



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

О30-И

Број: 58/88-
Датум: 2.10.2023 година
Скопје

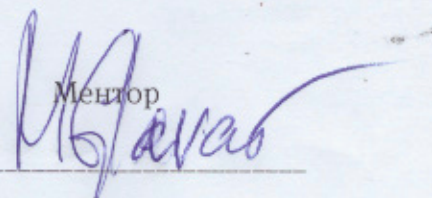
Врз основа на Правилникот за условите, критериумите и правилата за запишување и студирање на трет циклус студии - докторски студии на Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје (Универзитетски гласник бр. 530 од 31 декември 2020 година), се дава следнава

Изјава

Јас, проф. д-р Марија Главаш Додов, како ментор на м-р Душко Шалабалија, 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, 2.10.2023 година.

Ментор





УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ – СКОПЈЕ
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА ФАРМАЦЕВТСКА ТЕХНОЛОГИЈА



Душко Симон Шалабалија

**ДИЗАЈН И РАЗВОЈ НА
БИОИНСПИРИРАНИ ПЕГ-ИЛИРАНИ
НАНОЛИПОЗОМИ СО ВГРАДЕН
ЕКСТРАКТ ОД РУЗМАРИН ЗА
ТРЕТМАН НА
АЛЦХАЈМЕРОВА БОЛЕСТ**

- Докторски труд -

Скопје, јули 2023



SS. CYRIL AND METHODIUS UNIVERSITY IN SKOPJE
FACULTY OF PHARMACY
INSTITUTE OF PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY



Dushko Simon Shalabaliya

**DESIGN AND DEVELOPMENT OF
BIOINSPIRED PEG-YLATED
NANOLIPOSOMES LOADED WITH
ROSEMARY EXTRACT FOR
TREATMENT OF
ALZHEIMER'S DISEASE**

- Doctoral dissertation -

Skopje, July 2023

Докторанд: Душко Симон Шалабалија

Тема: Дизајн и развој на биоинспирирани ПЕГ-илирани нанолипозоми со вграден екстракт од рузмарин за третман на Алцхајмерова болест

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

Научна област: Фармацевтска технологија

Рецензентска комисија: Проф. д-р Светлана Кулеванова - претседател
Институт за фармакогнозија
Фармацевтски факултет
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ – Скопје

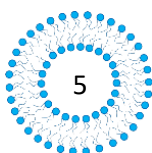
Проф. д-р Марија Главаш Додов - ментор
Институт за фармацевтска технологија
Фармацевтски факултет
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ – Скопје

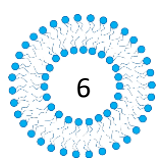
Проф. д-р Никола Гешковски - член
Институт за фармацевтска технологија
Фармацевтски факултет
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ – Скопје

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

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

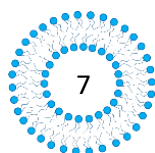
Ден на одбрана: 13.07.2023

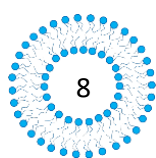




*За моите родители,
за љубовта,
за поддршката,
за поттикот*

Посветено на Симон и Татјана





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 (СIII-RS-1113), како и во Joint Research Center на Европската Комисија како дел од проектот „Протеомичко профилирање на протеинската корона формирана на површината на наночестичките по нивна инкубација во hСМЕС/D3 клеточен медиум“. Изразувам благодарност до сите кои беа вклучени во организацијата и реализацијата на експерименталната работа.

Својата најголема и неизмерна благодарност ја изразувам до мојот ценет ментор проф. д-р Марија Главаш Додов, за огромната поддршка, за секој корисен совет, за разбирањето, за трпението, за пренесеното знаење, идеи и насоки. Најискрено благодарам за Вашата доверба уште од првиот ден, за слободата која ни ја давате континуирано да се надоградуваме на професионален план, како и за постојаниот поттик да растеме пред сè како луѓе, а потоа и како професионалци. Благодарам за тоа што сте тука за нас во било кое време!

Посебна и неизоставна благодарност до мојата другарка, а воедно и колешка Љубица Михаилова чиј придонес во секој аспект од овој докторски труд е непроценлив. Ти благодарам за твоето трпение и искреност, твоите најкорисни совети, за несебичната поддршка, за тоа што си соработник кој секој би посакал да го има покрај себе.

Огромно благодарам до проф. Гешковски, за неговата несебична помош, корисни совети, долги дискусии како и нови идеи и сугестии при реализацијата на ова истражување. Ви благодарам за целото пренесено знаење и безрезервната поддршка.

На проф. Маја Симоноска Црцаревска се заблагодарувам на пренесеното знаење, за поддршката, за стручните совети и несебичната помош во текот на експерименталната работа и финалната изработка на овој докторски труд.

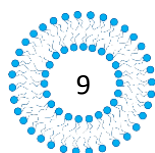
Голема благодарност до проф. Светлана Кулеванова за неизмерната поддршка уште од времето на моето студирање, за соработката, пренесеното знаење, корисните сугестии и размислувања при изработката на оваа дисертација.

На проф. Раички се заблагодарувам за стручните совети и за несебичната поддршка.

На проф. Андреас Цимер се заблагодарувам за одвоеното време, стручните совети, соработката и дадената можност вежен дел од експерименталната работа да се заврши под негово менторство.

Благодарам до преостанатите професори и колеги од Институтот за фармацевтска технологија, за поддршката, помошта, разбирањето, довербата и целокупното пренесено знаење. Им благодарам и на колегите од Фармацевтскиот факултет за досегашната соработка и пријателство. Голема благодарност до колегите од Институтот за фармакогнозија и за нивната несебична помош и отвореноста за соработка при изработката на дел од ова истражување.

Најголема и најдлабока благодарност должам на моите родители, целото мое семејство и најблиски пријатели за секојдневниот поттик, љубовта, трпението и силата којашто континуирано ми ја даваат да чекорам напред кон уште поголеми успеси!



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



Душко Шалабалија

Мислењата во поглед на доставените авторезимеа на докторскиот труд под наслов „Дизајн и развој на биоинспирирани ПЕГ-илирани нанолипозоми со вграден екстракт од рузмарин за третман на Алцхајмерова болест“ се дадени во прилог 1.

Листа на трудови поврзани со докторската дисертација

Gorachinov, F., Makresk, P., **Shalabalija, D.**, Mihailova, Lj., Simonoska Crcarevska, M., Glavas Dodov, M., Goracinova, K., Jovanovski, G., Geskovski, N. (2023). Micro-Raman spectroscopy for detection of label-free and oil red O labeled PEGylated nanoliposomes in hCmec/D3 cell internalization studies. *Croatica Chemica Acta*, in press. IF: 0,659

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*, in press. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.09.012> IF: 3,784

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>

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., 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: 5,062

Mihailova, 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, 2017-2018 година).
2. *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 Бугарската академија на науките, 2019-2020 година).
3. СЕЕРУС мрежа за мобилност, СЕКА PharmTech СИИ-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, 2021 година).
4. 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, Research Infrastructure Access Agreement N° 36025/9; 2020-1-RD-Nanobiotech, 2022-2023 година).

**ДИЗАЈН И РАЗВОЈ НА БИОИНСПИРИРАНИ ПЕГ-ИЛИРАНИ
НАНОЛИПОЗОМИ СО ВГРАДЕН ЕКСТРАКТ ОД РУЗМАРИН ЗА ТРЕТМАН
НА АЛЦХАЈМЕРОВА БОЛЕСТ**

- РЕЗИМЕ -

Литературните податоци сугерираат дека патогенезата на некои невродегенеративни заболувања, меѓу кои и Алцхајмеровата болест (АБ) е поврзана со состојбата на оксидативен стрес. Па оттука, употребата на антиоксидативните и антиинфламаторните активни компоненти, како што се полифенолите присутни во екстрактот од рузмарин (RE) се препорачува како корисна стратегија за превенција на развојот на АБ. Меѓутоа, имајќи ги предвид ограничувањата кои потекнуваат од слабата системска биорасположливост на овие компоненти и дополнително комплексноста на крвно-мозочната бариера (КМБ), развојот на нанолипозоми како системи-носачи би било соодветно и ефикасно формулациско решение за транспорт на екстрактот преку КМБ со можност за насочена испорака на активните компоненти до целното место во мозокот, а со тоа и успешен третман на АБ.

Во оваа насока, најпрво беа дизајнирани и формулирани неПЕГ-илирани празни нанолипозомски формулации (NLs), а понатамошните чекори влучуваа подготовка и карактеризација на NLs со полимер за стерна стабилизација – полиетилен гликол (PEG) и следствено на тоа, ПЕГ-илирани NLs со енкапсулиран RE. За добивање на оптималните формулации беше имплементиран централно композитен дизајн при што беа дизајнирани и подготвени 20 формулации со модифициран метод на хидрирање на сув липиден филм и истите беа карактеризирани од аспект на нивните физичко-хемиски и биофармацевтски особини кои се во насока на ефикасен транспорт низ КМБ и третман на АБ.

Оптималните нанолипозомски формулации се карактеризираа со големина околу 120 nm, тесна унимодална дистрибуција (SPAN фактор ~ 1) и негативен Зета потенцијал (од -18,50 до -48,3 mV). Енкапсулацијата на розмаринската киселина (RA) во липозомските везикули беше $\sim 90\%$, додека пак процентот на ослободена RA како маркер компонента во тек на 24 часа се движеше во опсег од 24,83 до 48,39%. Овие

резултати сугерираат дека подготвените нано-носачи имаат висока ефикасност на енкапсулација и се карактеризираат со продолжено и контролирано ослободување на RA во тек на 24 часа.

Сите оптимални нанолипозомски примероци покажаа статистички значаен поголем антиоксидативен капацитет ($> 94,15\%$) во споредба со чистиот RE ($90,04\%$). Најмал процент на адсорбирани протеини кај плазмата на здрави доброволци и плазмата од пациенти со АБ беше добиен за формулацијата со најголемо количество на PEG (NLb1) на површината на везикулите, додека пак IR-ATR спектроскопската анализа на нанолипозом-протеин комплексите посочи дека истата оваа формулација резултира со посилено водородно поврзување помеѓу PEG и говедскиот серум албумин. На крајот од оваа фаза беше испитана и стабилноста на оптималните NLs во физиолошки релевантни медиуми, каде што добиените резултати сугерираат на физичката стабилност на формулациите, но и на динамичниот процес на формирање на протеинската корона околу нано-везикулите при нивната инкубација во хумана плазма и клеточен медиум.

Резултатите добиени од *in vitro* испитувањата на вијабилноста и цитотоксичноста врз клетките на КМБ (hCMEC/D3) и неуробластома клетките (SH-SY5Y) во тек на 24 часа, по нивен третман со 3 различни концентрации од празни нанолипозомски примероци (5, 10 и 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) не покажаа значително намалување на клеточната вијабилност, ниту пак нарушување на интегритетот на клеточната мембрана што укажува на безбедноста на овие концентрации од примероците. Во компаративните студии на квантитативно клеточно преземање на флуоресцентно маркираните празни NLs од страна на овие две клеточни линии беше увидено дека концентрацијата на нано-везикулите и времето на инкубација играат суштинска улога врз процентот на нивната интернализација.

Дополнително, сите испитани флуоресцентно маркирани празни формулации на NLs следеа енергетски зависен транспорт на ендоцитоза и пасивна дифузија, додека пак транспортните студии на комбинираната hCMEC/D3/SH-SY5Y клеточна линија го потврдија успешниот транспорт на нано-формулациите низ клетките на КМБ и нивното последователно преземање од страна на невроните (во опсег од 25,17 до 27,54%).

Спектрите од Микро-Раманската спектроскопија ја потврдија успешната интернализација на нано-везикулите, а микрографските прикази од флуоресцентната и конфокалната микроскопија открија дека интернализираните NLs се ко-локализираат во перинуклеарните клеточни региони.

Клучни зборови: нанолипозоми, екстракт од рузмарин, Алцхајмерова болест, експериментален дизајн, оптимизација, карактеризација

**DESIGN AND DEVELOPMENT OF BIOINSPIRED PEG-YLATED
NANOLIPOSOMES LOADED WITH ROSEMARY EXTRACT FOR TREATMENT
OF ALZHEIMER'S DISEASE**

- ABSTRACT -

Literature data suggest that the pathogenesis of several neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease (AD), is associated with the state of oxidative stress. Hence, the use of antioxidant and anti-inflammatory molecules, such as polyphenols present in the rosemary extract (RE), is recommended as a useful strategy for preventing AD progression. Taking into consideration the limitations arising from the poor systemic bioavailability of these compounds, and additionally, the complexity of the blood-brain barrier (BBB), the development of nanoliposomes is considered to be suitable and effective solution for transport of the extract across BBB, with the possibility of targeted brain delivery, and thus, successful AD treatment.

In this direction, non-PEG-ylated empty nanoliposome formulations (NLs) were firstly formulated, while the further steps involved preparation and characterization of NLs with a polymer for steric stabilization (PEG) and subsequently, PEG-ylated NLs with encapsulated RE. In order to obtain the optimal formulations, central composite design was implemented. In this phase of the research, 20 different NLs formulations were prepared with a modified method of dry lipid film hydration and were completely characterized in terms of physico-chemical and biopharmaceutical properties.

The optimal nanoliposomal formulations were characterized with mean size ~ 120 nm, narrow unimodal distribution (SPAN ~ 1) and a negative zeta potential (from -18.50 to -48.3 mV). The encapsulation of the rosmarinic acid (RA) in the liposomal vesicles was ~ 90%, while the *in vitro* release within 24 hours ranged from 24.83 - 48.39%. These results indicated that the prepared nanoliposomes have high encapsulation efficacy and the rosmarinic acid follows prolonged and controlled release in a period of 24 hours.

All optimal nanoliposomal samples showed a statistically significant higher antioxidant capacity (> 94.15%) compared to the extract (RE) (90.04%). The lowest percentage of adsorbed proteins in the plasma of healthy volunteers and the plasma from patients with AD, was obtained for the formulation with the highest amount of polyethylene glycol (PEG) on its

surface, while IR-ATR spectroscopic analysis of the liposome-protein complex indicated that this same formulation provided a stronger hydrogen bonding between PEG and Bovine Serum Albumin.

The results obtained from the *in vitro* viability and cytotoxicity assays on BBB cells (hCMEC/D3) and neuroblastoma cells (SH-SY5Y) in a period of 24 hours, after their treatment with 3 different concentrations of blank nanoliposome samples (5, 10 and 100 µg/mL) did not show a significant decrease in the cell viability, nor a violation of the integrity of their cell membrane. In the comparative studies of quantitative cellular uptake of fluorescently labeled blank NLs formulations by these two cell lines it was found that the concentration of the nano-vesicles and the incubation time play an essential role on the percentage of their internalization.

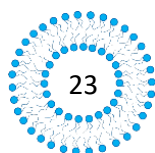
In addition, all tested fluorescently labeled blank NLs formulations followed energy-dependent transport of endocytosis and passive diffusion, while the transport studies on the combined hCMEC/D3/SH-SY5Y cell lines confirmed the successful transport of the nanoformulations across the BBB cells and their subsequent uptake by neurons (ranging from 25.17 to 27.54%).

Micro-Raman spectras confirmed the successful internalization of the nano-vesicles, while the fluorescence and confocal microscopy micrographs revealed that the internalized nanoliposomes co-localize in the perinuclear cell regions.

Keywords: nanoliposomes, rosemary extract, Alzheimer's disease, Design of Experiments, optimization, characterization

СОДРЖИНА

1. ВОВЕД	27
2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА	33
2.1. Примена на нанотехнологија и нано-системи за испорака на активни компоненти и успешен третман на различни заболувања кај луѓето	35
2.2. Нанолипозоми - состав, поделба, карактеристики	36
2.2.1. Основни формулациски карактеристики, предности и недостатоци на нанолипозомите	36
2.2.2. Фактори што влијаат на терапевтските перформанси на нанолипозомите	40
2.2.3. Клиничка употреба на нанолипозомите	44
2.3. Нанолипозоми како системи-носачи на активни компоненти за насочување во мозокот	45
2.3.1. Крвно-мозочна бариера (КМБ)	46
2.3.2. Катјонски нанолипозоми	48
2.3.3. Долго-циркулирачки нанолипозоми	49
2.3.4. Нанолипозоми за активен таргетирање на мозокот	50
2.4. Алцхајмерова болест – основни патофизиолошки карактеристики	53
2.5. Поврзаност помеѓу АБ и оксидативниот стрес	56
2.6. Нанолипозоми наменети за третман на Алцхајмерова болест	59
2.7. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Lamiaceae)	66
3. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО	71
4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДЕЛ	77
4.1. Материјали	79
4.2. Опрема	81
4.3. Методи	83
4.3.1. Прелиминарни студии и OFAT експерименти при развој на формулација на NLs	83
4.3.2. Подготовка на нанолипозомските дисперзии (NLs)	83
4.3.3. Студии на експериментален дизајн	84
4.3.4. Определување на големината и дистрибуцијата по големина на NLs	85
4.3.5. Определување на апсолутно количество на енкапсулирана RA во NLs	86
4.3.6. In vitro постапка за определување на брзината на ослободување на RA од NLs	86

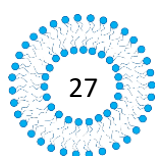


4.3.7.	Морфолошка изглед на NLs	87
4.3.8.	Определување на Зета потенцијал на NLs	89
4.3.9.	Определување на антиоксидативен капацитет (ORAC анализа) на NLs и RE	89
4.3.10.	Студии за определување на адсорпција на протеини на празни NLs (Брадфорд анализа)	89
4.3.11.	IR – ATR спектроскопски анализи на NLs	90
4.3.12.	In vitro студии на стабилност на NLs во физиолошки релевантен медиум, човечка плазма и медиум за клеточни култури	91
4.3.13.	Определување на промени во големината на NLs како функција од еволуцијата на протеинската корона со помош на AF4-MALS/DLS анализа	91
4.3.14.	Протеомско профилирање на адсорбирани протеини на површината на празни NLs со помош на автоматизирана електрофореза со висока резолуција	92
4.3.15.	hCMC/D3 клеточна линија	93
4.3.16.	SH-SY5Y клеточна линија	93
4.3.17.	Испитување на вијабилност на hCMC/D3 и SH-SY5Y клетки	94
4.3.18.	Испитување на цитотоксичност на празни NLs врз клетки од hCMC/D3 и SH-SY5Y клеточна линија	95
4.3.19.	Квантитативни студии на клеточно преземање на празни NLs од страна на hCMC/D3 и SH-SY5Y клеточните линии на 37 °C	95
4.3.20.	Квантитативни студии на клеточно преземање на празни NLs од страна на hCMC/D3 и SH-SY5Y клеточните линии во присуство на инхибитори на клеточен транспорт	96
4.3.21.	Квантитативни студии на клеточно преземање на празни NLs од страна на комбинирана hCMC/D3 / SH-SY5Y клеточна линија	97
4.3.22.	Определување на број на hCMC/D3 клетки со интернализирани NLs со помош на флуоресцентна микроскопија	97
4.3.23.	Детекција на флуоресцентно маркирани и немаркирани NLs во hCMC/D3 клеточната линија со Микро-Раманска спектроскопија	98
4.3.24.	Студии на интернализација на празни NLs во живи клетки на hCMC/D3 и SH-SY5Y со флуоресцентна микроскопија	99
4.3.25.	Студии на клеточна интернализација на празни NLs во hCMC/D3 и SH-SY5Y клеточните линии со конфокална микроскопија	100
4.3.26.	Статистичка анализа	100
5.	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	101
5.1.	Прелиминарни испитувања при развој на формулација на NLs	103
5.2.	Експериментален дизајн и оптимизација на NLs	104
5.3.	Карактеризација на оптималните NLs	114
5.3.1.	Физичко-хемишка карактеризација на NLs	114
5.3.2.	In vitro определување на брзината на ослободување на RA од NLs	115
5.3.3.	Определување на антиоксидативен капацитет (ORAC анализа) на NLs и RE	116

5.3.4.	Студии за определување на адсорпција на протеини на NLs (Брадфорд анализа)	118
5.3.5.	IR – ATR спектроскопски анализи на NLs	120
5.3.6.	Стабилност на NLs во физиолошки релевантни медиуми, човечка плазма и медиум за клеточна култура	123
5.3.7.	Определување на промени во големината на NLs како функција од еволуцијата на протеинската корона со помош на AF4-MALS/DLS анализа	128
5.3.8.	Протеомско профилирање на адсорбирани протеини на површината на NLs со помош на автоматизирана електрофореза со висока резолуција	135
5.3.9.	Испитување на вијабилност на hCMEC/D3 и SH-SY5Y клетки	136
5.3.10.	Испитување на цитотоксичност на клетки од hCMEC/D3 и SH-SY5Y клеточна линија	138
5.3.11.	Квантитативни студии на клеточно преземање на NLs од страна на hCMEC/D3 и SH-SY5Y клеточните линии на 37 °C	140
5.3.12.	Квантитативни студии на преземање на NLs од страна на hCMEC/D3 и SH-SY5Y клеточните линии во присуство на инхибитори на клеточен транспорт	149
5.3.13.	Квантитативни студии на клеточно преземање на NLs од страна на комбинирана hCMEC/D3 / SH-SY5Y клеточна линија	154
5.3.14.	Определување на број на hCMEC/D3 клетки со интернализирани NLs со помош на флуоресцентна микроскопија	156
5.3.15.	Детекција на флуоресцентно маркирани и немаркирани NLs во hCMEC/D3 клеточната линија со користење на Микро-Раманска спектроскопија	157
5.3.16.	Студии на интернализација на NLs во живи клетки на hCMEC/D3 и SH-SY5Y клеточните линии со флуоресцентна и конфокална микроскопија	168
6.	ЗАКЛУЧОК	175
7.	ЛИТЕРАТУРА	181
8.	ПРИЛОГ 1	205
9.	ПРИЛОГ 2	207

|

1. Вовед



Во последните две децении, истражувачките групи во светот се главно насочени кон имплементација на нанотехнологијата во медицината, односно нејзина примена во напреден и ефикасен третман на различни заболувања (Ramos-Caber and Campos, 2013). Кога се говори за терапевтските пристапи за третман на болести и состојби на централниот нервен систем (ЦНС), добро познат е фактот дека повеќето од активните компоненти не можат да стигнат до мозокот поради присуството на крвно-мозочната бариера (КМБ), која главно се состои од ендотелни клетки поврзани со тесни спојки (Montesinos, 2017). Како последица на анатомските и физиолошките особености на оваа бариера, развиена е цела нова генерација на мултифункционални молекуларни платформи за транспорт на молекулите на лекот низ КМБ, со способност за нивно селективно и специфично доставување до целното место на делување (Adams and Schier, 2001).

Досега се дизајнирани широк спектар на нано-системи со различна големина, форма, полнеж и површински својства за ефективна испорака на активните компоненти до мозокот (Simonoska-Crcarevska et al., 2016). Од сите нив, липозомите привлекуваат можеби најголемо внимание поради нивната биокompatibilност, биоразградливост, структурна сличност со клеточните мембрани, релативно високата ефикасност на енкапсулација на хидрофилни и липофилни активни компоненти, како и ниската токсичност. Имено, овие везикуларни носачи поседуваат уникатни физичко-хемиски својства што овозможуваат ефикасно транспортирање, насочување и доставување на различните активни компоненти до целното место на делување. Сепак, *in vivo* однесувањето на овие системи главно зависи од нивниот состав, како и од површинските карактеристики (Zhang et al., 2013).

Од тие причини, функционализацијата на површината на липозомите се смета за еден од најперспективните пристапи за подобрување на фармакокинетиката и биодистрибуцијата на енкапсулираните активни компоненти. Така, додавањето на полиетилен гликол (PEG) ја ограничува адсорпцијата на плазма протеините од циркулацијата на површината на липозомите и следствено го намалува клиренсот на истите *in vivo* (Mohamed et al., 2019). Подетално, создавањето на надворешен заштитен хидрофилен слој од страна на PEG ланците на површината на липозомските везикули го спречува врзувањето на плазма протеините, а со тоа и процесот на опсонизација и препознавање од страна макрофагите на ретикулоендотелниот систем. Во таа насока, најновите научни истражувања покажуваат дека ПЕГ-илацијата придонесува и за спречување на неспецифичното клеточно врзување што резултира со подобрена

биорасположивост на лековитите супстанции во паренхимот на централниот нервен систем (ЦНС), што е од особена важност за системите со насочено делување (Jenkins et al., 2016). Употребата на нано-формулации на липозоми што се функционализирани со PEG за насочена испорака во мозокот е добро воспоставена и потврдена во огромен број на истражувачки студии. Но сепак, кога станува збор за третманот на Алцхајмеровата болест (АБ), литературата е доста ограничена (Simonoska-Crcarevska et al., 2016).

Со стареењето на светската популација, нарушувањата на мозокот, особено невродегенеративните болести стануваат еден од главните здравствени проблеми. Поради нивната сè уште недефинирана и сложена патофизиологија, невродегенеративните болести, како што е АБ, се едни од глобалните здравствени предизвици на векот.

АБ, еден од најзастапените видови на деменција (Cauwenberghe Van et al., 2015), се карактеризира со абнормална екстрацелуларна агрегација на амилоид- β ($A\beta$) во амилоидните плаки (Strooper and Karaan, 2016) и таложее на хипер фосфорилиран тау протеин во интрацелуларните неврофибриларни клопчиња (Morales et al., 2010). Од друга страна пак, оксидативниот стрес се смета за еден од главните виновници за развој на патофизиолошките настани на АБ. Како примарен токсиколошки настан, оксидативниот стрес се карактеризира со присуство на реактивни кислородни радикали што во повисоки концентрации предизвикуваат низа нарушувања на клеточните структури, односно нуклеинските киселини, протеините и липидите (Yuri et al., 2015). Многу научни студии сугерираат дека основните механизми што предизвикуваат оксидативен стрес се: митохондријалната дисфункција (Silva et al., 2012), акумулацијата на метали (Altamura и Muckenthaler, 2009), хиперфосфорилираните тау протеини (Morales et al., 2010), акумулацијата на $A\beta$ (Strooper and Karaan, 2016) и инфламаторните процеси (Chen and Zhong, 2014). Како клучен тригер фактор во патогенезата на болеста, оксидативниот стрес ги придружува патолошките промени во АБ, па затоа неговите производи претставуваат потенцијални биомаркери во крвта за дијагноза на оваа болест. Понатаму, алдехидите и липидните хидропероксиди, како главни производи на оштетувањето од страна на слободните радикали во мозокот, може да се детектираат во крвта дури и пред појавувањето на првите симптоми на деменција (Skoumalova and Hort, 2012). Ваквите истражувања и резултати јасно укажуваат дека проучувањата на оксидативниот стрес се од особен интерес кога станува збор за оваа тема/болест.

Терапевтските опции за третман на АБ во денешно време се симптоматски. Имајќи ја предвид сложеноста и ограничувањата на патофизиологијата на АБ, сегашните

истражувања главно се фокусирани на превенција и забавување на болеста (Waite, 2015). Во последните години, низ научната литература се сретнуваат податоци за потенцијалот на невропротективни лекови добиени од природни извори со акцент на нивното мулти-таргет дејстввање како супериорен начин за постигнување на посакуваниот терапевтски ефект. Едно од најперспективните растенија во оваа група е *Rosmarinus officinalis* L. од семејството Lamiaceae. Меѓу широкиот спектар на егзогени антиоксиданси, биолошки активните компоненти на екстрактот од рузмарин (RE), како што се фенолните киселини (розмаринска киселина, хлорогенска киселина), фенолните дитерпени (карнозолна киселина, карнозол), пентацикличните тритерпени (урсолна, олеанолна, бутилна киселина), флавоноидите (деривати на апигенин и лутеолин) и етеричното масло (Ozarowski et al., 2013) се органски соединенија добро познати по нивната способност за „чистење“ на слободните радикали, како и за хелирање на металите. Овој антиоксидативен ефект е надополнет со активирање на патеките поврзани со Nrf-2 факторот, кои се вклучени во индукција на гени за различни антиоксидативни ензими, вклучително и ензимите за детоксикација од фаза II како што се: оксигеназа-1, NADPH-зависна хинон оксидоредуктаза и γ -глутамил цистеин лигаза. Исто така, научните податоци покажуваат дека компонентите на RE своето антиинфламаторно дејствување го извршуваат преку активирање на Nrf2/HO-1 патеката што резултира со модулација и намалување на инфламаторниот одговор кај АБ (намалување на серумските нивоа на проинфламаторни цитокини: TNF- α , IL -6 и простагландин E-2) и инхибиција на цитокин-индуцираната адхезија на молекули на површината на ендотелните клетки (Almela et al., 2006; Nabtemariam, 2016). Дополнително, многу *in vitro* и *in vivo* студии сведочат и за можната синергистичка активност на компонентите на RE во инхибицијата на ацетилхолинестеразата и бутирилхолинестеразата, како и за нивната способност да го инхибираат таложењето на клеточните олигомери на A β 42 и A β 43 и да ја промовираат нормалната, непатогена патека за обработка на овие протеини од страна на α -секретазата (Meng et al., 2013; Ozarowski et al., 2013). Затоа, полифенолите се сметаат за потенцијални кандидати во невропротекцијата, превенцијата и третманот на болести предизвикани од оксидативни оштетувања (Sato, 2008). Сепак, поради слабата растворливост во вода и ниската системска биорасположивост, нивната клиничка употреба е доста ограничена (Mignet et al., 2013). Оттука, развивањето различни системи како системи носачи за испорака на

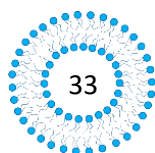
овие компоненти би било потенцијално ефикасно формулациско решение за овие проблеми.

Во оваа насока, имајќи ги во предвид ограничувањата на моментално достапните терапевтски опции за третман на АБ и комплексноста на КМБ, со инкорпорирањето на RE во соодветни нано-носачи би требало да овозможи подобрување на слабата растворливост на полифенолните компоненти во водени медиуми и нивна стабилност преку процесот на енкапсулација како и подобрување на нивната биорасположливост и терапевтски бенефит во мозочните ткива (Mignet et al., 2013).

Дополнителен проблем за време на развојот и оптимизацијата на нано-партикуларните носачи е фактот што различните процесни и формулациски варијабли може значително да влијаат врз нивните својства, а додавањето на природни екстракти во системот значително ја зголемува оваа сложеност. Па оттука, имплементацијата на експерименталниот дизајн претставува корисен статистички пристап за пронаоѓање на најдобрите експериментални услови при развојот на една формулација со користење на најмал број на експерименти, со цел да се добие нано-систем со сакани физичко-хемиски и биофармацевтски особини (големина <200 nm, висок % на енкапсулирана активна компонента и нејзино продолжено ослободување) за ефикасен транспорт низ КМБ и секако, безбеден третман на АБ.

Затоа, главната цел на ова истражување беше дизајн, развој, оптимизација и комплетна физичко-хемиска и биофармацевтска карактеризација на ПЕГ-илирани нанолипозоми (NLs) со енкапсулиран RE со потенцијал за успешен транспорт низ КМБ и ефикасен и безбеден третман на АБ, користејќи експериментален дизајн како пристап за квалитативно и квантитативно определување на влијанието на главните формулациски фактори врз својствата на подготвените нано-системи.

2. Преглед на литературата



2.1. Примена на нанотехнологија и нано-системи за испорака на активни компоненти и успешен третман на различни заболувања кај луѓето

Во последните две декади сведоци сме на интензивниот развој во полето на нанотехнологијата и дизајнирањето на нано-системи како носачи за испорака на активни компоненти во дијагностички и терапевтски цели, како и нивно доставување на до одредени целни места на делување на контролиран начин. Оттука, може да се каже дека нанотехнологијата нуди повеќекратни придобивки во лекувањето на хроничните болести кај луѓето во споредба со конвенционалните терапевтски пристапи и тоа пред сè како резултат на фактот што испораката на активните компоненти може да е специфична за местото на нивно делување и истата да е целно ориентирана. Ваквата испорака би требала да резултира со поголема терапевтска ефикасност, намалување на фреквенцијата на дозирање и намалување на потенцијалните несакани ефекти.

Досега, постојат мноштво на податоци што го потврдуваат широкиот спектар на примени и придобивки на нано-системите како носачи на активни компоненти наменети за третирање различни патофизиолошки состојби (пр. хемотерапевтски агенци, биолошки агенци, имунотерапевтски агенци итн.) (Patra et al., 2018).

Развојот на различните нано-системи е опширно проучуван и може да се каже дека истиот претставува една од најнапредните фармацевтски развојни технологии. Согласно нивниот дизајн, овие системи имаат низа на потенцијални предности, меѓу кои спаѓаат: можноста за модификација на растворливоста, креирањето на соодветен профил/брзина на ослободување, дифузивноста, стабилноста, биорасположивоста и имуногеноста на вградените активни компоненти. Овие карактеристики, последователно може да доведат до подобрување и развој на поприфатливи начини на примена, помала токсичност, помалку несакани ефекти, надминување на различни биолошки бариери, а со тоа и подобрена биодистрибуција и продолжено полувреме на елиминација на активните компоненти (Mirza and Siddiqui, 2014).

Кога станува збор за нано-системите, добро е познато дека постојат два начини преку кои истите целно ги испорачуваат активните компоненти. Имено, кај активното таргетирање, лигандите како што се антителата и пептидите се конјугирани за површината на нано-носачите со цел да се овозможи врзување за рецепторните структури експресирани на целното место на делување. Од друга страна, кај пасивното таргетирање, нано-носачите со енкапсулираната активна компонента циркулираат низ крвотокот и се движат кон целното место, а нивниот контакт и интернализација во

клетките се одвива под влијание на рН, температурата, како и афинитетот за одредено молекуларно место или пак облик. Па така, со цел успешен дизајн и развој на една нано-формулација треба да се земе предвид дека главни цели во човековото тело најчесто претставуваат рецепторите, антигените и липидните компоненти на клеточната мембрана или пак одредени протеини експресирани на клеточните површини на нано-системите, несоодветното знаење за токсичноста на истите претставува голема грижа и несомнено бара дополнителни истражувања за да се подобри ефикасноста и дополнително, да се овозможи нивна побезбедна практична примена. Затоа, внимателното дизајнирање на нано-системите може да биде корисно за справување со проблемите поврзани со нивната употреба (Patra et al., 2018) .

Низ литературата може да се сретне широка палета на формулирани нано-системи за таргетирана и контролирана испорака на активните компоненти, меѓу кои спаѓаат: цврстите липидни наночестички, нанолипозомите, полимерните мицели, металните наночестички, наноемулзиите и многу други (Huang et al., 2017; Taboada and Grooters, 2008; Yang et al., 2020; Zamani et al., 2018). Сепак, ефикасноста на овие нано-структури варира во зависност од нивната големина, облик и другите физичко-хемиски карактеристики. Така на пример, полимерните нано-системи со среден дијаметар од 10 до 1000 nm, покажуваат идеални карактеристики за ефикасна испорака на активните компоненти до туморските ткива (Chirico et al., 2014), при што поради високата биокompatibilност и биоразградливост денес истите широко се истражуваат и применуваат (пр.: поливинил алкохол, поли-L-млечна киселина, полиетилен гликол, поли(млечна-ко-гликолна киселина, алгинат и цитозан) (Watkins et al., 2015).

Но и покрај истражувањата на оваа група на нано-системи, компактните фосфолипидни нано-везикули, како што се липозомите претставуваат најпрочуваната категорија на нано-системи што сè повеќе се развива и применува од страна на научните групи во ова поле.

2.2. Нанолипозоми - состав, поделба, карактеристики

2.2.1. Основни формулациски карактеристики, предности и недостатоци на нанолипозомите

Клиничката употреба на нанолипозомите како носачи на активните компоненти датира уште од 1995 години и тоа како прва генерација на нано-носачи одобрена за

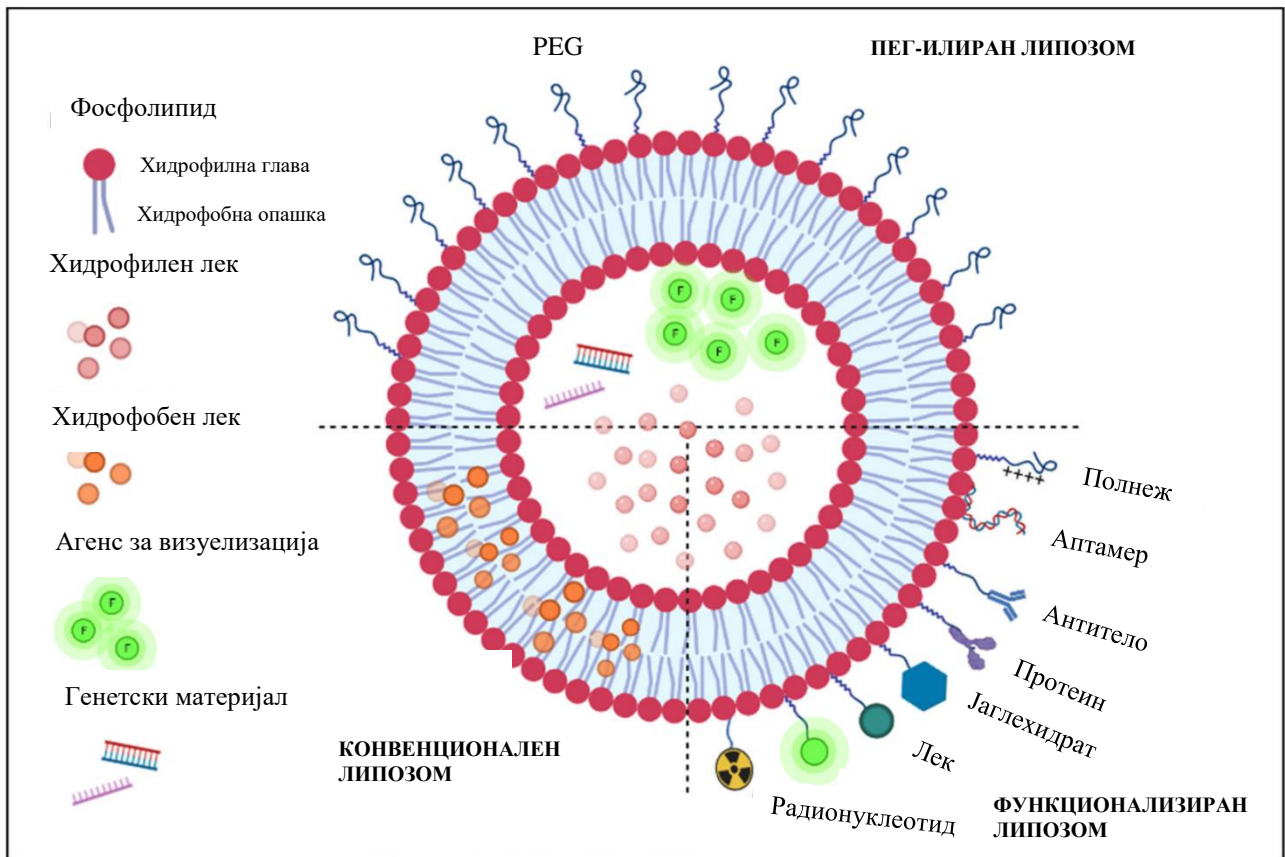
клиничка употреба од страна на Американската агенција за храна и лекови (FDA) (Ventola, 2017).

Имајќи предвид дека терминот липозом е широко дефиниран поим што опфаќа различни типови на везикули според структурата, како и везикули со просечна големина и до неколку микрометри, нанолипозомите ја опфаќаат групата на везикули што претставуваат двослојни сферични фосфолипидни структури со нанометарска големина од 20 до 1000 nm (Mozafari and Mortazavi, 2005; Patil and Jadhav, 2014). За нанолипозомите е карактеристично тоа што истите имаат поголема површина и поприватлив профил на стабилност во однос на везикулите со микрометарски димензии. Класифицирани се во неколку категории и тоа врз основа на големината и бројот на слоеви: мали униламеларни везикули (SUV), големи униламеларни везикули (LUV), мутиламеларни везикули (MLV) и мултивезикуларни везикули (MVV). Овие нано-везикули се главно составени од двослојна фосфолипидна мембрана изградена од природни или синтетски фосфолипиди што содржат хидрофобни опашки насочени кон внатрешноста на двослојот и хидрофилни глави насочени кон надворешноста. Овие фосфолипиди во воден медиум самоасоцираат и спонтано формираат сферични структури кои го заробуваат водениот компартмент (Сл. 1). Липидниот состав значајно влијае на карактеристиките на нанолипозомите и тоа, пред сè врз: средниот дијаметар, ригидноста и флуидноста на фосфолипидниот двослој, а следствено и врз стабилноста и електричниот полнеж на везикулите (Calvagno et al., 2007). Така на пример, нанолипозомите формуирани од природен незаситен фосфатидилхолин добиен од јајца или соја, се карактеризираат со високо пропустливи својства и ниска стабилност. За разлика од нив, нанолипозомите кои во липидниот состав имаат заситени фосфолипиди, како што е дипалмитоил фосфатидилхолин, формираат крути и речиси непропустливи двослојни структури. Понатаму, во составот на некои од досега формулираните нанолипозоми може да се сретнат и други дополнителни супстанции, како што се: јаглехидрати, антиоксиданси, протеини или стероли (Mozafari and Khosravi-Darani, 2007).

Поради нивната амфифилна природа, нанолипозомите имаат потенцијал да енкапсулираат широк спектар на хидрофилни и липофилни активни супстанции, поединечно или пак во комбинација. Дополнително, во споредба со другите нано-системи, нанолипозомите имаат предност поради тоа што се произведуваат од природни и евтини компоненти, дури и во индустриски размери со што се оптимизира

исплатливоста на финалниот производ (на пр. соја лецитин, жолчка од јајце, сончоглед, млеко) (Demirici et al., 2017).

Овие нивни предности, заедно со биокомпатибилноста, биоразградливоста, морфолошката сличност со клетките и способноста да се фузираат со клеточните структури ги прават многу фасцинантни како „паметни“ носачи за испорака на широка палета на активни компоненти.



Сл. 1. Шематски приказ на структура на липозомски везикули.

Сепак, без оглед на потенцијалот на овие нано-системи, ниската физичка стабилност, високата чувствителност на температурни влијанија и рН варијации се значајни предизвици што треба да се надминат кога се планира производство на финален медицински производ базиран на нанолипозоми (Milani et al., 2019). Имајќи го предвид компаративниот преглед на дадените атрибути на липозомите и нанолипозомите како системи-носачи презентирани во Табела 1, континуираното истражување со цел подобрување на веќе познатите нивни својства останува константно меѓу истражувачките групи. Во таа насока, истражувањата главно се насочени кон промовирање на нови структурни карактеристики низ можните методи за нивна

подготовка, како и модификација на нивната површина со цел подобрување на нивните терапевтски потенцијали, стабилност и рок на употреба (Aguilar-Perez et al., 2020; Jin et al., 2018).

Табела 1. Компаративен преглед на предности и недостатоци на липозомите и нанолипозомите

ПРЕДНОСТИ	НЕДОСТАТОЦИ
ЛИПОЗОМИ	
<ul style="list-style-type: none"> • Енкапсулација на хидрофилни и хидрофобни активни компоненти • Одложено ослободување на активните компоненти • Произведени од природни сировини • Едноставна изработка • Можност за функционализација на површината • Економски исплатливи 	<ul style="list-style-type: none"> • Намалување на ефикасноста на енкапсулација со зголемување на средниот дијаметар • Физичка нестабилност при чување • Брз клиренс од телото • Истекување на енкапсулираните активните компоненти • Помала биорасположливост во однос на нанолипозомите
НАНОЛИПОЗОМИ	
<ul style="list-style-type: none"> • Енкапсулација на хидрофилни и хидрофобни активни компоненти • Намалена токсичност и несакани ефекти • Поголема стабилност • Поголем површинско-волуменски однос • Подобен таргетинг • Понизок клиренс и соодветност за испорака на хемотерапевтици 	<ul style="list-style-type: none"> • Производниот процес вклучува употреба на механичка енергија (соникација, хомогенизација, микрофлуидизација) што може да ја разруши фосфолипидната структура • Агрегација и коалесценција при посилни електростатски интеракции • Потребни се повеќе клинички студии за потврда на нивната ефикасност и безбедност • Помал капацитет за енкапсулација • Во одредени случаи, потребни се сурфактанти како стабилизатори • <i>In vivo</i> судбината сèуште не е добро проучена

Поради сите наведени уникатни својства, бројни клинички испитувања го потврдуваат фактот дека нанолипозомите се одлични кандидати за испорака на различни активни компоненти како што се: антиканцерогени, антигабични и антибиотски лекови, како и испорака на лекови во генската терапија, анестетици и анти-инфламаторни агенци (Allen and Cullis, 2013).

