intracellular Bioavailability. *AAPS J.* 13, 585–597. <https://doi.org/10.1208/s12248-011-9298-1>
- Liu, Y., Tan, J., Thomas, A., Ou-Yang, D., Muzykantov, V.R., 2012. The shape of things to come: importance of design in nanotechnology for drug delivery. *Ther. Deliv.* 3, 181–194.
- Lombardo, S.M., Schneider, M., Türeli, A.E., Türeli, N.G., 2020. Key for crossing the BBB with nanoparticles: the rational design. *Beilstein J. Nanotechnol.* 11, 866–883. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.72>
- Lucas, C.J., Galettis, P., Schneider, J., 2018. The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 84, 2477–2482. <https://doi.org/10.1111/bcp.13710>
- Mannucci, S., Boschi, F., Cisterna, B., Esposito, E., Cortesi, R., Nastruzzi, C., Cappellozza, E., Bernardi, P., Sbarbati, A., Malatesta, M., Calderan, L., 2020. <p>A Correlative Imaging Study of in vivo and ex vivo Biodistribution of Solid Lipid Nanoparticles</p>. *Int. J. Nanomedicine* 15, 1745–1758. <https://doi.org/10.2147/IJN.S236968>
- Mante, P.K., Adomako, N.O., Antwi, P., Kusi-Boadum, N.K., Osafo, N., 2021. Solid-lipid nanoparticle formulation improves antiseizure action of cryptolepine. *Biomed. Pharmacother.* 137, 111354. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111354>
- Markoutsas, E., Pampalakis, G., Niarakis, A., Romero, I.A., Weksler, B., Couraud, P.-O., Antimisiaris, S.G., 2011. Uptake and permeability studies of BBB-targeting immunoliposomes using the hCMEC/D3 cell line. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV 77*, 265–274. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.11.015>
- Markova, E., Taneska, L., Kostovska, M., Shalabalija, D., Mihailova, L., Glavas Dodov, M., Makreski, P., Geskovski, N., Petrushevska, M., N. Taravari, A., Simonoska Crcarevska, M., 2022. Design and evaluation of nanostructured lipid carriers loaded with *Salvia officinalis* extract for Alzheimer’s disease treatment. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 110, 1368–1390. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.35006>
- McMahon, H.T., Boucrot, E., 2011. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 517–533. <https://doi.org/10.1038/nrm3151>
- Mihailova, L., Tchekalarova, J., Shalabalija, D., Geskovski, N., Stoilkovska Gjorgievska, V., Stefkov, G., Krasteva, P., Simonoska Crcarevska, M., Glavas Dodov, M., 2022. Lipid nano-carriers loaded with *Cannabis sativa* extract for epilepsy treatment - in vitro characterization and in vivo efficacy studies. *J. Pharm. Sci.* S0022-3549(22)00417–8. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.09.012>

- Mircioiu, C., Voicu, V., Anuta, V., Tudose, A., CElia, C., Paolino, D., Fresta, M., Sandulovici, R., Mircioiu, I., 2019. Mathematical Modeling of Release Kinetics from Supramolecular Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics* 11, E140. <https://doi.org/10.3390/pharmaCEutics11030140>
- Moura, S., Noro, J., CErqueira, P., Silva, C., Cavaco-Paulo, A., Loureiro, A., 2020. poloxamer 407 based-nanoparticles for controlled release of methotrexate. *Int. J. Pharm.* 575, 118924. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118924>
- Mula, M., 2016. Third generation antiepileptic drug monotherapies in adults with epilepsy. *Expert Rev. Neurother.* 16, 1087–1092. <https://doi.org/10.1080/14737175.2016.1195264>
- Mullis, A.S., Schlichtmann, B.W., Narasimhan, B., Cademartiri, R., Mallapragada, S.K., 2018. Ligand-cascading nano-delivery devices to enable multiscale targeting of anti-neurodegenerative therapeutics. *Biomed. Mater. Bristol Engl.* 13, 034102. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aaa778>
- Musumeci, T., Serapide, M.F., Pellitteri, R., Dalpiaz, A., Ferraro, L., Dal Magro, R., Bonaccorso, A., Carbone, C., Veiga, F., Sancini, G., Puglisi, G., 2018. Oxcarbazepine free or loaded PLGA nanoparticles as effective intranasal approach to control epileptic seizures in rodents. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 133, 309–320. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.11.002>
- Nair, R., Kumar, A.C.K., Priya, V.K., Yadav, C.M., Raju, P.Y., 2012. Formulation and evaluation of chitosan solid lipid nanoparticles of carbamazepine. *Lipids Health Dis.* 11, 72. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-72>
- Németh, Z., Csóka, I., Semnani Jazani, R., Sipos, B., Haspel, H., Kozma, G., Kónya, Z., Dobó, D.G., 2022. Quality by Design-Driven Zeta Potential Optimisation Study of Liposomes with Charge Imparting Membrane Additives. *Pharmaceutics* 14, 1798. <https://doi.org/10.3390/pharmaCEutics14091798>
- Neves, A.R., Queiroz, J.F., Lima, S.A.C., Reis, S., 2017. Apo E-Functionalization of Solid Lipid Nanoparticles Enhances Brain Drug Delivery: Uptake Mechanism and Transport Pathways. *Bioconj. Chem.* 28, 995–1004. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00705>
- Nie, S., Hsiao, W.L.W., Pan, W., Yang, Z., 2011. Thermoreversible Pluronic F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: in vitro drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies. *Int. J. Nanomedicine* 6, 151–166. <https://doi.org/10.2147/IJN.S15057>
- Ottenbrite, R.M., Javan, R., 2005. Biological Structures, in: Bassani, F., Liedl, G.L., Wyder, P. (Eds.), *Encyclopedia of Condensed Matter Physics*. Elsevier, Oxford, pp. 99–108. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369401-9/00698-7>
- Paolino, D., Tudose, A., CElia, C., Di Marzio, L., Cilurzo, F., Mircioiu, C., 2019. Mathematical Models as Tools to Predict the Release Kinetic of Fluorescein from Lyotropic Colloidal Liquid Crystals. *Materials* 12, 693. <https://doi.org/10.3390/ma12050693>
- Patil, S., Sandberg, A., Heckert, E., Self, W., Seal, S., 2007. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials* 28, 4600–4607. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.029>

Pelaz, B., del Pino, P., Maffre, P., Hartmann, R., Gallego, M., Rivera-Fernández, S., de la Fuente, J.M., Nienhaus, G.U., Parak, W.J., 2015. Surface Functionalization of Nanoparticles with polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and cellular Uptake. *ACS Nano* 9, 6996–7008. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b01326>

Pellati, F., Borgonetti, V., Brighenti, V., Biagi, M., Benvenuti, S., Corsi, L., 2018. Cannabis sativa L. and Nonpsychoactive Cannabinoids: Their Chemistry and Role against Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer. *BioMed Res. Int.* 2018, 1691428. <https://doi.org/10.1155/2018/1691428>

Perucca, E., 2017. Cannabinoids in the Treatment of Epilepsy: Hard Evidence at Last? *J. Epilepsy Res.* 7, 61–76. <https://doi.org/10.14581/jer.17012>

Rai, Y., Pathak, R., Kumari, N., Sah, D.K., Pandey, S., Kalra, N., Soni, R., Dwarakanath, B.S., Bhatt, A.N., 2018. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Sci. Rep.* 8, 1531. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19930-w>

Rang, H., Ritter, J., Flower, R., Henderson, G., Kong Loke, Y., MaCEwan, D., 2018. Rang and Dale's Pharmacology, 9th ed. Elsevier 2019, London.

Rohleder, C., Müller, J.K., Lange, B., Leweke, F.M., 2016. Cannabidiol as a Potential New Type of an Antipsychotic. A Critical Review of the Evidence. *Front. Pharmacol.* 7.

Russo, E.B., 2018. Cannabis Therapeutics and the Future of Neurology. *Front. Integr. Neurosci.* 12, 51. <https://doi.org/10.3389/fnint.2018.00051>

Sachs, J., McGlade, E., Yurgelun-Todd, D., 2015. Safety and Toxicology of Cannabinoids. *Neurotherapeutics* 12, 735–746. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0380-8>

Sahoo, A., Marar, T., 2018. Phytochemical Analysis, Antioxidant Assay and Antimicrobial Activity in Leaf Extracts of *Cerbera odollam* Gaertn [WWW Document]. URL <http://fulltxt.org/article/480> (acCEssed 10.31.22).

Sandhya, S., Vinod, K., Sravan Kumar, 2010. Herbs Used for Brain Disorders. *Hygeia. J. D. Med.* 2, 38–45.

Saraiva, C., Praça, C., Ferreira, R., Santos, T., Ferreira, L., Bernardino, L., 2016. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 235, 34–47. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.044>

Scioli-Montoto, S., Sbaraglini, M.L., Cisneros, J.S., Chain, C.Y., Ferretti, V., León, I.E., Alvarez, V.A., Castro, G.R., Islan, G.A., Talevi, A., Ruiz, M.E., 2022. Novel Phenobarbital-Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Epilepsy Treatment: From QbD to In Vivo Evaluation. *Front. Chem.* 10.

Scuderi, C., Filippis, D.D., Iuvone, T., Blasio, A., Steardo, A., Esposito, G., 2009. Cannabidiol in medicine: a review of its therapeutic potential in CNS disorders. *Phytother. Res. PTR* 23, 597–602. <https://doi.org/10.1002/ptr.2625>

Shalabalija, D., Mihailova, L., Crcarevska, M.S., Karanfilova, I.C., Ivanovski, V., Nestorovska, A.K., Novotni, G., Dodov, M.G., 2021. Formulation and optimization of bioinspired rosemary extract

loaded PEGylated nanoliposomes for potential treatment of Alzheimer's disease using design of experiments. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 63, 102434. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102434>

Shang, W., Zhang, X., Zhang, M., Fan, Z., Sun, Y., Han, M., Fan, L., 2014. The uptake mechanism and biocompatibility of graphene quantum dots with human neural stem cells. *Nanoscale* 6, 5799–5806. <https://doi.org/10.1039/c3nr06433f>

Sharma, A., Sharma, U.S., 1997. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *Int. J. Pharm.* 154, 123–140. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(97\)00135-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00135-X)

Shubhra, Q.T.H., Tóth, J., Gyenis, J., Feczko, T., 2014. Surface modification of HSA containing magnetic PLGA nanoparticles by poloxamer to decrease plasma protein adsorption. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 122, 529–536. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.07.025>

Silva, S., Marto, J., Gonçalves, L., Almeida, A.J., Vale, N., 2020. Formulation, Characterization and Evaluation against SH-SY5Y Cells of New Tacrine and Tacrine-MAP Loaded with Lipid Nanoparticles. *Nanomater. Basel Switz.* 10, E2089. <https://doi.org/10.3390/nano10102089>

Simonoska Crcarevska, M., Geskovski, N., Calis, S., Dimchevska, S., Kuzmanovska, S., Petruševski, G., Kajžanoska, M., Ugarkovic, S., Goracinova, K., 2013. Definition of formulation design space, in vitro bioactivity and in vivo biodistribution for hydrophilic drug loaded PLGA/PEO-PPO-PEO nanoparticles using OFAT experiments. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 49, 65–80. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.02.004>

Singh, A.P., Saraf, S.K., Saraf, S.A., 2012. SLN approach for nose-to-brain delivery of alprazolam. *Drug Deliv. Transl. Res.* 2, 498–507. <https://doi.org/10.1007/s13346-012-0110-2>

Singh, S., Gupta, B., 2016. Size-controlled preparation of nanosoy for potential biomedical applications. *Polym. Int.* 65, 1373–1381. <https://doi.org/10.1002/pi.5254>

Smith, B.H., Gazda, L.S., Conn, B.L., Jain, K., Asina, S., Levine, D.M., Parker, T.S., Laramore, M.A., Martis, P.C., Vinerean, H.V., David, E.M., Qiu, S., Cordon-Cardo, C., Hall, R.D., Gordon, B.R., Diehl, C.H., Stenzel, K.H., Rubin, A.L., 2011. Three-dimensional culture of mouse renal carcinoma cells in agarose macrobeads selects for a subpopulation of cells with cancer stem cell or cancer progenitor properties. *Cancer Res.* 71, 716–724. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2254>

Stolnik, S., Daudali, B., Arien, A., Whetstone, J., Heald, C.R., Garnett, M.C., Davis, S.S., Illum, L., 2001. The effect of surface coverage and conformation of poly(ethylene oxide) (PEO) chains of poloxamer 407 on the biological fate of model colloidal drug carriers. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1514, 261–279. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(01\)00376-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(01)00376-5)

Strachan, J.B., Dyett, B.P., Nasa, Z., Valery, C., Conn, C.E., 2020. Toxicity and Cellular uptake of lipid nanoparticles of different structure and composition. *J. Colloid Interface Sci.* 576, 241–251. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.05.002>

Strother, L., Miles, G.B., Holiday, A.R., Cheng, Y., Doherty, G.H., 2021. Long-term culture of SH-SY5Y neuroblastoma cells in the absence of neurotrophins: A novel model of neuronal ageing. *J. Neurosci. Methods* 362, 109301. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2021.109301>

Tahir, M.N., Shahbazi, F., Rondeau-Gagné, S., Trant, J.F., 2021. The biosynthesis of the cannabinoids. *J. Cannabis Res.* 3, 7. <https://doi.org/10.1186/s42238-021-00062-4>

Tekie, F.S.M., Hajiramezanali, M., Geramifar, P., Raoufi, M., Dinarvand, R., Soleimani, M., Atyabi, F., 2020. Controlling evolution of protein corona: a prosperous approach to improve chitosan-based nanoparticle biodistribution and half-life. *Sci. Rep.* 10, 9664. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66572-y>

Téllez-Zenteno, J.F., Ladino, L.D., Hernández-Ronquillo, L., 2020. The Use of Cannabis as a Treatment for Epilepsy in Adult Patients: Are Side Effects a Limitation of Use? *J. Clin. Neurophysiol. Off. Publ. Am. Electroencephalogr. Soc.* 37, 9–14. <https://doi.org/10.1097/WNP.0000000000000637>

Thompson, G.R., Fleischman, R.W., Rosenkrantz, H., Braude, M.C., 1974. Oral and intravenous toxicity of delta9-tetrahydrocannabinol in rhesus monkeys. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 27, 648–665. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(74\)90044-1](https://doi.org/10.1016/0041-008x(74)90044-1)

Thompson, G.R., Rosenkrantz, H., Schaeppi, U.H., Braude, M.C., 1973. Comparison of acute oral toxicity of cannabinoids in rats, dogs and monkeys. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 25, 363–372. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(73\)90310-4](https://doi.org/10.1016/0041-008x(73)90310-4)

Todorov, P., Peneva, P., Tchekalarova, J., Georgieva, S., 2020. Potential anticonvulsant activity of novel VV-hemorphin-7 analogues containing unnatural amino acids: synthesis and characterization. *Amino Acids* 52, 567–585. <https://doi.org/10.1007/s00726-020-02836-1>

Torchilin, V.P., Levchenko, T.S., Rammohan, R., Volodina, N., Papahadjopoulos-Sternberg, B., D'Souza, G.G.M., 2003. Cell transfection in vitro and in vivo with nontoxic TAT peptide-liposome-DNA complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1972–1977. <https://doi.org/10.1073/pnas.0435906100>

Tuma, P.L., Hubbard, A.L., 2003. Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol. Rev.* 83, 871–932. <https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2003>

Vanhoenacker, G., Van Rompaey, P., De Keukeleire, D., Sandra, P., 2002. Chemotaxonomic features associated with flavonoids of cannabinoid-free cannabis (*Cannabis sativa* subsp. *sativa* L.) in relation to hops (*Humulus lupulus* L.). *Nat. Prod. Lett.* 16, 57–63. <https://doi.org/10.1080/1057563029001/4863>

Vu, K., Weksler, B., Romero, I., Couraud, P.-O., Gelli, A., 2009. Immortalized Human Brain Endothelial cell Line HCMEC/D3 as a Model of the Blood-Brain Barrier Facilitates In Vitro Studies of Central Nervous System Infection by *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 8, 1803–1807. <https://doi.org/10.1128/EC.00240-09>

Wang, J., Wang, W., 2014. Significance of physicochemical and uptake kinetics in controlling the toxicity of metallic nanomaterials to aquatic organisms. *J. Zhejiang Univ. Sci. A* 15, 573–592. <https://doi.org/10.1631/jzus.A1400109>

Wang, S., Allen, N., Vickers, T.A., Revenko, A.S., Sun, H., Liang, X.-H., Crooke, S.T., 2018. Cellular uptake mediated by epidermal growth factor receptor facilitates the intracellular activity of phosphorothioate-modified antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 46, 3579–3594. <https://doi.org/10.1093/nar/gky145>

- Wang, Wenhao, Huang, Z., Li, Y., Wang, Wenhua, Shi, J., Fu, F., Huang, Y., Pan, X., Wu, C., 2021. Impact of particle size and pH on protein corona formation of solid lipid nanoparticles: A proof-of-concept study. *Acta Pharm. Sin. B* 11, 1030–1046. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.10.023>
- Weksler, B., Romero, I.A., Couraud, P.-O., 2013. The hCMEC/ Cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids Barriers CNS* 10, 16. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-10-16>
- Wu, M., Guo, H., Liu, L., Liu, Y., Xie, L., 2019. Size-dependent cellular uptake and localization profiles of silver nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* 14, 4247–4259. <https://doi.org/10.2147/IJN.S201107>
- Yu, Y., Luan, Y., Dai, W., 2022. Dynamic process, mechanisms, influencing factors and study methods of protein corona formation. *Int. J. Biol. Macromol.* 205, 731–739. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.105>
- Zeeshan, M., Mukhtar, M., Ul Ain, Q., Khan, S., Ali, H., 2020. Nanopharmaceuticals: A Boon to the Brain-Targeted Drug Delivery, in: *Pharmaceutical Formulation Design - Recent Practices*. IntechOpen, London, p. 164.
- Zhang, Z., Guan, J., Jiang, Z., Yang, Y., Liu, J., Hua, W., Mao, Y., Li, C., Lu, W., Qian, J., Zhan, C., 2019. Brain-targeted drug delivery by manipulating protein corona functions. *Nat. Commun.* 10, 3561. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11593-z>
- Zybina, A., Anshakova, A., Malinovskaya, J., Melnikov, P., Baklaushev, V., Chekhonin, V., Maksimenko, O., Titov, S., Balabanyan, V., Kreuter, J., Gelperina, S., Abbasova, K., 2018. Nanoparticle-based delivery of carbamazepine: A promising approach for the treatment of refractory epilepsy. *Int. J. Pharm.* 547, 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.05.023>

Прилог 1

Мислења по доставено авторезиме од
докторска дисертација



David Geffen
School of Medicine

Department of Medicine
Division of Endocrinology, Diabetes & Hypertension
Larry L. Hillblom Islet Research Center

10833 Le Conte Avenue
Los Angeles, CA 90095-7073
Tel: (310) 794-7645
Fax: (310) 206-5368

January 20th, 2023, Los Angeles, CA, USA

SUBJECT: External review of the doctoral dissertation submitted by the candidate Ljubica Mihailova at Faculty of Pharmacy, University SS. Cyril and Methodius, Skopje entitled:

"DESIGN, FORMULATION, CHARACTERIZATION AND IN VIVO EFFICACY STUDIES OF LIPID NANOSYSTEMS LOADED WITH CANNABIS SATIVA EXTRACT FOR POTENTIAL TREATMENT OF EPILEPSY".

According to the document N^o: 03-43/1 dated on 10.01.2023, signed by the Dean of the Faculty of Pharmacy, Prof. Dr. Zoran Sterjev, University SS. Cyril and Methodius, Skopje and obtained documentation, I am submitting the following:

EXTERNAL REVIEW

of the doctoral dissertation submitted by the candidate:

Ljubica Mihailova

at: Faculty of Pharmacy, University SS. Cyril and Methodius, Skopje

entitled: ""DESIGN, FORMULATION, CHARACTERIZATION AND IN VIVO EFFICACY STUDIES OF LIPID NANOSYSTEMS LOADED WITH CANNABIS SATIVA EXTRACT FOR POTENTIAL TREATMENT OF EPILEPSY".



David Geffen
School of Medicine

Department of Medicine
Division of Endocrinology, Diabetes & Hypertension
Larry L. Hillblom Islet Research Center

10833 Le Conte Avenue
Los Angeles, CA 90095-7073
Tel: (310) 794-7645
Fax: (310) 206-5368

I. PRESENTATION

Epilepsy is a serious neurological disorder that affects around 50 million people worldwide. Almost 30% of epileptic patients suffer from pharmaco-resistance, which is associated with social isolation and reduced quality of life. Currently available antiepileptic drugs have a limited efficacy, and their negative properties limit their use and cause difficulties in patient management. Antiepileptic drugs can provide only symptomatic relief as these drugs suppress seizures but do not have ability to cure epileptogenesis. Their long-term use is limited due to their adverse effects, withdrawal symptoms, deleterious interactions with other drugs and economic burden. Several *in vivo* and *in vitro* animal models have been proposed resulting in new antiepileptic drugs being marketed recently, however without bypassing limitations, leaving still a large number of patients pharmaco-resistant.

C. sativa has emerged as a medicinal plant with potential neuroprotective effect. As second most abundant phytocannabinoid and due to its ability to modify several molecular targets (including some brain receptors), cannabidiol (CBD) has gained attention due to its attractive therapeutic potential to treat some brain degenerative diseases including epilepsy. Most encouraging robust safety and low toxicity profiles of CBD have been reflected in the ongoing clinical trials for rheumatoid arthritis (NCT04911127) but also for COVID-19 (NCT04686539, NCT04467918) and post-COVID syndrome (Long-COVID, NCT04997395) (ClinicalTrials.gov).

Interestingly, the cannabidiolic acid (CBDA), which is the natural precursor of cannabidiol (CBD), possesses serotonin activity and up to 100 times greater affinity for the 5-HT_{1A} receptor compared to CBD but its utility has been compromised by poor bioavailability and low BBB penetration. Lipid nanosystems represent unique formulations that may overcome the pharmacodynamic- and challenges to deliver CBDA or *C. sativa* extracts across the BBB enabling these active agents to modify aberrant neuronal activities linked to epilepsy.

The main aim of this research was to assess the role of the physico-chemical properties and surface area of nanoliposomes and nanostructured lipid carriers in their suitability to deliver the cannabinoids or cannabinoid acids (CBD/CBDA) cargo over the brain blood barrier (BBB). *In vitro* comparison was established based on the heterospecific tissue interactions represented by human cerebral microvessel endothelial cell line (hCMEC/D3) as a model for BBB and human neuroblastoma clonal cell line (SH-SY5Y) as a proxy model to neuronal cells. The major objective of the study was to assess the ability and efficiency of the nanoliposomes and nanostructured lipid CBD/CBDA (extracts') carriers in the crossing of the BBB and targeting the CBD/CBDA delivery for the neuronal internalization. In addition to *in vitro* heterospecific tissue modeling of BBB and neuronal culture, the potential therapeutic efficacy was leveraged using *in vivo* IRC mouse model of epilepsy and a battery of functional seizure tests.



David Geffen
School of Medicine

Department of Medicine
Division of Endocrinology, Diabetes & Hypertension
Larry L. Hillblom Islet Research Center

10833 Le Conte Avenue
Los Angeles, CA 90095-7073
Tel: (310) 794-7645
Fax: (310) 206-5368

The aims of this PhD thesis was structured in 4 well-thought of phases: 1) preparation, characterization and selection of Cannabis sativa extracts, 2) Preparation and characterization of different lipid nanosystems with no Cannabis sativa extract encapsulated, 3) Preparation and characterization of different lipid nanosystems loaded with Cannabis sativa extract and 4): In vivo efficacy studies of the nanosystems loaded with Cannabis sativa extract in a mouse model with electrically or chemically induced seizures.

These studies yielded thoroughly characterized Cannabis sativa extracts (CE) loaded NL and NLCs. CE was previously prepared with predominant CBDA composition and insignificant amount of CBD. All formulations achieved spherical form and smooth surface, with z-average diameter of 105-160 nm, following unimodal particle size distribution, negative zeta potential (~-30 mV) and high CE EE% (>87%) for the loaded samples.

Nanoparticle mean size was stable, possessed prolonged CE release, dependent on the type of the nano-carrier system and the type of stealth polymer based on the Peppas-Sahlin model. All formulations showed statistically significant higher antioxidant capacity compared to CE alone. PEG and POL stealth polymers resulted in lower plasma protein adsorption and showed no cytotoxicity apart from the highest concentration used.

Most importantly this study demonstrated successful internalization of lipid nano-systems in the hCMEC/D3 and SH-SY5Y cell lines supporting their BBB penetrability. More than one uptake mechanism of the nanoparticles may be implicated and will be addressed in the future.

Also, the in vivo studies of the anticonvulsant activity in mice indicated that all nanoformulations significantly elevated the latencies for myoclonic, clonic and tonic seizures with some inter-formulation differences in preventing the seizures.

In conclusion, CBDA as a dominant cannabinoid incorporated into the lipid nanosystems prepared in the lab, was delivered successfully to the brain demonstrating high potency in slowing down the onset of seizures in IRS mouse model and a yet an unlocked potential for expanding to antiepileptogenic effects pending further optimization.

II. CONCLUSION AND OPINION

Based on the obtained resume of the work it is my pleasure to conclude that Ljubica Mihailova has successfully accomplished the objectives and scientific aims of the study: ""DESIGN, FORMULATION, CHARACTERIZATION AND IN VIVO EFFICACY STUDIES OF LIPID NANOSYSTEMS LOADED WITH CANNABIS SATIVA EXTRACT FOR POTENTIAL TREATMENT OF EPILEPSY".



David Geffen
School of Medicine

Department of Medicine
Division of Endocrinology, Diabetes & Hypertension
Larry L. Hillblom Islet Research Center

10833 Le Conte Avenue
Los Angeles, CA 90095-7073
Tel: (310) 794-7645
Fax: (310) 206-5368

Ljubica Mihailova published the results of the thesis topic in five publications (out of which 2 as a first author, all original research papers) and many poster presentations on conferences and as a part of various projects.

General impression of the doctoral dissertation

Presented work and results are innovative and give contribution in the scientific field of nanoparticle drug delivery systems. The work is written in a formal and understandable way. The results represent a solid basis for expanding the work in the future for unlocking the potential of cannabinoid formulations via lipidnanosystems in neuroprotection and intersection with some brain degenerative diseases.

Topic and formulation of the research task

The topic and formulation of the research task are clear and can be easily understood

Introduction

Literature review within introduction is written in understandable manner and gives good overview of the research topic

Materials and methods

Materials and methods clearly explain how the research work was conducted.

Results and discussion



David Geffen
School of Medicine

Department of Medicine
Division of Endocrinology, Diabetes & Hypertension
Larry L. Hillblom Islet Research Center

10833 Le Conte Avenue
Los Angeles, CA 90095-7073
Tel: (310) 794-7645
Fax: (310) 206-5368

Obtained results are well described and evaluated. Their scientific importance and added value are well discussed and explained. The evaluation is objective and reflective of gained expertise.

Summary

The main objective and aims of the research work as well as the outcome and potential use are clearly explained. It represents a well-designed and well controlled study

Organization and presentation

The dissertation is well organized and can be easily understood.

Opinion

Concerning all above aspects, it is my pleasure to express my enthusiasm for the proposed doctoral dissertation of Ljubica Mihailova and recommend the presentation of her doctoral thesis for obtaining a PhD degree.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Slavica Tudzarova'.

Slavica Tudzarova, PhD
University of California Los Angeles
10833 Le Conte Avenue, CHS 33-165
90095 Los Angeles, CA, USA
+1 310 948 1903
studzarova@mednet.ucla.edu



INSTITUTE OF NEUROBIOLOGY
BULGARIAN ACADEMY OF SCIENCES
Director: Assoc. Prof. Katerina Stambolieva, PhD
Acad. G. Bonchev street, bl.23; Sofia 1113
Phone: +359 2 979 21 51
e-mail: office@inb.bas.bg; inb_bas@abv.bg

January 26th, 2023, Sofia, Bulgaria

SUBJECT: External review of the doctoral dissertation submitted by the candidate Ljubica Mihailova at Faculty of Pharmacy, University SS. Cyril and Methodius, Skopje

entitled: "DESIGN, FORMULATION, CHARACTERIZATION AND IN VIVO EFFICACY STUDIES OF LIPID NANOSYSTEMS LOADED WITH CANNABIS SATIVA EXTRACT FOR POTENTIAL TREATMENT OF EPILEPSY".

According to the document N^o: 03-43/4 dated on 10.01.2023, signed by the Dean of the Faculty of Pharmacy, Prof. Dr. Zoran Sterjev, University SS. Cyril and Methodius, Skopje and obtained documentation, I am submitting the following:

EXTERNAL REVIEW

of the doctoral dissertation submitted by the candidate:

Ljubica Mihailova

at: Faculty of Pharmacy, University SS. Cyril and Methodius, Skopje

entitled: ""DESIGN, FORMULATION, CHARACTERIZATION AND IN VIVO EFFICACY STUDIES OF LIPID NANOSYSTEMS LOADED WITH CANNABIS SATIVA EXTRACT FOR POTENTIAL TREATMENT OF EPILEPSY".



INSTITUTE OF NEUROBIOLOGY
BULGARIAN ACADEMY OF SCIENCES
Director: Assoc. Prof. Katerina Stambolieva, PhD
Acad. G. Bonchev street, bl.23; Sofia 1113
Phone: +359 2 979 21 51
e-mail: office@inb.bas.bg; inb_bas@abv.bg

General impression of the candidate of the doctoral dissertation

I have known Ljubica Mihailova for the last three years in the capacity of a collaborator in the framework of our Agreement between Skopje University, Faculty of Pharmacy and Institute of Neurobiology, Bulgarian Academy of Sciences (# 03-138/1, 17.02.2020). As a Coordinator of this Agreement from the site of INB, BAS, Head of the Department of Behavioral Neurobiology in the Institute of Neurobiology I had the chance to work with her on the project related to exploring the anticonvulsant activity of different plant extracts and some nano-carrier systems. I know Ljubica Mihailova professional capabilities and personal traits very well, and I have had the opportunity to follow her continuous progress as a researcher. Lastly, Ljubica Mihailova's professional training, desire for and interest in research work, and consistency in thoroughly finishing every scientific issue she has taken up make me believe that she has laid the foundations of a brilliant scientific career.

Topic and formulation of the research task

The topic is innovative and the preparation of novel, possibly more effective cannabinoid extracts loading in lipid nanocarriers is original. The research topic is of significant clinical importance for studying new therapeutic approaches to treat epilepsy.

Introduction



INSTITUTE OF NEUROBIOLOGY
BULGARIAN ACADEMY OF SCIENCES
Director: Assoc. Prof. Katerina Stambolieva, PhD
Acad. G. Bonchev street, bl.23; Sofia 1113
Phone: +359 2 979 21 51
e-mail: office@inb.bas.bg; inb_bas@abv.bg

The Introduction is of high quality, clearly written, and gives a complete overview of the most critical issues associated with the research topic.

Materials and methods

The experimental design is straightforward. Ljubica Mihailova used appropriate protocols for the preparation of the formulations as well as adequate *in vitro* and *in vivo* methods for their characterization.

Results and discussion

The results and their discussion are clear and adequate. The findings of this Ph.D. thesis give a background for future preparation, characterization, and optimization of potential anticonvulsants and other compounds with neuroprotection and anti-inflammatory activity. My only recommendation is for future studies in this field to include a comparative analysis of *in vivo* data from compounds before and after their insertion into the lipid-nanosystem. This approach would help to elucidate the advantage of lipid-nanosystem for the preparation of potential drugs with anticonvulsant activity.

Conclusion



INSTITUTE OF NEUROBIOLOGY
BULGARIAN ACADEMY OF SCIENCES
Director: Assoc. Prof. Katerina Stambolieva, PhD
Acad. G. Bonchev street, bl.23; Sofia 1113
Phone: +359 2 979 21 51
e-mail: office@inb.bas.bg; inb_bas@abv.bg

In my opinion, Ljubica Mihailova has enough experience and motivation to “open the door” to this new and perspective field of research, and the quality of the supervision is excellent. Therefore, I like to give my strong support and recommendation for her doctoral thesis for obtaining a Ph.D. degree.

Prof. Jana Tchekalarova, PhD
Institute of Neurobiology
Acad G Bonchev Str Bl. 23
Bulgarian Academy of Sciences
Sofia 1113
Bulgaria

UNIVERSITY OF SARAJEVO
FACULTY OF PHARMACY
Department of Pharmaceutical Technology
Prof. dr. Edina Vranić, spec.

SS. CYRIL AND METHODIUS UNIVERSITY IN SKOPJE
FACULTY OF PHARMACY
Council for Science and Education of Faculty of Pharmacy

SUBJECT: External review of the doctoral dissertation submitted by the candidate *Ljubica Mihailova* at Faculty of Pharmacy, Ss. Cyril and Methodius University, Skopje entitled: **“Design, formulation, characterization and *in vivo* efficacy studies of lipid nanosystems loaded with *Cannabis sativa* extract for potential treatment of epilepsy”**

According to the document N°:03-43/3 dated on 10th January, 2023, signed by the Dean of the Faculty of Pharmacy, Ss.Cyril and Methodius University, Skopje, and available documentation, I am submitting the following:

EXTERNAL REVIEW

of the doctoral dissertation submitted by the candidate

Ljubica Mihailova

(In Macedonian language: *Љубица Михаилова*)

at Faculty of Pharmacy, Ss. Cyril and Methodius University Skopje,
entitled:

“Design, formulation, characterization and *in vivo* efficacy studies of lipid nanosystems loaded with *Cannabis sativa* extract for potential treatment of epilepsy”

(In Macedonian language:

“Дизајн, формулација, карактеризација и *in vivo* студии на ефикасност на липидни наносистеми со вграден екстракт од *Cannabis sativa* за потенцијален третман на епилепсија”

I PRESENTATION

As a complex neurological disease, epilepsy is still remaining a major challenge for the development of drugs. Namely, the fact that approximately 30% of patients that receive anticonvulsant therapy still couldn't control their seizures, points out that epilepsy has been a real challenge for modern medicine. Additionally, current available antiepileptic drugs have limited efficacy and many side effects including the behavioral comorbidities that occur in nearly half of the patients.

Several preclinical and clinical studies have been examining the effect of *Cannabis sativa* extracts as potential candidates for the treatment of patients with drug-resistant epilepsy. Namely,

cannabidiol (CBD) and cannabidiolic acid (CBDA) have shown beneficial anticonvulsant effects for clinical applications. But, as molecules with low water solubility, phytocannabinoids and their acids have been characterized by extensive and rapid metabolism and low bioavailability, which contribute to their reduced transport across the blood-brain barrier and correspondingly low concentration into the brain tissue. Therefore, by incorporating *Cannabis sativa* extract into a lipid nano-system, it was expected to improve the distribution and penetration of phytocannabinoids through the blood-brain barrier, as well as enhancing their bioavailability and controlled release into the brain.

Accordingly, the aim of this research was set in direction of *in vitro* physico-chemical and biopharmaceutical characterization and *in vivo* evaluation of nanoliposomes and nanostructured lipid carriers loaded with *Cannabis sativa* extract intended for safe and efficient transport via blood-brain barrier and treatment of epilepsy.

These nanoliposomes and nanostructured lipid formulations were characterized with z-average diameter <200 nm, following unimodal particle size distribution, negative values for Z-potential, high drug encapsulation efficiency and prolonged release during 24h (38.84-60.91 %) based on the Peppas-Sahlin model.

The polymer for stealth stabilization (polyethylene glycol or poloxamer) present onto the particles' surface resulted in lower plasma protein adsorption compared to the formulations without stealth polymer, which contributes to their prolonged circulation time *in vivo*. Prepared formulations showed statistically significant higher antioxidant capacity compared to the extract. All formulations did not show cytotoxicity in the tested concentrations.

Regarding the internalization studies in hCMEC/D3 and SH-SY5Y cell lines, nanoliposomes and nanostructured lipid carriers have been successfully internalized where passive diffusion as well as endocytosis were indicated as possible uptake mechanisms. But due to the complex nature of the nanoparticles' cell uptake where more than one uptake mechanism may be included, additional internalization studies will be addressed in the future.

The results from *in vivo* studies of the anticonvulsant activity demonstrated that all formulations significantly elevated the latencies for myoclonic, clonic and tonic seizures and, therefore, could be used in preventing different types of seizures. A distinction in the potential of the nano-systems was noted, which was anticipated by the type and the characteristics of the prepared formulations.

In conclusion, the incorporation of CBDA-rich *Cannabis sativa* extract into nanoliposomes and nanostructured lipid carriers, led to an increase in the anticonvulsant activity. Moreover, the different *in vivo* behaviour of the prepared lipid nanosystems was observed which shows the potential of these systems in the treatment of different types of epileptic seizures.

II CONCLUSION AND OPINION

Based on the survey of the applied documentation it is my pleasure to conclude that **Ljubica Mihailova** has successfully accomplished the goals she defined at the beginning of her research on **“Design, formulation, characterization and *in vivo* efficacy studies of lipid nanosystems loaded with *Cannabis sativa* extract for potential treatment of epilepsy”**

◇ General impression of the dissertation

The work is innovative and gives contribution to the field. It is written in the formal style, descriptions are clear. It is logic in the ideas proposed.

◇ *Topic and formulation of the research task*

Topic and formulation of the research task are clear.

◇ *Literature review*

The introduction / literature review is clearly written.

◇ *Materials and methods*

It is explained in the Materials and Methods section how this study was conducted.

◇ *Results and Discussion*

The results of this dissertation are meaningful and thus scientifically important. The discussion is well written.

◇ *Summary*

The answers to the questions in this dissertation are clear.

◇ *Organisation and presentation*

This is a well-organized dissertation which can be easily understood.

◇ *Opinion*

For the reasons of the above aspects, it is my pleasure to express my positive opinion about the presented research and doctoral dissertation of *Ljubica Mihailova*, to recommend the presentation of her doctoral thesis and to confirm her qualities for a PhD degree.

Sarajevo, 27th January, 2023.


Prof. dr. sci.
EDINA VRANIĆ
redovni profesor
Farmaceutičke tehnologije.

(Prof. dr. Edina Vranić,
specialist in Pharmaceutical Technology)

Предмет: Мислење по доставено авторезиме на докторска дисертација на кандидатот м-р Љубица Михаилова со наслов: “ДИЗАЈН, ФОРМУЛАЦИЈА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И *IN VIVO* СТУДИИ НА ЕФИКАСНОСТ НА ЛИПИДНИ НАНОСИСТЕМИ СО ВГРАДЕН ЕКСТРАКТ ОД *CANNABIS SATIVA* ЗА ПОТЕНЦИЈАЛЕН ТРЕТМАН НА ЕПИЛЕПСИЈА“.

Од авторезимето на докторската дисертација може да се увиди дека се работи за оригинално научно дело насочено кон истражувања поврзани со примената на современи липидни наносистеми со цел поефикасна испорака на екстракт од *Cannabis sativa* во мозокот, наменет за третман на епилепсија.

Цели на истражувањето

Цели на истражувањето претставуваат дизајн, формулација, карактеризација и *in vivo* студии на ефикасност на липидни наносистеми со вграден екстракт од *Cannabis sativa* за потенцијален третман на епилепсија.

Мошне осмислено и последователно се наведени четирите фази на истражувањето:

1) подготовка, карактеризација и избор на екстракт од *Cannabis sativa* за подготовка на повеќе екстракти, при што со помош на *in vitro* скрининг-тестови за цитотоксичност и биоактивност ќе биде избран оптимален екстракт.

2) Карактеризација на липидни наносистеми преку подготовка на различни формулации на нанолипозоми и наноструктурирани липидни носачи, преку што се испитуваат наносистем-протеин комплексите, нивната цитотоксичност, преземањето и интернализацијата во избрани клеточни култури.

3) Подготовка и карактеризација на липидни наносистеми со енкапсулиран екстракт од *Cannabis sativa*, со цел да биде направена нивна комплетна физичко-хемика и биофармацевтска карактеризација. Дополнително, ќе се следни нивната стабилност во различни медиуми, како и ќе бидат изведени и *in vitro* скрининг-тестови за проценка на биоактивноста на подготвените формулации.

4) Завршни *in vivo* студии на ефикасност на подготвените формулации на наносистеми со вграден екстракт од *Cannabis sativa*, преку следење на нивната антиконвулзивна активност на модел на глувчиња.

Краток опис на резултатите од истражувањето

Докторската дисертација вклучува изработка на дизајн и карактеризација на формулации на липидни наносистеми со вграден екстракт од *Cannabis sativa*. Истата, содржи и компаративна анализа на однесувањето на две од формулациите во избрани клеточни култури, како и евалуација на биоактивноста на подготвените формулации *in vitro* со определување на антиоксидативниот потенцијал и *in vivo* преку следење на антиконвулзивната активност на модел на глувчиња.

Формулациите на липидни наносистеми опфаќаат две формулации на нанолипозоми и две формулации на наноструктурирани липидни носачи, кои се разликуваат во однос полимерот за стерна стабилизација (полиетилен гликол и полуксамер 407). Сите формулации на липидни наносистеми се карактеризираат со тесна дистрибуција по големина на честички со индекс на полидисперзност помал од 0,3 и негативна површинска наелектризираност во опсег од приближно -24 до -44 mV. Сите четири формулации подготвени со лиофилизиран метанолен сув

екстракт од цвет на *Cannabis sativa* се карактеризираат со висок процент на негово вградување (>87 %). Сите липидни наносистеми резултираат со продолжено ослободување на канабинолната киселина во текот на 24 часа, при што нанолипозомските формулации иницијално се карактеризираат со побрзо ослободување во споредба со наноструктурираните липидни носачи. Математичкото моделирање на ослободувањето од дизајнираните системи преку моделот на Peppas-Sahlin најдобро ја опишува кинетиката на ослободување кај сите подготвени липидни наносистеми, а како доминантен механизам се јавува процесот на дифузија.

Резултатите добиени од испитувањето на вијабилноста на клетките по 4, 24 и 48 часа со три различни концентрации од подготвените липидни наносистеми (по третман на клетките) покажале дека таа се намалува, а најголемо намалување на вијабилноста на клетките е утврдена кај највисоката концентрација на нанолипозомите со полиетилен гликол по инкубација од 48 часа ($31,16 \pm 7,10\%$).

Кај добиените формулации на липидни наносистеми најден е мал процент на цитотоксичност што значи дека не доаѓа до нарушување на клеточната мембрана и не настанува некроза на клетките. Флуоресцентната и конфокалната микроскопија при направената клеточна интернализација упатуваат дека нанолипозомите и наноструктурираните липидни носачи ја поминуваат клеточната мембрана. Пенетрацијата како и нивната интернализација и дистрибуција внатре во клетките се остварува на различен начин – нанолипозомите се концентрираат околу јадрото, а наноструктурираните липидни носачи се дистрибуираат низ цитоскелетот на клетките.

Во докторската дисертација, потврдена е антиконвулзивната активност кај модел на глувчиња. Потврдено е дека подготвените наноформулации со екстракт од *Cannabis sativa* значително го зголемуваат времето на латенција за миоклонични, клонични и тонични напади, со што е потврдена нивната потенцијална примена во третман на различни видови епилептични напади.

Оригинални резултати од трудот

За високиот квалитет на докторската дисертација зборува и фактот што дел од резултатите се објавени како 3 оригинални труда во престижните списанија *Journal of Pharmaceutical Sciences* (IF = 3,784, за 2022 г.), *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials* (IF = 3,405, за 2022 г.), *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (IF = 5,062, за 2022 г.). Од оваа дисертација дополнително произлегуваат и 5 печатени труда кои се објавувани помеѓу 2018 и 2022 година во меѓународните списанија *Acta Pharmaceutica Hungarica* и *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*.

Завршно мислење кон дисертацијата

Согласно целокупниот пристап, преземени активности, презентацијата на добиените резултати и квалитетот на објавените трудови, можам со задоволство да истакнам дека докторската дисертација со наслов „ДИЗАЈН, ФОРМУЛАЦИЈА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И *IN VIVO* СТУДИИ НА ЕФИКАСНОСТ НА ЛИПИДНИ НАНОСИСТЕМИ СО ВГРАДЕН ЕКСТРАКТ ОД *CANNABIS SATIVA* ЗА ПОТЕНЦИЈАЛЕН ТРЕТМАН НА ЕПИЛЕПСИЈА“ на кандидатот м-р Љубица Михаилова целосно ги исполнува поставените цели и внесува значителен и оригинален научен пристап и придонес во областа на фармацевтската технологија.

Со почит,

Проф. д-р Петре Макрески, редовен професор при Институт за хемија, ПМФ, УКИМ, Скопје

Од Д-р Христина Литовин
Синцеритас АД
Ул. Антон Панов бр. 11
1000 Скопје, С. Македонија

До
Наставно-научниот совет на
Фармацевтски факултет – Скопје

МИСЛЕЊЕ

За доставеното авторезиме од докторската дисертација под наслов: „Дизајн, формулација, карактеризација и *in vivo* студии на ефикасност на липидни наносистеми со вграден екстракт од *Cannabis Sativa* за потенцијален третман на епилепсија“ изработена од кандидатката Љубица Михаилова

Лековитите растенија и хербалните екстракти имаат своја историска традиционална употреба кај широката популација, а нивниот квалитет е дефиниран согласно објавени монографии во фармакопеите. Последните неколку години, во светски рамки се актуелизира употребата на екстракт од растението *Cannabis Sativa* L. кое содржи бројни канабиноиди како активни супстанции кои имаат невропротективно дејство поради антиоксидативните и анти-инфламаторни својства. Терапевтско дејство е забележано во научната литература, предклиничките и клиничките студии кај неутралните форми на канабиноиди (на пр. ЦБД, ТХЦ и други) и нивните прекурзори киселинските форми на канабиноиди (на пр. ЦБДА, ТХЦА и други). Се претпоставува дека ЦБДА покажува антиконвулзивна активност, намалувајќи ја фреквенцијата на епилептични напади кај педијатриската популација во случаи кога конвенционалната антиконвулзивна терапија не го дава потребниот терапевтски одговор.

Поради липосолубилните карактеристики, канабиноидите се подложни на брз метаболизам, ниска биорасположивост и мален транспорт низ крвно-мозочната бариера што резултира со ниски концентрации на местото на делување. Овие недостатоци поттикнуваат развој на различни пристапи за ефикасна испорака на лековитата супстанција *in vivo*, а еден од нив се липидните наносистеми кои се биокомпатибилни и структурно слични со хуманите клетки, овозможуваат енкапсулација на липофилни и хидрофилни молекули и поради бројните физичко-хемиски својства ја зголемуваат нивната безбедност, стабилност и ефикасност.

И покрај бројните студии за липидните наносистеми, материјалите за нивна формулација од аспект на физичко-хемиски и биофармацевтски својства и интеракциите со биолошките карактеристики на живите организми, нивната безбедност не е целосно загарантирана.

Во дисертацијата направен е суштински придонес кон физичко-хемиска и биофармацевтска карактеризација на липидните наносистеми во *in vitro* услови како и *in vivo* евалуација на нанолипозоми и наноструктурирани липидни исстеми со енкапсулиран екстракт од *Cannabis Sativa* за безбеден и ефикасен транспорт преку крвно-мозочната бариера и третман на епилепсија.

Во таа насока, прво е направена фитохемиска карактеризација на екстракт добиен со метанолна екстракција и мацерација на цветни врвови од растението *Cannabis Sativa* кое диво расте на

поднебјето на Република Северна Македонија и доминантно содржи ЦБДА и ниска концентрација на ЦБД. Во продолжение, кандидатката се осврнува на подготовка на два типа липидни наносистеми: нанолипозоми и наноструктурирани липидни системи чија површина е модифицирана со различни типови на хидрофилни полимери. Направена е физичко-хемиска и биофармацевтска карактеризација на наносистемите во поглед на морфолошки изглед, големина на честички и дистрибуција на честички по големина, зета потенцијал, стабилност во физиолошки и биолошки медиуми, ФТИР анализа на поединечните компоненти во формулацијата и формулациите, квантитативна карактеризација на наносистем-протеински комплекс со Бредфордова реакција, *in vitro* клеточно преживување и евалуација на токсичност и неврална интернализација на хумани мозочни ендотелни клетки *hCMEC/D3* (модел клеточни линии за крвно-мозочната бариера) и хумани невробластома клонални клетки *SH-SY5Y* (ин витро модел за неврална функција).

Вака формулирани и карактеризирани липидни наносистеми се применети за енкапсулација на канабис екстракт и потврдени се нивните физичко-хемиски својства. Евалуирани се биофармацевтските карактеристики на подготвените формулации од аспект на ефикасност на енкапсулација на активната супстанција, а согледано е и влијанието на структурата на липидниот наносистем и типот на хидрофилен полимер врз кинетиката и механизмот на ослободување на активната супстанција. Забележана е статистички значајна повисока антиоксидативна активност на канабис екстракт енкапулиран во липиден наносистем. Конечно, испитана е ин виво ефикасноста на подготвените формулации на липидни наносистеми со енкапулиран канабис екстракт кај експериментални животни со индуцирани конвулзии и забележан е различниот потенцијал на различните наносистеми во превенција на епилептичките напади.