2.2.2. Фактори што влијаат на терапевтските перформанси на нанолипозомите

2.2.2.1. Ефикасност на енкапсулација / Капацитет на полнење на нанолипозомите

Ефикасноста на енкапсулација и капацитетот на полнење се сметаат за едни од клучните параметри за ветувачка примена на нанолипозомите и тоа пред сè поради потребата истите да ја содржат потребната доза на активните компоненти со нивна минимална загуба (Drummond et al., 2010). Како што веќе е наведено, една од причините за успешната клиничка примена на нанолипозомите е нивната способност да енкапсулираат прифатливи количества на активни компоненти потребни за да се постигне терапевтска ефикасност. Сепак, мора да се земат предвид неколку фактори што можат да влијаат на успешноста на енкапсулацијата. Еден од важните сегменти што може да влијае на капацитетот на полнење е моларниот сооднос помеѓу хидрофилните активни компоненти и фосфолипидите во нанолипозомските везикули. Имено, покажано е дека кога овој сооднос е повисок од 0,95, доаѓа до намалување на капацитетот на полнење поради тоа што вишокот на активна компонента предизвикува оштетувања на липидните мембрани (Zucker et al., 2009). Покрај ова, други сегменти што може да го компромитираат успешното полнење на нанолипозомите се растворливоста и физичко-хемиските својства на активните компоненти, рН на средината, температурата и условите на полнење. Па оттука произлегува потребата од претходно детално проучување, испитување и разработка на сите овие фактори за да се направи успешен развој на одредена нанолипозомска формулација.

2.2.2.2. Состав и површинска функционализација на нанолипозомите

Добро е познато дека терапевтскиот потенцијал на активните компоненти зависи од нивната достапност на целното место на делување и тоа во потребната доза и во одреден временски период. Освен тоа, од суштинско значење е да се минимизира изложеноста на активните компоненти во нецелните ткива како би се избегнале потенцијалните несакани ефекти. Бројни истражувања потврдуваат дека примената на

нанолипозомите помага во подобрување на ефикасноста и безбедноста на енкапсулираните активни компоненти и тоа преку модифицирање на нивните фармакокинетски својства (дистрибуција, апсорпција и нивна елиминација) (Mozetič, 2019).

Па така, кога станува збор за формулациските аспекти на нанолипозомите, конвенционалните нано-везикуларни формулации покрај фосфолипидите, најчесто содржат холестерол кој се додава со цел за да се намали флуидноста на липозомската мембрана и да се зголеми ригидноста на фосфолипидниот двослој, а со тоа и нивната стабилност преку превенција на истекување на енкапсулираните активни компоненти (Jovanović et al., 2018; Kaddah et al., 2018; Laouini et al., 2012) Меѓутоа, конвенционалните нанолипозоми се карактеризираат со кратко време на циркулација во крвта поради нивната подложност на елиминација од мононуклеарниот фагоцитен систем, како и брзата акумулација во црниот дроб и слезината, што финално резултира со попречена испорака на инкорпорираниите активни компоненти до целното место на делување и промени во нивната дистрибуција до другите ткива на телото (Senior and Gregoriadis, 1982). Конвенционалните нанолипозоми, исто така се карактеризираат и со релативно ограничена *in vitro* стабилност (Zhang et al., 2013). Како резултат на ова, во последните години, модификацијата на нано-везикуларната површина се користи како еден од пристапите за решавање на проблемот со фагоцитното преземање и нивното отстранување од крвно-васкуларниот систем по нивното пристигнување во циркулацијата (Mahapatro and Singh, 2011).

Низ литературата постојат податоци дека катјонските нанолипозоми покажуваат подобрена *in vitro* стабилност, бидејќи нивните наелектризираны површини се одбиваат една со друга, а со тоа се намалува и можноста за нивна агрегација. Во оваа насока, како најчесто користени суровини за подготовка на овој тип на нанолипозоми се споменуваат олеинската киселина и N-[1(2,3-диолеилокси) пропил]-N,N,N-триметилам-мониум хлорид (DOTAP). Притоа, овој тип на нано-системи својата најголема примена ја наоѓаат во генската терапија поради способноста успешно да ги енкапсулираат нуклеинските киселини со електростатско привлекување (San et al., 1993). Имено, катјонските липозоми се погодни за испорака на различни негативно наелектризираны макромолекули како што се ДНК, РНК и олигонуклеотиди бидејќи нивниот негативен полнеж и нивната големина ја ограничуваат пасивната дифузија во клетките, а дополнително истите селективно ги таргетираат ангиогените ендотелни клетки во туморите (Dass, 2003). Оттука, катјонските нанолипозоми се сметаат и за потенцијални

формулациски решенија за испорака на активните компоненти до мозокот како резултат на нивната способност да ја преминат КМБ преку рецептор-посредувана трансцитоза или пак апсорптивна трансцитоза (Hervé et al., 2008; Youn et al., 2014). Но сепак, позитивниот полнеж на површината на катјонските нанолипозоми може да влијае на нивното време на циркулација во крвта поради електростатските интеракции со негативно наелектризираните крвни протеини и истите да ја промовираат нивната агрегација со што би се намалила можноста за испорака на енкапсулираните активни компоненти до целното место на делување (Knudsen et al., 2015).

Од друга страна пак, анијонските нанолипозоми се карактеризираат со пониска стабилност во крвотокот во однос на неутралните и катјонските нанолипозоми и дополнително со повисока стапка на клиренс (Lee and Thompson, 2017).

Со цел да се надминат овие проблеми и ограничувања, еден од пристапите за поспецифична дистрибуција на нанолипозомите и нивна акумулација во целните ткива претставува површинската функционализација со користење на синтетски полимери, гликопротеини, полисахариди или специфични рецепторни лиганди (Rangger et al., 2012). Некои од најчесто користените молекули за постигнување на стерна стабилизација и заштита се: хијалуронската киселина, поливинил алкохолот (PVA), полиетилен иминот (PEI) и полиетилен гликолот (ПЕГ/PEG). ПЕГ-илираните нанолипозоми се нарекуваат и „невидливи“ липозоми (Paolino et al., 2010), поради фактот што хидрофилната површина на PEG ја супримира опсонизацијата од крвните протеини, а оттука се заобиколува и нивното препознавање од страна на ретикулоендотелниот систем. Ова резултира со продолжено време на циркулација, а со тоа и поголема терапевтска ефикасност во споредба со конвенционалните нанолипозомски формулации (Nsairat et al., 2022).

Од друга страна пак, активното таргетирање на нанолипозомите ја зголемува селективноста кон клеточните структури и допринесува во рецептор-посредуваната ендоцитоза на нано-везикулата и нејзината клеточна цел (Allen and Cullis, 2013). Следствено, ова резултира со можност за намалување на потребната доза на активните компоненти, намалена варијација на концентрацијата на активните компоненти во крвта и минимализирање на несаканите ефекти (Bertrand and Leroux, 2012).

Досега, многу нанолипозомски формулации за испорака на антитуморни активни компоненти се одобрени на пазарот коишто своето дејствување го остваруваат преку ефектот на зголемена пропусливост и задржување (Enhanced Permeability and Retention - EPR) на канцерогените клетки (Gubernator, 2011). Меѓутоа, бидејќи при пасивното

таргетирање не може да се направи разлика помеѓу заболените и здравите клетки, развиени се клеточно-специфични таргетирачки нанолипозоми со цел за да се зголеми акумулацијата и локализацијата на анти-туморните активни компоненти во заболените клетки (Alshaer et al., 2015). Дополнително, транспортот и специфичната акумулација на активни компоненти може да се подобрат со инкорпорирање на фрагменти за молекуларно препознавање на површината на нанолипозомите. Па така, во зависност од патофизиологијата што се третира и целното место на делување, дел од стратегиите за активен таргетинг на нанолипозомите вклучуваат „декорација“ на нивната површина со пептиди, протеини (вклучувајќи антитела) или протеински фрагменти, јаглехидрати, нуклеински киселини или витамини (d’Avanzo et al., 2021; Koren et al., 2012; Paolino et al., 2010). Лигандирањето на нанолипозомите може да се постигне преку нековалентна или ковалентна конјугација на таргетирачките лиганди со активните компоненти или пак со површината на нано-везикулите (Gupta and Gupta, 2017). Меѓутоа, треба да се земе предвид дека директната конјугација на активната компонента со таргетирачкиот лиганд може да го наруши препознавањето на лигандот од страна на рецепторот, а исто така може да се промени и терапевтската ефикасност на активната компонента (Backer et al., 2004).

Покрај претходно споменатите стратегии, литературните податоци сугерираат и на формулирање на нанолипозоми што реагираат на стимули. Оваа категорија на нанолипозоми се карактеризираат со брзо ослободување на активните компоненти под дејство на физичко-хемиските или пак биохемиските стимули, како што се: светлина, рН, температура, редокс потенцијал, присуство и концентрација на ензими, ултразвук, електрични или магнетни полиња (Lee and Thopson, 2017). Вообичаено, стимул-респонсивните нанолипозоми во својот состав содржат одредена компонента што ја контролира стабилноста и пропустливоста на липидниот двослој како резултат на присутниот стимул (на пр. модификација на ацилните синцири на фосфолипидите со функционални групи осетливи на светлина, користење на липиди со температура на фазна транзиција од 40–45 °С, амидна или естерска хидролиза од страна на протеази или пак естерази и користење на различни рН сензитивни молекули како што се: олеинска киселина, деривати на сукцинска киселина, полиакрилна киселина, аспартична киселина, глутарна киселина, фосфоеталноламин, рН сензитивни пептиди, ортоестри итн.) (Nsairat et al., 2022).

Последната развиена генерација на нано-везикули се липозомите со меурчиња (нанолипозоми со капсули со гас) за кои се очекува да ги отворат хоризонтите кон нови

примени во испораката на генетски материјал и други активни компоненти (Katsuji Sakaguchi et al., 2008). Овие нанолипозомски формулации се користат за енкапсулирање на биоактивни гасови и/или контролирано ослободување на активните компоненти под дејство на ултразвук (Sun, 2017). Нанолипозомите со меурчиња со азотен оксид (NO) го штитат NO од препознавање од страна на хемоглобинот *in vitro*, како што обично се случува со слободниот NO. Дополнително, нано-везикулите со меурчиња на кислород овозможуваат високи фиксаци на кислородот со висок pO_2 во белите дробови.

2.2.3. Клиничка употреба на нанолипозомите

Во последниве децении различни нанолипозомски формулации се одобрени и својата примена успешно ја наоѓаат во клиничката сфера. Првата одобрена ПЕГ-илирана нанолипозомска формулација со енкапсулиран доксорубицин наменета за третман на Капошиевият синдром, Доксил®, го отворила развојниот пат за неколку други нанолипозомски формулации во насока на модифицирање на нивниот состав и површина со цел поефикасна испорака на специфичните активни компоненти во туморските ткива (Lamichhane et al., 2018). Па така, LipoDox® е уште една ПЕГ-илирана формулација на нанолипозоми со енкапсулиран доксорубицин одобрена од страна на FDA, произведена во 2012 година (Chou et al., 2015). За разлика од нив, Myocet® којшто содржи не-ПЕГ-илирани нанолипозоми покажал пократок полуживот на елиминација, но истиот бил пропратен со помалку несакани срцеви ефекти во споредба со доксорубициноот (Fukuda et al., 2017). Дополнително, даунорубицин е вториот антрациклински антинеопластичен лек енкапсулиран во нанолипозоми за третман на акутна миелоидна леукемија под генеричкото име DaunoXome® (Fassas and Anagnostopoulos, 2005).

Досега се развиени и неколку депо-формулации на нанолипозоми во кои спаѓаат Деросут® во кои е енкапсулиран цитарабин, со што е овозможено негово одржливо ослободување во период од две недели (Murry and Blaney, 2000). Формулацијата Мераст® е глобално одобрена за третман на остеосарком (Meyers and Chou, 2014). Винкристиноот исто така е инкорпориран во нано-везикули кои во својот состав содржат сфингомиелин и холестерол, под името Marqibo®. Интересно е тоа што овој одобрен производ покажува подолго време на циркулација без притоа да се направи површинска модификација на нанолипозомите, што финално резултира со поголема акумулација во целните ткива и со продолжено и контролирано ослободување на винкристиноот.

Onivyde® е уште едно формулациско решение на ПЕГ-илирани нанолипозоми со енкапсулиран иринотекан што покажала поефикасно антитуморно дејствување во однос на слободниот лек (Passero et al., 2016). Дополнително, Vuxeos® познат и како CPX-351, составен од комбинација на цитарабин и даунорубицин, освен намалување на несаканите ефекти, се карактеризира и со зголемена терапевтска ефикасност (Kraus et al., 2016). Слично на ова, Lipusu® претставува уште еден успешен пристап за формулација на нанолипозоми со инкорпориран Paclitaxel, што овозможува лекување на гастричниот карцином со многу помалку негативни ефекти (Koudelka and Turánek, 2012).

Освен во анти-канцер терапјата, нанолипозомските формулации својата примена ја наоѓаат и во третманот на фунгални инфекции. Две главни одобрени антифунгални формулации на нано-везикули се Ambisome® и Fungisome®. И во двете формулации е енкапсулиран Амфотерицин Б и истите покажуваат низа на предности во споредба со слободниот лек, меѓу кои повисока биорасположливост и помала токсичност (Azanza et al., 2015; Rudramurthy et al., 2013). Понатаму, Visudyne® е единствениот нанолипозомски агенс одобрен за терапија на макуларна дегенерација поврзана со инхибиција на создавањето на крвни садови во окото (Chang and Yeh, 2012), додека пак DepoDur™ и Exparel® се депо препарати што се карактеризираат со постепено ослободување и продолжено време на одржување на клиничкиот ефект на морфин и бупивакин во третманот на олеснување на болката, соодветно (Angst and Drover, 2006; Zhigaltsev et al., 2010).

И покрај малиот број на одобрени нанолипозомски формулации за клиничка употреба, согласно последните литературни податоци од 2022 година, во светот моментално се регистрирани 511 активни клинички испитувања на различни формулации на нанолипозоми. Меѓу нив, 121 се во фаза III, 236 се во фаза II, 120 се во фаза I и 6 се во рана фаза на клинички студии (Nsairat et al., 2022).

2.3. Нанолипозоми како системи-носачи на активни компоненти за насочување во мозокот

Со напредокот на нанотехнологијата и воедно, согледувањето на предностите на нанолипозомите како системи-носачи за таргетирана испорака и контролирано ослободување на активните компоненти, утврдено е дека истите имаат и потенцијална

примена во дијагностиката и третманот на невродегенеративните заболувања, вклучувајќи ја и Алцхајмеровата болест (АБ).

Како што беше напоменато погоре, инкорпорирањето на активните компоненти во овој тип на везикули ја подобрува нивната биолошка дистрибуција, го намалува ретикулоендотелното преземање од страна на макрофагите, а дополнително ги намалува и концентрациите на слободниот лек, што понатаму резултира и со намалување на нивната системска токсичност. Модификациите во составот и површината на нанолипозомите може да овозможат ефикасен транспорт низ КМБ и да придонесат кон специфично таргетирање до различните мозочни структури. Дополнително, мултифункционалните нанолипозоми имаат потенцијал да таргетираат повеќе од една патологија на невродегенеративните болести и со тоа да ја забават нивната прогресија (Hernandez and Shukla, 2022).

Но и покрај ова, само неколку нанолипозомски производи за третман на мозочни заболувања успешно ја имаат поминато клиничката евалуација и истите се достапни на пазарот (Vieira and Gamara, 2016). Ова е најверојатно резултат на недостатокот од разбирање на суштинските фактори што придонесуваат за оптималната испорака на активните компоненти во ЦНС и тоа уште во раните фази од развојниот процес. Дополнително, од суштинско значење е и добивањето на детален увид и разбирање на механизмите на транспорт на нанолипозомите низ КМБ, како и последователните промени што настануваат при испораката на активните компоненти во мозокот. Важно е да се разберат механизмите кои целосно ја одредуваат достапноста на активните компоненти до нивната цел во мозокот и секако, како овие кинетички процеси зависат од својствата на нанолипозомските формулации, но и од промените во патофизиологијата/состојбата во испитуваниот организам (животно, здрав волонтер, пациент) (Hernandez and Shukla, 2022).

2.3.1. Крвно-мозочна бариера (КМБ)

КМБ е формирана од церебрални ендотелни клетки и истата ја претставува бариерата помеѓу крвта и мозокот. Таа игра значајна улога во регулацијата на мозочната микросредина (Abbott et al., 2010) и истовремено го контролира селективниот и специфичниот влез, излез, како и метаболизмот на ендогените и егзогените молекули. КМБ претставува физичка и физиолошка бариера која многу ефикасно и селективно го филтрира навлегувањето на соединенијата од крвта во мозокот и на тој начин го штити

нервното ткиво од штетните супстанции и инфективните агенси присутни во крвотокот. Но од друга страна пак, КМБ го спречува навлегувањето и ја ограничува дистрибуцијата на скоро 98% од потенцијалните активни компоненти во мозокот. Како резултат на тоа, во моментот се развиваат стратегии за таргетирање и испорака на лекови што го подобруваат нивниот транспорт од крвта во мозокот (Vlieghe and Khrestchatisky, 2013; Wolburg et al., 2008).

Во оваа насока, успешниот транспорт низ КМБ игра клучна улога во третманот на болестите на ЦНС, како што се Алцхајмеровата болест, Паркинсоновата болест, глиомот и други (Murphy and Levine, 2009). Па оттука, може да се заклучи дека развојот на алтернативни пристапи за испорака на активните компоненти кои ги надминуваат ограничувањата на КМБ со цел да се постигне терапевтска ефикасност е многу посакуван и истражуван (Ross et al., 2018).

Добро е познато дека транспортот на активните компоненти преку КМБ, освен од нејзините карактеристики, во голема мера зависи и од својствата на овие компоненти. Својствата на КМБ се под влијание на составот во крвта и контактните или ослободените фактори од околните мозочни клетки (перицити, астроцити, микроглија и неврони) (Abbott et al., 2010; Naass and Selkoe, 2007). Но, и покрај тоа што нанолипозомите имаат липофилни карактеристики, тие се многу големи и не можат едноставно да дифузираат низ клеточните мембрани или помеѓу клетките на КМБ (Krstic and Knuesel, 2013). Па така, досегашните истражувања сугерираат дека нанолипозомите ја преминуваат КМБ преку неколку активни трансцитозни транспортни системи, како што се: адсорптивната трансцитоза (Adsorptive-Mediated Transcytosis - АМТ), рецептор-посредуваната трансцитоза (Receptor-Mediated Transcytosis - RMT) и трансцитозата посредувана од транспортери (Carrier-Mediated Transcytosis - CMT) (Patching, 2017). Согласно ова, може да се каже дека стратегиите за успешен премин низ КМБ засновани на нанолипозомски системи може да се класифицираат како физиолошки пристап, во смисла на тоа дека липозомската везикула учествува во физиолошките интеракции, а оттука влијае на дистрибуцијата и следствено, на ефикасноста на активните компоненти.

Во последните три декади, наместо користење на конвенционалните нанолипозоми, развиени се нано-везикули чијшто состав и површина се модифицирани (пр. катјонски нанолипозоми, долго-циркулирачки нанолипозоми и специфично насочени нанолипозоми), со цел ефикасно преминување на КМБ со еден од горенаведените транспортни механизми (Ross et al., 2018).

2.3.2. Катјонски нанолипозоми

Нанолипозомите со позитивен површински полнеж имаат способност да посредуваат во електростатските интеракции со негативно наелектризираниот гликокаликс на луминалната КМБ мембрана, со што се иницира АМТ. Покрај тоа, позитивно наелектризираната липидна површина може да ја олесни адсорпцијата на полианјонските молекули, како што се ДНК и РНК, што сега е широко распространет пристап во третманот на различни типови на канцери на мозокот (Confaloni et al., 2016; Mutlu et al., 2011). Експерименталните студии спроведени од Joshi et al. (2015) откриваат дека овие формулации значително влијаат на *in vivo* акумулацијата на активните компоненти во мозокот, којашто се зголемува од 3 до 15 пати во споредба со ањонските и неутралните нанолипозоми. Во однос на формулациските аспекти, може да се заклучи дека моларната фракција на катјонските липиди и големината на нано-везикулите имаат суштинско значење во успешноста на енкапсулацијата и испораката на активните компоненти до мозокот. Меѓутоа, мора да се нагласи дека оптималната моларна фракција на липидите во катјонските нанолипозоми може да варира при различни патофизиолошки состојби и различни енкапсулирани активни компоненти (Juhairiyah and de Lange, 2021).

Друг сегмент којшто треба да се запази при формулирањето на катјонските нанолипозоми за успешен транспорт низ КМБ е силата на адхезија на нано-везикулата за КМБ, којашто треба да ја надмине хидродинамичката сила што произлегува од церебралниот проток на крв (Hossain et al., 2013). Имено, при побрз проток на крв каде што хемодинамичкиот стрес е висок, се претпочитува помала големина на нанолипозоми. Притоа, во предвид треба да се има дека различните начини на администрација/примена и различните патологии може да ја променат брзината на протокот на крв во мозокот. Па оттука, потребно е да се направи оптимизација на големината на липозомските везикули во согласност со можниот хемодинамиски стрес фактор.

Кога станува збор за начинот на примена на нанолипозомите, литературните податоци сугерираат дека интравенскиот начин (IV) е најчесто користениот и покрај тоа што интраартеријалната инјекција (IA) нуди посупериорни предности и можности. Така на пример, IA испораката го минимизира врзувањето за плазма протеините и неспецифичните интеракции со имуните клетки, а оттука се максимизира интеракцијата со површината на изложеното ткиво. Дополнително, преку IA се избегнува и неспецифичното навлегување на катјонските нанолипозоми во слезината и црниот дроб

(Drummond et al., 2010). Па следствено, со цел да се заобиколи навлегувањето на нанолипозомите во овие ткива при IV администрација, потребно е да се применат други стратегии како што се: модификација на нивната површина со полиетилен гликол (PEG) или прикачување на специфични лиганди.

2.3.3. Долго-циркулирачки нанолипозоми

Досега, многу *in vitro* и *in vivo* истражувања на глобално ниво ја имаат потврдено терапевтската ефикасност на долго-циркулирачките нанолипозоми во третманот на различни патологии на мозокот. Имено, добро е документирано дека по IV администрација/примена, конвенционалните нанолипозоми во биолошките течности се покриени со плазма протеините (на пример, фибриноген, имуноглобулини и протеини на комплементарниот систем), при што околу нив се формира т.н. „протеинска корона“ (ПК). Оваа корона го промовира активирањето на фагоцитниот систем и отстранувањето на нано-везикулите од крвотокот (Palchetti et al., 2016).

Оттука, формулирањето на т.н. „стерно стабилизирани“ нанолипозоми, со PEG или друг полимер за стерна стабилизација што би бил инкорпориран во една од липидните компоненти на липозомската мембрана, претставува еден од корисните пристапи за подобрување на фармакокинетскиот профил и продолжување на времето на циркулација. Имено, PEG молекулите се карактеризираат со висок степен на хидратација што резултира со зголемување на нивниот хидродинамички волумен и овозможува формирање на воден слој околу полимерот. Секоја структура, како во случајов нанолипозомите, ковалентно поврзана за PEG, исто така, ги покажува овие својства, со што се обезбедува зголемена растворливост и намалување на степенот на интеракциите помеѓу нано-носачите со плазма протеините. Последователно, ПЕГ-илираните нанолипозоми се помалку склони кон формирање на ПК, што овозможува драстично зголемување на времето на циркулација, а со тоа и зголемување на нивната плазматска концентрација и воедно, подобрена биодистрибуција во мозочните структури во споредба со другите ткива (на пр., слезинка, бели дробови и црн дроб). Освен тоа, ПЕГ-илацијата може да ја подобри и системската стабилност на нанолипозомите преку спречување на нивната агрегација и аглутинација со еритроцитите. Но и покрај овие формулациски пристапи, литературните податоци укажуваат дека не постои сигурност дека овие системи-носачи ќе бидат успешно транспортирани преку КМБ (Veronese and Mero, 2008).

2.3.4. Нанопозомите за активен таргетирање на мозокот

Како што е наведено во повеќе наврати претходно, употребата на површинско функционализираните нанопозомите со PEG е еден од начините за успешна испорака на активните компоненти до мозокот. Меѓутоа, треба да се земе предвид дека површинско наелектризираните нанопозомски везикули може да стапат во интеракции на неспецифично врзување во целните ткива и истите да подлежат на брз клиренс (Barar et al., 2016), додека пак ПЕГ-илацијата го продолжува само полуживотот на нанопозомите како системи-носачи без подобрување на нивната пенетрација во ткивата (Hattori, 2016). Во оваа насока, конјугирањето на нанопозомите со други функционални лиганди, како што се вектори на пептиди за таргетирање и ендогени молекули и антитела може да ја зголеми ефикасноста на испораката на активните компоненти во мозокот. Имено, лигандите го олеснуваат специфичното поврзување со површинските рецептори и последователниот транспорт низ КМБ. Притоа, афинитетот на лигандот е од суштинско значење за да се избегне лизозомската деградација на нанопозомите (Naqqani et al., 2018). Дополнително, важно е да се нагласи дека кога лигандот е во комбинација со PEG, потребно е да се направи оптимизација на густината на PEG ланците со цел да се направи рамнотежа помеѓу заштитните, стерно стабилизирачки својства на PEG и функционалните карактеристики на лигандот (Han et al., 2015; Hu et al., 2019).

Глутатион: Глутатион (GSH) претставува суштински ендеген трипептид кој е одговорен за интрацелуларната детоксикација на метаболитите. Na^+ зависниот GSH транспортер кој е присутен на луминалната страна на мозочните ендотелни клетки може да го олесни транспортот на GSH до мозокот преку транспорт посредуван од транспортери (Kannan et al., 2000). Литературните податоци сугерираат дека дополнителната конјугација на GSH за површината на нанопозомите ја зголемува достапноста на активните компоненти до мозокот, а механизмот преку кој се одвива транспортот на нано-везикулите вклучува клатрин-посредувана ендоцитоза (Maussang et al., 2016). Битно е да се напомене дека површинската конјугација со GSH не интерферира со механизмот на ослободување на активните компоненти од нанопозомите (Geldenhuys et al., 2015), а придобивките од оваа стратегија веќе се применуваат во неколку модели на болести, како што се ракот на мозокот (Gaillard et al., 2014), АБ (Rotman et al., 2015) и мултиплекс склерозата (Gaillard et al., 2012).

Глукоза: На сличен начин како и GSH и глукозата подлежи на олеснет премин низ КМБ, преку ендоцитоза посредувана со транспортери (GLUT). Изразената

транспортна активност на GLUT во КМБ, особено на GLUT-1 е далеку повисока во споредба со другите транспортери за хранливи материи, бидејќи мозокот има голема побарувачка на глукоза како основен извор на енергија. Оттука, инкорпорирањето на глукоза на површината на нанолипозомите, односно на PEG ланците, може да ја подобри испораката на нано-везикулите низ КМБ (Patching, 2017). Притоа, во студии на глумци, докажано е дека нанолипозомите кај кои глукозата е прикачена за PEG ланците со помала молекулска маса се карактеризираат со послаба пенетрација во мозокот, бидејќи глукозата не може ефективно да стапи во интеракција со транспортерот експресиран на површината на КМБ. Па така, колку што е поголем бројот на изложени остатоци од глукоза на површината на нанолипозомите, толку е посилен афинитетот кон GLUT-1 (Qu et al., 2018). Од друга страна пак, кога PEG ланците се подолги, истите се многу флексибилни и се преклопуваат, со што повторно се компромитира способноста за преминување низ КМБ. Оттука, може да се заклучи дека нанолипозомските системи кои во својот состав содржат PEG со средна молекулска маса се веројатно најефективниот формулациски дизајн за искористување на глукозата во подобрување на транспортот низ КМБ. Дополнително, GLUT-1 посредува и во транспортот на деривати на витамин Ц, при што формулацијата на нанолипозоми со лиганди за двојно таргетирање, односно глукозиди и витамин Ц, претставува уште една опција за подобрување на испораката на активните компоненти до мозокот. Со оглед на тоа што витаминот Ц е супстрат и за друг носач присутен на површината на ендотелните клетки на мозокот (SCVT2), конјугацијата со истиот дополнително може да ја подобри испораката низ КМБ користејќи ги овие два различни транспортери (Peng et al., 2018).

Трансферин: Во последните декади, нанолипозомите насочени кон рецепторот за трансферин (TfR) се најмногу истражувани поради изобилството од експресирани TfR на ендотелните клетки на КМБ (Rip et al., 2014). Оваа локализација најверојатно се должи на суштинската улога на трансферинот (Tf), како гликопротеин кој го врзува железото и на тој начин го контролира нивото на слободно железо и го регулира оксидативниот стрес во мозокот и во другите ткива. Постојат бројни *in vitro* и *in vivo* студии што го потврдуваат успешното пенетрирање на нанолипозомите лигандирани со Tf низ КМБ и оттука, последователната зголемена биорасположливост на енкапсулираните активни компоненти во мозочните ткива. Сепак, TfR-посредуваната ендцитоза на нано-везикулите е ограничена поради ендогениот Tf, кој се натпреварува за врзувачките места на TfR (Chen et al., 2014). Овој проблем делумно може да се реши со лигандирање со молекули кои се врзуваат со повисок афинитет за TfR во однос на Tf,

со што се избегнува оваа конкуренција. Така на пример, конјугацијата со TfR-таргетирачкиот пептид, HAIYPRH (T7) или пак со антителиа за рецепторот на трансферин (како што се OX26 и MYBE/4C1) се сметаат за ефикасни стратегии за олеснета интеракција помеѓу нано-везикулите и КМБ. Истата резултира со истакната акумулација во мозочните микросадови и можност за нивно поголемо навлегување во невроните (Gregori et al., 2017).

Лактоферин: Земајќи го предвид фактот дека и рецепторите на лактоферин (LfR), се исто така силно експресирани на луминалната површина на КМБ, современите истражувања се сè повеќе насочени кон дизајнирање на нано-везикули функционализирани со Lf, со цел да се зголеми нивниот транспорт преку овој тип на рецептор-посредувана ендоцитоза. Притоа, овие везикуларни системи имаат потенцијал да бидат особено ефикасни во таргетирањето на мозокот кај пациентите кои страдаат од АБ, бидејќи високата експресија на LfR на микросадовите и невроните е една од патофизиолошките карактеристики на оваа болест (Chen et al., 2010).

АроЕ гликопротеин: Од останатите рецептори кон кои што се насочени истражувањата е и рецепторот за АроЕ гликопротеинот што е одговорен за транспортот и испораката на холестеролот и другите липиди од крвната плазма до ЦНС. Овој рецептор содржи домен за врзување што го олеснува транспортот низ КМБ, при што нанолипозомските формулации што како лиганд ја имаат пептидната секвенца од врзувачкиот домен (mАроЕ) се карактеризираат со олеснета *in vitro* пенетрацијата низ КМБ (Re et al., 2011).

Клеточно-пенетрирачки пептиди: Употребата на клеточно-пенетрирачките пептиди (Cell-Penetrating Peptides - CPP) е исто така идентификувана како еден од начините за активно таргетирање на мозочните ткива и тоа како резултат на нивната способност за премин низ различни биолошки мембрани во телото, вклучувајќи ја и КМБ (Lindgren et al., 2000). Овие пептиди се врзуваат на нетоксичен начин и независно од мембранските рецептори и енергијата, со што се намалуваат ограничувањата од аспект на заситеност на рецепторите и транспортерите. Дејството на CPP се должи на позитивно наелектризираните аминокиселини што стапуваат во интеракција со негативно наелектризираните мембрани на мозокот. Па така, аргининот и во помала мера лизинот се особено ефикасни, бидејќи формираат водородни врски со негативно наелектризираните фосфати, што понатаму резултира со поефикасна интернализација. Притоа, треба да се напомене дека начинот на транспорт и механизмите на интернализација во кои посредуваат CPP (на пр. неспецифична ендоцитоза (TAT, VT5,

Vac7), ендоцитоза (пенетратин, транспортан, ARF), формација на пори (per-1, per-7, MPG), кавеолин-зависна ендоцитоза (p28), енергетски-независни процеси (C105Y, PFVYL1), микропиноцитоза (BPrPr) и други)) генерално зависат од својствата на овие пептиди (Ross et al., 2018).

Други стратегии: Понатаму, RVG29 пептидот конјугиран со нанолипозомската површина исто така покажува висока ефикасност на пермеабилност, зголемено навлегување во мозокот на глувци и последователно, поефикасен третман на Паркинсонова болест како резултат на зголемената интеракција со никотинските ацетилхолински рецептори. Резултатите укажуваат дека на овој начин е олеснет процесот на интернализацијата преку трансцитоза (Qu et al., 2018).

Сличен пристап за активно таргетирање на мозокот е и површинската функционализацијата со пептидот D8 (Guan et al., 2019), додека пак една од поновите стратегии е и феноменот наречен „Тројански коњ“. Имено, имуноцитите, особено моноцитите, можат да служат како носачи за енкапсулирани активни компоненти при нивниот премин низ КМБ. Па така, со оглед на тоа што негативно наелетризираните нанолипозоми покажуваат силен афинитет за врзување со моноцитите, овој пристап се покажал како ефикасна алтернатива за испорака на активни компоненти во мозокот (Qin et al., 2014).

2.4. Алцхајмерова болест – основни патофизиолошки карактеристики

Во најновите извештаи издадени од страна на Светската здравствена организација (СЗО), наведено е дека во 2019 година околу 50 милиони луѓе ширум светот страдаат од деменција, при што 10 милиони нови случаи се појавуваат секоја година. Притоа, 60-70% од овие случаи припаѓаат на АБ, како најраспространетата форма на деменција. Со оглед на тоа што досега не постојат ефикасни третмани за истата, многу е веројатно дека во иднина овие бројки ќе се зголемат на многу критични нивоа поради продолжувањето на животниот век на популацијата. Па така, се проценува дека до 2050 година, бројката на пациенти заболени од АБ ќе изнесува 115 милиони (WHO, 2019). Истовремено, најголема стапка на раст е забележана кај постарата популација (над 65 години), додека пак демографски, АБ е најзастапена во Кина, Индија и Јужна Азија (www.alz.co.uk).

АБ е едно од најчестите невродегенеративни заболувања кое што доведува до ментален, бихевиорален и функционален пад, како и до намалена способност за учење. И покрај тоа што досега нема информации за точниот механизам на настанување и развој на болеста, појавата на АБ се поврзува со намалувањето на мозочната маса и со локализирана загуба на невроните, која главно се одвива во хипокампусот и базалниот дел на предниот мозок. Дополнително, во оваа насока, покажано е дека оштетувањето на краткотрајната меморија и когнитивната моќ кај АБ е тесно поврзана со губење на холинергичните неврони во кортексот. Губењето на овие неврони резултира со намалени нивоа на ацетилхолин (ACh), намалена густина на рецепторот на ACh (AChR) и севкупно намалување на холинергичната невротрансмисија. Меѓутоа, постојат многу ограничувања и несакани ефекти поврзани со постоечките инхибитори на ацетил холинестеразите (AChEI), како што се малата стабилност во циркулацијата и слабата способност за премин преку КМБ, како и неспецифичните интеракции и ниската биорасположивост, што пак ја компромитираат нивната употреба (Tenover, 2005).

Две микроскопски промени се карактеристични за оваа болест, односно појава на екстрацелуларни амилоидни плаки составени од аморфни екстрацелуларни депозити на β амилоиден протеин (познат и како $A\beta$ протеин) и формирање на интраневронски неврофибриларни клопчиња што се состојат од филаментите на фосфорилизираните форми на протеин поврзан со микротубулите – tau (Serrano-Pozzo et al., 2011). И двата вида на депозити претставуваат протеински агрегати и се резултат на неправилното сврзување на чистите протеини. Овие промени може да се забележат и кај мозок со сосема нормална функција, но во значително помала мера.

Раното појавување на амилоидните депозити претставува предзнак за развојот на АБ, иако симптомите може да се појават многу години подоцна. Сепак, денес се смета дека клучен момент во патогенезата на АБ е изменетата обработка на амилоидниот протеин од неговиот амилоиден прекурзорен протеин (APP) (Rang and Dale, 2007). Амилоидните депозити се состојат од агрегати на $A\beta$ и содржат 40 или 42 аминокиселински остатоци. Двата протеини формираат амилоидни плаки, со што $A\beta_{42}$ се одликува со поголема тенденција кон агрегирање во споредба со $A\beta_{40}$. Овие пептиди спонтано агрегираат во растворливи олигомери, за подоцна да коасоцираат и да формираат нерастворливи фибрили со бета конформација, односно т.н. сенилни плаки (Kumar et al., 2015). Тие настануваат со протеолитичка разградба на трансмембранскиот протеин APP, кој во нормални услови е застапен во различни видови на клетки, па така и во клетките на ЦНС. Протеазите кои го разградуваат APP се познати под името

секретази. Во нормални услови, α секретазата дејствува на ослободување на големиот екстрацелуларен домен во вид на солубилан APP, додека пак формирањето на A β вклучува разградба со протеолитичко дејствување на β и γ секретазите во две различни места на молекулаата на APP (Rang and Dale, 2007).

Неизвесен е точниот механизам со кој акумулирањето на A β предизвикува невродегенерација, но во најновите студии е докажано дека A β 42 олигомерите индуцираат оксидативно оштетување и промовираат tau фосфорилација, што резултира со токсичност во синапсите и митохондриите (Maina et al., 2018). Од друга страна пак, A β 42 сенилните плаки, што се појавуваат во доцниот стадиум од болеста ги активираат микроглијалните клетки со што се индуцира производство на проинфламаторни цитокини како што се IL-1b, TNF- α и IFN-g, што ја придвижуваат каскадата за понатамошна продукција на A β 42.

Друг важен биохемиски фактор е протеинот tau. Тој ги сочинува неврофибриларните клопчиња. Во нормални услови, истиот наоѓа во состав на интрацелуларните микротубули.

Кај АБ, овој протеин абнормално се фосфорилира и се таложи интрацелуларно во облик на парни хеликоидни спирали со што доаѓа до нарушување на микротубулите, а со тоа и до нарушување на брзиот аксонски транспорт. Постојат докази дека мутациите на APP генот (генот за протеинот пресенилин) кој учествува во градбата на γ секретазниот комплекс, како и на генот за протеинот кој учествува во липидниот транспорт (апопротеин Е4 (АроЕ4)), го забрзуваат процесот на агрегација на A β протеините (Perl 2010; Rang and Dale, 2007) .

Разбирањето на патофизиологијата на АБ постојано се менува. На пример, акумулацијата и продукцијата на A β плаките и неврофибриларните tau клопчиња е познат патофизиолошки белег на АБ. Истите го рефлектираат долгорочното оштетување на неврните. A β протеинот и фосфорилираниот tau протеин се молекули кои споро се менуваат и се претпоставува дека претставуваат клеточна адаптивна стратегија за справување со оксидативниот стрес.

Дел од истражувањата во ова поле се во насока на подобрување на целокупното преживување на неврните кај пациентите со АБ главно преку инхибирање на фосфорилацијата на p38 и c-Jun N-терминалната киназа (JNK). Истите, се два клучни члена од семејството на митоген активирани протеин кинази (МАРК) што се присутни кај неврните оштетени од акумулација на A β . Оваа киназна каскада е од суштинско значење за разбирање на прогресијата на АБ, бидејќи фосфорилацијата катализирана од

МАРК во мозокот игра важна улога во процесите на апоптоза и целокупното преживување на неврните (Kuo et al., 2017).

Освен гореспоменатите причинители, хроничниот оксидативен стрес, митохондријалната и митотичната дисфункција, хормонската нерамнотежа, инфламацијата, нарушениот метаболизам на калциум, како и бројните генетски фактори, исто така имаат клучна улога во процесот на настанување и прогресирање на АБ (Kumar et al., 2015).

Во групата на лекови што моментално се користат за третман на АБ се инхибиторите на ацетилхолинестераза – донепезил, ривастигмин, галантамин и антагонистите на NMDA – мемантин, при што истите не се насочени кон ниту еден од гореспоменатите механизми. Наместо тоа, тие обезбедуваат само привремен симпатоматски третман преку балансирање на нарушената невротрансмисија и истите се пропратени со многу ограничувања и несакани ефекти. За жал, клиничките испитувања на повеќе од 200 лекови со различни молекуларни цели и механизми на дејствување, до ден денес немаат понудено терапевтски пристап кој целосно ќе го супримира или пак ќе го намали когнитивниот пад кај пациентите со АБ (Poudel and Park, 2022).

2.5. Поврзаност помеѓу АБ и оксидативниот стрес

Патогенезата на неколку невродегенеративни заболувања, вклучувајќи ја и АБ е поврзана со состојбата на оксидативен и нитрозивен стрес, што потекнува од акумулацијата на реактивните видови на кислород (ROS) и производството на реактивни азотни видови (RNS).

Оксидативниот стрес претставува редокс состојба која произлегува од нерамнотежа помеѓу производството и детоксикација на ROS (Polidori et al., 2007). ROS се неизбежни физиолошки нуспроизводи кои во биолошкиот систем делуваат како „меч со две острици“. Тие, во физиолошки концентрации можат да бидат вклучени како сигнални молекули во многу биохемиски процеси, а кога истите се присутни во прекумерно количество можат да предизвикаат многубројни оштетувања на биолошкиот систем. Имено, истите се способни за оксидација на сите поголеми биомолекули, вклучувајќи ги нуклеинските киселини (ДНК, РНК), протеините и липидите.

Мозокот е високо чувствителен на оксидативниот дисбаланс поради неговата голема побарувачка за енергија, високата потрошувачка на кислород, богатото изобилство со лесно пероксидирачки полинезаситени масни киселини, високото ниво на железо што е високо потентен ROS катализатор, како и релативно ниското ниво на антиоксиданси и сродни ензими (Wang et al., 2014).

Од друга страна, оксидативната модификација на протеините често се споменува како потенцијален фактор во прогресијата на АБ, без разлика дали истата е резултат на директен напад на ROS врз протеините или пак реакции на гликозилација, гликоксидација или врзување на производ од липидната пероксидација. Во таа насока, забележано е значително зголемување на нивоата на карбонили на специфичните протеини како што се: креатин киназа, глутамин синтаза и увиквитинин карбокси-терминална хидролаза 1-1, а исто така и на 3-нитротирозин (уште еден производ на оксидативна модификација) што се детектирани во различни региони на мозокот кај пациенти со АБ.

Согласно претходно споменато, главен белег на патологијата на АБ е акумулацијата на агрегати на А β (ран маркер на АБ) и на неврофибриларни клопчиња, сочинети од хиперфосфорилираниот микротубул-асоциран протеин tau. Комплексот Протеазом е главен регулатор на интрацелуларната контрола на квалитетот на протеините и есенцијален протеолитички ензим за обработка на А β и Тау. Неодамнешните студии укажуваат дека при состојба на АБ, протеинската оксидација и прекумерната фосфорилација може да ја ограничат протеазомалната обработка на А β и Тау и следствено, да доведат до таложeње на овие протеини (Bonet-Costa et al., 2016).

Бројни студии покажале и покачени нивоа на оксидативно оштетена ДНК во разни регии од мозокот кај лицата кои страдаат од АБ. Имено, оксидативното оштетување може да предизвика кинење на двојната верига на ДНК, ДНК/ДНК или ДНК/протеин вкрстеното поврзување, како и модификација на базите на ДНК веригата (Good et al., 1996).

Низа на литературни податоци укажуваат на фактот дека липидната пероксидација е исто така промовирана кај лицата со АБ. Липидната пероксидација се однесува на процесот во кој ROS ги напаѓаат липидите што влегуваат во составот на клеточните мембрани на клетките, при што од нив „крадат“ еден електрон. Така, преку механизам на верижна реакција постојано се генерираат липидни реактивни радикали, процес што резултира со терминално оштетување на клетката. Досега, најобемните производи за пероксидацијата на липидите што се изучувани кај лицата со АБ се

реактивните алдехиди, вклучувајќи ги 4-хидроксинонален, малондиалдехид (MDA) и 2-пропенален (акролеин), како и хемиски и метаболитички стабилни изопростаноиди (F2-изопростони и F4-невропростони) (Lowell et al., 1995).

Митохондриите се главниот извор на оксидативен стрес во човековото тело, бидејќи за време на непречениот процес на пренос на електрони доаѓа до постојано производство на супероксиден ањон кој и покрај присуството на ефикасен митохондријален/клеточен антиоксидативен систем е одговорен за производството на 90% од ендогените ROS. Се претпоставува дека дисфункционалните митохондрии се помалку ефикасни производители на АТП, но се поефикасни производители на ROS, што би можело да претставува главен извор на оксидативна нерамнотежа забележана кај пациентите со АБ (Wang et al., 2014). Всушност, митохондријалната дисфункција е истакната и како рана карактеристика на АБ, при што речиси сите аспекти на митохондријалната функција се нарушени кај овие пациенти (Wang et al., 2009).

Митохондриите се органели кои подлежат на континуиран процес на фузија, регулирана од страна на протеините Mfn1, Mfn2 и OPA1 и фисија, која што пак е релулирана од страна на DLP1, Mff и Fis1. Овие два процеси влијаат врз бројот, морфологијата и дистрибуцијата на овие органели. Фузијата и фисијата на митохондриите се исто така чувствителни на оксидативната нерамнотежа. Кај АБ се забележани сигнификантни разлики во експресијата на скоро сите претходно споменати протеини. Најновите истражувања покажуваат дека присуството на ендогени и егзогени ROS може директно да го нарушат митохондријалниот физионо-фузиски баланс, да предизвикаат митохондријална фрагментација и понатаму да предизвикаат последователни митохондријална дисфункција, вклучувајќи хиперпродукција на ROS. На овој начин се формира еден т.н. „маѓепсан“ циклус кој го засилува оксидативниот стрес (Сл. 2). Дел од алтерациите кои ги зафаќаат овие органели се редуциран енергетски метаболизам, намалена неврална експресија на нуклеарните гени кои се вклучени во кодирање на субединиците на митохондријалните ензими што учествуваат во ланецот на електронски транспорт и нивна намалена функција, активација на каспазите, покачени нивоа на спорадични мутации во митохондријалната ДНК, како и нарушување на хомеостазата на калциумот, поврзана со дисфункција и морфолошки промени на митохондријалниот ендоплазматски ретикулум (Wang et al., 2014).



Сл. 2. Оксидативен стрес како причина за настанување и развој на патофизиолошките настани кај АБ.

Врз основа на претходно наведеното може да се заклучи дека оксидативниот стрес учествува во развојот на АБ преку промоција на таложење на А β протеинот, тау хиперфосфорилација и последователно губење на синапсите и неврните. Односот меѓу оксидативниот стрес и АБ сугерира дека оксидативниот стрес е суштински дел од патолошкиот процес, па следствено на тоа антиоксидансите може да бидат корисни за третманот со АБ.

2.6. Нанолипозоми наменети за третман на Алцхајмерова болест

Иако низ литературата се сретнуваат голем број на истражувања за потенцијалната примена на нанолипозомите и ПЕГ-илираните формулации за насочено делување во мозокот, кога станува збор за третманот на АБ, податоците се релативно ограничени (Simonoska-Crcarevska et al., 2016). Многу од формулациските и површинските модификации на нанолипозомите кои беа дискутирани погоре, веројатно би биле поефикасни како дел од еден мултифункционален липозомски систем. Ова би вклучувало конјугација на една или повеќе молекули на површината на нано-везикулите со цел подобрување на нивниот транспорт низ КМБ, а дополнително и за специфичен таргетирање кон некоја од патофизиолошките структури/процеси изразени при АБ како на пр. таргетирање на А β , тау протеинот, ацетилхолинестеразите итн. (Ross et al., 2018).

2.6.1. Нанопозомски формулации за таргетирање на структурите на А β

Како што беше наведено претходно, процесите на акумулација и агрегација на А β во мозокот играат важна улога и тоа директно или индиректно во индукцијата на синаптичкото оштетување и дефицитот на меморијата при АБ (Hardy and Selkoe, 2002). Ефективните терапевтски молекули можат да имаат влијание врз спречување на хиперпродукцијата или пак врз неефикасниот клиренс на овие амилоидни плаки, но истите, сами по себе, имаат ограничен транспорт низ КМБ. Затоа, нивното инкорпорирање во нано-везикуларни системи од типот на нанопозоми може да помогне да се надмине овој проблем, истовремено овозможувајќи и ефикасно таргетирање на А β .

Нанопозоми функционализирани со mАpoE и фосфатидна киселина: Еден од потенцијалните формулациски пристапи претставуваат мултифункционалните нанопозоми составени од сфингомиелин (сфинголипид присутен во најголем удел во надворешните делови од клеточните мембрани) и холестерол. Овие носачи дополнително биле би-функционализирани со mАpoE (50-60% од површината) со цел да се подобри интеракцијата со луминалните структури на КМБ, и со фосфатидната киселина (РА), што претставува лиганд со висок афинитет за А β (Balducci et al., 2014). Резултатите од овие студии укажале на потенцијална ефикасност на овие системи при деагрегацијата на А β *in vitro* и *in vivo* и следствено, забавување на процесот на невродегенерација, споредено со нанопозомски везикули што се функционализирани само со mАpoE или само со РА. Овој синергистички ефект најверојатно се должи на истовремената интеракција на негативно наелектризираната фосфатна група со позитивно наелектризираните аминокиселински остатоци на А β и на позитивно наелектризираните аминокиселини на mАpoE со негативно наелектризираните региони на А β (Bana et al., 2014). И покрај тоа што овие нано-везикули се карактеризираат со среден дијаметар од околу 120 nm, истите резултирале со низок процент на навлегување во мозокот што најверојатно се должи на нивниот негативен Зета потенцијал (-15 mV). Имено, откриено е дека А β олигомерите се транспортираат надвор од мозокот, преку КМБ. Па така, од страна на истражувачката група на Mancini et al. (2016) предложена е стратегија што резултирала со таргетирање на циркулирачкиот А β и петкратно зголемување на неговиот одлив во периферната циркулација од страна на mАpoE-РА нанопозомите, без истите да навлезат во мозочните ткива (Mancini et al., 2016).

Нанопозоми со енкапсулиран pАpoE2: Литературните податоци покажуваат на јасни експериментални докази за улогата на аполипопротеинот Е (АpoE), како клучен

фактор поврзан со нивото на А β и неговата акумулација при прогресијата на АБ (Liu et al., 2013). На пример, дизајнирани се нанолипозоми со енкапсулиран плазмид на ApoE2 (pApoE2), при што пред енкапсулацијата во формулацијата бил додаден цитозан со цел да се олесни кондензацијата на ДНК и да се спречи ендолизозомалната деградација (Dos Santos Rodrigues et al., 2020). Површината на овие нано-везикули била функционализирана со маноза, како би се таргетирал GLUT1 транспортерот на КМБ, а подобра пенетрација била постигната со дополнително лигандирање со пенетратин. Освен поефикасен транспорт на ApoE2 плазмидот низ КМБ, овие двојно функционализирани нанолипозомски системи овозможиле и инхибиција на дигестијата од страна на ендонуклеазите (Agora et al., 2021).

Нанолипозоми функционализирани со кардиолипид или со PA: Слично на погорниот пристап, неколку истражувачки групи покажале дека нанолипозомите во чијшто липиден двослој влегува сфингомиелинот и холестеролот и што се дополнително лигандирани со PA или со кардиолипид (CL), ги намалуваат нивоата на А β кај трансгенски глувци APP/PS1. Резултатите укажале на фактот дека функционализираните везикули со PA и CL сèуште ја одржуваат способноста да ја преминуваат КМБ, благодарение на нивната големина од 100 nm, а од друга страна и да се врзат за А β 42 (Balducci et al., 2014). Дополнително, бил испитуван и ефектот при интраперитонеална администрација на овие формулации каде било забележано намалување на количеството на А β во плазмата, со истовремен опаѓачки тренд и на нивото на А β во мозокот. Овој пат на примена дополнително ги модулирал активностите на tau фосфорилацијата и на гликоген синтаза киназа 3 во мозокот, што сугерира дека таргетирањето на циркулирачкиот А β може да претставува терапевтски релевантно решение (Ordóñez-Gutiérrez et al., 2015).

Нанолипозоми функционализирани со пептидни инхибитори: Во литературата се сретнуваат податоци дека малите пептиди, именувани како RI-OR2-TAT, се способни да ја инхибираат агрегацијата на А β во олигомери и фибрили и на тој начин ги блокираат токсичните ефекти на А β врз култивираниите клетки. Но сепак, овие пептиди се чувствителни на протеолиза и не може да ја преминат КМБ.

Од овие причини, RI-OR2-TAT бил конјугиран на површината на нанолипозоми (составени сфингомиелин и холестерол) преку негово ковалентно поврзување со ПЕГ-илираниот липид што влегува во составот на везикулите (Gregori et al., 2017). Оваа формулација резултирала со статистички значајна инхибиција на А β агрегацијата за околу 50%, што најверојатно се должи на фактот дека на нанолипозомската површина

може да се прикачат повеќе копии на RI-OR2-TAT пептидот и на тој начин се овозможува истовремена интеракција на поголем број на инхибиторни пептиди со било која структура на А β . Покрај тоа што ТАТ фрагментот ја подобрува пенетрацијата низ КМБ кај глумци, овие нано-везикули се карактеризирале со дијаметар од 130-140 nm, што е оптимална големина за нивно ефикасно транспортирање низ мозочниот екстрацелуларен простор. Како што е наведено во истражувањето, недостаток е што поголемиот дел од аплицираната доза била акумулирана во периферните ткива, како што се белите дробови, црниот дроб и слезината, најверојатно поради клиренсот на нанолипозомите преку ретикулоендотелниот систем (Eisenberg and Jucker, 2012).

Резултатите од испитувањата на нанолипозоми конјугирани со пептидот Н102 укажале на подобрување на меморијата и учењето кај модели на глумчиња по интраназална администрација, при што гореспоменатиот пептид имал двојна функција, односно, таргетирање на КМБ и дополнително, таргетирање на А β 42 (Davtyan et al., 2014; Zheng et al., 2015).

Нанолипозоми функционализирани со анти-А β моноклонални антитела: Помеѓу широкиот спектар на стратегии за третман и превенција на АБ во моментот, се испитува и можноста од пасивна имунизација со користење на анти-А β моноклонални антитела (МА) (Panza et al., 2019). Меѓутоа, едно од главните прашања кога станува збор за употребата на МА е дали по нивното конјугирање со нанолипозомите би се задржал нивниот висок афинитет кон антигените и истите би претставувале оптимална терапевтска стратегија (Ordóñez-Gutiérrez and Wandosell, 2020). Во направената компаративна анализа од страна на Ordóñez-Gutiérrez и Wandosell (2020) е потврдено дека нанолипозомите со големина од 70 nm (дипалмитоил фосфатидилхолин / холестерол / mPEG2000-DSPE / MPB-PEG2000-DSPE = 70 / 25 / 4 / 1, m/m) лигандирани со анти-А β МА со ефикасност на конјугација од 50 анти-А β МА/нанолипозом покажуваат задоволително висок афинитет кон А β мономерите и кон фибрилите во зависност од возраста на третираните глумци. Дополнителната површинска модификација на оваа формулација со PEG не покажала значајно намалување на неговиот афинитет кон А β мономерите, потврдувајќи го потенцијалот на овие наносистеми во дијагностика и терапија на АБ (Markoutsas et al., 2012).

Нанолипозоми функционализирани со куркумин: Со оглед на тоа што низ литературата се сретнува фактот дека оксидативното оштетување се јавува многу рано во развојот на АБ, употребата на антиоксидансите може да ги заштити неврните од токсичноста на А β . Во оваа насока, спроведени се бројни клинички студии кои

вклучуваат антиоксиданси за третман на АБ. Иако најголемиот број од овие експерименти се покажале како неуспешни, употребата на куркумин покажал одреден потенцијал поради неговите анти-амилоидни ефекти (Lim et al., 2001). Имено, резултатите од истражувањата укажуваат дека овој фенолен фитохемиски антиоксиданс ги таргетира и се врзува за А β 42 плаките *in vitro* и *in vivo*, ја спречува нивната полимеризација, како и нивното формирање на директен начин (Kim et al., 2001; Yang et al., 2005), додека пак индиректно го подобрува клиренсот на А β (Begum et al., 2008; Zhang et al., 2006). Освен тоа, тој учествува во деагрегација на претходно формираните плаки (Yanagisawa et al., 2011). Меѓутоа, куркуминот има релативно слаба системска биорасположивост, па оттука, ПЕГ-илираните нанолипозомски носачи со конјугиран куркумин би биле одлични кандидати за испорака на истиот во мозочните ткива. Во тек на прелиминарните студии спроведени од Mourtas et al. (2014), било покажано дека со зголемување на моларниот процент на куркумин (во опсег од 1 до 10%), врзан за површината на везикулите во чијшто состав влегуваат дипалмитоилфосфатидилхолин, дипалмитоилфосфатидилглицерол, холестерол и ПЕГ-илиран липид, доаѓа до пораст на нивната големина од 135 на 207,2 nm што би претставувало ограничувачки фактор за преминот на овие носачи низ КМБ. Па оттука, развојот на формулацијата се одвивал во насока на нивно дополнително функционализирање со анти-трансферински МА за посредување на транспортот преку КМБ, при што истите покажале исклучително висок афинитет кон амилоидните плаки и придонеле за превенција од нивно формирање (Mourtas et al., 2014).

2.6.2. Нанолипозомски формулации за таргетирање на tau протеинот

Нанолипозоми функционализираани со антитела кон tau протеинот: Имајќи предвид дека tau неврофибриларните клопчиња се едни од двата главни патофизиолошки белези на АБ, од исклучителна важност е развивањето на специфични терапии насочени кон tau протеинот. И покрај тоа што патофизиологијата на невродегенерацијата посредувана од овој протеин не е целосно јасна, tau хиперфосфорилацијата, олигомеризацијата и полимеризацијата се предложени како едни од карактеристичните патолошки процеси кои предизвикуваат невродегенерација (Yoshiyama et al., 2013). Па оттука, се наметнува и потребата за формулациски стратегии кои би делувале на овие процеси и тоа главно во насока на нивна превенција (Novak et al., 2018a). Некои од почетните потенцијални терапевтски пристапи вклучуваат употреба на антитела кои го блокираат развојот и ширењето на tau патологијата преку

микроглијална фагоцитоза на комплексот антитело-tau протеин, како и зголемување на клиренсот на tau протеинот во неврните по негово ендозомалното навлегување (Sigurdsson, 2018, 2016).

Во изминатите години стратегијата базирана на tau имуноterapiја се наоѓа во фаза II од клиничките испитувања, при што оваа tau пептидна вакцина покажала значително намалување на нивоата на хипер-фосфорилирани tau протеини и неврофибрили за околу 95% (Kontseikova et al., 2014). Понатаму, била формулирана и прилагодена нанолипозомска формулација на вакцина составена од димиристоилфосфатидилхолин, димиристоилфосфатидилглицерол, холестерол и монофосфорил липид А, користејќи синтетски тетрапалмитоил фосфоептид како лиганд што го имитира фосфорниот-епитоп на tau протеинот. Формулираната нанолипозомска вакцина би требало да ги подобрува симптомите на АБ и моментално е во Фаза I од клиничките испитувања (Theunis et al., 2013).

2.6.3. Нанолипозомски формулации за инхибиција на ацетилхолинестерази

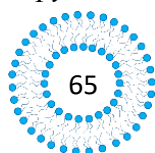
Нанолипозоми со енкапсулиран ривастигмин: Земајќи ги предвид веќе дискутираните ограничувања и проблеми на достапните терапии кои вклучуваат употреба на постоечките инхибитори на ацетил холинестеразите (AChEI) како еден од механизмите за справување со АБ, научните студии се насочени кон потенцијална употреба на мултифункционализирани нанолипозоми со енкапсулирани AChEI за постигнување на успешен третман на АБ. Досега направени се напори за формулирање на ПЕГ-илирани нанолипозоми со енкапсулиран ривастигмин за интраназална примена, кои се покажале ефикасни во зголемувањето на концентрацијата на овој лек во плазмата и мозокот во споредба со самиот ривастигмин (Kong et al., 2020). Исто така, потврдено е дека кога ривастигминот е енкапсулиран во нано-везикули во чијшто состав влегуваат фосфатидилхолин од јајца, холестерол и DSPE-PEG2000 функционализирани со ПЕГ-илиран дериват на полиаргинин, неговиот *in vitro* терапевтски ефект е подобрен како резултат на интензивирање на процесите на трансцитоза низ КМБ во споредба со истата формулација, но без полиаргинин. Имено, резултатите од овие истражувања покажуваат дека и двете формулации се карактеризираат со средна големина од околу 170 nm, ефикасност на енкапсулација на ривастигминот од 30% и продолжено ослободување на истиот во текот на времето што оди во прилог на постигнување на продолжен фармаколошки ефект *in vivo*. Сепак, модификацијата на површината на везикулите со клеточниот-пенетрирачки протеин не покажала значајни промени во Зета потенцијалот

(~ -10 mV), но во *in vivo* студиите спроведени на глувчиња било демонстрирано дека по интраназална примена, концентрацијата на ривастигминот ослободен од функционализираните нанолипозоми во хипокампусот и кортексот била повисока отколку онаа на формулацијата без лиганд, што дополнително ја потврдува улогата на клеточно-пенетрирачкиот пептид во промовирање на апсорпцијата на овие нано-носачи во мозочните ткива.

2.6.4. Нанолипозомски формулации со повеќе терапевтски таргети

Нанолипозоми функционализирани со аглутинин од пченични никулци: Имајќи го предвид фактот дека фосфорилацијата катализирана од MAPK киназите во мозокот игра суштинска улога во процесите на апоптоза и целокупното преживување на невроните, досега се дизајнирани два типа на мултифункционални нанолипозоми, при што во едната од нив е енкапсулиран куркумин, додека пак во другата е инкорпориран фактор на раст на нервите (NGF). Притоа, и двете формулации се карактеризираат со ист фосфолипиден состав кој вклучува соја фосфатидилхолин, 1,2-дипалмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфатохолин, холестерол и DSPE-PEG2000 и истите се површински би-функционализирани со аглутинин од пченични никулци (WGA) и кардиодипин со цел да се подобри нивната испорака низ КМБ. Како што беше и претходно дискутирано за куркуминот, покрај тоа што тој делува како инхибитор на $A\beta$ агрегацијата, во овие студии било покажано дека кога тој е енкапсулиран во овие специфични носачи, ефикасно ја менува експресијата на фосфорилираниот p38 (p-p38) и фосфорилираната c-Jun N-терминалната киназа (p-JNK), додека пак NGF ја промовира активноста на рецепторот на тирозин киназа тип 1 (TrkA), кој е вклучен во забавување на невронската апоптоза (Kuo and Tsao, 2017). Кога станува збор за својствата на нанолипозомите, резултатите од *in vitro* испитувањата покажуваат дека и двете формулации се карактеризираат со големина од 130-145 nm и продолжено ослободување на соодветната енкапсулирана активна компонента во тек на 24 часа. Исто така, направените студии на клеточна линија на КМБ сугерираат дека конјугацијата со WGA резултира со подобрена пермеација и на двете би-функционализирани формулации во однос на соодветните формулации без лиганд, ставајќи акцент и на протективното дејство на WGA врз интегритетот на клетките на КМБ. Па оттука, може да се заклучи дека предложените носачи би можеле да претставуваат соодветни формулациски решенија за ефикасна испорака на споменатите активни компоненти во мозокот.

2.6.5. Нанолипозомски формулации со други механизми на делување



Низ литературата се сретнуваат и други формулациски решенија на нанолипозоми за насочување во мозокот. На пример, развиени се нанолипозоми со кверцетин, кој ја намалува дегенерацијата на холинергичните неврони преку зголемување на активноста на супероксид дисмутазата, ензим вклучен во антиоксидативните клеточни механизми (Phachonpai et al., 2010).

Резултатите од голем број истражувања покажуваат дека лигандирањето на нанолипозомската површина со глутатион е исто така погодно за специфична испорака на антитела и други протеини насочени кон А β (Henriques and Castanho, 2008).

Исто така, нанолипозомски формулации со енкапсулирани кумарински деривати кои биле дополнително функционирани со СХС хемокински рецептор 4 (CXCR4), демонстрирале успешно навлегување и невропротективен ефект кај APP-SH-SY5Y клеточната линија, а освен тоа била забележана и поголема дистрибуција на кумаринскиот аналог во мозокот заедно со ублажување на патологиите поврзани со А β (Ni et al., 2021).

2.7. *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae)

Растенијата отсекогаш биле едни од најлесно достапните и најискористените ресурси за лекување на болести од страна на луѓето. Согласно СЗО, скоро 80% од глобалната популација се потпира на традиционалната медицина за потребите на примарната здравствена заштита, но сепак потенцијалот на растенијата како извор на нови лековити соединенија останува главно неистражен и покрај многуте научни студии и докази (Morteza-Semnani et al., 2016; Refaat et al., 2013).

Интересот за хербалните лекови како подобрувачи на когнитивните способности континуирано се зголемува и тоа како резултат на докажаните својства на неколку ветувачки соединенија што влегуваат во составот на растенијата како што се: куркумата, *Ginkgo biloba*, *Vacopa monnieri*, *Hypericum perforatum*, *Salvia officinalis*, *Lycopodium serratum* и Ginseng (Heo et al., 2008; Mazza et al., 2006). Овие растенија и нивните хербални преработки се ветувачки кандидати како активни компоненти во подобрување на меморијата, особено во третманот на А β , и тоа не само поради нивната невропротективна моќ, туку и поради бројните докажани механизми на дејствување што се однесуваат на основната патофизиологија на болеста (Hussain et al., 2022).

Како што беше наведено и претходно, во последните две децении оксидативниот стрес и воспалението се посочени како водечки причини за стареење на мозокот. Па така,

употребата на антиоксидативните и антиинфламаторните соединенија, како што се полифенолите, се препорачуваат како корисна стратегија за превенција на стареење на мозокот и појава на неколку невродегенеративни болести, меѓу кои и АБ. Во многу студии е покажано дека бенефитот од невропротективната моќ од овие соединенија, освен преку нивната антиоксидативна и антиинфламаторна активност се должи и на нивната улога во модулација на процесите како што се: епигенетските фактори, амилоидната депозиција, холинестеразната инхибиција, автофагијата, невротропните фактори и многу други (Annunziata et al., 2021).

Рузмариот - *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae), претставува ароматично растение што вообичаено се сретнува во медитеранскиот регион. Тоа е најкултивираната кулинарска билка во светот (Hussain et al., 2022).

Неговиот богат хемиски состав кој вклучува: фенолни киселини (розмаринска киселина, хлорогенска киселина), фенолни дитерпени (карносолна киселина и карносол), пентациклични тритерпени (урсолна киселина, олеанолна киселина, бетулинска киселина), флавоноиди (деривати на апигенин и на лутеолин) и етерични масла, придонесува за неговите бројни дејства потврдени во многу *in vitro* и *in vivo* студии од кои најизразени се антиоксидативните, антиинфламаторните, антимикробните и имуномодулаторните ефекти (Dabaghzadeh et al., 2022; Nematollahi et al., 2018; Perry et al., 2018).

Корисните ефекти од секојдневното консумирање на производи и преработки од рузмарин во доза од 100 mg/kg со цел подобрување на краткотрајната меморија, конфузијата, проблеми со размислувањето и расудувањето се потврдени од страна на многу клинички испитувања кои вклучуваат здрави волонтери и пациенти со АБ на различни возрасти (Hanson, 2016; Hussain et al., 2022). Но и покрај сè, главниот специфичен механизам преку кој рузмариот ги остварува овие дејства останува нејасен, иако се смета дека најверојатно се должи на синергистичкиот ефект на широката палета на компоненти што влегуваат во неговиот состав (Dabaghzadeh et al., 2022).

Меѓу изолираните фенолни соединенија во екстрактот од рузмарин (RE), утврдено е дека карнозолната и розмаринската киселина (RA) се карактеризираат со најширок спектар на фармаколошки ефекти и тоа како резултат на нивната способност да дејствуваат на повеќе молекуларни цели (Alagawany et al., 2017; Borrás-Linares et al., 2014). Имено, покрај антиоксидативните, RA покажува уште неколку други важни биолошки карактеристики, вклучувајќи антиинфламаторни, антивирусни, антибактериски, антидепресивни, антиканцерогени, антимулагени и хеморецептивни

својства (Nunes et al., 2017). Нејзината ефикасност во третманот на АБ е во насока на спречување на молекуларните пореметувања кои придонесуваат во прогресијата на АБ како што се: олигомеризација и формирање на Аβ плаки преку диференцијално врзување за Аβ1-42 олигомерите, Аβ-олигомер индуцирана синаптичка токсичност и невротоксичност, оксидативна дестабилизација предизвикана од Аβ фибрилите (пероксидација на липиди, фрагментација на ДНК, активација на каспаза-3) и хиперфосфорилација на tau протеини (Mirza and Zahid, 2022).

Во моментот, предложениот механизам за инхибиција на Аβ агрегацијата од страна на RA се должи на о-хинонската структура која специфично се врзува за Аβ, спречувајќи го понатамошното врзување на Аβ со олигомерот (Ono et al., 2004). Имено, покажано е дека о-хинонот ковалентно се врзува за остатоците од нуклеофилните аминокиселини или пак формираат Шифови бази и на тој начин ја инхибираат екстензијата на Аβ фибрилите (Sato et al., 2013). Исто така, утврдено е дека реакцијата на издолжување на фибрилите е потисната преку дестабилизација на Аβ терминалниот дел при што настанува и негова забрзана деполимеризација. Дополнително, во неколку експериментални студии е покажано зголемување на нивоата на допамин при употреба на RA и оттука индиректно подобрување на симптомите на АБ. Ова најверојатно се должи на тоа што оксидацијата на катехолната група на допаминот резултира со добивање на о-хинон, кој понатаму се врзува за Аβ мономерот и со тоа се оневозможува негова полимеризација (Hase et al., 2019).

Многу литературни податоци сведочат за поврзаноста помеѓу формирањето на Аβ плаките и нивната интеракција со метални јони, со оглед на тоа што Аβ е редокс-активен пептид кој го намалува нивото на преодните метали како Cu^{2+} и Fe^{3+} и доведува до генерирање на ROS. Понатаму, полимеризацијата и токсичноста на Аβ се тесно поврзани со металните јони и ROS. Документирано е дека благодарение на нејзините хелаторски својства, RA е ефикасна против невротоксичноста индуцирана од Cu^{2+} , интерферирајќи на интеракцијата помеѓу Аβ и Cu^{2+} преку формирање на оригинален троен комплекс помеѓу RA, Аβ и Cu^{2+} (Kola et al., 2020). Освен тоа, RA го спречува и создавањето на липидните хидропероксиди предизвикани од Аβ. Дополнително, бројни *in vitro* и *in vivo* студии сведочат за антиапоптоичкиот ефект на ова соединение што финално резултира со ублажување на воспалението и невродегенерацијата поврзана со оксидативниот стрес (Lv et al., 2020).

In vivo истражувањата спроведени на глувци, укажуваат дека освен RA, исто така и урсолната киселина учествува во спечување на фосфорилацијата и последователната

фибрилизација и формацијата на β планарната структура во tau протеинот, што дополнително имплицира на можноста од нивното синергистичко дејствување и значаен терапевтски потенцијал против АБ (Cornejo et al., 2017).

Кога станува збор за овие две соединенија, истите значително ги подобруваат когнитивните дефицити, како и синаптичката дисрегулација поврзаната со невродегенерација во многу *in silico* модели на АБ (Mirza et al., 2021). Дополнително, резултатите од неколку спроведени *in vivo* студии сугерираат и на нивниот невротропен ефект врз обновувањето на меморијата поврзана со просторот и препознавањето на предмети (Tang et al., 2017), како и на нивните анксиолитички и антидепресивни ефекти. Сите овие ефекти позитивно влијале на социјалните интеракции и однесувањето на третираните глупчиња (Colla et al., 2015; Lataliza et al., 2021; Ramos-Hryb et al., 2019).

Имајќи ги предвид овие резултати, дополнително била направена и *in silico* анализа со цел да се утврдат врзувачките интеракции на овие компоненти со маркерите за неврогенеза, Ki-67 и DCX, во споредба со донепезил. Резултатите покажале дека и урсолната киселина и RA учествуваат во нормализирање на нивоата на експресија на mRNA на Ki-67, DCX и NeuN, со тоа што урсолната киселина покажала значително поголемо обновување на нивоата на експресија на овие маркери во споредба со донепезил (Mirza et al., 2021), што укажува на нејзиниот терапевтски потенцијал против невродегенерацијата поврзана со АБ.

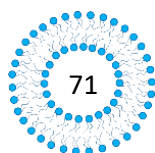
Покрај бројните дејства на RA и урсолната киселина, регистрирани се и бројни позитивни ефекти кои потекнуваат од групата на дитерпени присутни во RE (Farg et al., 2016). Имено, слично како и претходно споменатите, и овие соединенија своите антиоксидативни својства ги остваруваат преку „чистење“ на ROS благодарение на загубата на еден водороден атом од нивните фенолни хидроксилни групи што води до формирање на хинонски деривати. Дополнително, својот невропротективен ефект го остваруваат и со регулација на транскрипциските патишта поврзани со експресијата на антиоксидативните и антиинфламаторните ензими преку активација на Keap1/Nrf2 патеката. Така на пример, демонстрирано е дека карнозолот и карнозолната киселина поседуваат висока електрофилна активност при што се врзуваат за Keap1 протеинот и учествуваат во последователната активација на Nrf2 факторот, што е одговорен за индукција на ензимите за детоксикација од фаза II на клеточниот редокс систем (глутатион S-трансфераза, глутамилцистеин синтетаза, тиоредоксин редуктаза, хемоксигеназа-1, NADPH-зависна хинон оксидоредуктаза, и γ -глутамил цистеин лигаза) (Martin et al., 2004; Satoh et al., 2013, 2006). Дополнително, истите играат клучна улога

во инхибицијата на ацетилхолинестеразите и синтезата на ацетил холинот (Ozarowski et al., 2013), како и во металната хелација на преодните метали што учествуваат во невротоксичните процеси кај АБ (Habtemariam et al., 2016).

Исто така, докажано е дека дитерпените присутни во RE ги инхибираат сигналните патишта предизвикани од TNF- α преку регулација на експресијата на HO-1 и Nrf2 што последователно доведува до надолна регулација на инфламаторниот одговор, а воедно влијаат и на експресијата на mRNA на α -секретазата, со што се промовира „нормалниот“ пат на обработка на амилоидниот прекурзорен протеин (Meng et al., 2013).

Но и покрај бројните позитивни ефекти на компонентите во рузмариноот кои одат во прилог на успешно справување со АБ, сепак истите се карактеризираат со ниска системска биорасположливост (<1%) како и со низок степен на премин низ КБМ (Hase et al., 2019). Па оттука, со нивното инкорпорирање во нанолипозомски везикули се очекува подобрување на растворливоста и нвната стабилност, ефикасен и безбеден премин преку КМБ и последователно подобрена акумулација во мозочните ткива и соодветна терапевтска ефикасност (Mignet et al., 2013).

3. Цели на истражувањето



Земајќи ги предвид сите претходно споменати аспекти во однос на постоечките проблеми, ограничувања и предизвици за ефикасен третман на невродегенеративните болести, предметот на ова истражување беше дизајн, развој, оптимизација и целосна *in vitro* физичко-хемика и биофармацевтска карактеризација на ПЕГ-илирани нанолипозоми со вграден екстракт од рузмарин (RE) за потенцијален и ефикасен третман на Алцхајмеровата болест.

Со цел успешно и рационално остварување на предвидените цели, поставени беа соодветни работни активности, кои беа поделени во неколку истражувачки фази:

ФАЗА 1: Развој, подготовка и карактеризација на ПЕГ-илирани нанолипозоми со RE.

- Развој и подготовка на празни нано-везикули без полимер за стерна стабилизација и нивна карактеризација од аспект на големина и дистрибуција според големина.
- Развој и подготовка на празни нано-везикули со ПЕГ како полимер за стерна стабилизација и нивна карактеризација од аспект на големина и дистрибуција според големина.
- Развој и подготовка на ПЕГ-илирани нано-везикули со енкапсулиран RE и нивна карактеризација од аспект на големина, дистрибуција по големина, ефикасност на енкапсулација на RE, преку розмаринската киселина (RA) како маркер компонента.

ФАЗА 2: Експериментален дизајн и оптимизација на избрани формулации на ПЕГ-илирани нанолипозоми со RE.

- Подготовка и карактеризација на формулации на нанолипозоми со енкапсулиран RE со различен сооднос на составните компоненти и нивна карактеризација (големина, дистрибуција по големина, морфологија, ефикасност на енкапсулација, *in vitro* брзина на ослободување на екстрактот следено преку RA во тек на 48 часа и студии на адсорпција на говедски серумски албумин (BSA) на површината на нано-везикулите (OFAT експерименти)).
- Имплементација на централно композитен дизајн како статистичка алатка за оптимизација на формулациите на нанолипозоми за насочена испорака на RE во мозокот.
- Подготовка и карактеризација на различни предложени ПЕГ-илирани формулации на нанолипозоми со енкапсулиран RE и нивна карактеризација

(големина, дистрибуција по големина, ефикасност на енкапсулација и *in vitro* ослободување на RE во тек на 24 часа).

- Воспоставување и анализа на математичките модели кои квалитативно и квантитативно го опишуваат влијанието на формулациските варијабли врз особините од интерес на нано-везикулите.
- Оптимизација на формулации на нанолипозоми за насочена испорака на RE во мозокот.

ФАЗА 3: Подготовка и карактеризација на оптимални формулации на ПЕГ-илирани нанолипозоми со енкапсулиран RE.

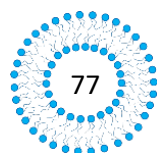
- Подготовка на оптимални формулации на ПЕГ-илирани нанолипозоми со вграден RE согласно студиите на експериментален дизајн.
- Физичко-хемика карактеризација на подготвените нано-везикули со енкапсулиран RE (големина и дистрибуција според големина, определување на површинска наелектризираност и ефикасност на енкапсулирање на RE).
- Определување на *in vitro* брзината и механизмот на ослободување на маркер компонентата RA од дизајнираните нано-системи.
- *In vitro* определување на антиоксидативниот потенцијал на RE и тоа, како чист екстракт и на нанолипозомите со вграден RE.
- Квалитативна и квантитативна карактеризација на наносистем - протеин комплексите со методи на протеомика.
- Испитување на стабилноста на нано-системите во физиолошки релевантен и биолошки медиуми.

ФАЗА 4: *In vitro* студии за испитување на токсичност и ефикасност на преземање на празните нано-системи од страна на избрани две клеточни линии.

- Испитување на цитотоксичност на нано-системите без инкорпориран RE врз човечки церебрални микроваскуларни ендотелни клетки и човечки неуробластома клетки.
- Оптимизација на процесот на маркирање на празните нано-системи со флуоресцентна боја
- Квантитативно определување и испитување на механизмот на преземање на флуоресцентните нанолипозоми од страна на човечките церебрални микроваскуларни ендотелни клетки и човечките неуробластома клетки.

- Студии на клеточна интернализација на нано-везикулите во човечки церебрални микроваскуларни ендотелни клетки и човечки неуробластома клетки.

4. Експериментален дел



4.1. Материјали

Со цел изработка и соодветна карактеризација на формулациите беа употребени следните материјали:

- Соја лецитин (SL) (Виталија, С. Македонија)
- LIPOID PE 18:0/18:0-PEG 2000 (PEG) (Lipoid, Germany)
- Холестерол (CH) (Sigma Aldrich, USA)
- Екстракт од рузмарин (RE), Институт за фармакогнозија, Фармацевтски факултет – УКИМ, Скопје, С. Македонија
- Розмаринска киселина (RA), стандард (Sigma Aldrich, USA)
- Хлороформ со HPLC чистота (Merck, Germany)
- Метанол со HPLC чистота (Merck, Germany)
- Мравја киселина со HPLC чистота (Merck, Germany)
- Ацетонитрил со HPLC чистота (Merck, Germany)
- Хумана плазма (Институт за неврологија, Клинички центар – Мајка Тереза, Скопје, С. Македонија) – Протоколите за хумана плазма беа одобрени од етичка комисија при Медицински факултет – УКИМ, Скопје, С. Македонија (25.05.2016, No. 03-2039/9)
- Говедски серумски албумин (BSA) (Sigma Aldrich, USA)
- Bradford реагенс (Sigma Aldrich, USA)
- Човечки церебрални микроваскуларни ендотелијални клетки (hCMEC/D3) (CELLutions, Biosystems/Cedarlane, Канада)
- Dulbecco's фосфатен пуфер (DPBS) (Sigma Aldrich, USA)
- Колаген тип I (rat tail) (Sigma Aldrich, USA)
- Ендотелијален базален медиум – 2 (EBM-2) (Life Technologies)
- EndoGRO-MV SCME004 комплетен медиум за клеточни култури (Merck, Germany)
- Фетален говедски 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 (CytoTox) (Promega, USA)
- Alexa Fluor™ Phalloidin 488 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Hoechst Fluorescent stain (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Dil stain (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate ('DiI'; DiIC18(3))) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Nile Red (Sigma Aldrich, USA)
- Oil red O (Sigma-Aldrich, USA)
- pHrodo™ Green dextran conjugate (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA)
- CellLight™ ER-GFP (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA)
- Флуоресцеин исотиоцијанат изомер I (FITC) (Sigma Aldrich, USA)
- Хлорпромазин (Sigma Aldrich, USA)
- Индометацин (Sigma Aldrich, USA)
- 2,2'-азобис(2-аамидинопропан) дихидрохлорид (AAPH) (Merck, Germany)
- Флуоресцеин натриум (Sigma Aldrich, Germany)
- Фосфатен пуфер pH 7,4, подготвен *ex tempore* (Ph. Eur. 9)

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

4.2. Опрема

За подготовка и испитување на формулациите беше користена следнава опрема:

- Ротавапор (Buchi 215, Switzerland)
- Ултрасонична бања (Ultrawave Limited, Cardiff, UK)
- Хомогенизатор UltraTurax T25 Basic (IKA – Werke GmbH & Co. KG, Germany)
- Магнетна мешалка (Jenway, UK)
- Agilent 1200 Model HPLC (Agilent Technologies, USA)
- Лиофилизатор (Labconco, USA)
- Водена бања со хоризонтално мешање и термостат (Unitronic OR, Selecta, Barcelona, Spain)
- 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)
- Mastersizer 2000, Hydro 2000S (Malvern Instr. 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 (Perkin-Elmer, USA)

- Luna fluorescence cell counter (Logos Biosystems, Republic of Korea)
- LabRam 300 spectrometer (Horiba Jobin Yvon, USA)
- LaserCheck TM Handheld Power Meter (Coherent Scientific, Australia)
- Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation (AF4) поврзан со Multiangle light scattering detector (MALS) и Dynamic light scattering (DLS) (Wyatt Technology Europe GmbH, Dernbach, Germany; Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- 2100 Биоанализатор за автоматизирана електрофореза со висока резолуција (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

4.3. Методи

4.3.1. Прелиминарни студии и OFAT експерименти при развој на формулација на NLs

Во прелиминарните истражувања за развој на формулација на NLs беа подготвени различни примероци со цел да се добијат празни ПЕГ-илирани везикули со средна големина помала од 200 nm и продолжено време на циркулација, што претставува основен предуслов за успешна испорака на активните компоненти во мозокот. Истите беа подготвени со примена на модифицирана техника на хидрирање на сув липиден филм (Сл. 3) (Cambuleva et al., 2016).

Во текот на овие истражувања беше вариран односот на SL и CH, како главни составни компоненти на фосфолипидниот двослој.

Врз основа на резултатите добиени од големината и дистрибуцијата по големина на везикулитете во следниот чекор беше избрана формулација во која што беше инкорпориран PEG, а дополнително беше енкапсулиран и RE и тоа, во водената или во липидната фаза.

Понатаму, со цел да се постават границите на дизајн просторот, беше продолжено со експерименти во кои беше вариран еден фактор во дадено време (OFAT експерименти), односно беше вариран односот на компонентите во формулацијата (SL, CH и PEG).

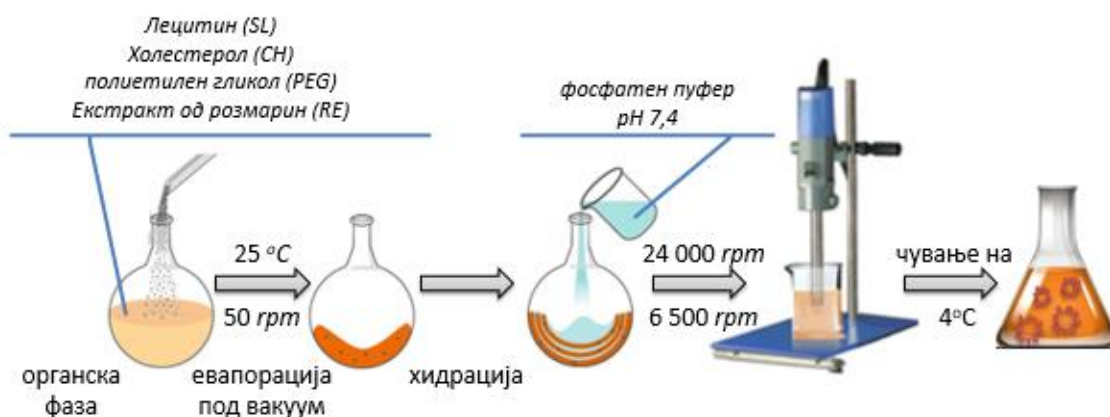
4.3.2. Подготовка на нанолипозомските дисперзии (NLs)

При подготовката, потребните количества на SL, CH (30 mg) и RE беа растворени во смеса од метанол и хлороформ во однос 1:4 (v/v). Потоа, органските растворувачи беа отстранети со помош на евапорација под вакуум користејќи ротовапор на температура од 25 °C, 50 rpm/ мин. и притисок од 50 mbar (Buchi 215, Switzerland). Формираниот тенок липиден филм беше хидриран со водената фаза, односно со 10 mL PB pH 7,4. Хидрирањето беше извршено во четири последователни циклуси во тек на 15 мин. кои се состојат од по 3 чекори кои траат по 5 минути и тоа: мешање со помош на ултразвук (ултрасоникација) (50/60 Hz, ULTRASONICS-H, J.P. Selecta), вортексирање (Tehtnika, EV-102, Slovenia) и рачно мешање на собна температура.

Вака добиената липозомска дисперзија беше подложена на процес на хомогенизација (24000 rpm, 5 мин.; Ultra-Turrax T25, IkaWerke, Germany) и беше оставена 24 часа на температура од 2-8 °C. Потоа, липозомската дисперзија повторно

беше хомогенизирана во времетраење од 3 мин. на 6000 rpm и беше чувана на температура од 2-8 °C.

Површинско модифицираните формулации беа подготвени на ист начин со тоа што во липидната фаза беа додадени различни количества на PEG. Дополнително, беа подготвени и празни формулации каде што во органската фаза не беше додаден RE (Табела 3 и 4).



Сл. 3. Шематски приказ на подготовка на NLs.

4.3.3. Студии на експериментален дизајн

Со цел подетално да се увиди влијанието на формулациските фактори и нивните интеракции врз испитуваните параметри, беше применет централно композитниот дизајн - CCD (компјутески програм Design-Expert V8, Stat-Ease, Inc. Minneapolis, MN). Врз основа на резултатите добиени од OFAT експериментите, количините (mg) на RE, SL и PEG (Фактор А, В и С, соодветно) беа избрани како потенцијални критични формулациски параметри што влијаат на средната големина на честичките, апсолутното количество на енкапсулирана RA, како и вкупното количество на RA ослободена по 1, 4, 6 и 24 ч. Целта беше да се воспостават моделите на одговори и математичките равенки на зависност на параметрите од интерес, а оттука да се направи оптимизација на формулацијата од аспект на значајн физичко-хемиски и биофармацевтски особини на NLs.

Беа направени 20 експерименти, при што сите фактори беа варирани на 2 нивоа со 6 репликати на централната точка. Кодираниите и вистинските вредности за нивоата на кои беше извршено варирањето на трите независни варијабли се прикажани во Табела 2. Експериментите беа изведени по случаен редослед (Табела 3).

Табела 2. Кодирани и реални вредности на независните експериментални варијабли

Фактор		Ниско ниво		Високо ниво	
		Кодирани вредности	Реални вредности	Кодирани вредности	Реални вредности
A	RE	-1	200	1	400
B	SL	-1	250	1	310
C	PEG	-1	5	1	50

Табела 3. Експерименти предложени од Design-Expert софтверот

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

Врз основа на резултатите од студиите за експериментален дизајн и воспоставените математички модели, оптимизацијата на формулацијата беше направена во насока на добивање на липозомски везикули со минимална големина, максимално апсолутно количество на енкапсулирана RA и нејзино продолжено ослободување на RA.

4.3.4. Определување на големината и дистрибуцијата по големина на NLs

Средната големина на везикулите (D_{50}) и дистрибуцијата на везикулите по големина (SPAN фактор) на подготвените NLs беа определени со помош на ласерска дифрактометрија (Mastersizer 2000, Hydro 2000S, Malvern Instr. Ltd., Great Britain).

Опскурацијата на примерокот во оптичката ќелија за мерење беше 0,2-2%. Мерењата беа направени под следниве услови: дисперзант – вода; мешање на 1750 вртежи во минута; индекс на рефракција на NLs - 1,52; индекс на апсорпција - 0,001 и „општ модел на пресметка“.

Од секоја формулација беа земени најмалку по 3 примероци, а секој примерок беше измерен најмалку 10 пати.