Оваа докторска дисертација претставува добро-структуриран пристап во кој систематски и темелно е согледано влијанието и поврзаноста на факторите на формулација, физичко-хемиските карактеристики и однесувањето на липидните наносистеми во биолошка средина. Истото може да се забележи од јасно поставените цели, изборот на современа методологија за изведбата на експериментална работа и статистичка евалуација на добиените резултати, како и концизно и јасно претставување на резултатите, нивна дискусија и изведување на заклучоците. Дел од истражувачките активности се изведени како дел од седум проекти, а резултатите од истражувањата во рамки на оваа докторска дисертација веќе се публикувани во десет оригинални научни труда, што говорат за евалуацијата на нејзината вредност пред научната јавност. Врз основа на сите наведени аргументи, ми претставува особена чест и задоволство да го дадам своето стручно мислење за успешно направеното истражување на кандидатката Љубица Михаилова кое дава значаен научен, но и практичен придонес во областа на фармацевтската нанотехнологија и биофармација.

Со почит,


Д-р Христина Литовин

Прилог 2

Листа на објавени трудови поврзани со истражувањата во
докторската дисертација



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: www.jpharmsci.org

Pharmaceutical Nanotechnology

Lipid nano-carriers loaded with *Cannabis sativa* extract for epilepsy treatment – *in vitro* characterization and *in vivo* efficacy studies

Ljubica Mihailova^{a,*}, Jana Tchekalarova^b, Dushko Shalabalija^a, Nikola Geskovski^a, Veronika Stoilkovska Gjorgievska^c, Gjoshe Stefkov^c, Paoleta Krasteva^b, Maja Simonoska Crcarevska^a, Marija Glavas Dodov^a

^a Institute of Pharmaceutical Technology, Center of Pharmaceutical Nanotechnology, Faculty of Pharmacy, Ss. Cyril and Methodius University, Majka Tereza 47, 1000 Skopje, Republic of North Macedonia

^b Institute of Neurobiology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia 1113, Bulgaria

^c Institute of Pharmacognosy, Center for Natural Products, Faculty of Pharmacy, Ss. Cyril and Methodius University, Majka Tereza 47, 1000 Skopje, Republic of North Macedonia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 June 2022

Revised 14 September 2022

Accepted 14 September 2022

Available online 19 September 2022

Keywords:

Blood-brain barrier

Epilepsy

Nanoliposomes

Nanostructured lipid carriers

Anticonvulsant activity

Cannabis sativa extract

Cannabidiolic acid

ABSTRACT

Taking into consideration the latest reported beneficial anticonvulsant effects of cannabidiol (CBD) and cannabidiolic acid (CBDA) for clinical applications and the advantages of lipid nano-systems as carriers for targeted brain delivery, the aim of this study was set in direction of *in vitro* physico-chemical and biopharmaceutical characterization and *in vivo* evaluation of nanoliposomes and nanostructured lipid carriers loaded with *Cannabis sativa* extract intended for safe and efficient transport via blood-brain barrier and treatment of epilepsy. These nanoliposomes and nanostructured lipid formulations were characterized with z-average diameter <200 nm, following unimodal particle size distribution, negative values for Z-potential, high drug encapsulation efficiency and prolonged release during 24h (38.84–60.91 %). Prepared formulations showed statistically significant higher antioxidant capacity compared to the extract. The results from *in vivo* studies of the anticonvulsant activity demonstrated that all formulations significantly elevated the latencies for myoclonic, clonic and tonic seizures and, therefore, could be used in preventing different types of seizures. A distinction in the potential of the nano-systems was noted, which was probably anticipated by the type and the characteristics of the prepared formulations.

© 2022 American Pharmacists Association. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Intensive research in nanotherapeutics provides answers to a number of questions regarding the advantages and disadvantages for overcoming the biological barriers. In fact, the ability to design and develop nano-systems with different properties and characteristics, including improved bioavailability of the encapsulated drugs while enhancing their solubility and stability, reduced toxicity, targeted and controlled release of the drug, the possibility for fluorescent or other types of visualization, bioimaging and etc, makes them promising candidates in diagnosis and treatment of various diseases.

Medicinal plants and various herbal extracts have been the main source of drugs for many years, consisting of most of the monographs

in the pharmacopeias in the past. Herbal medicine, based mainly on the experience transmitted through generations, has been increasingly receiving scientific confirmation of its effectiveness and safety. In recent years, it has been observed that a large part of the population is returning to traditional medicine, and the use of herbal drugs in the treatment of numerous diseases is constantly growing. In addition, the side effects of some synthetic drugs have been the main reason for inciting many researchers to focus their research on the traditional methods of treatment.

Cannabis sativa (f. *Cannabaceae*), has been one of the most widely used and controlled plants containing psychoactive substances, with regulated use for medical and scientific purposes has been occupying more and more territories. Several studies have been performed on animals and humans that indicate the enormous therapeutic value of this plant for the treatment of central nervous system (CNS) diseases. The chemical composition of the prepared extracts from *Cannabis sativa* is very important, as well as the ratio of the main cannabinoids,

* Corresponding author at: Institute of Pharmaceutical Technology, Center of Pharmaceutical Nanotechnology, Faculty of Pharmacy, Ss. Cyril and Methodius University, Majka Tereza 47, 1000 Skopje, North Macedonia.
E-mail address: lj.mihailova@ff.ukim.edu.mk (L. Mihailova).

including cannabidiol (CBD), tetrahydrocannabinol (THC), cannabinol (CBN), cannabigerol (CBG), cannabichromene (CBC), tetrahydrocannabinavarin (THCV) and their acid forms that have great potential in the treatment of multiple diseases.¹

The neuroprotective effect shown by this plant has been actually due to the great antioxidant and anti-inflammatory effect of CBD.² Regardless of the mechanism of action, literature data points out that CBD-rich extracts could be used to treat and reduce the symptoms of epilepsy and seizures,^{3, 4} as well as other neurological disorders such as psychosis, anxiety, multiple sclerosis etc.^{5–7}

Scarce literature data from the last few years indicate that carboxylated form - cannabidiolic acid (CBDA), which is the natural precursor of CBD, possesses possible serotonin activity and up to 100 times greater affinity for the 5-HT_{1A} receptor compared to CBD.⁸ It has been assumed that CBDA shows anticonvulsant activity, reducing the frequency of seizures, especially in the treatment of epilepsy in children where conventional therapy has not been showing positive results.⁹ Yet, more research is needed to confirm this statement. On the other hand, the antimicrobial and anti-emetic effects of CBDA have been well documented. Additionally, with dual inhibition of cyclooxygenases through downstream regulation and enzyme inhibition, CBDA has shown its anti-inflammatory effect.¹⁰

In the last decade, more than 30 preclinical and clinical studies have been performed, including several randomized placebo-controlled studies examining the effect of *Cannabis sativa* extracts as potential candidates for the treatment of patients with drug-resistant epilepsy. The fact that approximately 36% of patients that receive anticonvulsant therapy have not adequately controlled their seizures indicates that epilepsy has been a disease that attracts a lot of attention and has been a real challenge for modern medicine. In addition, a large percentage of patients (up to 50%) also experience behavioral comorbidities such as cognitive impairment, anxiety, and depression, which are sometimes more significant problems than seizures themselves.¹¹

The ability to cross the blood-brain barrier (BBB) has been well known for some cannabinoids, especially THC derivatives. However, when it comes to phytocannabinoid acids, there has been evidence that they have been prone to poor penetration into the brain, probably due to the part of the molecule with carboxylic acid that has a negative charge under physiological conditions, which prevents their transport across the BBB.⁹

As molecules with low water solubility, phytocannabinoids and their acids have been characterized by extensive and rapid metabolism and low bioavailability, which contribute to their reduced transport across the BBB and correspondingly low concentration into the brain tissue. Additionally, CBDA undergoes rapid transformation, especially under the influence of temperature, humidity and light, which indicates the low level of stability of the prepared extracts and the need for controlled storage conditions. Namely, CBDA could readily be decarboxylated into CBD.¹² These problems require developing different approaches for their stability and more efficient delivery *in vivo*. Among the various drug delivery carrier systems, lipid nanosystems (nanoliposomes, nanostructured lipid carriers) attract the most attention due to their biocompatibility and structural similarity to human cells.^{13, 14} They can encapsulate both lipophilic and hydrophilic molecules and along with numerous physico-chemical attributes, they contribute to increasing drug molecules' safety, stability and efficacy.^{15–17} Hence, by incorporating *Cannabis sativa* extract into an appropriate lipid nano-system, it is expected to potentially improve the stability of phytocannabinoids, their distribution and penetration through the BBB, thus enhancing their bioavailability and controlled release into the brain.

Although there have been numerous studies focused on the design and development of multifunctional carriers loaded with selected plant extracts and their potential application as effective

dosage forms in the treatment of CNS disorders, up to date when it comes to the treatment of epilepsy, the data have been relatively limited.

Therefore, the present study aimed to *in vitro* physico-chemical and biopharmaceutical characterization of nanoliposomes and nanostructured lipid carriers intended for safe and efficient transport via BBB treatment of epilepsy. To further evaluate their therapeutic efficacy, comparative *in vivo* studies were performed using a battery of seizure tests in IRC mice.

Materials and methods

Chemicals and solvents

Soybean lecithin (SL) was obtained from Vitalia, Macedonia. LIPOID PE 18:0/18:0-PEG 2000 (PEG) was purchased from Lipoid, Germany. Hydrogenated soy phosphatidylcholine (LC-3) was contributed by Lipoid, Germany. Phospholipone 90H (PL90H) was supplied from Phospholipid, Germany, while Poloxamer 407 (POL) from BASF, Germany. Cholesterol (CH) and oleic acid (OA) were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Cannabidiol (CBD) CRM solution concentration 1 mg/mL in methanol (CAS: 13956-29-1, purity 98.66%), cannabinol (CBN) CRM solution concentration 1mg/mL in methanol (CAS: 521-35-7, purity 99.50%), (-)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) CRM solution concentration 1mg/mL in methanol (CAS: 1972-08-3, purity 99.39%), Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A (Δ^9 -THCA) CRM solution concentration 1 mg/mL in acetonitrile (CAS: 23978-85-0, purity 96.99%) and cannabidiolic acid (CBDA) CRM solution concentration 1 mg/mL in acetonitrile (CAS: 1244-58-2, purity 97.88%) were purchased from Cerilliant Corporation (USA). 85% o-phosphoric acid and acetonitrile HPLC grade were purchased from Carlo Erba. *Cannabis sativa* herb was a gift from the Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, R.N. Macedonia. Human plasma was obtained from the Institute of Neurology, Clinical Center – Mother Theresa, Skopje, R. N. Macedonia. The protocols for the human plasma studies were approved by the ethical committee of the Faculty of Medicine, Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, R. N. Macedonia (25.05.2016, No. 03-2039/9). All the other chemicals and reagents were of the highest purity grade commercially available and used as received.

Preparation of *Cannabis sativa* extract (CE)

Crude extract of *Cannabis sativa* L. herb was prepared by maceration. Namely, the extraction was performed with 1.5 L methanol on 50 g dried and grounded plant material of wild growing *Cannabis sativa* from the territory of North Macedonia, for a period of 3h under continuous magnetic stirring (60 °C, 250 rpm, Jenway, UK). After 3h, the sample was filtered and 1 L methanol was additionally added and the extraction was continued for another 4 h under the above mentioned conditions. Afterward, the maceration was carried out at room temperature for 17 h. Subsequently, both filtrates were mixed together and evaporated until constant weight (40 °C, 50 rpm, 50 mBar, Buchi 215, Switzerland), then left at -80 °C. After 2 h the obtained extract was lyophilized (24 h, 0.048 mbar, -45 °C, Labconco, USA).

Preparation of nanoliposomes (NL)

Two different formulations of NL were prepared by the modified lipid film hydration technique.¹⁸ Briefly, SL, PC-3, CH and PEG (NL1) and SL, PC-3, CH and POL (NL2) in mass ratio 17.3:1:1:2, were dissolved in a mixture of chloroform/methanol 3:2 (v/v). In this step, 200 mg of CE dry extract were added to the organic mixture as well. Afterward, the organic solvents were vaporized (40°C, 50 rpm; Buchi

215, Switzerland). Consequently, the liposomal dispersion was produced by hydration (phosphate buffer pH 7.4 (Ph. Eur. 9.0)) of the dried lipid film previously obtained in three consecutive cycles each lasting 15 min, under two hydration steps: ultrasonication (50/60 Hz) and gentle shaking. Thus, obtained vesicles were homogenized (24000 rpm, 3 min; Ultra-Turrax T25, Ika-Werke, Germany) and were left in a refrigerator at 2–8°C for 24 h. After 24 h, prepared samples were homogenized again with ultra-turrax for 3 min at 6500 rpm and stored at 2–8°C in a refrigerator.

Preparation of nanostructured lipid carriers (NLC)

NLC formulations, which were previously developed and completely characterized, were prepared using the solvent evaporation method.¹⁹ Briefly, the oil phase was consisted of PL90H as a solid lipid and OA as a liquid lipid in mass ratio of 1:1.15, respectively, dissolved in methanol to which 200 mg of CE had been previously added, under continuous magnetic stirring (250 rpm, Jenway, UK) at 50°C. Afterward, the lipid phase was slowly added to the water phase which was composed of 3 % Tween 80 water solution and PEG in the first formulation (NLC1) and 3% Tween 80 water solution and POL in the second formulation (NLC2) also heated to 50 °C, until complete methanol evaporation. Obtained lipid emulsions were homogenized with ultra-turrax for 5 min at 6500 rpm and were left in a refrigerator at 2–8 °C for 24 h..

Phytochemical characterization of CE

The content of extracted cannabinoids was determined using German Pharmacopoeial (DAD) method for assay of cannabis potency. Analyzes were performed on Agilent 1200 Model HPLC equipped with DAD G1315D, quaternary pump G1311A, column thermostat G1316A and thermostated autosampler G1329A Agilent Technologies, USA), using InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 chromatographic column (150 mm x 3 mm ID, 2.7 μm, Agilent Technologies, USA). As mobile phase was used: A – aqueous solution of orthophosphoric acid (8.64 g/L) and B – acetonitrile, following solvent gradient elution of 0 – 16 minute from 36% to 18% A linear gradient, 16 – 17 minute 18% to 36% A linear gradient and from 17 to 30 minute re-equilibration of column with 0.7 mL/min flow rate. DAD measurements were conducted at 225 nm and 306 nm wavelength for neutral and acidic cannabinoid forms, respectively.

In vitro characterization of NL and NLC

Morphological properties of NL and NLC

Morphological characteristics of NL and NLC formulations were evaluated using transmission emission microscopy (TEM) (JEM-1400, Jeol, Japan) attached to a digital camera (Veleta TEM Camera, Olympus, Germany) using iTem software v.5.2.

Particle size, particle size distribution and surface potential

Particle size and particle size distribution as well as surface potential of the prepared formulations were examined using Zetasizer (Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., UK). For that purpose, each sample was diluted 20 times in a phosphate buffer with low molarity (10 mM). In order to investigate the *in vitro* stability of NL and NLC, 200 μL of the prepared formulations were incubated with 800 μL physiologically relevant medium (phosphate buffer pH 7.4) and human plasma, respectively, at 37°C for 1, 4, 6 and 24 hours.

The measurements were performed at 25°C, with thermostating time of 120 s, medium viscosity 0.8894 cP, dielectric constant 78.5 and angle of 173°, in disposable transparent cuvettes, with refractive

index of 1.339 and 1.348 for NL and NLC, respectively. The obtained results were average values of at least 3 batches each analyzed 3 times with 12 consecutive measurements. The particle size of the prepared NL and NLC was expressed as z-average diameter (d_z nm), the particle size distribution as polydispersity index (PDI) and the surface potential as zeta potential (mV). Taking into consideration that the mean particle size of the samples is smaller than 0.2 μm and the samples were measured in low dielectric constant media, electrophoretic determinations of zeta potential was calculated according the Hückel approximation (Eq 2).

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta} \quad (\text{Eq. 1})$$

Encapsulation efficiency and drug loading

The loading of CE (mg) into NL and NLC was analyzed indirectly by determining the non-encapsulated CE in the dispersions using the previously described HPLC method. Briefly, the prepared NL and NLC were centrifuged (4500 rpm, 25°C, 30 min, Rotofix 32 - Hettich Zentrifugen, Germany) in Vivaspin 20 ultrafiltration cuvettes (100 000 MWCO units, Sartorius, Germany) followed by 2 subsequent rinses for 15 min with phosphate buffer pH 7.4 and water for NL and NLC, respectively. Afterward, the eluate was removed and the amount of CE was calculated by HPLC analysis through CBD and CBDA quantification. Formulations without CE incorporated were used as blank samples.

In vitro release studies

The total amount of released CE from NL and NLC was determined using an *in vitro* membrane dialysis method (MEMBRA-CEL® dialysis tubing, MWCO 7000 RC, Serva Feinbiochemica GmbH, Germany) where 3 mL of the prepared formulations were added in 30 mL of phosphate buffer pH 7.4 at 37±1°C and 200 rpm. At determined time intervals (after 1, 2, 4, 6, 8, 24 hours), 10 mL of the medium were taken and the amount of CE released from NL and NLC formulations was detected by validated method using spectrophotometry on 220 and 306 nm wavelength for CBD and CBDA, respectively. The experiments were also performed on blank formulations for method suitability and ensuring that the achieved results are representative. The results obtained for detection and quantification of the abovementioned components using spectrophotometry were shown to be comparable with those from the previously described HPLC method.

To investigate the kinetics of release of CE from the prepared formulations, the *in vitro* release data were mathematically modeled using DDSolver 1.0 (menu-driven add-in program for Microsoft Excel) computer program.

Antioxidant capacity (ORAC assay)

Antioxidant capacity of CE, blank samples without PEG/POL (NL0 and NLC0, respectively), CE loaded samples without PEG/POL (NL01, NL02, NLC01 and NLC02, accordingly) and prepared nano formulations (NL1, NL2, NLC1, NLC2) was examined by conducting the Oxygen Radical Antioxidant Capacity (ORAC) assay. Namely, 25 μL of tested samples were added in 150 μL of fluorescein solution (10 nM) and were incubated for 30 min at 37°C in a dark place. Afterward, 25 μL of 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) (100 mM) was added and the fluorescence was measured at different time points (at the beginning, after 60 and 120 min) using plate reader (492/535 nm ex/em, VICTOR Perkin Elmer, USA). As a positive control was used a solution of fluorescein, AAPH and phosphate buffer pH 7.4, while fluorescein and phosphate buffer pH 7.4 as a negative control. All experiments were conducted in quadruplicates and statistical analysis was done using ANOVA and multivariate PLS modeling.

The antioxidant capacity of CE and prepared formulations was calculated as % of initial fluorescence of each sample.

% of initial fluorescence

$$= \frac{\text{fluorescence of sample in given time period}}{\text{fluorescence of sample at the beginning}} * 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

In vivo studies

Male ICR mice (25–30 g), purchased from the animal facility of the Institute of Neurobiology, Bulgarian Academy of Sciences, were used in the present study. Upon arrival, they were adapted to the new environment for at least a week before being used in the study. The mice were group-housed 10–12 in standard cages and under environmental conditions (temperature: 21–24°C; humidity 40–50%; at artificial 12:12 light: dark cycle with lights on at 7:00 a.m.). Water and rodent chow were delivered at libitum. The experimental procedures were carried out in accordance with the European Communities Council Directive 2010/63/EU and were approved by the Bulgarian Food Safety Agency (license no. № #58000183).

Drugs and dosage

Prepared formulations (NL1, NL2, NLC1, NLC2) and the referent antiepileptic drug diazepam were dispersed in a 1% Tween 80 solution, and administered intraperitoneally (i.p.) at three different doses (30, 100 and 300 mg/kg at a volume of 0.1 ml per 10 g of body weight) and a time interval of 30 min before the tests. The other referent drugs, Phenytoin and carbamazepine (CBZ) were administered at a dose of 30 and 10 mg/kg, respectively, 60 min before the seizure stimulus. Matched controls were injected with a vehicle.

Anticonvulsant activity

Maximal electroshock seizure (MES) test. The MES was executed as described previously.^{20, 21} In brief, the seizure response was induced by stimulation with transcorneal electrodes (Constant Current Shock Generator; 50 mA, 60 Hz delivered for 0.2 s). The prevention of tonic seizures accompanied by the hind limb extensor component in 50 % of mice in a group was accepted as an anticonvulsant effect.

Six hertz (6 Hz) psychomotor seizure test. Psychomotor seizures were evaluated as described earlier.^{20, 21} Seizures were characterized by responses such as Straub tail, vibrissae, eye blinking, locomotion, head nodding, forelimb clonus, or rearing. The animal that resumed normal position within 10 s after the stimulus was considered protected.

Subcutaneous pentylenetetrazole (scPTZ) seizure test. For the scPTZ test, a dose of 85 mg kg⁻¹ provoked clonic seizures in 97% (CD97) of tested control animals.²⁰ The tested mice were observed for a period of 30 min. The latency for the first onset of myoclonic, clonic and tonic seizures was detected.

Intravenous pentylenetetrazole seizure (ivPTZ) test. Solution of 1% pentylenetetrazole (PTZ) was continuously infused (0.01 mL/s) into the tail vein of the tested animal for detection of the three seizure phases for myoclonic twitch, clonic and forelimb tonic. The seizure threshold was calculated in mg/kg from the volume infused PTZ in mL, the body weight, and PTZ concentration.

Rota-rod test. The motor coordination was assessed elsewhere.^{20, 21} The tested dose of the prepared formulations that caused a loss of coordination of the mouse on a rotating rod (3.2 cm in diameter, at a

speed 10 rpm) for less than 1 min from three repeated sessions was accepted as neurotoxic.

Statistical analysis

ORAC assay

A partial least square (PLS) methodology was employed to explore the main factors governing the antioxidant capacity of the tested samples, using validated statistical software Simca 14.1 (Sartorius Stedim Biotech, Germany). The antioxidant capacity (expressed as % of initial fluorescence) was selected as a quantitative dependent variable (y) and the formulation type, loaded/blank, CE alone (qualitative variables) and incubation time (quantitative variable), were used as independent variables (x). Variable important for the projection (VIP) and loading scores were used to point out and explain the effects of the dominant factors which have significant contributions to the statistical model.

Animal studies

Data were presented as mean ± S.E.M. The doses (in mg/kg) that protected 50% of mice in both the MES and 6 Hz-test (ED50) and the dose toxic in 50% of tested animals (TD50) (rota-rod test) were calculated through a log-probit method (Litchfield and Wilcoxon, 1949). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post hoc test was used for the ivPTZ test. Not normally distributed data were estimated by Kruskal-Wallis on ranks followed by the Mann-Whitney U test. The statistical significance was accepted at P ≤ 0.05. The analysis was performed via Graph Pad Prizm Version 7.04 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA.).

Results and discussion

Physico-chemical characterization of NL and NLC

Lipid nano-systems have been one of the most promising carriers for drug delivery and controlled release at the site of action due to their similarity to human cells and biological membranes, among other attributes.

The prepared formulations were characterized with spherical and symmetric shapes (Fig. 1), z-average particle diameter <200 nm, narrow unimodal distribution (PDI ~ 0.2) and negative surface potential (Table 1).

From Table 1 it could be noticed that the formulations with POL as a polymer for steric stabilization (NL2 and NLC2) had a larger particle size diameter compared to formulations with PEG (NL1 and NLC1, respectively) (Fig. 2). Moreover, NL1 and NLC1 had lower ZP (-28.90 and -24.60), compared to NL2 and NLC2 (-43.80 and -31.20), accordingly (Fig. 3). Regarding the EE, it could be seen that all formulations were characterized with a high % of CE loading (>85%).

As we discussed earlier, the nano-systems' long blood circulation time is one of the most critical parameters to achieve their destination and show their therapeutic effect. Therefore, the *in vitro* stability of freshly prepared NL and NLC was examined through determining the z-average particle diameter (nm) at different time intervals (0, 1, 4, 6 and 24 hours) after incubation in physiologically relevant medium (phosphate buffer pH 7.4) as well as in human plasma. From the particle size distribution graph of the prepared NL it could be observed that after 24 h incubation with phosphate buffer pH 7.4 and human plasma, respectively, the z-average particle diameter for NL1 was 125.7±5.8 and 130.3±8.78 nm, for NL2 was 157.9±7.12 and 160.4±7.76 nm. The obtained results indicated on the stability of the prepared formulations since no significant differences in the particle sizes were obtained (Fig. 4). After incubation of NLC with the above-mentioned media, the z-average particle diameter was slightly increased. Namely, the average particle size was 133.4±4.67 and

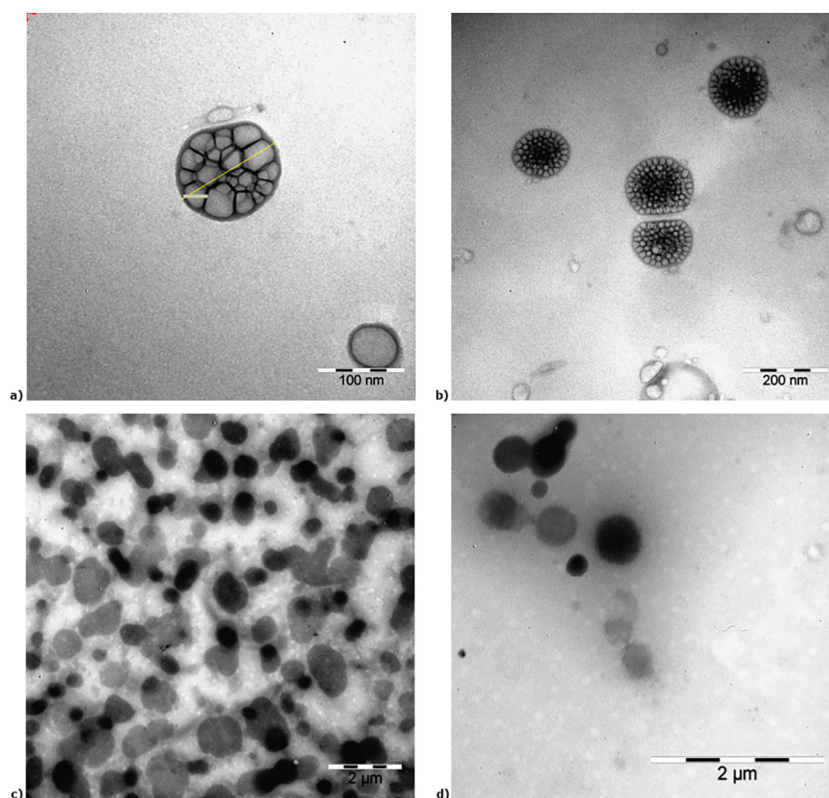


Fig. 1. TEM images of prepared formulations a) NL1; b) NL2; c) NLC1; d) NLC2.

147.5±5.8 nm for NLC1 and NLC2 after 24 h incubation with phosphate buffer pH 7.4, and 128±4.3 and 146.1±5.12 nm for NLC1 and NLC2, respectively, after 24 incubation with human plasma. The increase in particle diameter for 14.49 and 9.52% for NLC1 and NLC2 after 24 h incubation with human plasma was probably due to the adsorption of proteins onto their surface. According to the findings of,²³ once the nano-systems released in biological fluids there is an immediate coverage with proteins and other biomolecules that could contribute in particle size changes.

In order to be suitable for i.v. administration and to achieve their final destination, these carriers intended for brain delivery must meet certain criteria, including appropriate average particle size diameter, narrow particle size distribution and surface potential. Several studies aimed at overcoming the BBB have suggested that the average diameter of particles should be 50–200 nm.²² As mentioned before, in order to increase the therapeutic effect in the CNS, the prerequisites of a nano formulation as a carrier for brain targeting include high encapsulation efficiency, controlled drug release, prolonged *in vivo* circulation time, greater drug activity and reduced systemic toxicity.²⁴ Properties such as particles' size, charge and surface morphology have been one of the main formulation challenges in order to design nanoparticles' characteristics, including their blood circulation time, biodistribution, specific tissue targeting, and cell internalization. Since the ability of nanoparticles to accumulate at the

target site is directly linked to their circulation times, the nanoparticles' long blood circulation time is one of the most critical determinants of their therapeutic potential.²⁵

Phytochemical characterization of CE

The phytochemical profile of lyophilized dry methanolic extract from *Cannabis sativa* L. was explored using the previously described HPLC method. The following cannabinoids have been detected and quantified: at $t_R=7.095$ min cannabidiol (0,524 % w/w) and cannabidiolic acid (5,696 % w/w) at $t_R=6.017$ min (Fig. 5). CBDA was selected as a marker compound, which was further used in the examination of the encapsulation efficiency and determination of CE release rate from the prepared nano-systems.

In vitro drug release studies

Results from the *in vitro* release studies indicated that all nanoformulations demonstrated prolonged release of CE over 24 h (Fig. 6). Additionally, faster initial release after 1 h has been observed in liposomal formulation NL1 (10,89%) compared to NL2 (5,42%) and nanostructured lipid carriers (7,89% and 6,23% for NLC1 and NLC2, accordingly, $p < 0.05$). On the other hand, the results presented in the

Table 1
Physico-chemical properties of prepared nano-systems (NL and NLC).

Sample	$d_z \pm SD$ (nm)	PDI	ZP (mV)	EE (%)	DL (mg CE/100 mg lipid mass)
NL1	130.70±2.526	0.285±0.024	-28.90±3.269	99.86±1.01	65.48±0.69
NL2	159.80±3.230	0.253±0.017	-43.8±2.387	99.89±0.76	65.50±0.52
NLC1	111.80±1.256	0.213±0.053	-24.60±0.763	98.02±0.62	105.97±0.88
NLC2	133.40±2.319	0.202±0.047	-31.20±1.117	87.19±0.42	94.26±0.61

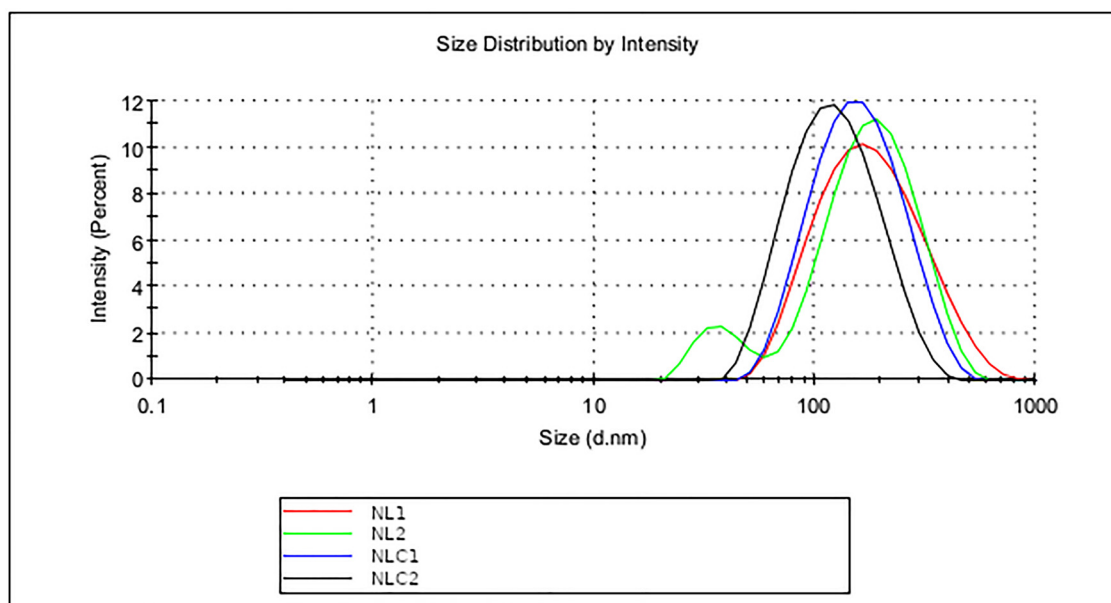


Fig. 2. Z-average diameter distribution plot of NL and NLC formulations.

graph indicate that there has been a higher % of CE release over 24h in NLC compared to NL ($p < 0.05$).

Taking into consideration the advantages of the lipid nano systems, including the potential for controlled release of the drugs, it is expected to achieve a relatively high local concentration at the site of action, targeting them to a specific organ and releasing their content in a prolonged way while reducing the systemic side effects, in order to improve their bioavailability and effectiveness which has been particularly important for the treatment of epilepsy.²⁶

When it comes to the drug release rate, it is well known that it depends on the particle size and the polymer coating thickness. Namely, the drug dissolution rate is expected to be lower as the surface amount of poloxamer increases due to an enhanced length of diffusion pathways. Additionally, it could reduce the initial burst release of the drug,²⁷ which is in accordance with the abovementioned

results. Moreover, NL2 is a nanoformulation with the lowest % of drug release over time. Based on the obtained correlation coefficients from the examined mathematical models for the release of CE from the prepared formulations, the model that best describes the release kinetics of the lipid nanosystems is the Peppas-Sahlin model ($R^2 > 0.996$ for all four formulations). Additionally, based on the obtained values for the kinetics of *in vitro* release of CE, it could be seen that the value for K_{1ps} (9.517 and 4.080 for NL1 and NL2, respectively) has been far higher than the value for K_{2ps} (0.724 and 1.008 for NL1 and NL2, respectively), which indicates that the release mechanism from nanoliposomal samples is most likely by diffusion,^{28, 29} On the other hand, the results obtained for NLC formulations suggest that the release of CE could be by diffusion and polymer relaxation ($K_{1ps} = 4.919$ and 3.213 , $K_{2ps} = 2.316$ and 2.680 for NLC1 and NLC2, respectively).

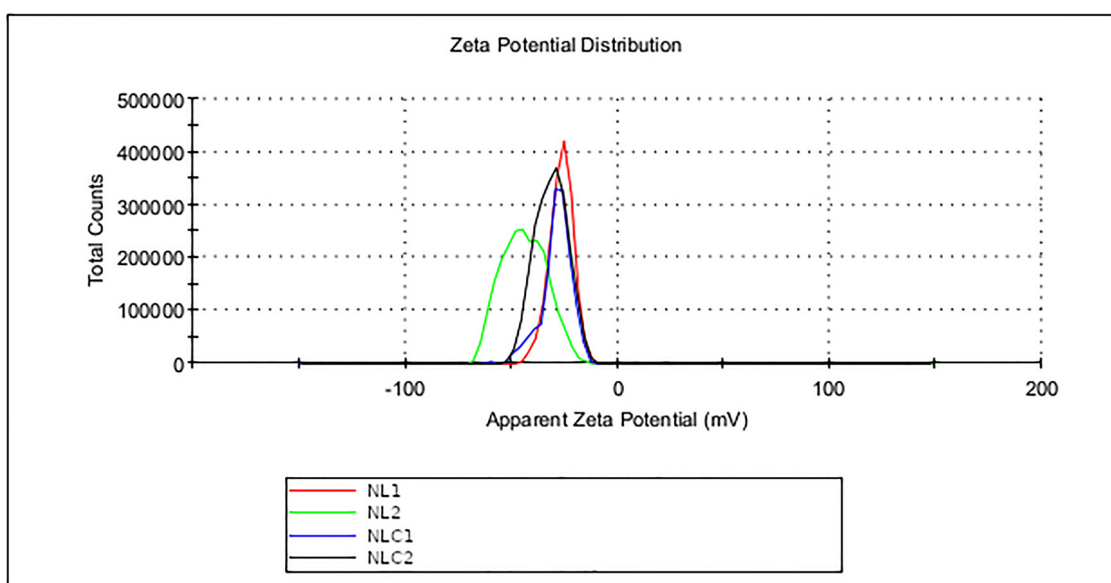


Fig. 3. Zeta potential distribution plot of NL and NLC formulations.

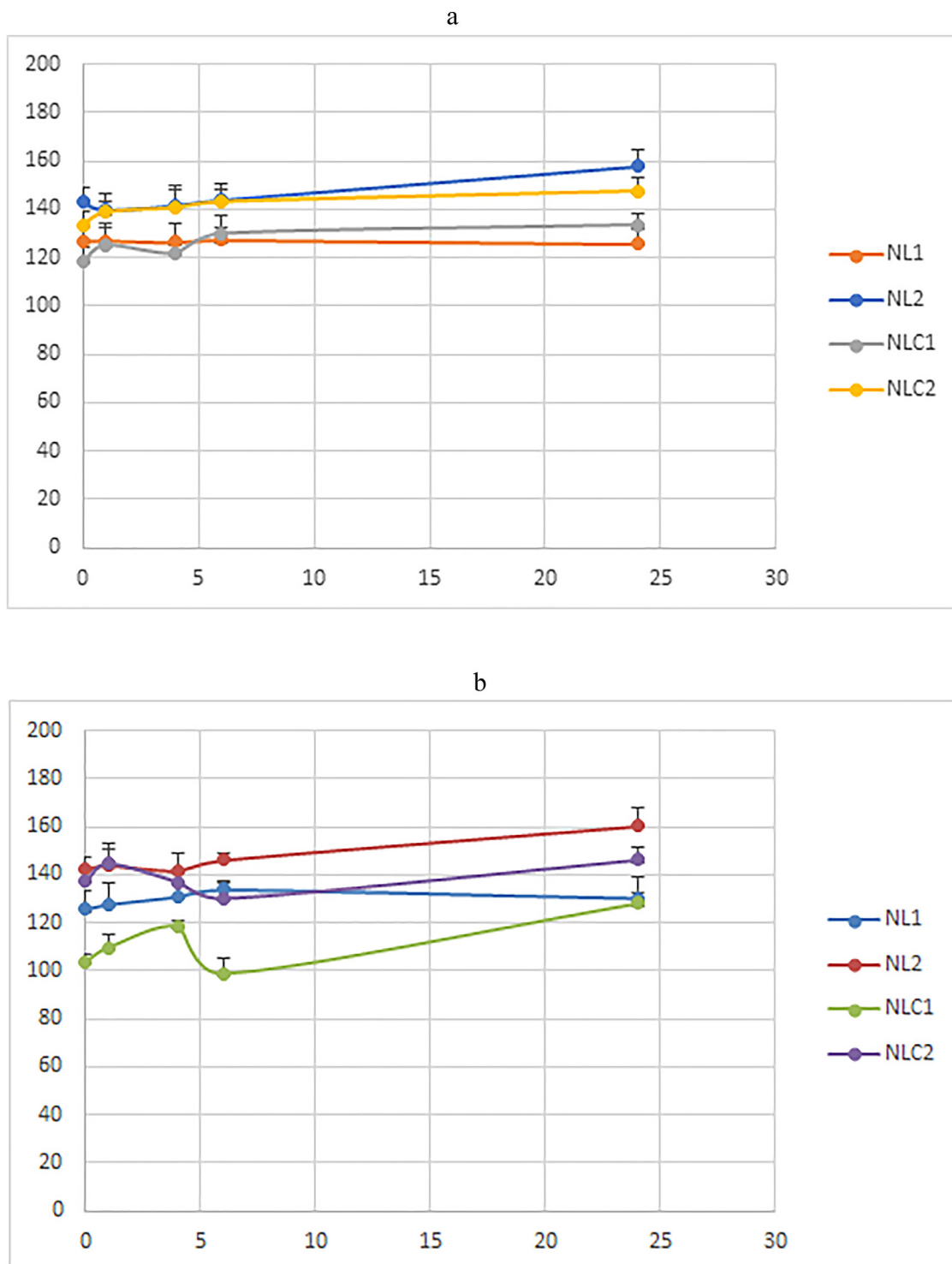


Fig. 4. a) Z-average diameter distribution plot of NL and NLC after 24 h incubation in a) phosphate buffer pH 7.4; b) human plasma.

Antioxidant capacity (ORAC)

To examine the antioxidant capacity of CE and prepared NL and NLC formulations, a modified ORAC assay was performed. Obtained results have been calculated as a percent of initial fluorescence of each sample over a period of 120 min ($n = 4$).

The PLS model was built on two main components with appropriate correlation and prediction coefficients ($R^2Y=0.78$, $Q^2=0.68$), while

the score scatter plot (Fig. 7 a and b), VIP and loading plots (Fig. 8 a and b) reveal that the formulation type, as well as the presence of CE, have been the dominant factors influencing the variability of the y-values, while the incubation time has no statistically significant effect.

The loading coefficients of the critical variables demonstrate the importance of the surface characteristics of the formulations in regards to their antioxidant capacity. Moreover, there is a clear distinction among the NL (bearing negative loading coefficient) and NLC

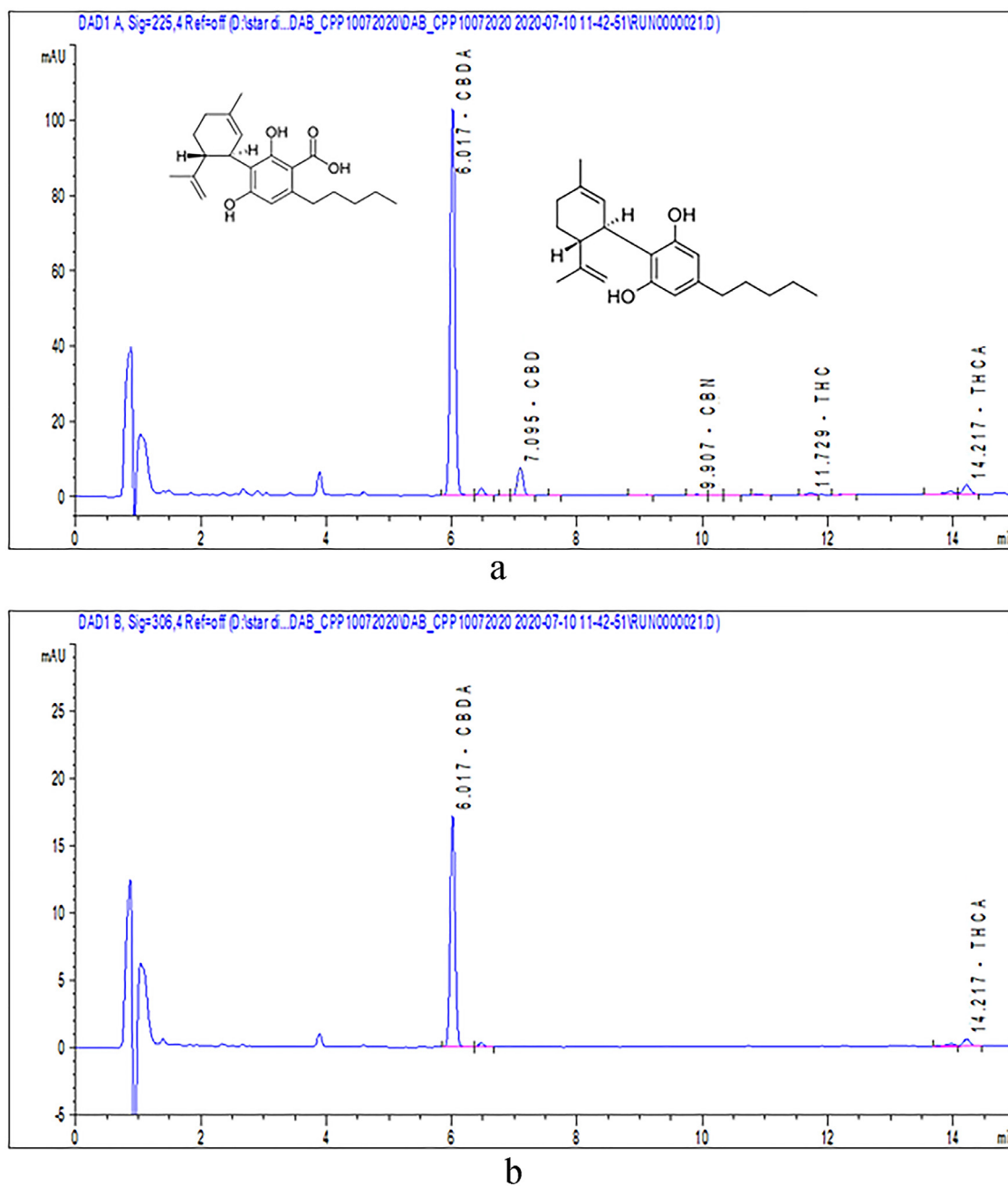


Fig. 5. Representative HPLC chromatogram of *Cannabis sativa* extract recorded at a) 225 and b) 306 nm for CBD and CBDA, respectively. The chemical structures which have been selected for quantitative analysis are presented in the slot; Standard mix recorded at c) 225 and d) 306 nm.

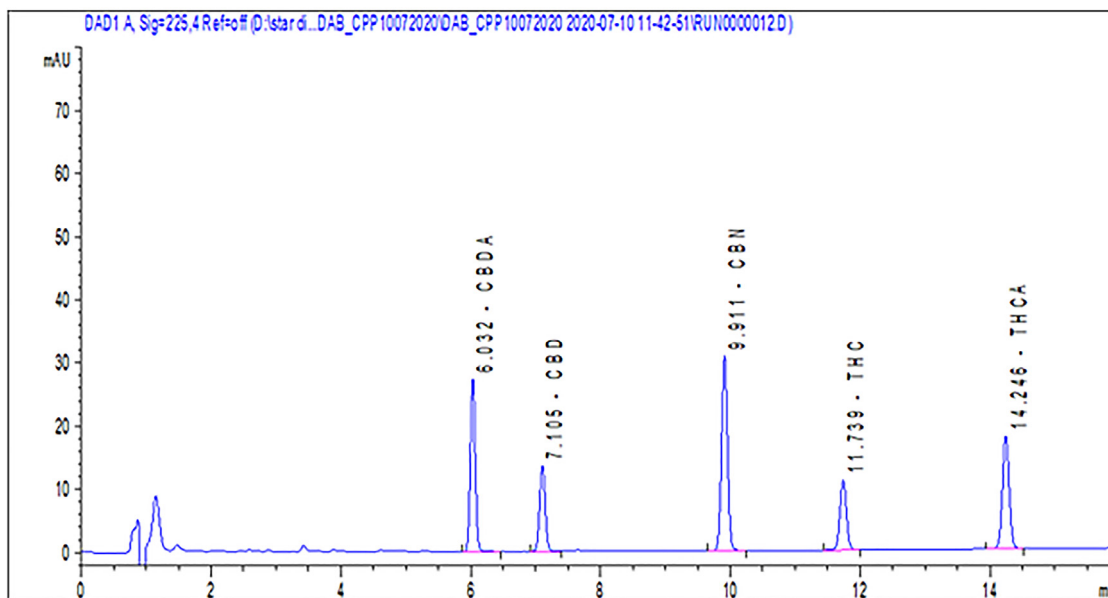
(bearing positive loading coefficient) where NL demonstrates lower antioxidant activity probably due to fewer interactions with the ROS generator (AAPH), needed to prevent the oxidation of the fluorescent probe, while the NLC demonstrates the opposite effect. However, these differences diminish as both formulations are coated with polymers for steric stabilization (PEG/POL). In addition, the presence of CE in the formulations contributes to increased antioxidative capacity, as confirmed by the enormous VIP scope and positive loading coefficient.

Namely, It could be noticed that all 4 formulations (97.78 ± 0.56 , 99.32 ± 1.84 , 99.28 ± 2.85 and 99.90 ± 1.81 for NL1, NL2, NLC1 and NLC2, respectively) have statistically significant higher antioxidant activity compared to CE (91.59 ± 0.65) ($p < 0.05$). On the other hand, the obtained results indicated the difference between NL1, NL2,

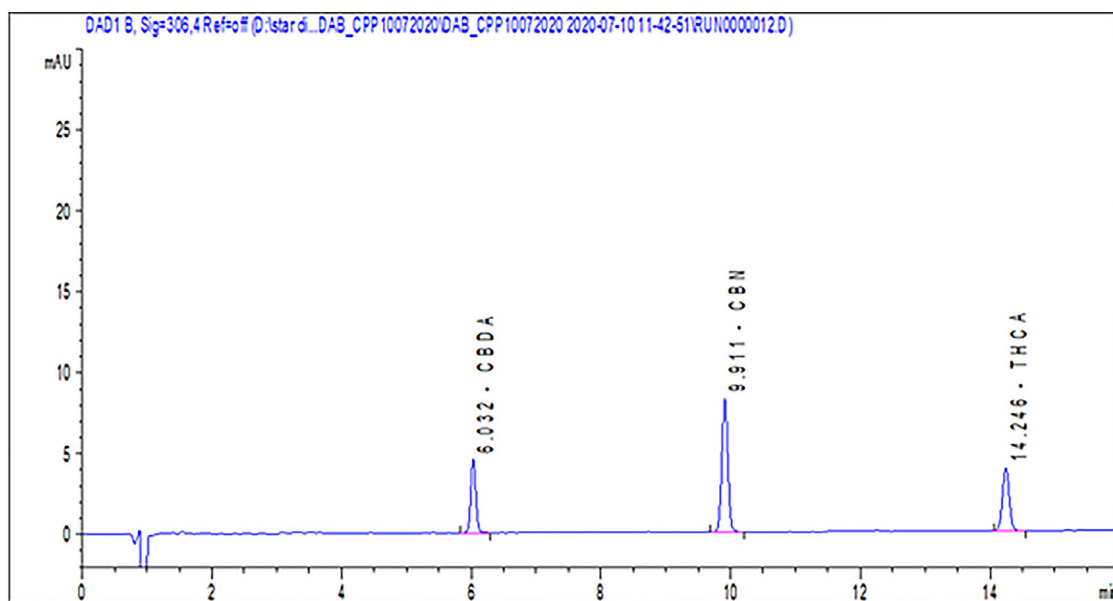
NLC1, NLC2 and their analogues without the polymer for steric stabilization. Namely, NL1, NL2, NLC1 and NLC2 formulations had shown higher antioxidant activity over time than NL01, NL02, NLC01 and NLC02 (93.47 ± 2.47 , 95.73 ± 1.02 , 95.13 ± 1.97 and 96.67 ± 1.65 , respectively), which is probably due to the presence and the prolonged release of the extract.³⁰

Anticonvulsant activity

The suggested anticonvulsant activity of the prepared nano-systems loaded with CE was performed on a battery of seizure tests in naive mice by using either an electrical or chemical stimulus. The MES test, the 6-Hz test, the sPTZ test, as well as the iv PTZ test were selected according to the recommended guidelines of the



C



d

Fig. 5. Continued.