4.3.5. *Определување на апсолутно количество на енкапсулирана RA во NLs*

Апсолутното количество на енкапсулирана RA (mg) во NLs беше пресметано индиректно преку одредување на неенкапсулираната фракција на RA користејќи претходно валидиран метод опишан од Cambuleva et al. (2016).

За таа цел, дисперзиите на NLs беа центрифугирани на 4500 rpm, 15 мин., 4 циклуси во кивети за ултрафилтрација (Vivaspin 20, 1000 KDa, Sartorius-Stedim Biotech, France), по што супернатантот беше отстранет. HPLC анализите беа направени на Merck Hitachi HPLC систем (Darmstadt, Germany), опремен со Ellite LaChrom L-2200 autosampler, L-2130 pump, L-2450 diode array detector и колона Zorbax Eclipse XDB RP C-18 column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm, Agilent, Germany). Како мобилна фаза беше користена: А - 1% мравја киселина (pH 3,0) и В – ацетонитрил (90:10 v/v) (Cvetkovikj et al., 2013). Квантификацијата на RA беше извршена со помош на UV/VIS DAD детектор на 330 nm. Од секоја формулација беа земени најмалку по 3 примероци, а секој примерок беше испитан 3 пати.

4.3.6. *In vitro постапка за определување на брзината на ослободување на RA од NLs*

In vitro постапката за определување на брзината на ослободување на RA од NLs (3 mL нативна липозомска дисперзија како примерок) беше направена со користење на дијализен метод со полупропустлива мембрана (MEMBRA-CEL dialysis tubing; Serva Feinbiochemica GmbH, Germany) во 30 mL PB pH 7,4 на температура од 37±1 °C и 100 rpm. Во претходно дефинирани временски интервали (по изминати 1, 4, 6 и 24 часа), беа земени по 10 mL од медиумот и истите беа заменети со еднаков волумен на претходно термостатиран PB.

Количеството на ослободена RA од секој примерок беше определен со претходно наведениот HPLC метод. Од секоја формулација беа земени најмалку по 3 примероци, а секој примерок беше анализиран 3 пати.

4.3.7. Морфолошка изглед на NLs

Површинската морфологија на примероците на NLs подготвени во прелиминарната фаза од истражувањата беше карактеризирана со користење на трансмисиона електронска микроскопија (ТЕМ, JEM-1400, Jeol, Japan), опремена со дигитална камера (Veleta TEM Camera, Olympus, Germany) и iTem софтвер v.5.2. Снимањето беше направено по нанесување на секој од примероците на сито обложено со бакар (100 mesh) и јаглероден филм.

Подготовка на оптимални формулации на NLs

Врз основа на резултатите од студиите на експерименталниот дизајн и воспоставените математички модели, последователната оптимизација на формулацијата беше спроведена со цел на добивање нано-везикули кои ќе се карактеризираат со минимална големина на честички (D_{50}), максимална апсолутна количина на енкапсулирана RA и различни профили на *in vitro* ослободување на RA.

Овие формулации на ПЕГ-илирани NLs со инкорпориран RE (примероци NL1-NL5) беа подготвени со претходно опишаната модифицирана постапка на хидрација на сувиот липиден филм (Табела 4). Кај сите оптимални формулации, беше инкорпориран 400 mg RE во органската фаза. Со цел да се добијат формулации соодветни за парентерална администрација и испорака во мозокот, подготвените примероци беа филтрирани преку филтри со големина на пори од 0,22 μm (Sartorius, Germany).

Во насока на испитување на влијанието на физичко-хемиските и површинските својства на нанолипозомите како системи-носачи врз нивните перформанси, беа подготвени две празни формулации кои содржат 50 и 5 mg на PEG (примероци NLb1 и NLb2, соодветно), како и празна неПЕГ-илирана формулација (примерок NLb0) (Табела 4), при што истите беа искористени за студиите на: квантитативно определување на адсорбирани протеини (Брадфорд анализа), квалитативна анализа на нанолипозом-протеин комплексите (IR-ATR спектроскопска анализа), стабилност во клеточен медиум (AF4 анализа), како и на клеточни култури (студии на клеточна вијабилност и цитотоксичност, експерименти на квантитативно преземање и студии на клеточна интернализација).

Табела 4. Состав на оптималните формулации на NLs и нивните аналози користени во текот на истражувањата

Форм. бр.	RE (mg)	SL (mg)	PEG (mg)	CH (mg)
NL1	400	261,08	50	30
NL2	400	272,18	5	30
NL3	400	250,01	50	30
NL4	400	307,58	5	30
NL5	400	257,41	50	30
NLb1	/	261,08	50	30
NLb2	/	272,18	5	30
NLb0	/	261,08	/	30

Карактеризација на оптималните формулации на NLs

Оптималните формулации на липозомите (примероци NL1-NL5) беа карактеризирани во однос на големината (D_{50}) и дистрибуцијата по големина (SPAN фактор), ефикасноста на енкапсулација на екстрактот и *in vitro* брзината на неговото ослободување.

Содржината на екстрактот во оптималните NLs беше изразена преку параметрите: Ефикасност на енкапсулација (EE %) и инкорпорација на екстрактот (ИЛ) според равенките:

$$EE\% = \frac{\text{вкупна маса на RA во NLs} - \text{неенкапсулирана маса на RA}}{\text{вкупна маса на RA}} * 100 \quad (\text{Рав. 1})$$

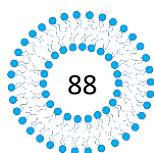
$$ИЛ = \frac{\text{маса на RA енкапсулирана во NLs}}{\text{маса на липидна фаза во NLs}} * 100 \quad (\text{Рав. 2})$$

EE% ја опишува ефикасноста на инкорпорирање на RA во nano-системите, додека пак капацитетот на ИЛ ја претставува количината на RA вградена во самиот носач.

ИЛ беше пресметан со цел да се определи количеството на RA (mg) инкорпорирана во 100 mg липид.

Количеството на RA ослободена од оптималните нанолипозомски формулации по 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 и 24 часа беше изразено како % на ослободен RE (Рав. 3), изразен преку маркер компонентата RA.

$$\% \text{ на ослободена RA} = \frac{\text{(маса на ослободена RA)}}{\text{вкупна маса на енкапсулирана RA во NLs}} * 100 \quad (\text{Рав. 3})$$



4.3.8. *Определување на Зета потенцијал на NLs*

Зета потенцијалот (ZP) беше определен со помош на Zetasizer Nano Series, Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., Велика Британија, по разредување на оптималните дисперзии на NLs во 10 mM PB pH 7,4, 1:20 (v/v). Мерењата беа направени во транспарентни кивети под следниве услови: 25 °C, време на термостатирање од 120 секунди, вискозитет на медиумот 0,8894 cP, диелектрична константа 78,5 и агол од 173°. Мерењата беа направени на 3 примероци од секоја формулација, а за секој примерок беа направени по најмалку 12 мерења.

4.3.9. *Определување на антиоксидативен капацитет (ORAC анализа) на NLs и RE*

Антиоксидативниот капацитет на RE и на оптималните примероци на NLs беше определен со помош на тестот за капацитет на апсорпција на кислородни радикали (ORAC), заснован на оксидација на флуоресцеинот од страна на пероксидните радикали од 2,2'-азобис (2-амидинопропан) дихидрохлорид (AAPH).

За таа цел, 25 µL од нанолипозомските примероци беа инкубирани со 150 µL раствор на флуоресцеин (10 nM) на темно место (37 °C, 30 мин), по што беше измерена флуоресценцијата со употреба на спектрофотометар (λ на екситација = 492 nm, λ на емисија = 535 nm, VICTOR, Perkin Elmer, USA). Потоа, беа додадени 25 µL AAPH (100 mM) и беше измерена флуоресценцијата на почетокот на експериментот и по 30, 60, 90 и 120 мин. Сите експерименти беа спроведени во трипликат и дополнително, беше направена статистичка анализа со помош на ANOVA. Антиоксидативниот капацитет на RE и на нанолипозомските формулации беше пресметан како % од иницијалната флуоресценција на секој примерок (Рав. 4).

$$\% \text{ од иницијална флуоресценција} = \frac{\text{флуоресценција на примерокот во дадено време}}{\text{флуоресценција на примерокот во 0 мин}} * 100$$

(Рав. 4)

4.3.10. *Студии за определување на апсорпција на протеини на празни NLs (Брадфорд анализа)*

Со цел да се утврди влијанието на количеството на PEG врз формирањето на комплексите помеѓу липозомските везикули и протеините, беше направено инкубирање на празниот примерок без PEG како и оние што содржат 50 и 5 mg на PEG (примероци

NLb0, NLb1 и NLb2, соодветно) со хумана плазма од здрави доброволци и плазма од пациенти со АБ.

За таа цел, формулациите на NLs беа разредени со дестилирана вода до крајна концентрација на липиди од 1 mM, а потоа беа инкубирани со хумана плазма (NLs:хумана плазма = 1:1 (v/v)). Инкубацијата се изведуваше на водена бања со постојано хоризонтално мешање (37 °C, 1 час, Haake SVB 20, JP Selecta, Spain) и последователно, примероците беа центрифугирани (10 мин, 12000 rpm, MiniSpin Plus, Eppendorf International, Germany). Процентот на атсорбирани протеини беше определен индиректно, по изведената Брадфорд анализа на супернатантот (Рав. 5). Како контрола се користеше разредена плазма, претходно инкубирана без нанолипозомски формулации. Секој примерок беше анализиран во трипликат.

$$\% \text{ атсорбирани протеини} = \frac{\text{количество на протеини атсорбирани на NLs}}{\text{вкупно количество на протеини во плазма}} * 100 \quad (\text{Рав. 5})$$

4.3.11. IR – ATR спектроскопски анализи на NLs

Со цел да се откријат можните интеракции помеѓу компонентите кои влегуваат во состав на NLs и дополнително, да се добијат подетални сознанија за липозом-протеин врските формирани при администрација на NLs *in vivo*, беше направена IR-ATR анализа.

За таа цел, 150 µL од формулациите со 50 и 5 mg на PEG со инкорпориран RE (примероци NL1 и NL2) и нивните празни аналози (примероци NLb1 и NLb2) беа инкубирани со 1 mg/mL раствор на BSA во PB pH 7,4 на водена бања со хоризонтално мешање (37 °C, 75 rpm, Haake SVB 20, JP Selecta, Spain). После атсорпцијата, неврзаната фракција на BSA беше одделена со центрифугална ултрафилтрација (3 циклуси, 15 минути, 4000 rpm, 25 °C, Rotofix 32 - Hettich Zentrifugen, Germany). Последователно, формираните NL-протеински комплекси беа лиофилизирани (-40 °C, 0,052 mBar; FreeZone 2.5 Freeze Dry System - LABCONCO, USA). За споредба, беа снимени и спектрите на SL, CH, PEG, RE и BSA. IR-ATR спектрите беа снимени со помош на Perkin-Elmer System 2000 FT-IR спектрометар, користејќи Golden Gate (Specac) како ATR додаток опремен со дијамантски ATR кристал и ZnSe леќи. Аголот на инциденца беше 45°. Беа направени 64 сенови за позадината и за спектрите на примероците (двонасочни, двострани).

4.3.12. *In vitro* студии на стабилност на NLs во физиолошки релевантен медиум, човечка плазма и медиум за клеточни култури

Влијанието на PEG врз *in vitro* стабилноста на NLs и формирањето на протеинската корона (ПК) беше испитано по инкубација на подготвените оптимални формулации NL1-NL5 (200 μ L) во 800 μ L на: а) фосфатен рН 7,4, симулирајќи физиолошки релевантен медиум (воедно претставува и везикулум на нативните формулации); б) човечка плазма и в) комплетен EndoGRO-MV клеточен медиум SCME004 (изотоничен и изосмотичен медиум за hCMES/D3 клеточна линија која ја симулира човечката крвномозочна бариера) на 37 °C во тек на 2, 6 и 24 часа.

Примероците беа анализирани од аспект на ZP, големината на честичките и индексот на полидисперсност (PDI) (Zetasizer Nano-Series, Malvern Instr. Ltd., UK). Добиените резултати за големината на везикулите исто така се покажаа како слични и споредливи со оние од ласерската дифрактометрија (Mastersizer 2000, Hydro 2000S, Malvern Instr. Ltd., UK).

4.3.13. *Определување на промени во големината на NLs како функција од еволуцијата на протеинската корона со помош на AF4-MALS/DLS анализа*

Со цел да се испита однесувањето и перформансите на NLs како системи носачи во зависност од количеството на PEG на нивната површина во сите понатамошни испитувања беа користени примероци на празни нанолипозомски формулации (NLb0, NLb1 и NLb2), односно неПЕГ-илирана формулација и формулации што содржат 50 и 5 mg PEG, соодветно.

За потребите на оваа студија на стабилност, липозомските дисперзии со концентрација од 30 mg/mL најпрво беа разредени до финална концентрација од 1 mg/mL (вкупен волумен од 2 mL) во медиумот за клеточни култури (Endo-GRO-MV, Cat SCME004, Sigma Aldrich), а потоа беа инкубирани на 37 °C во тек на 1 и 4 часа во Eppendorf термомиксер под константно мешање (300 вртежи во минута). Инкубацијата се одвиваше во клеточен медиум без или суплементиран со 5% серум (подготвен согласно упатствата на производителот). На крајот на периодот на инкубација, примероците беа вортексирани (5 секунди) и волумен од 1 mL беше пренесен во вијала за анализа на асиметрична flow-field-flow фракционизација (AF4 анализа).

Експериментите беа спроведени со внатрешно спојување на AF4 системот со детектори за UV/VIS, MALS и DLS.

Користениот AF4 систем беше составен од уред за сепарација Eclipse Dualtec (Wyatt Technology Europe GmbH, Dernbach, Germany) и течен хроматограф со високи перформанси (Agilent 1260 Infinity; Agilent Technologies, Santa Clara, USA) опремен со дегасер (G1322A), изократска пумпа (G1310B), автосемплер (G1329B) и детектор (G1365C) поставен на 230 nm. Истиот беше споен со повеќеаголен детектор за расејување на светлината DAWN 8+ HELEOS II (MALS) кој работи со ласер од 658 nm (Wyatt Technology Europe). Во каналот за сепарација на Eclipse SC, беа користени регенерирани целулозни мембрани (10 kDa) со висинско растојание од 350 μm . Како елуент се користеше фосфатен пуфер (PBS). Протокот на детекторот беше поставен на 0,5 mL/min, а волуменот на инјектирање беше 50 μL . Во оваа студија беше користен и DLS (Malvern Zetasizer Nano-S, UK) со инсталирана кварцна ќелија за проток (ZEN0023). Вредностите за рефрактивен индекс и апсорпција имаа вредности од 1,38 и 0,010 соодветно. Како дисперзант беше избрана дестилирана вода, температурата беше поставена на 25 °C, а атенуацијата на 11. Како модел за анализа беше избран 'General purpose (normal distribution)'.

4.3.14. Протеомско профилирање на адсорбирани протеини на површината на празни NLs со помош на автоматизирана електрофореза со висока резолуција

Со цел да се процени профилот на адсорбирани протеини по инкубација на празните нанолипозомски примероци (NLb0, NLb1 и NLb2) во клеточен медиум за хумани церебрални микроваскуларни ендотелијални клетки (hCMEC/D3), беше изведена протеинската електрофореза со 2100 Bioanalyzer користејќи High Sensitivity Protein 250 kit assays. По фазите на подготовка и инкубација кои беа идентични како и за студиите на AF4 анализата, на секој од примероците беше додаден стандарден пуфер за означување. Понатаму, примероците беа разредени 200 пати во milliQ-вода и денатурирани на 95 °C во тек на 5 мин. Редукцијата беше направена со додавање 3,5% (v/v) 1 M раствор на дитиотреитол (DTT) во пуферот на примерокот. По ладење, примероците беа поставени на микрофлуидниот чип за електрофореза, во согласност со упатствата на производителот. Сите реагенси и инструменти беа од Agilent Technology, California, USA.

4.3.15. hCMEC/D3 клеточна линија

За потребите на *in vitro* студиите за определување на квантитативното клеточно преземање и интернализацијата на нано-везикулите беше користена клеточната линија на човечки церебрални микроваскуларни ендотелни клетки - hCMEC/D3 (CELLutions Biosystems/Cedarlane®, Canada), која е докажано дека ги симулира морфолошките и функционалните особености на човечката КМБ.

За оваа цел, најпрво на T-75 шишињата за клеточни култури (Greiner Bio-One GmbH, Germany) беше нанесен 0,05 mg/mL колаген тип I во DPBS (1 час, 37 °C.) Култивирањето на клетките беше изведено во EBM-2 клеточен медиум во услови на 37 °C и 5% CO₂, кој беше менуван на секои 2-3 дена до постигнување на 80% конфлуентност на клетките. Потоа, клеточниот медиум беше отстранет, а монослојот од адхерираните клетки на дното од шишињата беше промиен со DPBS. Клетките беа последователно одвоени по инкубација со 0,1 mg/mL Trypsin-EDTA раствор (37 °C во времетраење од 8 минути). Добиената суспензија од клетки беше центрифугирана (1500 rpm, 3 минути; Hettich, Rotofix 32, Germany), по што следуваше отстранување на супернатантот. Исталожената фракција на клетки беше суспендирана во 5 mL од клеточниот медиум и потоа беше определен нивниот број. На овој начин клетките беа понатаму подготвени за следно пресадување и/или за понатамошни студии. Сите услови на засадување и култивирање на hCMEC/D3 клеточната линија, како и суплементацијата на клеточниот медиум беа направени во согласност со водичите од производителот.

4.3.16. SH-SY5Y клеточна линија

Освен на hCMEC/D3, *in vitro* квантитативни и квалитативни клеточни студии беа направени и на човечки неуробластома клетки - SH-SY5Y, една од најчесто користените клеточни линии за *in vitro* проучување и симулирање на карактеристиките на невродегенеративните заболувања, како што се Паркинсонова и Алцхајмерова болест. По засадувањето, клетките беа инкубирани во T-75 шишињата за клеточни култури (Greiner Bio-One GmbH, Germany) во DMEM (37 °C и 5% CO₂), при што клеточниот медиум беше менуван на секои 2-3 дена додека клетките не постигнат конфлуентност од околу 80%. Во фазата на пресадување, медиумот беше отстранет, а монослојот од клетки на дното на шишињата беше промиен со DPBS. Одвојувањето на клетките беше направено по инкубација (3 минути на 37 °C) во 0,1 mg/mL раствор на Trypsin-EDTA, по што добиената суспензија од клетки беше центрифугирана (800 rpm, 5 минути). По

отстранување на супернатантот, клетките беа ресуспендирани во 5 mL DMEM и беше избројан бројот на живи клетки со што истите беа подготвени за понатамошно пресадување и/или експерименти. Сите услови на засадување и култивирање на hCMES/D3 клеточната линија, како и суплементацијата на клеточниот медиум беа во согласност со водичите од производителот.

4.3.17. Испитување на вијабилност на hCMES/D3 и SH-SY5Y клетки

In vitro студиите за определување на вијабилноста на клетките по нивен третман со празните NLs формулации (примероци NLb0, NLb1 и NLb2) беа направени и на двете претходно споменати клеточни линии. Клетките со густина од 1×10^4 клетки/бунарче беа засадени во плочи со 96 бунарчиња (Cellstar® 96 well Cell Culture Microplate, Greiner Bio-One GmbH, Germany) и диспергирани во соодветен клеточен медиум (200 μ L) (EBM-2 и DMEM, за hCMES/D3 и SH-SY5Y, соодветно). Пред засадувањето, плочите за hCMES/D3 клеточната линија беа инкубирани со колаген тип 1 во тек на 1 час. По инкубацијата на клетките (24 часа, постигнување на конфлуентност од околу 80%), следеше отстранување на медиумот и последователно третирање на клетките со различните формулации на NLs претходно разредени во DPBS и дополнително, диспергирани во соодветниот клеточен медиум во финални концентрации од 5 μ g/mL, 10 μ g/mL и 100 μ g/mL. По 24 часовна инкубација на нанолипозомските примероци со клетките, од бунарчињата беше отстранет медиумот и истиот беше соодветно обработен за тестот за определување на цитотоксичноста врз клетките преку процентот на ослободена лактат дихидрогеназа (LDH). Понатаму, клетките во секое од бунарчињата беа инкубирани со MTS раствор (20 μ L, 4 часа, 37 °C и 5% CO₂). Со овој метод, вијабилноста на клетките се определува индиректно, преку количеството на формираните растворливи формазански кристали добиени од редукцијата на MTS под дејство на митохондријалните NAD(P)H-зависни оксидоредуктази, кои се воедно показател за живи и метаболички активни клетки. Апсорбацијата на добиениот раствор од формазански кристали беше измерена на бранова должина од 490 nm на читач за микроплочи (FLUOstar, BMG LabTechnologies, Germany). Клеточната вијабилност беше пресметана како % од апсорбацијата на позитивната контрола, односно клетки кои не беа третирани со нанолипозомски примероци (само во клеточен медиум), додека пак како негативна контрола беше искористен Triton X-100. За потребите на студиите на

клеточно преземање во присуство на инхибитори, беше определена и вијабилноста на клетките по нивен третман со хлорпромазин (15 μM) и индометацин (25 μM).

4.3.18. Испитување на цитотоксичност на празни NLs врз клетки од hCMEC/D3 и SH-SY5Y клеточна линија

По 24 часовната инкубација на празните нано-везикули (примероци NLb0, NLb1 и NLb2) со соодветната клеточна линија во претходно споменатиот ранг на концентрации, цитотоксичноста врз клетките беше определена со помош на LDH тестот. 25 μL од медиумот после инкубацијата беше аплициран во бели плочи со 96 бунарчиња (Corning® 96 Well Solid Polystyrene Microplate). Понатаму, на супернатантот беа додадени 25 μL супстрат (CytoTox-ONE™) по што следеше инкубација од 20 минути (37 °C и 5% CO₂). На крајот, во секое од бунарчињата беа додадени по 13 μL од растворот за стопирање на реакцијата. Ослободеното количество на лактат дехидрогеназата во супернатантот како резултат на оштетувањето на интегритетот на клеточната мембрана беше детектирано со мерење на флуоресценцијата со помош на читач на микроплочи на 560 nm ексцитација и 590 nm емисија (FLUOstar, BMG LabTechnologies, Germany).

Цитотоксичноста беше пресметана како процент од количеството на ослободена лактат дехидрогеназа од клетките во присуство на Triton X-100 (позитивна контрола). Како негативна контрола беа искористени бунарчињата со клетки третирани само со клеточен медиум (EBM-2 и DMEM, за hCMEC/D3 и SH-SY5Y, соодветно). Цитотоксичноста врз клетките исто така беше испитана и по третман на соодветните клеточни линии со хлорпромазин (15 μM) и индометацин (25 μM).

4.3.19. Квантитативни студии на клеточно преземање на празни NLs од страна на hCMEC/D3 и SH-SY5Y клеточните линии на 37 °C

Со цел да се одреди влијанието на PEG како и влијанието на експерименталните услови (време на инкубација и концентрација на NLs) врз квантитативното преземање на нано-везикулите од страна на hCMEC/D3 и SH-SY5Y, соодветната клеточна линија беше засадена во плочи со 96 бунарчиња во густина од 10⁴ клетки про бунарче и беа инкубирани во период од 48 часа со 200 μL клеточен медиум (EBM-2 и DMEM, за hCMEC/D3 и SH-SY5Y, соодветно) на температура од 37 °C и во присуство на 5% CO₂. Бунарчињата за hCMEC/D3 клеточната линија беа претходно обложени со колаген тип 1 во тек на 1 час. По постигнување на конфлуентноста, клеточниот медиум беше заменет

и монослоевите на клетки беа третирани со различни концентрации на флуоресцентно маркираните, празни формулации (примероци NLb0, NLb1 и NLb2) со Nile Red (Sigma Aldrich, USA) (претходно разредени со PBS и диспергирани во соодветен клеточен медиум во финални концентрации од 5, 10 и 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Инкубацијата беше изведена во тек на 1, 2 и 4 часа (37 °C, 5% CO₂), со последователно двократно промивање со PBS и лиза со 2% Triton X-100 (2 часа, 37 °C, 5% CO₂).

Добиената флуоресценција беше измерена на читач за плочи при ексцитација од 535 nm и емисија од 635 nm (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Како слепа проба беа искористени бунарчињата со соодветните клетки инкубирани во соодветниот клеточен медиум (нетретирани со нанолипозоми). Квантитативното количество на преземени нанолипозоми беше пресметано согласно претходно добиени равенки на прави, конструирани од флуоресценцијата добиена на ранг од концентрации за секоја од формулациите (неинкубирани со клетки).

4.3.20. Квантитативни студии на клеточно преземање на празни NLs од страна на hCMEC/D3 и SH-SY5Y клеточните линии во присуство на инхибитори на клеточен транспорт

Со цел да се одреди точниот механизам на клеточна интернализација, експериментите за клеточно преземање беа спроведени и во присуство на инхибитори на специфични патеки на транспорт. Имено, засадувањето и култивирањето на клетките беше направено на ист начин како и за експериментите на 37 °C. Квантитативното количество на преземени флуоресцентно маркирани празни нанолипозомски формулации (примероци NLb0, NLb1 и NLb2, во финални концентрации од 5, 10 и 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) беше испитано и на двете клеточни линии. Притоа, најпрво, една група беше третирана со 15 μM хлорпромазин како финална концентрација во соодветен клеточен медиум, додека пак друга група клетки беше третирана со 25 μM индометацин (во период од 40 мин), по што следеше инкубација со споменатите концентрации на NLs во тек од 2 часа (37 °C, 5% CO₂). Третата група клетки беше претретирани на 4 °C во времетраење од 40 мин, како и за време на инкубацијата со примероците во тек на 2 часа. Добиената флуоресценција беше измерена под истите услови како и за експериментите на 37 °C, а квантитативното количество на интернализирани NLs беше пресметано и изразено како % од преземањето на соодветните концентрации на нано-везикулите на 37 °C (земено како 100%).

4.3.21. *Квантитативни студии на клеточно преземање на празни NLs од страна на комбинирана hCMEC/D3 / SH-SY5Y клеточна линија*

За потребите на определување на клеточното преземање на NLs од страна на невроните, по нивен премин низ КМБ, hCMEC/D3 клетките беа засадени на Transwell инсерт (5x10⁴ клетки/инсерт), претходно обложени со 0,05 mg/mL колаген тип I во DPBS (1 час, 37 °C) и инкубирани со EBM-2 (0.5 mL клеточен медиум во апокалниот дел на инсертот и 1 mL базалниот дел од бунарчето) во тек на 5-6 дена. Медиумот беше менуван на секои 2-3 дена до постигнување на вредност за трансендотелијален отпор (TEER) ~50 Ω, како показател за формирање на цврст монослој и цврсти врски помеѓу ендотелните клетки (Weksler et al., 2013). Од друга страна пак, клетките на SH-SY5Y беа засадени на плочи со 12 бунарчиња (3x10⁴ клетки/бунарче) и култивирани во 1 mL DMEM во истиот временски период, до постигнување на конфлуентност. Понатаму, инсертите со засадени hCMEC/D3 клетки беа ставени во плочите со формирани монослоеве од SH-SY5Y. Во апикалниот дел од инсертите беа додадени NLs (флуоресцентно маркирани NLb0, NLb1 и NLb2) претходно дилуирани во PBS и диспергирани во EBM-2 (финална концентрација 10 µg/mL), а во базалниот дел од плочите беше додаден 1 mL DMEM. По инкубација од 2 часа (TEER >30 Ω), беа отстранети инсертите, а бунарчињата со SH-SY5Y беа двократно промиени со PBS и лизирани со 2% Triton X-100 (2 часа, 37 °C, 5% CO₂). Добиената флуоресценција беше измерена на читач за плочи при ексцитација од 535 nm и емисија од 635 nm (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Како слепа проба беа искористени бунарчињата со соодветните клетки инкубирани во соодветниот клеточен медиум (нетретирани со нанолипозомски примероци).

Квантитативното количество на преземени NLs беше пресметано како % од флуоресценцијата на истата концентрација на примероците неинкубирани со клетки.

4.3.22. *Определување на број на hCMEC/D3 клетки со интернализирани NLs со помош на флуоресцентна микроскопија*

Со цел да се потенцираат предностите на Микро-Раманската спектроскопија во однос на микроскопските методи за потврда на интернализацијата на NLs, беа направени експерименти за клеточно преземање на избрана празна нанолипозомска формулација, односно формулација што содржи најголемо количество на PEG на својата површина (NLb1) во hCMEC/D3 клетките согласно методот опишан од Mourtas et al. (2014).

Накратко, клетките беа засадени на плочи претходно обложени со колаген тип 1 на плочи со 6 бунарчиња со густина од 1×10^6 клетки/бунарче и оставени преку ноќ. Претходно подготвените флуоресцентно маркирани и немаркирани нанолипозомски примероци беа додадени во клеточниот медиум во финална концентрација од 200 nM (пресметано на липозомални липиди), со последователна инкубација од 4 часа (37 °C и 5% CO₂). Како слепа проба беа искористени нетретирани клетки со NLs. Потоа, клетките беа трипати промиени со Dulbecco PBS (Thermo Scientific, USA) и беа откачени од дното на бунарчињата со помош на растворот Trypsin-EDTA. По промивање со клеточниот медиум со цел комплетно да се отстрани Trypsin-EDTA, клетките повторно беа промиени со Dulbecco PBS и беа фиксирани со користење на 10% раствор на параформалдехид во PBS во тек на 30 мин. Фиксираните клетки беа промиени три пати со PBS и чувани на 4 °C до моментот на анализа.

За квантификација на клеточната популација со интернализирани нанолипозоми претходно означени со Oil Red беше искористен Luna fluorescence cell counter (Logos Biosystems, Република Кореја). 12 µL од фиксираната клеточна суспензија во PBS беше префрлена на слајдот за броење на клетки и вметната во инструментот. Броењето беше направено во „*fluorescent cell counting mode*“ со користење на следните параметри: ексцитација на црвениот канал - 20, праг на црвениот канал - 5, влез на големината на клетката 3-60 µm. Бројот на изброени клетки по истекот на секое мерење изнесуваше 400-600, а процентот на клетки со интернализирани нанолипозоми беше пресметан како просек од три мерења.

4.3.23. Детекција на флуоресцентно маркирани и немаркирани NLs во hCMEC/D3 клеточната линија со Микро-Раманска спектроскопија

По спроведување на експериментите на интернализација, опишани во претходниот сегмент, Микро-Раманските спектри на примероците беа снимени на LabRam 300 spectrometer (Horiba Jobin Yvon, USA) споен со конфокален микроскоп Olympus LMPlanFL со користење на Nd:YAG ласер (532 nm). Позадинското расеано зрачење (конфигурација 180°) беше анализирано на 1800 линии/mm дифракционен графтинг. Раманските интензитети беа собрани на CCD детектор на зраци. Беше избран long-distance × 50 објектив (N.A = 0,5) со работно растојание од 10,6 mm . Должината на иглата беше 500 µm, а процепот 100 µm. Исто така, беше искористен и филтер за спречување на слабеење на сигналот, а ласерската моќност на примероците (0,99 mW)

беше измерена со LaserCheck TM Handheld Power Meter (Coherent Scientific, Australia). Времето на аквизиција беше 12 секунди, а бројот на акумулација (број на скенирања) беше поставен на 10 за секоја спектрална колекција. Примероците на фиксирани клетки беа додадени на микроскопски слајд и истите понатаму беа исушени со воздух до сув филм, додека пак нанолипозомите (немаркирани и маркирани со флуоресцентна боја) беа скенирани како примероци претходно исушени со замрзнување.

4.3.24. Студии на интернализација на празни NLs во живи клетки на hCMEC/D3 и SH-SY5Y со флуоресцентна микроскопија

Со цел да се добие појасна слика за интернализацијата и ко-локализацијата на подготвените примероци на NLs во живи клетки, hCMEC/D3 и SH-SY5Y беа најпрво засадени на 35-милиметарски стаклени садови во густина од 2×10^5 клетки про бунарче (μ -Dish 35 mm, Polymer coverslip uncoated) со последователна инкубација во времетраење од 48 часа (37°C и $5\% \text{CO}_2$). Потоа, медиумот беше заменет, а клетките беа третираны со претходно маркираните празни NLs (примероци NLb0, NLb1 и NLb2) со флуоресцентна боја Nile Red (Sigma Aldrich, USA) диспергирани во соодветниот клеточен медиум во финална концентрација од $10 \mu\text{g/mL}$. По соодветната инкубација од 1, 2 и 4 часа (37°C , $5\% \text{CO}_2$) беше направено двократно промивање на клетките со PBS, по што беше направена анализа на флуоресцентна микроскопија на 37°C (Zeiss Axio Observer Z1 инвертен микроскоп, Zeiss, Jena, Germany; опремен со епифлуоресцентен илуминатор и комора за загревање на плочи). Добиените слики беа обработени со помош на софтверот Carl Zeiss (ZEN 2.6).

Исто така, беа спроведени и уште еден сет на експерименти, каде што SH-SY5Y клетките пред инкубацијата со претходно маркираните нанолипозоми со Dil (1,1'-Diocadecyl-3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate) ($10 \mu\text{g/mL}$, 4 часа, 37°C , $5\% \text{CO}_2$), беа третираны со pHrodo Green dextran conjugate. На ваков начин беше можно да се направи визуелизација на ендоцитните патеки како резултат на зелена флуоресценција на бојата во кисела средина. Постинкубациониот третман и условите за микроскопска визуелизација беа идентични како гореспоменатите.

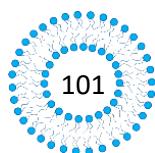
4.3.25. Студии на клеточна интернализација на празни NLs во hCMEC/D3 клеточните линии со конфокална микроскопија

Со цел да се потврди интернализацијата на NLs во внатрешноста на клетките како и да се испита нивната подетална колокализација во клеточните структури на КМБ, беше направена и конфокална ласерска скенирачка 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) со густина 2×10^5 клетки про бунарче и инкубирани во тек на 24 часа (37°C и $5\% \text{CO}_2$). По инкубацијата (4 часа, 37°C и $5\% \text{CO}_2$) со претходно маркираните празни NLs (примероци NLb0, NLb1 и NLb2) со DiI флуоресцентната боја, клетките беа два пати промиени PBS и фиксирани со $3,7\%$ параформалдехид во времетраење од 20 минути на собна температура. По промивање на клетките PBS, беше направено боење на мембраната со зелена боја Alexa FluorTM Phalloidin 488 ($5 \mu\text{L}$) во $200 \mu\text{L}$ 1% говедски серум албумин (10 минути, 37°C), со последователно боење на јадрото со $0,5 \mu\text{L}$ сина боја Hoechst fluorescent stain (hCMEC/D3), во тек на 5 минути на собна температура. Пред микроскопската визуелизација, на примероците им беше додаден медиум за одржување и зачувување на флуоресцентната боја - Vectashield mounting medium. Добиените слики беа обработени со помош на Carl Zeiss software (ZEN 2.6).

4.3.26. Статистичка анализа

Статистичката анализа на добиените резултати за квантитативно преземање на NLs беше спроведена со имплементација на методот на најмали квадрати (PLS) со користење на валидиран статистички софтвер Simca 14.1 (Sartorius Stedim Biotech, Germany). Со цел да се истакнат доминантните независни варијабли што имаат значителен ефект во моделот, беше користен VIP скор резултатот.

5. Резултати и дискусија



5.1. Прелиминарни испитувања при развој на формулација на NLs

Во рамките на истражувањата на оваа докторска дисертација беа подготвени ПЕГ-илирани нанолипозоми со енкапсулиран екстракт од рузмарин (RE) со потенцијал за ефикасно и безбедно лекување на АБ, при што беше користен систематски пристап за време на процесот на дизајн, развој и оптимизација на формулациите.

Најпрво, во тек на прелиминарната фаза, беа подготвени формулации на празни неПЕГ-илирани нанолипозомски примероци, каде беше вариран масениот сооднос на SL и во опсег од 5:1 до 20:1, соодветно.

Резултатите добиени од анализата на големината на липозомските везикули, како и нивната стабилност покажаа дека со најмала вредност за D_{50} од 136 nm (SPAN 1,743) се карактеризира примерокот што содржи 300 mg SL, односно однос на липидните компоненти SL:CH = 10:1 (*m/m*).

Оттука, оваа формулација беше избрана за подготовка на ПЕГ-илирани липозоми (примерок P1), каде што PEG беше инкорпориран во липидната фаза (сооднос SL:CH:PEG = 10:1:0.5, *m/m*).

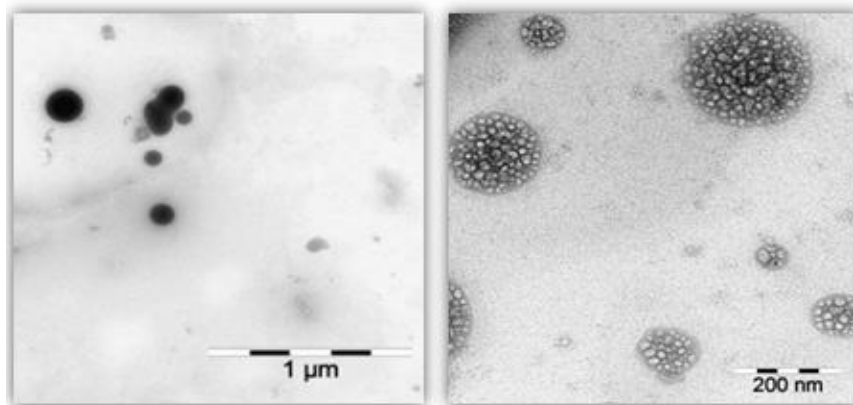
Во рамките на овие прелиминарни испитувања, беше определена и ефикасноста на енкапсулација на RE кога истиот е инкорпориран во липидната, односно водената фаза при подготовката на NLs (Cambuleva et al., 2016). Повисока ефикасност на енкапсулација на RE (за околу 40%) беше добиена кога истиот е инкорпориран во липидната фаза на NLs. Дополнително, инкорпорирањето на RE во липидниот филм резултираше со зголемување на средниот дијаметар на нано-везикулите (од 129 на 136 nm) (Cambuleva et al., 2016).

Во насока на поставување на границите на дизајн просторот, беа направени експерименти во кои беше вариран еден фактор во дадено време (OFAT експерименти).

Имено, покрај примерокот P1, во овој сегмент беа подготвени уште три други формулации, односно примероци P2, P3 и P4, каде што масениот сооднос на SL:CH:PEG изнесуваше 7,5:1:3; 9:1:1,5 и 10,25:1:0,25, соодветно. Во оваа фаза од истражувањата беше увидено дека промената на количествата на SL, PEG и RE во формулацијата сигнификантно влијае врз големината на везикулите, апсолутното количество на енкапсулирана RA и *in vitro* профилите на ослободување на RA во тек на 24 часа (Shalabalija et al., 2017). Имено, средниот дијаметар на везикулите се движеше од $119 \pm 1,76$ до $141 \pm 2,53$ nm и истите се карактеризираа со унимодална дистрибуција (SPAN

фактор $< 1,83$). Морфолошката анализа покажа дека подготвените примероци претставуваат мултивезикуларни системи (Сл. 4). Ефикасноста на енкапсулација на RA се движеше од 75 до 90%, а профилите на *in vitro* ослободувањето на RA, како маркер компонента, потврдија дека сите липозомски формулации се одликуваат со продолжино ослободување на екстрактот во тек на 48 часа (од 35,55 до 56,27%). Истовремено беше забележан обратен тренд помеѓу уделот на PEG во формулациите и количеството на ослободената RA. Статистичката анализа на резултатите од *in vitro* ослободувањето на RA од NLs укажаа дека истото се одвива според кинетичкиот модел на Peppas-Sahlin.

Дополнително, студиите на апсорпција на протеини демонстрираа дека не-PEG-илираниот аналог на формулацијата P1 се одликува со околу 70% апсорбиран BSA на површината, додека пак овој % кај PEG-илираните формулации (примероци P1-P4) беше $< 30\%$, што укажува на фактот дека PEG-илирањето претставува успешна стратегија за спречување на формирањето на ПК на површината на везикулите *in vitro* (Pozzi et al., 2014).



Сл. 4. TEM микрографски приказ на формулацијата составена од SL, CH и PEG (примерок P1).

5.2. Експериментален дизајн и оптимизација на NLs

По внимателно анализирање на податоците добиени во OFAT експериментите, беше применет дизајн на експерименти т.е. централно композитен дизајн (CCD) во насока на квалитативно и квантитативно определување на влијанието на главните независни формулациски променливи (mg на SL, PEG и RE) врз одговорите од интерес (големина на везикули, апсолутно количество на енкапсулирана RA и вкупно количество на RA ослободено по 1, 4, 6 и 24 ч), по што беа воспоставени математички модели што ја опишуваат нивната поврзаност.

Подготвените формулации беа испитани во однос нивните физичко-хемиски и биофармацевтски карактеристики. Последователно, оптимизацијата на формулациите на NLs беше извршена во точно дефиниран дизајн простор во однос на дефинираните/ посакуваните физичко-хемиски и биофармацевтски својства на дизајнираните системи со цел успешна испорака во мозокот.

Табела 5. Реални вредности за испитаните формулациски фактори и добиените одговори

Std	Run	A: RE	B: SL	C: PEG	D ₅₀ ±SD (nm)	Апс. кол. на енкапс. RA±SD (mg)	Кол. на ослоб. RA±SD (mg) по 1ч	Кол. на ослоб. RA±SD (mg) по 4 ч	Кол. на ослоб. RA±SD (mg) по 6 ч	Кол. на ослоб. RA±SD (mg) по 24 ч
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

Добиените резултати за D₅₀ беа во опсег од 120±1,65 до 133±2,60 nm. Апсолутното количество на енкапсулирана RA беше 7,26±0,10 - 18,83±0,06 mg, додека пак вкупното количество на ослободена RA за период од 24 часа беше 0,97±0,06 - 2,65±0,05 mg (Табела 5). Како што споменавме претходно, целта на овие експерименти беше да се идентификуваат варијаблите на формулацијата, односно количествата на SL, PEG и RE (фактори А, В, С, соодветно), како и нивните можни интеракции што имаат статистички значајно влијание врз испитуваните одговори. Оттука, најдобриот модел за

опишување на влијанието на формулациските фактори и нивните интеракции врз D_{50} беше редуцираниот кубен метод, додека пак квадратниот модел беше предложен за апсолутното количество на енкапсулирана RA. Вкупното количество на RA ослободено по 1, 4, 6 и 24 часа најдобро беше опишано во 2FI моделите. ANOVA статистичката анализа за моделите на испитаните одговори е прикажана во Табела 6 и 7.

Табела 6. ANOVA статистичка анализа на предвидените модели

Response	D_{50} (nm)	Апс. кол. на енкапс. RA (mg)	Кол. на ослоб. RA (mg) по 1 ч.	Кол. на ослоб. RA (mg) по 4 ч.	Кол. на ослоб. RA (mg) по 6 ч.	Кол. на ослоб. RA (mg) по 24 ч.
	Reduced					
<i>Suggested model</i>	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

Како што може да се забележи, вредностите за „Adj-R²“ и „Pred-R²“ за сите модели на следените одговори се во дозволен опсег (разликата помеѓу „Adj-R²“ и „Pred-R²“ е помала од 0,2), што укажува на фактот дека податоците се опишани соодветно со предложениот математички модел. Вредностите на $p < 0,05$, посочуваат на тоа дека сите модели се значајни. Вредностите на „Adequate precision“ беа поголеми од 4, што значи дека сите предложени модели можат да се користат за навигација во дизајн просторот.

Воспоставените математички модели за влијанието на испитуваните независни променливи врз особините на дизајнираните нанолипозомски примероци се прикажани согласно равенките 6-11.

$$D_{50}(nm) = +126,11 - 5,50 * A + 0,44 * B + 0,73 * C - 0,79 * AB + 0,46 * AC + 1,71 * BC + 1,32 * A^2 + 0,74 * B^2 - 1,68 * C^2 + 1,04 * ABC + 3,29 * AB^2$$

(Рав. 6)

$$\text{Апсолутно количество на енкапсулирана RA} = +13,31 + 4,93 * A - 0,25 * B - 0,36 * C - 0,14 * AB + 0,21 * AC - 0,34 * BC - 0,42 * A^2 + 0,042 * B^2 + 0,26 * C^2$$

(Рав. 7)

$$\text{Вкупно количество на ослободена RA по 1 час} = +0,49 + 0,15 * A - 0,059 * B - 0,16 * C + 0,031 * AB + 0,038 * AC + 0,098 * BC$$

(Рав. 8)

$$\text{Вкупно количество на ослободена RA по 4 часа} = +1,25 + 0,25 * A - 0,055 * B - 0,27 * C + 0,16 * AB + 0,15 * AC + 0,20 * BC$$

(Рав. 9)

$$\text{Вкупно количество на ослободена RA по 6 часа} = +1,45 + 0,27 * A - 0,086 * B - 0,27 * C + 0,13 * AB + 0,19 * AC + 0,19 * BC$$

(Рав. 10)

$$\text{Вкупно количество на ослободена RA по 24 часа} = +1,73 + 0,33 * A - 0,10 * B - 0,32 * C + 0,10 * AB + 0,083 * AC + 0,25 * BC$$

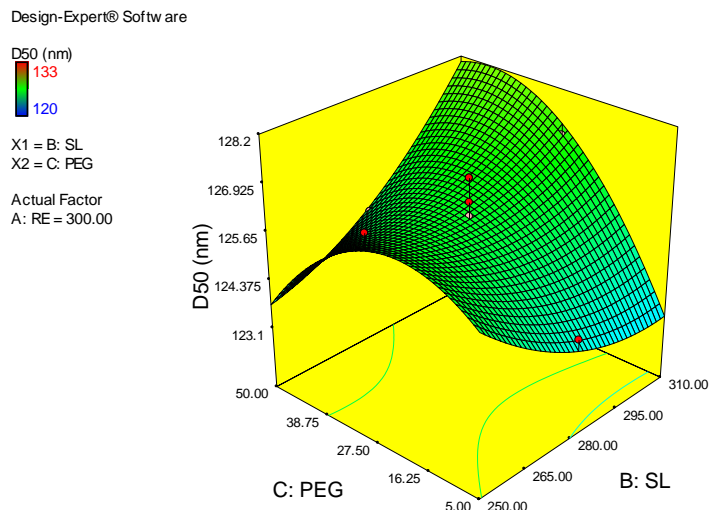
(Рав. 11)

Табела 7. *p* вредности за формулациските варијабли и нивните интеракции со секој од одговорите

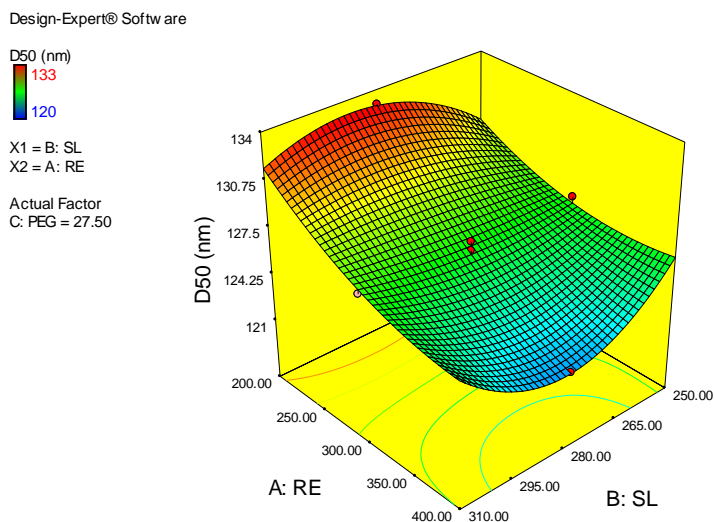
D ₅₀ (nm)		Апс. кол. на енкапс. RA (mg)		Кол. на ослоб. RA (mg) по 1 ч.		Кол. на ослоб. RA (mg) по 4 ч.		Кол. на ослоб. RA (mg) по 6 ч.		Кол. на ослоб. RA (mg) по 24 ч.	
Фактор	<i>p</i>	Фактор	<i>p</i>	Фактор	<i>p</i>	Фактор	<i>p</i>	Фактор	<i>p</i>	Фактор	<i>p</i>
A-RE	< 0,0001	A-RE	< 0,0001	A-RE	0,0008	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										

Како што беше наведено во прегледот на литературата, големината на нано-везикулите влијае врз испораката на терапевтските и дијагностичките агенси до мозокот, како и врз времето на циркулација на везикулите во крвта, таргетирањето, нивниот клеточен транспорт и интернализација и секако, врз кинетиката на ослободување на активната супстанција (Hoshyar et al., 2016; Porfire et al., 2019). Оттука, оптимизирањето на големината на везикулите е клучен сегмент во развојот на нано-носачи за ефикасна испорака на активните компоненти во мозокот (Abreu et al., 2011; Shilo et al., 2015). Добиените равенки за формулациските фактори и нивните интеракции сугерираат дека факторите А, С и интеракциите АВ, ВС, А², С², АВС и АВ² имаат статистички значајно влијание врз D₅₀ ($p < 0,05$). Позитивниот знак пред факторот С и интеракцијата ВС посочуваат на пропорционална зависност помеѓу количината на SL, PEG и D₅₀, што претставува логична претпоставка дека при повисоки концентрации на компонентите присутни во липидниот филм ќе се формираат поголеми NLs (Рав. 5). Од друга страна пак, во текот на анализата на добиените вредности за D₅₀, забележан е тренд на експоненцијално намалување на D₅₀ на испитаните NLs откако количеството на PEG во формулацијата достигнува одредена вредност, при пониски количини на SL (Сл. 5а). Ова е веројатно заради фактот дека при повисока концентрација на PEG, ланците од PEG се поблиску еден до друг на површината на липозомите, што доведува до зголемување на страничните одбивни сили помеѓу молекулите на PEG. Ова одбивање резултира со поголемо закривување и формирање на енергетски стабилни липозоми со помала големина (Labouta et al., 2018). Дополнително, присуството на PEG на површината на нанолипозомите го спречува процесот на агрегација како резултат на стерната (просторна) стабилизација (Nunes et al., 2019).

Негативната вредност пред факторот А укажува дека има спротивна зависност помеѓу D₅₀ и количината на енкапсулиран RE во NL (Сл. 5б). Овие резултати се спротивни на добиените сознанија во текот на прелиминарните студии, но во согласност со резултатите добиени од Tefas et al. (2015) што сугерираат дека високи концентрации на липофилни молекули вметнати во липидниот двослој (во овој случај RE) може да заменат некои од фосфолипидните молекули во липозомите и оттука да резултираат со намалување на нивната големина.



a)



б)

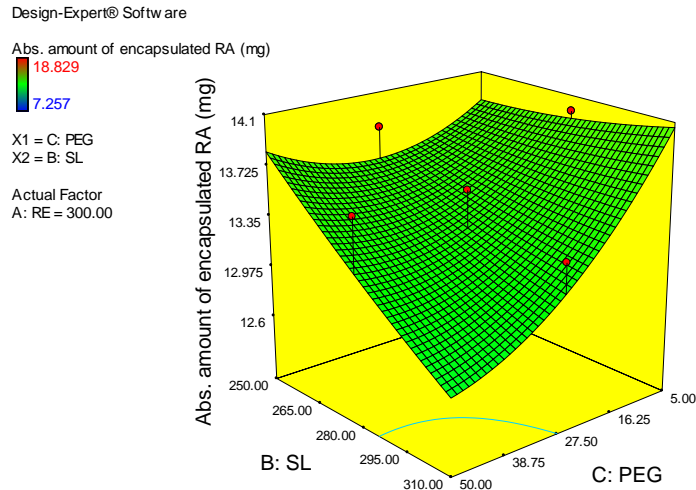
Сл. 5. 3D графички приказ на влијанието на проучуваните варијабли: а) SL и PEG врз D_{50} , б) RE и SL врз D_{50} .

Дополнителен предизвик при формулирањето на софистицираните фармацевтски дозирани форми за парентерална примена што содржат слабо растворливи активни компоненти (пр. компонентите присутни во RE) е пронаоѓањето на ефикасен метод за подготовка што ќе резултира со производ кој ќе содржи доволно висока, односно терапевтски ефикасна концентрација на истите. Притоа, ефикасноста на енкапсулацијата на хидрофобните активни компоненти може да се промени со варијација на видот и количината на растворувач што се користи за растворање, како и количеството на самите активни компоненти (Ong et al., 2016).

Во таа насока, *ANOVA* статистичката анализа ($p < 0,05$) укажа дека формулациските фактори, но и интеракциите: А, В, С, ВС и А² имаат статистички значајно влијание врз апсолутното количество на енкапсулирана РА (Рав. 7). Позитивниот знак пред факторот А сугерира на зголемување на ефикасноста на енкапсулација при зголемување на количината на РЕ во текот на процесот на подготовка, веројатно како резултат на поголемото количество на екстракт достапен за инкорпорирање помеѓу фосфолипидните структури на соја лецитинот (Сл. 6). Наспроти ова, забележана е спротивна зависност помеѓу апсолутното количество на енкапсулиран РА и количествата на SL, PEG и интеракцијата SL-PEG.

Литературните податоци сугерираат дека хидрофобните активни компоненти се сместуваат во ацилните делови од јагледородните синцири на липозомските везикули, па оттука енкапсулацијата зависи од својствата на нивните ацилни синцири, како што се должината и густината на пакувањето на фосфолипидните ланци (Bozzuto и Mollinari, 2015).

Според Kerzyski et al. (2008), инкорпорирањето на СН во липозомскиот двослој резултира со намалена мобилност на хидрофобните ланци на масните киселини и супресија на пенетрацијата на вода во јагледородните делови од двослојот. Ова води кон подобрена ефикасност на инкорпорација на хидрофобните компоненти како што е РЕ во овој дел од липозомот. Исто така, добро е познато дека со намалување на релативниот масен удел на липидите во составот на NLs и на тој начин, зголемување на релативното количество на СН во липидниот двослој, се намалува и движењето на хидрофобните опашки на масните киселини што доведува до намалување на пропустливоста на липидниот двослој и оттука, ефикасно заробување на активните компоненти во липозомската структура (Sailor et al., 2015; Tefas et al., 2016). Покрај тоа, присуството на СН во липидниот двослој може да генерира т.н. „дебови“, кои овозможуваат поволна интеракција на липидот со молекулите на липофилните активни компоненти. Оттука, поголемиот релативен удел на СН во однос на мембранските липиди во испитуваните примероци на NLs би значело и подобрена стабилност во смисол на задржување на овие компоненти во овој дел од везикулите (Xu et al., 2012).

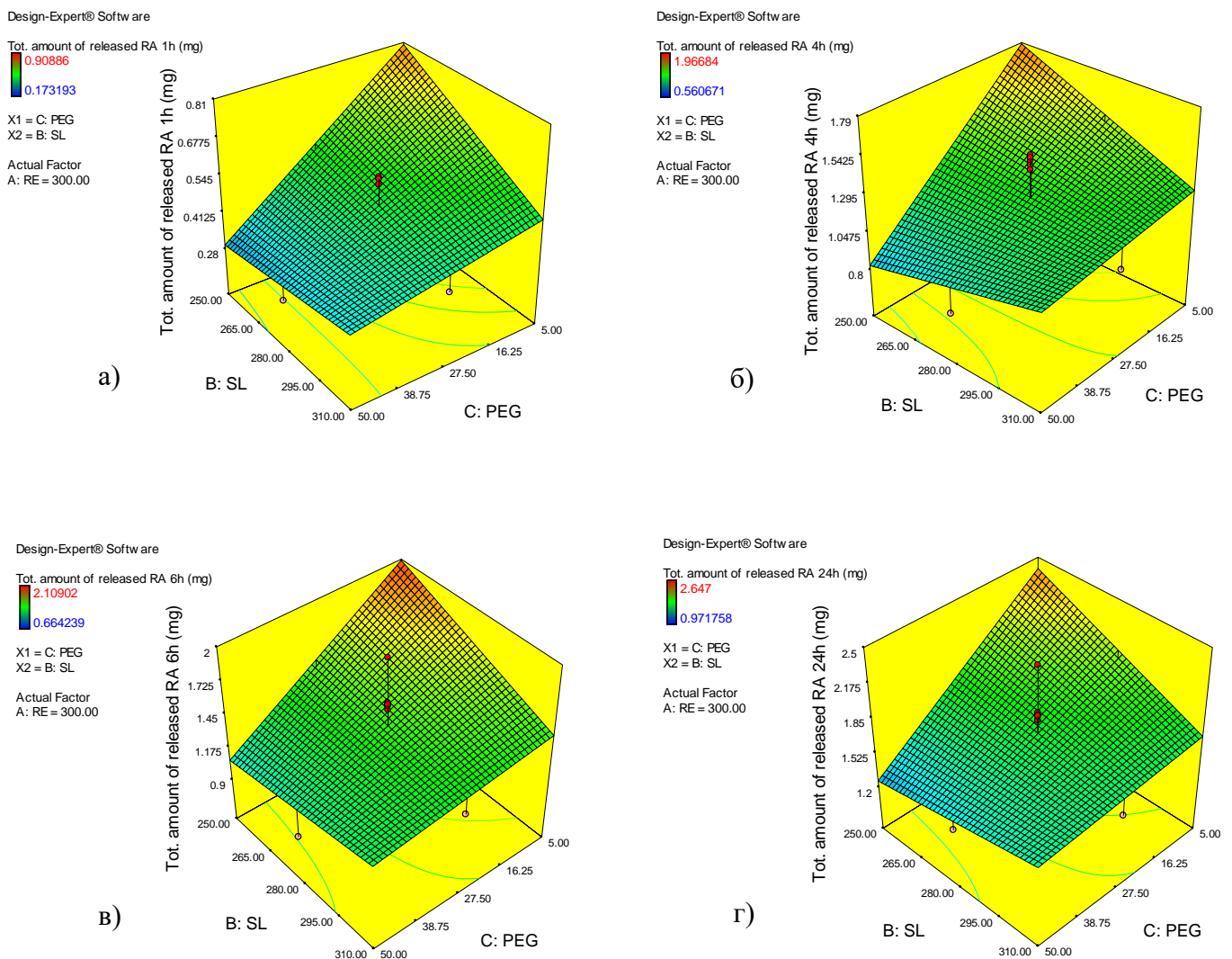


Сл. 6. 3D графички приказ на проучуваните варијабли (SL и PEG) врз апсолутното количество на енкапсулирана RA.

Добро е познато дека за постигнување на ефикасно терапевтско дејствување, а истовремено и намалување на несаканите ефекти потребно е да се исполнат неколку предуслови меѓу кои е и одржувањето на ефективна терапевтска концентрација на активните компоненти во крвта, односно во местата на делување. Оттука, освен целното ослободување на енкапсулираните компоненти, еден од клучните фактори што игра улога во нивната ефикасност претставува и контролираниот начин на нивно ослободување. Па така, со цел да се добијат оптимални формулации на NLs коишто ќе се карактеризираат со продолжено ослободување на екстрактот по доспевање на целното место на делување, т.е. во мозокот, и на тој начин ќе овозможат одржливи нивоа на активните компоненти во неговите структури, од исклучителна важност беше да се согледа влијанието на формулациските фактори врз брзината на ослободување на RE од везикулите.

Податоците од статистичката анализа укажаа дека значајни фактори што влијаат на ослободувањето на RA по 1, 4, 6 и 24 часа се: A, C, BC ($p < 0,05$). Притоа, вкупното количество на ослободен RA во период од 24 часа беше обратно корелирана со зголемувањето на количеството на PEG во формулацијата (Рав. 8-11, Сл. 7). Овие резултати се во согласност со литературните податоци што сугерираат дека хидрофобните долги алкилни ланци на PEG како полимер за стерна стабилизација може да дејствуваат како бариера за дифузија на активните компоненти и оттука ефикасно да го успорат нивното ослободување (Panwar et al., 2010).

Дополнително, беше забележано дека поголема количина на ослободен RA во дефинираните временски периоди се добива не само при намалување на концентрацијата на PEG, туку и со намалување на количината на SL, што претходно резултираше со пониски D_{50} на подготвените NLs. Логично објаснување за овој ефект би можел да биде фактот што кај помалите везикули, дифузискиот пат што треба да го помине активната компонента до површината е пократок, па затоа се очекува и истата побрзо да се ослободува (Porfire et al., 2019).



Сл. 7. 3D графички приказ на проучуваните варијабли (SL и PEG) на вкупното количество на ослободена RA по: а) 1 час, б) 4 часа, в) 6 часа, г) 24 часа.

По воспоставување и анализирање на соодветните модели за сите испитани одговори беше направена оптимизација на формулациите на NLs во насока на добивање

на нанолипозоми кои ќе се карактеризираат со минимална големина, максимално количество на енкапсулирана RA и соодветни *in vitro* профили на ослободување на RA (комбинации од минимално и максимално количество на ослободена RA по 1, 4, 6 и 24 часа) (Табела 8). Главната цел беше да се постигне продолжено време на циркулација и ефикасен транспорт на везикулите низ КМБ, контролирано и продолжено ослободување како и постигнување на релативно високи/терапевтски концентрации на RE во мозочните ткива.

Предложените решенија за оптималните формулации и претпоставените одговори се дадени во Табела 9.

Табела 8. Оптимизација со користење на Експериментален дизајн

	RE (mg)	SL (mg)	PEG (mg)	D ₅₀ (nm)	Апс. кол. на енкапс. RA (mg)	Кол. на ослоб. RA (mg) по 1 ч.	Кол. на ослоб. RA (mg) по 4 ч.	Кол. на ослоб. RA (mg) по 6 ч.	Кол. на ослоб. RA (mg) по 24 ч.
Долна граница	200	250	5	120	7,26	0,17	0,56	0,66	0,97
Горна граница	400	310	50	133	18,83	0,91	1,97	2,11	2,65
Важност	3	3	3	5	5	3	3	3	3
NL1	Во опсег	Во опсег	Во опсег	мин.	макс.	мин.	мин.	мин.	макс.
NL2	Во опсег	Во опсег	Во опсег	мин.	макс.	макс.	макс.	макс.	макс.
NL3	ЦЕЛ	Во опсег	Во опсег	Во опсег	мин.	макс.	мин.	мин.	мин.
NL4	Во опсег	Во опсег	Во опсег	мин.	макс.	макс.	мин.	мин.	макс.
NL5	Во опсег	Во опсег	Во опсег	мин.	макс.	макс.	мин.	мин.	мин.

Табела 9. Предложени решенија за оптимални формулации и претпоставени одговори

Форм. бр.	RE (mg)	SL (mg)	PEG (mg)	D ₅₀ (nm)	Апс. кол. на енкапс. RA (mg)	Кол. на ослоб. RA по 1 ч. (mg)	Кол. на ослоб. RA по 4 ч. (mg)	Кол. на ослоб. RA по 6 ч. (mg)	Кол. на ослоб. RA по 24 ч. (mg)	Посакуваност
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

5.3. Карактеризација на оптималните NLs

5.3.1. Физичко-хемиска карактеризација на NLs

Како што веќе беше дискутирано низ прегледот на литературата, големината и површинската наелектризираност на липозомските везикули значајно влијаат врз нивната *in vitro* стабилност, а дополнително ја диктираат и нивната судбина *in vivo* од аспект на постигнување на продолжено време во циркулацијата, можноста за премин низ различни бариери, вклучувајќи ја и КМБ, како и стапувањето во специфични интеракции со клеточните структури. Од друга страна пак, ефикасното полнење на овие нано-носачи со активни компоненти би значело енкапсулирање на истите во количества соодветни за да се постигне терапевтската доза со истовремена минимална загуба, што понатаму би се одразило позитивно врз нивниот клинички ефект (Drummond et al., 2010).

Средната големина (D_{50}) на подготвените оптимални формулации се движеше во опсег од $116 \pm 2,25$ до $122 \pm 4,30$ nm и истите се карактеризираа со тесна унимодална дистрибуција (SPAN фактор ~ 1) (Табела 10). Овие вредности за големината на везикулите се значајни од аспект на постигнување на продолжено време на циркулација на нано-системите, како и нивен ефикасен транспорт низ КМБ. Како што може да се забележи, формулациите подготвени со 50 mg PEG на површината (примероци NL1, NL3, NL5) имаа помалку негативни вредности за ZP (~ -20 mV) во споредба со ZP (~ -45 mV) на NL2 и NL4 (примероци штоо содржат 5 mg PEG на површината). Резултатите укажуваат дека со намалување на концентрацијата на хидрофилниот полимер на површината, доаѓа до израз негативниот полнеж на структурните липиди кои влегуваат во состав на двослојот на NLs, што исто така води до намалување на ZP. Дополнително, литературните податоци сугерираат дека присуството на PEG на површината на везикулите ја намалува електрофоретската подвижност на NLs поради хидродинамичкиот отпор што го дава овој полимер, финално резултирајќи со помалку негативен ZP на липозомските структури (Nakamura et al., 2012; Nunes et al., 2019).

EE (%) се движеше од $80,94 \pm 3,67$ до $93,15 \pm 2,43\%$, додека пак ИЛ беше во опсег од $3,53 \pm 0,10$ до $4,28 \pm 0,11$ mg RA/100 mg липид (Табела 10). Овие два параметри варираа во зависност од формулациските променливи, како што се: однос и количина на компонентите на липидната фаза, како и однос на PEG и затоа не беше можно воспоставување на зависност помеѓу количините на компонентите на формулацијата и EE%. Ваквите резултати беа очекувани, со оглед на тоа што овој ефект најверојатно е

поврзан со стабилноста на везикулите, како и со сложената интеракција помеѓу формулациските компоненти.

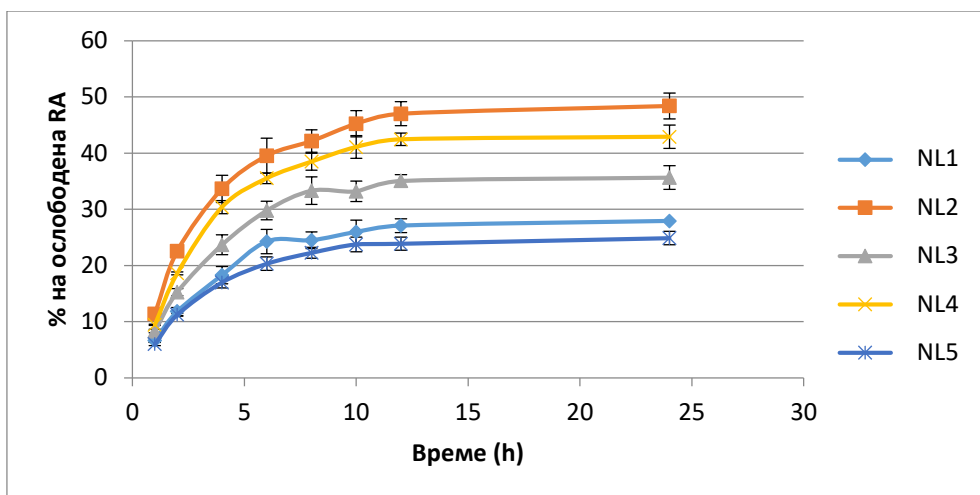
Табела 10. Физичко-хемиски својства на оптималните NLs

Примерок	D ₅₀ ±SD (nm)	SPAN фактор	ZP (mV)	EE (%)	ИЛ mg RA/100 mg липид
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

5.3.2. In vitro определување на брзината на ослободување на RA од NLs

In vitro студиите на брзината на ослободување на RA од оптималните формулации (Сл. 8) покажаа дека подготвените липозомски дисперзии се карактеризираат со продолжено ослободување на RA (од 24,83±1,22 до 48,39±2,32% во период од 24 часа), при што беше забележана обратна зависност помеѓу брзината на ослободување и количината на PEG присутна на површината на нано-системите. Имено, формулациите NL1, NL3 и NL5 каде што PEG беше присутен во поголемо количество (примероци со 50 mg PEG) резултираа со побавно ослободување на маркер компонентата (24,83±1,22 - 35,64±2,12% RA ослободена во текот на 24 часа), што беше добиено и во прелиминарните студии (Shalabalija et al., 2017).

Како што беше напоменато и во претходните сегменти, се претпоставува дека за овој ефект придонесуваат долгите хидрофобни алкилни ланци на PEG што најверојатно дејствуваат како дифузиска бариера за RA и истата ја заробуваат (Panwar et al., 2010). Земајќи го во предвид липофилниот карактер на RA, дополнителен можен механизам што ја објаснува оваа разлика во брзината на ослободување од различните формулации на NLs е брзата хидратација што се јавува како резултат на присуството на PEG на површината на везикулите (Begum et al., 2012). Спротивно на тоа, формулациите NL2 и NL4, кои се карактеризираат со пониска концентрација на PEG во формулацијата, покажаа побрзо ослободување на RA во текот на 24 часа (48,39±2,32 и 42,90±2,07%, соодветно).



Сл. 8. In vitro профили на ослободување на RA од оптималните NLs.

Со помош на софтверот DDSolver 1.0, беа пресметани различни кинетички модели за евалуација на ослободувањето на RA од подготвените формулации Врз основа на добиените коефициенти на корелација ($R^2 > 0,897$), најсоодветниот модел што најдобро ја опишува кинетиката на ослободување на RA од подготвените NLs беше моделот на Peppas-Sahlin. Високите вредности за k_1 ($> 11,149 \text{ h}^{-n}$) посочија дека преовладувачкиот механизам на ослободувањето на RA од nano-везикулите е процесот на дифузија (Табела 11) (Mady, 2013).

Табела 11. Резултати од анализираниите модели за кинетиката на ослободување на RE од NL1-NL5

Формулација	Прв ред		Higuchi		Korsmeyer-Peppas			Peppas-Sahlin			
	k (h^{-1})	R	k ($\text{mg}/\text{h}^{1/2}$)	R	K (h^{-n})	n	R	k_1 (h^{-n})	k_2 (h^{-n})	m	R
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

5.3.3. Определување на антиоксидативен капацитет (ORAC анализа) на NLs и RE

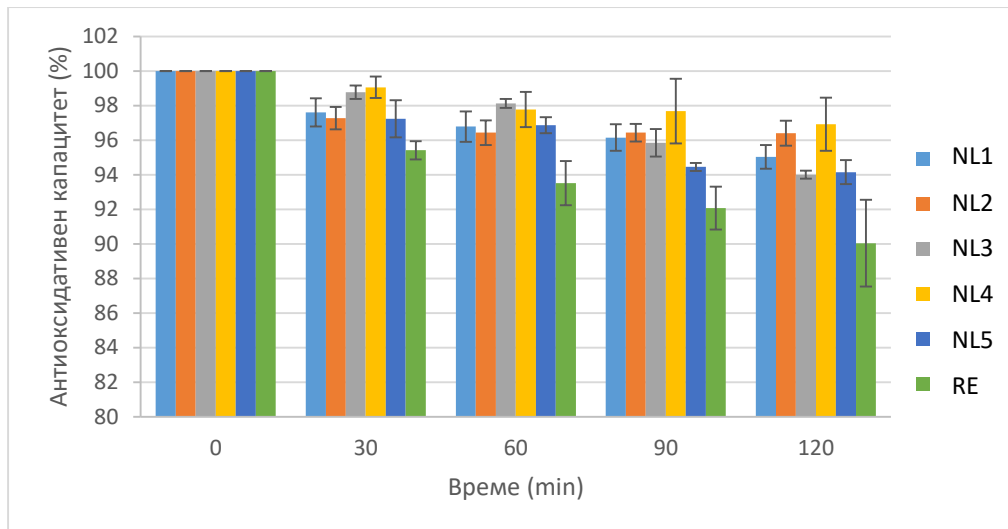
Зголеменото производство на реактивни кислородни видови (ROS) е поврзано со губење на митохондријалната функција, променета хомеостаза на металите и намалена антиоксидативна одбрана. Овие настани директно влијаат на синаптичката активност и

невротрансмисијата во неврните, а исто така предизвикуваат оштетувања на клеточните структури што доведува до штетен ефект, односно когнитивна дисфункција и прогресија на АБ (Wang et al., 2014). Научните податоци сугерираат дека Аβ е редокс-активен пептид што придонесува до намалување на концентрацијата на преодните метали како што се Cu^{2+} и Fe^{3+} и понатаму доведува до генерирање на ROS. Дополнително, оксидацијата и агрегацијата на мозочните протеини може да влијае на ензимите што се клучни за функциите на неврните и глијалните клетки, како и формирањето на неврофибриларните клопчиња. Оксидацијата на ДНК може да резултира со прекини во веригите, размена на сестрински хроматиди, вкрстено поврзување помеѓу ДНК и протеините и дополнителни модификации на нуклеинските бази. Имајќи предвид дека фосфолипидите на мозочната мембрана се составени од полинезаситени масни киселини, може да се каже дека мозокот е особено ранлив на напади на слободните радикали (Huang et al., 2016; Tonnie and Trushina, 2017).

Како што беше наведено претходно, компонентите на RE покажуваат мултифункционални својства, вклучително и чистење на слободните радикали, хелирање на металите и активирање на антиоксидативните патеки, што води до индукција на генската транскрипција за различни антиоксидативни ензими и истовремено придонесуваат за намалување на полимеризацијата и токсичноста на Аβ.

Како што може да се забележи од Сл. 9, сите оптимални примероци на NLs (NL1-NL5) беа релативно стабилни во текот на експериментот и покажаа статистички значајно поголем антиоксидативен капацитет ($>94,15 \pm 1,78\%$) во споредба со чистиот RE ($90,04 \pm 2,51\%$) ($p < 0.0048$).

Значајно е да се истакне дека формулациите со поголем удел на SL во липидниот филм (примероци NL2 и NL4), резултираа со подобар антиоксидативен капацитет во период од 120 мин ($96,40 \pm 0,73$ и $96,92 \pm 1,54\%$, соодветно) во однос на другите три формулации (примероци NL1, NL3 и NL5) ($<95,03\%$), што е очекувано поради фактот што NL2 и NL4 се карактеризираат и со најбрзо *in vitro* ослободување во период од 2 часа ($22,57 \pm 0,73$ и $18,06 \pm 0,25\%$ на RA, соодветно).



Сл. 9. Антиоксидативен капацитет на чист RE и на оптималните формулации на NLs.

Согласно графичкиот приказ, различните вредности за антиоксидативниот капацитет се должат не само на различните профили на продолжено ослободување на RE од подготвените липозомски формулации, туку и на синергистичкиот антиоксидативен ефект на компонентите во RE и SL, присутни во составот на фосфолипидниот двослој на овие везикули. Согласно литературните податоци, фосфатидилхолинот (FH) и фосфатидилетаноламинот (FE) како главни компоненти на SL, својот антиоксидативен ефект го остваруваат преку комплексирање и „отстранување“ на метали, како и обновување на оксидираните молекули со донирање на водороден атом. Дополнително, докажана е и позитивната корелација помеѓу количеството на FE и FH и постигнатиот антиоксидативен ефект (Cabezas et al., 2012), што е во прилог на нашите резултати.

5.3.4. Студии за определување на апсорпција на протеини на NLs (Брадфорд анализа)

Како што беше претходно споменато, при интравенска примена на нанолипозомите, плазма протеините формираат динамичен слој околу нано-системот, т.н. протеинска корона (ПК). Оваа корона им дава нов биолошки идентитет на нано-системот и значително влијае на нивната судбина *in vivo* (Corbo et al., 2015; Palchetti et al., 2019).

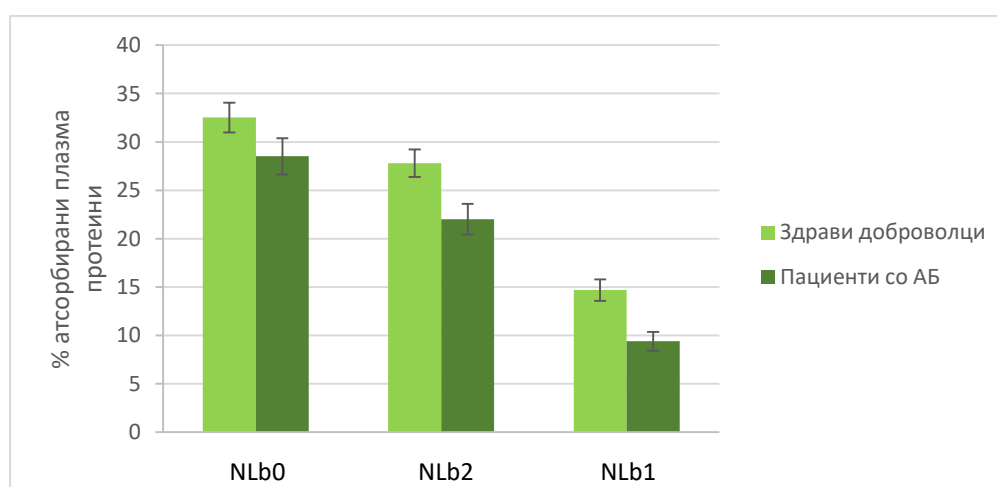
Во тек на OFAT експериментите, беше покажано дека зголемувањето на количината на PEG е проследено со намалување на процентот на апсорбиран BSA на

површината на нано-везикулите (Shalabaliija et al., 2017). Затоа, во оваа фаза од истражувањето беше потребно да се разгледаат интеракциите помеѓу NLs и хуманите плазматски протеини со цел да се добијат порелевантни информации за процесот на формирање на ПК *in vivo*.

Од таа причина, беа подготвени празни формулации на NLs (примероци без инкорпориран екстракт NLb1 и NLb2, кои содржат 50 и 5 mg PEG, соодветно) и формулација без PEG во површината (примерок NLb0). Истите беа инкубирани 1 час во човечка плазма од здрави доброволци и човечка плазма од пациенти со АБ. Резултатите од студиите за атсорпција на протеини се прикажани на Сл. 10.

Како што беше очекувано, најмал процент на плазматските протеини беше атсорбиран на површината на формулацијата NLb1 со 50 mg PEG ($14,69 \pm 1,11$ и $9,39 \pm 0,99\%$ по 1 час инкубација во хумана плазма од здрави доброволци и пациенти со АБ, соодветно). Спротивно, најголемата количина на атсорбирани плазматски протеини ($32,52 \pm 1,54$ и $28,52 \pm 1,86\%$, по 1 час инкубација во хумана плазма од здрави доброволци и пациенти со АБ, соодветно) беше забележана на површината на везикулите без PEG (примерок NLb0).

Добиените резултати се во согласност со литературните податоци што потврдуваат дека присуството на PEG на површината на липозомските везикули го спречува формирањето на ПК, по што доаѓа до намалување на нивното преземање од страна на мононуклеарниот фагоцитен систем и со тоа се продолжува времето на нивна циркулација во крвта (Sahil et al., 2011).



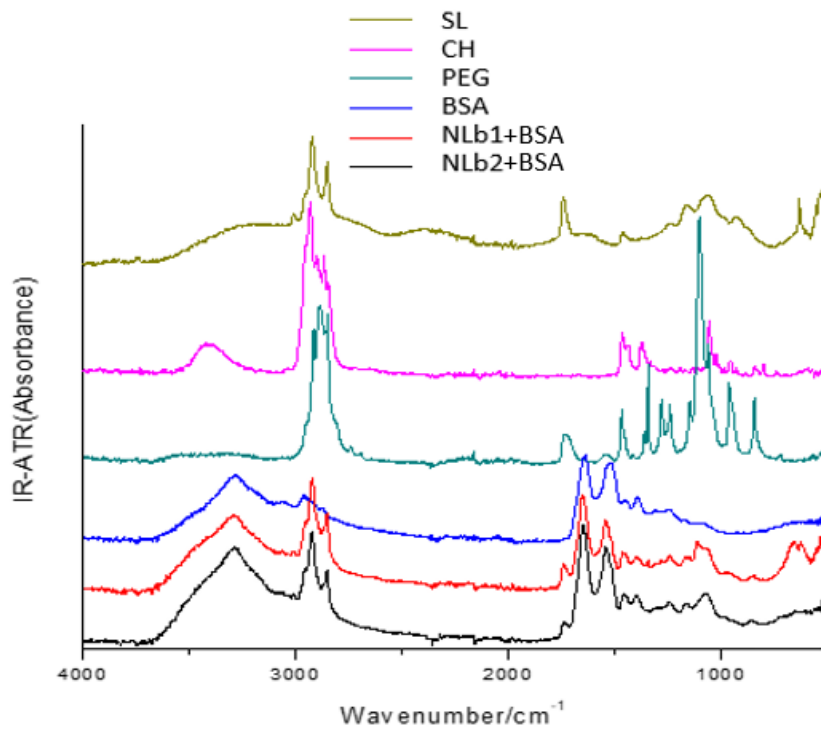
Сл. 10. Атсорбирани плазматски протеини на површината на NLb1, NLb2 и NLb0.

5.3.5. IR – ATR спектроскопски анализи на NLs

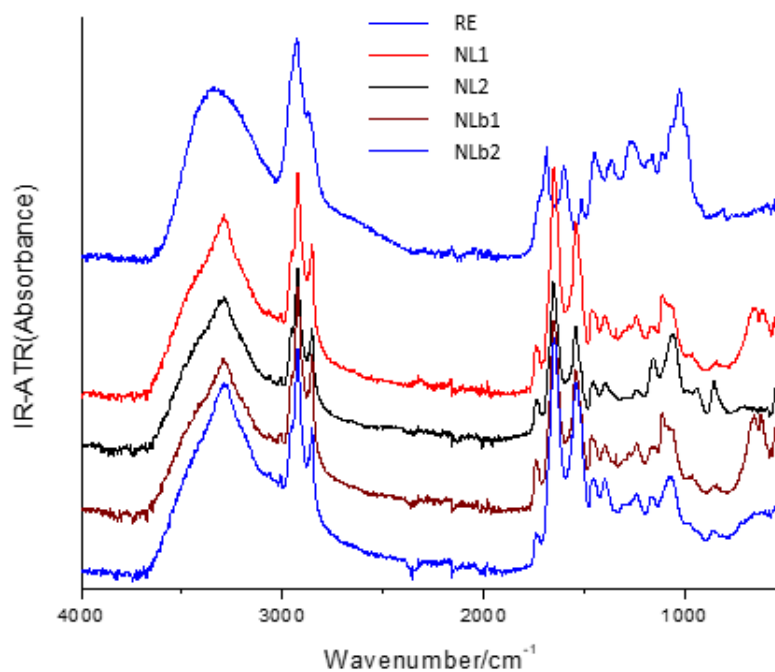
По квантитативното определување на количеството адсорбирани протеини на површината на нано-везикулите, во следната фаза од оваа докторска дисертација беше од исклучителна важност да се добијат подетални сознанија за природата на формираните липозом-протеин врски и подетално да се испита како уделот на PEG во везикулите влијае врз јачината на овие врски. Дополнително, со цел да се предвиди стабилноста на оптималните формулации *in vivo*, во овој стадиум од истражувањата значајно беше да се увидат и можните интеракции помеѓу составните компоненти на NLs. Па оттука, за овие потреби беше направена IR-ATR спектроскопска анализа каде што покрај спектрите на составните компоненти на NLs (SL, CH, PEG, RE) и чистиот BSA, беа снимени и спектрите на формулациите што содржат 50 и 5 mg на PEG (примероци NL1 и NL2, соодветно), нивните празни аналогни формулации без инкорпориран екстракт (примероци NLb1 и NLb2), како и комплексите формираны помеѓу BSA и празните липозомски везикули после нивна едночасовна инкубација (примероци NLb1-BSA и NLb2-BSA).

Како што може да се забележи од Сл. 11, главниот придонес во спектрите од комплексите на обете празни формулации со BSA (примероци NLb1-BSA и NLb2-BSA) доаѓа од SL (доминантната компонента во однос на масениот удел) заедно со PEG и BSA, што имплицира на феноменот на формирање на ПК. Меѓутоа, во овие примероци беа отсутни спектралните ленти на CH најверојатно поради фактот дека неговото количество во формулациите беше прилично ниско (30 mg).

Понатаму, со цел да се истражи влијанието на енкапсулацијата на RE врз стабилноста и структурата на везикулите, беа снимени спектрите на чистиот екстракт, како и спектрите на NLs со енкапсулиран RE (примероци NL1 и NL2) и нивните празни анализи (примероци NLb1 и NLb2) (Сл. 12).



Сл. 11. IR-ATR спектри на SL, CH, PEG, BSA, NLb1 и NLb2.



Сл. 12. IR-ATR спектри на RE, NL1 и NL2 конвертирани во апсорбанци и ATR коригирани; Спектрите на NLb1 и NLb2 се дадени за компарација.

Од графичките прикази може да се увиди дека RE се карактеризира со силни ленти во делот помеѓу Амид I и Амид II регионите, т.е. $1700 - 1500 \text{ cm}^{-1}$, со изразени ленти на 1687 и 1602 cm^{-1} . Исто така, силна лента беше забележана и на 1027 cm^{-1} . Споредбата помеѓу спектрите на NLb1 и NLb2 и NL1 и NL2, соодветно, претставени на Слика 12 покажаа дека полните формулации ги имаат речиси истите спектрални карактеристики како и празните липозоми. Причината за отсуството на лентите на RE во спектрите кај примероците NL1 и NL2, и покрај неговата најголема масена фракција во формулациите, веројатно се должи на инкорпорирањето на RE во везикулите, чијшто фосфолипиден двослој најверојатно е подебел од длабочината на пенетрација на зракот.

Со цел да се утврди влијанието на количеството на PEG врз својствата на водородните врска помеѓу BSA и NLs, беше направена деконволуција и фитовање на спектрите на комплексите помеѓу BSA со NLb1 и NLb2, соодветно. Брановите должини на добиените ленти, во опсегот на регионот Амид I/II со нивните прелиминарна асигнација се дадени во Табела 12.

Табела 12. Бранови должини на ленти во Амид I и II регионите за комплексите помеѓу BSA со NLb1 и NLb2 со нивни прелиминарни асигнации

$\nu(\text{BSA})/\text{cm}^{-1}$	$\nu(\text{NLb1-SCA})/\text{cm}^{-1}$	$\nu(\text{NLb2-BSA})/\text{cm}^{-1}$	Прелиминарна асигнација
1686	1680	1683	Амид I
1643	1657	1653	Амид I
	1641	1628	Амид I
1582	1579	1577	COO ⁻ странична група
1537	1541	1538	Амид II
1512	1515	1513	Амид II
1495	1497	1495	Амид II
1448	1467	1466	CH лента
	1453		CH лента
	1401	1399	COO ⁻ странична група
1394			COO ⁻ странична група

Од Табела 12 може да се забележи дека фреквенциите на чистиот BSA и неговите фреквенции во комплекс со примероците NLb1 и NLb2 се различни. Овие резултати потврдуваат дека присуството на други компоненти во липозомските везикули како што се: CH, SL и PEG играат клучна улога во секундарната структура на протеинот и јачината на формираните водородни врски. Првата од лентите на нанолипозом-BSA комплексите во Амид I регионот се карактеризираше со пониска фреквенција отколку

онаа на чистиот BSA, што би сугерирало дека водородните врски се посилни кај протеинските комплекси со примероците NLb1 и NLb2, отколку во чистиот примерок на BSA, бидејќи лентата во Амид I регионот генерално потекнува од C=O вибрациите (Gradolnik and Marechal, 2001).

Кај вторите ленти во истиот овој регион беше забележан обратен ефект. Но сепак, кога го насочуваме нашето внимание кон Амид II регионот, може да се забележи дека сите ленти во овој регион, кои потекнуваат од примероците NLb1 и NLb2 со адсорбиран BSA имаат повисоки фреквенции отколку чистиот BSA. Ова сугерира на посилно водородно поврзување во примероците, земјаќи предвид дека спектралните ленти во Амид II регионот е спрегнато C-N издолжување и во рамнина N-H деформираща деформација (Gradolnik and Marechal, 2001). Имено, колку што е посилна водородната врска на водородниот атом од N-H групата, толку е поголема фреквенцијата на лентата, бидејќи Амид II е примарно под влијание на промените во N-H водородната врска (Myshakina et al., 2005). Од Табела 12, дополнително може да се увиди дека сите ленти во Амид II регионот кај комплексот со примерокот NLb1 што содржи 50 mg на PEG како полимер за стерна стабилизација имаат повисока фреквенција од соодветните ленти кај комплексот со NLb2 што во својот состав има десет пати помало количество од полимерот, што имплицира на фактот дека водородните врски помеѓу BSA и NLb1 се посилни отколку со NLb2. Ова не е невообичаено бидејќи е добро покажано дека количината на PEG игра важна улога во формирањето на водородните врски со BSA (Tattini Jr et al., 2005). Оттука, примерокот со NLb1 се карактеризира со посилни водородна врска помеѓу PEG и BSA, најверојатно поради поголемата содржина на PEG, а со тоа и поголемиот број на етилен гликолски поединици достапни за интеракција со водородниот атом од N-H групата на BSA.