Antiepileptic Drug Development Program (ADD) of the National Institutes of Health (USA) as 'gold standards'.³¹ The neurotoxicity of the nano-systems was assessed by a rotarod test. In Phase I of evaluation, the samples were injected i.p. at doses of 30, 100 and 300 mg.kg⁻¹, 0.5 h before MES or rotarod test, respectively. The results of Phase I are summarized in Table 2. The preliminary pharmacological data revealed that all four formulations showed protection in half or more of the mice tested in the MES test. The potency was in order NL1 = NLC2 = NLC1 > NL2 in the MES test, which was comparable to the referent drug phenytoin. No neurotoxicity was detected in the rotarod test at the highest dose of 300 mg/kg, while it was limited to 100 mg/kg for phenytoin (Phase I).

The next quantitative pharmacological analysis in Phase II of screening, the median effective doses (ED50) calculated in the MES

and 6-Hz test, respectively, the median neurotoxic dose (TD50) in the rotarod test, as well as the protective indexes (PI) were determined for all four formulations that exhibited activity in the Phase I of screening. The referent drug for the MES was phenytoin. The quantitative evaluation of tested samples in Phase II revealed that the potency was in order NLC1 > NLC2 > NL1 > NL2 in the MES test and NL2 > NL1 > NLC2 > NLC1 in the 6Hz test (Table 3). The NLC1 exhibited comparable to phenytoin activity in the MES test (NLC1: ED50 = 11.85 vs phenytoin: ED50 = 7.15) while its PI was higher than PI of phenytoin (NLC1: PI = 25.31 vs phenytoin: PI = 13.99).

Literature data suggest that particle size and surface charge play important roles and strongly affect the pharmacokinetics and biological distribution of the nano-carrier systems in vivo. More precisely, these properties influence NPs circulation time and clearance in vivo

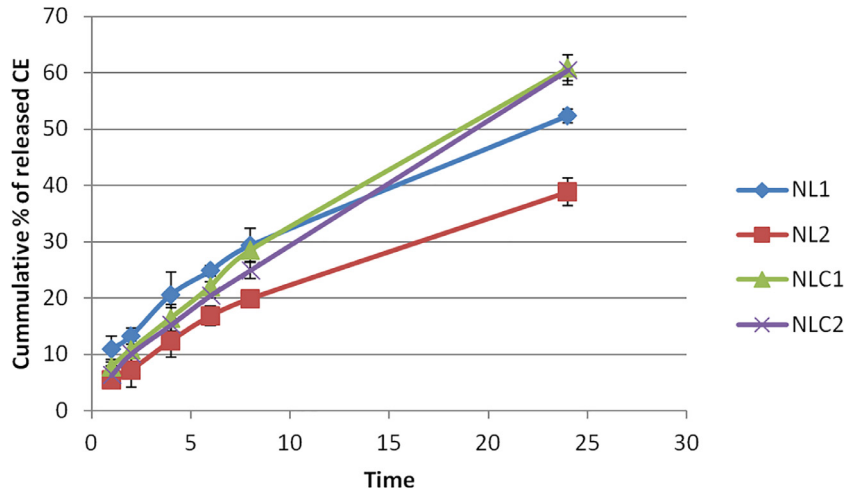


Fig. 6. *In vitro* release profile of CE loaded NL and NLC ($n = 3$) Fig. 2. 3D graphic representation of the influence of studied variables (SL and PEG) on absolute amount of encapsulated RA.

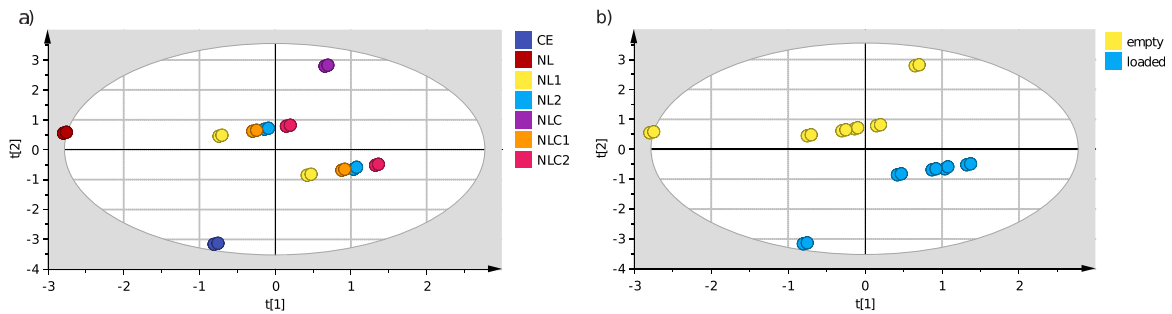


Fig. 7. Score scatter plot colored according to a) formulation type b) empty/loaded formulations.

and on the other hand also determine the success of transport across the endothelial cells at the specific tissues, such as BBB. Many research studies reveal that a particle size between 20 and 150 nm could reduce the *in vivo* clearance through liver and kidney while exhibiting longer systemic circulation time. It is also well established that the phagocytosis of the nano-carriers is greater with increasing the values of the surface potential, regardless their charge, and hence, leading to accelerated clearance *in vivo*.³² Therefore, the biggest particle size (~160 nm) and most negative value for ZP (~ -44 mV) of NL2, compared to the other three formulations, may partially

contribute to the weakest therapeutic potential of this nano- carrier formulation in the aforementioned *in vivo* tests.

Mice administered with NL1, NLC1 and NLC2, injected at a dose of 30 mg/hg, exhibited significantly increased latencies to the first myoclonic seizure phase compared to vehicle-treated mice [Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks: $H = 16.132$, $p = 0.003$]. *Post hoc* test showed that NL1, NL2, NLC1 and NLC2 samples significantly elevated the latency for myoclonic seizure ($p = 0.0447$, $p = 0.043$, $p = 0.0007$, $p = 0.0002$, respectively) (Fig. 9A). Latency to the first clonic seizure was also significantly increased by

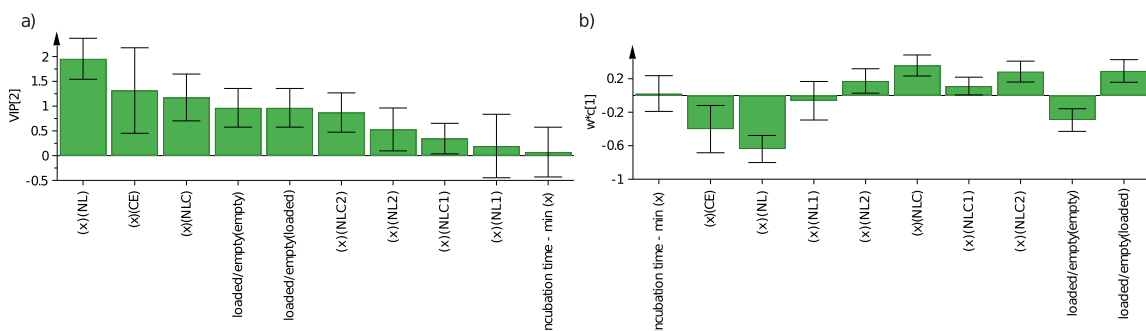


Fig. 8. a) Variable importance for projection (VIP) plot and b) loading score plot for discriminate analysis of formulations and the presence of CE as well as the incubation time.

Table 2
Anticonvulsant activity and neurotoxicity of the tested samples (mice, i.p.).

Samples	MES ^a 0.5 h	Rotarod ^b 0.5 h
NL1	30	—
NL2	300	—
NLC1	30	—
NLC2	30	—
Phenytoin ^d	30	—
Diazepam ^e	—	30

In the presented table the values demonstrate the minimum dose of the tested samples, where bioactivity or neurotoxicity was exhibited in at least 50% of treated animals. A dash indicates that there hasn't been any activity or toxicity when the samples or referent drugs have been administered at the highest dose of 300 mg/kg.

^a Maximal electroshock test (MES).

^b Test for neurotoxicity (Rotarod).

the nano-systems [$H = 12.383$, $p = 0.015$]. Like for the myoclonic seizures, the latencies for the clonic seizures were significantly increased by the NLC1 and NLC2 formulations ($p = 0.02$, $p < 0.001$, respectively) (Fig. 9.B). For the latency for the onset of the tonic phase, there was no main effect of the dose of the tested formulations. However, the NLC1 and NLC2 exhibited no tonic-clonic seizures induced by scPTZ (Fig. 9.C). To explain this phenomenon, the complex etiology, pathophysiology and the huge number of mechanisms included in the development and progression of different types of seizures, as well as the numerous differences in the structure and the physico-chemical and biopharmaceutical properties between liposomes and nanostructured nano-carriers should be taken into consideration. Since no similar experimental results related to this event have been found in the literature, further investigation studies are needed to be carried out. The anticonvulsant activity of the formulations (mostly NLC1 and NLC2) was comparable to the positive control CBZ.

The four formulations NL1, NL2, NLC1 and NLC2 affected the three seizure phases, myoclonic twitch, generalized clonus and forelimb tonus at all administered doses (30, 100 and 300 mg/kg), respectively, of mice i.v. injected with 1% PTZ. One-way ANOVA revealed that NL1, NL2, NLC1 and NLC2 have significant effects on the thresholds for myoclonic seizure, generalized clonic seizure and forelimb tonus, respectively. The *post hoc* test showed that NL1, NL2, NLC1 and NLC2 formulations showed comparable to CBZ effect at the three doses used on the three seizure phases ($p < 0.01$ and $p < 0.001$) (Fig. 10 A,B,C).

Table 3
Quantitative screening of nanocompounds by MES and 6-Hz seizure test in mice.

Sample	Test	TPE ^a (h)	ED ₅₀ ^b (mg/kg)	95% confidence interval	Hill slope	TD ₅₀ ^c (mg/kg)	PI ^d
NL1	MES	0.5	66.90	29.20–153.3	0.18	> 300	> 4.48
	6-Hz	0.5	43.01	1.279–1.988	0.78	> 300	> 6.97
NL2	MES	0.5	96.97	36.58–257.1	0.66	> 300	> 3.09
	6-Hz	0.5	33.33	1.385–1.661	1.14	> 300	> 9.0
NLC1	MES	0.5	11.85	7.491–18.75	1.17	> 300	> 25.31
	6-Hz	0.5	84.19	1.743–2.107	1.24	> 300	> 3.56
NLC2	MES	0.5	30.79	20.88–45.43	0.1	> 300	> 9.74
	6-Hz	0.5	67.38	1.551–2.106	0.94	> 300	> 4.45
Phenytoin	MES	0.5	7.15	2.911–17.59	1.04	> 100	> 13.99

The presented data is in the 95% confidence interval.

^a Time to peak effect - TPE

^b median effective doses (ED₅₀)

^c median minimal neurotoxic doses (TD₅₀)

^d Protective index (PI) (rotarod TD₅₀/ED₅₀).

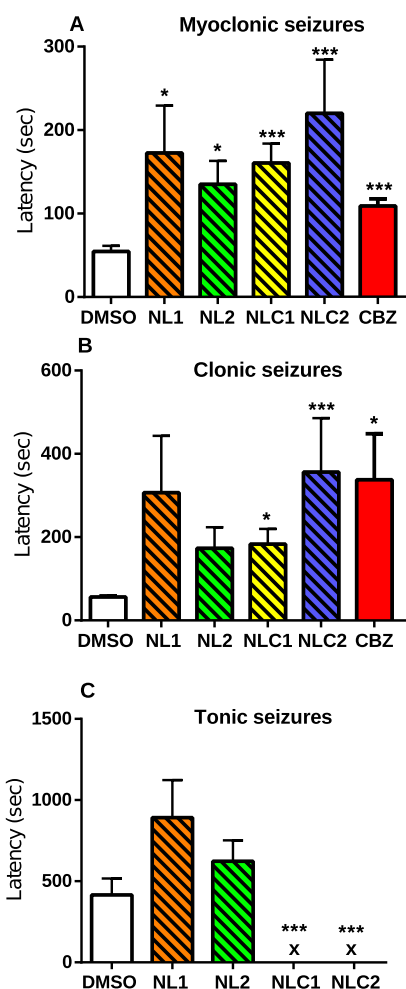


Fig. 9. Effects of NL1, NL2, NLC1 and NLC2 samples and the positive control CBZ (30 mg/kg, i.p.) on the latency for onset of the myoclonic (A), clonic (B) and tonic (C) seizures elicited by scPTZ injection (85 mg/kg) in mice. Asterisks mark significant differences between drugs and controls. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Conclusion

During the first phase of this research, two different types of four formulations of *Cannabis sativa* extract loaded NL and NLC were prepared and thoroughly characterized. CE was also previously prepared and underwent phytochemical characterization with emphasis on the main cannabinoids, where the predominant component detected was CBDA with a small amount of CBD. Nano formulations were characterized with z-average diameter of 111–160 nm following unimodal particle size distribution (PDI < 0.3) negative values for Z-potential and high CE EE% (> 87%). All prepared samples resulted in prolonged CE release, which was dependent on the type of nano-carrier system and the type of stealth polymer used. Based on the obtained correlation coefficients, the model that best described the release kinetics of the CE was Peppas-Sahlin. Regarding the antioxidant capacity, all formulations showed statistically significant higher antioxidant capacity compared to CE. Obtained results from the *in vivo* studies of the anticonvulsant activity in mice indicated that all nano-formulations significantly elevated the latencies for myoclonic, clonic and tonic seizures. Both types of systems have shown

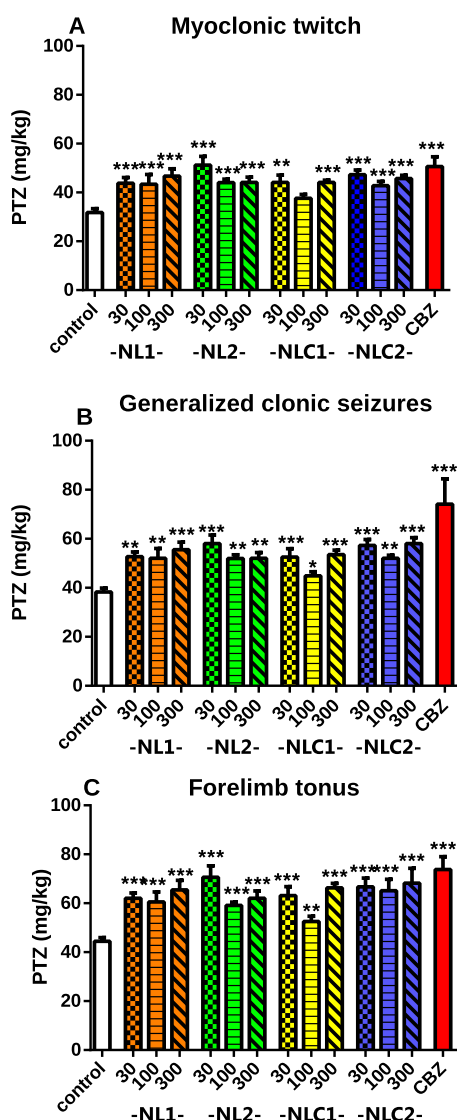


Fig. 10. Effects of NL1, NL2, NLC1 and NLC2 compounds and the positive control CBZ (30 mg/kg, i.p.) on the threshold for three seizure phases: the myoclonic twitch (A), generalized clonic seizures (B) and forelimb tonus (C) elicited by ivPTZ injection (1 %) in mice. Asterisks mark significant differences between drugs and controls. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

different potential in preventing seizures. The most noticeable was the lower activity of NL2 compared to the other nanosystems, which was probably affected by the type of stealth polymer, the structure of this nano-system and its properties.

In conclusion, the anticonvulsant activity of CE, where CBDA was present as dominant cannabinoid, and its successful *in vivo* delivery to the brain when it is incorporated into lipid nanosystems such as liposomes and nanostructured lipid carriers have been confirmed. However, additional *in vivo* studies are needed to understand better the influence of the nano-carrier properties loaded with CE on the successful management of different types of epileptic seizures.

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- Perruca E. Cannabinoids in the treatment of epilepsy: hard evidence at last? *J Epilepsy Res.* 2017;7(2):61–76. <https://doi.org/10.14581/jer.17012>.
- Scuderi C, Filippis DD, Iuvone T, Blasio A, Steardo A, Esposito G. Cannabidiol in medicine: a review of its therapeutic potential in CNS disorders. *Phytother Res.* 2009;23(5):597–602. <https://doi.org/10.1002/ptr.2625>.
- Hofmann EM, Frazier JC. Marijuana, endocannabinoids, and epilepsy: potential and challenges for improved. *Exp Neurol.* 2013;244:43–50. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.11.047>.
- Jones R, Rickards H, Cavanna AE. The prevalence of psychiatric disorders in epilepsy: a critical review of the evidence. *Funct Neurol.* 2010;25(4):191–194.
- Rohleder C, Muller JK, Lange B, Leweke FM. Cannabidiol as a potential new type of an antipsychotic. A critical review of the evidence. *Front Pharmacol.* 2016;7:422. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00422>.
- Bergamaschi MM, Queiroz RHC, Chagas MHN, et al. Cannabidiol reduces the anxiety induced by simulated public speaking in treatment-naïve social phobia patients. *Neuropsychopharmacology.* 2011;36:1219–1226. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.6>.
- Lakhan SE, Rowland M. Whole plant cannabis extracts in the treatment of spasticity in multiple sclerosis: a systematic review. *BMC Neurol.* 2009;9:59. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-9-59>.
- Russo EB. Cannabis therapeutics and the future of neurology. *Front Integr Neurosci.* 2018;12:51. <https://doi.org/10.3389/fnint.2018.00051>.
- Anderson LL, Absalom NL, Abelev SV, et al. Co-administered cannabidiol and clobazam: preclinical evidence for both pharmacodynamic and pharmacokinetic interactions. *Epilepsia.* 2019;60(11):2224–2234. <https://doi.org/10.1111/epi.16355>.
- Pellati F, Borgonetti V, Brighenti V, Biagi M, Benvenuti S, Corsi L. Cannabis sativa L. and nonpsychoactive cannabinoids: their chemistry and role against oxidative stress, inflammation and cancer. *Biomed Res Int.* 2018;2018: 1691428. <https://doi.org/10.1155/2018/1691428>.
- Tellez-Zenteno JF, Hernandez-Ronquillo L, Denton A. Understanding the value of meta-analysis in epilepsy. Are we using more than required? *Seizure - Eur J Epilepsy.* 2020;76:105–106. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2020.02.004>.
- Citti C, Pacchetti B, Vandelli MA, Forni F, Cannazza G. Analysis of cannabinoids in commercial hemp seed oil and decarboxylation kinetics studies of cannabidiolic acid (CBDA). *J Pharm Biomed Anal.* 2018;149:532–540. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.11.044>.
- Celia C, Cristiano MC, Froio F, et al. Nanoliposomes as multidrug carrier of gemcitabine/paclitaxel for the effective treatment of metastatic breast cancer disease: a comparison with Gemzar and Taxol. *Adv Therap.* 2021;4(1): 2000121. <https://doi.org/10.1002/adtp.202000121>.
- Paolino D, Licciardi M, Celia C, Giammona G, Fresta M, Cavallaro G. Folate-targeted supramolecular vesicular aggregates as a new frontier for effective anticancer treatment in *in vivo* model. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;82(1):94–102. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.06.001>.
- Marianecci C, Di Marzio L, Del Favero E, et al. Niosomes as drug nanovectors: multi-scale pH-dependent structural response. *Langmuir.* 2016;32(5):1241–1249. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b04111>.
- Pannuzzo M, Esposito S, Wu L, et al. Overcoming nanoparticle-mediated complement activation by surface PEG pairing. *Nano Lett.* 2020;20(6):4312–4321. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01011>.
- Rayamajhi S, Marchitto J, Nguyen TDT, Marasini R, Celia C, Aryal S. pH-responsive cationic liposome for endosomal escape mediated drug delivery. *Colloids Surf B.* 2020;188: 110804. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110804>.
- Shalabalija D, Mihailova Lj, Simonoska Crcarevska M, Zimmer A, Geshkovski N, Glavas Dodov M. *In vitro* cytotoxicity evaluation on nanoliposomes intended for brain drug delivery. *13th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, September 16th–18th, Gdansk, Poland.* 2021.
- Mihailova Lj, Shalabalija D, Zimmer A, et al. Cytotoxicity and cellular uptake of Cannabis sativa extract loaded nanostructured lipid carriers on hCMEC/D3 cells. *12th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, May 11th–14th, Virtual meeting.* 2021.
- Angelova VT, Rangelov M, Todorova N, et al. Discovery of novel indole-based aroyl-hydrazones as anticonvulsants: pharmacophore-based design. *Bioorg Chem.* 2019;90: 103028. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103028>.
- Todorov P, Georgieva S, Peneva P, Tchekalarova J. Potential anticonvulsant activity of novel VV-hemorphin-7 analogues containing unnatural amino acids: synthesis and characterization. *Amino Acids.* 2020;52(4):567–585. <https://doi.org/10.1007/s00726-020-02836-1>.
- Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics.* 2018;10(2):57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.

23. Hadjidemetriou M, Kostarelou K. Evolution of the nanoparticle corona. *Nature Nanotech.* 2017;12:288–290. <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.61>.
24. Hu Y, Hammarlund-Udenaes M. Perspectives on nanodelivery to the brain: prerequisites for successful brain treatment. *Mol Pharm.* 2020;17(11):4029–4039. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00881>.
25. Yoo J, Chambers E, Mitragotri S. Factors that control the circulation time of nanoparticles in blood: challenges, solutions and future prospects. *Curr Pharm Des.* 2010;16(21):2298–2307. <https://doi.org/10.2174/138161210791920496>.
26. Bonilla L, Esteruelas G, Etcheto M, et al. Biodegradable nanoparticles for the treatment of epilepsy: from current advances to future challenges. *Epilepsia Open.* 2021;00:1–12. <https://doi.org/10.1002/epi4.12567>.
27. Shubhra QTH, Toth J, Gyenis J, Feczko T. Surface modification of HAS containing magnetic PLGA nanoparticles by poloxamer to decrease plasma protein adsorption. *Colloids Surf B.* 2014;122:529–536. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.07.025>.
28. Paolino D, Tudose A, Celia C, Di Marzio L, Cilurzo F, Mircioiu C. Mathematical models as tools to predict the release kinetic of fluorescein from lyotropic colloidal liquid crystals. *Materials.* 2019;12(5):693. <https://doi.org/10.3390/ma12050693>.
29. Mircioiu C, Voicu V, Anuta V, et al. Mathematical modeling of release kinetics from supramolecular drug delivery systems. *Pharmaceutics.* 2019;11(3):140. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030140>.
30. Shalabaliya D, Mihailova Lj, Simonoska Crcarevska M, et al. Formulation and optimization of bioinspired rosemary extract loaded PEGylated nanoliposomes for potential treatment of Alzheimer's disease using design of experiments. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2021;63: 102434. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102434>.
31. Krall R, Penry J, White B, Kupferberg H, Swinyard E. Antiepileptic drug development: II. Anticonvulsant drug screening. *Epilepsia.* 1978;19(4):409–428. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1978.tb04507.x>.
32. Di J, Gao X, Du Y, Zhang H, Gao J, Zheng A. Size, shape, charge and “stealthy” surface: carrier properties affect the drug circulation time in vivo. *Asian J Pharm Sci.* 2021;16(4):444–458. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2020.07.005>.

Insight into the efficacy of lipid nano-systems for brain delivery – uptake and internalization pathways in different cell culture lines

Ljubica Mihailova*, Dushko Shalabalija, Nikola Geskovski,
Maja Simonoska Crcarevska, Marija Glavas Dodov

*Institute of Pharmaceutical Technology and Center of pharmaceutical nanotechnology, Faculty of Pharmacy,
Ss. Cyril & Methodius University in Skopje, Majka Tereza 47, 1000 Skopje, R. North Macedonia*

Blood-Brain Barrier: from physiology to disease

The blood-brain barrier (BBB) represents high selective, semipermeable membrane which separates the circulation from the brain, due to the presence of endothelial cells and specialized tight junctions that prevents the transport of 100% of large neurotherapeutics and more than 98% of all small-molecule drugs (Daneman and Prat, 2015). There are different specific transporters on both sides of the BBB that are responsible for its selective transport role as well as certain enzymes released locally (secretory and metabolic role) (Abbott et al., 2006). BBB carefully protects the brain from neurotoxins and other harmful substances. Because of its neuroprotective role, the delivery of many potentially important agents intended for diagnostic or therapeutic purposes has been fully blocked or at least difficult and problematic. Moreover, many neurotherapeutics do not reach the adequate drug concentration in brain to be clinically effective (Sweeney et al., 2018).

There has been evidence that only several drugs such as morphine, methadone, diazepam, etc. could cross the BBB and express their pharmacologic effect in the brain. On the other hand, the delivery of most antibiotics, anti-tumor agents as well as the drugs for the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, epilepsy, etc., has been quite challenging and there has been an urgent need for finding new approaches in order to enhance their transport through the BBB more easily and selectively (Khaledian et al., 2022). In this sense, a whole new generation of modern drug delivery systems has been designed and developed, where lipid based nano systems

have been gaining much attention due to their biocompatibility and similarity to human cells.

Lipid nano-systems (LNS) as carriers for brain drug delivery

The ability to simultaneously encapsulate hydrophilic and lipophilic drugs as well as the possibility of particle surface modification with different ligands and polymers for stealth stabilization, make LNS one of the most used and evaluated drug delivery systems. When it comes to the effectively crossing the BBB and drug delivery to the brain, among various LNS, nanostructured lipid carriers (NLC) and liposomes stand out as the most important. In the literature, there are numerous research studies confirming their potential in brain drug delivery, starting from the dual-targeting doxorubicin liposomes that could selectively transfer the active component in brain glioma leading to reduction in the tumor size (Gao et al., 2013). Kong et al. (2020), evaluated the improvement of brain targeting when using transferring-conjugated liposomes. In another study the increased uptake of ribavirin loaded liposomes surface functionalized with glutathione and polyethylene glycol (GSH-PEG-liposomes) compared to non-functionalized liposomes, was investigated in three different cell lines (brain endothelial cells, human umbilical vein endothelial cells and human kidney epithelial cells), where it was revealed that the enhanced uptake of GSH-PEG-liposomes has been determined by endocytosis (Maussang et al., 2016). Various research studies also revealed the potential of NLC for enhancing the drug permeation through the BBB. For instance, the formulation of conventionally used active compound such

*lj.mihailova@ff.ukim.edu.mk

as carbamazepine in the treatment of epilepsy, when encapsulated in NLC showed improved brain delivery and therapeutic outcome (Khan et al., 2020).

BBB uptake and internalization pathways of LNS

Several mechanisms to cross the BBB have been proposed that these carriers may follow, such as simple diffusion; paracellular transport; transcytosis, carrier-mediated transport and endocytosis, or a combination thereof (Ahn et al., 2020). Namely, the internalization of LNS into the cells is usually through lysosomal pathway when the active compounds are released into the cell upon nanoparticle degradation by the lysosomal components; or endosomal pathway where nanoparticles travel inside the endosomes from one side of the cell to the other without being degraded. When it comes to the uptake of NLC, research studies suggest that the process of endocytosis has been the most likely mechanism for particle internalization through the BBB. On the other hand, liposomes as one of the most attractive vehicles could fuse with endothelial cells and transport the active components via endocytosis or receptor-mediated transcytosis (Khaledian et al., 2022).

Literature data suggests that the most important factor that could affect the uptake of LNS is the particle size. As per the findings, the most used and effective nanoparticle size in brain drug delivery has been around 100 nm, which was found to be also significant for prolonged plasma circulation time. Additionally, the shape, charge and modifications of the nanoparticle's surface also play an important role in determining the amount and the rate of LNS uptake and passage through the BBB. LNS usually have spherical shapes which contributes for enhanced penetration through the cells. Even though it would be more natural positively charged particles to have higher uptake considering that the BBB is slightly negatively charged, however, literature data indicates that formulations with a negative zeta potential have been also effective and high drug concentrations cross the BBB. The possibility for particle surface functionalization represents an enormous advantage to design nano system with desirable properties that will be in accordance with the characteristics and requirements originating from the disease being treated. It has already been established that the process of PEGylation induces nonspecific cellular detachment resulting with prolonged bioavailability of the drugs in the central nervous system which is of particular benefit for targeted delivery (Shalabalija et al., 2021).

In this sense, in the last few years our research group is orientated towards design and development of LNS for brain drug delivery. Namely, the *in vitro* internalization efficiency of different formulations of liposomes and

NLC was confirmed on hCMEC/D3 and SH-SY5Y cell lines as a model for BBB and neurons, respectively.

References

- Abbott, N.J., Rönnbäck, L., Hansson, E., 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 7(1): 41-53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
- Ahn, S.I., Sei, Y.J., Park, H.J., Kim, J., Ryu, Y., Choi, J.J., Sung, H.J., MacDonald, T.J., Levey, A.I., Kim, Y.T., 2020. Microengineered human blood-brain barrier platform for understanding nanoparticle transport mechanisms. *Nat Commun.* 11, 175. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13896-7>
- Daneman, R., Prat, A., 2015. The Blood-Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7(1): a020412. Doi: <https://doi.org/10.1101/2Fchshperspect.a020412>
- Gao, J.Q., Lv, Q., Li, L.M., Tang, X.J., Li, F.Z., Hu, Y.L., Han, M., 2013. Glioma targeting and blood-brain barrier penetration by dual-targeting doxorubicin liposomes. *Biomaterials.* 34, 5628-5639. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.03.097>
- Khaledian, S., Dayani, M., Fatahian, A., Fatahian, R., Martinez, F., 2022. Efficiency of lipid-based nano drug delivery systems in crossing the blood-brain barrier: A review. *Journal of Molecular Liquids.* 346, 118278. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.118278>
- Khan, N., Shah, F.A., Rana, I., Ansari, M.M., ud Din, F., Rizvi, S.Z.H., Aman, W., Lee, G.Y., Lee, E.S., Kim, J.K., Zeb, A., 2020. Nanostructured lipid carriers-mediated brain delivery of carbamazepine for improved in vivo anticonvulsant and anxiolytic activity. *Int J Pharm.* 577, 119033. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119033>
- Kong, L., Li, X.T., Ni, Y.N., Xiao, H.H., Yao, Y.J., Wang, Y.Y., Ju, R.J., Li, H.Y., Liu, J.J., Fu, M., Wu, Y.T., Yang, J.X., Cheng, J., 2020. Transferrin-modified osthole PEGylated liposomes travel the blood-brain barrier and mitigate Alzheimer's disease-related pathology in APP/PS-1 mice. *Int J Nanomedicine.* 15:2841-2858. <https://doi.org/10.2147/ijn.s239608>
- Maussang, D., Rip, J., van Kregten, J., van den Heuvel, A., van der Pol, S., van der Boom, B., Reijerkerk, A., Chen, L., de Boer, M., Gaillard, P., de Vries, H., 2016. Glutathione conjugation dose-dependently increases brain-specific liposomal drug delivery in vitro and in vivo. *Drug Discov Today Technol.* 20:59-69. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2016.09.003>
- Shalabalija, D., Mihailova, Lj., Crcarevska, M.S., Karanfilova, I.C., Ivanovski, V., Nestorovska, A.K., Novotni, G., Dodov, M.G., 2021. Formulation and optimization of bioinspired rosemary extract loaded PEGylated nanoliposomes for potential treatment of Alzheimer's disease using design of experiments. *JDDST.* 63, 102434. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102434>
- Sweeney, D.M., Sagare, P.A., Zlokovic, V.B., 2018. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol.* 14, 133-150. <https://doi.org/10.1038/2Fnrneurol.2017.188>

Lipid nano-carriers with herbal extracts for targeted brain delivery and treatment of CNS disorders

Dushko Shalabalija*, Ljubica Mihailova, Nikola Geskovski,
Maja Simonoska Crcarevska, Marija Glavas Dodov

*Institute of Pharmaceutical Technology and Center of pharmaceutical nanotechnology, Faculty of Pharmacy,
Ss. Cyril & Methodius University in Skopje, Majka Tereza 47, 1000 Skopje, R. North Macedonia*

Neurodegenerative disorders

According to reports of the Global Burden of Disease Study (2016), the neurological disorders, among which are the neurodegenerative diseases (ND), are the leading cause of disability and the second leading cause of death worldwide. ND can be defined as conditions where the progressive neuronal loss in the central nervous system (CNS) provokes physical disability, cognitive deficits or both. The major basic mechanisms leading to slow progressive and irreversible dysfunction and loss of neurons and synapses can be result of different genetic, environmental and endogenous factors. Common pathological molecular mechanisms and pathways included in the ND development and progression include: abnormal protein dynamics, degradation, proteasomal dysfunction and aggregation; oxidative stress and formation of reactive oxygen species; mitochondrial dysfunctions and DNA damage; fragmentation of neuronal Golgi apparatus; disruption of cellular/axonal transport; neutrophine dysfunction as well as different neuroinflammatory and neuroimmune processes which finally result in cell dysfunction and death (Jellinger, 2010).

Therapeutic treatments for ND

Since ND are disorders with a wide range of different pathophysiologies and insufficient information and understanding of the mechanisms and cascades involved, the therapeutic options for this type of diseases is quite limited (Duares et al., 2018). On the other hand, the complexity of the blood-brain barrier (BBB), the main

physiological barrier that selectively and specifically controls the entry of endogenous and exogenous molecules from the blood into the brain, additionally affects the efficacy of the treatment. Some of the therapeutic strategies currently used for AD treatment are: protein aggregation inhibitors (iA β 5 - Chaperon), cholinesterase inhibitors (Donepezil and Rivastigmine), regulation of Amyloid precursor protein by Latrepirdine, glutamate regulators (Memantine) and amyloid directed antibody (Aducanumab). Additionally, PD therapy is consisted of combination of Levodopa and Carbidopa, inducers of Hsp104 chaperones, targeting of α -synuclein misfolding with Hsp 70, anti-inflammatory drugs against Methyl-4-phenylpyridinium induced autophagy and knockdown of Sirt2 by siRNA, while the options for ALS is reducing the oxidative stress with Vitamin E and using glutamate receptor antagonists (Riluzole). Dopamine receptor blockers (phenothiazines), targeting of mHTT misfolding with Hsp70, immunomodulation therapy and Rapamycin-induced autophagy as well as RNAi-mediated silencing of host-encoded cellular prion protein (PrPC) are the treatment options for Huntington disease. Medication approaches for MS treatment include immunomodulation by beta-interferon, Ocrelizumab and hormonal replacement therapy (Lampeteu et al., 2022; Poddar et al., 2021).

However, many of the approved drug regimens for ND help to treat the symptoms but do not prevent or reduce the progression of NDs.

*d.shalabalija@ff.ukim.edu.mk

Herbal resources as therapeutic option for ND treatment

In the last two decades, the use of molecules from herbal sources is reported to complete and/or assist the traditional pharmacological agents in the treatment of ND, as a result of their numerous neuroprotective properties.

In the literature, there are several *in vivo* and *in vitro* studies confirming the antioxidant and anti-inflammatory activity of the phenolic acids (rosmarinic acid, chlorogenic acid, galic acid), phenolic diterpenes (carnosic acid, carnosol), pentacyclic triterpenes (ursolic, oleanolic, butilic acid), flavonoids (derivatives of apigenin, luteolin and epicatechin gallate) present in the extracts of *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* and Green tea. Apart from their free radical scavenging and metal chelating properties, the neuroprotective activity is enriched with decrease of apoptotic neuronal cell death, motor and memory impairment and protein aggregation and deposition by the inhibitory effect on dopamine transporters, activation of NF- κ B and ERK and p38 mitogen-activated protein kinase pathways, decrease of COX-2 expression as well as inhibition of brain secretases (Shalabalija et al., 2021). Among the wide range of activities, the ginsenosides and saponins in Ginseng, Ginkgo Biloba constituents and Curcumin show inhibitory effect on the acetylcholinesterase and Caspase-3 activation, decrease of TNF- α , IL-1 β and IL-6 mRNA, decreased gene expression and proteins involved in metabolic pathways leading to neuronal death, as well as increased function of mitochondrial respiratory chain, thus resulting in prevention of the cascade reactions included in development and progression of AD and PD (Abdel-Salam, 2019). However, due to their low stability, fast metabolism, trivial permeability, poor water solubility leading to low bioavailability, their clinical use is quite limited. Hence, developing different drug delivery approaches would be a prospective solution to these problems.

Lipid nano-carriers with herbal extracts

Treatment of ND with lipid nano-carriers may have significant advantages in terms of proper biocompatibility and biodegradability, improvement of the drug pharmacokinetic and therapeutic efficacy, as well as reduction of the drug adverse effects. Literature data suggests that there have been developed many lipid-based nano-carriers with incorporated herbal extract components such as: wide range of Curcumin loaded nanoliposomes, lipid based NPs, solid lipid NPs (SLN) and lipid core NPs mainly intended for AD and PD treatment. On the other hand, many studies showed that

Quercetin loaded nano-lipid carriers, SNLs and liposomes, as well as Resveratrol into lipidic core NPs and nanoemulsions have improved bioavailability, transport and efficacy to the brain (Moradi et al., 2020).


In this sense, the application of lipid nano-carriers may significantly improve the clinical efficacy of herbal components in neurological disorders. Therefore, the activities of the Institute of Pharmaceutical Technology at the Faculty of Pharmacy in Skopje, in the last few years is oriented towards formulation, development and characterization of lipid nano-carriers loaded with herbal extracts intended for efficient brain delivery.

References

- Abdel-Salam, O.M.E., 2019. Pathology, Prevention and Therapeutics of Neurodegenerative Disease in: Use of Herbal Products/Alternative Medicines in Neurodegenerative Diseases (Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease), pp. 279-301. http://dx.doi.org/10.1007/978-981-13-0944-1_24
- Duares, F., Pinto, M., Sousa, E., 2018. Old Drugs as New Treatments for Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceuticals* (Basel) 11(2), 44. <https://doi.org/10.3390%2Fph11020044>
- Jellinger, K.A., 2010. Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *J Cell Mol Med.* 14(3), 457-487. <https://doi.org/10.1111%2Fj.1582-4934.2010.01010.x>
- Lamprey, R.N.L., Chaulagain, B., Trivedi, R., Gothval, A., Layek, B., Singh, J., 2022. A Review of the Common Neurodegenerative Disorders: Current Therapeutic Approaches and the Potential Role of Nanotherapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* 23(3), 1851. <https://doi.org/10.3390%2Fijms23031851>
- Moradi, S.Z., Momtaz, S., Bayrami, Z., Farzaei, M.H., Abdollahi, M., 2020. Nanoformulations of Herbal Extracts in Treatment of Neurodegenerative Disorders. *Front Bioeng. Biotechnol.* 8, 238. <https://doi.org/10.3389%2Ffbioe.2020.00238>
- Poddar, M.K., Chakraborty, A., Bannerjee, S., 2021. Neurodegeneration: Diagnosis, Prevention, and Therapy. *Oxidoreductase*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94950>
- Shalabalija, D., Mihailova, Lj., Simonoska Crcarevska, M., Cvetkovikj Karanfilova, I., Ivanovski, V., Kapedanovska Nestorovska, A., Novotni, G., Glavas Dodov, M., 2021. Formulation and optimization of bioinspired rosemary extract loaded PEGylated nanoliposomes for potential treatment of Alzheimer's disease using design of experiments. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* Volume 63, 102434. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102434>

RESEARCH ARTICLE

Design and evaluation of nanostructured lipid carriers loaded with *Salvia officinalis* extract for Alzheimer's disease treatment

Elena Markova¹ | Lea Taneska¹ | Monika Kostovska¹ | Dushko Shalabalija¹ |
Ljubica Mihailova¹ | Marija Glavas Dodov¹ | Petre Makreski² |
Nikola Geskovski¹ | Marija Petrushevska³ | Arben N. Taravari⁴ |
Maja Simonoska Crcarevska¹ 

¹Institute of Pharmaceutical Technology, Center of Pharmaceutical Nanotechnology, Faculty of Pharmacy, Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Skopje, North Macedonia

²Institute of Chemistry, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Skopje, North Macedonia

³Institute of Pharmacology, Faculty of Medicine, Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Skopje, North Macedonia

⁴University Clinic for Neurology, Faculty of Medicine, Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Skopje, North Macedonia

Correspondence

Maja Simonoska Crcarevska, Institute of Pharmaceutical Technology, Center of Pharmaceutical Nanotechnology, Faculty of Pharmacy, Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Majka Tereza 47, 1000 Skopje, North Macedonia.

Email: msimonoska@ff.ukim.edu.mk; maja.simonoska@gmail.com

Funding information

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial or not-for-profit sectors.

Abstract

Considering the potential of *Salvia officinalis* in prevention and treatment of Alzheimer's disease (AD), as well as the ability of nanostructured lipid carriers (NLC) to successfully deliver drug molecules across blood–brain barrier (BBB), the objective of this study was design, development, optimization and characterization of freeze-dried *salvia officinalis* extract (FSE) loaded NLC intended for intranasal administration. NLC were prepared by solvent evaporation method and the optimization was carried out using central composite design (CCD) of experiments. Further, the optimized formulation (NLCo) was coated either with chitosan (NLCc) or poloxamer (NLCp). Surface characterization of the particles demonstrated a spherical shape with smooth exterior. Particle size of optimal formulations after 0.45 μm pore size filtration ranged from 127 ± 0.68 nm to 140 ± 0.74 nm. The zeta potential was -25.6 ± 0.404 mV; 22.4 ± 1.106 mV and -6.74 ± 0.609 mV for NLCo, NLCc, and NLCp, respectively. Differential scanning calorimetry (DSC) confirmed the formation of NLC whereas Fourier-transform infrared spectroscopy confirmed the FSE encapsulation into particles. All formulations showcased relatively high drug loading (>86.74 mcg FSE/mg solid lipid) and were characterized by prolonged and controlled release that followed Peppas-Sahlin in vitro release kinetic model. Protein adsorption studies revealed the lowest adsorption of the proteins onto NLCp ($43.53 \pm 0.07\%$) and highest protein adsorption onto NLCc ($55.97 \pm 0.75\%$) surface. The modified ORAC assay demonstrated higher antioxidative activity for NLCo ($95.31 \pm 1.86\%$) and NLCc ($97.76 \pm 4.00\%$) as compared to FSE ($90.30 \pm 1.53\%$). Results obtained from cell cultures tests pointed to the potential of prepared NLCs for FSE brain targeting and controlled release.

KEYWORDS

Alzheimer's disease, experimental design, *in vitro* characterization, nanostructured lipid carriers, optimization, *Salvia officinalis*

1 | INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease and one of the most common causes for dementia, related with slow decrease of all mental capacities: memory, problem solving, speaking, and other cognitive skills that strongly affect the ability of the patient to perform everyday activities. These changes occur due to the neurons' damage in the parts of the brain that are responsible for cognitive functions. From a pathological point of view, it is commonly explained that AD is characterized by the presence of extracellular plaques in the brain containing aggregated beta amyloid (A β) peptide (amyloid plaques) and intraneuronal neurofibrillary tangled structures containing phosphorylated tau proteins (tau bundles). According to the so-called "Amyloid cascade hypothesis" the accumulation of A β results in a distortion of the balance between the synthesis and clearance of A β in the brain.¹ Namely, the progressive cerebral accumulation of A β initiates a complex multicellular cascade involving microglia, astrocytosis, neuronal dystrophy, neuronal dysfunction and loss, as well as synaptic insufficiency resulting in changes in neurotransmission and disorders of thought and cognitive functions.² These damage first occur in the hippocampus, the part of the brain, which plays an essential role in the formation of memory. Over time, large parts of the brain are characterized by impaired neurons, and eventually the lesions are so widely spread that a significant reduction in the functional brain tissue is observed.

Oxidative stress, A β aggregation, A β production, tau aggregation, tau hyperphosphorylation, neurotransmitter imbalance, neural death, neuroinflammation, blocked Nrf2 pathway, abnormal cholesterol metabolism, hormonal imbalance, metabolism problems in mitochondria, abnormal kinase signaling, and activation of caspases and impaired calcium homeostasis are the main mechanisms for appearance and progression of AD, targeted by the therapeutic approaches. Currently, there are five approved medicines for AD treatment on the market, and all of whom belong to the group of drugs that compensate for the lack of neurotransmitters, so called modulators of neurotransmission such as acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs) and N-methyl-aspartate receptor antagonists (NMDA antagonists). AChEIs include tacrine, donepezil, rivastigmine and galantamine, approved for use in 1993, 1996, 1998, and 2001, respectively, whereas the NMDA antagonists include memantine (approved in 2003).³ In 2014, the FDA approved Namzaric, which contains memantine and donepezil. Although AD drugs have been used for more than 25 years, there is still insufficient evidence about their efficacy and clinical significance,⁴ since outcomes of the therapy are generally unsatisfactory.⁵

Scientific research activities proved that *Salvia lavandulae folia* and *Salvia officinalis* have potentially important effects on the reduction of cognitive decline associated with downward regulation of the cholinergic system, which often occurs in natural aging and dementia. Both varieties of *Salvia* possess inhibitory effect on cholinesterase enzymes. *Salvia officinalis* has been shown to have a CNS acetylcholine receptor activity, with nicotine and muscarinic binding capabilities.⁶ By using *Salvia officinalis* no adverse effects or symptoms of toxicity have been demonstrated.^{6,7} On the other hand, a dose-

dependent inhibition of lipid peroxidation was presented by ref. [8], which implies on the antioxidant activity of the aqueous methanolic extract of *Salvia officinalis*. In this sense, the components in the extract of *Salvia officinalis* are considered as potential candidates in prevention and treatment of diseases caused by oxidative damage, including AD. Rosmarinic acid (RA), one of the main constituents of *Salvia officinalis*, has been revealed to provide anti-inflammatory, antiviral, antibacterial, antidepressant, anticancer, antimutagenic and chemoreceptive properties.⁹ Additionally, its efficacy in the treatment of AD has been confirmed *in vitro* in the prevention of molecular disorders that contribute to the progression of AD such as: oligomerization and the formation of A β plaques through differential binding for A β 1-42 oligomers, A β -oligomer induced synaptic toxicity and neurotoxicity, oxidative destabilization caused by A β fibrils (lipid peroxidation, DNA fragmentation, caspase-3 activation) and hyperphosphorylation of tau proteins. In studies involving experimental mice, a decrease in the soluble A β oligomers, as well as the insoluble deposit of A β in the brain was also observed.¹⁰ In addition, *in vitro* and *ex vivo* experiments indicated that rosmarinic acid yields promising results in the inhibition of acetylcholinesterase activity.¹¹

Despite the not yet clarified mechanisms leading to the onset of the disease and the poor oral bioavailability of polyphenols¹² which are main antioxidant components in *Salvia officinalis*, the anatomic characteristics of blood-brain barrier (BBB) limit the drug transport to the brain which results with inability to achieve optimal therapeutic concentrations of the active substances in the targeted site. Since it is well known that the efficacy of treatment depends on providing adequate concentrations of the active substance at the site of action, combination of the current knowledge from phytotherapy and the modern technologies from the field of pharmaceutical technology, new effective dosage forms can be developed. Designed formulations, based on built-in plant active substances offer multi-targeted therapy coupled with a specific targeting of brain tissue alone.

One of the most promising strategies for delivering therapeutics in the CNS is the intranasal pathway, which as a noninvasive technique for bypassing the BBB through olfactory and trigeminal nerve allows direct transport of the medicinal substances in the CNS. However, respiratory mucosa, which comprises 80%–90% of nasal mucosa is highly vascularized and could promote systemic absorption.¹³ So, the design of the suitable system for CNS targeting should take into the consideration both possibilities and hence designed system should be characterized with appropriate physicochemical and biopharmaceutical properties. A system tailored for targeted brain delivery needs to satisfy the following criteria: biocompatibility and biodegradability, particle size up to approximately 100–700 nm for nose to brain targeting and ~ 200 nm for systemic pathway CNS targeting, spherical form, low surface charge, steric stabilization, bio/mucoadhesivity, high-encapsulation efficacy, controlled release rate capability, satisfactory stability and bioactivity.^{14–18}

Lipid nanoparticles (solid lipid nanoparticles [SLN]) and nanostructured lipid carriers [NLC]) are colloidal particles composed of a biocompatible and biodegradable lipid matrix that is solid at room temperature and show a particle size commonly between 100 and

400 nm. They combine the advantages of other colloidal systems for targeted action, such as liposomes, polymeric nanoparticles and emulsions, and at the same time avoid or minimize their negative properties.^{19,20} Compared with SLN, NLC are characterized by greater encapsulation efficiency and loading capacity (drug loading), due to the smaller subordination of the lipid matrix, making lipid active substances easily incorporated into the matrix. The solid matrix protects the built-in active substances from chemical degradation and gives the flexibility to modify the release rate of the active component. Because of their relatively small size and biocompatibility, NLCs are particularly suitable for the incorporation of substances that are necessary to pass the BBB.^{21,22} By adjusting (modifying) the physicochemical and biopharmaceutical properties of NLC (particle size, surface charge, encapsulation efficiency, release rate), selective targeting and retention of the system, as well as effective therapeutic concentration in the brain could be obtained.

Selecting the right system for the intended purpose is not enough. In order to achieve great results in the design of such a complicated formulation, a systematic, science and risk-driven methodology to design drug products that prospectively plans their desired quality features should be applied. As such, the aim of this study was design, development and physicochemical and biopharmaceutical characterization of NLC loaded with *Salvia officinalis* extract with the potential for efficient intranasal delivery and effective and safe treatment of AD, supported on a sequential experimental strategy in order to find the optimal conditions for providing a drug product with a sustained therapeutic effect.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Materials

Phospholipon 90H (PL) was purchased from Phospholipid, Germany, oleic acid (OA) from Sigma-Aldrich, Germany, Tween 80 from Merck, Germany, Poloxamer 407 from BASF, Germany, Chitosan low-molecular weight (Sigma-Aldrich, Germany) and Ethanol 96% from Alkaloid, N. Macedonia. The 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), Bradford Reagent (0.1–1.4 mg/ml protein), Bovine Serum Albumin (BSA) and fluorescein sodium were purchased from Sigma Aldrich, Germany. Methanol, chloroform, formic acid and acetonitrile were of HPLC grade purity (Merck, Germany). Phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS pH 7.4) was prepared *ex tempore* (Ph. Eur. 9). *Salvia officinalis* leaves were kindly donated by Alkaloid, N. Macedonia. All other used chemicals and reagents were of analytical purity and used without additional modifications.

2.2 | Preparation of NLC loaded with FSE

The freeze-dried *Salvia officinalis* extract (FSE) was obtained by extraction of 100 g of dry herbal material with 2 L of 70% (v/v) methanol under continuous magnetic stirring (24 h, 60°C, 250 r/min, Variomag, Multipoint HP 15, Germany). Afterwards, methanol was removed by

evaporation under reduced pressure (40°C, 50 r/min, 40 mBar, Rotovapor R-200/205, Buchi, Switzerland). The obtained extract was freeze-dried (24 h, 0.05 mbar, -47°C, Labconco, USA).

The NLCs loaded with FSE (NLC-FSE) were prepared using a previously described solvent evaporation method.^{23,24}

Briefly, the oil phase (PL, OA, ethanol and FSE) and the aqueous phase (Poloxamer 407, Tween 80 and purified water) were heated to 70°C, a temperature adequate to maintain the lipids in liquid state and dissolve them in the organic solvent. Nanodispersion was prepared by dropwise addition of the oil to the aqueous phase under magnetic stirring (70°C, 250 r/min, Variomag, Multipoint HP 15, Germany). Organic solvent (ethanol) was evaporated under continuous magnetic stirring at previously mentioned conditions. Solidification of NLC was performed by cooling the obtained hot-lipid emulsion at 25°C under magnetic stirring at 250 r/min (Variomag, Multipoint HP 15, Germany). The NLC dispersion was left overnight in a refrigerator at 2–8°C for recrystallization of the lipids and formation of the final particle structure.

2.3 | Experimental design studies and optimization of NLC-FSE

In order to determine the boundaries of the design space, one factor at a time (OFAT) experiments were conducted. The quantities of ethanol (2.5–8.6 g), OA (0.0325–0.13 g), PL (0.1–0.2 g) and Tween 80 (0.1–0.3 g) were varied, and their influence upon particle size and particle size distribution, the amount of encapsulated FSE and *in vitro* release characteristics were observed.^{23–26} Ethanol, PL, and Tween 80 were identified as significant factors (one way ANOVA, $p < .05$) and their quantities were varied in the design space in order to quantify their impact on the NLCs' physicochemical and biopharmaceutical properties that is, responses of interest (particle size and particle size distribution, zeta potential, amount of incorporated FSE and *in vitro* release). The quantities for OA, FSE, Poloxamer 407 and water were 65 mg, 25 mg, 45 mg and 8.805 ml, respectively, while the amounts of ethanol, PL and Tween 80 were varied according to the experimental design studies. An orthogonal central composite design (OCCD) was used, (Design-Expert® V8 trial, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN) and 20 experiments were designed, with all factors (ethanol, PL and Tween 80) varied on two levels, with one replication for each factorial and axial point, and 6 replications of the central points. The coded and actual values of three studied formulation variables are shown in Table 1, while designed experiments are presented in Table 2. The experiments were performed in random order.

2.4 | Characterization of NLC loaded with FSE

2.4.1 | Particle size

Particle size was determined by laser diffractometry using Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd., UK equipped with Hydro 2000S,

TABLE 1 Coded and actual values of studied formulation variables

Level	Low		High	
	Coded values	Actual values	Coded values	Actual values
A: Ethanol (g)	-1	5.00	+1	10.00
B: Tween 80 (g)	-1	0.15	+1	0.30
C: PL (g)	-1	0.10	+1	0.30

TABLE 2 Experimental design points for the studied variables in terms of actual values

Factors				
Std	Run	A: Ethanol (g)	B: Tween 80 (g)	C: PL (g)
13	1	7.50	0.22	0.05
14	2	7.50	0.22	0.35
8	3	10.00	0.30	0.30
12	4	7.50	0.34	0.20
9	5	3.69	0.22	0.20
11	6	7.50	0.11	0.20
4	7	10.00	0.30	0.10
10	8	11.31	0.22	0.20
20	9	7.50	0.22	0.20
1	10	5.00	0.15	0.10
3	11	5.00	0.30	0.10
15	12	7.50	0.22	0.20
2	13	10.00	0.15	0.10
5	14	5.00	0.15	0.30
18	15	7.50	0.22	0.20
17	16	7.50	0.22	0.20
16	17	7.50	0.22	0.20
6	18	10.00	0.15	0.30
7	19	5.00	0.30	0.30
19	20	7.50	0.22	0.20

Malvern Instruments Ltd., UK, for wet dispersions. The method was previously developed and validated in terms of sample preparation (NLC dispersion amount 50, 100, 200, and 300 mg), dispersion media (distilled water and 0.9% NaCl), dispersion time (5, 10 and 15 min), refractive index determination (Mettler Toledo RM40, Switzerland), measurement duration (2, 7, 10 and 15 s), repeatability/sample measurement stability (1, 5, 7, and 10 min), stirring rate (500, 1000, 1500, 2520 r/min), linearity/obscuration (0.2%, 0.5%, and 1%), reproducibility and intermediate precision. Based on the obtained results, NLC particle size was determined under the following conditions: NLC-FSE dispersion (250–300 mg) was diluted in 50 ml 0.9% NaCl and redispersed under continuous magnetic stirring (25°C, 15 min., 250 r/min, Variomag, Multipoint HP 15, Germany). An adequate aliquot was transferred to the optical measurement cell containing distilled water as dispersing cell medium. Measurement duration was set to 10 s, stirrer rate at 2520 r/min and sample

measurement stability at 5 min. The particle size of NLC-FSE was expressed as D_{50} (nm).

At least three samples from each batch were measured and at least 10 measurements for each sample were recorded.

2.4.2 | Loading of FSE in the NLC

The extract loading of the NLC-FSE was determined using an indirect method, that is, by quantification of the amount of nonencapsulated FSE. The aqueous phase containing the nonencapsulated FSE was carefully and quantitatively separated from the dispersion of the NLC particles after centrifugation of the samples (30 min, 12,500 r/min, MiniSpin Plus, Eppendorf International, Germany). The amount of nonencapsulated FSE present in the supernatant was determined by a previously validated HPLC method described by ref. [27]. In brief, the analyses were conducted by means of a HPLC system (Agilent 1100 Series, DAD detector, Germany) using the Waters Spherisorb ODS-2; 150 mm × 4.6 mm; 5 μm column. The used mobile phase consisted of: A - 1% formic acid (pH 3.0) and B - acetonitrile (90:10 v/v). The chromatographic conditions were set according to the method described by ref. [27] with small modifications (gradient elution 0–20 min 15% B; 20–25 min 40% B; 25–30 min 15% B and flow 1 ml/min). Quantification was made using UV/VIS DAD at 327 nm where rosmarinic acid as main component of FSE is detected.

The amount of encapsulated FSE was expressed as μg of encapsulated FSE per mg PL (μg FSE/mg PL) and was calculated using a calibration curve obtained from a series of standard solutions of the *Salvia officinalis* extract using the following equation (Equation 1):

$$DL(\mu\text{g FSE/mg PL}) = \frac{(\text{total FSE used in formulation}(\mu\text{g}) - \text{nonencapsulated FSE}(\mu\text{g}))}{\text{PL in formulation}(\text{mg})} \quad (1)$$

2.4.3 | *In vitro* release studies

In vitro release studies were performed using a membrane diffusion method. Certain dispersion volume of NLC particles containing 4 mg of FSE was placed in cylindrical tubes with an attached membrane on the bottom (MEMBRA-CEL[®] dialysis tubing, regenerated cellulose, MWCO 7000 RC, Serva, Germany). The dissolution tests were carried out in 40 ml PBS pH 7.4 (Ph. Eur. 9.0) (37°C, 100 r/min), under sink conditions and in triplicate.

Samples for analysis were taken at appropriate time intervals (0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, and 24 h) and the amount of released FSE was determined by the aforementioned HPLC method. The amount of released extract from NLC-FSE over time is expressed as % of the initial available amount.

The kinetic modeling of the dissolution data was performed with the DDSolver 1.0 program (menu-driven add-in program for Microsoft Excel).²⁸

2.5 | Optimization of the formulation

Based on results from experimental design studies and established mathematical models subsequent optimization of formulation was carried out in means of minimal particle size (D_{50}), minimal percent of initial FSE released in the first 2 h, and maximal DL expressed as μg FSE/mg PL.

Predicted optimal formulation of NLC-FSE (NLCo) was prepared by previously described solvent evaporation method. Additional two NLCo formulations were prepared by subsequent surface modification using Chitosan low-molecular weight (Sigma-Aldrich, Germany) (NLCC) and Poloxamer 407 (BASF, Germany) (NLCp). Briefly, a definite volume of the prepared NLCo was mixed with a solution of the appropriate polymer (0.5% chitosan or 4% poloxamer 407) in ratio of 1:2 in favor of the polymer solution. Afterwards the samples were mixed on a magnetic stirrer (2 h, 25°C, 200 r/min). The coated NLC particles were separated from the polymer solution by centrifugation (45 min, 12500 r/min, MiniSpin Plus, Eppendorf International) and then redispersed in water to primary NLCo volume.

Also, analogues without FSE (blank NLCs) were prepared under the same conditions and were used for differential scanning calorimetry (DSC) and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) studies (blank NLCo) and for protein adsorption FTIR studies (blank NLCo, blank NLCC and blank NLCp).

2.6 | Characterization of the optimal formulation

NLCo, NLCC and NLCp were characterized in terms particle size and particle size distribution, drug loading and *in vitro* release (during 48 h) by above described methods. Furthermore they were subjected to additional characterization.

2.6.1 | Morphological properties

Morphological properties were examined using field emission scanning electron microscope (FESEM) without gold coating (Zeiss ULTRA plus, Zeiss Germany). NLC dispersion was placed on metal surface and left to air-dried at ambient temperature.

Also, NLCs were visualized by transmission emission microscopy (TEM). The NLC prepared sample was placed slowly on the surface of a formvar coated copper grid (100 mesh). The grid was placed on filter

paper (WhatmanTM 42, Austria) in order to absorb the excess solvent and air-dried at ambient temperature. After drying, the sample was loaded into TEM (JEM – 1400, Jeol, Japan) attached to a digital camera (Veleta TEM Camera, Olympus, Germany) and controlled by iTem software v.5.

2.6.2 | Zeta potential

Zeta potential (Zetasizer Nano Series, Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) was determined after dispersing 100 mg of the NLC-FSE samples in 10 ml of PBS pH 7.4 (Ph. Eur. 9) with low molarity (0.00118 M) and low-ionic strength (0.001183 M) under magnetic stirring (25°C, 250 r/min, 15 min, Variomag, Multipoint HP 15, Germany).

The measurement was performed in disposable transparent cuvettes at 25°C with thermostating time of 120 s, viscosity of the medium 0.8894 cP, dielectric constant of water (ϵ) around 78.5 and angle of 173°. At least three batches from each NLC-FSE sample and at least 3 analyses from each batch were measured. Each analysis was averaged from at least 12 measurements.

2.6.3 | DSC analysis

NLCo, blank NLCo (without FSE) and appropriate binary mixtures (in ratio 1:1) and mixture of all samples' components with and without FSE (in ratio present in the particles) as well as individual formulation components were examined by DSC. Analyses were performed with the thermic system Mettler Toledo DSC 1 STAR^e System (Mettler Toledo, USA). The samples (5–7 mg) were scanned in perforated aluminum crucible pans (40 μL), under dynamic nitrogen atmosphere (50 ml/min), in the temperature region of 0–150°C using a heating rate of 10°C/min.

2.6.4 | FTIR analysis

The infrared spectra were recorded by the ATR module of a Fourier transform infrared spectrometer (Thermo Nicolet NEXUS 470 FTIR, USA). Each spectrum was recorded in the 4000–500 cm^{-1} range, with a resolution of 2 cm^{-1} and averaged from 32 scans. Prior to recording the FTIR spectra, the samples were freeze-dried (0.05 mBar, –47°C, 24 h, Labconco, USA). FTIR spectra of the individual formulation components as well as of the blank NLCo, NLCo, NLCC and NLCp were also recorded.

2.6.5 | Protein adsorption studies

The protein adsorption studies were performed using previously described methods.^{29,30} In brief, 200 μL of the NLC samples equal to 5 mg lipid phase was incubated with 5 mg BSA in 5 ml PBS pH 7.4 (Eur. Ph. 9.0) at 37°C, 75 r/min on a thermostatic water bath

(Unitronic OR, Selecta, Spain) with horizontal mixing for 1 h. Unbound protein was removed by centrifugation, in three separate washing cycles with PBS (12,500 r/min, MiniSpinPlus, Eppendorf International). Afterwards the sample volume was corrected to the initial volume of the NLC dispersion that is, 5 ml. The amount of adsorbed BSA was calculated indirectly, that is, by determination of the amount of unbound protein into the supernatant by UV spectroscopy (595 nm, Victor X4 2030 Multilabel Reader, Perkin Elmer), after a reaction with a Bradford reagent (Sigma-Aldrich, Germany), based on the Bradford method (microtiter plate protocol). The results were expressed as percentage of adsorbed BSA onto the NLC surface (Equation 2).

$$\% \text{ of protein adsorption} = \frac{\text{amount of BSA adsorbed on NLCs}}{\text{total amount of BSA}} * 100, \quad (2)$$

ATR-FTIR spectra (using conditions reported above) of freeze dried samples were recorded to get insight into the qualitative nature of BSA adsorption on the NLC particles. Curve fitting of the Amide I band using mixed Gaussian-Lorentzian function and subsequent band iteration was performed to elucidate the secondary structure of BSA adsorbed on the blank (nonloaded) formulations. The identified peaks were assigned to the appropriate secondary structure as previously described.³¹

2.6.6 | Determination of the antioxidative effect

A modified ORAC (oxygen radical absorbance capacity) assay test was applied for determination of antioxidative capacity of NLCo, NLCc and NLCp. Exact amount of NLCo, NLCc and NLCp that equals to 0.05 mg FSE (~40 μ L) was placed in a 96 wells plate. In each well, 150 μ L of 10 nM solution of fluorescein sodium (Merck, Germany) and 25 μ L of 100 mM of 2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH, Aldrich chemistry, Germany) as an initiator for the generation of free radicals were added. Also, samples (40 μ L) of chitosan (0.5%) and poloxamer 407 (4%) solutions were examined.

For positive control, solution of fluorescein with AAPH was used, while solution of fluorescein without the addition of AAPH was used for negative control. The plate was kept in dark space at 37°C. The fluorescence of the samples was measured in the beginning of the experiment and afterwards in assigned time points (0.5, 1, 1.5, 2 h) using Multilabel Reader (Perkin Elmer, USA) (excitation at 492 nm, emission at 535 nm). The results were calculated as a percent of the primary sample fluorescence (Equation 3).

$$\% \text{ of initial fluorescence} = \frac{\text{fluorescence of sample in given time period}}{\text{fluorescence of sample in 0 min}} * 100. \quad (3)$$

2.7 | hCMEC/D3 cell culture studies

In vitro permeability studies were performed on cell culture of human cerebral microvascular endothelial cells (hCMEC/D3) which was

obtained under license of CELLutions Biosystems/Cedarlane®, Canada. T-75 cell culture flasks (Greiner Bio-One GmbH, Germany) were first coated with 0.05 mg/ml collagen type I from rat tail (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) and were allowed to stand for a minimum of 1 h at 37°C. Cells were cultured in a cell medium (EndGRO™-MV Complete Media Kit, Merck, Germany) at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. The cell medium was replaced every 2–3 days, until the cells become confluent. Afterwards, the media was removed and the cells were detached from the culture flask walls after incubation (37°C for 8 min) in 0.1 mg/ml trypsin-EDTA (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) solution. The cell suspension was centrifuged at 1500 r/min for 3 min and the supernatant was removed. Subsequently, cells were suspended in 5 ml cell medium and cells were ready for further research. hCMEC/D3 cells were cultured according to guidelines by the manufacturer.

2.7.1 | *In vitro* permeability studies

For *in vitro* permeability experiments, hCMEC/D3 cells were cultured on a 12 well plate transwell inserts previously coated with collagen type I from rat tail (5*10⁴ cells/cm²). 0.5 ml of cell media was added into the apical compartment of the well and 1 ml into the basolateral chamber of the well. Cells were grown to confluence for six days (at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂) and medium was changed every three days. Under these culture conditions, cells formed a confluent monolayer. Transendothelial electrical resistance (TEER) was measured in duplicate inserts on day three to six of culture (Millicell® ERS-2, Epithelial Volt-Ohm Meter, Millipore, USA). After the transendothelial electrical resistance (TEER) of the cell monolayer reached value >50 Ω cm², the samples of NLCo, NLCc and NLCp particles resuspended in 0.5 ml cell culture media were added into the upper chamber of the wells. The plate was incubated on thermostatic water bath with horizontal mixing (Unitronic OR, Selecta, Spain), at 37°C, 75 r/min. Insight of the transport of NLC formulations across the membrane formed by the hCMEC/D3 cells was obtained through the amount of released extract from the different NLC formulations in the basolateral chamber of the well. Samples for analyses (0.5 ml) were taken from the lower compartments of the wells at 2, 4, and 6 h after the start of the incubation. The samples were diluted (1:4) with HPLC mobile phase used for determination of the *in vitro* release of the extract,²⁷ filtered through 0.45 μ m pore size filters (Sartorius, Germany) and analyzed using the same method. The viability of the cells was checked every 2 h. All experiments were performed in duplicate and transwell inserts without cells were included as control for membrane interference.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

Methanol (70% v/v) was used for extraction of *Salvia officinalis* leaves as according to literature data²⁷ compared to other solvents (pure

methanol, pure ethanol, acetone, water, 70% v/v ethanol and 70% v/v acetone) methanolic extracts are characterized by a higher number of extracted compounds regardless of extraction temperature (25°, 40° and 60°C). Also, the 70% v/v methanol as a solvent for extraction was chosen as the findings of ref. [32] as well as ref. [33] points out that higher antioxidant activity (radical scavenging activity) is determined in methanol/water extracts of *Salvia officinalis* compared to aqueous and acetone extracts, respectively. The yield of the extraction was $11.25 \pm 0.65\%$ (11.25 g FSE were obtained from 100 g raw material).

Design, development, and optimization of NLC formulation with encapsulated FSE were carried out using sequential experimental strategy. As was already mentioned, in the first phase OFAT experiments were conducted to define the design space boundaries. In the second phase experimental design studies that is, response surface methods (RSM) were used with the rationale of finding the causality and establishing the relationship between variables of interest (ethanol, tween 80 and PL as independent variables and particle size, drug loading and initial FSE released in the first 2 h as dependent variables). Using solvent evaporation method designed NLC formulations were prepared and subjected to characterization according to described methods. Mathematical models describing the relations between the followed responses and the studied variables were established. Optimization was carried out in an accurately defined design space related to the recommended physicochemical and biopharmaceutical properties of NLC for intranasal delivery. The experimental design studies enabled acquiring detailed knowledge and understanding of prepared

formulations complexity, as well as determination of tested variables values that would result with formulation characterized by optimal that is, desired, expected or best therapeutic effect. Using the applied sequential strategic approach the danger of caring out the optimization in small lateral or design space with less importance was avoided.

3.1 | Experimental design and optimization of formulation

The particle size (D_{50} (nm)), drug loading ($\mu\text{g FSE}/\text{mg PL}$) and initial FSE released in the first 2 h (%) values of formulations generated with Central Composite RSM DoE are presented in Table 3.

Particle size is one of the most important parameters that influence the amount of encapsulated material, targeted and controlled release, bioavailability as well as cellular uptake, and overall *in vivo* fate of the particulated carriers.^{34,35} Therefore, it is of utmost importance to determine the influence of the formulation factors on this parameter. Most studies in the area of intranasal delivery indicate that the particle size of NLCs in the range 100–700 nm presented capability for increasing the amount of active substance that reaches the brain compared to free substance administered intranasally.^{14,18,36,37}

The size of the prepared formulations ranged between 131.6 and 453.9 nm. In the initial modeling, D_{50} (nm) values for samples 1 and 2 were identified as outliers and were not taken into consideration during the modeling. The influence of the investigated formulation

TABLE 3 Responses of the designed experiments

Run (sample)	Factor A: Ethanol (g)	Factor B: Tween 80 (g)	Factor C: PL (g)	Response Y1: $D_{50}(\text{nm}) \pm \text{SD}$	Response Y2: DL ($\mu\text{g FSE}/\text{mg PL}$) $\pm \text{SD}$	Response Y3: % released FSE at 2 h $\pm \text{SD}$
1	7.50	0.22	0.05	251 \pm 1.64	402.87 \pm 9.2	10.67 \pm 0.5
2	7.50	0.22	0.35	169 \pm 22.66	47.19 \pm 1.02	15.24 \pm 0.58
3	10.00	0.30	0.30	150.6 \pm 9.83	69.81 \pm 1.21	12.72 \pm 0.35
4	7.50	0.34	0.20	138.9 \pm 2.83	44.75 \pm 0.98	9.76 \pm 0.51
5	3.69	0.22	0.20	135.2 \pm 2.70	50.41 \pm 0.9	10.45 \pm 0.4
6	7.50	0.11	0.20	132.0 \pm 4.29	65.61 \pm 1.25	6.91 \pm 0.25
7	10.00	0.30	0.10	133.9 \pm 2.47	112.00 \pm 2.2	6.62 \pm 0.3
8	11.31	0.22	0.20	139.6 \pm 1.50	61.26 \pm 1.32	5.09 \pm 0.15
9	7.50	0.22	0.20	149.5 \pm 6.71	82.12 \pm 1.52	7.07 \pm 0.18
10	5.00	0.15	0.10	150.3 \pm 0.49	90.71 \pm 1.63	3.23 \pm 0.2
11	5.00	0.30	0.10	151.7 \pm 1.16	92.25 \pm 1.82	2.12 \pm 0.3
12	7.50	0.22	0.20	134.5 \pm 4.32	63.52 \pm 1.2	6.82 \pm 0.42
13	10.00	0.15	0.10	146.2 \pm 3.49	105.60 \pm 1.96	5.29 \pm 0.31
14	5.00	0.15	0.30	426.4 \pm 12.79	48.77 \pm 1.56	12.80 \pm 0.6
15	7.50	0.22	0.20	137.1 \pm 2.25	48.42 \pm 1.53	6.34 \pm 0.2
16	7.50	0.22	0.20	131.6 \pm 11.02	57.99 \pm 0.74	4.29 \pm 0.34
17	7.50	0.22	0.20	137.9 \pm 5.74	53.97 \pm 0.69	2.60 \pm 0.21
18	10.00	0.15	0.30	453.9 \pm 21.69	53.25 \pm 1.33	6.37 \pm 0.28
19	5.00	0.30	0.30	147.9 \pm 95.37	39.00 \pm 0.84	2.74 \pm 0.36
20	7.50	0.22	0.20	157.7 \pm 63.90	59.90 \pm 1.04	2.96 \pm 0.27

factors on the particle size can be best described by a reduced cubic model. Statistically significant factors identified by one-way ANOVA were factor C, C² and the interactions BC and A²B, where A is ethanol, B is Tween 80 and C is PL.

The equation describing the dependence of D₅₀ (nm) of the studied variables (Equation 4) expressed in coded values was as follows:

$$D_{50} = 139.88 + 1.19 * A + 2.25 * B + 74.58 * C - 4.80 * A * B + 6.53 * A * C - 71.35 * B * C - 1.07 * A^2 + 81.31 * C^2 - 76.33 * A^2 * B, \quad (4)$$

Equation 4 indicates that D₅₀ of NLCs would increase by increasing the amount of PL (factors C and C²). This effect is probably associated with the decrease of surfactant/lipid phase ratio resulting in an insufficient amount of surfactant that can effectively stabilize the emulsion and prevent the coalescence of the oil droplets, thus enabling the formation of larger particles.³⁸ On the other hand, the negative influence of A²B (ethanol*Tween 80) and BC (Tween 80*PL) interactions on D₅₀ could be linked to the relative concentration of lipid in the oil phase that affects its viscosity and surface tension that is, the lower they are the easier oil droplets breaking would be, thus resulting with smaller emulsion droplets and hence smaller NLC particles.²⁸

High drug loading (DL) is desirable for the NLC-FSE to be effective carriers of the particular active substance and to be able to bring an appropriate drug amount at the site of action. In the 20 formulations examined, DL ranged from 39.00 to 402.87 µg FSE /mg PL. The DL value for sample 1 was identified as an outlier and was not taken into consideration during modeling. The influence of the investigated factors on DL can be described with a reduced quadratic model, and the one-way ANOVA indicated that significant variables for this parameter were A (ethanol), C (PL), and C². The equation that describes the dependence of DL on the three formulation factors (Equation 5) expressed in coded values is:

$$DL (\mu\text{g FSE/mg PL}) = 59.81 + 6.84 * A - 1.35 * B - 25.18 * C + 3.9 * A * B + 14.38 * C^2, \quad (5)$$

The positive coefficient in front of ethanol indicates that the increase in ethanol content in the formulation increases DL, while the negative coefficient in front of PL indicates that lower amounts of PL would result with higher DL. A logical conjecture is that a higher amount of ethanol would result with a longer time for its evaporation at the NLCs' preparation conditions and hence delayed solidification of NLC, thus providing enough time for FSE to be incorporated into their matrix. Also, at lower amounts of PL as solid lipid (and a constant amount of OA as a liquid lipid), more inner imperfections in the NLCs' crystal structure (less ordered solid lipid matrix) would be present thus enabling higher amounts of FSE to be encapsulated into the NLC.²⁰

The release of the active substance over time is an important parameter because the purpose of designing nanosystems for the delivery of active substances is to provide not only delivery to the site of action, but also a prolonged and controlled release of the active

substance at the target site. Therefore, a slow release is desirable for the NLC-FSE, especially in the initial hours in order not to lose a large amount of active substance before translocation of the NLC-FSE to the CNS in order to provide appropriate concentrations locally at the site of action over a prolonged period of time. For RSM modeling, data for % FSE released in t = 2 h were taken and the values obtained ranged from 2.12 to 15.24%. After a square transformation of the results, the influence of the investigated factors on the percentage of released FSE over 2 h can best be described with a nonhierarchical reduced cubic model, and the one-way ANOVA indicates that the statistically significant factors for this parameter are C and the interactions AB, C² and ABC, where as it was already noted A refers to ethanol, B to Tween 80 and C to PL. The equation that describes the dependence of the %FSE released in the initial 2 h from the studied formulation factors (Equation 6), expressed in the coded values, is as follows:

$$(\% \text{ released FSE } t = 2\text{h})^2 = +35.193 + 36.961 C + 37.393 * AB + 43.561 * C^2 + 31.953 * ABC, \quad (6)$$

The positive coefficient in front of C indicates a direct relationship among the used amount of PL and the percent of FSE released. This is probably due to an increase in the value of the solid/liquid lipid ratio that affects the properties of the resulting NLC-FSE.^{39,40} Namely, solid lipids are subject to recrystallization and rearrangement of molecules in order to achieve a state of lower energy during storage. This process results in the formation of a lipid matrix with a lower number of deformities and the active substance trapped in the intermolecular spaces can be quickly expelled. By incorporating a suitable amount of liquid lipid, the rapid expulsion of the active substance is prevented.

ANOVA statistical analysis of the selected models (Table S1 in section Supporting information) for the examined responses showed that the predicted R² (Pred-R²) and the adjusted R² (Adj-R²) in all examined responses differ less than 0.2, which is desirable having in mind that greater difference would indicate a problem with either the data or the selected model. The values for adequate precision are greater than four and indicate that the proposed models can be used for appropriate navigation in the designed space.

The *in vitro* release profiles for all 20 formulations are shown in Figure 1. All formulations showed slow release of FSE within 24 h (within the limits of 12.45 to 32.64%). By comparing the coefficients of correlation of different kinetic models, it was concluded that the best representation of the formulations dissolution profiles are given by the Peppas-Sahlin model (Equation S3 in section Supporting information) Table 4.

The Peppas-Sahlin model combines two release mechanisms, Fickian diffusion and case-II transport. The values for the k₁ and k₂ coefficients indicate which of them is dominant that is, if k₁ > k₂ Fickian diffusion dominates and when k₂ > k₁ the case-II transport is the main mechanism that governs FSE release through the lipid matrix of NLC-FSE.⁴¹

The optimization of NLC-FSE was carried out by means of minimal particle size (D₅₀), minimal percent of initial FSE released in the

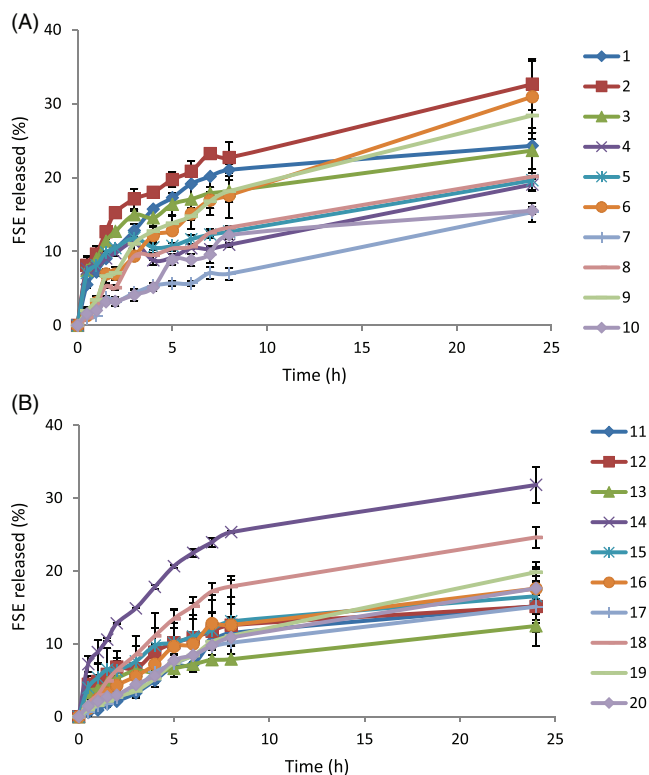


FIGURE 1 *In vitro* release profiles of the NLC-FSE formulations generated by the experimental design: (A) samples 1–10 and (B) samples 11–20. SD bar is visualized for those values that outgrow the corresponding marker size

first 2 h, and maximal DL expressed as μg FSE/mg PL. The desired individual responses were combined to obtain the final or total desirability function. Selected optimal formulation was composed of 10.0 g Ethanol, 0.3 g Tween 80 and 0.1 g PL, while predicted values of responses of interest were as follows: D_{50} 132.602 nm, DL 108.7309 μg FSE/mg PL and released FSE at 2 h 6.8719% with Desirability function value of 0.8461.

3.2 | Characterization of optimal formulation

Predicted optimal formulation of NLC-FSE (NLCo) as it was already mentioned was prepared by solvent evaporation method and, subsequently, its surface was modified either with low molecular weight chitosan (NLCc) or poloxamer 407 (NLCp). Chitosan is biocompatible, biodegradable polymer that is generally recognized as safe. It was selected with a rationale of its bio/mucoadhesive properties and attribution to positive surface charge that would result in prolonged residence time and reduced mucociliary clearance of NLCs from the nasal cavity as well as its reversible opening on tight junctions to enhance the probability for cell internalization. Poloxamer 407 was used for its bioadhesion and improved drug penetration properties through the mucosa layer thus facilitating NLC transport to the brain⁴² as well as its “stealth” properties which would significantly decrease the immune system detection of particles hence prolonging their

TABLE 4 Kinetic modeling of the *in vitro* release data related to the NLC-FSE samples generated by the experimental design

Peppas-Sahlin model				
Samples	k_1	k_2	m	R
1	7.77	−0.6	0.649	0.9989
2	11.61	−0.87	0.437	0.9972
3	10.88	−1.18	0.39	0.9969
4	5.32	1.94	0.196	0.9354
5	5.92	2.08	0.196	0.9765
6	4.23	−0.14	0.789	0.9967
7	2.05	0.07	0.569	0.9919
8	3.72	−0.17	0.736	0.9898
9	4.72	−0.2	0.76	0.9965
10	1.66	−0.04	1.04	0.9887
11	−21.46	22.48	0.117	0.9698
12	5.26	−0.45	0.545	0.9898
13	3.03	0.95	0.267	0.9961
14	9.44	−0.7	0.618	0.9979
15	5.47	−0.44	0.529	0.9955
16	2.25	−0.07	0.965	0.9968
17	1.37	−0.03	1.088	0.9982
18	3.51	−0.12	0.92	0.9994
19	−7.45	8.84	0.217	0.9919
20	1.77	−0.04	0.966	0.9979

circulation time and increase therapeutic efficiency.⁴³ All three formulations were subjected to further characterization.

3.2.1 | Morphological analysis

SEM and TEM photomicrographs confirmed the nanoparticulated nature of prepared optimal formulation and revealed that the NLCo were characterized with spherical form and smooth surface (Figure 2).

3.2.2 | Particle size and particle size distribution (span value)

The particle size (D_{50}) of NLCo was 135 ± 4.84 nm corresponding to the predicted value of 132.602 nm (Bias% = −1.81), while particle size distribution expressed as Span value was 1.57 ± 0.73 . NLCp and NLCc were characterized with a statistically significant increase in particle size (*t* test, $p < .05$) and particle size distribution that is, 139 ± 0.52 nm and 153 ± 0.68 nm and Span values of 4.51 ± 0.03 and 5.14 ± 0.02 , respectively. The increase in particle size was in favor of the successful coating of NLCo with poloxamer 407 and chitosan. Namely, poloxamer 407 is most likely physically adsorbed on the NLCo surface that is, hydrophobic block (polypropylene glycol) is adsorbed onto the lipid particle surface, whereas the two hydrophilic

side chains (polyethylene glycol) remain free extended into the surrounding thus forming a structure that resembles a brush on the particle surface.⁴⁴ On the other hand, chitosan presents a more complex interaction with the lipid surfaces. According to the research carried out by ref. [45,46] the chitosan primarily binds to the lipid surfaces by forming electrostatic complexes between carboxylic groups of lipids (in the particular case originating from stearic and palmitic acid from PL) and amino groups of chitosan, however, hydrophobic interactions and hydrogen bonding might take place.

Due to the somewhat wider particle size distribution, NLC suspensions were filtered through 0.45 μm pore size filters (Sartorius, Germany) and the particle size was reduced to 127 ± 5.41 nm, 127 ± 0.68 nm and 140 ± 0.74 nm, for NLCo, NLCp and NLCC, while Span values were 1.08 ± 0.14 , 1.15 ± 0.001 and 0.83 ± 0.03 , respectively.

The obtained particle size of all three formulations (NLCo, NLCp and NLCC) was found appropriate and satisfactory for the design for BBB targeting through intranasal administration.^{14,18,47}

3.2.3 | Zeta potential and electrophoretic mobility

As it can be seen from Figure 3, the zeta potential value of NLCo was -25.6 ± 0.404 mV, while NLCp and NLCC were characterized with values of -6.74 ± 0.609 mV and 22.4 ± 1.106 mV, respectively.

The negative zeta potential of the NLCo could be explained by the acidic nature of the lipid matrix,⁴⁸ while as it was expected NLCp

was characterized with lower surface charge^{49,50} ascribed to the non-ionic nature of poloxamer 407 and NLCC with positive values attributed to cationic nature of chitosan coating.^{45,51}

Zeta potential is an important parameter for *in vitro* stability. Usually, particles with high values for zeta potential (above +30 mV and below -30 mV) are considered stable due to the strong repulsive electrostatic forces that exist between them. Particles with a lower absolute value for the zeta potential can manifest instability followed by aggregation and sedimentation. However, this general rule does not take into account the effect of steric stabilization that can additionally improve the stability of the nanoparticles. Namely, ref. [52] showed that particles with low zeta potential (-7--12 mV) were stable due to the additional steric stabilization with nonionic surfactants that most likely provided a sufficient thickness and density of the layer on the particles' surface and efficiently prevent their aggregation as it is probably in the case of prepared NLC where Tween 80 and Poloxamer 407 were used.

Also, zeta potential influences *in vivo* behavior of colloidal systems such as protein adsorption in biological fluids, particle transition through biological membranes as well as cell internalization. Bearing in mind that BBB is negatively charged, one would expect that particles with a positive zeta potential would be quickly attracted to it and would easily cross it. However, studies have shown different correlations among brain translocation efficacy and absolute values of zeta potential of the particulated carriers. In general, after intranasal administration, a high percent of transported particles to the brain are

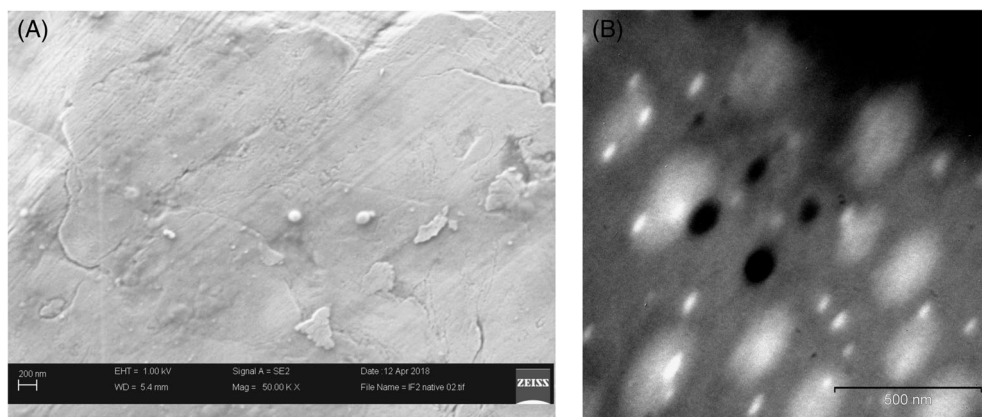


FIGURE 2 Photomicrographs of the prepared NLCo: (A) SEM and (B) TEM

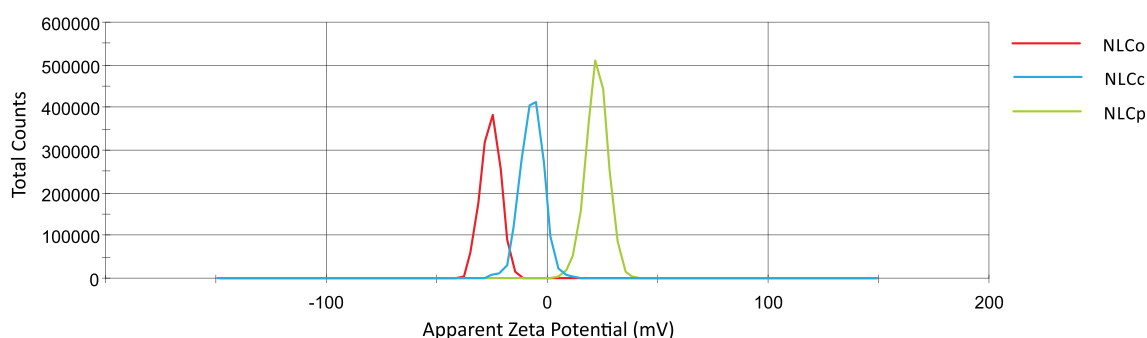


FIGURE 3 Zeta potential of the NLCo, NLCC and NLCp

TABLE 5 Main thermal features determined by DSC in individual formulation components, binary physical mixtures, physical mixture of all components in blank NLCo and NLCo, as well as blank NLCo and NLCo particles

Component	Onset T (°C)	Peak T (°C)	Endset T (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)
PL ^a	67.29	68.83	70.64	-0.12
	71.64	75.83	80.98	-1.45
	115.14	122.67	128.16	-79.32
	142.05	144.83	148.90	-0.45
	172.95	178.17	13.56	-7.84
OA	5	7.67	13.28	-3.58
Tween 80	-620.81e-12	2.5	7.61	-2.41
	44.59	73.33	97.36	-7.36
P407	54.82	58	60.71	-129.94
FSE	122.2	130.83	141.55	-4.21
PL/OA	-45.35e-3	4.37	17.43	-7.98
	38.04	45.2	49.36	-9.16
	106.54	112.83	121.98	-2.12
PL/P407	53.13	55.92	60.28	-66.12
	114.86	121.08	124.83	-34.99
PL/Tween 80	-80.57e-3	3.68	16.48	-7.69
	73.35	78.56	81.89	-3.26
	105.68	112.38	119.57	-9.62
PL/FSE	66.17	68.15	69.86	-0.11
	70.74	74.14	79.33	-0.36
	106.37	117	122.1	-2.75
OA/Tween 80	-86.86e-3	2.65	9.5	-4.41
	49.17	74.27	78.4	-5.09
OA/P407	0.64	7.34	12.96	-4.9
	39.67	48.23	52.01	-71.57
	111.5	112.85	114.83	32.22e-3
	115.22	117.69	121.03	0.41
OA/FSE	-54.46e-3	3.24	7.74	-1.31
	125.46	130.35	141.88	-3.39
Tween 80/P407	-68.67e-3	3.68	13.48	-5.98
	48.72	53.2	57.23	-70.88
Tween 80/FSE	-54.59e-3	3.36	9.65	-3.72
	120.63	131.58	148.24	-12.54
P407/FSE	53.21	55.43	60.67	-90.56
	130	137.52	143.24	-0.79
Physical mixture	44.56	48.03	52.53	-9.45
FSE physical mixture	44.90	48.37	52.67	-8.75
Blank NLCo	42.6	48.67	53.87	-11.53
	94.3	110.83	121.53	-992.49
NLCo	43.3	49	53.88	-5.45
	97.34	114.17	125.66	-1512.77

^aPL (Phospholipon 90H), FSE (Freeze-dried Salvia extract), OA (Oleic acid), P407 (Poloxamer 407), Physical mixture contains PL, OA, Tween 80 and P407 while FSE Physical mixture is composed of PL, OA, Tween 80, P407 and FSE.

observed when the surface charge is in the range between -20 and 20 mV, with higher efficacy as it is closer to zero.¹⁴

3.2.4 | DSC analysis

DSC analyses were performed to determine the possible interactions between formulation components and to determine the degree of crystallinity of the NLC lipid matrix. Table 5 condenses all important thermal parameters for the individual components, binary physical mixtures, physical mixture of all components of blank NLCo and NLCo as well as of the blank NLCo and NLCo particles.

DSC curves of NLC main component, Phospholipon 90H (- Figure S1a in section Supporting information), is characterized by several thermal events. The first negligible endothermic peak (68.83°C) is most likely related to the hot movement of phospholipids polar head group,⁵³ the second weak peak (75.83°C) is related to the phase transition of PL,⁵⁴ while the major thermal event occurring at 122.67°C is attributed to phosphatidylcholine transition to the liquid crystalline state due to side chain partial melting.^{55,56} Diminishing peaks at 144.83°C and 178.17°C reflect further PL phase transitions^{55,56} when carbon-chain undergo other isomeric or crystal changes.⁵⁷ Poloxamer 407 (Figure S1a in section Supporting information) showed one major peak at 58°C reflecting its melting point.^{58,59} The broad endothermic peak of Tween 80 at 73.33°C (Figure S1b in section Supporting information) is probably linked to its cloud point (around 65°C) when dehydration of the oxyethylene head groups of the molecule occurs.⁶⁰ DSC results for OA (Figure 4b) were consistent with literature data which points out the melting of the solid material that begins at 4°C .⁶¹ The FSE thermal curve (Figure S1b in section Supporting information) exhibits broad endothermic peak at 130.83°C that is most likely attributed to volatile compounds present in the extract.⁶²

Except in the case of PL/OA (Figure S2a in section Supporting information), all other binary mixtures did not manifest significant changes in the thermal behavior despite the subtle shifting of the thermic events (Figure S2 in section Supporting information) as well as tenuous change in ΔH (Table 5) as a result of the variations of the concentration loadings.

The PL/OA curve reveals the absence of all peaks characteristic for PL and evolvement of new peak at 45.2°C . These changes in the binary mixture DSC curve compared to the corresponding curves of the individual components (PL and OA) could be attributed to the homogenous dispersion of OA into PL resulting from the weakening of intermolecular forces between PL molecules,⁶³ increasing their fluidity^{64,65} and *in situ* formation of partial solid-liquid lipid complex.⁶⁶

DSC curves of the both physical mixtures, with and without FSE (Figure 4, top curves), exhibit sole peak at 48°C . The event probably originates from the present Poloxamer 407 due to its partial solubility in lipids, although its position is slightly shifted to lower temperature compared to the pure compound. The similar behavior is observed in the thermal curves of blank NLCo and NLCo indicating the partial presence of poloxamer 407 on their surface that was further confirmed from their FTIR spectra (see forthcoming discussion). On the

other hand, their DSC curves showed distinct broad endothermic maxima at 110°C and 114° for blank NLCo and NLCo, respectively that are not present in the individual components and physical mixtures. Their appearance is taken as indicator for the formation of a new structured complex. Pronounced values of ΔH suggest high crystallinity degree.⁶⁷ The difference in the ΔH between the blank NLCo and NLCo is most likely related to the influence of FSE on the lipid matrix and the volatility of the compounds present in the extract.⁶² Similar observations related to the influence of rosmarinic acid on the formation of solid Witepsol nanoparticles were reported by ref. [68].

3.2.5 | Fourier transform infrared spectroscopy analysis

ATR-FTIR spectra of each freeze-dried component comprising the NLCo formulation as well as the corresponding spectrum of the freeze-dried NLCo sample are shown in Figure 5. The spectrum of the NLCo undoubtedly depicts the presence of OA and PL (both manifesting rather identical spectral feature in the $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ region) with the dominant sharp bands at 2916 and 2850 cm^{-1} . However, two components' spectra discriminate in the position of the $\text{C}=\text{O}$ carbonyl stretching vibration at 1726 cm^{-1} (ester group) in PL and 1707 cm^{-1} (carboxyl group) in the OA. Therefore, the spectrum of the NLCo formulation compromised broader band appearance in this region explained by the overlap of the discussed carboxyl stretching bands. The presence of the poloxamer 407 in the NLCo is deciphered by the weak band around 1340 cm^{-1} . Having in mind that the positions of the very prominent bands in the Tween 80 spectrum (discussed C-H and $\text{C}=\text{O}$ stretchings as well as the C-O stretchings at 1100 and 946 cm^{-1})⁶⁹ are majorly overlaid with the strongest bands found in the remaining components (particularly in PL and OA), its mere spectral signature in the NLCo spectrum is reflected from the Tween 80 medium intensity bands at 1348 and 1296 cm^{-1} . Although the IR signature of the lyophilized salvia extract (FSE) exhibit several strong bands (completely in accordance with the spectrum of the *Salvia officinalis* L. leaves,⁷⁰ its presence was not evidenced in the NLCo because its spectrum was in a complete match with the spectrum of the salvia-free nanoparticles (blank NLCo) (- Figure S2 in section Supporting information). The absence of spectral manifestation of FSE in the formulation indicated complete incorporation of the FSE extract within the NLCo particles. However, all other lipids (PL, OA) and aqueous (poloxamer 407, tween 80) components from the formulation were spectrally mapped (Figure 5).