5.3.6. Стабилност на NLs во физиолошки релевантни медиуми, човечка плазма и медиум за клеточна култура

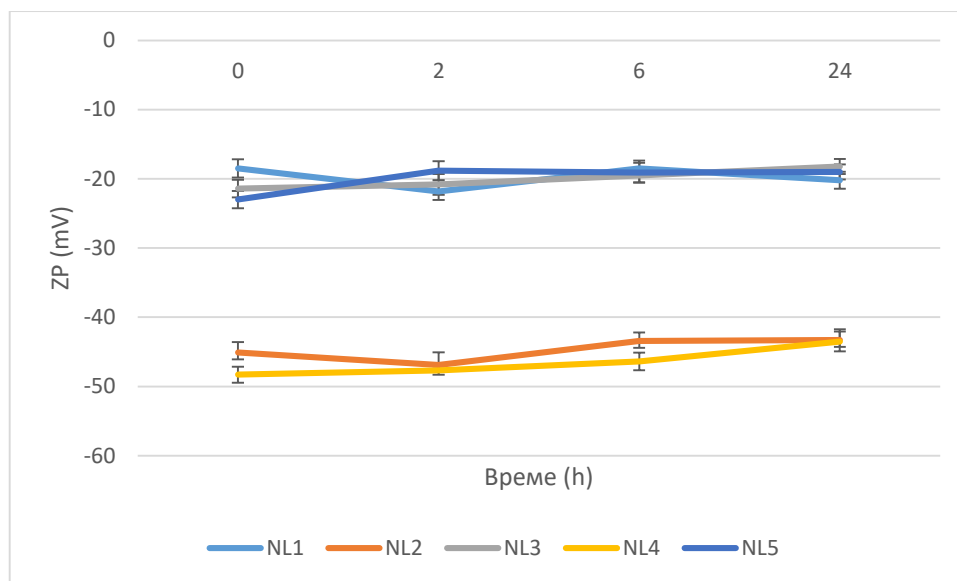
По интравенска примена *in vivo*, нанолипозомските везикули циркулираат во крвотокот сè додека не ја достигнат одредената цел на дејствување. Добро е познато дека серумските компоненти може да имаат деструктивно влијание врз структурата на овие системи, предизвикувајќи нарушување на фосфолипидниот двослој и следствено, истекување на енкапсулираните активни компоненти. Од друга страна пак, постојат докази дека врзувањето на плазма протеините на површината на нано-везикулите може

да промовира нивна агрегација (Mady, 2011). Имајќи предвид дека формираната ПК на површината на везикулите ги менува нивните површински својства, присуството на протеини во клеточниот медиум исто така може позитивно или негативно да влијае врз интернализацијата и на катјонските и на анјонските нано-носачи во клетките (Behzadi et al., 2017).

Затоа, со цел за да се постигне продолжено ослободување на активните компоненти од RE и воедно, ефикасна акумулација во мозочните ткива *in vivo*, од суштинско значење беше да се испита стабилноста на NLs *in vitro*, не само во физиолошки релевантен медиум pH 7,4, туку и во хуманата плазма, како и во мозочното клеточно опкружување (EndoGRO-MV Complete Culture Media Kit SCME004 - медиум за клеточна култура за hCMEC/D3 клеточна линија која симулира човечка крвно-мозочна бариера).

Имајќи предвид дека Z-средната големина на честичките и ZP се ефективни алатки за добивање на релевантни информации во однос на состојбата на површината на нано-системите и процесот на агломерација, како и за предвидување на нивната долгорочна стабилност, D_{50} (nm), PDI и ZP (mV) на формулираните примероци (NL1-NL5) беа измерени на почетокот на експериментот и во различни временски интервали (2, 6 и 24 часа) по нивната инкубација во горенаведените медиуми.

Во физиолошки релевантен медиум, фосфатен пуфер pH 7,4, дијаметарот (D_{50}) на свежо подготвените оптимални формулации на NLs беше во опсег од $107,2 \pm 2,38$ до $113,7 \pm 1,95$ nm со релативно тесен PDI $\sim 0,27$ и просечен ZP од $-18,5 \pm 1,32$; $-21,4 \pm 1,28$ и $-23,0 \pm 1,23$ mV за NL1, NL3 и NL5, соодветно и $-45,1 \pm 1,52$ и $-48,3 \pm 1,17$ mV за NL2 и NL4 (Сл. 13). Не беа забележани значителни промени во просечната големина на везикулите за време од 24 часа инкубација ($p > 0,7795$ за сите формулации), ниту пак во ZP на формулациите ($p > 0,8475$), што сугерираше на стабилноста на нативните формулации.



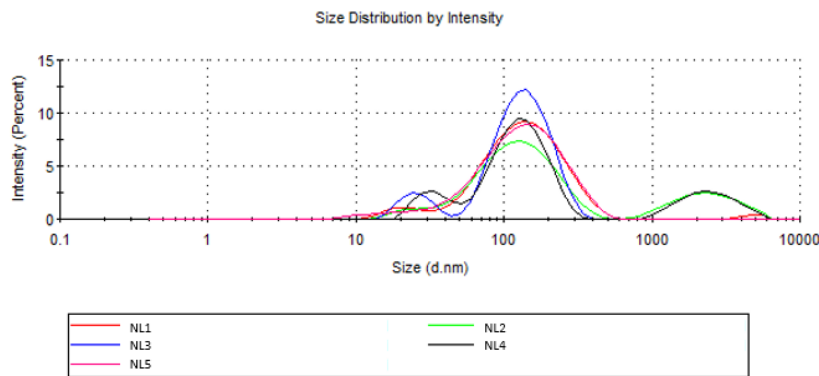
Сл. 13. ZP на NL1-NL5 во фосфатен пуфер рН 7,4 во период од 24 часа (n=6).

По 24 часовна инкубација во човечка плазма, видливо беше зголемување на средната големина ($D_{50} = 111 \pm 1,22 - 123,6 \pm 2,15$ nm со PDI 0,3) за NL1-NL5 (Сл. 14). Појавата на фракцијата на везикули со $D_{50} > 1000$ nm за NL2 и NL4 веројатно беше резултат на агрегацијата промовирана од адсорбираните протеини на површината (Konduru et al., 2017).

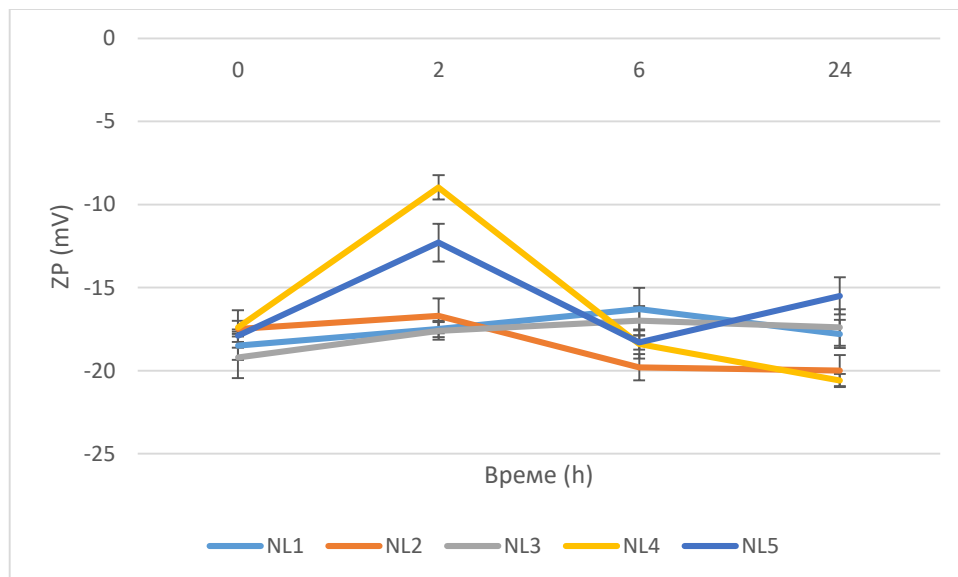
Како што веќе беше покажано во студиите за адсорпција на протеини, NL2 и NL4 покажуваат тенденција за врзување на протеините на нивната површина во повисок % поради помалата количина на PEG (5 mg) во нивниот состав. Дополнително, од графичкиот приказ (Сл. 15) може да се забележи намалување на почетната вредност за ZP од $-45,1 \pm 5,2$ и $-48,3 \pm 1,17$ mV на $-17,5 \pm 1,13$ и $-17,4 \pm 0,4$ mV за NL2 и NL4, соодветно. Имајќи предвид дека наночестичките ослободени во биолошките флуиди веднаш се покриени со биомолекули кои ја менуваат нивната големина и физичко-хемиски својства (Hadjidemetriou и Kostarellos, 2017), добиените податоци беа во согласност со наодите на Bulundell et al. (2016) каде што е покажано дека промената на ZP кон помалку негативни вредности се должи на адсорбираните протеини на површината на NLs. Со оглед на тоа што нативните формулирани примероци (NL1-NL5) беа суспендирани во фосфатен пуфер рН 7,4, очекувано е албуминот присутен во човечката плазма да ја заземе најголемата површина на NLs бидејќи процесот на адсорпција се одвива на рН најоддалечена од неговата изоелектрична точка.

За време на испитниот период од 24 часа, NL2 и NL4 резултираа со благо намалување на ZP кон помалку негативни вредности во текот на првите 2 часа (-

16,7±1,05 и -8,97±0,73 mV). Следствено, по 6 часа и потоа до 24 часа, беше добиена понегативна вредност за ZP (~ -20 mV) (Сл. 15). Ваквите резултати најверојатно се должат на динамичниот процес на формирање на ПК, односно постојаната адсорпција и десорпција на протеини (Blundell et al., 2016). Дополнително, не беше забележано значително намалување на почетната вредност за ZP кај примероците NL1, NL3 и NL5, при нивно суспендирање и инкубација во човечка плазма во периодот од 24 часа ($p>0,5414$).



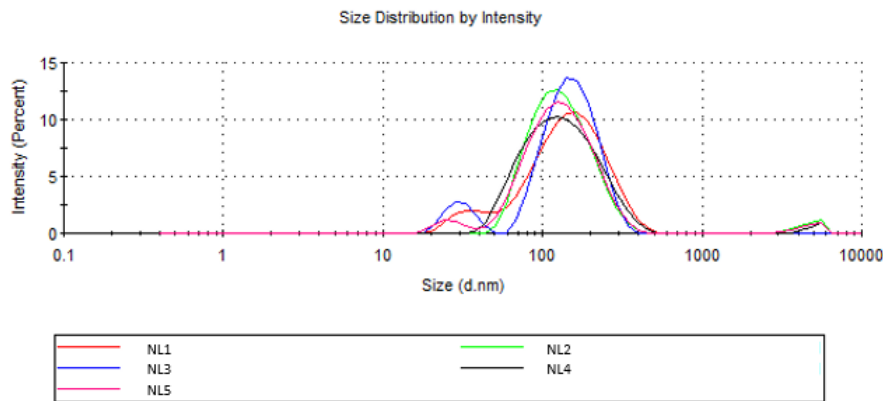
Сл. 14. Дистрибуција по големина на NL1-NL5 по инкубација од 24 часа во човечка плазма ($n=6$).



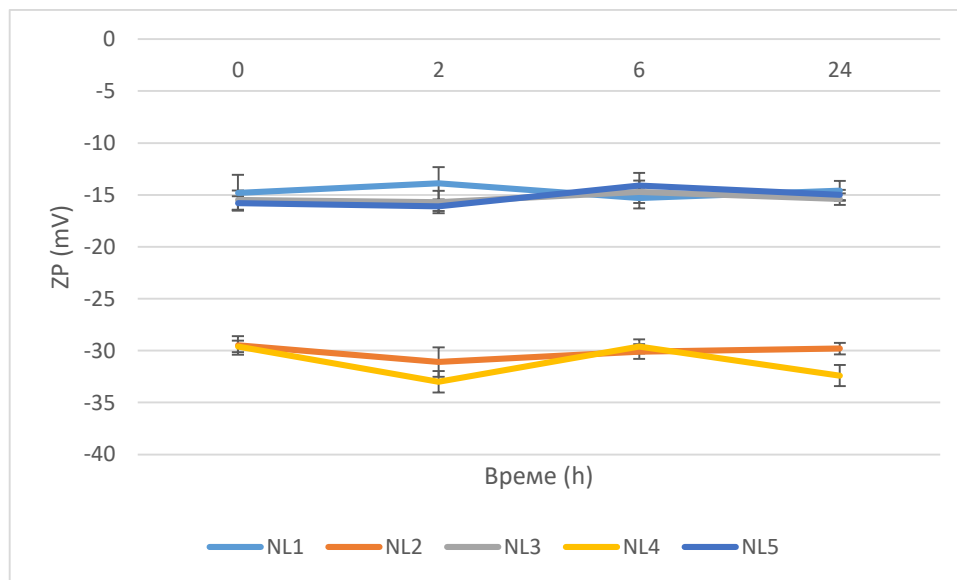
Сл. 15. ZP на NL1-NL5 во човечка плазма во период од 24 часа ($n=6$).

Средниот Z-дијаметар на NLs во периодот од 24 часовна инкубација во клеточниот медиум беше во опсег од 108,1±2,53 до 110,6±2,14 nm (PDI~0,30) ($p<0.0225$)

(Сл. 16), додека пак просечните ZP вредности за примероците NL1, NL3 и NL5 што содржат 50 mg на PEG беа $-14,6 \pm 1,65$, $-15,4 \pm 0,78$ и $-15,0 \pm 0,55$ mV, соодветно и $-29,8 \pm 1,12$ и $-32,4 \pm 0,66$ mV за оние подготвени со 5 mg на PEG, односно NL2 и NL4, соодветно ($p < 0.0011$) (Сл. 17). Слично како и кај хуманата плазма, намалување на почетниот ZP за NL2 и NL4 беше исто така добиено веднаш по нивно суспендирање во клеточниот медиум (ZP = $\sim -29,5$ mV за двете формулации).



Сл. 16. Дистрибуција по големина на NL1-NL5 по инкубација од 24 часа во клеточен медиум ($n=6$).



Сл. 17. ZP на NL1-NL5 во клеточен медиум во период од 24 часа ($n=6$).

Согласно резултатите од Lee et al. (2015), присуството на серумски протеини во медиумот за клеточни култури може значително да го намали навлегувањето на

наночестичките во клетките. Од друга страна пак, истите може да ја редуцираат токсичноста на нано-системите преку заштита на нечистотиите од металните катализатори и поттиснување на конкурентната адсорпција на другите протеини присутни во медиумот (Lee et al., 2015). Бидејќи клеточниот медиум, EndoGRO-MV Complete Culture Media Kit SCME004, е суплементиран со 5% серум, намалувањето на ZP може да се објасни преку можна адсорпција на серумските протеини на површината на NLs (Giau et al., 2019).

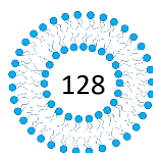
5.3.7. Определување на промени во големината на NLs како функција од еволуцијата на протеинската корона со помош на AF4-MALS/DLS анализа

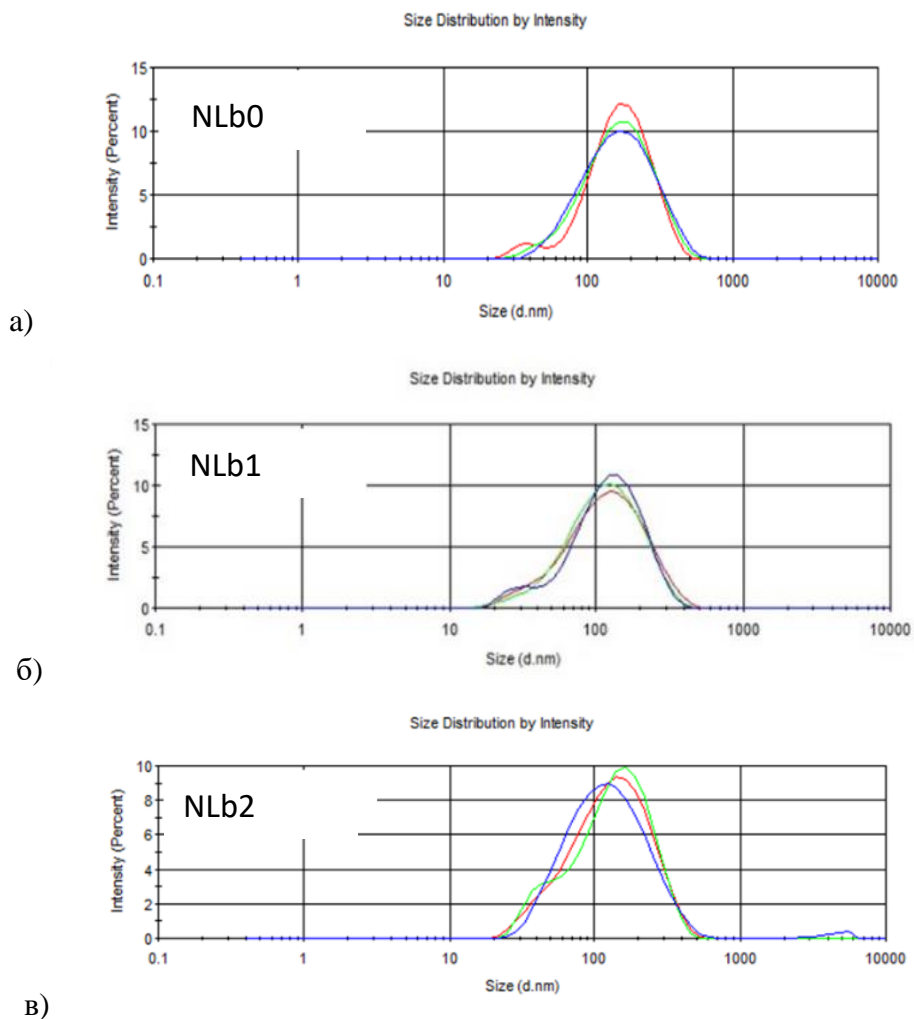
Имајќи го предвид фактот дека ПК формирана на површината на нано-системите ги менува нивните површински својства, присуството на протеини во ткивната средина исто така може да го намали клеточното навлегување (Behzadi et al., 2017). Затоа, од суштинско значење е да се истражи формирањето и еволуцијата на ПК *in vitro*, но и нејзините карактеристиките и соодветно да се поврзат со стабилноста и перформансите на нано-носачите во симулирана средина на мозочно ткиво.

Резултатите од ваквите истражувања би придонеле кон порационален дизајн на формулација која би ги исполнувала критериумите за ефикасност и безбедност. Согласно резултатите за промената на средната големина и ZP на везикулите, добиени во студиите на стабилност во клеточен медиум, следен чекор беше подетално испитување на влијанието на серумските компоненти присутни во клеточниот медиум за hCMC/D3 клеточната линија, како и количеството на PEG како полимер за стерна стабилизација врз големината на три празни примероци на нанолипозоми со примена на AF4-MALS/DLS анализа. Дополнително, добиените сознанија од овие студии понатаму би послужиле за разбирање на ефикасноста и механизмите на интернализација во гореспоменатата клеточна линија.

За таа цел, најпрво беше определена големината на свежо подготвените празни примероци, односно примерокот без PEG (NLb0) и примероци со 50 и 5 mg на PEG (NLb1 и NLb2, соодветно), а потоа истите беа инкубирани со клеточен медиум без и со серум во тек на 1 и 4 часа.

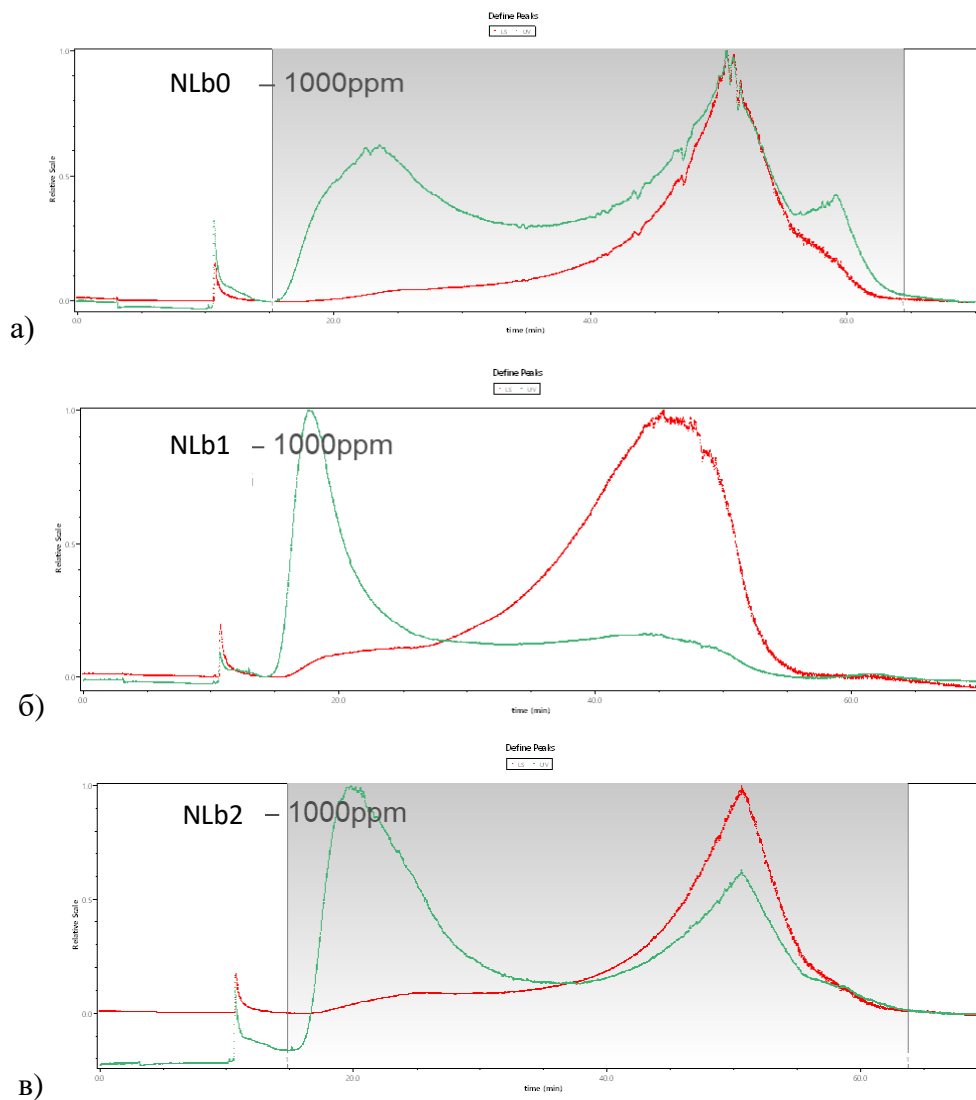
Согласно добиените резултати, средниот дијаметар на нано-везикулите определен со динамичко расејување на светлината (ZetaSizer, NanoS, UK) беше во граници од $96,10 \pm 0,81$ до $140,20 \pm 0,95$ nm (PDI < 0,256) (Сл. 18).





Сл. 18. Графички приказ на средниот Z-дијаметар на: а) NLb0, б) NLb1, в) NLb2.

Од Сл. 19 може да се видат фрактограмите на трите свежно подготвени формулации добиени од квалитативната евалуација со користење на AF4-UV-MALS-DLS. Зелената линија го претставува UV-сигналот (230 nm), а црвената линија сигналот од расејувањето на светлината на 90° . И двата сигнали се нормализирани до највисокиот сигнал. Притоа, пиковите на UV-апсорпцијата забележани на ретенционо време од околу 20 минути многу веројатно се поврзани со апсорпцијата на PEG-от. Дополнително, може да се увиди дека пикот е поостар кај NLb1 (формулацијата со најголемо количество на PEG на површината, 50 mg), во споредба со оној кај NLb2 (примерок што содржи 5 mg на PEG). Од друга страна, пик во облик на пирамида, некарактеристичен за AF4-анализата, беше забележан и кај формулацијата која што не содржи PEG (NLb0) и тоа, на истото ретенционо време.

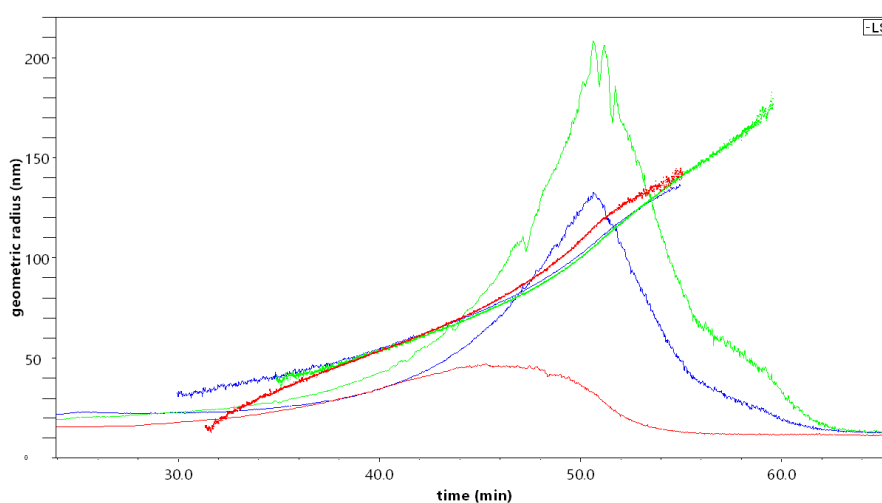


Сл. 19. Фрактограми од квалитативната евалуација со користење на AF4-UV-MALS-DLS на нативните формулации на а) NLb0, б) NLb1, в) NLb2.

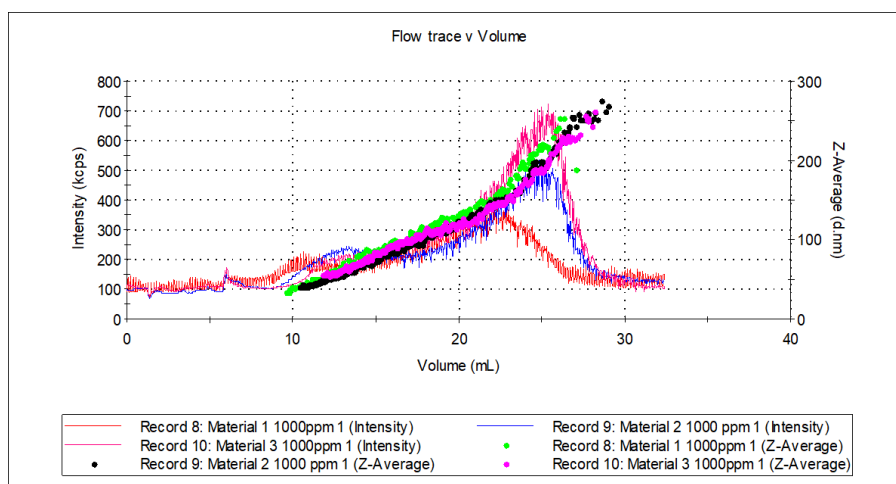
Како што веќе е напоменато во повеќе наврати, присуството на PEG на површината на NLs може да ја подобри физичката стабилност на дисперзијата преку стерно одбивање (Pozzi et al., 2014), што воедно беше потврдено и во презентираниите студии на стабилност. Затоа, во нашиот случај примероците со најмало количество на PEG/или без PEG имаат тенденција да се агломерираат или пак да ја изгубат својата матична структура што доведува до фрагментација. Па оттука, слабиот пик на 230 nm кај NLb0 (примерок без PEG) може да биде резултат на апсорпцијата на различни фрагменти од нанолипозомите и/или некои од компонентите присутни во соја лецитинот, доминантната компонента во формулациите (пр. масло од соја.

фосфатидилинозитоли, фосфатидилхолин, фосфатидилетаноламин и други фосфатиди кои можат да апсорбираат на оваа бранова должина).

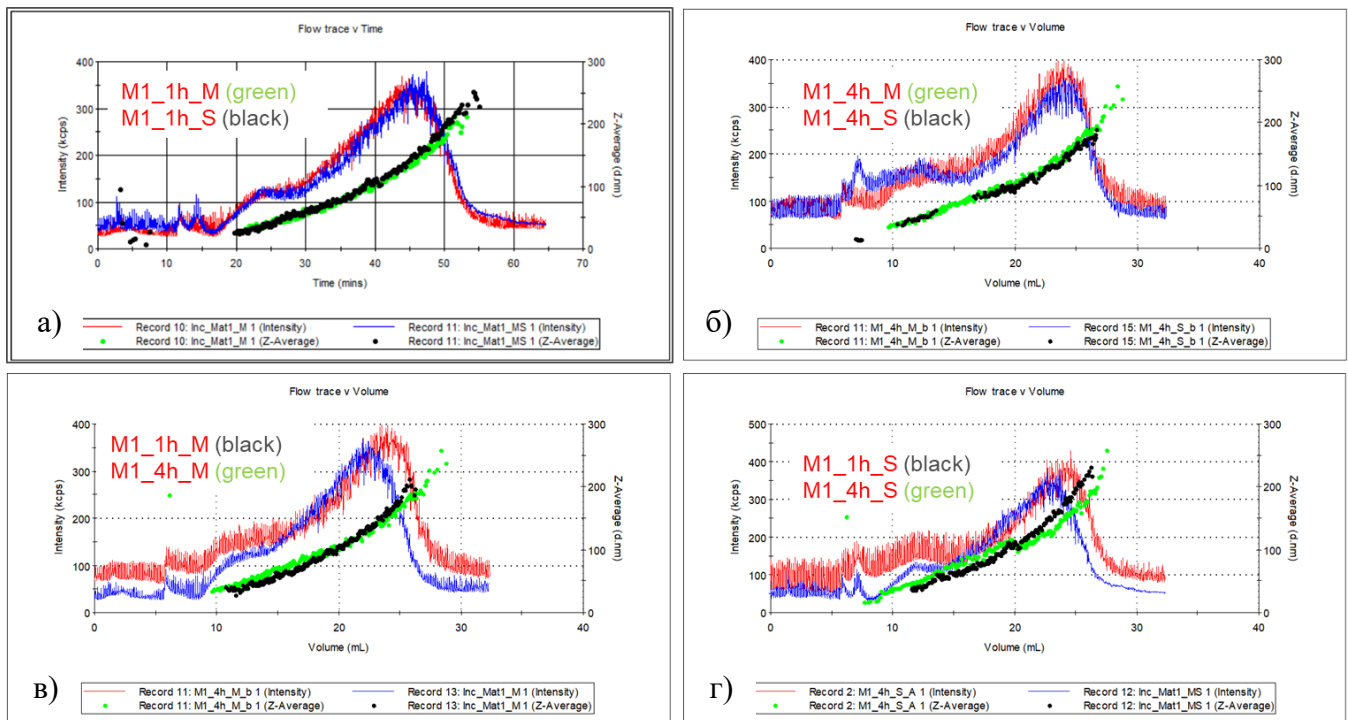
На Сл. 20 се прикажани сигналите од расејувањето на светлината и геометрискиот радиус (одреден со MALS) за секоја од трите формулации за кои може да се забележи дека се препоклопуваат. Сепак, се покажа дека примерокот со најголемо количество на PEG (NLb1) се карактеризира со малку поголеми честички во последниот дел од пикот во однос на другите две формулации, што најверојатно е резултат на некоја мала, незначителна фракција од агломерирани NLs настаната при изведување на мерењата. Истото беше потврдено и со DLS inline мерењата (Сл. 20, 21).



Сл. 20. Сигнал од расејување на светлината и геометриски радиус на нативните формулации фракционирани со AF4 (зелена линија – NLb0, сина линија – NLb2, црвена линија – NLb1).

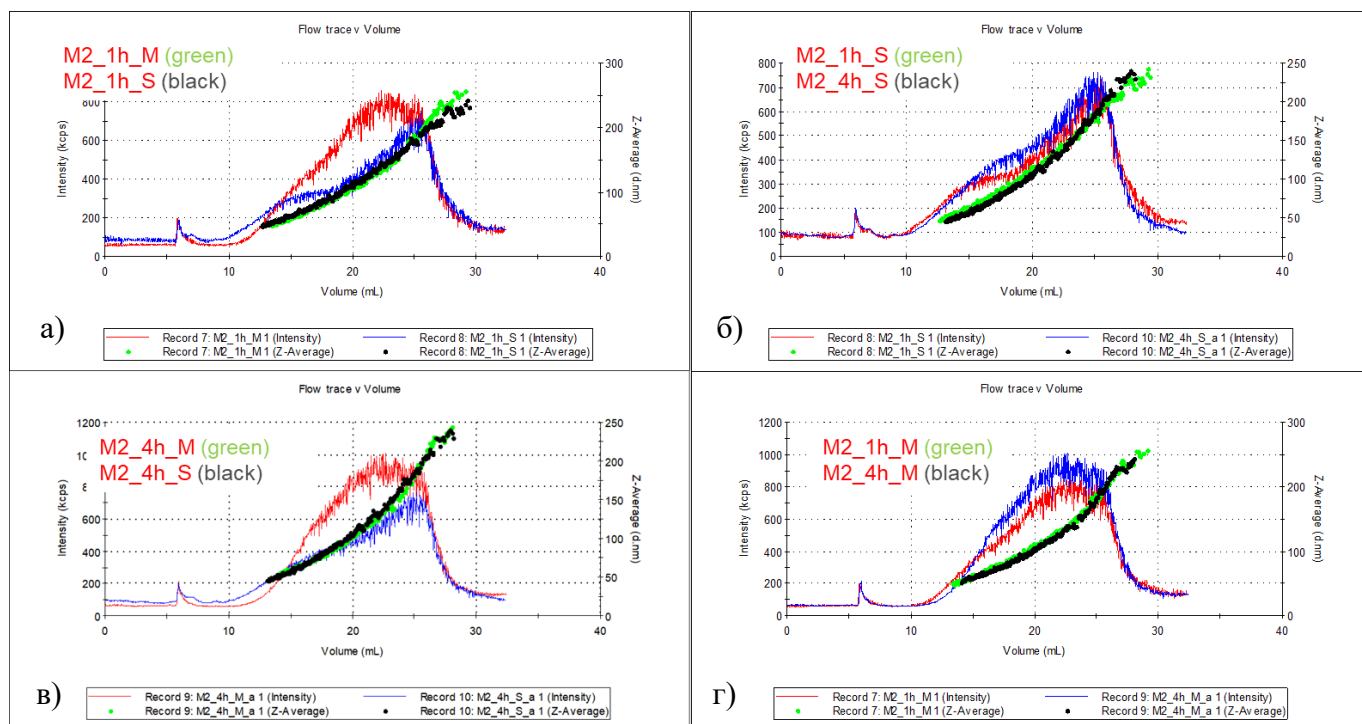


Сл. 21. UV сигналот и Z-средниот дијаметар на формулациите фракционирани со AF4.



Сл. 22. Компаративни прегледи на UV сигналот и Z-средниот дијаметар на NLb1 по а) 1 час инкубација во клеточен медиум со и без серум, б) 4 часа инкубација во клеточен медиум со и без серум, в) 1 и 4 часа инкубација во клеточен медиум без серум, г) 1 и 4 часа инкубација во клеточен медиум со серум. (M – клеточен медиум без серум, S – клеточен медиум со серум).

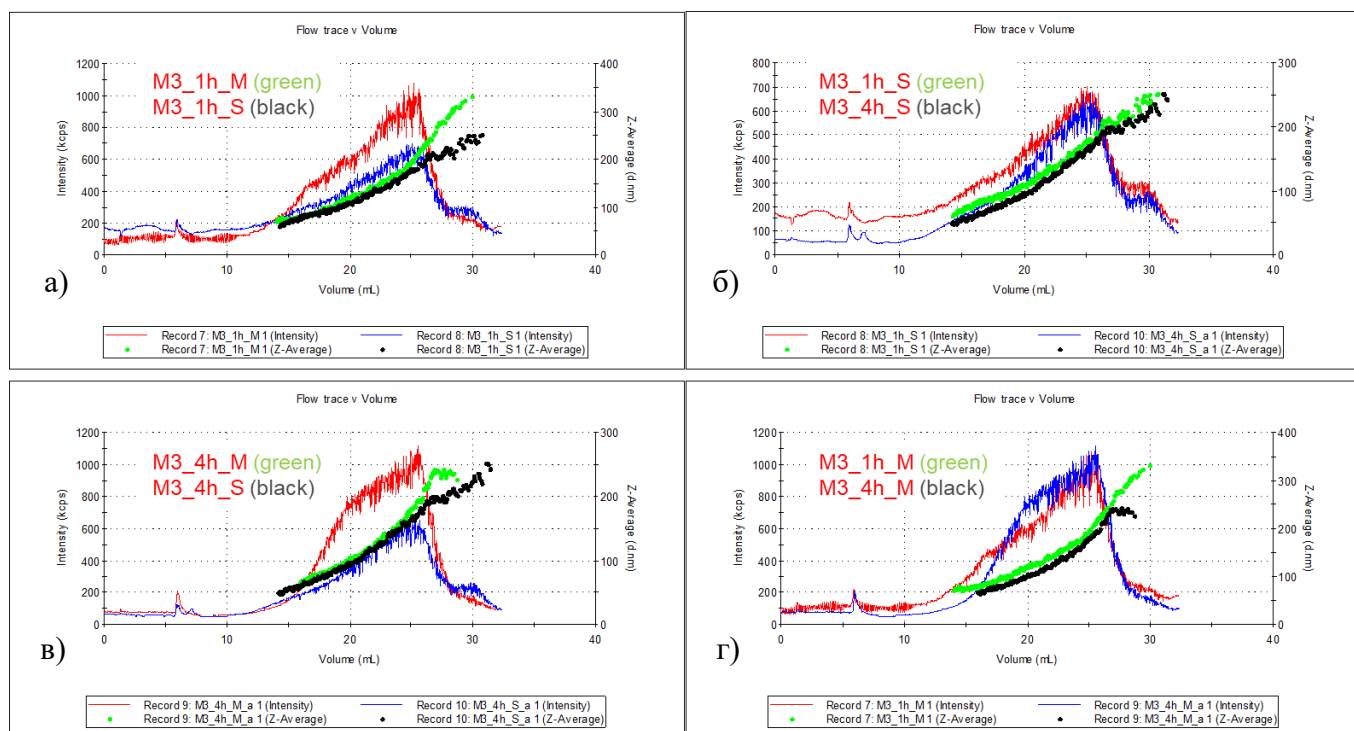
Од фрактограмите прикажани на Сл. 22 може да се забележи дека не постои значителна промена во големината на везикулите на формулацијата со најголемо количество на PEG (примерок NLb1 со 50 mg PEG), кога истите се инкубирани во клеточен медиум без и со серум во период од 1 и 4 часа. овие резултати се потврда за стабилноста на оваа формулација, а исто така го поткрепува фактот дека PEG како полимер за стерна стабилизација учествува во превенцијата и супресијата на процесот на формирање на ПК.



Сл. 23. Компаративни прегледи на UV сигналот и Z-средниот дијаметар на NLb2 по а) 1 час инкубација во клеточен медиум со и без серум, б) 1 и 4 часа инкубација во клеточен медиум со серум, в) 4 часа инкубација во клеточен медиум со и без серум, г) 1 и 4 часа инкубација во клеточен медиум без серум. (M – клеточен медиум без серум, S – клеточен медиум со серум).

Од Сл. 23 може да се увиди малото зголемување на средниот дијаметар на нано-везикулите кај формулацијата со најмало количество на PEG (примерок NLb2 со 5 mg PEG) со продолжување на периодот на инкубација во клеточен медиум со серум (Сл. 23б). Дополнително, мерењата покажаа помали везикули на NLb2 во горниот опсег на големини, кога оваа формулација беше инкубирана во клеточен медиум со серум во споредба кога истата беше инкубирана во клеточен медиум без серум и тоа во двете временски точки, одделно (1 и 4 часа, соодветно) (Сл. 23а, в).

Во случај на зголемување на дијаметарот на везикулите како резултат на формираната ПК, би се очекувало да се забележи општо зголемување на големината во целиот опсег на големина, додека во пак во овој случај зголемувањето се забележува само во горниот опсег на големини. Во оваа насока, добиените резултати може да се припишат на фактот дека протеините од серумот исто така можат да ги стабилизираат нано-везикулите, спречувајќи го процесот на нивна агрегација (Kennedy et al., 2018).



Сл. 24. Компаративни прегледи на UV сигналот и Z-средниот дијаметар на NLb0 по а) 1 час инкубација во клеточен медиум со и без серум, б) 1 и 4 часа инкубација во клеточен медиум со серум, в) 4 часа инкубација во клеточен медиум со и без серум, г) 1 и 4 часа инкубација во клеточен медиум без серум. (M – клеточен медиум без серум, S – клеточен медиум со серум).

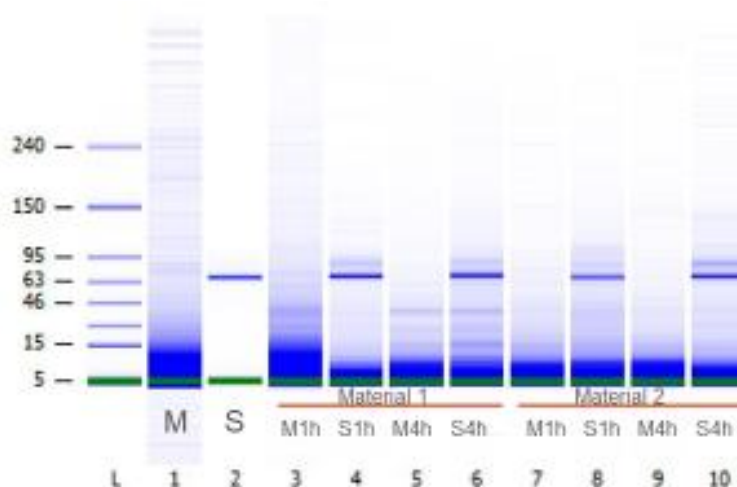
Значајно е да се истакне дека AF4 анализата покажа дека примерокот што не содржи PEG (NLb0), слично како и примерокот со најмало количество на PEG (примерок NLb2 со 5 mg PEG), се карактеризира со помала големина на везикули кога истиот е инкубиран во клеточен медиум со серум, во споредба со инкубацијата во клеточен медиум без серум што најверојатно е резултат на стабилизирачкиот ефект на протеините присутни во серумот врз нано-везикулите (Сл. 24а, в). Меѓутоа, интересно е да се истакне дека во текот на овие студии беше забележано неочекувано намалување на големината на везикулите од NLb0 по 4 часа наспроти 1 час инкубација во клеточен медиум со серум (Сл. 24б) што може да се припише на фактот дека формирањето на ПК е динамичен процес кој генерално покажува тенденција да се развива со текот на времето и вклучува многу различни движечки сили контролирани од својствата на нанолипозомите, протеините и самиот медиум (Yu et al., 2022). Добиените резултати се во прилог на резултатите од студијата на Mičlăuș et al. (2014), каде што е докажано дека „меката“ корона (формирана во почетните временски точки на инкубација) содржи

повеќе протеини од „цврстата“ корона формирана во подоцните временски интервали, резултирајќи со поголем дијаметар на честичките во раните периоди на инкубација.

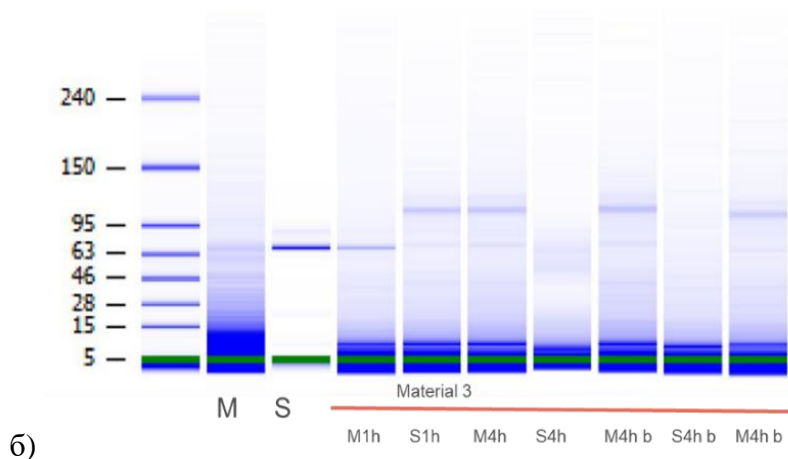
5.3.8. Протеомско профилирање на адсорбирани протеини на површината на NLs со помош на автоматизирана електрофореза со висока резолуција

Во овој стадиум од истражувањата, следен чекор беше квалитативната анализа на адсорбираните серумски компоненти присутни во клеточниот медиум на површината на трите претходно испитани празни формулации на NLs (NLb0, NLb1 и NLb2), како и протеомско профилирање на истите (Сл. 25а и б).

За таа цел, примероците на NLs беа инкубирани во клеточен медиум со и без серум (како контрола) во тек на 1 и 4 часа. Од графичките прикази може да се забележи дека протеинската адсорпција кај NLb1 и NLb2 (Сл. 25) е изразена уште во првиот час на инкубација на примероците со клеточен медиум со серум, резултирајќи со изразени ленти на околу 60 kDa, кои потекнуваат од албуминот, најзастапен протеин во серумот. Од друга страна пак, овие ленти не се толку изразени кај формулацијата без PEG, односно примерокот NLb0. Имајќи предвид дека чувствителноста на биоанализаторот е висока и покрива широк опсег на концентрации, добиените резултати за оваа формулација може да се должат на проблеми со денатурацијата на протеините присутни во формираната ПК или можно формирање на липо-протеински комплекси (помеѓу серумските протеини и NLs). Дополнително, кај трите формулации може да се забележат и слаби ленти од други протеини, но за овој чекор потребни се подетални анализи со масена спектрометрија.