Further spectral interest was focused to investigate the NLCo formulation incorporating chitosan (NLCc) and the NLCo nanoparticles with the poloxamer 407 (NLCp). Their spectra revealed some bands occurring from the coated chitosan and poloxamer that discriminate from the NLC spectrum (Figure 6). The chitosan wrapping was revealed by the band at 1148 cm^{-1} , because the strongest bands at 1057 and 1087 cm^{-1} were overlapped with the bands from NLC components. Likewise, three distinct bands superimposed at 1342 , 1146 , and 842 cm^{-1} occurred in the spectrum that unraveled the occurrence of poloxamer in the NLCp formulation (Figure 6).

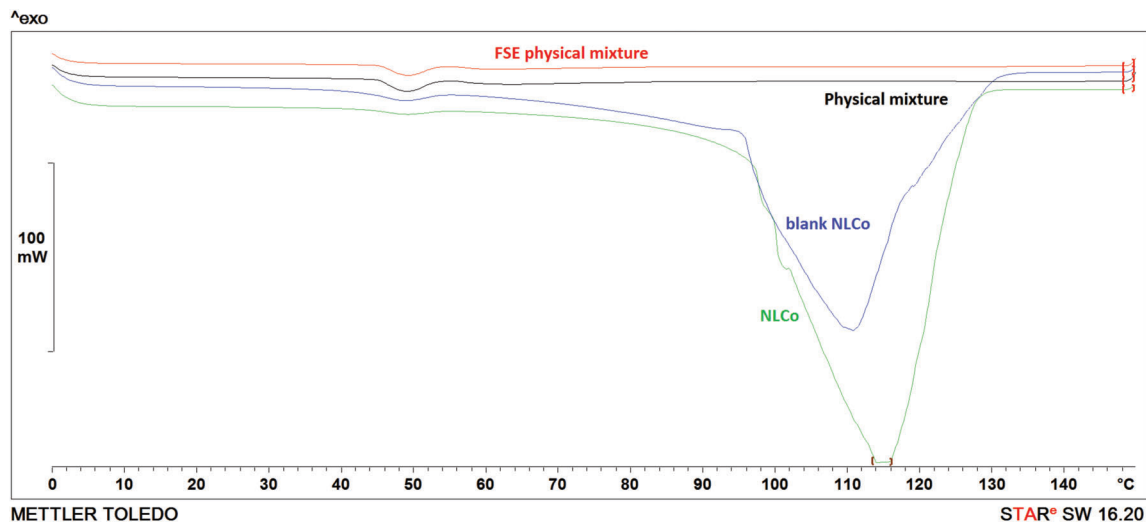


FIGURE 4 DSC curve of physical mixtures (with and without FSE) and of blank NLCo and NLCo

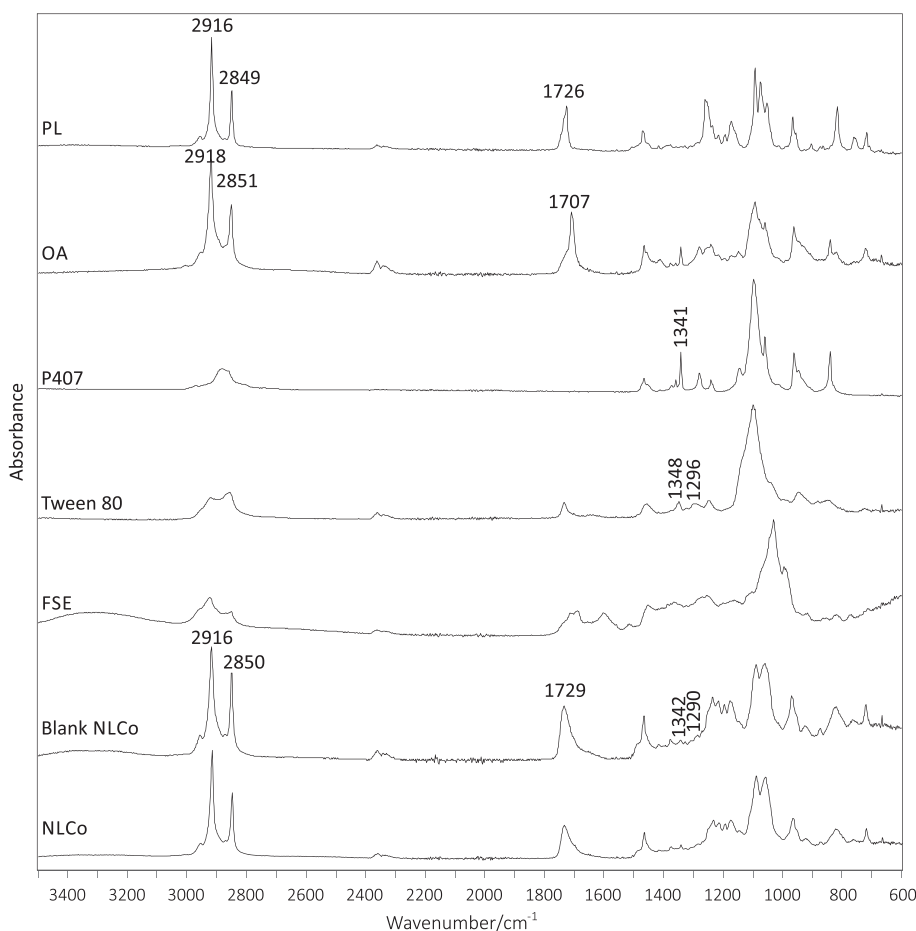


FIGURE 5 IR spectra of Phospholipon 90H (PL), Oleic acid (OA), Poloxamer 407 (P407), Tween 80, FSE, blank NLCo and NLCo. The characteristic bands discussed in the text are marked

3.2.6 | Protein adsorption studies

During intranasal administration, as reported above, drugs could enter CNS either by the direct nose to brain pathway through olfactory and trigeminal nerve transport or by systemic circulation through respiratory mucosa. However, regardless of the delivery pathway,

biomolecules present in biological fluids (including the protein-rich nasal mucosa and blood circulation) tend to adsorb onto nanoparticle surfaces. This dynamic particle's surface-biomolecule interaction leads to protein corona formation, which may have a significant impact on the biological effects of the particles that is, targeted delivery and cell internalization.^{71,72}

Therefore, with the aim to obtain more relevant information about the possible NLC-protein interaction *in vivo*, *in vitro* protein adsorption studies were performed using BSA as a model protein. The amount of adsorbed BSA (%) onto the surface of characterized NLC particles is shown in Figure 7.

The results presented on the graph inferred that NLCp was characterized by a lower amount of BSA adsorbed onto its surface ($43.53\% \pm 0.07\%$) compared to NLCo ($52.02\% \pm 0.22\%$). This phenomenon was expected and suggests that the hydrophilic blocks of Poloxamer 407 are capable of forming a hydrophilic barrier to protein adsorption.⁷³ On the other hand, particles that possess basic functional groups with a positive charge are more likely to adsorb proteins with an isoelectric point less than 5.5 (e.g., albumin).^{17,74} Therefore, a higher percent of bound BSA onto the NLCc surface ($55.97\% \pm 0.75\%$) could be attributed to the cationic nature of the chitosan coating (Figure 7).

For qualitative access into the process of adsorption of the BSA on the particles from the different NLC formulations (NLCo, NLCc and NLCp) and their respective blank (without FSE) counterparts (blank NLCo, blank NLCc and blank NLCp), the ATR-FTIR spectra were collected on all freeze-dried samples (Figure 8). Similar studies were previously conducted to monitor the interactions of BSA and gold nanoparticles⁷⁵⁻⁷⁷ and PLGA-PEG-PLGA nanoparticles²⁹ addressing the BSA conformational changes that took place during the interlinkage.

First, the interaction of BSA was monitored with the NLC saliva-free samples (blank NLCo, blank NLCc and blank NLCp) (Figure 8). The amide I band primarily arising from the C=O stretching vibration within the amide group in the peptide chain⁷⁸ is found to serve as an indicator for the peptide backbone conformation and the hydrogen

bonding. Therefore, its position and intensity are used to elucidate the alteration of the protein secondary structure. The remaining amide II (C–N stretching and N–H bending coupled out-of-phase) vibrations of adjacent peptide units and the coupling between amide III vibrations (C–N stretching and N–H bending coupled in-phase)⁷⁸ of adjacent peptide units are very complex bands and not informative for accessing the structural properties of peptides.⁷⁹ The former bands in the BSA spectrum were found at 1516 cm^{-1} and the weaker amide III bands (not discussed) in the $1200\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$ region (Figure 8). Therefore, to address the interactions between blank NLC and BSA we have focused mostly on the BSA amide I band at 1645 cm^{-1} in the pure BSA freeze-dried specimen occurring in the BSA-adsorbed NLC formulations (NLC-BSA) (Figure 8). The consistent ongoing trend of stronger BSA-NLC interaction was found in all the saliva (FSE)-free formulations. In other words, the comparison between the IR spectra among the three pairs: blank NLCo-BSA versus NLCo-BSA, blank

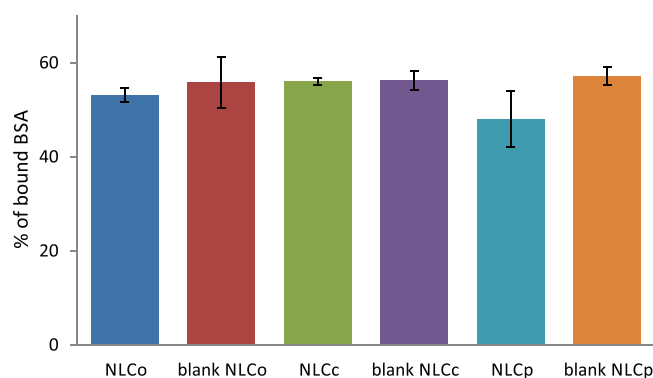


FIGURE 7 Amount of bound BSA on the NLCs' surface

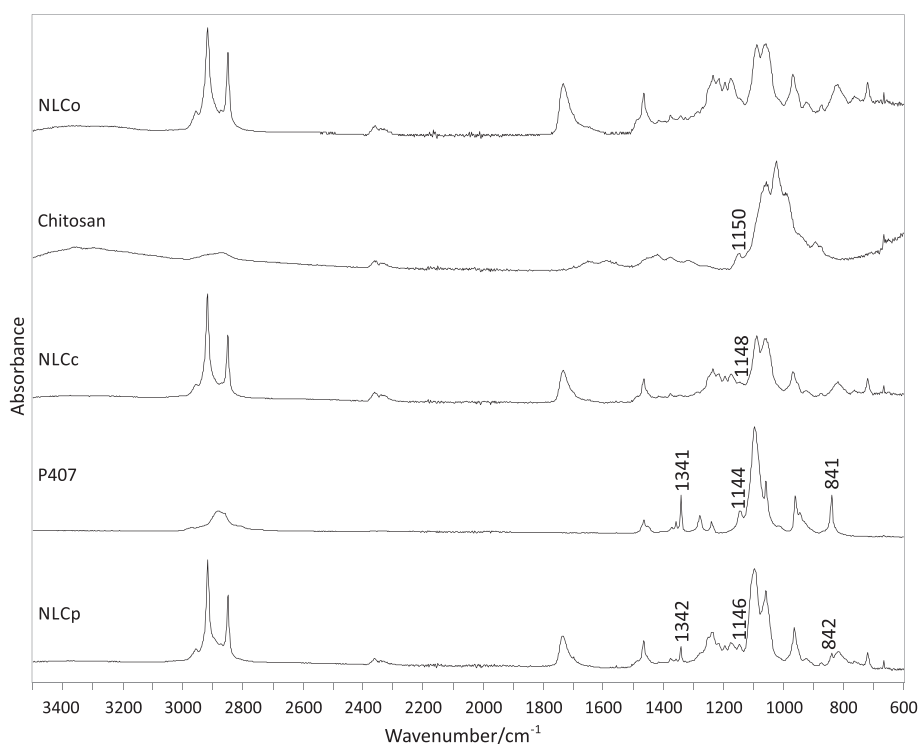


FIGURE 6 IR spectra of NLCo, Chitosan, NLCc, Poloxamer 407 and NLCp. The characteristic bands discussed in the text are marked

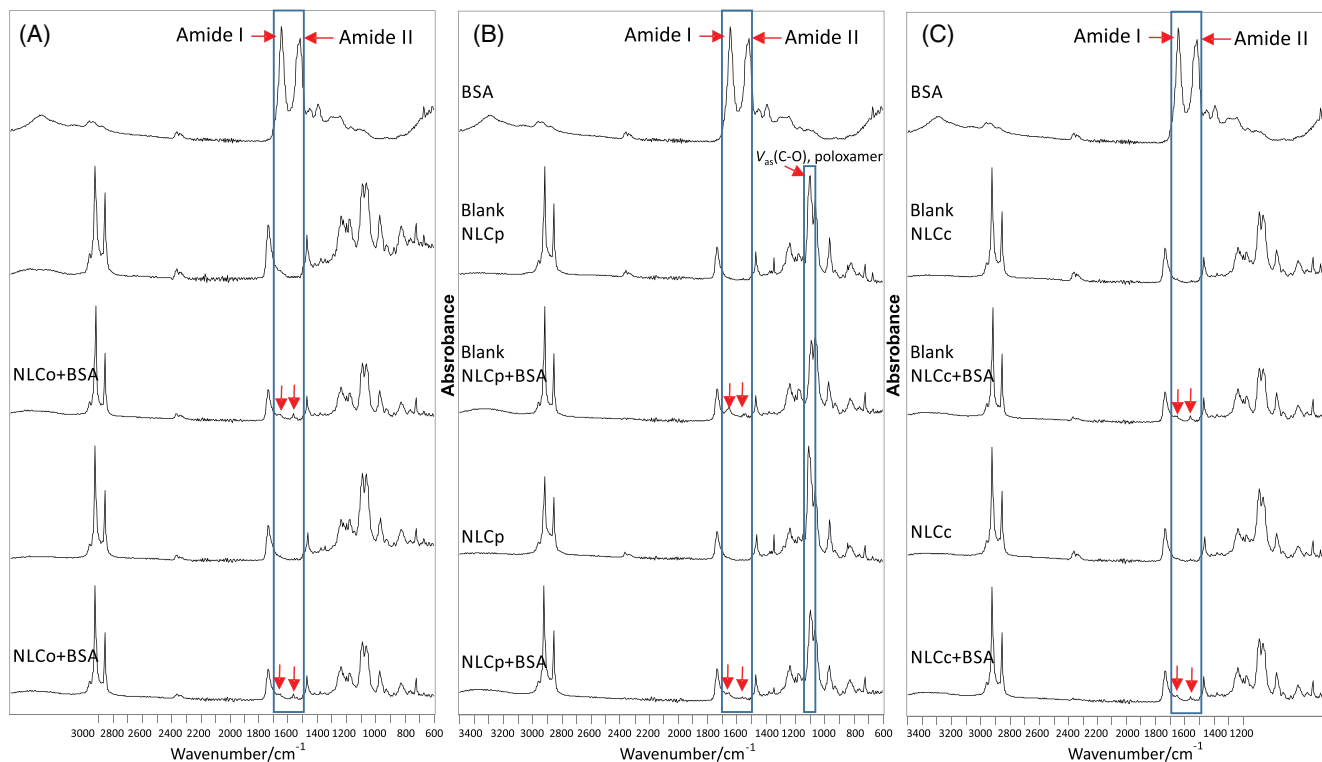


FIGURE 8 IR spectra on both saliva and saliva-free: (A) NLCo formulations, (B) NLCp formulations, and (C) NLCc formulations acquired to elucidate the BSA-interactions. The characteristic bands discussed in the text are marked

NLCc-BSA versus NLCc-BSA and the blank NLCp-BSA versus NLCp-BSA indicate much stronger intensity of amide I band in the former formulations (Figure 8). The weaker amide I band in the corresponding saliva formulation (NLCo, NLCc, and NLCp) spectra probably infers that, during the incubation, the saliva extract was released and to some extent, block the binding sites of the albumin. Furthermore, the amide I band in these spectra was blue shifted from 1645 cm^{-1} (in the freeze-dried BSA) to 1655 cm^{-1} in all the formulations. The shift implies obvious interaction of the nanoparticles with the BSA molecules that, in turn, alters the secondary structure of the adsorbed BSA. At the same time, the shift of the strongest band from the anti-symmetric C–O vibration of the poloxamer from 1099 cm^{-1} (in the pure sample) to 1089 cm^{-1} (in the NLC-BSA formulations) was registered. The redshift of this band might be explained by the involvement of the stronger interaction, most likely via hydrogen bonding. It is assumed that the BSA molecules unfold and expose their hydrophilic segment towards the hydrophilic (PEO) blocks of the poloxamer that weakens the C–O bond within the PEO moiety. This effect was found in both NLCp and blank NLCp-BSA formulations, which means that saliva extract does not play role in this interaction.

Considering the net positive surface charge of NLCc (due to Chitosan NH^{3+} groups) and the excess of COOH residues in BSA, one could favor an electrostatic interaction among them. However, there are not sufficient spectral indicators for such claim, mostly because the electrostatic interactions among NH^{3+} and COO^- are dominating the secondary structure of the proteins (BSA) thus overlapping the possible signal originating from the interactions among the Chitosan

NH^{3+} and BSA COO^- . On the other hand, the blueshift of the BSA amide I and II bands as found in NLCp formulations (1645 to 1653 cm^{-1} for amide I, 1516 to 1561 cm^{-1} for amide II) indicate possible alterations in the BSA secondary structure.

The particle surface properties and its protein interaction patterns significantly affect the secondary structure of the adsorbed proteins.⁸⁰ Having in mind that the particle's protein corona is the surface layer that dominantly interacts with the biological milieu, the secondary structure of the adsorbed proteins will govern the surface exposure of epitopes and functional groups thus affecting the interactions with the cell surfaces and overall nanoparticle in vivo fate.⁸¹ To evaluate the conversions in the secondary structure of the adsorbed BSA, peak fitting of the Amide I band from the spectra of the blank formulations + BSA was performed. The relative percentage of the area under the peaks for each spectrum was calculated after the appropriate iteration of the peaks in the proposed statistical model. The results, along with the statistical indicators are presented in Table 6 and Figure 9. The secondary structure of the freeze-dried BSA sample presents a significant reduction of the α -helix conformation relative to the known data for the native BSA, due to water loss and H-bonds redistribution that occur during the freeze-drying procedure.⁸² Furthermore, the secondary structure of BSA adsorbed on different formulations reveals a distinct pattern of interactions among surface modified and nonmodified NLC. The BSA adsorbed on the NLCo presented a very similar structure to the freeze-dried BSA, pointing out weak interactions that didn't induce significant conformational changes. On the other hand, the interaction of the BSA with the

surface modified NLCp and NLCc resulted in promotion of ordered structure relative to the nonadsorbed freeze-dried molecule. The increase of the portion of α -helix and β -sheets on the expense of the random coils probably occurs due to the formation of H-bonds or electrostatic interactions with NLCp and NLCc, respectively, and most probably supports the maintenance of the ordered structure of native BSA during freeze-drying of the complex. Such phenomena were reported in the literature claiming that the hydrophilic interactions contribute to a strong protein-surface bonding that doesn't alter the native secondary structure of the proteins and aids in its preservation during freeze-drying.^{29,83,84}

3.2.7 | FSE content determination in optimal and surface coated NLCs formulations

The amount of incorporated FSE in the corresponding formulation is shown in Figure 10. The amount of incorporated extract in NLCc was 106.24 μg FSE/mg PL (%Bias = 2.29 when compared to the predicted value of 10.7309 μg FSE/mg PL). The coated formulations (NLCp and NLCc) contained a smaller amount of FSE, which was expected, as an additional coating step was performed in their preparation procedure (2 h of mixing on a magnetic stirrer, at room temperature) during which a certain amount of the extract diffused out of the particles. A statistically significant difference in the amounts of the incorporated FSE was noticed between the NLCc and NLCp, as well as NLCp and NLCc (t test, $p < .05$). The lower amount of FSE incorporated into the NLCp particles (86.74 μg FSE/mg PL) was probably due to the solubilization of FSE by poloxamer,⁸⁵ whereas in the case of NLCc most likely the dense packing of the chitosan polymer chains onto the particles surface, hindered the diffusion of FSE.

3.2.8 | In vitro release studies

In vitro dissolution profiles of FSE from NLCc, NLCc and NLCp are shown in Figure 11. The amount of released FSE after 2 h for NLCc

was 6.61 mg (%Bias = 3.73 when compared to the predicted value of 6.8719 mg).

The value for the f_2 factor points to the similarity of the dissolution curves among the samples (NLCc vs. NLCc-51.98; NLCc vs. NLCp-73.84 and NLCc vs. NLCp-57.43). Considering that for 48 h the amount of released FSE ranges from $\sim 33\%$ to $\sim 49\%$, it can be concluded that controlled and prolonged release is achieved in all three formulations. This is in correlation with the high degree of crystallinity of the formulations,⁸⁶ as was determined by DSC studies. From the graph in Figure 11 a lower amount of FSE released from the NLCc particles compared to NLCc can be noted, which according to ref. [87] as well as ref. [88] is most likely due to the dense packing of the chitosan polymer chains on the lipid particles surface, which are hydrated in an aqueous media and form a sort of diffusion barrier.

Several mathematical models examined for the release of FSE from the particles are shown in Table 7. Thereby, based on the obtained correlation coefficients, the Peppas-Sahlin model best explains the release kinetics of FSE. The high values for k_1 indicate that the most likely mechanism of release of FSE is diffusion, whereas the negative values for k_2 indicate that the release of FSE due to the relaxation/erosion of the polymer is insignificant.⁸⁹

3.2.9 | Determination of antioxidative effect

The brain of patients suffering AD presents a significant extent of oxidative damage associated with the abnormal marked accumulation of A β and the deposition of neurofibrillary tangles. Free radicals such as reactive oxygen species (ROS) can partake in redox reactions due to the presence of an unpaired electron.⁹⁰ Considering the fact that the brain membrane phospholipids are composed of polyunsaturated fatty acids, it is particularly vulnerable to free radical attacks. Also, the oxidation of brain proteins can affect enzymes critical to neuron and glial functions such as glutamine synthetase and creatine kinase, which are markedly reduced in AD brains.⁹¹

TABLE 6 Percentage of the secondary structure elements of BSA in freeze-dyed samples of BSA, NLCc+BSA, NLCp+BSA and NLCc+BSA

Sample	α -helix	β -sheet	β -turns	Random coils	Statistical indicators
BSA (freeze-dried)	19%	35.4%	22.4%	23.2%	$\chi^2 = 0.039$ $R^2 = 0.91$ $SE = 0.034$
NLCc+BSA	20.2%	39.6%	24.9%	15.49%	$\chi^2 = 0.00049$ $R^2 = 0.98$ $SE = 0.003$
NLCp+BSA	24%	47.4%	22.6%	6.6%	$\chi^2 = 6.5 \cdot 10^{-5}$ $R^2 = 0.99$ $SE = 0.0005$
NLCc+BSA	27.9%	43.2%	22.1%	6.6%	$\chi^2 = 0.0032$ $R^2 = 0.92$ $SE = 0.001$

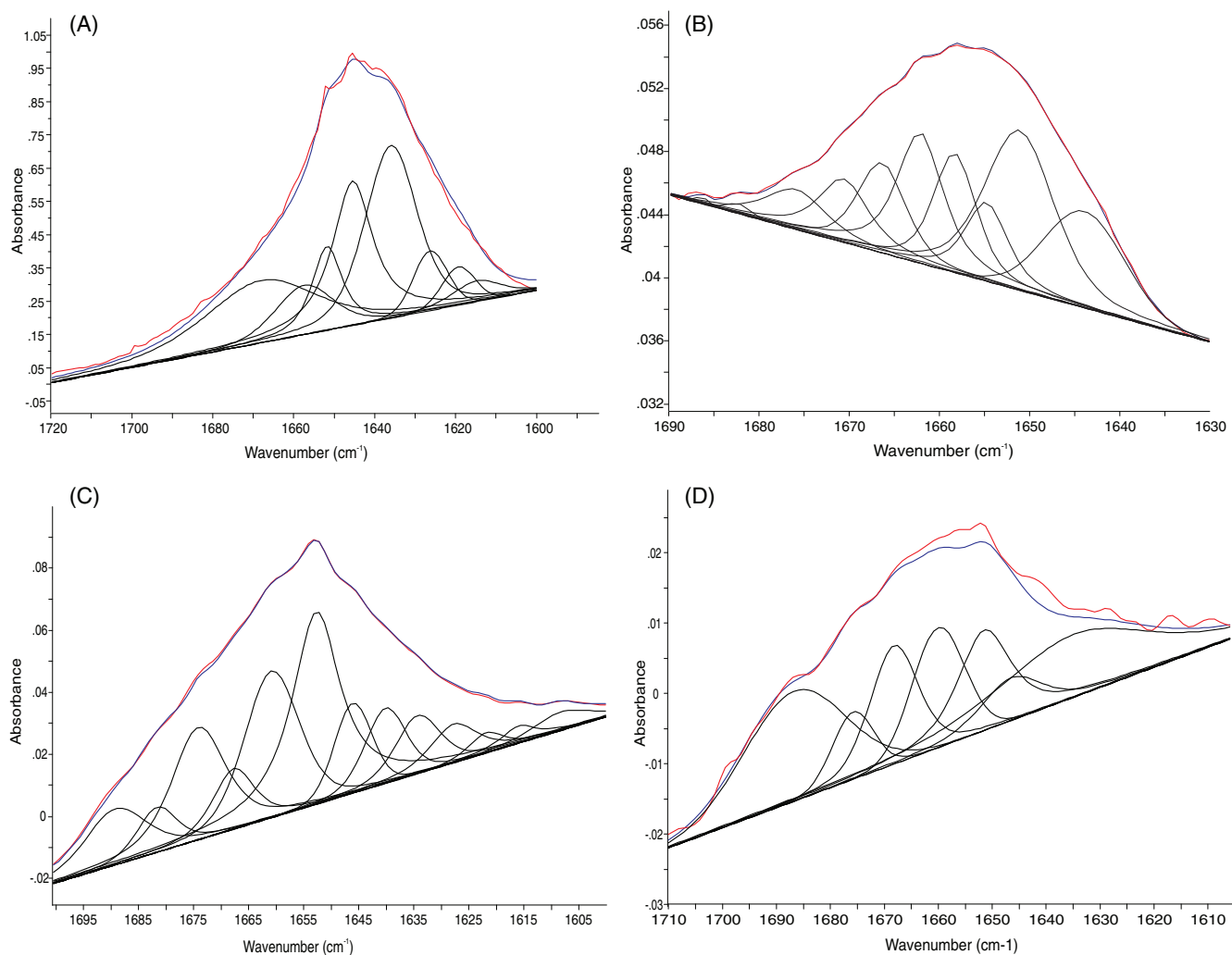


FIGURE 9 Curve fitting of BSA Amide I band from (A) pure freeze dried BSA sample, (B) NLCo+BSA, (C) NLCp+BSA, and (D) NLCc+BSA; red line—original spectrum line, blue line—fitted spectrum line, black line—individual peaks

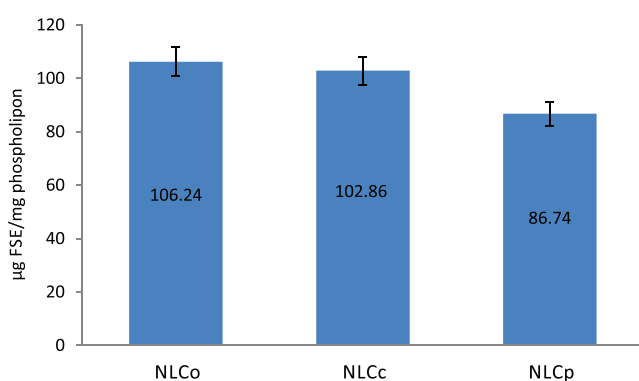


FIGURE 10 Amount (micrograms) of incorporated FSE per mg solid lipid into the NLCo, NLCc, and NLCp formulations

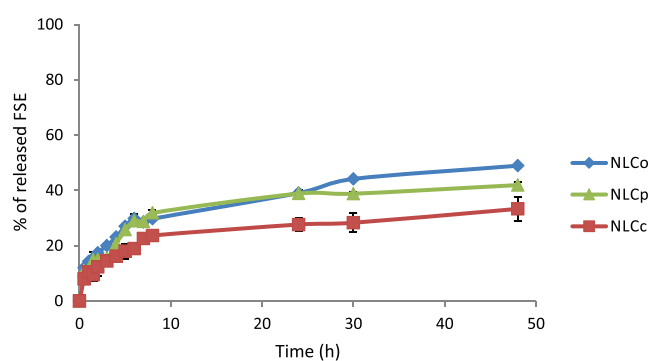


FIGURE 11 *In vitro* dissolution profile of FSE from NLCo, NLCp, and NLCc. SD bar is visualized for those values that outgrow the corresponding marker size

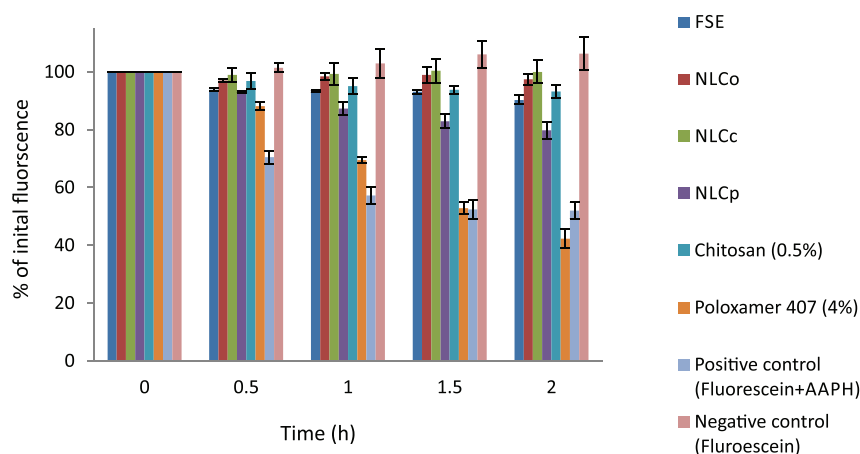
Evidence from several research studies suggests that polyphenolic compounds amongst which rosmarinic acid and flavonoids, the constituents of FSE, prevent memory deficits by inhibiting lipid peroxidation and enhancing antioxidant defense systems, mostly due to

their free radical scavenging properties.^{92,93} Double-blind randomized and placebo-controlled trials have confirmed that administration of *Salvia officinalis* extract in AD patients provides significantly greater improvements in cognitive function with no differences in adverse

TABLE 7 Results from the examined kinetic dissolution models

Sample	Higuchi ^a		Korsmeyer-Peppas ^a			Peppas-Sahlin ^a			
	k	R ²	k	n	R ²	k ₁	k ₂	m	R ²
NLCo	8.669	0.7738	14.726	0.324	0.9851	14.704	-1.113	0.45	0.9891
NLcC	5.987	0.7136	10.189	0.326	0.9578	10.606	-0.877	0.45	0.9778
NLCp	7.965	0.7035	12.972	0.344	0.9234	14.329	-1.220	0.45	0.9686

^aEquations for examined kinetic dissolution models are given in Supporting information section (Equation S1, S2 and S3 for Higuchi model, Korsmeyer-Peppas and Peppas-Sahlin, respectively).

FIGURE 12 Antioxidant activity of the NLCs samples compared to FSE, chitosan (0.5%) and poloxamer 407 (4%) solution

effects across the active and placebo conditions. Improvements in mood (e.g. alertness, contentedness, and calmness) and cognition were also identified following the single administration of a *Salvia officinalis* extract to healthy young adults, as well to healthy, older-age adults,⁹⁴ indicating that this extract could be successfully used in the management of mild to moderate AD.⁵

Therefore, to determine the antioxidative effect of the NLC particles, a modified ORAC assay was performed. A graphical representation of the obtained results is shown in Figure 12. The change of fluorescence over time is shown as a percent of the initial fluorescence of each sample. The NLCo ($95.31 \pm 1.86\%$) and NLcC ($97.76 \pm 4.00\%$) exhibited statistically significant higher antioxidant activity compared to NLCp ($79.75 \pm 2.97\%$) and FSE ($90.30 \pm 1.53\%$) after a period of 2 h (one-way ANOVA, LSD post hoc, $p < .05$). This observation is most likely related to the prolonged FSE release from NLCo and NLcC (Figure 12). Actually, when FSE is encapsulated into NLC it is protected from the influence of surrounding degradation factors and its bioavailability and hence antioxidant efficacy is increased. Similar results were obtained for rosemary extract encapsulated into nanoliposomes.⁹⁵ It has been demonstrated that chitosan alone exhibits redox-regulatory activity (Figure 12) due to inhibition of ROS production and additionally, can stimulate the increase of the intracellular antioxidant enzymes in biological systems.⁹⁶ Therefore, the highest antioxidant activity of NLcC could be a result of the synergistic antioxidant effect of the FSE components and chitosan present in this formulation. The particular mechanisms of the antioxidant effect of chitosan are the free radical scavenging and metal ions chelation by the donation of hydrogen or the ion pairs of electrons, thus leading to

deactivation of catalytic activity of metal ions, for example, $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, which are key catalysts of oxidation processes in biological systems *in vivo*.⁹⁶ On the other hand, the lowest antioxidant capacity of NLCp could be attributed to the complex relationship and interactions between the components in the formulation in particular poloxamer 407, the fluorescein and AAPH. This observation is confirmed by the results determined for antioxidative effects where it is evident that poloxamer 407, when compared to a positive control (Fluorescein +AAPH) (Figure 12), quenches the fluorescence after 2 h (one-way ANOVA, LSD post hoc, $p < .05$).

3.2.10 | In vitro permeability studies

According to the literature data, one of the possible mechanisms for intranasal drug delivery is the systematic pathway, which represents an indirect route for brain targeted delivery and involves the direct absorption of the drug (or drug-loaded formulation) from the highly vascular nasal respiratory epithelium and the lymphatic system, and its subsequent transport into the systemic circulation, thus, crossing the BBB to reach the brain parenchyma.¹⁴ For this reason, it was of great importance to perform *in vitro* permeability studies of the NLC formulations across hCMEC/D3 cell monolayers, which are a highly restrictive permeability barrier, and provide permeability coefficients that correlate well with the *in vivo* permeability data for lipophilic substances.⁹⁷ During the experiments, constant values for TEER were obtained, and they varied between 30 to 50 $\Omega \text{ cm}^2$ which points to the fact that the hCMEC/D3 cell monolayers retained their integrity

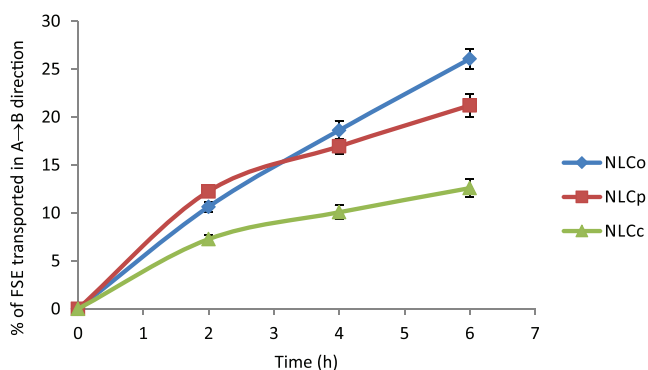


FIGURE 13 Permeability profile of NLCo, NLCp and NLCc. SD bar is visualized for those values that outgrow the corresponding marker size

during the examination. The percent of the encapsulated FSE that was transported to the basolateral chamber of the well over the period of 6 h are shown in Figure 13. Transport studies of non-encapsulated FSE were not feasible, as due to lack of adequate FSE aqueous solubility organic solvents that is, methanol/or DMSO (above 2%) should be added in the medium, rendering conditions that affect the cell monolayer integrity by compromising the cell tight junctions.⁹⁸

According to the presented results, the highest transported percent of FSE over a period of 6 h in the basolateral chambers of the wells was achieved by NLCo (26.07%), while lower amounts were transported by NLCp (21.21%) and NLCc (12.60%). The FSE A → B transport patterns of the three formulations were very similar to those from the above presented *in vitro* release studies where the % of FSE released from NLCo, NLCp and NLCc after 6 h were 29.86%, 28.985, and 18.04%, accordingly. Obtained results suggested that all three NLC formulations contributed to the successful transport of FSE across the simulated BBB. In this sense, it could be stipulated that the formulation of the above mentioned NLCs is a promising strategy for mediating brain delivery of FSE and consequently, a potential treatment of AD. Additionally, many research studies have confirmed that the small particle size in conjunction to the large surface area and the lipophilic nature of NLCs tend to facilitate the contact and the drug transport across the brain via combined mechanisms (endocytosis, transcytosis and/or the opening of tight junctions). On the other hand, the presence of coating in NLC formulations can contribute to the enhanced membrane fluidity, inhibition of brain endothelial cell efflux pumps, as well as better attachment to lipoprotein receptors that support brain delivery.⁹⁹ To delineate the exact mechanism that contributes to the enhanced FSE-NLC brain uptake, pre-incubation of the cells with specific inhibitors of endocytosis, followed by incubation with NLCs, should be carried out in the future.

4 | CONCLUSION

During the OFAT experiments, different formulations of FSE loaded NLCs were prepared using the solvent evaporation method. After

careful data analysis, the amounts of ethanol, phospholipon, and Tween 80 were identified as formulation factors that could significantly affect the physicochemical and biopharmaceutical properties of NLCs. To investigate the qualitative and quantitative impact of the main formulation variables on the NLCs' particle size, drug loading and initial FSE released in the first 2 h *in vitro*, OCCD was implemented. Consequently, the response patterns, mathematical models and dependence equations of the parameters of interest were determined and optimization was performed. The surface of the optimal formulation (NLCo) was further modified with low molecular weight chitosan (NLCc) and poloxamer 407 (NLCp). All three formulations were characterized with smooth surface and $D_{50} < 160$ nm. The formulation with Poloxamer 407 on its surface expressed less negative zeta potential in comparison to NLCo, while the zeta potential of the formulation coated with chitosan was positive. DSC curves of NLCo showed distinct endothermic peak not present in the individual components and the physical mixtures, thus indicating the formation of a new structured complex. IR-ATR analysis revealed that the absence of spectral manifestation of FSE in NLCo was due to the complete incorporation of the FSE extract within the particles. Furthermore, spectra of NLCp and NLCc revealed analytical bands occurring from the coated chitosan and poloxamer, which discriminate from the NLC spectrum. As expected, NLCp was characterized by lower amount of BSA adsorbed onto its surface compared to NLCo, while higher percentage of bound BSA onto NLCc surface was attributed to the electrostatic interactions with BSA. IR spectra of NLCs-BSA complexes demonstrated a distinctive interaction pattern where the hydrophilic interactions promote stronger bonding and preservation of a more ordered BSA secondary structure. The amount of incorporated FSE was $>86.74 \mu\text{g FSE/mg PL}$ in the following order $\text{NLCp} < \text{NLCc} < \text{NLCo}$. All prepared NLC samples enabled controlled and prolonged FSE release over a period of 48 h, where formulations coated with Poloxamer and chitosan showed slower release in comparison to NLCo. Based on the obtained correlation coefficients, the release kinetics of the active component was best described under the Peppas-Sahlin model. Regarding the antioxidant capacity, all optimal NLCs samples were relatively stable for 120 min and, moreover, NLCc and NLCo showed statistically significant higher antioxidant capacity compared to FSE. Obtained results from the *in vitro* permeability studies on hCMCEC/D3 cell monolayers demonstrated that three modelled NLC formulations contributed to successful transport of FSE across BBB. Additionally, the FSE release patterns from the NLCs were congruent to those emerging from the *in vitro* release studies. As a bottom line, overall results delivered from the physicochemical and biopharmaceutical studies of the optimized NLCs showcase potential for a successful brain delivery, and could be considered as promising and prospective formulations for efficient and safe AD treatment.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to acknowledge the CEEPUS RS-1113 mobility grant programme and prof. Stane Srcic, Faculty of pharmacy, University of Ljubljana, Slovenia for opportunity to perform SEM, DSC, and FTIR analyses.

According to Biological material transfer and licence agreement we acknowledge that hCMEC/D3 cell culture was purchased from Cederlane Corporation, Ontario, Canada and that experiments were performed in the validity period of agreement.

CONFLICT OF INTEREST

On behalf of all authors, the corresponding author states that there are no conflicts to declare.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Elena Markova Investigation, Analysis and interpretation of data, Writing - Original draft preparation, Editing. Lea Taneska: Investigation, Analysis and interpretation of data, Writing - Original draft preparation. Monika Kostovska: Investigation, Analysis and interpretation of data. Dushko Shalabalija: Analysis and interpretation of data, Writing - Original draft preparation. Ljubica Mihailova: Analysis and interpretation of data, Writing - Original draft preparation. Marija Glavas Dodov: Conceptualization, Analysis and interpretation of data, Writing - Reviewing and Editing. Petre Makreski: Analysis and interpretation of data, Writing - Original draft preparation, Reviewing and Editing. Nikola Geskovski: Analysis and interpretation of data, Writing - Original draft preparation, Reviewing and Editing. Marija Petrushevska: Investigation. Arben N Taravari: Writing - Reviewing and Editing. Maja Simonoska Crcarevska: Conceptualization, Analysis and interpretation of data, Writing - Original draft preparation, Reviewing and Editing, Supervision.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analyzed during the current study.

ORCID

Maja Simonoska Crcarevska  <https://orcid.org/0000-0002-1927-7101>

REFERENCES

- Ferrero J, Williams L, Stella H, et al. First-in-human, double-blind, placebo-controlled, single-dose escalation study of aducanumab (BIIB037) in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dementia: Trans Res Clin Interventions*. 2016;2:169-176. doi:10.1016/j.trci.2016.06.002
- Selkoe DJ. Soluble oligomers of the amyloid β -protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res*. 2008;192:106-113. doi:10.1016/j.bbr.2008.02.016
- Cummings JL, Morstorf T, Zhong K. Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimer's Res Therapy*. 2014;6:37. doi:10.1186/alzrt269
- Lancôt KL, Rajaram RD, Herrmann N. Therapy for Alzheimer's disease: how effective are current treatments? *Ther Adv Neurol Disord*. 2009;2:163-180. doi:10.1177/1756285609102724
- Akhondzadeh S, Noroozian M, Mohammadi M, Ohadinia S, Jamshidi AH, Khani M. *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *J Clin Pharm Ther*. 2003;28:53-59. doi:10.1046/j.1365-2710.2003.00463.x
- Wake G, Court J, Pickering A, Lewis R, Wilkins R, Perry E. CNS acetylcholine receptor activity in European medicinal plants traditionally used to improve failing memory. *J Ethnopharmacol*. 2000;69:105-114. doi:10.1016/S0378-8741(99)00113-0
- Schulz V, Hänsel R, Tyler V.E., 2001. *Rational Phytotherapy*. Springer Berlin Heidelberg 10.1007/978-3-642-98093-0
- Hohmann J, Zupkó I, Rédei D, et al. Protective Effects of the Aerial Parts of *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis* and *Lavandula angustifolia* and their Constituents against Enzyme-Dependent and Enzyme-Independent Lipid Peroxidation. *Planta Med*. 1999;65:576-578. doi:10.1055/s-2006-960830
- Nunes S, Madureira R, Campos D, et al. Therapeutic and Nutraceu-tical Potential of Rosmarinic Acid - Cytoprotective Properties and Pharmacokinetic Profile. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2015;57:1799-1806. doi:10.1080/10408398.2015.1006768
- Obulesu M, Rao DM. Effect of plant extracts on Alzheimer's disease: An insight into therapeutic avenues. *J Neurosci Rural Prac*. 2011;02:56-61. doi:10.4103/0976-3147.80102
- Ozarowski M, Mikolajczak PL, Bogacz A, et al. *Rosmarinus officinalis* L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain. *Fitoterapia*. 2013;91:261-271. doi:10.1016/j.fitote.2013.09.012
- Mignet N, Seguin J, Chabot G. Bioavailability of Polyphenol Liposomes: A Challenge Ahead. *Pharmaceutics*. 2013;5:457-471. doi:10.3390/pharmaceutics5030457
- Gänger S, Schindowski K. Tailoring Formulations for Intranasal Nose-to-Brain Delivery: A Review on Architecture, Physico-Chemical Characteristics and Mucociliary Clearance of the Nasal Olfactory Mucosa. *Pharmaceutics*. 2018;10:116. doi:10.3390/pharmaceutics10030116
- Bourganis V, Kammona O, Alexopoulos A, Kiparissides C. Recent advances in carrier mediated nose-to-brain delivery of pharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm*. 2018;128:337-362. doi:10.1016/j.ejpb.2018.05.009
- Cortés H, Alcalá-Alcalá S, Caballero-Florán IH, et al. A Reevaluation of Chitosan-Decorated Nanoparticles to Cross the Blood-Brain Barrier. *Membranes*. 2020;10:212. doi:10.3390/membranes10090212
- Lockman PR, Mumper RJ, Khan MA, Allen DD. Nanoparticle Technology for Drug Delivery Across the Blood-Brain Barrier. *Drug Dev Ind Pharm*. 2002;28:1-13. doi:10.1081/DDC-120001481
- Moraru C, Mincea M, Menghiu G, Ostafe V. Understanding the Factors Influencing Chitosan-Based Nanoparticles-Protein Corona Interaction and Drug Delivery Applications. *Molecules*. 2020;25:4758. doi:10.3390/molecules25204758
- Sabir F, Ismail R, Csoka I. Nose-to-brain delivery of anti-glioblastoma drugs embedded into lipid nanocarrier systems: status quo and outlook. *Drug Discov Today*. 2020;25:185-194. doi:10.1016/j.drudis.2019.10.005
- Joshi MD, Müller RH. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009;71:161-172. doi:10.1016/j.ejpb.2008.09.003
- Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int J Pharm*. 2002;242:121-128. doi:10.1016/S0378-5173(02)00180-1
- Devkar TB, Tekade AR, Khandelwal KR. Surface engineered nano-structured lipid carriers for efficient nose to brain delivery of ondansetron HCl using Delonix regia gum as a natural mucoadhesive polymer. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;122:143-150. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.06.037
- Madane RG, Mahajan HS. Curcumin-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) for nasal administration: design, characterization, and *in vivo* study. *Drug Deliv*. 2016;23:1326-1334. doi:10.3109/10717544.2014.975382
- Kostovska M, Markova E, Taneska L, Shalabalija D, Mihailova L, Glavas Dodov M, Vranic E, Simonoska Crcarevska M., 2018. Nano-structured lipid carriers for Alzheimer's disease treatment: Influence of solid/liquid lipid ratio on physico-chemical properties, in: Central

- European Symposium on Pharmaceutical Technology and Regulatory Affairs and Satellite Symposium on Pharmaceutical Biotechnology, Szeged, Hungary.
24. Taneska, L., Kostovska, Monika, Markova, E., Cambuleva, L., Shalabalija, D., Glavas Dodov, Marija, Cvetkovikj, Karanfilova, I., Petrushevska, M., Stefkov, G., Slaveska Raicki, R., Simonoska Crcarevska, Maja., 2018. Nanostructured lipid carriers loaded with *Salvia off.* extract for intranasal delivery, in: 11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Granada, Spain. Granada
 25. Markova, E., Kostovska, M., Taneska, L., Shalabalija, D., Cambuleva, L., Glavas Dodov, M., Simonoska Crcarevska, M., 2018. Protein binding capacity of nanostructured lipid carriers loaded with *Salvia off.* extract, in: Nanomedicine, Rome, Italy.
 26. Mihailova, L., Kostovska, M., Markova, E., Taneska, L., Shalabalija, D., Glavas Dodov, M., Vranic, E., Simonoska Crcarevska, M., 2018. Determination of physico-chemical properties of *Salvia off.* loaded nanostructured lipid carriers, in: VII Serbian Congress of Pharmacy with International Participation, Belgrade, Serbia
 27. Cvetkovikj I, Stefkov G, Acevska J, et al. Polyphenolic characterization and chromatographic methods for fast assessment of culinary *Salvia* species from South East Europe. *J Chromatogr A*. 2013;1282:38-45. doi:10.1016/j.chroma.2012.12.068
 28. Zhang W, Li X, Ye T, et al. Design, characterization, and in vitro cellular inhibition and uptake of optimized genistein-loaded NLC for the prevention of posterior capsular opacification using response surface methodology. *Int J Pharm*. 2013;454:354-366. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.07.032
 29. Dimchevska S, Geskovski N, Koliqi R, et al. Efficacy assessment of self-assembled PLGA-PEG-PLGA nanoparticles: Correlation of nanobio interface interactions, biodistribution, internalization and gene expression studies. *Int J Pharm*. 2017;533:389-401. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.05.054
 30. Geskovski N, Kuzmanovska S, Simonoska Crcarevska M, et al. Comparative biodistribution studies of technetium-99 m radiolabeled amphiphilic nanoparticles using three different reducing agents during the labeling procedure. *J Label Compd Radiopharm*. 2013;56:689-695. doi:10.1002/jlcr.3097
 31. Ranaldi S, Belle V, Woudstra M, et al. Lid Opening and Unfolding in Human Pancreatic Lipase at Low pH Revealed by Site-Directed Spin Labeling EPR and FTIR Spectroscopy. *Biochemistry*. 2009;48:630-638. doi:10.1021/bi801250s
 32. Martins N, Barros L, Santos-Buelga C, Henriques M, Silva S, Ferreira ICFR. Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chem*. 2015;170:378-385. doi:10.1016/j.foodchem.2014.08.096
 33. Grzegorzcyk I, Matkowski A, Wysockińska H. Antioxidant activity of extracts from in vitro cultures of *Salvia officinalis* L. *Food Chem*. 2007;104:536-541. doi:10.1016/j.foodchem.2006.12.003
 34. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*. 2018;10:57. doi:10.3390/pharmaceutics10020057
 35. Hoshyar N, Gray S, Han H, Bao G. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine*. 2016;11:673-692. doi:10.2217/nnm.16.5
 36. Haque S, Md S, Alam MI, Sahni JK, Ali J, Baboota S. Nanostructure-based drug delivery systems for brain targeting. *Drug Dev Ind Pharm*. 2012;38:387-411. doi:10.3109/03639045.2011.608191
 37. Wavikar PR, Vavia PR. Rivastigmine-loaded in situ gelling nanostructured lipid carriers for nose to brain delivery. *J Liposome Res*. 2015;25:141-149. doi:10.3109/08982104.2014.954129
 38. Jain K, Sood S, Gowthamarajan K. Optimization of artemether-loaded NLC for intranasal delivery using central composite design. *Drug Deliv*. 2015;22:940-954. doi:10.3109/10717544.2014.885999
 39. Iqbal MA, Md S, Sahni JK, Baboota S, Dang S, Ali J. Nanostructured lipid carrier system: Recent advances in drug delivery. *J Drug Target*. 2012;20:813-830. doi:10.3109/1061186X.2012.716845
 40. Mukherjee S, Ray S, Thakur R. Solid lipid nanoparticles: A modern formulation approach in drug delivery system. *Indian J Pharm Sci*. 2009;71:349-358. doi:10.4103/0250-474X.57282
 41. Freire MC, Alexandrino F, Marcelino HR, et al. Understanding drug release data through thermodynamic analysis. *Materials*. 2017;10:651. doi:10.3390/ma10060651
 42. Espinoza LC, Silva-Abreu M, Clares B, et al. Formulation Strategies to Improve Nose-to-Brain Delivery of Donepezil. *Pharmaceutics*. 2019;11:64. doi:10.3390/pharmaceutics11020064
 43. Göppert TM, Müller RH. Adsorption kinetics of plasma proteins on solid lipid nanoparticles for drug targeting. *Int J Pharm*. 2005;302:172-186. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.06.025
 44. Storm G, Belliot SO, Daemen T, Lasic DD. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. *Adv Drug Deliv Rev*. 1995;17:31-48. doi:10.1016/0169-409X(95)00039-A
 45. Quemeneur F, Rammal A, Rinaudo M, Pépin-Donat B. Large and Giant Vesicles "Decorated" with Chitosan: Effects of pH, Salt or Glucose Stress, and Surface Adhesion. *Biomacromolecules*. 2007;8:2512-2519. doi:10.1021/bm061227a
 46. Wydro P, Krajewska B, Hąc-Wydro K. Chitosan as a Lipid Binder: A Langmuir Monolayer Study of Chitosan-Lipid Interactions. *Biomacromolecules*. 2007;8:2611-2617. doi:10.1021/bm700453x
 47. Morrison EE, Costanzo RM. Morphology of olfactory epithelium in humans and other vertebrates. *Microsc Res Tech*. 1992;23:49-61. doi:10.1002/jemt.1070230105
 48. Singh SK, Dadhania P, Vuddanda PR, Jain A, Velaga S, Singh S. Intranasal delivery of asenapine loaded nanostructured lipid carriers: formulation, characterization, pharmacokinetic and behavioural assessment. *RSC Adv*. 2016;6:2032-2045. doi:10.1039/C5RA19793G
 49. Tiwari R, Pathak K. Nanostructured lipid carrier versus solid lipid nanoparticles of simvastatin: Comparative analysis of characteristics, pharmacokinetics and tissue uptake. *Int J Pharm*. 2011;415:232-243. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.05.044
 50. Zirak MB, Pezeshki A. Effect of Surfactant Concentration on the Particle Size, Stability and Potential Zeta of Beta carotene Nano Lipid Carrier. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2015;4:924-932.
 51. Chang S-H, Lin H-TV, Wu G-J, Tsai GJ. pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan. *Carbohydr Polym*. 2015;134:74-81. doi:10.1016/j.carbpol.2015.07.072
 52. Zimmermann E, Müller RH. Electrolyte- and pH-stabilities of aqueous solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions in artificial gastrointestinal media. *Eur J Pharm Biopharm*. 2001;52:203-210. doi:10.1016/S0939-6411(01)00167-9
 53. Semalty A, Semalty M, Singh D, Rawat MSM. Phyto-phospholipid complex of catechin in value added herbal drug delivery. *J Inclusion Phenomena Macrocyclic Chem*. 2012;73:377-386. doi:10.1007/s10847-011-0074-8
 54. Uronnachi E, Attama A, Umeyor C, Nwakile C, Kenekukwu F, Reginald-Opara J. Solidified Reverse Micellar Solution-Based Lipid Microparticles of Miconazole Nitrate: Formulation Design, Biopharmaceutical Characterization, and Dissolution Studies. *J Pharm Innov*. 2020. doi:10.1007/s12247-020-09514-5
 55. Kolbina M, Schulte A, van Hoogevest P, Körber M, Bodmeier R. Evaluation of Hydrogenated Soybean Phosphatidylcholine Matrices Prepared by Hot Melt Extrusion for Oral Controlled Delivery of Water-Soluble Drugs. *AAPS PharmSciTech*. 2019;20:159. doi:10.1208/s12249-019-1366-3
 56. Mwiiri FK, Brandner JM, Daniels R. Electrospun Bioactive Wound Dressing Containing Colloidal Dispersions of Birch Bark Dry Extract. *Pharmaceutics*. 2020;12:770. doi:10.3390/pharmaceutics12080770

57. Saoji SD, Raut NA, Dhore PW, Borkar CD, Popielarczyk M, Dave VS. Preparation and Evaluation of Phospholipid-Based Complex of Standardized Centella Extract (SCE) for the Enhanced Delivery of Phytoconstituents. *AAPS J*. 2016;18:102-114. doi:10.1208/s12248-015-9837-2
58. Ibrahim M, El-Badry M, Hassan M. Performance of Poloxamer 407 as Hydrophilic Carrier on the Binary Mixtures with Nimesulide. *Farmacia*. 2013;61:1137-1150.
59. Jansook P, Fülöp Z, Ritthidej GC. Amphotericin B loaded solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carrier (NLCs): physico-chemical and solid-solution state characterizations. *Drug Dev Ind Pharm*. 2019;45:560-567. doi:10.1080/03639045.2019.1569023
60. Prieto C, Calvo L. Performance of the Biocompatible Surfactant Tween 80, for the Formation of Microemulsions Suitable for New Pharmaceutical Processing. *J Appl Chem*. 2013;2013:1-10. doi:10.1155/2013/930356
61. Hadaruga DI, Hadaruga NG, Hermenean A, Ravis A, Păslaru V, Codina G. Bionanomaterials: Thermal stability of the oleic acid/ α - and β -cyclodextrin complexes. *Revista de Chimie*. 2008;59:994-998.
62. Al-Tawaha A, Al-Karaki G, Massadeh A. Antioxidant activity, total phenols and variation of chemical composition from essential oil in sage (*Salvia officinalis* L.) grown under protected soilless condition and open field conditions. *Adv Environ Biol*. 2013;7:894-901.
63. Notman R, Noro MG, Anwar J. Interaction of Oleic Acid with Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) Bilayers Simulated by Molecular Dynamics. *J Phys Chem B*. 2007;111:12748-12755. doi:10.1021/jp0723564
64. Prenner E, Chiu M. Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions. *J Pharm Bioallied Sci*. 2011;3:39-59. doi:10.4103/0975-7406.76463
65. Talló K, Moner V, de Cabo M, Cócera M, López O. Vesicular nanostructures composed of oleic acid and phosphatidylcholine: Effect of pH and molar ratio. *Chem Phys Lipids*. 2018;213:96-101. doi:10.1016/j.chemphyslip.2018.04.002
66. Telang DR, Patil AT, Pethe AM, Tatode AA, Anand S, Dave VS. Kaempferol-phospholipid complex: formulation, and evaluation of improved solubility, in vivo bioavailability, and antioxidant potential of kaempferol. *J Excipients Food Chem*. 2016;7:89-116.
67. Khurana RK, Bansal AK, Beg S, et al. Enhancing biopharmaceutical attributes of phospholipid complex-loaded nanostructured lipidic carriers of mangiferin: Systematic development, characterization and evaluation. *Int J Pharm*. 2017;518:289-306. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.12.044
68. Campos DA, Madureira AR, Gomes AM, Sarmento B, Pintado MM. Optimization of the production of solid Witepsol nanoparticles loaded with rosmarinic acid. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;115:109-117. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.10.035
69. Liu Y, Gu J, Zhang J, et al. LiFePO₄ nanoparticles growth with preferential (010) face modulated by Tween-80. *RSC Adv*. 2015;5:9745-9751. doi:10.1039/C4RA14791J
70. Gudi G, Krähmer A, Krüger H, Schulz H. Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy on Intact Dried Leaves of Sage (*Salvia officinalis* L.): Accelerated Chemotaxonomic Discrimination and Analysis of Essential Oil Composition. *J Agric Food Chem*. 2015;63:8743-8750. doi:10.1021/acs.jafc.5b03852
71. Ali N, Mattsson K, Rissler J, et al. Analysis of nanoparticle-protein coronas formed in vitro between nanosized welding particles and nasal lavage proteins. *Nanotoxicology*. 2016;10:226-234. doi:10.3109/17435390.2015.1048324
72. Lundqvist M, Augustsson C, Lilja M, et al. The nanoparticle protein corona formed in human blood or human blood fractions. *Plos One*. 2017;12:e0175871. doi:10.1371/journal.pone.0175871
73. Stolnik S, Daudali B, Arien A, et al. The effect of surface coverage and conformation of poly(ethylene oxide) (PEO) chains of poloxamer 407 on the biological fate of model colloidal drug carriers. *Biochim et Biophys Acta (BBA) - Biomembrane*. 2001;1514:261-279. doi:10.1016/S0005-2736(01)00376-5
74. Fologea D, Ledden B, McNabb DS, Li J. Electrical characterization of protein molecules by a solid-state nanopore. *Appl Phys Lett*. 2007;91:53901-1. doi:10.1063/1.2767206
75. Dasgupta N, Ranjan S, Patra D, Srivastava P, Kumar A, Ramalingam C. Bovine serum albumin interacts with silver nanoparticles with a "side-on" or "end on" conformation. *Chem Biol Interact*. 2016;253:100-111. doi:10.1016/j.cbi.2016.05.018
76. Mudunkotuwa IA, al Minshid A, Grassian VH. ATR-FTIR spectroscopy as a tool to probe surface adsorption on nanoparticles at the liquid-solid interface in environmentally and biologically relevant media. *Analyst*. 2014;139:870-881. doi:10.1039/C3AN01684F
77. Tsai D-H, DelRio FW, Keene AM, et al. Adsorption and Conformation of Serum Albumin Protein on Gold Nanoparticles Investigated Using Dimensional Measurements and in Situ Spectroscopic Methods. *Langmuir*. 2011;27:2464-2477. doi:10.1021/la104124d
78. Myshakina NS, Asher SA. Peptide Bond Vibrational Coupling. *J Phys Chem B*. 2007;111:4271-4279. doi:10.1021/jp065247i
79. Kong J, Yu S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2007;39:549-559. doi:10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x
80. Singh N, Marets C, Boudon J, Millot N, Saviot L, Maurizi L. In vivo protein corona on nanoparticles: does the control of all material parameters orient the biological behavior? *Nanoscale Adv*. 2021;3(5):1209-1229. doi:10.1039/D0NA00863J
81. Park SJ. Protein-nanoparticle interaction: corona formation and conformational changes in proteins on nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:5783-5802. doi:10.2147/IJN.S254808
82. Griebenow K, Klibanov AM. Lyophilization-induced reversible changes in the secondary structure of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:10969-10976. doi:10.1073/pnas.92.24.10969
83. Koliqi, R., Dimchevska, S., Geskovski, N., Petruševski, G., Chacorovska, M., Pejova, B., R. Hristov, Ugarkovic, S., Goracinova, K., 2016. PEO-PPO-PEO/Poly(DL-lactide-co-caprolactone) Nanoparticles as Carriers for SN-38: Design, Optimization and Nano-Bio Interface Interactions. *Curr Drug Deliv* 13, 339-352. doi:10.2174/1567201813666151130221806
84. Stark B, Debbage P, Andreae F, Mosgoeller W, Prassl R. Association of vasoactive intestinal peptide with polymer-grafted liposomes: Structural aspects for pulmonary delivery. *Biochim et Biophys Acta (BBA) - Biomembrane*. 2007;1768:705-714. doi:10.1016/j.bbamem.2006.11.017
85. Bodratti A, Alexandridis P. Formulation of Poloxamers for Drug Delivery. *J Func Biomater*. 2018;9:11. doi:10.3390/jfb9010011
86. Bikiaris D, Karavelidis K, Giliopoulos P. Evaluating the effects of crystallinity in new biocompatible polyester nanocarriers on drug release behavior. *Int J Nanomedicine*. 2011;3021:3021-3032. doi:10.2147/IJN.S26016
87. Luo Y, Teng Z, Li Y, Wang Q. Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery: Chitosan coating improves stability, controlled delivery, mucoadhesion and cellular uptake. *Carbohydr Polym*. 2015;122:221-229. doi:10.1016/j.carbpol.2014.12.084
88. Dharmala K, Yoo JW, Lee CH. Development of Chitosan-SLN Micro-particles for chemotherapy: In vitro approach through efflux-transporter modulation. *J Control Release*. 2008;131:190-197. doi:10.1016/j.jconrel.2008.07.034
89. Peppas NA, Sahlin JJ. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *Int J Pharm*. 1989;57:169-172. doi:10.1016/0378-5173(89)90306-2
90. Chen X, Guo C, Kong J. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res*. 2012;7:376-385.

91. Huang W-J, Zhang X, Chen W-W. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomed Report*. 2016;4:519-522. doi:10.3892/br.2016.630
92. Ghorbani A, Esmailizadeh M. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *J Tradit Complement Med*. 2017;7:433-440. doi:10.1016/j.jtcme.2016.12.014
93. Jasicka-Misiak I, Poliwoda A, Petecka M, Buslovych O, Shlyapnikov VA, Wieczorek PP. Antioxidant Phenolic Compounds in *Salvia officinalis* L. and *Salvia sclarea* L. *Ecologic Chem Eng S*. 2018;25:25-142. doi:10.1515/eces-2018-0009
94. Lopresti AL. *Salvia* (Sage): A Review of its Potential Cognitive-Enhancing and Protective Effects. *Drugs R&D*. 2017;17:53-64. doi:10.1007/s40268-016-0157-5
95. Shalabalija D, Mihailova L, Crcarevska MS, et al. Formulation and optimization of bioinspired rosemary extract loaded PEGylated nanoliposomes for potential treatment of Alzheimer's disease using design of experiments. *J Drug Delivery Sci Technol*. 2021;63:102434. doi:10.1016/j.jddst.2021.102434
96. Ivanova DG, Yaneva ZL. Antioxidant Properties and Redox-Modulating Activity of Chitosan and Its Derivatives: Biomaterials with Application in Cancer Therapy. *BioRes Open Access*. 2020;9:64-72. doi:10.1089/biores.2019.0028
97. Poller B, Gutmann H, Krähenbühl S, et al. The human brain endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model for drug transport studies. *J Neurochem*. 2008;107:1358-1368. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05730.x
98. Awortwe C, Fasinu PS, Rosenkranz B. Application of Caco-2 Cell Line in Herb-Drug Interaction Studies: Current Approaches and Challenges. *J Pharm Pharm Sci*. 2014;17:1-19. doi:10.18433/J30K63
99. Eleraky NE, Omar MM, Mahmoud HA, Abou-Taleb HA. Nanostructured lipid carriers to mediate brain delivery of Temazepam: Design and in vivo study. *Pharmaceutics*. 2020;12:451. doi:10.3390/pharmaceutics12050451

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

How to cite this article: Markova E, Taneska L, Kostovska M, et al. Design and evaluation of nanostructured lipid carriers loaded with *Salvia officinalis* extract for Alzheimer's disease treatment. *J Biomed Mater Res*. 2022;110(6):1368-1390. doi:10.1002/jbm.b.35006



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Drug Delivery Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jddst

Research paper

Formulation and optimization of bioinspired rosemary extract loaded PEGylated nanoliposomes for potential treatment of Alzheimer's disease using design of experiments

Dushko Shalabalija^{a,b,1,*}, Ljubica Mihailova^{a,1}, Maja Simonoska Crcarevska^a, Ivana Cvetkovikj Karanfilova^b, Vladimir Ivanovski^c, Aleksandra Kapedanovska Nestorovska^d, Gabriela Novotni^e, Marija Glavas Dodov^a

^a Institute of Pharmaceutical Technology, Center of Pharmaceutical Nanotechnology, Faculty of Pharmacy, Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Majka Tereza 47, 1000 Skopje, Republic of North Macedonia

^b Center for Natural Products, Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Majka Tereza 47, 1000, Skopje, Republic of North Macedonia

^c Institute of Chemistry, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Arhimedova 5, 1000, Skopje, Republic of North Macedonia

^d Institute of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Majka Tereza 47, 1000, Skopje, Republic of North Macedonia

^e University Clinic of Neurology, Department of Neuroimmunology, Faculty of Medicine, Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Majka Tereza 17, 1000, Skopje, Republic of North Macedonia

ARTICLE INFO

Keywords:

Alzheimer's disease
Rosemary extract
Nanoliposomes
Design of experiments
Optimization

ABSTRACT

Based on the latest scientific knowledge about the antioxidant stress being the main trigger factor for the development of Alzheimer's disease (AD) and the advantages of nanoliposomes (NLs) as drug carriers for targeted brain delivery, the aim of this study was design, development and optimization of rosemary extract (RE) loaded PEGylated NLs for potential AD treatment. Central composite design was applied in order to obtain the optimal formulations. NLs dispersions were prepared by modified dry lipid film hydration method and were investigated in terms of their physicochemical and biopharmaceutical properties. Optimized NLs samples were characterized with D50 around ~120 nm with narrow unimodal distribution, negative Zeta potential (-18.50 to -48.3 mV), followed by high drug encapsulation efficiency (~90%) and prolonged drug release during 24 h (24.83-48.39%). All optimal NLs samples showed statistically significant higher antioxidant capacity (>94.15%) compared to RE (90.04%). Highest amount of adsorbed plasma proteins, in plasma of healthy volunteers and AD patients, was obtained for the formulation with no PEG on its surface, while IR-ATR spectrophotometric analysis pointed out that the formulations with larger PEG content showed a stronger hydrogen bonding between PEG and BSA. The protein corona formation was also confirmed with in vitro stability studies.

1. Introduction

Human brain is one of the most important and intricate organs, with its network of billions of cells giving rise to every aspect of our shared humanity. Living by the rules of this pattern-matching machine and with the aging of the world population, brain-based disorders especially neurodegenerative diseases, are becoming one of the major health problems. Because of their still undefined and complex pathophysiology,

neurodegenerative diseases like Alzheimer's, are one of the global health challenges of the century. Alzheimer's disease (AD) as the most prevalent of the dementias [1], is characterized by the abnormal extracellular aggregation and deposition of amyloid- β (A β) in amyloid plaques [2] and hyper phosphorylated tau protein in intracellular neurofibrillary tangles [3]. Oxidative stress is a center of the overall scheme as one of the major trigger factors and an important contributor to the AD pathology. As a primary toxicological event, oxidative stress is

* Corresponding author.

E-mail addresses: d.shalabalija@ff.ukim.edu.mk, d_salabalija@hotmail.com (D. Shalabalija).

¹ first two authors contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102434>

Received 11 August 2020; Received in revised form 6 February 2021; Accepted 14 February 2021

Available online 19 February 2021

1773-2247/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

characterized by reactive oxygen species (ROS) which at higher concentrations are engendering the nucleic acid, protein and lipid oxidation [4]. Many research studies have suggested that the basic mechanisms which induce oxidative stress are mitochondrial dysfunction [5], metal accumulation [6], hyperphosphorylated tau [3], A β accumulation [2] and inflammation [7]. As a crucial upstream factor in the pathogenesis of the disease, oxidative stress accompanies pathological changes in AD and therefore its products represent potential biomarkers in blood for diagnosis. Furthermore, aldehydes and lipid hydroperoxides, as main products of free radical damage in the brain, could be detected into the blood even before the onset of dementia syndrome at its preclinical stage [8]. Consequently, investigation of the oxidative stress is of particular interest.

The therapeutic options for treatment of AD are symptomatic. Having in mind the complexity and limitations of AD pathophysiology, current research is focused on the prevention and deceleration of the disease [9]. There have been long-established studies in the field of neuroprotective drugs from natural sources promoting multi-targeted drug therapy as a better way to achieve the desired treatment. One of the most promising plants is *Rosmarinus officinalis* L. of the Lamiaceae family. Among the wide range of exogenous antioxidants, biologically active compounds of rosemary extract (RE), such as phenolic acids (rosmarinic acid, chlorogenic acid), phenolic diterpenes (carnosic acid, carnosol), pentacyclic triterpenes (ursolic, oleanolic, butilic acid), flavonoids (derivatives of apigenin and luteolin) and essential oil [10], are organic compounds well known for their free radical scavenging and metal chelating properties. This antioxidant effect is complemented by the activation of erythroid derived 2-related factor 2 (Nrf-2) pathways which are involved in the antioxidant response elements- (AREs)- mediated induction of genes for a variety of antioxidant enzymes, including phase II detoxifying enzymes such as: oxygenase-1, NADPH-dependent quinone oxidoreductase, and -glutamyl cysteine ligase. Furthermore, scientific data indicate that RE components complete their anti-inflammatory effect via Nrf2/HO-1 pathway activation which results with modulation and downregulation of the inflammatory response in AD (reduction the serum levels of pro-inflammatory cytokines: TNF-, IL-6 and prostaglandin E-2) and inhibition of cytokine-induced adhesion molecules on endothelial cells surface [11, 12]. Additionally, *in vitro* and *in vivo* studies have evinced the possible synergic activity of RE components to inhibit the acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, as well as to inhibit the deposition of cellular oligomers of A β 42 and A β 43, and to promote the normal non-amyloidogenic-dependent pathway of processing the amyloid processing protein by -secretase [10,13]. In this sense, polyphenols are considered as potential candidates in neuroprotection, prevention and treatment of diseases caused by oxidative damage [14]. However, due to their poor water solubility and low bioavailability, their clinical use is quite limited [15]. Hence, developing different drug delivery approaches would be a prospective solution to these problems.

In the last two decades, research studies have clearly shown the inherent tendency towards usage of nanotechnology in medicine [16]. Most of the active compounds cannot reach the brain because of the presence of the blood brain barrier (BBB) which is mainly composed by endothelial cells linked by tight junctions [17]. Therefore, a whole new generation of multifunctional molecular platforms have been developed, capable of transporting drug molecules through the BBB with the ability to deliver a drug more selectively to a specific site, with high stability and flexibility [18]. A wide range of nano-systems of various sizes, shapes, architectures, charges and surface properties have been designed for the effective delivery of the active compounds to the brain, including liposomes, lipid emulsions, solid lipid nanoparticles, polymeric nanoparticles, carbon nanotubes, nanofibers, dendrimers, micelles, inorganic nanoparticles made of iron oxide and gold nanoparticles [19]. Liposomes have gained much attention due to their biocompatibility and biodegradability, as well as low toxicity. Their unique physicochemical properties allow these systems to transport and

effectively deliver both hydrophilic and hydrophobic therapeutic agents to the target site of action. Surface functionalization onto liposomes is considered as one of the most promising approaches for improving the pharmacokinetics and biodistribution of encapsulated drug substances. Thus, the addition of polyethylene glycol (PEG) has been reported to restrain the adsorption of the plasma proteins in the circulation onto liposome surfaces, which is the main clearance problem *in vivo* [20]. The formation of protective layer over the vesicles is preventing the binding of plasma proteins, and consequently the process of opsonization and retrieval of macrophages of the reticuloendothelial system (RES). Accordingly, the latest scientific research studies indicate that PEGylation is inducing nonspecific cellular detachment resulting with prolonged bioavailability of the active compounds in the central nerve system (CNS) parenchyma, which is of particular benefit for targeted action [21]. The utilization of liposomes and PEG-based formulations for targeted brain delivery is well-established and substantial, supported by tremendous amount of research studies, although when it comes to treatment of AD, the literature is quite limited [19].

Therefore, the main aim of this study was design, development, optimization and physicochemical and biopharmaceutical characterization of RE loaded PEGylated nanoliposomes (NLs) with the potential for efficient brain targeting and effective and safe treatment of AD, using Design of Experiments as an approach for qualitative and quantitative identification of the main formulation variables' impact on the prepared NLs' properties like mean particle size (D₅₀), absolute amount of encapsulated Rosmarinic acid (RA), as well as the total amount of *in vitro* released RA during the period of 24 h.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Soybean lecithin (SL) was purchased from Vitalia, R. N. Macedonia. LIPOID PE 18:0/18:0-PEG 2000 (PEG) was kindly donated from Lipoid, Germany. Rosemary extract (RE) was a gift from the Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Skopje, R. N. Macedonia. Cholesterol (CH), rosmarinic acid (RA), 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), Bradford Reagent (0.1–1.4 mg/mL protein), Bovine Serum Albumin (BSA) and fluorescein sodium were purchased from Sigma Aldrich (Germany). Methanol, chloroform, formic acid and acetonitrile were of HPLC grade purity (Merck KGaA, Germany). EndoGRO-MV Complete Culture Media Kit SCME004 (cell culture media) was purchased from Merck, Germany. Phosphate buffer pH 7.4 (PB pH 7.4) was prepared *ex tempore* (Ph. Eur. 9). Human plasma from healthy volunteers and AD patients was obtained from the Institute for Neurology, Clinical Center - Mother Theresa, Skopje, R. N. Macedonia. The protocols for the human plasma studies were approved by the ethical committee of the Faculty of Medicine, Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Republic of North Macedonia (25.05.2016, No. 03-2039/9).

2.2. Preparation of the NLs

Liposome dispersions were prepared by modified lipid film hydration technique [22]. For this purpose, required amounts of SL, CH (30 mg), PEG and RE were dissolved in methanol:chloroform mixture 1:4 (v/v). Afterwards, the organic solvents were removed by evaporation under vacuum using a rotavapor (25 °C, 50 rpm, 50 mbar; Buchi 215, Switzerland). The obtained dry thin lipid film was further hydrated with a PB pH 7.4. The hydration was carried out in four consecutive cycles consisting of 3 steps each lasting 5 min: ultrasonication (50/60 Hz; ULTRASON-H, J.P. Selecta), vortexing (Tehtnika, EV-102, Slovenia) and manual mixing at room temperature. Obtained liposomes were submitted to high shear homogenization (24000 rpm, 5 min; Ultra-Turrax T25, IkaWerke, Germany) and were allowed to stand at 4–8 °C for 24 h. Finally, the liposomal dispersion was homogenized

again at 6000 rpm, 3 min and stored at 4–8 °C.

2.3. Design of experiments

During the preliminary studies, different formulations of NLS were prepared in order to obtain vesicles with mean size of ~200 nm, which is known to be suitable for intravenous application achieving long plasma circulation time thus leading to successful brain delivery [23,24]. In these experiments, the mass ratio of SL:CH was varied in a range from 5:1 to 20:1. The results obtained from particle size analysis revealed that the lowest $D_{50} = 136$ nm was originated from the sample with 300 mg of SL (SL:CH = 10:1 mass ratio), which was further selected for preparation of PEGylated liposomes, where PEG was incorporated into the lipid phase (SL:CH:PEG = 10:1:0.5, mass ratio). In this stage of the formulation development, higher RE encapsulation efficacy for 40% was obtained when RE was incorporated in the NLS' lipid phase in comparison when it was added in the water phase during the NLS preparation. Additionally, the incorporation of RE into the lipid film resulted with increase in liposomes size from 129 to 136 nm [22].

In order to determine the boundaries of the design space, one factor at a time (OFAT) experiments were performed [25]. The mass ratio of SL:CH:PEG was varied from 7.5:1:3 to 10.25:1:0.25, accordingly, along with the observation that the change in the amounts of SL and PEG in the formulations, significantly affected the mean vesicle size, absolute amount of encapsulated RA as well as the *in vitro* drug release characteristics. With the aim to describe the influence of the formulation factors and their interactions on the investigated parameters more precisely, central composite design - CCD (Design-Expert V8 trial computer software, Stat-Ease, Inc. Minneapolis, MN) was applied. The amounts (mg) of RE, SL and PEG (Factor A, B and C, accordingly) were chosen as potential critical formulation parameters that affect the particle size, the absolute amount of encapsulated RA, as well as the absolute amount of RA released in 1, 4, 6 and 24 h, and hence, the response patterns and dependence equations of the parameters of interest were established. The main idea was to obtain the optimal formulation in terms of the overall NLS physicochemical and biopharmaceutical properties (mean particle size <200 nm, high drug encapsulation efficacy and controlled drug release) which will achieve prolonged circulation time, efficient BBB transport as well as therapeutic drug doses and controlled drug release in the brain. 20 experiments were performed, with all factors varied on 2 levels and with 6 replicates of the central point. The coded and actual values for the levels at which the three independent variables were varied are shown in Table 1. The experiments proposed by the Design-Expert software are shown in Table 2. The experiments were performed in random order.

2.4. Characterization of the NLS

2.4.1. Mean particle size and particle size distribution

Mean particle size (D_{50}) and particle size distribution (SPAN) of the prepared NLS were determined by laser diffractometry (Mastersizer 2000, Hydro 2000S, Malvern Instr. Ltd., UK). Certain amount of aliquot was transferred to the optical measurement cell containing distilled water as dispersing cell medium. Measurements were taken under the following conditions: stirring 1750 rpm, refractive index of NLS 1.52 and absorption index 0.001. In order to obtain statistically significant results, at least 3 batches from each sample and at least 3 analyses from

Table 1
Coded and real values of the independent experimental variables.

Factor	Low limit		Upper limit		
	Coded values	Real values	Coded values	Real values	
A	RE	-1	200	1	400
B	SL	-1	250	1	310
C	PEG	-1	5	1	50

Table 2
Experiments proposed by the Design-Expert software.

Std	Run	A: RE (mg)	B: SL (mg)	C: PEG (mg)
19	1	300	280	27.5
8	2	400	310	50
20	3	300	280	27.5
14	4	300	280	50
7	5	200	310	50
2	6	400	250	5
11	7	300	250	27.5
16	8	300	280	27.5
17	9	300	280	27.5
3	10	200	310	5
9	11	200	280	27.5
5	12	200	250	50
12	13	300	310	27.5
4	14	400	310	5
18	15	300	280	27.5
15	16	300	280	27.5
6	17	400	250	50
10	18	400	280	27.5
1	19	200	250	5
13	20	300	280	5

each batch were measured. Each analysis was average value of 10 measurements.

2.4.2. Drug content

The absolute amount of encapsulated RA (mg) into NLS was calculated indirectly by determination of the non-encapsulated RA using previously validated method described by Cambuleva et al. [22]. NLS dispersions were centrifuged (Rotofix 32 - Hettich Zentrifugen, Germany) at 4500 rpm, 25 °C, 15 min, 4 cycles in Vivaspin 20 ultrafiltration cuvettes, 100 000 MWCO units (Sartorius, Germany). Afterwards, the supernatant was removed and HPLC analysis was performed on a Merck Hitachi HPLC system (Darmstadt, Germany) equipped with an Ellite LaChrom L-2200 autosampler, L-2130 pump, L-2450 diode array detector. The chromatographic conditions were set according to the method described by Cvetkovikj et al. [26]. Namely, the Zorbax Eclipse XDB RP C-18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm, Agilent, Germany) was used as a column. Mobile phase was consisted of: A - 1% formic acid (pH 3.0) and B - acetonitrile (90:10 v/v). Quantification of RA was performed using UV/VIS DAD at 330 nm.

2.4.3. In vitro release studies

The total amount of *in vitro* released RA from NLS (3 mL liposomal dispersion) was examined using a membrane dialysis method (MEMBRA-CEL dialysis tubing; Serva Feinbiochemica GmbH, Germany) in 30 mL of physiologically relevant media (PB pH 7.4) at 37 ± 1 °C and 100 rpm. At predetermined time intervals (after 1, 4, 6, 24 h), 10 mL of the medium were taken and replaced with an equal volume of thermostated PB pH 7.4. The amount of RA released from NLS formulations was determined using the previously mentioned HPLC method by Cvetkovikj et al. [26].

In order to determine the kinetics of release of RA from the prepared NLS, the *in vitro* release data were mathematically modeled using DDSolver 1.0 (menu-driven add-in program for Microsoft Excel) computer program.

2.5. Optimization of formulation

Based on results from the experimental design studies and the established mathematical models, subsequent optimization of formulation was carried out in means of minimal particle size (D_{50}), maximal absolute amount of encapsulated RA and different RA *in vitro* release patterns.

Predicted optimal RE loaded PEGylated NLS formulations (NL1-NL5) were prepared by previously described modified lipid film hydration

technique. In all optimal formulations, 400 mg of RE was incorporated into the lipid film. In order to obtain liposomal formulations suitable for parenteral administration and brain delivery, prepared samples were filtered through 0.22 µm pore size filters (Sartorius, Germany).

Taking into consideration that NL1, NL3 and NL5 contain 50 mg, and NL2 and NL4 contain 5 mg PEG on their surface, for the purpose of protein adsorption studies blank formulations of NL1 and NL2 (NLb1 and NLb2, respectively) and non-PEGylated blank analogue of NL1 (NLb01) were prepared by the previously described method. NLb1 and NLb2 consisted the same amounts of all components as NL1 and NL2, except incorporated RE. NLb01 consisted the same amounts of all components as NL1, but without incorporated RE and PEG on its surface.

NLb1 and NLb2 were also used for performing IR – ATR spectroscopic analysis.

2.6. Characterization of optimal NLS formulations

Optimal formulations (NL1-NL5) were characterized in terms of particle size (D_{50}) and particle size distribution (SPAN), drug content and *in vitro* release studies by the above described methods.

The drug content into optimal NLS was expressed as *Encapsulation efficacy* (EE %) and *Drug loading* (DL).

$$EE\% = \frac{(\text{total amount of RA} - \text{non-encapsulated amount of RA})}{\text{total amount of RA}} * 100 \quad (1)$$

EE% (Eq. (1)) describes the efficiency of the RA incorporation method into the nano-systems, while the DL (Eq. (2)) capacity represents the amount of RA trapped inside the carrier itself. DL was calculated in order to determine the mg of RA incorporated in 100 mg of lipid.

$$DL = \frac{\text{amount of RA encapsulated in NLS (mg)}}{\text{amount of lipid phase in NLS}} * 100 \quad (2)$$

The amount of RA released from optimal NLS formulations after 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 h was converted and expressed as % of released RE (Eq. (3)).

$$\% \text{ of released RE} = \frac{(\text{released amount of RA})}{\text{total amount of encapsulated RA}} * 100 \quad (3)$$

Furthermore, additional characterization of the optimal formulation was done.

2.6.1. Zeta potential measurements

Zeta potential (ZP) was determined by Zetasizer Nano Series, Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., UK, after diluting optimal NLS dispersions in 10 mM PB pH 7.4, 1:20 (v/v). The measurements were performed in disposable transparent cuvettes at 25 °C with thermostating time of 120 s, viscosity of the medium 0.8894 cP, dielectric constant 78.5 and angle of 173°. At least 3 batches from each sample and at least 3 analyses from each batch were measured. Each analysis was average value of at least 12 measurements.

2.6.2. Antioxidant capacity (ORAC assay)

Antioxidant capacity of RE and optimal NLS formulations (NL1-NL5) was determined by performance of Oxygen Radical Antioxidant Capacity (ORAC) assay based on the oxidation of a fluorescent probe by peroxy radicals from 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH). 25 µL of NLS samples were incubated with 150 µL of fluorescein solution (10 nM) in a dark place (37 °C, 30 min). Subsequently, the fluorescence was measured using Multilabel Reader (excitation $\lambda = 492$ nm, emission $\lambda = 535$ nm, VICTOR Perkin Elmer, USA) in order to determine the background signal. Afterwards, 25 µL of AAPH (100 mM) was added and the fluorescence was measured at the beginning of the experiment and after 30, 60, 90 and 120 min. Fluorescein + AAPH + PB pH 7.4 was used as a positive, and fluorescein + PB pH 7.4 as a negative control, respectively. All experiments were conducted in triplicate and

statistical analysis was done using ANOVA. The antioxidant capacity of RE and NLS formulations was expressed as % of initial fluorescence of each sample (Eq. (4)).

$$\% \text{ of initial fluorescence} = \frac{\text{fluorescence of sample in given time period}}{\text{fluorescence of sample in 0 min}} * 100 \quad (4)$$

2.6.3. Protein adsorption studies (Bradford assay)

During the OFAT experiments, it was demonstrated that the increase of PEG amount in the formulation was followed by decrease of % BSA adsorbed on the NLS surface [25]. With the aim to investigate the effect of PEG presence and its amount on the protein corona (PC) formation, and hence the *in vivo* stability and fate of NLS, comparative protein adsorption studies were performed to determine the amount of proteins adsorbed on the surface of blank formulations of NL1 and NL2 (NLb1 and NLb2) versus non-PEGylated blank analogue of NL1 (NLb01). The formation of the NLS-protein complex was investigated by incubating NLS dispersions with human plasma from healthy volunteers and AD patients. Prior to the incubation step, the plasma aliquots previously stored at 4 °C were centrifuged for 5 min at 15 000 rpm in order to remove the protein aggregates. NLS formulations were diluted with distilled water to a final lipid concentration of 1 mM, and then incubated with plasma (NLS:human plasma = 1:1 (v/v)). The incubation was performed on a water bath with constant horizontal stirring (37 °C, 1 h). A Bradford assay (microtiter plate protocol) at the obtained supernatant after centrifugation (10 min, 12 000 rpm) was performed and the % of unbound plasma proteins was calculated (Eq. (5)). Diluted plasma, previously non incubated with NLS was used as a control. Samples and controls were applied in triplicate.

$$\% \text{ of protein adsorption} = \frac{\text{amount of proteins adsorbed on NLS}}{\text{total amount of proteins in plasma}} * 100 \quad (5)$$

2.6.4. IR – ATR spectroscopic analysis

In order to detect the possible interactions among the NLS components in the formulations as well as to observe the NLS-protein bonds formed upon NLS administration *in vivo*, IR-ATR analysis of freeze-dried samples was performed. For that purpose, 150 µL of the prepared NLS (NL1 and NL2) and blank NLS (NLb1 and NLb2) were incubated with 1 mg/mL solution of BSA in PB pH 7.4 for 1 h in a shaking water bath (37 °C, 75 rpm, Haake SVB 20, JP Selecta, Spain). After adsorption, the fraction of unbound BSA was separated by centrifugal ultrafiltration (3 cycles, 15 min, 4000 rpm, 25 °C, Rotofix 32 - Hettich Zentrifugen, Germany). Subsequently, formed NLS-protein complexes were submitted to freeze-drying (–40 °C, 0.052 mBar; FreeZone 2.5 Freeze Dry System – LABCONCO, USA). Prior the lyophilisation, the samples were stored at –20 °C for 24 h and at –80 °C for additional 2 h.

The IR-ATR reflectance spectra were recorded on a Perkin-Elmer System 2000 FT-IR spectrometer, using Golden Gate (Specac) as an ATR accessory. The accessory was equipped with diamond ATR crystal and ZnSe lenses (which allow recording as low as 520 cm^{-1}). The angle of incidence was 45°. The background spectrum was recorded against air/N₂. Nitrogen gas with 99.999% purity was used for purging purposes. The number of scans (bidirectional, double-sided) was 64, both for the background and the sample spectra.

2.6.5. Stability of NLS in physiologically relevant media, human plasma and cell culture media

The effect of PEG on the *in vitro* stability of NLS and the PC complex formation was investigated after incubation of the prepared optimal formulations NL1-NL5 (200 µL) in 800 µL a) PB pH 7.4, simulating physiologically relevant medium and vehicle in the formulation; b) human plasma or c) EndoGRO-MV Complete Culture Media Kit SCME004 (isotonic and isosmotic cell culture media for hCMC/D3 cell

line which simulates the human blood brain barrier) at 37 °C for 2, 6 and 24 h. The samples were analyzed in terms of zeta potential, particle size and polydispersity index (PDI), which is a tool that describes the degree of non-uniformity of a size distribution of particles (Zetasizer Nano-Series, Malvern Instr. Ltd., UK). The method for particle size and PDI determination was earlier validated and obtained results for particle size were also shown to be comparable with those from the laser diffractometry (Mastersizer 2000, Hydro 2000S, Malvern Instr. Ltd., UK).

3. Results and discussion

3.1. Design of experiments

RE loaded PEGylated NLs with the potential for efficient and safe treatment of AD were prepared using systematic approach during the process of design, development and optimization. After careful examination of the historical data achieved in the previously performed OFAT experiments, Design of Experiments i.e. central composite design (CCD) from the response surface methods (RSM) was performed with the rationale of qualitative and quantitative identification of the main formulation independent variables' impact (mg of SL, PEG and RE) on the NLs responses of interest (particle size, absolute amount of encapsulated RA, total amount of RA released in 1, 4, 6 and 24 h) and establishment of mathematical models which describe their relation. Prepared formulations were subjected to physicochemical and biopharmaceutical characterization according to described methods.

Subsequently, optimization of NLs formulations was performed in accurately defined design space regarding the required physicochemical and biopharmaceutical properties of NLs for a successful brain delivery.

Obtained results for D_{50} were in a range from 120 ± 1.65 to 133 ± 2.60 nm. The absolute amount of encapsulated RA was 7.26 ± 0.10 – 18.83 ± 0.06 mg, while the total amount of released RA in a period of 24 h was 0.97 ± 0.06 – 2.65 ± 0.05 mg (Table 3). As mentioned before, the aim of these experiments was to identify the formulation variables (Factors A, B, C) and their possible interactions that had a statistically significant impact on the examined responses. According to Design Expert software, best fitted model for the D_{50} response was reduced cubic. Quadratic model was proposed for the absolute amount of encapsulated RA, while the total amount of RA released in a period of 1, 4, 6 and 24 h fitted in 2FI models. ANOVA statistical analysis for models of the examined responses is shown in Table 4.

As it can be seen, the values for “Adj- R^2 ” and “Pred- R^2 ” for all response models were in reasonable agreement, indicating that the data were described adequately by the proposed mathematical model. Values of “ p ” less than 0.05 indicated that model terms were significant. Obtained “Lack of Fit F ” values showed that the Lack of Fit was not significant relative to the pure errors. “Adequate Precision” values were greater than 4, thus implying that all suggested models could be used to navigate the design space.

Furthermore, mathematical correlations between the values of the investigated variables and the observed responses were established (Equations (6)–(11)). The negative sign in front of the factors indicated

Table 3
Real values for the investigated formulation factors and obtained responses from the designed formulations.

Std	Run	A: RE	B: SL	C: PEG	$D_{50} \pm SD$ (nm)	Abs. amount of encapsulated RA $\pm SD$ (mg)	Total amount of RA $\pm SD$ released in 1 h (mg)	Total amount of RA $\pm SD$ released in 4 h (mg)	Total amount of RA $\pm SD$ released in 6 h (mg)	Total amount of RA $\pm SD$ released in 24 h (mg)
19	1	300	280	27.5	124 ± 1.74	13.59 ± 0.07	0.43 ± 0.03	1.09 ± 0.05	1.99 ± 0.06	2.35 ± 0.05
8	2	400	310	50	128 ± 1.45	17.02 ± 0.09	0.56 ± 0.02	1.60 ± 0.03	1.78 ± 0.05	1.97 ± 0.06
20	3	300	280	27.5	126.37 ± 1.56	13.10 ± 0.07	0.58 ± 0.05	1.43 ± 0.04	1.62 ± 0.02	1.89 ± 0.09
14	4	300	280	50	125 ± 1.31	13.61 ± 0.08	0.28 ± 0.02	0.80 ± 0.02	0.94 ± 0.04	1.32 ± 0.04
7	5	200	310	50	131 ± 1.91	7.26 ± 0.10	0.17 ± 0.02	0.56 ± 0.04	0.66 ± 0.03	0.97 ± 0.06
2	6	400	250	5	126 ± 1.84	18.18 ± 0.07	0.91 ± 0.04	1.77 ± 0.02	1.96 ± 0.05	2.65 ± 0.05
11	7	300	250	27.5	126.85 ± 1.44	13.83 ± 0.06	0.37 ± 0.04	0.92 ± 0.03	1.11 ± 0.03	1.34 ± 0.06
16	8	300	280	27.5	126 ± 1.87	13.06 ± 0.09	0.58 ± 0.03	1.46 ± 0.04	1.58 ± 0.03	1.85 ± 0.07
17	9	300	280	27.5	127 ± 2.36	13.06 ± 0.04	0.59 ± 0.03	1.52 ± 0.04	1.61 ± 0.03	1.90 ± 0.05
3	10	200	310	5	129 ± 1.85	8.80 ± 0.08	0.39 ± 0.01	1.03 ± 0.05	1.32 ± 0.06	1.45 ± 0.04
9	11	200	280	27.5	133 ± 2.60	8.42 ± 0.07	0.21 ± 0.03	0.89 ± 0.03	0.83 ± 0.01	1.12 ± 0.04
5	12	200	250	50	127 ± 2.79	7.79 ± 0.05	0.18 ± 0.01	0.61 ± 0.03	0.87 ± 0.03	1.01 ± 0.08
12	13	300	310	27.5	127 ± 1.85	13.33 ± 0.07	0.37 ± 0.02	1.05 ± 0.03	1.22 ± 0.05	1.46 ± 0.04
4	14	400	310	5	120 ± 1.65	18.46 ± 0.05	0.64 ± 0.03	1.55 ± 0.06	1.51 ± 0.03	2.03 ± 0.05
18	15	300	280	27.5	127 ± 2.25	13.07 ± 0.03	0.56 ± 0.04	1.51 ± 0.03	1.60 ± 0.07	1.88 ± 0.09
15	16	300	280	27.5	126 ± 0.95	13.05 ± 0.04	0.59 ± 0.02	1.49 ± 0.06	1.63 ± 0.05	1.92 ± 0.06
6	17	400	250	50	123 ± 1.75	18.83 ± 0.06	0.45 ± 0.04	1.07 ± 0.04	1.30 ± 0.05	1.51 ± 0.08
10	18	400	280	27.5	122 ± 1.37	17.81 ± 0.04	0.66 ± 0.03	1.60 ± 0.03	1.90 ± 0.03	2.06 ± 0.03
1	19	200	250	5	127.7 ± 1.57	8.70 ± 0.06	0.80 ± 0.02	1.97 ± 0.06	2.11 ± 0.02	2.39 ± 0.04
13	20	300	280	5	124 ± 1.91	13.98 ± 0.08	0.47 ± 0.04	1.07 ± 0.05	1.37 ± 0.03	1.47 ± 0.02

Table 4
ANOVA statistical analysis of the models.