а)



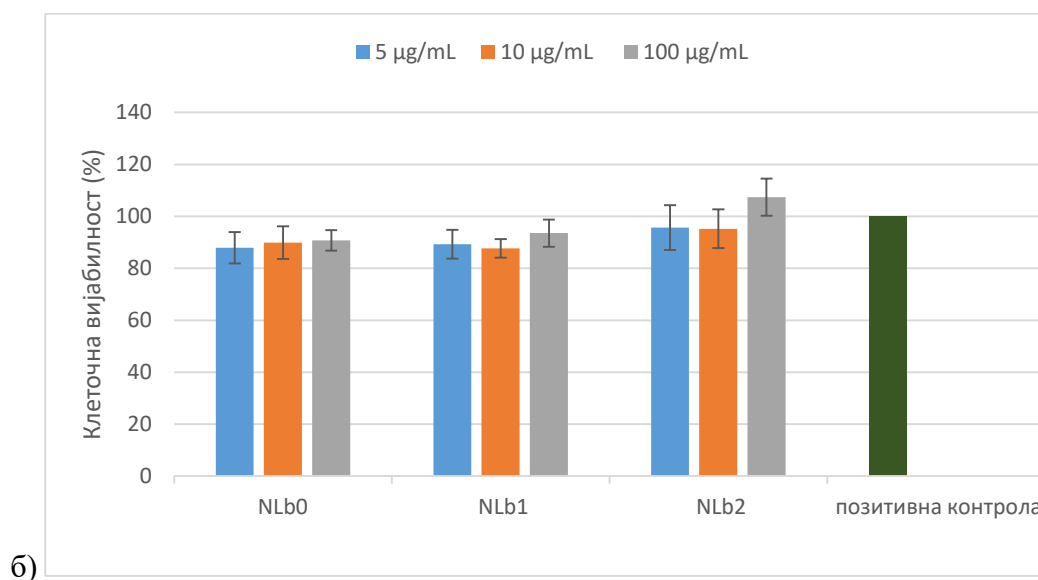
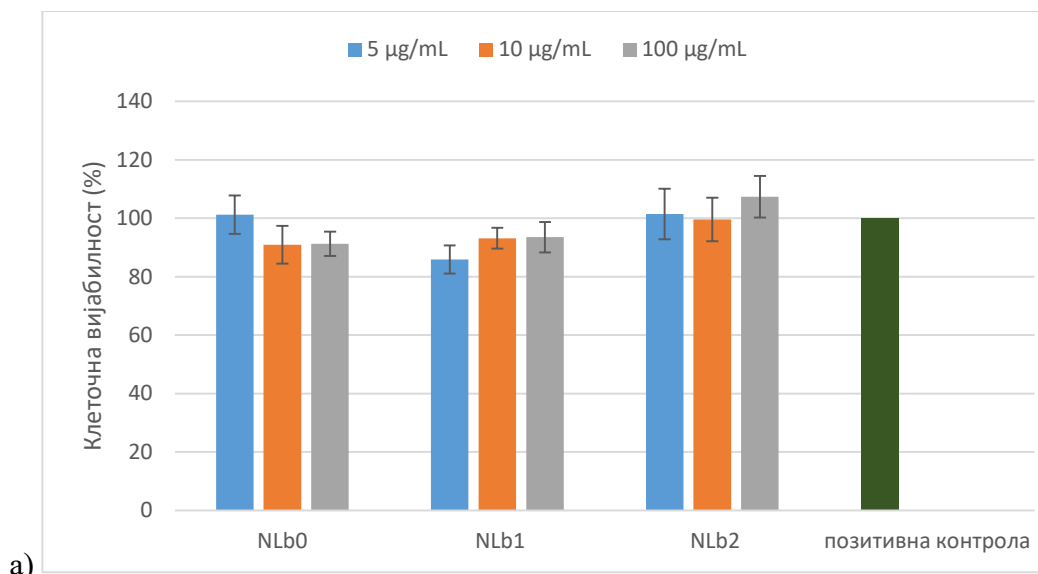
б)

Сл. 25. Приказ на ленти од автоматизирана електрофореза со висока резолуција на а) NLb1 и NLb2 (означени како 1 и 2) по инкубација од 1 и 4 часа во клеточен медиум без серум и клеточен медиум со серум, б) NLb0 (означено како 3) по инкубација од 1 и 4 часа во клеточен медиум без серум и клеточен медиум со серум. (M – клеточен медиум без серум, S – клеточен медиум со серум).

5.3.9. Испитување на вијабилност на hCMEC/D3 и SH-SY5Y клетки

Во последните декади, различни истражувачки групи имаат покажано дека нанолипозомите практично се сметаат за фармаколошки неактивни везикули кои покажуваат минимална токсичност. И покрај нивната биокompatibilност и сличноста со структурата на клеточната мембрана, важно е да се истакне дека нивната потенцијална цитотоксичност е тесно поврзана со моделот на користената клеточна линија, времето на изложување и концентрацијата, како и физичко-хемиските и површинските својства на везикулите, вклучувајќи го липидниот состав, големината, површинскиот полнеж, ПЕГ-илацијата и др (Inglut et al., 2020; Syama et al., 2022).

Резултатите илустрирани на Сл. 26а покажуваат дека вијабилноста на клетките во период од 24 часа изнесуваше $90,92 \pm 6,43\%$ (NLb0, примерок без PEG), $85,89 \pm 4,80\%$ (NLb1, примерок со 50 mg на PEG) и $99,54 \pm 7,44$ - $107,41 \pm 7,12\%$ (NLb2, примерок со 5 mg на PEG) во тестираниот опсег на концентрации од 5 до 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Кога станува збор за клеточната линија на невроните, метаболичката активност на клетките беше $\sim 90\%$ за NLb0 и NLb1, додека пак клеточна вијабилност $>95\%$ беше карактеристична за бунарчињата третирани со сите концентрации на NLb2 (Сл. 26б).



Сл. 26. Клеточна вијабилност на а) hCMEC/D3 клетки, б) SH-SY5Y клетки по 24 часа инкубација со различни концентрации на подготвените формулации.

Добиените резултати сугерираат дека не постои зависност помеѓу концентрацијата и/или типот на формулација и цитотоксичноста испитана преку анализа на вијабилноста на клетките. Имено, сите три формулации во испитуваните концентрации покажаа намалување на метаболичката активност на клетките за <15%, што укажува на благ ефект на NLs врз метаболичката активност на клетките од двете клеточни линии.

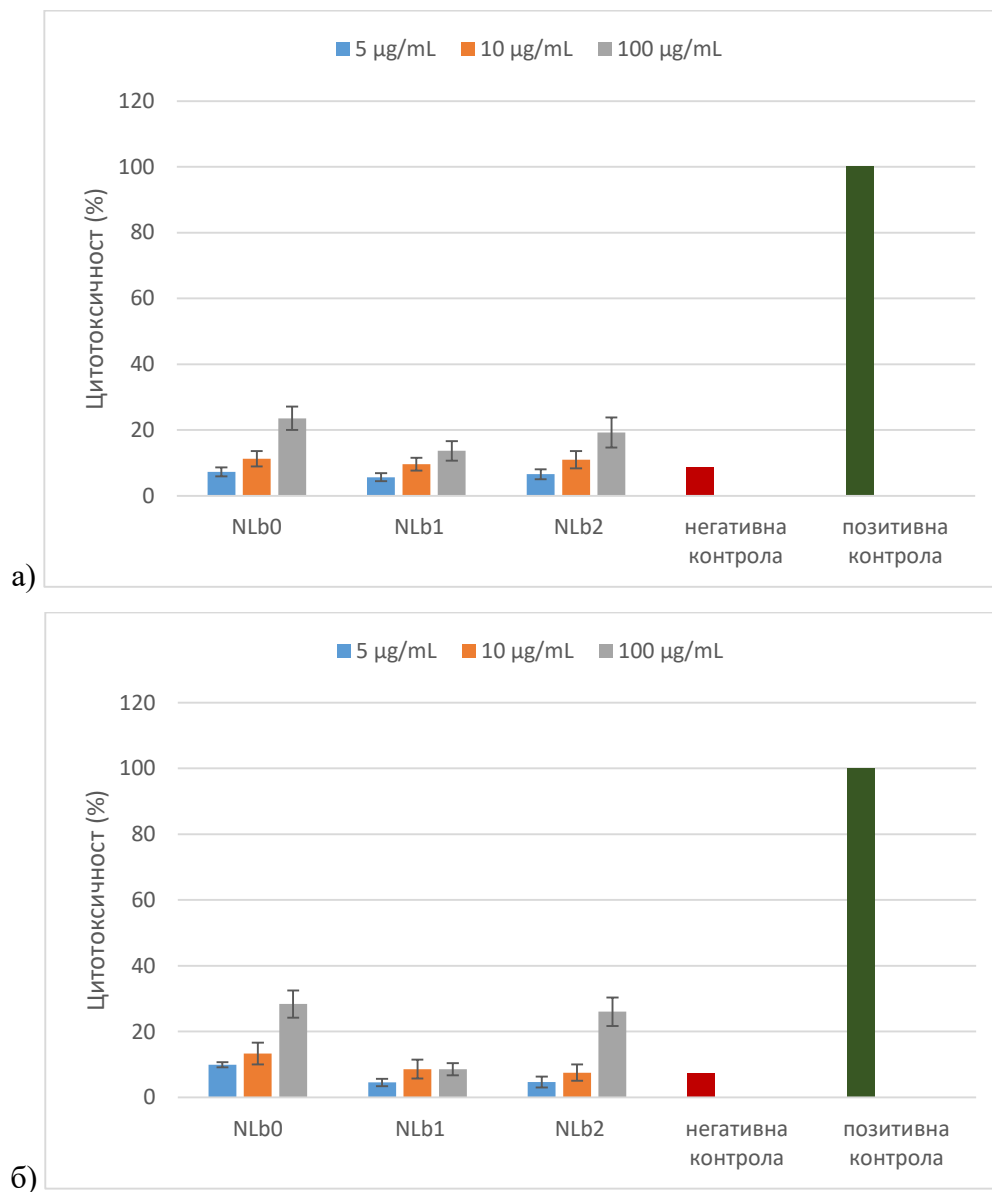
5.3.10. Испитување на цитотоксичност на клетки од hCMEC/D3 и SH-SY5Y клеточна линија

Со цел да се добијат подетални информации за цитотоксичниот потенцијал на нано-везикулите и исто така, да се осигура дали времето и концентрацијата на изложеност се безбедни за спроведување на експериментите на клеточно преземање и интернализација, следниот чекор од ова истражување беше евалуација на активноста на ослободениот клеточен LDH во медиумот за клеточни култури во период од 24 часа, како резултат на оштетувањето на клеточната мембрана.

Од графичките прикази може да се забележи дека кога двете клеточни линии беа изложени во концентрации од 5 и 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ на сите три празни нано-формулации, нивоата на ослободениот LDH ($5,654 \pm 1,25$ - $23,54 \pm 3,44$ и $4,52 \pm 1,13$ - $13,33 \pm 3,32\%$ за hCMEC/D3 и SH-SY5Y, соодветно) се споредливо ниски како и нетретираните контролни групи на клетки ($8,64 \pm 1,37$ за hCMEC/D3 и $7,26 \pm 3,38\%$ за SH-SY5Y, соодветно) (Сл. 27). Овие резултати укажуваат дека фузијата и навлегувањето на испитуваните празни нано-везикули не влијаат врз одржувањето на интегритетот на клеточната мембрана (Mihailova et al., 2021).

Од друга страна пак, може да се забележи дека постои зголемување на ослободениот LDH во двете клеточни линии, зависно од концентрацијата на примероците. Ова зголемување е особено забележливо по третирање на клетките со највисоките концентрации (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) на липозомските везикули. Па така, hCMEC/D3 покажа $28,36 \pm 4,15$; $8,56 \pm 2,85$ и $26,04 \pm 4,34\%$ (Сл. 27a), додека пак SH-SY5Y се карактеризираше со $23,55 \pm 3,55$; $9,56 \pm 1,95$ и $19,56\%$ токсичност (Сл. 27б) по 24-часовна изложеност на 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NLb0, NLb1 и NLb2, соодветно. Дополнително, може да се забележи дека и на двете клеточни линии, NLs со најголемо количество на PEG на нивната површина (примерок NLb1) покажуваат најмал цитотоксичен потенцијал, проследено со NLb2 и неПЕГ-илираната формулација (NLb0). Ова е во согласност со литературните податоци кои сугерираат дека PEG 2000 во одредени концентрации е способен за фузија со одредени типови на клетки *in vitro* и учествува во процесите на спојување на мембраните помеѓу соседните неврони и аксони. Дополнително, PEG учествува во заздравувањето на оштетените невронски мембрани и нивното функционално обновување преку подобрување на нивната пропустливост и стабилност. Молекуларните механизми на овие дејства сè уште се нејасни, но се верува дека синџирите на PEG имаат тенденција да ги дехидрираат мембраните, со што им

овозможуваат на нивните структурни компоненти да се подредат и преуредат во ламеларна конфигурација проследена со рехидратација (Kouhzaei et al., 2012; Shi, 2013).



Сл. 27. Клеточна цитотоксичност а) hCMEC/D3 клетки, б) SH-SY5Y клетки по 24 часа инкубација со различни концентрации на подготвените формулации.

Од друга страна пак, за време на експериментите со MTS, највисоките концентрации на NLs не покажаа значаен ефект врз вијабилноста на клетките, спротивно на LDH тестот. Добиените резултати може да се припишат на фактот дека двата теста даваат информации за различни механизми на клеточна смрт и главно се насочени само кон одредени клеточни компартменти, односно лизозомите, мембраната, јадрото, цитоплазмата, митохондриите итн. Затоа, мерењата од овие анализи се резултат на

комплексен процес зависен од многу фактори/експериментални услови, и затоа, оптимизацијата на овие експерименти, како и рационалното толкување на добиените податоци игра клучна улога во превенција на донесување погрешни заклучоци. (Istifli et al., 2019).

5.3.11. Квантитативни студии на клеточно преземање на NLs од страна на hCMEC/D3 и SH-SY5Y клеточните линии на 37 °C

Како што беше дискутирано во неколку наврати досега, еден од предусловите за постигнување на терапевтски ефект во мозокот е успешниот транспорт на нанолипозомите низ КМБ, како и нивната интернализација во неврроните. Во оваа насока, по одредувањето на безбедносниот концентрациски опсег на липозомските нано-носачи, во наредната фаза од испитувањата беа спроведени *in vitro* студии на клеточно преземање на празни нанолипозомски везикули од страна на клетките на КМБ (hCMEC/D3) и човечките неуробластома клетки SH-SY5Y). Дополнително, со цел да се добие појасна слика за влијанието на физиолошките карактеристики на клетките и формулациските фактори на испитуваните примероци на NLs (со посебен акцент на PEG) беше направена и компаративна анализа на добиените резултати од двете клеточни линии.

Резултатите од коцентрациско (5, 10 и 100 µg/mL) и временско (1, 2 и 4 часа) зависните експерименти на квантитативно клеточно преземање на празните примероци на NLs (NLb0, NLb1 и NLb2) од страна на клеточните линии (hCMEC/D3 и SH-SY5Y, соодветно) се претставени во Табела 13.

Како што може да се забележи, постои постепено зголемување на клеточното навлегување на сите формулации со зголемување на нивната концентрација (испитувана во сите временски точки) и тоа во двете клеточни линии. Добиеените резултати се сосема логични, бидејќи се очекува поголемо количество нано-везикули да се интернализираат кога клетките се третираат со нивно поголемо количество. Слично, растечкиот тренд во клеточното преземање може да се види со продолжување на временските интервали на инкубација, со исклучок на експериментите каде што клетките беа третирани со концентрација од 100 µg/mL од трите формулации. Имено, при оваа концентрација, навлегувањето на нано-системите беше околу 3 µg во сите временски точки на инкубација за hCMEC/D3, додека пак за SH-SY5Y варираше од 3,665±0,096 до

4,138±0,186 µg (NLb0), од 3,280±0,211 до 3,594±0,072 µg (NLb1) и од 3,573±0,250 до 3,809±0,112 (NLb2) по 1 и 4 часа време на инкубација, соодветно.

Табела 13. Клеточно преземање на NLs од страна на hCMC/D3 и SH-SY5Y

	hCMC/D3 клеточна линија			SH-SY5Y клеточна линија		
	1 час	2 часа	4 часа	1 час	2 часа	4 часа
Конц. на нанолипозомска дисперзија - 5 µg/mL						
NLb0	0.089±0.034	0.167±0.004	0.537±0.086	0.185±0.034	0.276±0.013	0.308±0.017
NLb1	0.221±0.025	0.376±0.033	0.549±0.045	0.182±0.019	0.238±0.005	0.243±0.002
NLb2	0.198±0.020	0.233±0.047	0.294±0.035	0.183±0.022	0.201±0.011	0.205±0.008
Конц. на нанолипозомска дисперзија - 10 µg/mL						
NLb0	0.355±0.007	0.587±0.035	1.072±0.121	0.612±0.109	0.738±0.041	0.852±0.036
NLb1	0.461±0.048	0.636±0.012	1.118±0.018	0.611±0.057	0.663±0.029	0.744±0.018
NLb2	0.510±0.019	0.562±0.013	0.702±0.121	0.510±0.014	0.664±0.076	0.716±0.042
Конц. на нанолипозомска дисперзија - 100 µg/mL						
NLb0	3.203±0.128	3.378±0.026	3.249±0.055	3.665±0.096	3.845±0.104	4.138±0.186
NLb1	2.919±0.013	3.022±0.065	3.057±0.033	3.280±0.211	3.271±0.115	3.594±0.072
NLb2	2.982±0.066	3.031±0.018	3.082±0.053	3.573±0.250	3.576±0.101	3.809±0.112

Добро е познато дека интернализацијата на нанолипозомите во клетките може да се одвива преку неколку енергетски зависни ендоцитозни патеки (фагоцитоза, ендоцитоза посредувана од клатрин, ендоцитоза посредувана од кавеолин, ендоцитоза независна од клатрин/кавеоли и микропиноцитоза), како и преку пасивен транспорт или дифузија, директен транспорт низ мембранските фосфолипиди (едноставна дифузија) или во комбинација со мембрански протеини (олесната дифузија) (Behzadi et al., 2018; Sabourian et al., 2020).

Досега е добро елаборирано дека ендоцитозата е процес што започнува преку атхезија на нано-носачите на клеточната мембрана, проследена со еластична деформација на клеточната мембрана и рецепторска дифузија на површината на мембраната, процеси зависни од физичко-хемиските својства на нано-системите, како и одредени експериментални услови (концентрацијата на испитуваните примероци на NLs и времето на експозиција) (Sabourian et al., 2020). Во нашите истражувања, преземањето на NLs при концентрација од 100 µg/mL во двете клеточни линии со текот на времето покажа многу мал пораст, сугерирајќи на фактот дека уште во првиот час, hCMC/D3 и SH-SY5Y веќе го достигнале својот максимален ендоцитен потенцијал, што веројатно е резултат на заситеноста на механизмите за навлегување што понатаму доведува до ограничена интернализација (Khetan et al., 2019; Loureiro et al., 2015; Vranic et al., 2013).

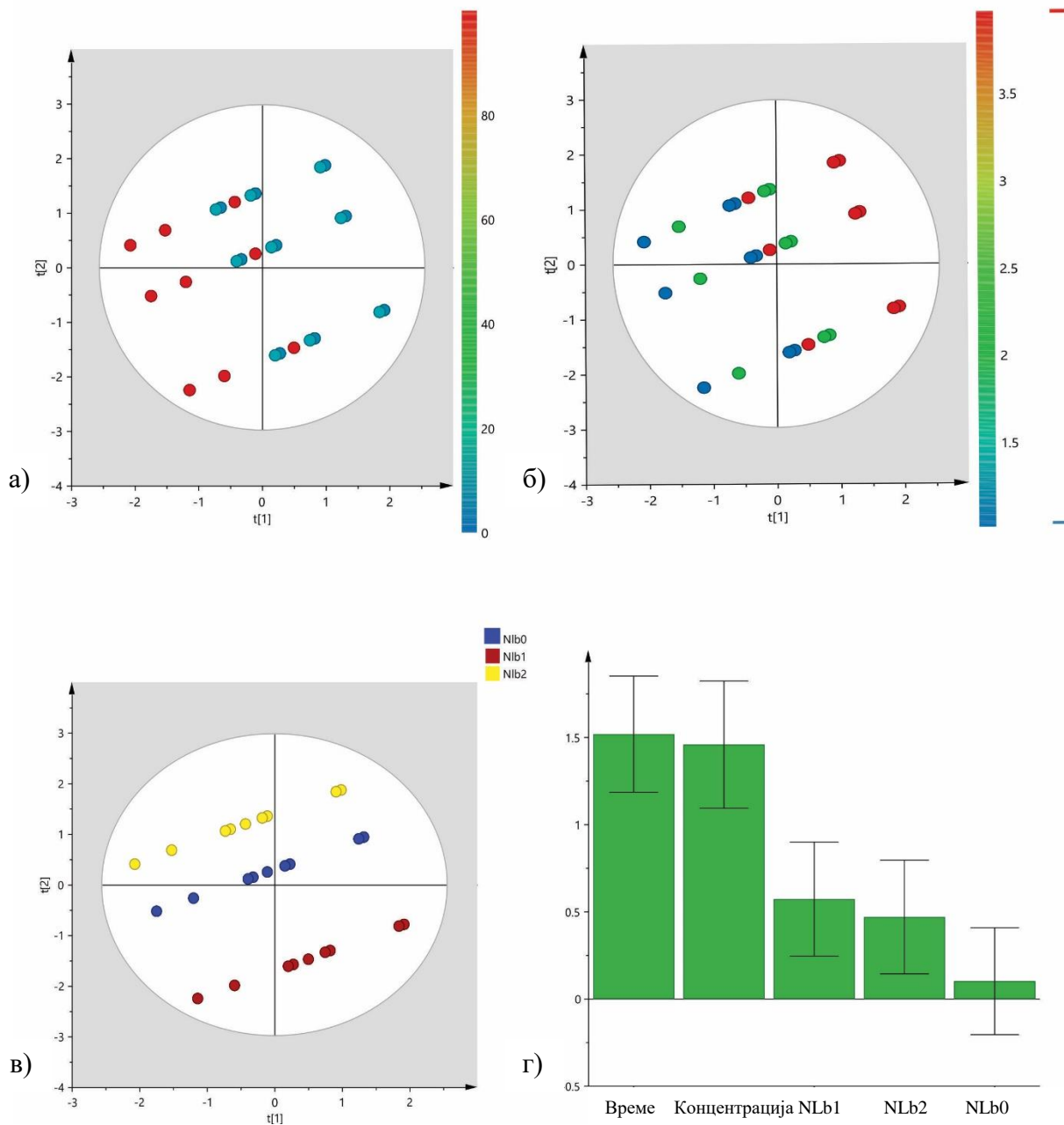
Дополнително, овие резултати може да се должат на постигнување на *steady state* состојба, каде што градиентот на концентрација на NLs низ клеточните мембрани е низок со што се забавува процесот на пасивен транспорт (Di and Kerns, 2016). Од друга страна, пропорционалниот раст на клеточното преземање со продолжување на времето на инкубација при концентрации од 5 и 10 $\mu\text{g/mL}$ го потврдува отсуството на заситувањето на овие транспортни процеси (Derakhshandeh et al., 2011).

Со цел да се утврди влијанието на можните независни фактори (експериментални услови, тип на формулација, односно количеството на PEG) врз квантитативното преземање на нано-везикулите во наведените клеточни линии, извршена беше статистичка анализа.

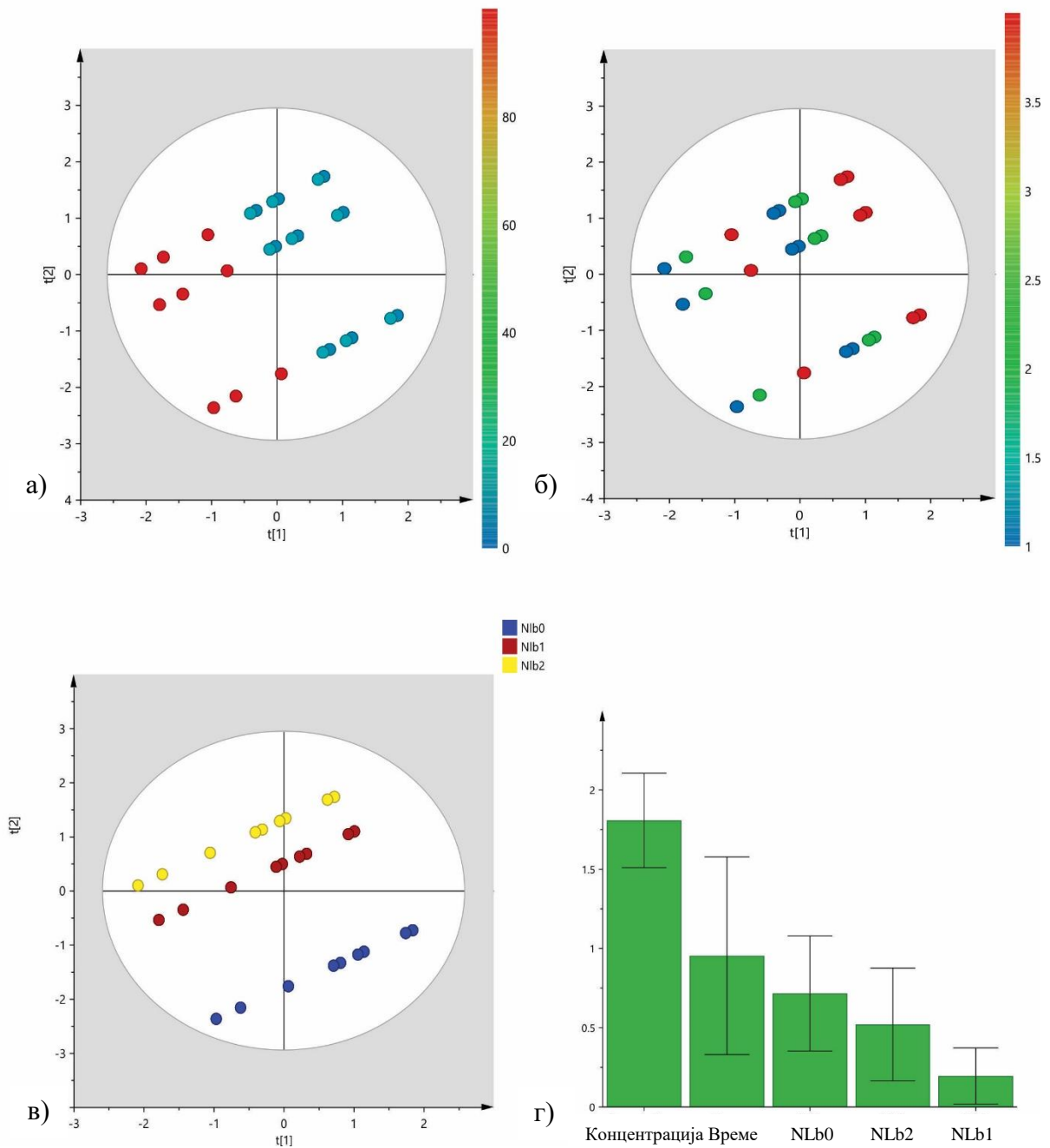
Статистичката корелација добиена од скетер плотовите на иницијалниот модел со сите вредности (нормализирано преземање изразено во %) не беше со доволна моќност и предвидливост, но беше забележано дека типот на клетки влијае врз резултатите на поединечните точки, поради што беше одлучено да се направи линеарна дискриминантна анализа (PLS – DA).

Затоа, за кинетичките експерименти на интернализација, беа изведени посебни статистички модели за секоја клеточна култура. Моделот за интернализација во hCMC/D3, исто така, потврди дека концентрацијата на примерокот и времето на експозиција се доминантни фактори кои го условуваат процентот на преземени NLs (Сл. 28). Согласно VIP графикот, типот на формулацијата, т.е. количеството на PEG на површината на NLs, исто така има значаен ефект врз нивното преземање (Сл. 28д).

Моделот на кинетички експерименти за SH-SY5Y покажа слични карактеристики како и претходниот модел, каде што повторно концентрацијата и времето на изложување беа доминантни фактори кои влијаат на интернализацијата на NLs, додека пак количината на PEG на површината имаше помало, но дистинктивно влијание (Сл. 29).



Сл. 28. а) Сктер плот обоен по концентрација на примерок, б) Сктер плот обоен по време на инкубација, в) Сктер плот обоен по тип на формулација и г) VIP score за дискримитивна анализа на факторите кои влијаат врз преземањето на NLs во hCMEC/D3.



Сл. 29. а) Скетер плот обоен по концентрација на примерок, б) Скетер плот обоен по време на инкубација, в) Скетер плот обоен по тип на формулација и г) VIP score за дискриминативна анализа на факторите кои влијаат врз преземањето на NLS во SH-SY5Y.

Како што може да се забележи од Табела 13, преземањето на нано-везикулите од hCMC/D3 по 4 часа инкубација е највисоко за формулацијата со најголемо количество на PEG на површината – 50 mg (NLb1) ($0,549 \pm 0,045 \mu\text{g}$ и $1,118 \pm 0,018 \mu\text{g}$, за концентрации од 5 и $10 \mu\text{g/mL}$, соодветно), проследено со формулацијата без PEG на површината - NLb0 ($0,537 \pm 0,086$ и $1,072 \pm 0,121 \mu\text{g}$, при концентрации од 5 и $10 \mu\text{g/mL}$,

соодветно). Најмал процент на интернализација беше забележан кај NLb2, формулацијата со 5 mg PEG на површината ($0,294\pm 0,035$ и $0,702\pm 0,121$ μg , при концентрации од 5 и 10 $\mu\text{g/mL}$, соодветно).

Бројни истражувања имаат потврдено дека формирањето на ПК им дава нов биолошки идентитет на NLs што може значително да влијае и да го диктира нивното препознавање и интернализација во клетките, како и нивниот интрацелуларен транспорт (Ezzat et al., 2022). Атсорбираните протеини може да ја намалат адхезијата на наносачите на клеточната мембрана или да ја нарушат нејзината стабилност, што резултира со намалено клеточно навлегување. Дополнително, покажано е дека формираната ПК и нејзиниот протеински состав влијаат на таргетирањето, како и на интеракциите нанолипозом-клетка и механизмите на интернализација, во смисла на активирање или блокирање на одредени транспортни патишта. Понатаму, нановезикулите можат да предизвикаат структурни промени во атсорбираните протеини, кои пак за возврат играат значајна улога во трансдукцијата на клеточниот сигнал (Aliyandi et al., 2021; Xu et al., 2022; Yan et al., 2013). Влијанието на ПК врз интеракциите на нанолипозомите со клетките е разновидно, бидејќи овој феномен не зависи само од својствата на везикулите (составни компоненти, големина, облик, полнеж, површински функционални групи, хидрофобност) и клеточните компоненти, туку и од природата на биолошките течности, т.е. медиумот за клеточна култура (Patrikel et al., 2019).

Имено, во нашите истражувања, медиумот што се користеше за експериментите за квантитативно преземање на NLs од hCMC/D3 клетките беше дополнет со серум, како и со фактори на раст, бои и антибиотици. Во претходните фази на ова истражување беше докажано дека во текот на 24 часа време на инкубација во медиум за клеточни култури, формулацијата NLb1 (50 mg PEG) резултираше со мало намалување на ZP и без значајни промени во просечниот Z-дијаметар во споредба со нативната формулација, што беше очекувано со оглед на тоа што ПЕГ-илацијата е една од најпознатите и најкористените стратегии за спречување и намалување на феноменот на формирање на ПК. Добиените резултати имплицираат на стабилноста и минималното влијание на атсорбираните протеини врз својствата и перформансите на NLs во оваа формулација (Shalabali et al., 2021), кои се поволни за ефикасен транспорт и преземање од клетките. Освен ова, највисокото преземање на оваа формулација од hCMC/D3 клетките може да се припише и на неговиот ZP кој е помалку негативен (-15 mV), во споредба со другите две испитувани формулации без и со 5 mg на PEG (NLb0 и NLb2, соодветно), бидејќи помалку негативните или позитивно наелектризираните нано-носачи се очекува

поефикасно да стапат во интеракција со структурите на крвно-мозочните клетки кои се карактеризираат со негативен полнеж (Neves et al., 2015).

Од друга страна, неколку истражувања сведочат дека густината и конформацијата на PEG на површината на нано-системите играат клучна улога и ја подобруваат дифузијата и транспортот на различни типови наночестички низ ендотелните бариери, особено КМБ, и следствено резултираат со поефикасна мозочна дистрибуција. Имајќи предвид во составот на NLb1 количеството на PEG е високо (50 mg), густината на синцирите на површината на нанолипозомите очекувано е да биде поголема и да се карактеризира со конформација на „густа четка“ (McCrigh et al., 2020).

Во студијата на Nance et al. (2012) е докажано дека наночестичките кои се карактеризираат со површински PEG слој со конформација на „густа четка“ можат да навлезат во КМБ и поефикасно да се акумулираат во мозочниот паренхим *ex vivo*, отколку оние кои не содржат PEG. Друга причина за најуспешното навлегување на формулацијата NLb1 може да се припише на хидрофилната природа на PEG синцирите за кои е докажано дека дејствуваат како супстрати за P-gp ефлукс транспортерите (Fernandes et al., 2018; Hoosain et al., 2015; Nguyen et al., 2021) кои се прилично експресирани во hCMEC/D3 клеточната линија. Исто така, важно е да се спомене дека и покрај фактот што PEG може да дејствува како инхибитор на P-gp, сè уште не е јасно дали оваа функција се должи на неговата способност да ја инхибира АТР-азата или пак оваа улога ја остварува преку индиректен механизам кој вклучува нарушувања на структурите од клеточната мембрана во регионите во кои се наоѓа P-gp (Wang et al., 2020).

Од Табела 13 може да се забележи дека по 1-часовна инкубација, количеството на клеточното преземање на неПЕГ-илираниот примерок (NLb0) е помало во споредба со примерокот NLb2 (5 mg PEG), при концентрации од 5 и 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Но, спротивен случај е забележан во текот на 4-часовната инкубација каде што квантитативното клеточно навлегување на NLb0 беше приближно 1,5 пати повисоко отколку кај PEG-обложената формулација (NLb2).

Главната причина за ваквото однесување може да биде фактот што во нашите претходни студии за стабилност спроведени со AF-4 анализа, се покажа дека серумските протеини присутни во медиумот за клеточни култури најверојатно го стабилизираат примерокот NLb0 и тоа од аспект на спречување на процесот на агрегација. Дополнително, за разлика од NLb2, кај оваа формулација имаше намалување на просечниот дијаметар во текот на времето на инкубација, што веројатно е резултат на

динамичниот процес на формирање на ПК. Овие резултати се во насока на тврдењето за обратната зависност помеѓу големината на честичките и липозомската адхезија и навлегување во hCMC/D3, како и промените во интернализацијата промовирана од атсорбираните серумски протеини на површината на NLs (Mazumdar et al., 2021).

Од друга страна, и покрај малиот удел на PEG на површината на формулацијата NLb2 (5 mg), истата покажа заситено навлегување во текот на првиот час ($0,198 \pm 0,020$ и $0,510 \pm 0,019$ μg , при концентрации од 5 и 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, соодветно), со оглед на тоа што растот на количеството на интернализирани везикули во подоцнежните времиња на инкубација ($0,294 \pm 0,035$ и $0,702 \pm 0,121$ μg по 4 часа, при концентрации од 5 и 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, соодветно) покажа тенденција на стагнација во споредба со другите две формулации.

Овие резултати дополнително го потврдуваат ограничениот капацитет на примерокот NLb2 да се акумулира интрацелуларно, а исто така е показател за настанувањето на рамнотежа помеѓу процесите на ендоцитоза и егзоцитоза (Rabanel et al., 2020). Дополнително, литературните податоци сугерираат дека честичките обложени со PEG со површински полнеж помеѓу -20 и -40 mV немаат афинитет да ја преминат КМБ најверојатно поради недоволната густина на PEG обвивката (Nance et al., 2012). Ова е во согласност со нашите резултати каде што може да се забележи дека хидрофилноста како и површинскиот полнеж може значително да влијаат на испораката на нанолипозомите до КМБ, а со тоа и во мозочните ткива.

Кога станува збор за клеточното преземање на нано-везикулите од SH-SY5Y, постои различен тренд на квантитативна интернализација помеѓу формулациите. Имено, формулацијата која се карактеризира со највисоко клеточно навлегување по 4 часа е неПЕГ-илираната формулација - NLb0 ($0,308 \pm 0,017$ и $0,852 \pm 0,036$ μg , при концентрации од 5 и 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, соодветно), проследено со онаа што содржи 50 mg PEG - NLb1 ($0,202 \pm 0,243$ и $0,744 \pm 0,018$ μg , при концентрации од 5 и 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, соодветно). Идентично како и во hCMC/D3, за формулацијата NLb2 (5 mg PEG) беше забележано дека има најниско клеточно навлегување со $0,205 \pm 0,008$ и $0,716 \pm 0,042$ μg , при концентрации од 5 и 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, соодветно.

Добиените резултати се во согласност со податоците од литературата кои сугерираат дека неПЕГ-илираните липозоми се склони кон поефикасно навлегување во неуробластома клетките. Овој исход најверојатно се должи на фактот што PEG ланците ги попречуваат интеракциите на липозомите со различните мембрански структури на овој тип на клетки, и финално резултира со слаб клеточен транспорт (Hartwig et al., 2021).

Од друга страна, неврните се карактеризираат со мембрани во чиј состав холестеролот е застапен во висок процент и истиот игра клучна улога во регулацијата на структурата на мембраната, нејзината флуидност и пропустливост, а исто така влијае и на повеќе аспекти од синаптичкиот пренос (Saher and Simons, 2010). Во човечките неуробластома клетки SH-SY5Y, холестеролот што потекнува од глијалните клетки не е застапен, па оттука потребно е дополнително количество на холестерол за се симулира нормална невронска средина, како и да се промовира процесот на диференцијација на клетките на неуробластома SH-SY5Y клетките во невронски тип на клетки (Terpolo et al., 2016). До денес, постојат научни сознанија кои го потенцираат афинитетот на SH-SY5Y клетките за липозоми што содржат холестерол. Имено, во студијата на Lee et al. (2013) беше забележано дека додавањето на холестерол во липозомската формулација резултира со 11-кратно зголемено преземање на овие системи од страна на оваа клеточна линија, што имплицира на фактот дека составот на нано-везикулите значително влијае врз нивното навлегување во невронските клетки и истото во значителна мера е подобро со додавање на холестерол.

Во оваа насока, бидејќи сите три нано-формулации содржат холестерол во нивниот липиден двослој, понискиот процент на интернализирани ПЕГ-илирани липозоми (NLb1 и NLb2) може да биде резултат на стерниот ефект на површинските PEG ланци кои веројатно делуваат како бариера и го спречуваат пристапот на холестеролот до клеточните структури. Исто така, важно е да се спомене дека ПЕГ-илацијата може да спречи или намали, но не го исклучува целосно врзувањето на протеините на површината на NLs. Прекумерната ПЕГ-илација може да придонесе за помалку ефикасно врзување на протеините кои би имале потенцијална функција на лиганди за транспорт во рецептор посредуваната интернализација, што финално резултира со делумна инхибиција и намалување на клеточното преземање (Pozzi et al., 2014). Како што беше претходно дискутирано за експериментите со hCMC/D3, супериорното навлегување на примерокот што повеќе содржи PEG, односно NLb1 во споредба со NLb2 може да се должи на помалку негативниот ZP ($-15,77 \pm 0,51$ и $-37,64 \pm 1,42$ mV, за NLb1 и NLb2, соодветно), подобрената стабилност (неагрегација) како и конформацијата на „густа четка“ на PEG ланците кај истата, за кои се претпоставува дека се клучни фактори што ја фаворизираат клеточната интернализација.

Земајќи го предвид сето гореспоменато, може да се сумира дека клеточниот транспорт и интернализацијата се под влијание на бројни својства на нанолипозомските везикули како што се: составот на NLs (особено количеството на PEG), физичко-

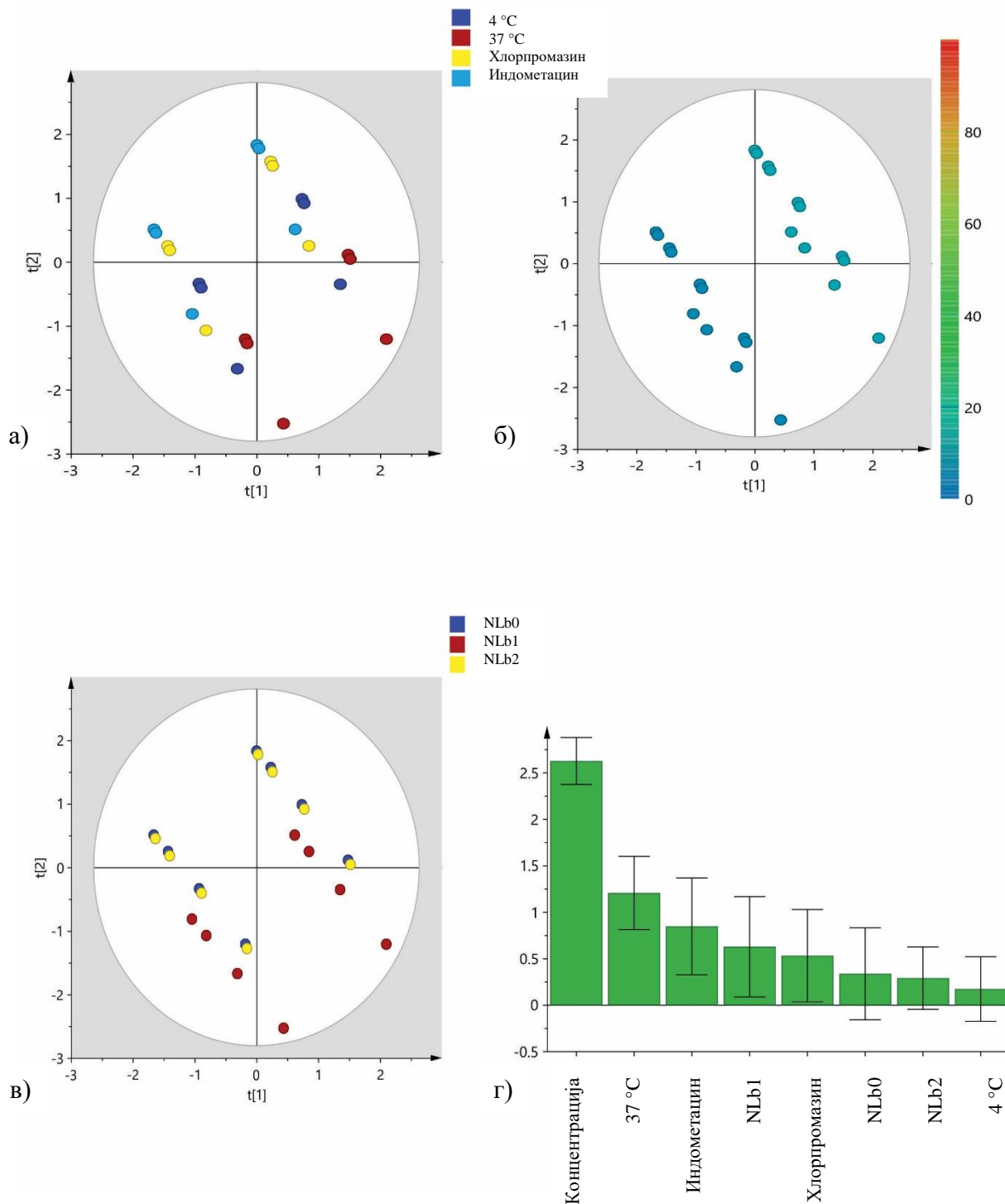
хемиските својства на NLs, експерименталните услови (концентрација на нанолипозомските формулации и време на инкубација), како и составот на клеточниот медиум и структурните карактеристики на клеточните линии. Комплексната врска помеѓу сите наведени фактори дополнително го пропагира настанувањето и развојот на други биолошки процеси, како што е феноменот на ПК, како и механизмот за интернализација на nano-системите.

Затоа, со цел да се направи детална интерпретација на резултатите од квантитативното преземање во клетките и да се извлечат релевантни заклучоци, потребно е да се направат дополнителни студии за карактеризација на површината на нанолипозомите, конформацијата на PEG, составот на ПК и интеракциите на нанолипозом-клеточна површина.