Response	D ₅₀	Abs. encapsulated amount of RA (mg)	Total amount of RA released in 1 h (mg)	Total amount of RA released in 4 h (mg)	Total amount of RA released in 6 h (mg)	Total amount of RA released in 24 h (mg)
<i>Suggested model</i>	Reduced Cubic	Quadratic	2FI	2FI	2FI	2FI
<i>Sum of Squares (SS)</i>	156.36	247.29	0.59	2.16	2.22	2.84
<i>Degrees of freedom</i>	11	9	6	6	6	6
<i>Mean squares (MS)</i>	14.21	27.48	0.098	0.36	0.37	0.47
<i>F-value</i>	17.13	230.06	8.75	6.23	4.67	4.90
<i>Prob > F</i>	0.0002	<0.0001	0.0006	0.029	0.0096	0.0079
<i>Lack of fit F-value</i>	0.14	4.30	4.15	2.81	4.73	3.75
<i>SD</i>	0.91	0.35	0.11	0.24	0.28	0.31
<i>Mean value</i>	126.30	13.25	0.49	1.25	1.45	1.73
<i>CV%</i>	0.72	2.61	21.59	19.13	19.45	17.98
<i>PRESS</i>	40.60	10.23	0.32	1.27	2.06	2.31
<i>R²</i>	0.9593	0.9952	0.8015	0.7420	0.6833	0.6934
<i>Adj-R²</i>	0.9033	0.9909	0.7099	0.6230	0.5371	0.5519
<i>Pred-R²</i>	0.7509	0.9588	0.5645	0.5579	0.3646	0.4355
<i>Adequate precision</i>	19.342	46.886	11.781	9.028	8.084	8.637

the negatively proportional relationship between the response of interest and the variables studied, while the positive sign referred to a proportional dependence.

$$D_{50}(nm) = +126.11 - 5.50*A + 0.44*B + 0.73*C - 0.79*A * B + 0.46*A * C + 1.71*B*C + 1.32*A^2 + 0.74*B^2 - 1.68*C^2 + 1.04*A * B * C + 3.29*A * B^2 \quad (6)$$

$$\text{Absolute amount of encapsulated RA (mg)} = +13.31 + 4.93*A - 0.25*B - 0.36*C - 0.14*A*B + 0.21*A*C - 0.34*B*C - 0.42*A^2 + 0.042*B^2 + 0.26*C^2 \quad (7)$$

$$\text{Total amount of released RA 1 h (mg)} = +0.49 + 0.15*A - 0.059*B - 0.16*C + 0.031*A * B + 0.038*A * C + 0.098*B*C \quad (8)$$

$$\text{Total amount of released RA 4 h (mg)} = +1.25 + 0.25*A - 0.055*B - 0.27*C + 0.16*A * B + 0.15*A * C + 0.20*B*C \quad (9)$$

$$\text{Total amount of released RA 6 h (mg)} = +1.45 + 0.27*A - 0.086*B - 0.27*C + 0.13*A * B + 0.19*A * C + 0.19*B * C \quad (10)$$

$$\text{Total amount of released RA 24 h (mg)} = +1.73 + 0.33*A - 0.10*B - 0.32*C + 0.10*A * B + 0.083*A * C + 0.25*B * C \quad (11)$$

Table 5
p values of the formulation variables and their interactions for each response.

D ₅₀ (nm)		Abs. amount of encapsulated RA (mg)		Total amount of RA released in 1 h (mg)		Total amount of RA released in 4 h (mg)		Total amount of RA released in 6 h (mg)		Total amount of RA released in 24 h (mg)	
Factor	<i>p</i> value	Factor	<i>p</i> value	Factor	<i>p</i> value	Factor	<i>p</i> value	Factor	<i>p</i> value	Factor	<i>p</i> value
A-RE	<0.0001	A-RE	<0.0001	A-RE	0.0008	A-RE	0.0052	A-RE	0.0103	A-RE	0.0054
B-SL	0.1610	B-SL	0.0476	B-SL	0.1022	B-SL	0.4832	B-SL	0.3535	B-SL	0.3171
C-PEG	0.0350	C-PEG	0.0078	C-PEG	0.0004	C-PEG	0.0032	C-PEG	0.0094	C-PEG	0.0062
AB	0.0402	AB	0.2843	AB	0.4156	AB	0.0767	AB	0.2204	AB	0.3668
AC	0.1889	AC	0.1183	AC	0.3332	AC	0.1029	AC	0.0811	AC	0.4610
BC	0.0007	BC	0.0194	BC	0.0212	BC	0.0314	BC	0.0798	BC	0.0416
A ²	0.0436	A ²	0.0702								
B ²	0.2149	B ²	0.8438								
C ²	0.0154	C ²	0.2429								
ABC	0.0122										
AB ²	0.0018										

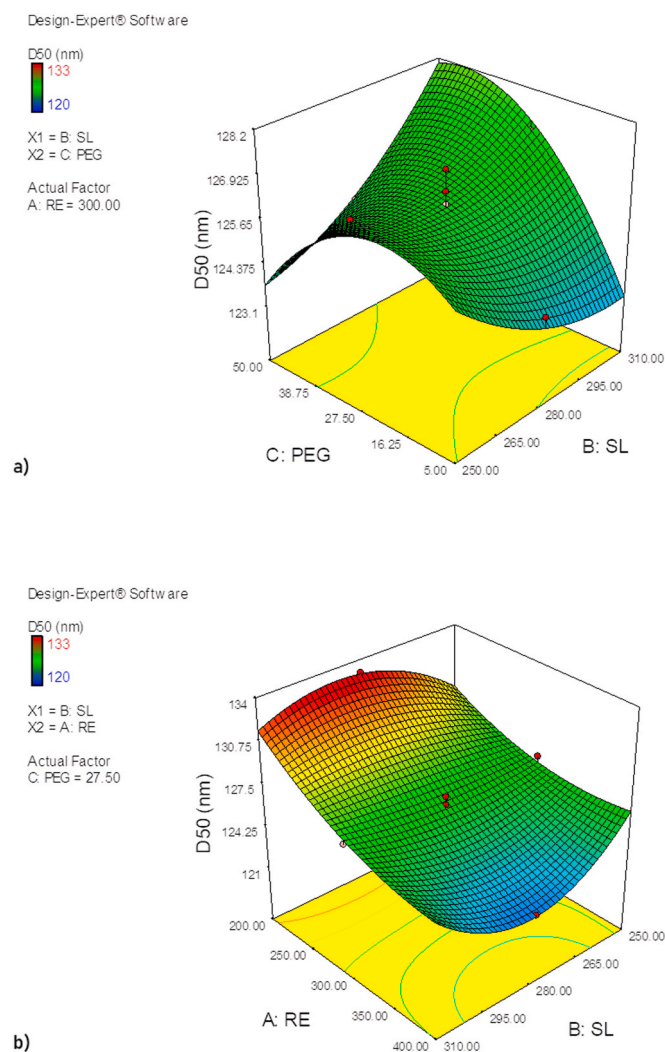


Fig. 1. 3D graphic representation of the influence of a) studied variables (SL and PEG) on D_{50} , b) studied variables (RE and SL) on D_{50} .

between the PEG molecules. This repulsion caused greater curvature, and therefore smaller liposomes tended to be energetically favorable at high PEG concentrations [31]. Additionally, as it was already reported, the presence of PEG creates a “stealth” layer around the liposomes that can reduce the interaction between the lipids of the bilayer, hindering the aggregation process [32].

The negative value in front of the factor A suggested that there was a negatively proportional relationship between D_{50} and the RE amount in NLS (Fig. 1b). This was contrary to the findings during the preliminary studies, but in accordance with the results obtained by Tefas et al. [33] suggesting that high concentrations of lipophilic molecules inserted in the lipid bilayer (in this case RE), might replace some of the phospholipid molecules in the liposomes causing a reduction in NLS size.

Taking into consideration the low water-solubility of RE components, the loading of the RE within the core/lipid bilayer of the NLS was another critical step in the development and optimization process. The major challenge in formulation of poorly soluble drugs for parenteral administration is to find an efficient preparation method resulting in a sufficiently high dose. The encapsulation efficiency of hydrophobic drugs could be modified by changing the type and amount of solvent used for solubilization as well as the amount of drugs [34]. One-way ANOVA ($p < 0.05$) indicated that the formulation parameters A, B, C, BC and A^2 had a statistically significant impact on the absolute amount of encapsulated RA. The positive value in front of factor A, indicated

increment of the entrapped RA amount by increasing the amount of RE during the preparation process (Eq. (7), Fig. 2), probably as a result of the higher amount of extract available for incorporation among the SL phospholipids. Contrary to this, negative proportional dependence between encapsulated amount of RA and the amount of SL, the amount of PEG and the interaction SL-PEG was observed. Literature data suggests that hydrophobic drugs reside in the acyl hydrocarbon chain of the liposome, and hence encapsulation is dependent on the properties of the acyl chains of the liposome, such as length and packing density [35]. According to Kepczyński et al. [36], incorporation of CH into the liposomal bilayer and thus, in our case, lowering the mass ratio between the total lipid (composed of SL and the DSPE part of PEG) and CH results with suppression of water penetration into the hydrocarbon lipid phase which leads to higher hydrophobic drug entrapment in this portion of the liposome. It is also well documented that by lowering the relative amount of the lipid and thus, increasing the relative amount of CH in the NLS lipid bilayer, results with reduction in the movement of fatty acids hydrophobic tails which leads to permeability reduction and ultimately, prevents the drug leakage from lipid bilayer [33,37]. Additionally, higher encapsulation efficacy can be obtained due to the “pocket” phenomenon described by Xu et al. [38], indicating that incorporation of CH in the lipid bilayer can generate pockets in between the cholesterol molecules which allow a favorable interaction of the lipid with the lipophilic drug molecules.

Nano-carriers formulated to deliver drugs in a spatiotemporally controlled manner can potentially enhance the therapeutic efficacy of the drugs through maintenance of the drug concentration in blood or target tissues at the efficacious level and at the same time to reduce their systemic side effects, and improve patient’s adherence to regimen by reducing the dose and administration frequency [39]. Data from the statistical analysis revealed that significant factors influencing the release properties in 1, 4, 6 and 24 h were A, C, BC ($p < 0.05$). Total amount of released RA in a period of 1, 4, 6 and 24 h was negatively correlated with the increase of PEG amount in the formulation (Eqs. (8)–(11), Fig. 3). These results were in accordance with the literature data [40] elucidating that the hydrophobic long alkyl chains of the polymer may act as a barrier to drug diffusion and effectively decrease the extract release from the nano-carriers. From Fig. 3 it can also be observed that higher total amounts of RA in all examined time intervals were obtained not only by decreasing the PEG concentration, but also by decreasing the amount of SL which resulted with lower NLS D_{50} . A logical explanation to this effect could be the fact that as the particle size gets smaller, their surface area-to-volume ratio gets larger which implies that the drug diffusion pathway to the surface is shorter and therefore, faster drug release is expected to happen [28].

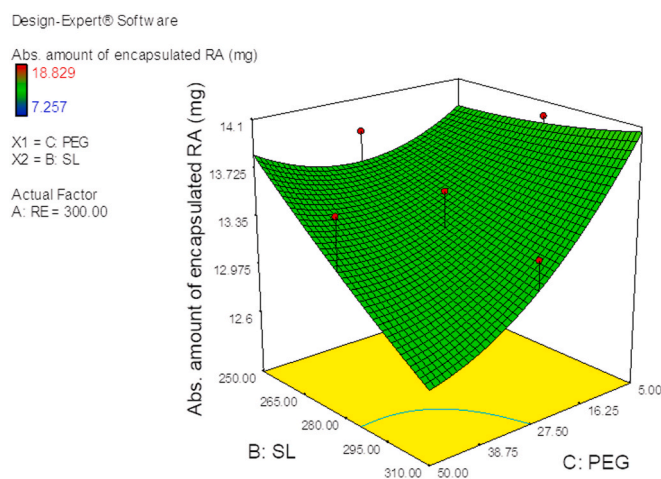


Fig. 2. 3D graphic representation of the influence of studied variables (SL and PEG) on absolute amount of encapsulated RA.

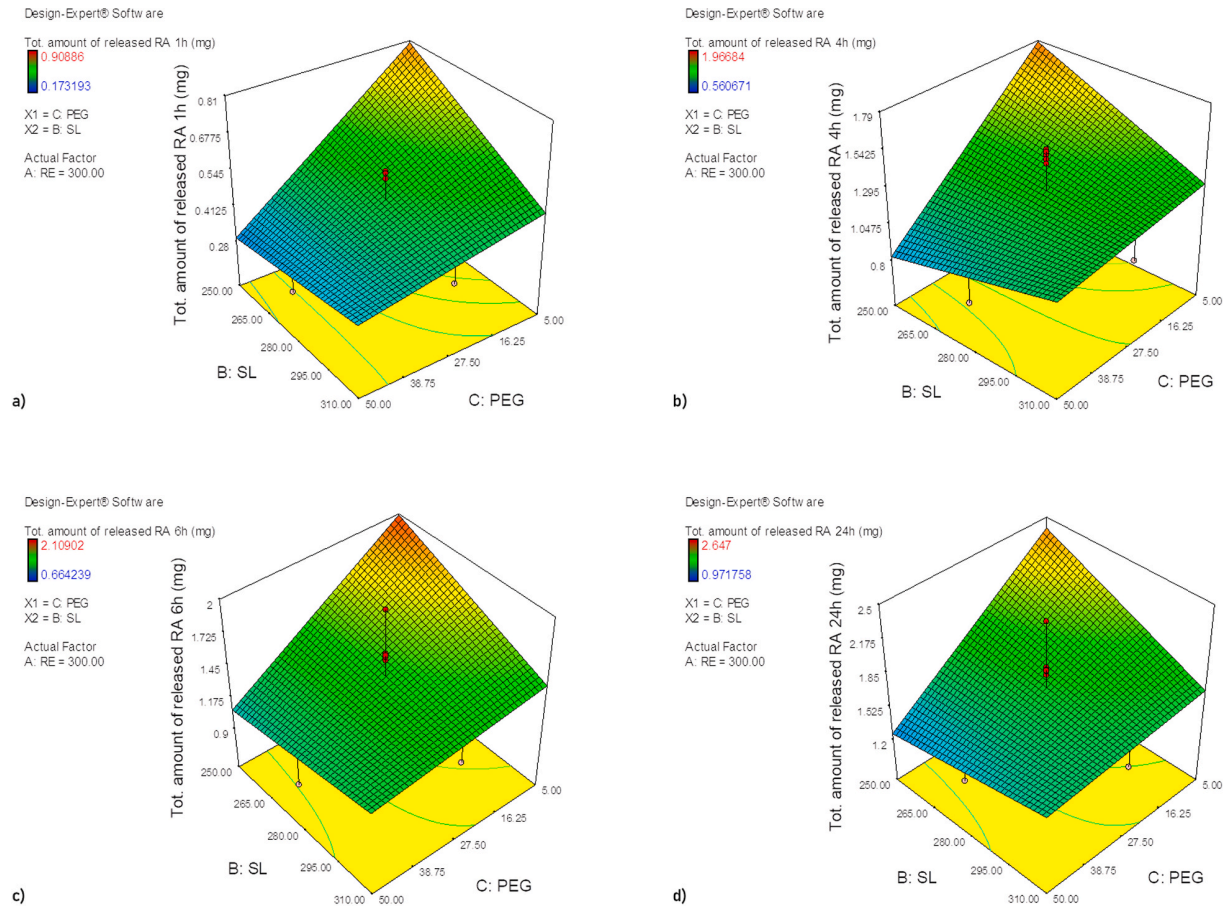


Fig. 3. 3D graphic representation of the influence of studied variables (SL and PEG) on a) total amount of released RA in 1 h, b) total amount of released RA in 4 h, c) total amount of released RA in 6 h, d) total amount of released RA in 24 h.

3.2. Optimization of formulation

Optimization of the formulations was undertaken after selecting and analyzing the appropriate models for all examined responses. NLS optimization process was oriented towards obtaining NLS with minimal vesicle size, maximal amount of entrapped RA and different *in vitro* release profiles (Table 6) in order to obtain stable formulations that will achieve prolonged circulation time, efficient transport across BBB high RE concentrations in the brain tissues, and therefore, safe and efficient AB treatment. The predicted solutions for the optimal formulations as well as the predicted responses and “Desirability” values are given in

Table 7.

3.3. Characterization of NLS

3.3.1. Mean particle size and particle size distribution, drug content and zeta potential measurements

Prepared NLS samples were characterized with mean vesicle diameter (D_{50}) in a range from 116 ± 2.25 to 122 ± 4.30 nm and followed narrow unimodal distribution (SPAN ~1) (Table 8).

From Table 8, it could be seen that formulations with 50 mg PEG (NL1, NL3, NL5) had less negative values for the ZP (~-20 mV)

Table 6
Optimization using Design of Experiments.

	RE (mg)	SL (mg)	PEG (mg)	D_{50} (nm)	Abs. amount of encapsulated RA (mg)	Total amount of RA released in 1 h (mg)	Total amount of RA released in 4 h (mg)	Total amount of RA released in 6 h (mg)	Total amount of RA released in 24 h (mg)
Lower limit	200	250	5	120	7.26	0.17	0.56	0.66	0.97
Upper limit	400	310	50	133	18.83	0.91	1.97	2.11	2.65
Importance	3	3	3	5	5	3	3	3	3
NL1	in	in	in	min.	max.	min.	min.	min.	max.
GOAL	range	range	range						
NL2	in	in	in	min.	max.	max.	max.	max.	max.
NL3	in	in	in	min.	max.	min.	min.	min.	min.
NL4	in	in	in	min.	max.	max.	min.	min.	max.
NL5	in	in	in	min.	max.	max.	min.	min.	min.

Table 7
Solutions for optimization with predicted responses.

Sample	RE (mg)	SL (mg)	PEG (mg)	Size (nm)	Abs. amount of encapsulated RA (mg)	Total amount of released RA in 1 h (mg)	Total amount of released RA in 4 h (mg)	Total amount of released RA in 6 h (mg)	Total amount of released RA in 24 h (mg)	Desirability
NL1	400	261.08	50	121.37	18.46	0.45	1.12	1.36	1.58	0.70
NL2	400	272.18	5	121.26	18.32	0.76	1.59	1.71	2.23	0.84
NL3	400	250.01	50	123.37	18.73	0.42	1.00	1.28	1.50	0.72
NL4	400	307.58	5	119.99	18.27	0.61	1.47	1.54	1.97	0.67
NL5	400	257.41	50	121.96	18.55	0.44	1.08	1.34	1.55	0.66

Table 8
Physicochemical properties of optimized samples of NLs.

Sample	D ₅₀ ±SD (nm)	SPAN	ZP (mV)	EE (%)	DL (mg RA/100 mg lipid mass)
NL1	122 ± 4.30	1.055	-18.50 ± 1.32	85.93 ± 1.93	4.10 ± 0.09
NL2	116 ± 2.25	0.979	-45.10 ± 1.52	93.15 ± 2.43	4.28 ± 0.11
NL3	120 ± 2.97	1.197	-21.45 ± 1.28	80.94 ± 3.67	4.01 ± 0.18
NL4	120 ± 3.95	0.984	-48.30 ± 1.17	85.81 ± 2.36	3.53 ± 0.10
NL5	120 ± 2.45	1.000	-23.00 ± 1.23	85.77 ± 2.54	4.14 ± 0.13

compared to the ZP (~-45 mV) of NL2 and NL4 (5 mg PEG). This is in accordance with the literature data suggesting that PEG presence on the surface of the liposomes reduces the NLs electrophoretic mobility due to the hydrodynamic resistance given by this polymer. Additionally, by decrease of the hydrophilic polymer concentration on the surface, the predominant negative charge present in the structural lipids is exposed, leading to the reduction of the NLs zeta potential [32,41].

RA EE% ranged from 80.94 ± 3.67 to 93.15 ± 2.43%, while DL was in the range of 3.53 ± 0.10 to 4.28 ± 0.11 mg RA/100 mg lipid (Table 8). These two parameters varied depending on the formulation variables, such as: the ratio and the amount of lipid phase components as well as PEG ratio, and therefore, no dependence establishment between the amounts of the formulation components and EE% was possible, which can be anticipated that this effect was probably related to the stability of the vesicles as well as the complex relationship between the formulation variables.

3.3.2. *In vitro* release studies

The *in vitro* RE release profile from the formulations (NL1-NL5) is shown in Fig. 4. Graph results show that the prepared liposomal dispersions resulted in prolonged RE release (24.83 ± 1.22–48.39 ± 2.32% over a 24-h period), which was proportionally dependent on the PEG amount present onto NLs surface. Namely, formulations NL1, NL3, and

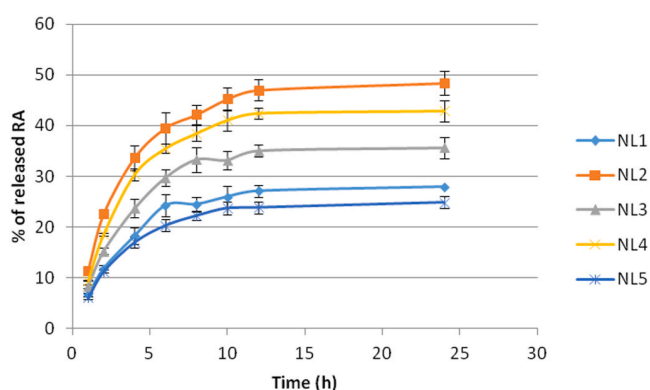


Fig. 4. *In vitro* release profile of NL1-NL5 in a period of 24 h.

NL5 where PEG was present in greater proportion resulted in slower release of the active component (24.83 ± 1.22–35.64 ± 2.12% RA released over 24 h). The same dependence was observed during our preliminary studies [25]. As mentioned in the Design of Experiments section, it is assumed that the hydrophobic long alkyl chains of the polymer can act as a barrier to drug diffusion and effectively trap the extract in the polymers [40]. Taking into consideration the lipophilic character of the RE components, an additional possible mechanism that explains this difference in the RA release rate from the NLs is the rapid hydration that occurs due to the presence of PEG on the vesicle surface [42]. In contrast, formulations NL2 and NL4 characterized by lower PEG concentration in the formulation showed faster RA release over 24 h (48.39 ± 2.32 and 42.90 ± 2.07%, respectively).

Several kinetic models of the RA release from the prepared formulations were tested using the software DDSolver 1.0. Based on the obtained correlation coefficients, the model that best described the release kinetics of the active component was Peppas-Sahlin (Table 9). High k_1 values indicated that the predominant mechanism involved in RA release was diffusion, while the high negative k_2 values indicated that RA release by polymer relaxation was insignificant [43].

3.3.3. Antioxidant capacity (ORAC assay)

Increased production of reactive oxygen species (ROS) is associated with age- and disease-dependent loss of mitochondrial function, altered metal homeostasis and reduced antioxidant defense. These events directly affect the synaptic activity and neurotransmission in neurons, and also cause damage of the cell structures leading to a deleterious effect, cognitive dysfunction and progression of AD. Scientific data suggests that A β is a redox-active peptide that reduces transition metals like Cu²⁺ and Fe³⁺ leading to the generation of ROS. In addition, the oxidation and aggregation of brain proteins can affect enzymes critical to neuron and glial functions and formation of neurofibrillary tangles, while the oxidation of DNA can result in producing strand breaks, sister chromatid exchange, DNA-protein crosslinking, and base modification. Taking into consideration that the brain membrane phospholipids are composed of polyunsaturated fatty acids, this brain is particularly vulnerable to free radical attacks [44,45].

As described before, the RE components exhibit with multifunctional properties including free radical scavenging, metal chelation and activation of antioxidant pathways, thus leading to induction of gene transcription for different antioxidant enzymes and in the same time contributing against A β polymerisation and toxicity.

Regarding the antioxidant capacity, as previously mentioned by Mihailova et al. [46], all optimal NLs samples (NL1-NL5) were relatively stable over a period of 120 min and showed statistically significant higher antioxidant capacity (>94.15% of the initial fluorescence) compared to RE (90.04 ± 2.51%) (Fig. 5). Formulations with higher amount of SL in the lipid film (NL2 and NL4), resulted with better antioxidant capacity in a period of 120 min (96.40 ± 0.73 and 96.92 ± 1.54%, respectively) compared to the other three formulations (<95.03%), which could be anticipated by the fact that NL2 and NL4 were characterized with fastest *in vitro* RE release during the period of 2 h (22.57 ± 0.73 and 18.06 ± 0.25%, accordingly). Obtained data for antioxidant capacity could be result not only of the different prolonged RE release properties from the liposomal formulations, but also of the

Table 9
Results of the analyzed models of RE release kinetics from NL1-NL5.

Sample	First order		Higuchi		Korsmeyer-Peppas			Peppas-Sahlin				
	k (h^{-1})	R^2	k ($mg/h^{1/2}$)	R^2	k (h^{-n})	n	R^2	k_1 (h^{-n})	k_2 (h^{-n})	m	R^2	
NL1	0.021	0.469	7.481	0.668	8.393		0.469	0.71	11.149	-1.606	0.45	0.92
NL2	0.062	0.037	12.98	0.649	22.57		0.228	0.733	19.319	-1.994	0.45	0.897
NL3	0.028	0.333	9.634	0.664	10.65		0.476	0.693	15.913	-1.623	0.45	0.898
NL4	0.054	0.131	11.63	0.656	18.9		0.243	0.677	21.649	-2.255	0.45	0.92
NL5	0.018	0.624	6.69	0.652	11.62		0.228	0.728	12.31	-1.254	0.45	0.901

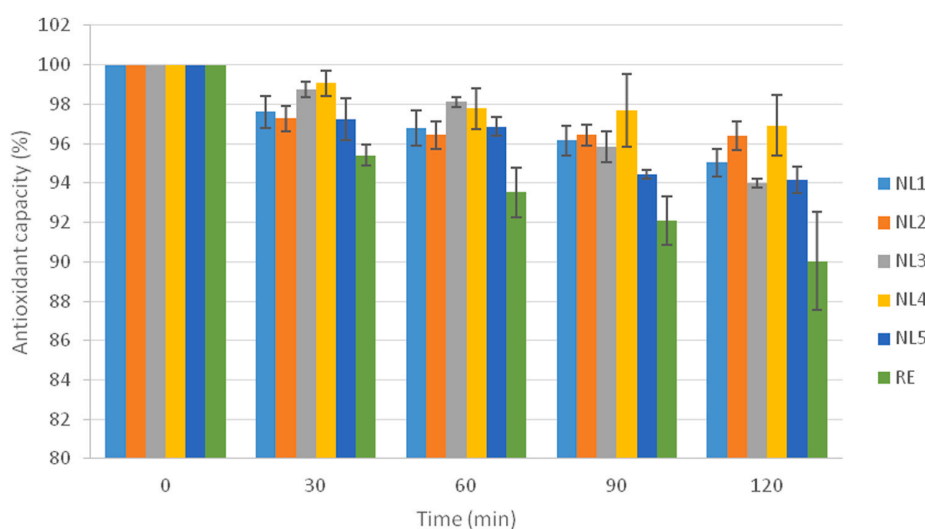


Fig. 5. Antioxidant capacity of RE and optimal NLs formulations (NL1-NL5).

synergistic antioxidant effect of the RE and SL components present in the NLs formulations. Many research works have demonstrated that phosphatidylcholine (PCH) and phosphatidylethanolamine (PE), the main components of SL, complete their antioxidant activity through their metal-chelating and scavenging properties. Additionally, these phospholipids present a synergistic antioxidant effect with the different radical scavenging molecules including the RE polyphenolic components, regenerating the oxidized molecule by donation of a hydrogen atom. It is also shown that PCH and PE concentrations are in positive correlation with the better antioxidants characteristics, which is in accordance with our obtained results [47].

3.3.4. Protein adsorption studies (Bradford assay)

As previously mentioned, upon intravenous administration of NLs, plasma proteins form a dynamic layer around the nano-system, also called the protein corona (PC). This corona gives new biological identity to nanoparticles and significantly influences their fate *in vivo* [48,49]. During the OFAT experiments, it was proved that the increase of PEG amount in the formulation was followed by decrease of % BSA adsorbed on the NLs surface [25]. In this stage of the research, it was necessary to consider the interactions between NLs and human plasma proteins in order to obtain more relevant information about the process of PC formation *in vivo*. For that reason, NLb1 and NLb2, containing PEG amount of 50 and 5 mg, respectively and formulation with no PEG in the content (NLb01) were prepared and were incubated for 1 h in human plasma from healthy volunteers and AD patients. Results from the protein adsorption studies are given in Fig. 6.

From the results presented on the graph it can be observed the inverse relationship between PEG amount present in the formulations and the % of plasma proteins adsorbed onto NLs surface. As expected, the % of plasma proteins adsorbed onto NLb1 surface (50 mg PEG) was 14.69 ± 1.11 and 9.39 ± 0.99 , after 1 h incubation in human plasma from

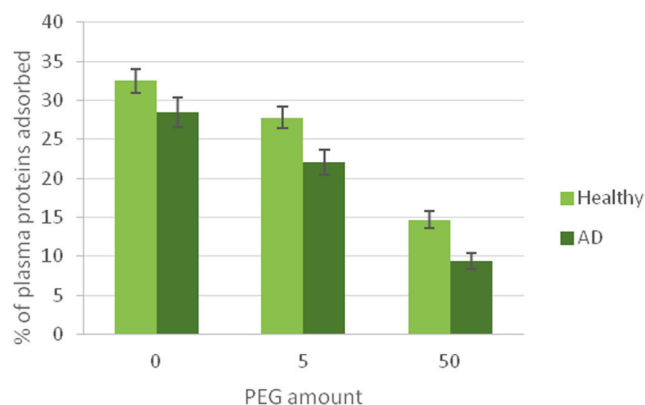


Fig. 6. Adsorbed plasma proteins (%) onto the NLs surface as function of PEG amount.

healthy volunteers and AD patients, accordingly. NLb2 (5 mg PEG) was characterized by higher % of adsorbed plasma proteins onto their surface in both, human plasma of healthy volunteers and AD patients (27.80 ± 1.42 and $22.02 \pm 1.59\%$, respectively). The highest amount of adsorbed plasma proteins (32.52 ± 1.54 and $28.52 \pm 1.86\%$, in plasma of healthy volunteers and AD patients, accordingly) was obtained for the formulation with no PEG on its surface (NLb01). These results are in accordance with the literature data suggesting that the presence of PEG on the surface of the liposomal carrier has been shown to prevent PC formation through giving stealth properties of the liposomal vesicles and therefore to reduce the mononuclear phagocyte system uptake and extend the NLs blood-circulation time [50].

3.3.5. IR-ATR spectrophotometric analysis

The spectra of the two blank samples after 1 h incubation with BSA (NLb1 and NLb2), BSA alone as well as spectra for each of the components that they consist of (SL, CH, PEG) were recorded (Fig. 7).

As it is possible to be noticed, the main contribution in the both formulations came from SL (the predominant component concerning the mass fraction) together with PEG and BSA, which implied to the phenomenon of PC formation. The bands of CH were absent from the spectra of NLb1 and NLb2 most likely as its concentration in the formulations was rather low.

In order to investigate the influence of the RE incorporation on the vesicles stability and structure, RE loaded NLs (NL1 and NL2) were also prepared. The spectra of RE, blank and RE loaded formulations are given in Fig. 8.

It can be observed that RE presented quite strong bands in the region between Amide I and Amide II region i.e. $1700 - 1500 \text{ cm}^{-1}$, particularly bands at 1687 and 1602 cm^{-1} . Also, there was a strong band at 1027 cm^{-1} . Comparison between the spectra of the NLb1 and NLb2 and the NL1 and NL2, correspondingly, presented in Fig. 8, showed almost the same spectral characteristics. The reason for the non-appearance of RE in the spectra of NL1 and NL2, although it is largest mass fraction in the formulations, was probably due to the incorporation of RE into the spherical particles, whose walls were thicker than the penetration depth of the evanescent ray.

With the aim to determine the impact of PEG amount on the hydrogen bonding between BSA and NLs, deconvolution and fitting of the NLb1 and NLb2 spectra was done. The wave numbers of the obtained bands, in the range of Amide I/II region with their tentative assignments are given in Table 10.

The frequencies of pure BSA and the one incorporated in NLb1 and NLb2 were different (Table 10). This means that the presence of other substances such as: CH, SL and PEG play role in the secondary structure of the protein and the strength of the hydrogen bonds. The first of the Amide I bands in the formulations were at lower frequency than in pure BSA, which would suggest that the hydrogen bonding is stronger in the NLb1 and NLb2 specimens than in the pure BSA sample, as Amide I band originates mainly from a C=O vibration [51]. However, the second Amide I band assigned did not support this assumption. Nevertheless, when turning our attention to the Amide II region, it can be verified that all the Amide II bands of the NLb1 and NLb2 specimens were at higher frequencies than from the pure BSA. This suggested a stronger hydrogen bonding in the specimens, as Amide II band is a coupled C–N stretching

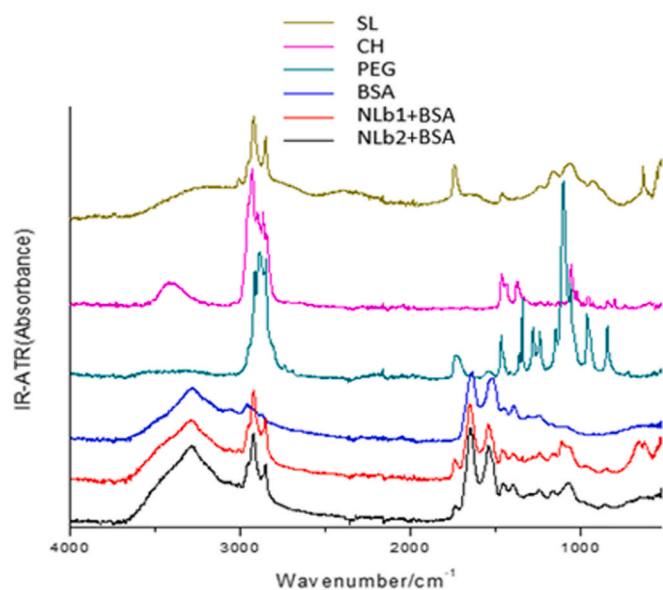


Fig. 7. IR-ATR spectra of SL, CH, PEG, BSA, NLb1 and NLb2.

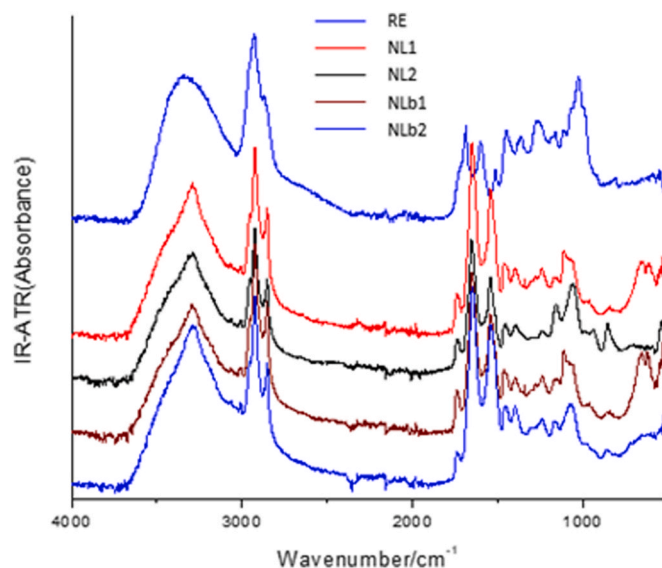


Fig. 8. IR-ATR spectra of RE and samples NL1 and NL2 converted to absorbance and ATR corrected. The spectra of NLb1 and NLb2 blank samples are given for comparison.

Table 10

Wave numbers of the bands in the Amide I and II region for the NLb1 and NLb2 with the tentative assignments.

$\nu(\text{BSA})/\text{cm}^{-1}$	$\nu(\text{NLb1})/\text{cm}^{-1}$	$\nu(\text{NLb2})/\text{cm}^{-1}$	Tentative assignment
1686	1680	1683	Amide I
1643	1657	1653	Amide I
	1641	1628	Amide I
1582	1579	1577	COO ⁻ side group
1537	1541	1538	Amide II
1512	1515	1513	Amide II
1495	1497	1495	Amide II
1448	1467	1466	CH bend
	1453		CH bend
	1401	1399	COO ⁻ side group
1394			COO ⁻ side group

and in plane N–H bending vibration [51]. The stronger the hydrogen bond of the H atom from the N–H group, the higher the frequency of the band, as Amide II is primarily affected by the changes in the N–H hydrogen bonding [52]. From Table 10, it can also be seen that all the Amide II bands from NLb1 were at higher frequency than the corresponding ones from the NLb2 specimen, suggesting that the hydrogen bonding in NLb1 is stronger than in NLb2. This is not unusual as it has been shown that the content of PEG plays a role in the bond formation with BSA [53]. In this case, the NLb1 specimen shows a stronger hydrogen bonding between PEG and BSA, due to the larger content of PEG, and thus, larger number of ethylene glycol subunits interacting with the H atom from the N–H group.

3.3.6. Stability of NLs in physiologically relevant media, human plasma and cell culture media

Upon intravenous application *in vivo*, NLs circulate in the blood stream until reaching the specified target of action. It is well known that the serum components may have highly destructive influence on the liposomal structure, causing disruption of the phospholipid bilayer and consequently, leakage of the encapsulated components. On the other hand, there is an evidence that the binding of plasma proteins onto NLs surface can promote vesicle aggregation [48]. Since the PC formed at the surface of NPs changes their surface properties, the presence of proteins in the cellular environment may also decrease the uptake, of both the

cationic and anionic nano-carriers [54].

Therefore, in order to obtain a prolonged drug release and an efficient brain accumulation by passive targeting *in vivo*, it was of essential importance to investigate the *in vitro* stability of NLs, not only in the formulation (physiologically relevant medium pH 7.4), but also in the human plasma as well as in the brain cellular environment (EndoGRO-MV Complete Culture Media Kit SCME004 - cell culture media for hCMEC/D3 cell line which simulates the human blood brain barrier). Taking into consideration that zeta mean particle size and zeta potential are effective tools for understanding the state of nanoparticle surface and the process of agglomeration as well as for predicting the long-term stability of the nanoformulations, D_{50} (nm), PDI and ZP (mV) of the optimal samples (NL1-NL5) were determined at the beginning of the experiment and at different time intervals (2, 6 and 24 h) after their incubation in the abovementioned medias.

In physiological relevant medium with pH 7.4, the diameter (D_{50}) of freshly prepared NLs (NL1-NL5) was in a range from 102.9 ± 2.38 to 113.7 ± 1.95 nm with a relatively narrow PDI~0.27 and ZP-average of -18.5 ± 1.32 , -21.4 ± 1.28 and -23.0 ± 1.23 mV for NL1, NL3 and NL5, respectively and -45.1 ± 1.52 and -48.3 ± 1.17 mV for NL2 and NL4 (Fig. 9). No significant differences in the mean vesicle size and zeta potential were noticed during the period of 24 h incubation, implying on the stability of the native formulations.

In human plasma, the initial D_{50} of NL1-5 was in a range from 111 ± 1.22 to 123.6 ± 2.15 nm with PDI = 0.3. The appearance of a fraction with $D_{50} > 1000$ nm for NL2 and NL4 after 24 h incubation (Fig. 10), was probably a result of the aggregation promoted by the adsorbed proteins onto NLs surface [55]. As it was already revealed in the protein adsorption studies, NL2 and NL4 showed a tendency for binding proteins onto their surface in higher % due to the lower amount of PEG (5 mg) into their composition. Contrary to this, there was a reduction of the initial ZP from -45.1 ± 52 and -48.3 ± 1.17 mV to -17.5 ± 1.13 and -17.4 ± 0.4 mV for NL2 and NL4, respectively (Fig. 11). Taking into consideration that nanoparticles released in biological fluids are immediately covered with biomolecules that change their size and physicochemical properties [56], obtained data were in accordance with the findings of Bulundell et al. [57] who demonstrated that ZP reduction of NLs comes from the adsorbed proteins on the NLs surface. Our native samples (NL1-NL5) were all suspended in PB pH 7.4, and therefore, the albumin present in the human plasma was expected to occupy the largest area of the NLs surface as the adsorption was occurring at a pH furthest from its isoelectric point.

During the examination period of 24 h, NL2 and NL4 showed slight reduction in the ZP during first 2 h (-16.7 ± 1.05 and -8.97 ± 0.73 mV). As previously described by Mihailova et al. [58], after 6 h and gradually onto 24 h, the ZP became more negative (~ -20 mV) (Fig. 11). An explanation for this situation may be the dynamic process of PC complex formation. In late time intervals, probably there was a displacement of the plasma proteins present onto hard corona layer and

formation of soft corona complex with the NLs [57]. No significant reduction of the initial ZP was observed for NL1, NL3 and NL5, when suspended and incubated in human plasma during a period of 24 h.

D_{50} of NLs during the 24 h period of incubation in cell culture media was in a range from 109.6 ± 2.53 – 120.5 ± 2.14 nm (PDI~0.30) (Fig. 12). When suspended in cell culture media, the average zeta values for NL1, NL3 and NL5 were -14.8 ± 1.73 , -15.5 ± 0.93 and -15.8 ± 0.66 mV respectively, and -29.6 ± 0.89 , -29.5 ± 0.55 mV for NL2 and NL4 (Fig. 13). Reduction of the initial ZP for NL2 and NL4 was also obtained when suspended in cell culture media (ZP = ~ -29.5 mV for both formulations). Slight reduction was also observed for formulations NL1, NL3 and NL5 (ZP = ~ -15 mV). Recent study conducted by Lee et al. [59], demonstrated that the presence of serum proteins in the cell culture media can significantly reduce the intracellular uptake of nanoparticles. On the other hand, serum protein adsorbed on the nanoparticles can inhibit their toxicity by shielding impurities of metal catalyzers and suppressing the competitive adsorption of other proteins in the medium [59]. Since the cell culture media, EndoGRO-MV Complete Culture Media Kit SCME004, is a 5% serum formulation, the reduction of ZP could be explained as a possible serum protein adsorption onto NLs surface [60].

4. Conclusion

During the preliminary studies, different formulations of RE loaded NLs were prepared using modified lipid film hydration technique, where RE was incorporated into the lipid phase due to the higher encapsulation efficiency. After careful data analysis, CCD was performed with the rationale of qualitative and quantitative identification of the main formulation independent variables' impact on the NLs responses of interest and establishment of mathematical models which describe their relation. As potential critical formulation parameters that affect the particle size, the absolute amount of encapsulated RA, as well as the absolute amount of RA released in different time points, were chosen, and hence the response patterns and dependence equations of the parameters of interest were determined. Optimized NLs samples were characterized with D_{50} around 120 nm with narrow unimodal distribution, followed with high RA EE% ($\sim 90\%$). Formulations with higher amount of PEG had less negative values for the ZP compared to the formulations with 5 mg of PEG. All prepared liposomal dispersions resulted in prolonged RA release, which was proportionally dependent on the PEG amount present onto NLs surface. Namely, formulations where PEG was present in greater proportion resulted in slower release of the active component. Based on the obtained correlation coefficients, the model that best described the release kinetics of the active component was Peppas-Sahlin. Regarding the antioxidant capacity, all optimal NLs samples were relatively stable over a period of 120 min and showed statistically significant higher antioxidant capacity compared to RE. As expected, the highest amount of adsorbed plasma proteins, in plasma of healthy volunteers and AD patients, was obtained for the formulation with no PEG on its surface. IR-ATR spectrophotometric analysis pointed out that the reason for non-appearance of RE in the spectra of NLs was due to the incorporation of RE into the spherical particles. Furthermore, the content of PEG was shown as an important factor that plays a role in the bond formation with BSA, where the formulations with larger content of PEG showed a stronger hydrogen bonding between PEG and BSA. Obtained results from stability studies of NLs in human plasma and cell culture media, showed that nanoparticles released in biological fluids are immediately covered with biomolecules that change their size and physicochemical properties. Additionally, no significant differences in the mean vesicle size were noticed during the period of 24 h incubation with physiologically relevant media, implying on the stability of the native formulations.

In conclusion, revealed data from the physicochemical and biopharmaceutical studies of the optimized NLs, imply on their potential for a successful transport across BBB and therefore, efficient and safe AD

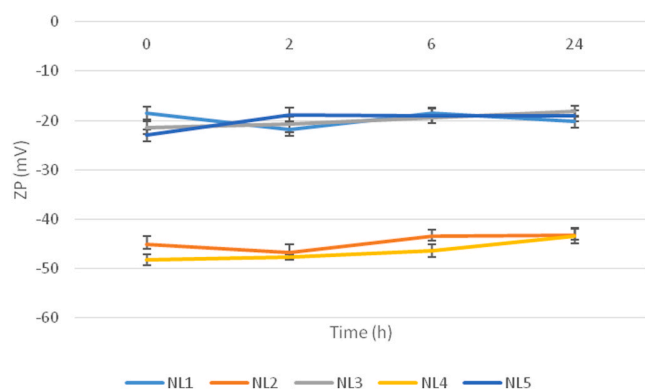


Fig. 9. ZP of NL1-NL5 in PB pH 7.4 during a period of 24 h.

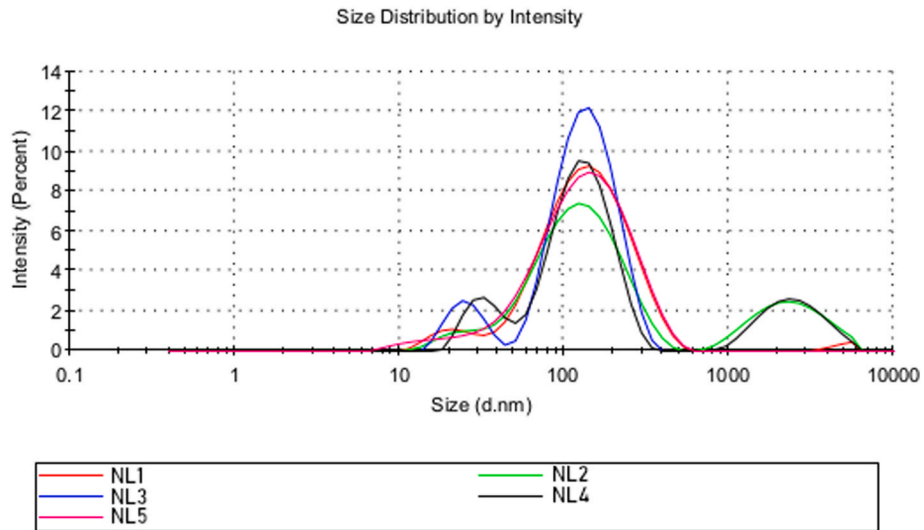


Fig. 10. Size distribution of NL1-NL5 after 24 h incubation in human plasma.

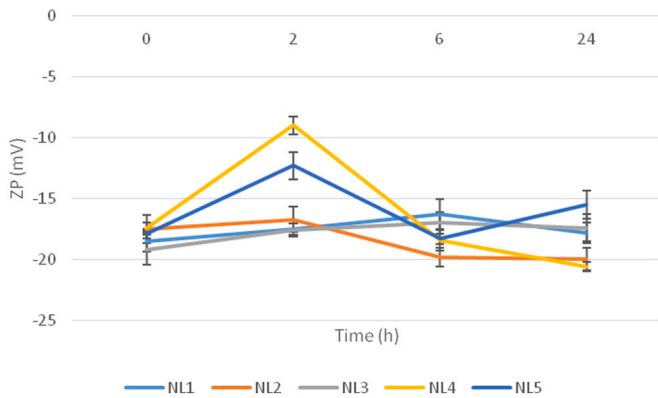


Fig. 11. ZP of NL1-NL5 in human plasma during a period of 24 h.

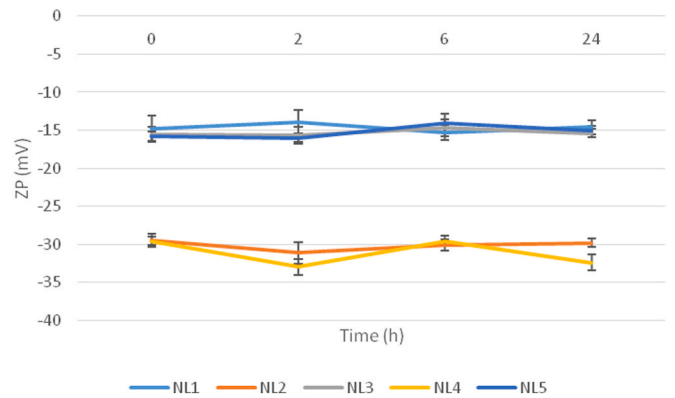


Fig. 13. ZP of NL1-NL5 in cell culture media during a period of 24 h.

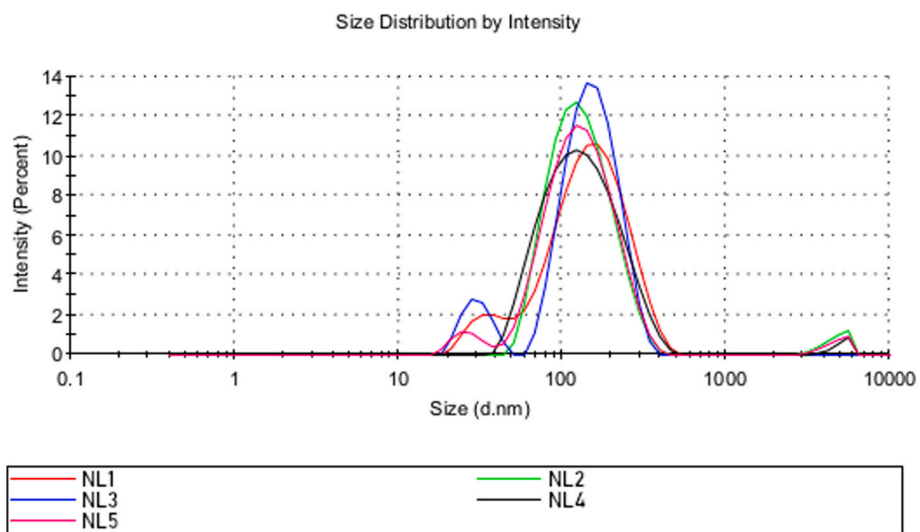


Fig. 12. Size distribution of NL1-NL5 after 24 h incubation in cell culture media.

treatment.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial or not-for-profit sectors.

Credit author statement

Dushko Shalabalija: Investigation, Analysis and interpretation of data, Writing - Original draft preparation. Ljubica Mihailova: Investigation, Analysis and interpretation of data, Writing - Original draft preparation. Maja Simonoska Crcarevska: Conceptualization, Analysis and interpretation of data, Writing - Reviewing and Editing. Ivana Cvetkovikj Karanfilova: Investigation, Analysis and interpretation of data. Vladimir Ivanovski: Investigation, Analysis and interpretation of data. Aleksandra Kapedanovska Nestorovska: Investigation. Gabriela Novotni: Investigation. Marija Glavas Dodov: Conceptualization, Analysis and interpretation of data, Writing - Reviewing and Editing, Supervision.

Declaration of competing interest

On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

References

- C. Cauwenbergh Van, C. Broeckhoven Van, K. Sleegers, The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives, *Genet. Med.* 18 (2015) 421–430, <https://doi.org/10.1038/gim.2015.117>.
- B. Strooper De, E. Karran, Review the cellular phase of Alzheimer's Disease, *Cell* 164 (4) (2016) 603–615, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.056>.
- I. Morales, L. Navarrete, R.B. Maccioni, G. Fari, The revitalized Tau hypothesis on Alzheimer's disease, *Arch. Med. Res.* 41 (3) (2010) 226–231, <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2010.03.007>.
- L. Yuri, D. Marco, A. Venneri, E. Farkas, P.C. Evans, A. Marzo, F.A. Frangi, Vascular dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease - a review of endothelium-mediated mechanisms and ensuing vicious circles, *Neurobiol. Dis.* 62 (2015) 593–606, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.08.014>.
- D.F. Silva, J.E. Selfridge, J. Lu, E. Lezi, S.M. Cardoso, R.H. Swerdlow, Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's Disease: possible targets for therapeutic intervention, *Adv. Pharmacol.* 64 (2012) 83–126, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394816-8.00003-9>.
- S. Altamura, M.U. Muckenthaler, Iron toxicity in diseases of aging: Alzheimer's disease, Parkinson's disease and atherosclerosis, *J. Alzheimers. Dis.* 16 (4) (2009) 879–895, <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1010>.
- Z. Chen, C. Zhong, Oxidative stress in Alzheimer's disease, *Neurosci. Bull.* 30 (2) (2014) 271–281, <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1423-y>.
- A. Skoumalova, J. Hort, Blood markers of oxidative stress in Alzheimer's disease Biochemical processes related to underlying AD pathology, *J. Cell Mol. Med.* 16 (10) (2012) 2291–2300, <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01585.x>.
- L.M. Waite, Treatment for Alzheimer's disease: has anything changed? *Aust. Prescr.* 38 (2) (2015) 60–63, <https://doi.org/10.18773/austprescr.2015.018>.
- M. Ozarowski, P.L. Mikolajczak, A. Bogacz, A. Gryszczynska, M. Kujawska, J. Jodynis-Liebert, A. Piasecka, H. Napieczynska, M. Szulc, R. Kujawski, J. Bartkowiak-Wieczorek, J. Cichocka, T. Bobkiewicz-Kozlowska, B. Czerny, M. P. Mrozkiewicz, Rosmarinus officinalis L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain, *Fitoterapia* 91 (2013) 261–271, <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.09.012>.
- L. Almela, S. Blas, A. Fern, J. Roca, V. Rabe, Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material, *J. Chromatogr., A* 1120 (1–2) (2006) 221–229, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.02.056>.
- S. Habtemariam, The therapeutic potential of rosemary (Rosmarinus officinalis) diterpenes for Alzheimer's Disease. *Evid. Based Complement Alternat, Med* 2016 (2016), <https://doi.org/10.1155/2016/2680409>, 2680409.
- P. Meng, H. Yoshida, T. Matsumiya, T. Imaizumi, K. Tanji, F. Xing, R. Hayakari, J. Dempoya, T. Tatsuta, T. Aizawa-Yashiro, J. Mimura, K. Kosaka, K. Itoh, K. Satoh, Carnosic acid suppresses the production of amyloid-1–42 by inducing the metalloprotease gene TACE/ADAM17 in SH-SY5Y human neuroblastoma cells, *Neurosci. Res.* 75 (2013) 94–102, <https://doi.org/10.1016/j.neures.2012.11.007>.
- T. Satoh, M. Izumi, Y. Inukai, Y. Tsutsumi, N. Nakayama, K. Kosaka, Y. Shimajo, C. Kitajima, K. Itoh, T. Yokoi, T. Shirasawa, Carnosic acid protects neuronal HT22 Cells through activation of the antioxidant-responsive element in free carboxylic acid- and catechol hydroxyl moieties-dependent manners, *Neurosci. Lett.* 434 (2008) 260–265, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.01.079>.
- N. Mignet, J. Seguin, G.G. Chabot, Bioavailability of polyphenol liposomes: a challenge ahead, *Pharmaceutics* 5 (3) (2013) 457–471, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics5030457>.
- P. Ramos-Cabrer, F. Campos, Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on neurological targets, *Int. J. Nanomed.* (2013) 951, <https://doi.org/10.12147/ijn.s30721>.
- R.N. Montesinos, Liposomal drug delivery to the central nervous system. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70055>, 2017.
- G.P. Adams, R. Schier, Developing anti-HER2/neu single-chain Fv fragments from phage display libraries, *Methods Mol. Med.* 39 (2001) 729–747, <https://doi.org/10.1385/1-59259-071-3:729>.
- M. Simonoska Crcarevska, R. Slaveska-Raicki, M. Glavas-Dodov, Current therapeutic options and trends in drug development for Alzheimer's disease, *Macedonia Pharmaceut. Bull.* 62 (suppl) (2016) 401–402.
- M. Mohamed, A.S. Abu Lila, T. Shimizu, E. Alaaeldin, A. Hussein, H.A. Sarhan, J. Szebeni, T. Ishida, PEGylated liposomes: immunological responses, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 20 (1) (2019) 710–724, <https://doi.org/10.1080/14686996.2019.1627174>.
- S. Jenkins, D. Weinberg, A.F. Al-Shaklia, A.R. Fernandes, H.H.P. Yiu, N.D. Telling, P. Roach, D.M. Chhari, 'Stealth' nanoparticles evade neural immune cells but also evade all major brain cell populations: implications for PEG-based neurotherapeutics, *J. Contr. Release* 224 (2016) 136–145, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.013>.
- Lj Cambuleva, D. Shalabalija, I. Cvetkovikj Karanfilova, M. Simonoska Crcarevska, M. Glavas Dodov, Formulation and characterization of Rosmarinic extract loaded PEG-ylated liposomes for brain delivery, *Macedonian Pharmaceut. Bull.* 62 (suppl) (2016) 641–642.
- W. Geldenhuys, D. Wehrung, A. Groshev, A. Hirani, V. Sutariya, Brain-targeted delivery of doxorubicin using glutathione-coated nanoparticles for brain cancers, *Pharmaceut. Dev. Technol.* 20 (4) (2015) 497–506, <https://doi.org/10.3109/10837450.2014.892130>.
- T. Tanaka, S. Shiramoto, M. Miyashita, Y. Fujishima, Y. Kaneo, Tumor targeting based on the effect of enhanced permeability and retention (EPR) and the mechanism of receptor-mediated endocytosis (RME), *Int. J. Pharm.* 277 (2004) 39–61, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.09.050>.
- D. Shalabalija, Lj Cambuleva, M. Simonoska Crcarevska, R. Slaveska Raicki, I. Cvetkovikj Karanfilova, M. Glavas Dodov, Rosmarinic acid loaded PEGylated liposomes for treatment of Alzheimer's disease: influence of the formulation variables on vesicle properties, in: 2nd European Conference on Pharmaceutics, April 3rd-4th, Poland, Krakow, 2017.
- I. Cvetkovikj, Gj Stefkov, J. Acevska, J. Petreska-Stanoeva, M. Karapandzova, M. Stefova, A. Dimitrovska, S. Kulevanova, Polyphenolic characterization and chromatographic methods for fast assessment of culinary Salvia species from South East Europe, *J. Chromatogr. A* 1282 (2013) 38–45, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.068>.
- N. Hoshyar, S. Gray, H. Han, G. Bao, The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction, *Nanomedicine* 11 (6) (2016) 673–692, <https://doi.org/10.2217/nnm.16.5>.
- A. Porfire, M. Achim, C. Barbalata, I. Rus, I. Tomuta, C. Cristea, Pharmaceutical development of liposomes using the QbD approach, *IntechOpen* (2019), <https://doi.org/10.5772/intechopen.85374>.
- S.A. Abreu, M.S.E. Castanheira, R.P.M.-J. Queiroz, M.T.P. Ferreira, A.L. Vale-Silva, E. Pinto, Nanoliposomes for encapsulation and delivery of the potential antitumoral methyl 6-methoxy-3-(4-methoxyphenyl)-1H-indole-2-carboxylate, *Nanoscale Res. Lett.* 6 (1) (2011) 482, <https://doi.org/10.1186/1556-276X-6-482>.
- M. Shilo, A. Sharon, K. Baranes, M. Motiei, M.J.-P. Lellouche, R. Popovtzer, The effect of nanoparticle size on the probability to cross the blood-brain barrier: an in vitro endothelial cell model. *J. Nanobiotechnology* 13, Article number 19. <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0075-7>, 2015.
- H.I. Labouta, M.J. Gomez-Garcia, D.C. Sarsons, T. Nguyen, J. Kennard, W. Ngo, K. Terefe, N. Iragorri, P. Lai, D.K. Rinker, T.D. Cramb, Surface-grafted polyethylene glycol conformation impacts the transport of PEG-functionalized liposomes through a tumour extracellular matrix model. *R.S.C. Adv.* <https://doi.org/10.1039/c7ra13438j>, 2018, 18, 7697-7708.
- S.N. Nunes, S.R. Fernandes, H.C. Cavalcante, C.I. da Costa, A.E. Leite, A.C.S. Lopes, A. Ferretti, D. Rubello, M.D. Townsend, C.M. Oliveira, N.V. Cardoso, B.A.L. de Barros, Influence of PEG coating on the biodistribution and tumor accumulation of pH-sensitive liposomes, *Drug Deliv. Transl. Res.* 9 (1) (2019) 123–130, <https://doi.org/10.1007/s13346-018-0583-8>.
- L.R. Tefas, B. Sylvester, I. Tomuta, A. Sesarman, E. Licarete, M. Banciu, A. Porfire, Development of antiproliferative long-circulating liposomes co-encapsulating doxorubicin and curcumin, through the use of a quality-by-design approach. *Drug Design, Dev. Ther.* 11 (2017) 1605–1621, <https://doi.org/10.2147/DDDT.S129008>.
- G.M.S. Ong, C.L. Ming, S.K. Lee, H.K. Yuen, Influence of the encapsulation efficiency and size of liposome on the oral bioavailability of Griseofulvin-loaded liposomes, *Pharmaceutics* 8(3) 25 (2016), <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8030025>.
- G. Bozzuto, A. Molinari, Liposomes as nanomedical devices, *Int. J. Nanomed.* 10 (2015) 975–999, <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>.
- M. Kepczynski, K. Nawalany, M. Kumorek, A. Kobierska, B. Jachimska, M. Nowakowska, Which physical and structural factors of liposome carriers control their drug-loading efficiency? *Chem. Phys. Lipids* 155 (1) (2008) 7–15, <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2008.05.174>.

- [37] G. Sailor, A.K. Seth, G. Parmar, S. Chauhan, A. Javia, Formulation and in vitro evaluation of berberine containing liposome optimized by 32 full factorial designs, *J. Appl. Pharmaceut. Sci.* 5 (7) (2015) 23–28, <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50704>.
- [38] X. Xu, A.P. Costa, M.A. Khan, D.J. Burgess, Application of quality by design to formulation and processing of protein liposomes, *Int. J. Pharm.* 434 (1–2) (2012) 349–359, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.002>.
- [39] H.J. Lee, Y. Yeo, Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers, *Chem. Eng. Sci.* 125 (2015) 75–84, <https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.08.046>.
- [40] P. Panwar, B. Pandey, P.C. Lakhera, K.P. Singh, Preparation, characterization, and in vitro release study of albendazole-encapsulated nanosize liposomes, *Int. J. Nanomed.* 5 (2010) 101–108, <https://doi.org/10.2147/ijn.s8030>.
- [41] K. Nakamura, K. Yamashita, Y. Itoh, K. Yoshino, S. Nozawa, H. Kasukawa, Comparative studies of polyethylene glycol-modified liposomes prepared using different PEG-modification methods, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1818 (11) (2012) 2801–2807, <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2012.06.019>.
- [42] M.Y. Begum, K. Abbulu, M. Sudhakar, Flurbiprofen-loaded stealth liposomes: studies on the Development, characterization, pharmacokinetics and biodistribution, *J. Young Pharm.* 4 (4) (2012) 209–219, <https://doi.org/10.4103/0975-1483.104364>.
- [43] O. Mady, Mechanisms and percent of drug release of each new mathematic approach, *Int. Res. J. Pharmaceut. Appl. Sci.* 3 (6) (2013) 56–69.
- [44] W.-J. Huang, X. Zhang, W.-W. Chen, Role of oxidative stress in Alzheimer's disease, *Biomed. Rep.* 4 (5) (2016) 519–522, <https://doi.org/10.3892/br.2016.630>.
- [45] E. Tonnes, E. Trushina, Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.* 57 (4) (2017) 1105–1121, <https://doi.org/10.3233/JAD-161088>.
- [46] L. Mihailova, D. Shalablija, I. Cvetković, Karanfilova, M. Simonoska Crcarevska, M. Glavas Dodov, Influence of the release properties on the antioxidant capacity of encapsulated Rosemary extract, in: 7th Serbian Congress of Pharmacy with International Participation, October 10th – 14th, Belgrade, Serbia, 2018.
- [47] M.D. Cabezas, N.E. Guiotto, W.K.B. Diehl, C.M. Tomás, Antioxidant and emulsifying properties of modified sunflower lecithin by fractionation with ethanol-water mixtures, *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/53165>, 2013.
- [48] C. Corbo, R. Molinaro, F. Taraballi, N.T. Furman, M. Sherman, A. Parodi, F. Salvatore, E. Tasciotti, Effects of the protein corona on liposome-liposome and liposome-cell interactions, *Int. J. Nanomed.* 11 (2016) 3049–3063, <https://doi.org/10.2147/IJN.S109059>.
- [49] S. Palchetti, D. Caputo, L. Digiaco, A.L. Capriotti, R. Coppola, D. Pozzi, G. Caracciolo, Protein corona fingerprints of liposomes: new opportunities for targeted drug delivery and early detection in pancreatic cancer, *Pharmaceutics* 11 (1) (2019), <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11010031>. PMID: 30650541.
- [50] K. Sahil, S. Premjeet, B. Ajay, A. Middha, K. Bhawna, Stealth liposomes: a review, *IJRAP* 2 (5) (2011), 1534–1538. ISSN 2229–3566.
- [51] J. Gradolnik, Y. Marechal, Bovine Serum Albumin observed by infrared spectrometry. I. Methodology, structural investigation and water Uptake, *Biopolymers* 62 (2001) 40–53, [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2001\)62:1<40::AID-BIP60>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2001)62:1<40::AID-BIP60>3.0.CO;2-C).
- [52] S.N. Myshakina, Z. Ahmed, A.S. Asher, Dependence of amide vibrations on hydrogen bonding, *J. Phys. Chem. B* 112 (38) (2008) 11873–11877, <https://doi.org/10.1021/jp8057355>.
- [53] V. Tattini Jr., F.D. Parra, B. Polakiewicz, N.M.R. Pitombo, Effect of lyophilization on the structure and phase changes of PEGylated-bovine serum albumin, *Int. J. Pharm.* 304 (2005) 124–134, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.08.006>.
- [54] S. Behzadi, V. Serpooshan, W. Tao, A.M. Hamaly, Y.M. Alkawareek, C.E. Dreaden, D. Brown, M.A. Alkilany, C.O. Farokhzad, M. Mahmoudi, Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell, *Chem. Soc. Rev.* 46 (14) (2017) 4218–4244, <https://doi.org/10.1039/c6cs00636a>.
- [55] V.N. Konduru, M.R. Molina, A. Swami, F. Damiani, G. Pyrgiotakis, P. Lin, P. Andreozzi, C.T. Donaghey, P. Demokritou, S. Krol, W. Kreyling, D.J. Brain, Protein corona: implications for nanoparticle interactions with pulmonary cells, *Part. Fibre Toxicol.* 14 (2017), <https://doi.org/10.1186/s12989-017-0223-3>.
- [56] M. Hadjidemetriou, K. Kostarelos, Evolution of the nanoparticle corona, *Nat. Nanotechnol.* 12 (2017) 288–290, <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.61>.
- [57] L.C.J.E. Blundell, J.M. Healey, E. Holton, M. Sivakumaran, S. Manstana, M. Platt, Characterisation of the protein corona using tunable resistive pulse sensing: determining the change and distribution of a particle's surface charge, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (21) (2016) 5757–5768, <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9678-6>.
- [58] Lj Mihailova, D. Shalablija, M. Simonoska Crcarevska, E. Vranic, M. Glavas Dodov, Determination of the protein corona stability complex of nanoliposomes in physiological mediums, *Acta Pharm. Hung.* 3 (2018) 174.
- [59] K.Y. Lee, E.-J. Choi, J.T. Webster, S.-H. Kim, D. Khang, Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity, *Int. J. Nanomed.* 10 (2015) 97–113, <https://doi.org/10.2147/IJN.S72998>.
- [60] V.-V. Giau, Y.-H. Park, K.-H. Shim, S.-W. Son, S.-S.A. An, Dynamic changes of protein corona compositions on the surface of zinc oxide nanoparticle in cell culture media, *Front. Chem. Sci. Eng.* 13 (2019) 90–97, <https://doi.org/10.1007/s11705-018-1766-z>.

Cytotoxicity and cellular uptake of *Cannabis sativa* extract loaded nanostructured lipid carriers on hCMEC/D3 cells

Ljubica Mihailova¹; Dushko Shalabaliija¹; Andreas Zimmer²; Nikola Geshkovski¹;
Gjoshe Stefkov³; Maja Simonoska Crcarevska¹; Marija Glavas Dodov¹

¹ Ss. Cyril and Methodius University, Faculty of Pharmacy, Institute of Pharmaceutical Technology, Majka Tereza 47, 1000 Skopje, R.N. Macedonia, lj.mihailova@gmail.com

² University of Graz, Institute of Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, 8010 Graz, Austria

³ Ss. Cyril and Methodius University, Faculty of Pharmacy, Institute of Pharmacognosy, Majka Tereza 47, 1000 Skopje, R.N. Macedonia

INTRODUCTION

Recent research studies have clearly shown the great potential of *Cannabis sativa* compounds to be applied for the treatment of many neurodegenerative diseases, including epilepsy. Blood-brain barrier (BBB) penetration is a major challenge in the development of drugs acting on the central nervous system (CNS) due to the specific anatomic and physiological features of the cerebral vascular tissue. Molecular characteristics, which are known to reduce the ability for partition into the BBB cells are: significant polarity, high potential for hydrogen bond formation, molecular weight of more than 500 kDa and presence of rotatable bonds or highly branched molecular structure (1). In this sense, nanostructured lipid carriers (NLC) could be considered as a possible approach for successful brain delivery and improved bioavailability of many drugs, including the cannabinoids due to the biocompatible nature of their components and the properties such as high drug entrapment efficiencies, high stability and well-established safety profile (2,3). Therefore, the aim of this study was to evaluate the biocompatibility of *Cannabis sativa* extract loaded NLC through determination of the cytotoxic effect as well as their efficiency through examination of the uptake potential on human cerebral microvascular endothelial cell line (hCMEC/D3).

MATERIALS AND METHODS

Materials

LIPOID PE 18:0/18:0-PEG 2000 (PEG) was kindly donated from Lipoid, Germany. Phospholipone 90H (PL90H) was supplied from Phospholipid, Germany, Tween 80 from Merck, Germany and Poloxamer 407 (POL) from BASF, Germany. Oleic acid (OA), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) and fluorescein isothiocyanate isomer I (FITC) were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Immortalized hCMEC/D3 cell line (CELLutions, Biosystems/Cedarlane®, Canada) were maintained in Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2), supplemented with Fetal Bovine Serum (FBS), chemically defined lipid concentrate, HEPES 1M and penicillin-streptomycin (Life

Technologies), human basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), ascorbic acid and hydrocortisone (Sigma) and trypsin-EDTA (GIBCO, Thermo Fisher scientific). CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS) and CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (CytoTox) were purchased from Promega, USA. *Cannabis sativa* (CSE) dry extract was kindly donated by the Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Skopje.

Methods

Preparation of NLC

Briefly, the oil phase (PL90H, OA, CSE and methanol) and the aqueous phase (Tween 80 and distilled water with PEG (NLC-1) or Tween 80 and distilled water with POL (NLC-2)) were heated to 50 °C. O/W emulsion was prepared by the dropwise addition of the oil to the aqueous phase under magnetic stirring (50 °C, 250 rpm, Variomag, Multipoint HP 15, Germany). The organic solvent (methanol) was evaporated under the continuous magnetic stirring at the previously mentioned conditions. Obtained NLC were submitted to high shear homogenization (13500 rpm, 3 min; Ultra-Turrax T25, Ika-Werke, Germany) and were allowed to stand for 24 h at 4 °C. For the cellular uptake studies, NLC were labeled with FITC, which was incorporated in the organic phase.

Particle size, particle size distribution and zeta potential

Particle size (D_{50}), particle size distribution (PDI) and zeta potential (ZP) of the prepared formulations were determined using Zetasizer Nano Series (Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., UK).

Cell viability assay (MTS assay)

Cells were seeded in 96-well plate (5×10^3 cells) and left overnight to settle at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ in EBM-2. Afterward, the cells were incubated with different concentrations of the prepared NLC for 4 hours. The medium of each well was separated from the cells and stored for the cytotoxicity assay, and cells were treated with 20 µL MTS solution for 4 hours. The absorbance (490 nm)

was measured using a microplate reader. Cell viability was expressed as a percentage compared to the cells incubated only with EBM-2 (positive control) and triton X-100 was used as the negative control.

Cell cytotoxicity assay (LDH assay)

The medium (25 μ L) resulting from incubation of the prepared formulations was transferred into white plates. The release of lactate dehydrogenase (LDH) into culture supernatants was detected by adding 25 μ L CytoTox reagent. After 20 min of incubation at 37 $^{\circ}$ C in an atmosphere of 5% CO₂, 13 μ L of stop solution was added in each well. The fluorescence was measured at 560 nm excitation and 590 nm emission. Cytotoxicity was expressed as a percentage compared to the maximum LDH release in the presence of Triton X-100 (positive control). EBM-2 was used as a negative control.

Cellular uptake studies

NLC (10 μ g/ml) were incubated for 4 hours with confluent monolayers of hCMEC/D3 (4 x 10⁴ cells/well) in cell culture medium at 4 $^{\circ}$ C and 37 $^{\circ}$ C. After incubation, cells were washed out 2 times with DPBS. The cellular uptake (%) was calculated after measuring the fluorescence of each sample (excitation/emission of 495 nm/519 nm) by a microplate reader. NLC incubated under the same conditions without cells were used as control probes.

RESULTS AND DISCUSSION

The mean particle size and particle size distribution were 104.0 \pm 3.2 nm (PDI = 0.191 \pm 0.065) and 106.7 \pm 2.6 nm (PDI = 0.181 \pm 0.024) for NLC-1 and NLC-2, respectively. Zeta potential for both formulations was around -32 mV.

The obtained results from the MTS assay (Fig. 1) demonstrated concentration-dependent reduction of cell viability, with a significant decrease when treated with the highest NLC concentration (100 μ g/ml).

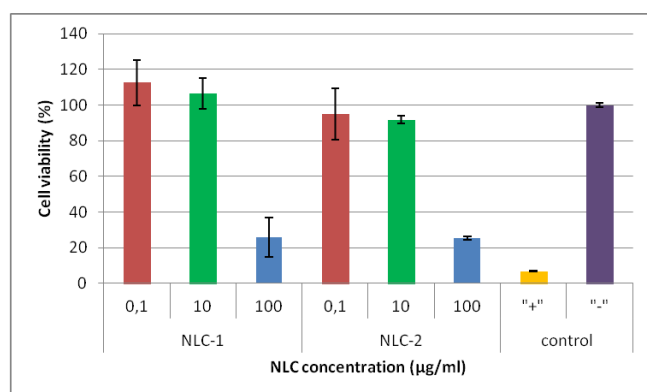


Figure 1. Cell viability (%) after 4h incubation of hCMEC/D3 cells with NLC (μ g/ml)

On the other hand, low percent of cytotoxicity for all NLC concentrations was observed (Fig. 2) which indicates that the reduction of cell viability does not occur due to necrosis.

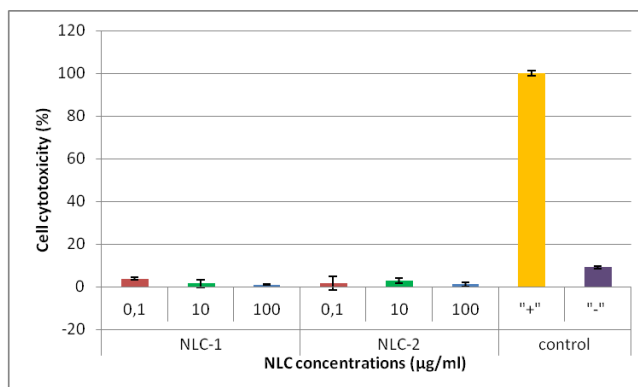


Figure 2. Cell cytotoxicity (%) after 4h incubation of hCMEC/D3 cells with NLC (μ g/ml)

No significant difference in cellular uptake was noticed after the incubation of NLC formulations at 4 $^{\circ}$ C and 37 $^{\circ}$ C (Fig. 3), which indicates to ATP independent internalization mechanism.

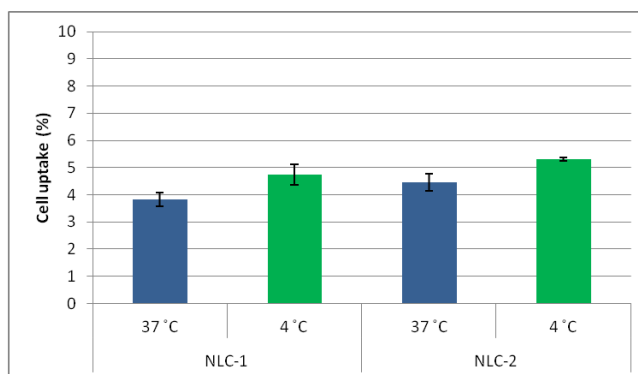


Figure 3. Cell uptake (%) after 4h incubation of hCMEC/D3 cells with NLC (10 μ g/ml) at 37 $^{\circ}$ C and 4 $^{\circ}$ C

CONCLUSION

In this study, the prepared formulations were characterized by dose-dependent and low cytotoxicity, as well as successful cell internalization by ATP independent mechanism, which is pivotal for achieving therapeutic effects in the brain.

REFERENCES

- Haque, S.; Md, S.; Alam, M.I.; Sahni, J.K.; Ali, J.; Baboota, S. Nanostructure-based drug delivery systems for brain targeting, Drug Development And Industrial Pharmacy, 38(4), 387-411 (2012)
- Hofmann, M.E. and Frazier, C.J. Marijuana, endocannabinoids, and epilepsy: potential and challenges for improved therapeutic intervention, Experimental Neurology, 244, 43-50 (2013).
- Gartziandia, O.; Herran, E.; Pedraz, J.L.; Carro, E.; Igartua, M.; Hernandez, R.M. Chitosan coated nanostructured lipid carriers for brain delivery of proteins by intranasal administration, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 134, 304-313 (2015).

IN VITRO CYTOTOXICITY EVALUATION OF NANOLIPOSOMES INTENDED FOR BRAIN DRUG DELIVERY

Dushko Shalabalija¹, Ljubica Mihailova¹, Maja Simonoska Crcarevska¹, Andreas Zimmer², Nikola Geshkovski¹, Marija Glavas Dodov¹

1. *Institute of Pharmaceutical Technology, Ss Cyril and Methodius University in Skopje, Republic of North Macedonia*

2. *Institute of Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, University of Graz, Austria*

INTRODUCTION

Despite the huge potential for clinical application in the recent years, many studies have confirmed the ability of different types of nanoparticles (NPs) to accumulate in cells and induce organ-specific toxicity which is dependent on their composition and biophysical properties. These studies, combined with the ever-increasing human exposure, impose an urgent need for design of safe NPs and development of strict guidelines for their toxicity testing [1].

MATERIALS AND METHODS

Two different formulations of nanoliposomes (NLs) (soybean lecithin, hydrogenated soy phosphatidylcholine, cholesterol and LIPOID PE 18:0/18:0-PEG 2000 (NL1) or poloxamer 407 (NL2) in mass ratio 17,3:1:1:2, accordingly) were prepared by the modified lipid film hydration technique and analyzed in terms of particle size, particle size distribution and zeta potential (Zetasizer Nano-Series, Malvern Instr. Ltd., UK). The biocompatibility of NLs was investigated through determination of the cytotoxic effect on human cerebral microvascular endothelial cell line (hCMEC/D3) (CELLutions, Biosistemas/Cedarlane®, Canada) by performance of MTS and LDH assays (Promega, USA) according to standard protocols.

RESULTS

NLs samples had mean particle diameter (D50) ~120 nm, following narrow unimodal distribution with negative values for zeta potential of -26.5 and -31.2 mV for NL1 and NL2, respectively. The results from the MTS and LDH assays implied that there was no reduction of the cell viability and showed low percent of cytotoxicity, accordingly, after 4 h incubation of the prepared samples in three concentrations (0.1, 10 and 100 µg/ml) with hCMEC/D3 cell line.

CONCLUSION

Obtained results from the cell viability and cytotoxicity studies confirmed the biocompatibility of NLs in the examined concentrations, which makes them suitable further to be used in the investigations of their uptake by hCMEC/D3.

REFERENCES

1. Najahi-Missaoui W, et al. *Int. J. Mol. Sci.* (2021) 22: 385.

Freeze-drying of nanostructured lipid carriers loaded with *Salvia off.* extract for Alzheimer's disease treatment

Iskra Karakash*, Jovana Vasileska*, Dushko Shalabalija, Ljubica Mihailova, Marija Glavas Dodov, Renata Slaveska Raicki, Maja Simonoska Crcarevska

Institute of Pharmaceutical Technology and Center of pharmaceutical nanotechnology, Faculty of Pharmacy, Ss. Cyril & Methodius University, Majka Tereza 47, 1000 Skopje, R. N. Macedonia

Introduction

NLC (nanostructured lipid carriers) are matrix type colloidal drug carriers composed of a mixture of solid (fat) and liquid (oil) phase. Compared to solid lipid nanoparticles NLCs are characterized by higher drug loading capacity, minimized drug expulsion during storage and improved stability as a final product. Commonly used methods for their preparation are high pressure homogenization, o/w microemulsion, solvent emulsification-evaporation or -diffusion, water-in-oil-in-water double emulsion (w/o/w) as well as high shear homogenization and ultrasonication (Üner, 2006). In all cases they are produced as water dispersion and in order to extend their stability and prolong shelf-life the water should be removed using some of available techniques such as freeze-drying, spray-drying etc.

The aim of this paper was to stabilize previously prepared NLC loaded with freeze-dried methanol extract *Salvia off.* Extract (FSE) for Alzheimer's disease treatment (Taneska et al., 2018) by freeze-drying. Several cryoprotectants in different concentration were used and their influence upon particle size and particle size distribution of prepared NLC-FSE was evaluated.

Materials and methods

Preparation

The NLC-FSEs were prepared using the solvent evaporation method. The lipid phase was prepared as follows: FSE (0.025 g) was dissolved in ethanol 96% (Alkaloid, Macedonia) (10 g) using ultra sonic bath for 10 min and subsequently phospholipon 90H (kindly donated by Phospholipid, Germany) (0.1 g) and oleic acid (Sigma-Aldrich, Germany) (0.065 g) were added. The aqueous phase was composed of 0.045 g poloxamer 407 (BASF, Germany), 0.3 g tween 80 (Merck, Germany) and 8.805 g of distilled water. Lipid phase was dropwise added to aqueous phase under constant magnetic stirring (68 °C, 500 rpm; IKA, Germany). Emulsion was stirred for ~2h under previous conditions until complete evaporation of ethanol and formation of NLC dispersion. The dispersion was cooled down to room temperature by magnetic stirring (300 rpm, 25 °C; IKA, Germany) and left over night on 2-8 °C for recrystallization of the lipid phase.

Freeze-drying

Volume of 0.5 mL of certain cryoprotectant solution with adequate concentration was added to NLC-FSE formulation (2 g) and gently shaken for 1 min. 16 different samples were prepared using 4

* iskra.karakash@gmail.com; * vasileskajovana@gmail.com

cryoprotectants (mannitol, sorbitol, trehalose and saccharose,) each in four different quantities (total lipids (solid+liquid):cryoprotectant ratio of 1:1, 1:2, 1:4 and 1:6). Samples were frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 h and then transferred at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 22 h. Freeze drying was conducted at $-47\text{ }^{\circ}\text{C}$ 0.05 mBar, for 24 h (Labconco, USA). For comparison, NLC-FSE without cryoprotectant was freeze-dried at the same conditions.

Particle size and distribution determination

The freeze-dried samples (30 mg) were reconstituted with 0.9% NaCl (50 mL) under magnetic stirring (15 min, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 300 rpm; IKA, Germany). The particle size and particle size distribution were measured by laser diffractometry (Mastersizer 2000, Hydro 2000S, UK) using previously validated method (Taneska et al., 2018). Results are expressed as particle size ($D_{50}\pm\text{SD}$) and distribution ($\text{Span}\pm\text{SD}$). D_{50} and Span factor of NLC-FSE particles before freeze-drying were also determined.

Results

D_{50} and Span factor value of NLC-FSE before freeze-drying were $149.1\pm 7.25\text{ nm}$ and 2.59 ± 1.3 , and in freeze-dried sample without cryoprotectant they were $490.9\pm 8.02\text{ nm}$ and 85.27 ± 7.93 , accordingly. The higher values for D_{50} and Span of reconstituted freeze-dried sample could be explained by absence of cryoprotectant thus resulting in the formation of agglomerates, most likely due to disruption of the phospholipid layer on the particle surface during the freeze-drying. When sugar alcohols were used as cryoprotectants the lowest observed values for D_{50} and Span were determined in 1:2 ratio ($338.8\pm 4.55\text{ nm}$ and 5.27 ± 0.36) for manitol and 1:1 ratio for sorbitol ($157.7\pm 5.87\text{ nm}$ and 5.77 ± 0.78), subsequently. In the case of trehalose and saccharose as cryoprotectants best results were obtained for 1:2 ratio with D_{50} of $141.9\pm 2.23\text{ nm}$ and Span of 4.14 ± 0.07 and $155.6\pm 1.26\text{ nm}$ and 4.91 ± 0.08 , accordingly.

Trehalose and sucrose in the lyophilization process form a glass matrix that represents a physical barrier between particles, reduces diffusion and molecular mobility (Abdelwahed et al., 2006). Results indicated that trehalose is more effective cryoprotectant than saccharose most likely related to

the water molecule displacement due to the hydrogen bonding between the phospholipid phosphate groups and the hydroxyl groups of trehalose thus resulting with the complexation between trehalose and phospholipid and favoring the stability of the lamellar structure on the particle surface. On the other hand, sucrose does not interact with phospholipid groups and is unable to replace water molecules from the surface of the nanoparticles as in trehalose. The effect of sucrose on the surface of the nanoparticles is most likely of a colligative nature and the extraction of water molecules from the particle surface occurs by an osmotic route (Crowe et al., 2007).

Conclusion

NLC-FSE were prepared and freeze-dried using manitol, sorbitol, trehalose and saccharose as stabilizers (cryoprotectants) in different concentrations. NLC-FSE sample freeze-dried with total lipids (solid+liquid): trehalose ratio of 1:2 showed best results related to D_{50} and Span after reconstitution

References

- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., Fessi, H., 2006. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58(15), 1688-1713.
- Crowe, J.H., Tsvetkova, N.M., Oliver, A.E., Leidy, C., Ricker, J., Crowe, L.M., 2007. Stabilization of liposomes by freeze-drying: Lessons from nature, in: Gregoriadis, G. (Eds.), *Liposome technology 3rd ed. Volume I: Liposome preparation and related techniques*. New York: Informa Healthcare USA, Inc. pp. 261-284.
- Taneska, L., Kostovska, M., Markova, E., Cambuleva, Lj., Shalabalija, D., Dodov, M.G., Karanfilova, I.C., Petrushevska, M., Raicki, R.S., Crcarevska, M.S., 2018. Nanostructured lipid carriers loaded with *Salvia off.* extract for intranasal delivery, 11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Granada, Spain.
- Üner, M., 2006. Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. *Die pharmazie* 61(5), 375-386.

is acceptable by the EMA regulations, 50% of the particles are under 100 nm size, they are around the ideal 80 nm even before membrane filtering it. The zeta potentials are the appropriate value, they promise complying stability. Spectroscopic studies showed fast drug release of the formulation.

CONCLUSION: We can conclude Soluplus® is a good excipient for the preparation of polymer micelles. Formulating polymer micelles can improve the solubility of poorly soluble agents, which can be useful for developing “value added” preparations.

REFERENCES:

1. Miller, T. et al. *Pharmaceutical Research* 30, 584595 (2013).
2. Kulthe, S.S. et al. *Designed Monomers and Polymers* 15, 465521 (2012).

P2/11

Design and Development of microcarriers for natural drug encapsulation: Statistical validation and optimization of polydispersity index and volume/surface parameters

AGUILLA, F.^{1,2}, MOGHRANI, H.¹,
MANCER, D.³, NASRALLAH, N.¹

¹Laboratoire de Génie de la Réaction, Faculté de Génie Mécanique et de Génie des Procédés, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Algiers;

²Unité de Recherche en Analyses et Développement Technologique en Environnement (URADTE), Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC), Tipaza;

³Laboratoire de Phénomènes de Transfert, Faculté de Génie Mécanique et de Génie des Procédés, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB), Algiers, Algeria

INTRODUCTION: Recently, the formulation of natural drugs such as plant extracts and essential oils (EO) has been highly studied due to their multitude bioactivities and their lot off applications from food flavor industry to pharmaceutical and cosmeceutical applications [1].

In aims of Design and Development of EO microcarriers, Ionic Gelation (IG), highly recommended for the encapsulation of hydrophobic bioactive molecules, can be applied and optimized to ensure high drug encapsulation yield with response stability to facilitate its semi-industrial scaling-up [2].

MATERIALS AND METHODS: To obtain EO microcarriers with small particles size and high

drug loading capacity, the studied EO was micro-encapsulated by cross-linking a biodegradable polymer under several experimental conditions. Process optimization was carried out using the Response Surface Methodology to investigate fourth experimental parameters (polymer concentration, cross-linking agent concentration, mixing time and mixing velocity) and the statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) and the Mean comparison of Polydispersity Index (PI), volume-weighted mean particle diameter (d43) and Surface Weighted Mean particle diameter (d32) was carried out using T-test [3]. All analyses were repeated in triplicate.

RESULTS: Both the loading capacity and the particles size of the obtained microcapsules were evaluated to optimize the ionic gelation process. Laser diffractometry (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd) was used to assess the physical characteristics of the developed microcarriers.

The selected optimal conditions allow obtaining microparticles with a loading capacity of 4.95 to 15.19% with a PI range from 0.852 to 5.695, a specific surface area from 0.011 to 10.1 m²/g, a d32 range of 0.595 to 547.735 μm and a d43 from 5.392 to 714.263 μm. The RSM results combined with the statistical analysis allow assessing the correlation between the fourth experimental parameters and their range on significant (P-value < 0.05) or not significant (P-value > 0.05) effects.

CONCLUSION: Development of microcarriers for EO encapsulation using alginate microspheres was optimized to allow an interesting loading capacity, acceptable particles size, desired polydispersity and suitable volume/surface characteristics. The designed microencapsulation process is statistically validated and can be easily scaling-up to a semi-industrial level.

P2/12

Nanostructured lipid carriers for Alzheimer's disease treatment: Influence of solid/liquid lipid ratio on physico-chemical properties

KOSTOVSKA, M.¹, MARKOVA, E.¹,
TANESKA, L.¹, SHALABALIJA, D.¹,
MIHAILOVA, LJ.¹, GLAVASH DODOV, M.¹,
VRANIC, E.², SIMONOSKA, C.¹

¹Institute of pharmaceutical technology, Center of pharmaceutical nanotechnology, Faculty of pharmacy, Ss. Cyril & Methodius University, Skopje, R. Macedonia;

²*Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Sarajevo, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina*

INTRODUCTION: Novel formulations based on embedded herbal therapeutical moieties into nanostructured lipid carriers (NLC) for nose to brain delivery are promising candidates for multi-target therapy of Alzheimer's disease along with specific and selective delivery to the brain tissue. Given that NLC effectiveness would be determined by their physico-chemical properties, the aim of this study was to investigate the influence of solid/liquid lipid ratio upon them.

MATERIALS AND METHODS: NLC loaded with dry extract of *Salvia officinalis* L. (SE) were prepared by solvent evaporation method [1]. Lipid phase consisted of phospholipon 90H (kindly donated by Phospholipid, Germany) and oleic acid (Sigma-Aldrich, Germany) in ratio of 1 to 0.216 (NLCS1), 0.433 (NLCS2) and 0.866 (NLCS3). Relative ratio of phospholipon 90H to other NLCs' formulation variables was 1 to 28.67, 0.167, 1.67, 0.3 and 58.7 for ethanol (Alkaloid, Macedonia), SE, tween 80 (Merck, Germany), poloxamer 407 (BASF, Germany) and water, respectively. NLCs' morphology (Jeol-SEM T300, Japan), particle size (PS) and size distribution (PSD) (Mastersizer 2000, UK), zeta potential (ZP) (Nano ZS, UK) and encapsulation efficiency (EE%) (HPLC Agilent 1100, Germany) were determined.

RESULTS: SEM photomicrographs pointed that prepared NLCS were with spherical shape and smooth surface. As they were yellow-green in color DLS technique could not be used for PS and PSD, so laser diffractometry was applied. By increasing the amount of liquid lipid, NLCs' PS increased (132±1.8, 145±0.86 and 257±6.33 nm for NLCS1, NLCS2 and NLCS3, accordingly) most likely related to the higher density of organic solution thus resulting with larger emulsion droplets with lower surfactant surface coverage. Span values indicated narrow PSD for NLCS1 (1.05±0.01) and NLCS2 (1.04±0.06), while NLCS3 PSD (1.93±0.04) was a bit wider. Amount of liquid lipid did not have influence on ZP (-17.3±0.41 mV), contrary to the EE% (NLCS1 - 42.03±1.23, NLCS2 - 48.94±1.85 and NLCS3 - 95.34±2.21%) probably due to the increase of imperfection degree in the solid lipid crystals, thus providing more space for SE encapsulation.

CONCLUSION: Influence of solid/liquid lipid ratio on NLCS physico-chemical properties was

determined. Results indicated statistically significant influence on PS and PSD, as well as EE%.

REFERENCES:

1. Taneska L. et al. 11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Granada, Spain (2018)

P2/13

Determination of Load-Efficiency of Vancomycin in Nanoparticles System

YÜNKÜL, F.¹, AKSU, N.B.², SEZER, A. D.¹

¹*Marmara University, Turkey;*

²*Altinbas University, Turkey*

INTRODUCTION: Vancomycin is a glycopeptide antibiotic which is active against gram-positive organisms. It is used particularly in the treatment and prophylaxis of staphylococcal infections especially caused by Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. To eliminate adverse effects such as ototoxicity and nephrotoxicity of vancomycin upon systemic administration, local administration with various drug delivery systems such as microspheres or nanoparticles can be utilized. Chitosan is a polysaccharide produced by N-deacetylation of chitin. Chitosan is biocompatible, biodegradable and non-toxic material. Fucoidan is another polysaccharide obtained from brown seaweeds. It has anticoagulant, antithrombotic, antiviral, antitumor and immunomodulatory, anti-inflammatory and antioxidant properties. Chitosan and fucoidan due to their positive and negative charges in proper media respectively, forms a nanoparticle system in which active pharmaceutical ingredients can be encapsulated. In this study, vancomycin-loaded chitosan/fucoidan nanoparticles were fabricated and for determination of load efficiency of vancomycin, an easy and effective method was developed.

MATERIALS AND METHODS: Nanoparticles were prepared using polyion complexation method. For this purpose chitosan was dissolved in 1% (w/v) acetic acid solution while fucoidan and vancomycin were dissolved in distilled water. Fucoidan solution was then dropped to chitosan solution under magnetic stirring. Nanoparticles were separated by centrifugation and then freeze dried.

RESULTS: Two methods were tested, UV spectrophotometry where samples scanned at 280 nm wavelength and RP-HPLC method for related substances in European Pharmacopoeia monograph for vancomycin with modification.

and permeability of the capsule wall for E vitamin diffusion.

REFERENCES:

1. Sharipova et al. *Colloids Surf B* 137, 152–157 (2016)
2. Luo et al. *Colloids Surf B* 85, 145–152 (2011)
3. Petrović et al. *Colloid Polym Sci*, 295, 2279–2285 (2017)
4. Liu et al. *Colloids Surf B* 144, 38–45 (2016)

P7/10

Determination of the protein corona stability complex of nanoliposomes in physiological mediums

MIHAILOVA, L. J.¹, SHALABALIJA, D.¹, SIMONOSKA CRCAREVSKA, M.¹, VRANIC, E.², GLAVASH DODOV, M.¹

¹*Institute of pharmaceutical technology, Center of pharmaceutical nanotechnology, Faculty of pharmacy, Ss. Cyril & Methodius University, Skopje, R. Macedonia*

²*Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Sarajevo, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina*

INTRODUCTION: Due to nanosizing results in the creation of new interfaces and in a positive Gibbs free energy change, nanoliposomal dispersion is a thermodynamically unstable system with tendency of agglomeration or vesical growth. Also, upon the addition of nanoliposomes (NLs) to biological fluids, there is an almost immediate fouling of their surfaces with proteins and other cellular apparatus forming a layer known as protein corona (PC), which determines the eventual properties of NLs [1].

MATERIALS AND METHODS: In order to investigate the effect of LIPOID PE 18:0/18:0-PEG 2000 (PEG) on the in vitro stability of NLs and PC complex formation, two formulations (lecithin: cholesterol:PEG = 8.7:1:1.7 and 9:1:0.17 for S1 and S2, respectively) loaded with rosmarinic extract were prepared by the modified lipid film hydration technique [2]. Prepared NLs (200 µl) were incubated in 800 µl phosphate buffer pH 7.4 or human plasma at 37 °C for 2, 6 and 24h and analyzed in terms of particle size, particle size distribution and zeta potential (Zetasizer Nano-Series, Malvern Instr. Ltd., UK).

RESULTS: In physiological relevant medium with pH 7.4, the diameter (D) of freshly prepared NLs was 107.2 and 113.7 nm with a relatively nar-

row size distribution (PDI=0.27) and zeta-average of -18.5 and -45.1 mV, for S1 and S2, respectively. No significant differences were observed during the examined period of 24h. Obtained results showed that the concentration of PEG influenced the mean size and zeta potential of NLs. In human plasma, D of NLs was 111 and 123.6 nm with PDI=0.3 and zeta-average of -18.5 and -17.5 mV. S1 was stable during the period of 24h. In opposite, during the examination period of 24h, S2 showed slight reduction in the zeta potential (-16.7 mV during first 2 h). After 6 h and gradually onto 24 h, the zeta potential became more negative (-20 mV). This could be due to PC complex formation. In late time intervals, probably there was a displacement of the plasma proteins present onto hard corona layer and formation of soft corona complex with the NLs [1].

CONCLUSION: Due to the steric stabilization, NL formulation prepared with sufficient amount of PEG showed satisfactory stability in relevant mediums and potential for prolonged circulation time, thus enabling effective drug deposition to the target site.

REFERENCES:

1. Blundell E. et al. *Anal Bioanal Chem* 408, 5757–5768 (2016)
2. Cambuleva Lj. et al. *Maced. Pharm. Bull.* 62(suppl), 641 (2016)

P7/11

Low-energy nanoemulsions with antioxidant red raspberry seed oil and fruit extracts – Influence of extract type and its quality and different polyols on EPI nanoemulsion formation and stability

ANA, G.¹, ĐOKOVIĆ, J.¹, SAVIĆ, S. M.², TASIĆ-KOSTOV, M.³, PAVLOVIĆ, D.³, SAVIĆ, S. D.¹

¹*University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Belgrade, Serbia;*

²*DCP Hemigal, Leskovac, Serbia*

³*Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Niš, Serbia*

INTRODUCTION: Red raspberry seed oil is a rich source of anti-inflammatory polyunsaturated fatty acids and antioxidants while hydro-glycolic extracts made from raspberry fruit are known for carotenoids, vitamin C and tannins. To use their biological potential in effective skin care products we formulated low energy nanoemulsions (LE-