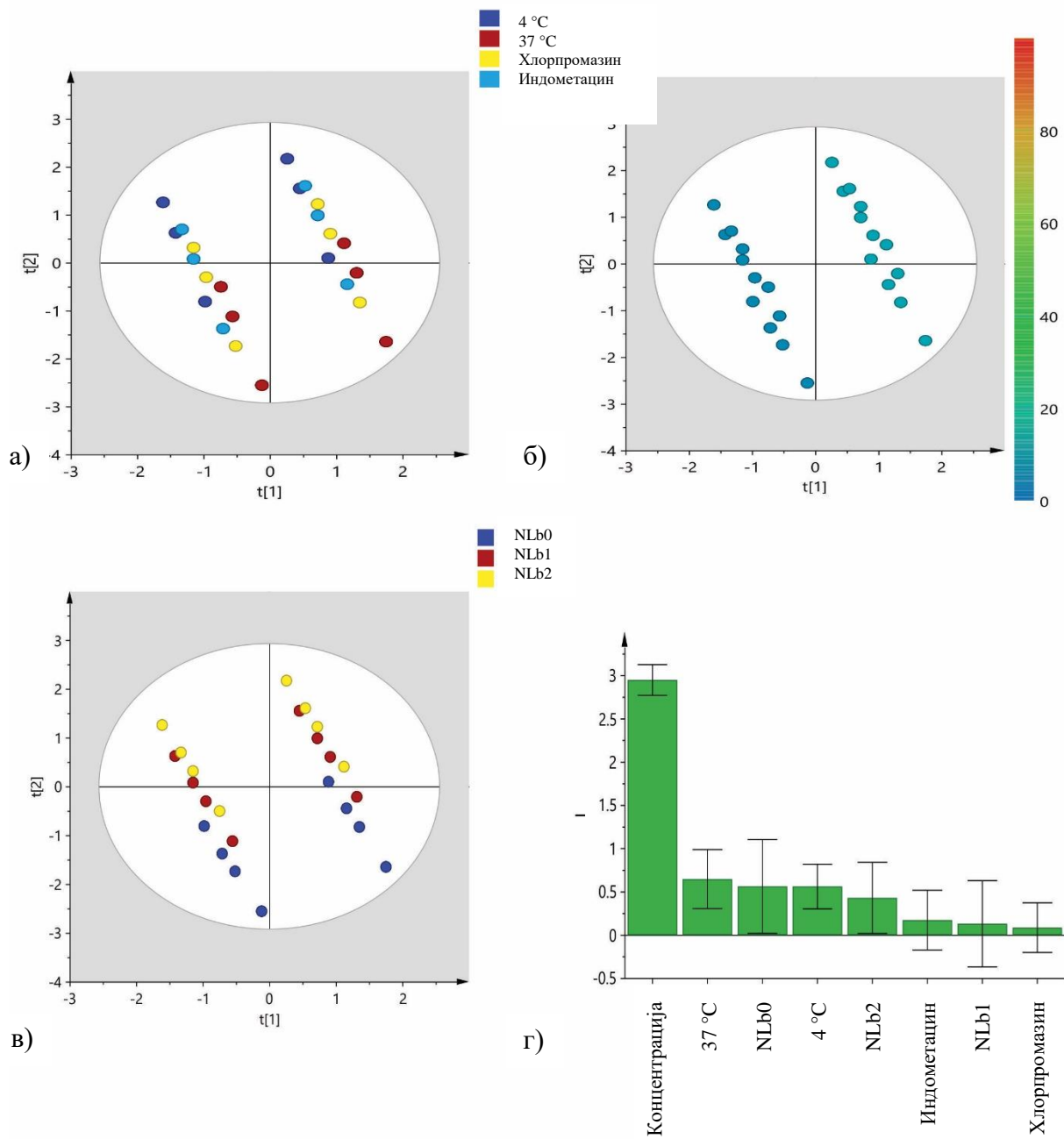
5.3.12. Квантитативни студии на преземање на NLs од страна на hCMEC/D3 и SH-SY5Y клеточните линии во присуство на инхибитори на клеточен транспорт

Со цел да се добие јасна слика за точниот механизам на интернализација на подготвените празни nano-формулации, како и да се направи корелација со претходно презентирани квантитативни резултати за интернализација на овие системи во клетките на 37 °C, беа спроведени експерименти на клеточно преземање на NLs во присуство на инхибитори на специфични ендоцитозни патишта во концентрации што беа нетоксични за клетките. Во оваа насока, експериментите беа поделени во 3 сета, при што во првиот сет секоја од клеточните линии (hCMEC/D3 и SH-SY5Y) беше претходно третирана (30 минути) со хлорпромазин, во вториот сет со индометацин (30 минути), а во третиот сет беа спроведени експерименти на клеточно преземање на 4 °C.

Флуоресценцијата на клетките инкубирани со подготвените NLs во отсуство на било кој од инхибиторите се сметаше за 100%, додека пак флуоресценцијата добиена по инкубацијата во присуство на инхибитори беше изразена како релативен процент во споредба со клетките без инхибитор.



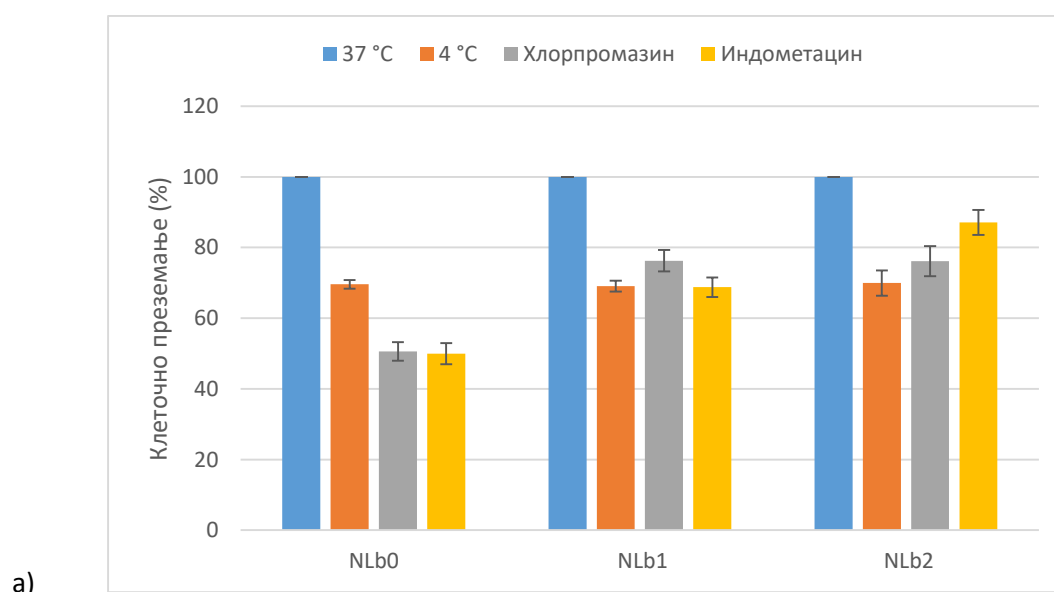
Сл. 30. а) Скетер плот обоен по услови на експеримент, б) Скетер плот обоен по концентрација на примерок, в) Скетер плот обоен по тип на формулација и г) VIP скор за дискриминативна анализа на факторите кои влијаат врз преземањето на NLs во hCMEC/D3.

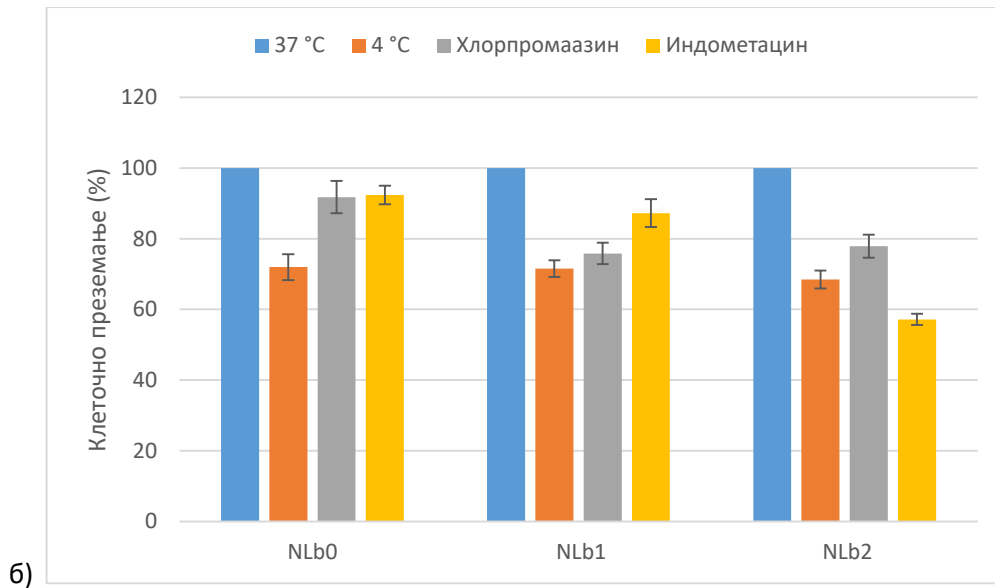


Сл. 31. а) Скетер плот обоен по услови на експеримент, б) Скетер плот обоен по концентрација на примерок, в) Скетер плот обоен по тип на формулација и г) VIP скор за дискриминативна анализа на факторите кои влијаат врз преземањето на NLs во SH-SY5Y.

Статистичката анализа на добиените резултати за моделот на hCMC/D3 (Сл. 30) јасно го покажува влијанието на концентрацијата на примероците и експерименталните услови врз клеточното преземање, при што инхибиторите на ендоцитоза имаат значаен ефект, додека пак температурата на одвивање на експериментот (вкупен енергетски метаболизам) не покажа значително влијание врз вкупното навлегување во клетките. Дополнително, количеството на PEG на површината на NLs се покажа како фактор што влијае на навлегувањето, што исто така може да се види на VIP графикот кој дава севкупен приказ на ефектот на независните променливи (Сл. 30д). Моделот на преземање од страна SH-SY5Y покажа поинаква слика за влијанието на независните променливи (Сл. 31). Согласно VIP графикот (Сл. 31д), може да се заклучи дека концентрацијата на примероците и температурата се доминантни фактори што влијаат на интернализацијата на NLs. Слично како и кај hCMC/D3, и присуството и количеството на PEG во составот на подготвените формулации исто така покажа значаен ефект.

Од Сл. 32 може да се забележи дека по 2 часа инкубација на 4 °C, односно по предизвикување општа клеточна метаболичка инхибиција, навлегувањето на испитуваните формулации во концентрации од 10 µg/mL беше намалено на ~70% во двете клеточни линии. Овие резултати покажуваат дека за дел од преземените NLs е најверојатно одговорна енергетски зависната ендоцитоза, додека пак преостанатиот дел на интернализирани NLs веројатно е резултат на физичката атхезија или пасивната дифузија (Jiang et al., 2013).





Сл. 32. Клеточно преземање на NLs (10 µg/mL) во а) hCMEC/D3 клетки; б) SH-SY5Y клетки по 2 часа инкубација на 4 °C, со хлорпромазин и со индометацин.

Со цел да се разјасни точниот механизам на ендоцитоза, клетките беа понатаму третирали со хлорпромазин за кој е познато дека е инхибитор на функцијата на AP2, еден од клучните адаптер протеини во ендоцитозата посредувана од клатрин што исто така обезбедува акумулација на клатринот во доцните ендозоми, а со тоа ја инхибира ендоцитозата. Од графичкиот приказ може да се забележи намалување на интернализацијата на ПЕГ-илираните формулации NLb1 и NLb2 (примерок со 50 и 5 mg PEG, соодветно) за ~25% во двете клеточни линии во споредба со контролата на 37 °C, што укажува на тоа дека ендоцитозата посредувана од клатрин, едно од доминантните патишта за интернализација на NLs со дијаметар ~ 120 nm е најверојатно вклучена, поради големината на клатрин обложените јами (Francia et al., 2019; Jiang et al., 2013; Ou et al., 2022). Дополнително, спроведените експерименти резултираа со значително намалување на процентот на навлегување на неПЕГ-илираниот примерок - NLb0 во hCMEC/D3 (50,59±2,65%) и благо намалување во интернализацијата во SH-SY5Y клетките (93,78±458%). Оваа ситуација може да биде резултат на различните структурни специфики, различните својства на клеточните површини помеѓу двете клеточни линии, како и составот на ПК формирана на површината на NLs по инкубацијата во медиумот за клеточни култури (Nie et al., 2012).

Дополнително, треба да се земе предвид дека при обид за блокирање на одреден транспортен пат, клетките најчесто се прилагодуваат со активирање на алтернативни

механизми, и развиваат додатни механизми за компензација на блокираната функција или рецептор (Francia et al., 2019). Ова тврдење може дополнително да ги објасни хетерогените резултати добиени за инхибиција на ендоцитозата посредувана од кавеолин помеѓу различните формулации во различните клеточни линии ($49,96 \pm 2,95$ - $87,10 \pm 3,56\%$ и $57,17 \pm 1,56$ - $92,38 \pm 2,65\%$ на преземени NLs во hCMEC/D3 и SH-SY5Y, соодветно).

Површинските својства на нано-везикулите, како што е ПЕГ-илацијата, исто така може да влијаат на преземањето/атхезијата со клетките бидејќи конформацијата на PEG ланците и исто така, агрегацијата на PEG полимерите во контактниот регион помеѓу ПЕГ-илираниот липозом и клеточната мембрана може да го диктира процесот на мембранското обвиткување на ПЕГ-илираните NLs за време на ендоцитозата (Chen et al., 2018). Оттука, може да се заклучи дека различни енергетско зависни и независни транспортни патеки се веројатно вклучени во диктирањето на транспортот на испиуваните примероци на липозомски везикули низ КМБ и неврните.

5.3.13. Квантитативни студии на клеточно преземање на NLs од страна на комбинирана hCMEC/D3 / SH-SY5Y клеточна линија

До денес, добро е утврдено дека КМБ е селективна и сложена структура која претставува површина помеѓу централниот нервен систем и периферната циркулација. Нејзините специфицирани микроваскуларни ендотелни клетки поврзани со клетките на базалната ламина и другите клетки како што се перицитите, астроцитните, микроглијалните клетки и неврните формираат целина, позната како невровакуларна целина. Оваа целина служи како физичка бариера поради присуството на сложените тесни спојки помеѓу соседните ендотелни клетки и го ограничува и регулира транспортот на повеќето молекули и носачи и во исто време го наметнува трансцелуларниот пат како поволен за нивно поминување преку КМБ. Наспроти него, парацелуларниот транспорт низ тесните спојки е карактеристичен за повеќето ендотелни клетки (Hourfar et al., 2022; Idris et al., 2018; Mursaleen et al., 2023).

Во последните декади се добиени резултати од многу студии во однос на интернализацијата и преземањето на нано-системите од различни типови на клеточни линии за КМБ и неврони, поединечно. Во оваа насока, во текот на нашето истражување беа спроведени детални експерименти под различни експериментални услови на веќе споменатите две клеточни линии, hCMEC/D3 и SH-SY5Y, со цел да се одреди

квантитативното преземање на дизајнираните формулации на NLs од страна на овие клетки и дополнително, да се предвиди механизмот на нивна интернализација. Сепак, и покрај потврденото успешно навлегување на NLs во SH-SY5Y неуробластома клетките при нивна директна изложеност, не може со сигурност да се потврди дали резултатите би биле конзистентни и добиените ефекти би се реплицирале *in vivo*. Имено, способноста на nano-везикулите како носачи на активни компоненти наменети за третман на заболувањата на ЦНС е ограничена поради примарниот предизвик да се премине КМБ (Mursaleen et al., 2023). Друг аспект што треба да се земе предвид е фактот дека информациите за судбината на нанолипозомите во перицитите, астроцитите или невроните по преминувањето на КМБ се доста ограничени (Perkolab et al., 2020).

Поради овие причини, беа направени транспортни студии на неПЕГ-илирана празна формулација – NLb0 и двете ПЕГ-илирани празни формулации - NLb1 и NLb2 (примероци што содржат 50 и 5 mg PEG, соодветно) низ *in vitro* модел на КМБ и квантитативно беше определно количеството на нивна последователна интернализација во неуробластома клетките. За таа цел, човечките мозочни микроваскуларни ендотелни клетки, hCMEC/D3, беа засадени и култивирани на апикалната страна на полупропустливите Transwell инсерти, додека пак монослоевите на SH-SY5Y неуробластома клетките беа култивирани на базалната страна на плочи со 12 бунарчиња. Откако hCMEC/D3 достигна вредност за TEER >50 Ω и конфлуентноста на SH-SY5Y беше >85%, двете клеточни линии беа комбинирани и беа направени студиите на транспорт.

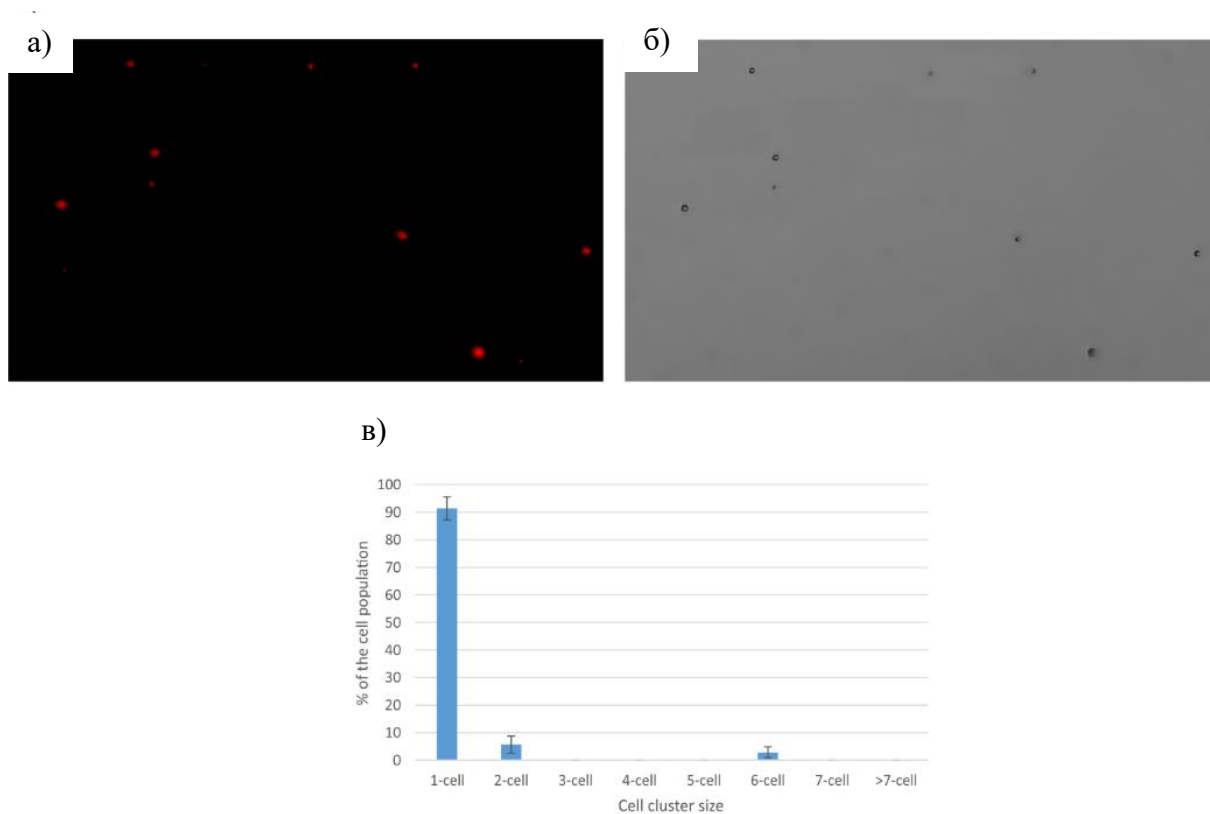
Резултатите за клеточно преземање на nano-везикулите во невронските клетки по преминувањето на КМБ *in vitro* сугерираат дека неПЕГ-илираната формулација (NLb0) беше интернализирана во најголем процент (27,54 \pm 2,93%), проследена со формулацијата NLb2 (26,46 \pm 1,87%, со 5 mg на PEG) и формулацијата со најголемо количество на PEG на нејзината површина - NLb1 (25,17 \pm 1,74%), што имплицира на успешен транспорт на овие nano-носачи преку моделот на КМБ и нивно последователно навлегување во невронските клетки (Mursaleen, 2021). Исто така, беше забележано дека трите формулации следат ист тренд на квантитативно навлегување во SH-SY5Y во комбинација со hCMEC/D3, слично како и во експериментите на поединечната клеточна линија на неуробластома клетките (33,27 \pm 1,95, 25,17 \pm 2,65 и 26,46 \pm 1,54% за NLb0, NLb1 и NLb2, соодветно). Ваквите резултати може да се припишат на физичко-хемиските својства на nano-везикулите, како и на физиолошките фактори што влијаат врз нивната интернализација, но и на морфолошките и структурните особености на SH-SY5Y.

Бидејќи успехот на експериментите кои се изведуваат на клеточна ко-култура првенствено зависи од сложената интеракција помеѓу голем број фактори, резултатите добиени од овој тип на експерименти треба да послужат само како почетна точка во процесот на создавање на севкупната слика. Во согласност со достапната литература, при интерпретација на овие резултати треба да се земе предвид и ефектот на размената на медиум помеѓу различните клеточни култури со оглед на тоа дека клеточната комуникација се одвива преку растворливи фактори и екстрацелуларни везикули, т.н. клеточни секретони. Иако нивното влијание сèуште не е целосно дефинирано и разјаснето, клеточните секретони може значително да го регулираат однесувањето на клетките и да ги менуваат нивните перформанси и карактеристики (Vis et al., 2020).

5.3.14. Определување на број на hCMEC/D3 клетки со интернализирани NLs со помош на флуоресцентна микроскопија

Во насока на потенцирање на примената на Микро-Раманската спектроскопија за потврда на интернализацијата на нано-системите во клетките, како и предностите кои оваа техника ги нуди во споредба со микроскопските методи што најчесто се користат за нивна визуелизација, најпрво беа направени експерименти за клеточно преземање на една избрана празна нанолипозомска формулација - NLb1 ((примерок 50 mg PEG) во hCMEC/D3 клетките согласно методот опишан од Mourtas et al. (2014).

Со цел да се евалуира интернализацијата на NLb1 во hCMEC/D3 клетките, најпрво беше имплементирана техника на флуоресцентна микроскопија со користење на автоматизиран бројач на флуоресцентни клетки погоден за детекција на епифлуоресценција на црвената Oil Red O. По изложеност од 4 часа, нанолипозомите маркирани со Oil red O беа детектирани во $95,3 \pm 4,2\%$ од изброените клетки ($n=3$). Епифлуоресценцијата на Oil red O јасно се разликуваше од позадината (Сл. 33а и б). Клетките беа интактни и не беше забележана ниту клеточна некроза, ниту пак токсичност со оглед на краткото време на инкубација. Дополнително, присуството на клеточни агрегати во примероците беше минимално, што укажа на занемарливи грешки во тек на автоматското броење на клетките (Сл. 33в).



Сл. 33. Флуоресцентна микроскопија на клетките со интернализирани липозоми
 а) флуоресцентна микроскопија на интернализираните липозоми со Oil red O,
 б) светлосна микроскопија на интернализираните липозоми, в) графички приказ на
 присутните кластери (кластерите скоро и да не се присутни што овозможува броење
 на клетките со интернализирани Oil red O маркирани липозоми со минимална грешка).

5.3.15. Детекција на флуоресцентно маркирани и немаркирани NLs во hCMEC/D3 клеточната линија со користење на Микро-Раманска спектроскопија

Во последните години, микроскопските техники (флуоресцентна и конфокална микроскопија) и проточната цитометрија се едни од најчесто користените методи за определување на клеточниот механизам на интернализација и интрацелуларната судбина на нанолипозомите (Huth et al., 2006). Сепак, можните промени во физичко-хемиските и биолошките својства предизвикани од флуоресцентната боја, истекувањето на бојата, слабата стабилност и бледеењето на бојата што доведува губење или намалување на интензитетот на сигналот со текот на времето се големи ограничувања што не можат лесно да се решат. Понатаму, брановите должини со висока енергија што се користат за ексцитација на флуорофорите може да ги оштетат клетките и да предизвикаат производство на реактивни кислородни радикали, што понатаму влијае на

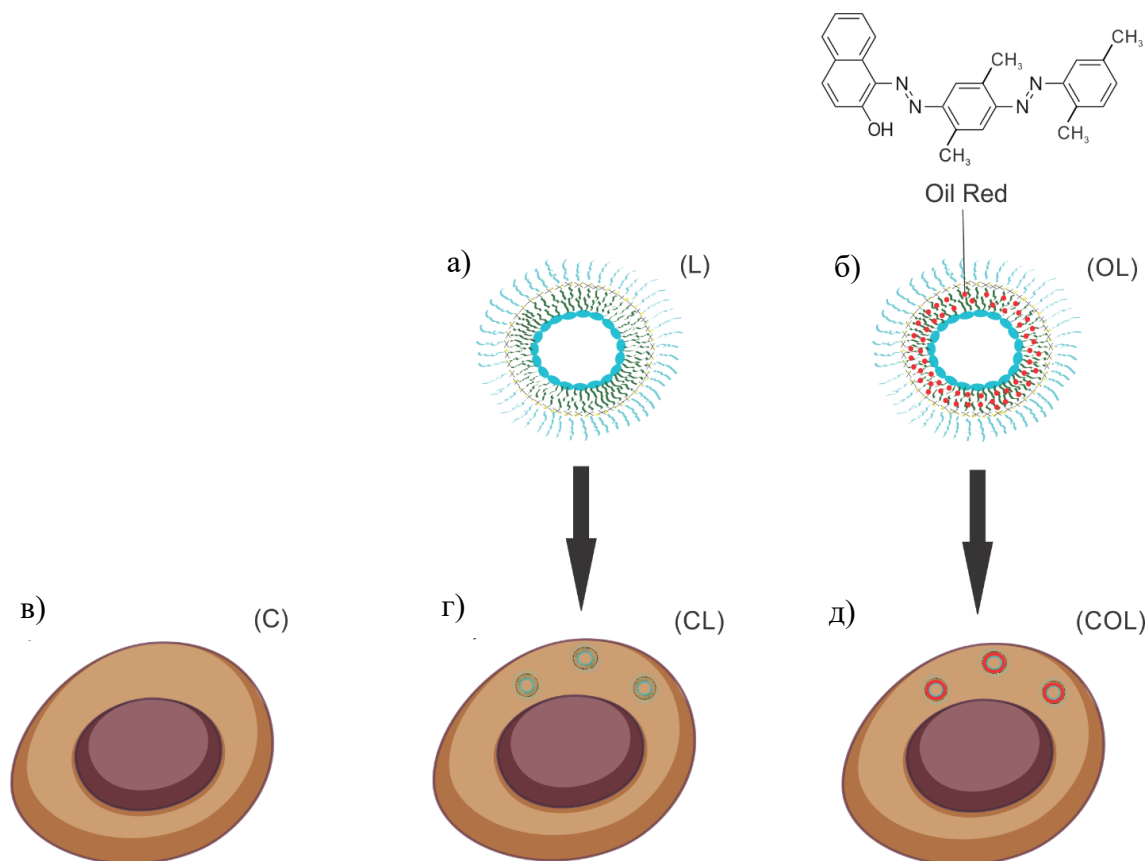
цитотоксичноста и на мембранската пропусливост и интегритет (Robson et al., 2018). Разновидноста на проблемите што потекнуваат од флуоресцентните бои треба да се надминат со техники кои можат да ги споредат и разликуваат немаркираните и маркираните нано-носачи. За таа цел, во ова истражување беше пристапено кон техника која што потенцијално ќе ги надмине и заобиколи сите гореспоменати предизвици и проблеми.

Поради високата резолуција и применливоста за таргетирање на живи клетки во воден медиум и за фиксирани примероци, конфокалната Микро-Раманска спектроскопија е една од најчесто користените техники за визуелизација на клетките. Оваа техника овозможува неинвазивно хемиско сликање врз основа на вибрационите својства на функционалните групи во примерокот и дополнително, не бара маркирање на примероците. Директната визуелизација на компонентите во примерокот обично се изведува со добивање на тродимензионални конфокални Рамански слики и интегрирање на интензитетот на карактеристичните спектрални појаси измерени на една локација и на неколку слоеви на примероци (Majzner et al., 2013). Спектрите може да се добијат со фокусирање на ласерскиот зрак во точката од интерес или со мапирање на експерименти кои понатаму би се обработувале со мултиваријантна анализа на податоци (хемометрија). Во споредба со едноваријантните методи, каде што информациите се извлекуваат преку релативна споредба на поместувањето на спектралните ленти и промените во интензитетот забележани во спектрите на поединечните примероци, мултиваријантните методи се помоќни и поточни бидејќи ги изведуваат и споредуваат информациите од сите спектри добиени од различни точки на испитуваниот примерок (Matthäus et al., 2018).

Во биолошките клетки и другите сложени ткива, набљудуваните спектри покажуваат ленти со различен интензитет и форми кои потекнуваат од вибрациите на различните составни компоненти: нуклеински киселини, протеини, липиди, фосфолипиди и јаглехидрати. Поради богатата спектрална содржина, освен истражувањата на молекуларниот состав и структура, техниката може да се искористи за следење на оптичките сигнали кои произлегуваат од интернализираните липозоми, со предуслов клеточното преземање да биде во висок процент. Со оглед на недостигот на податоци во врска со употребата на конфокалната Микро-Раманска спектроскопија за проучување на клеточната интернализација на маркирани и немаркирани нанофармацевтици (Romero et al., 2011), целта на овие експерименти беше да се тестира и нагласи потенцијалот на техниката за евалуација на интернализацијата на

немаркираните ПЕГ-илирани нанолипозоми (NLb1), како и оние маркирани со Oil Red O во клетките на крвно-мозочната бариера (hCMEC/D3).

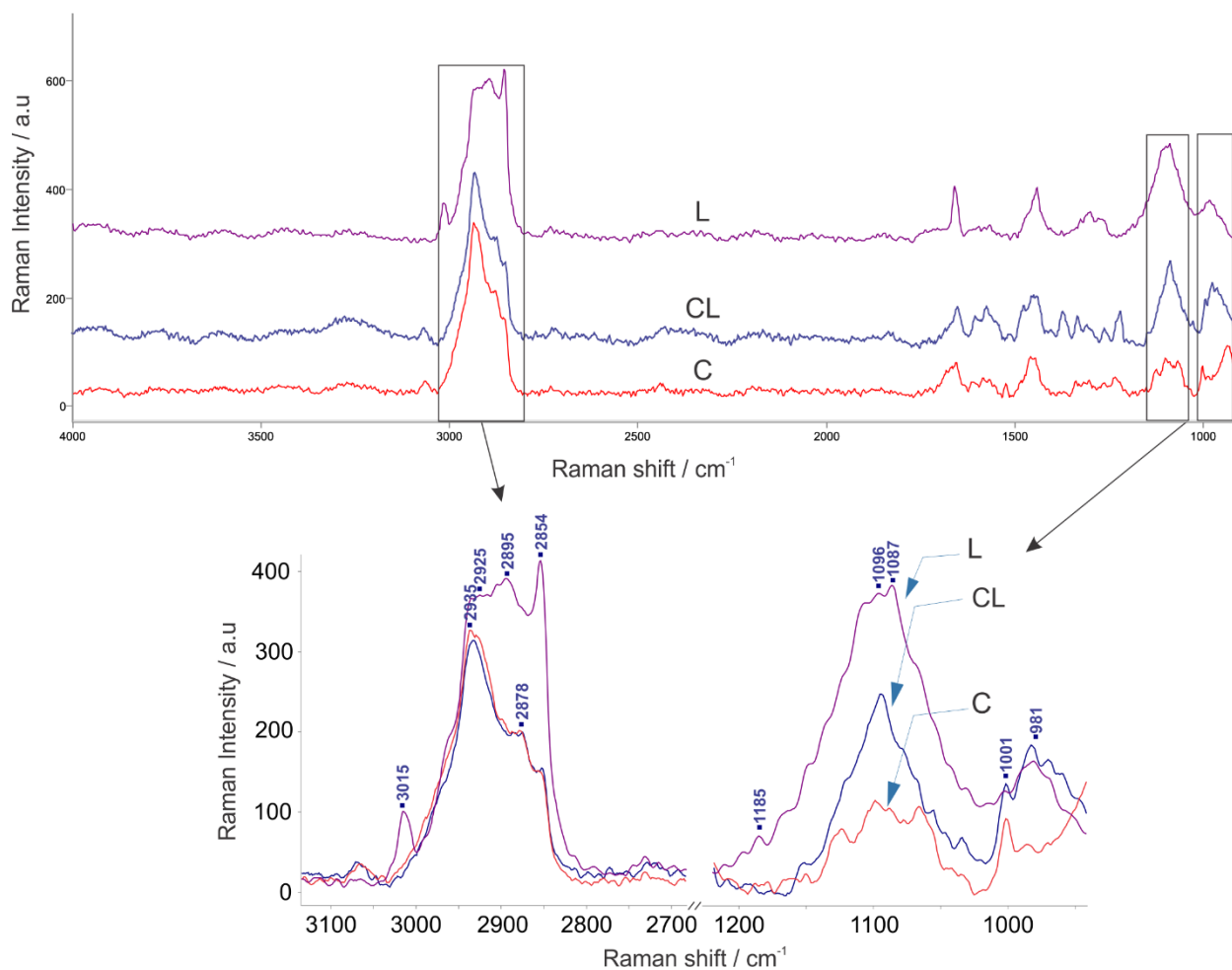
Примероците на немаркираната (примерок L) и маркираната (примерок OL) празна нанолипозомска формулација, контролните hCMEC/D3 клетки (примерок C), како и hCMEC/D3 клетките инкубирани со немаркирани (примерок CL) и маркирани везикули (примерок COL) се прикажани на Сл. 34.



Сл. 34. Шематска презентација на а) немаркирани нанолипозоми (L), б) маркирани нанолипозоми со Oil Red O (OL), в) контролна група на hCMEC/D3 клетки (C), г) hCMEC/D3 клетки инкубирани со немаркирани нанолипозоми (CL), д) hCMEC/D3 клетки инкубирани со маркирани нанолипозоми со Oil Red O (COL).

Најпроминентните карактеристики во Раман спектрите на hCMEC/D3 клетките (примерок C) може да се воочат во регионот на C–H растегнување ($3100-2800\text{ cm}^{-1}$) и регионот на молекуларен отпечаток ($1700-900\text{ cm}^{-1}$) (Сл. 35). Деталите за спектралните асигнации се во согласност со литературата и соодветно се прикажани во Табела 14. Од Сл. 35 може да се забележи дека Раманските спектри на немаркираните липозоми (примерок L), контролната група на клетки (примерок C) и клетките инкубирани со

интернализирани немаркирани липозоми (примерок CL) се слични, но сепак покажуваат забележителни спектрални разлики. Асигнациите на овие три примероци се сумирани во првите три колони од Табела 14. Раманските спектри на примероците што содржат липозоми (примероци L и CL) претставуваат карактеристични ленти што потекнуваат од вибрациите на липидните опашки (метиленско C-C скелетно растегнување на *trans* и *gauche* конформациите на ацилните ланци на липидите (Živanović et al., 2021) во регионот 1150-1030 cm^{-1} со изразен максимум на 1087 cm^{-1} и 1095 cm^{-1} во спектрите на примероците L и CL, соодветно). Дополнително, регистрирани се слаби ленти околу на 1440 (примерок L и CL) и 1300 cm^{-1} бранова должина (примерок L) асигнирани како CH_2 деформациски модови (Fox et al., 2007; Tantipolphan et al., 2006) (завртување-twist и свиткување-bend, соодветно). И покрај нивниот слаб интензитет, овие ленти е важно да се земат предвид со оглед на тоа што не беше детектирано преклопување со ленти на другите структурни единици. Симетричното растегнување на C=C врската (Tantipolphan et al., 2006) на холестеролот се манифестира како добро дефиниран пик на 1657 (примерок L) и 1656 cm^{-1} (примерок CL). Понатаму, важно е да се споменат трите истакнати ленти помеѓу 3100 и 2800 cm^{-1} . Имено, лентата на 2854 cm^{-1} примероци (L и CL) и лентите од 2895 (примерок L) и 2878 cm^{-1} (примерок CL) потекнуваат од асиметричното и симетричното C-H метиленско истегнување, соодветно (Fox et al., 2007). Симетричната лента за C-H растегнување на крајните метил групи беше карактеристична за 2925 (L) и 2932 cm^{-1} (примерок CL). Пикот на 3015 cm^{-1} е припишан на асиметричното растегнување на метил групата на холинот (Fujii et al., 2000; Tantipolphan et al., 2006) и на $\text{Ag}(\text{C-H})$ вибрациите на растегнување (Tantipolphan et al., 2006), и истите се показатели за подреденоста на липозомската мембрана (Fox et al., 2007; Gaber et al., 1978). Спектралните ленти на 3000-2750 cm^{-1} , 1180-1000 cm^{-1} , 1300-1200 cm^{-1} и 1500-1400 cm^{-1} , најверојатно потекнуваат од PEG (симетрично и антисиметрично растегнување на PEG метиленската група, C-O-C вибрациите на *trans* и *gauche* полиетилен гликолските ланци (Kuzmin et al., 2020; Varga et al., 2013), CH_2 завртувањето и $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ симетричното и антисиметрично свиткување (Yamini et al., 2014). Но сепак, голем број од овие ленти се преклопуваат со фосфолипидните вибрации и не можат јасно да се разликуваат.

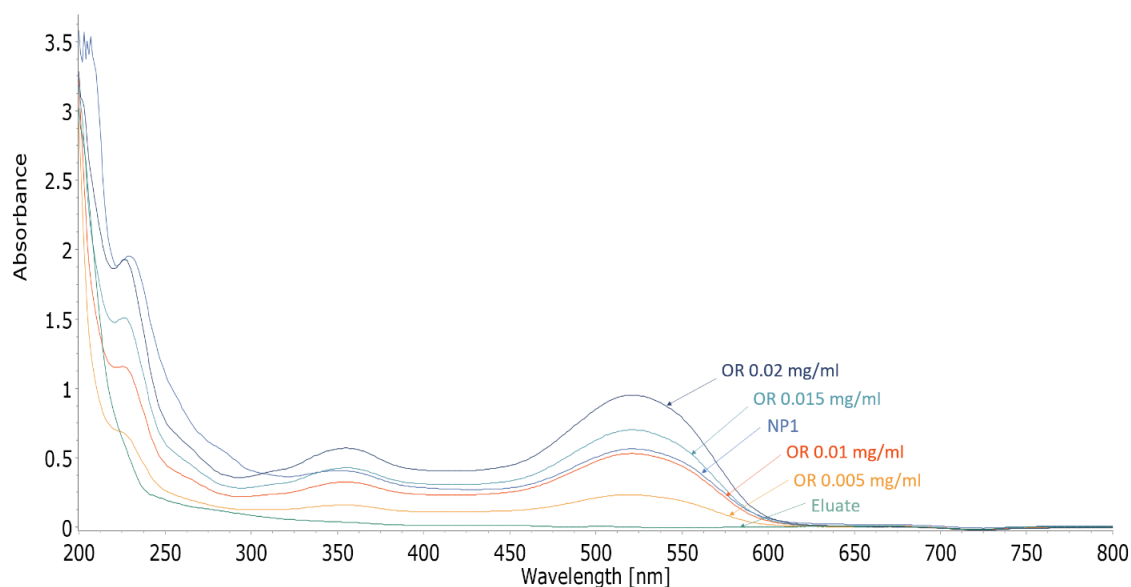


Сл. 35. Рамански спектри на: немаркирани нанолипозоми (L), клетки инкубирани со немаркирани нанолипозоми (CL), и контролна група на клетки (C) (горен дел). Спектралните региони од интерес се означени со правоаголници и понатаму зголемени и преклопени за подобра визуелизација.

Oil Red O е лизохромна диазо боја која се користи за боеење на неутралните триглицериди, масните киселини, естрите на холестерол и некои липопротеини, а со тоа и за следење и разбирање на физиолошките и патофизиолошките настани во липидниот метаболизам, како и прекумерната акумулација на липиди во ткивата и клетките (Kraus et al., 2016; Rizk et al., 2004). И покрај високата липофилност и афинитетот кон неутралните липиди како што се триглицеридите и естрите на холестерол, поради нејзините амфифилни својства и присуството на $-OH$ и $-N=N-$ поларните групи, Oil red O може да стапи во интеракција и со поларните групи на фосфолипидните и

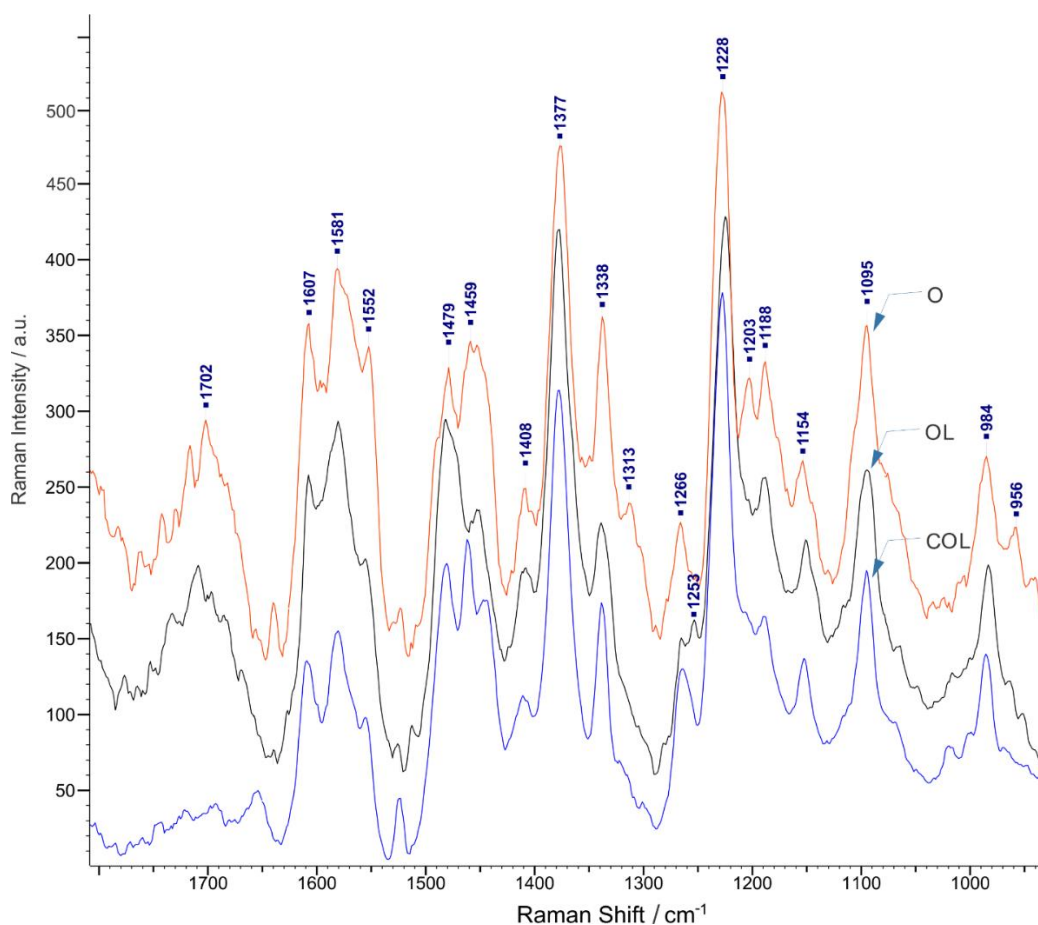
холестеролските молекули од липозомскиот двослој, што ги прават соодветни за маркирање на липозоми.

Во студиите на стабилност, изведени пред експериментите на интернализација, најпрво беше докажана стабилноста на нанолипозом-Oil Red O комплексите со оглед на тоа што немаше слободна боја присутна во елуатот по чување во тек на 7 дена (Сл. 36). Ова беше очекувано со оглед на тоа што откако ќе се зароби во липидната фаза, истекувањето на оваа флуоресцентна боја е незначително поради нејзината многу ниска растворливост во водени медиуми. Како што се претпоставуваше, најистакнатите ленти (Табела 14, Сл. 37) во Раманските спектри на Oil red O се појавија на 1228 cm^{-1} (C-O вибрација на нафтил групата и C-H сецкање свиткување на нафталенскиот прстен (Ou et al., 2016; Çatikkaş, 2017), 1377 cm^{-1} (N=N растегнување (Ou et al., 2017), 1479 cm^{-1} (CH_3 асиметрично и симетрично свиткување (Dhakal et al., 2019), и 1581 cm^{-1} (C-C растегнување на ароматичните прстени и N=N растегнување (Dhakal et al., 2019). Спектрите на маркираните липозоми беа слични на Раманските спектрите на слободната боја и поседуваа слични спектрални ленти како и на Oil red O (Табела 14; Сл. 37). Двата проминентни пикови на Oil red O (1228 cm^{-1} и 1377 cm^{-1}) беа присутни во спектрите на маркираните липозоми и спектрите на клетките со интернализирани маркирани липозоми.

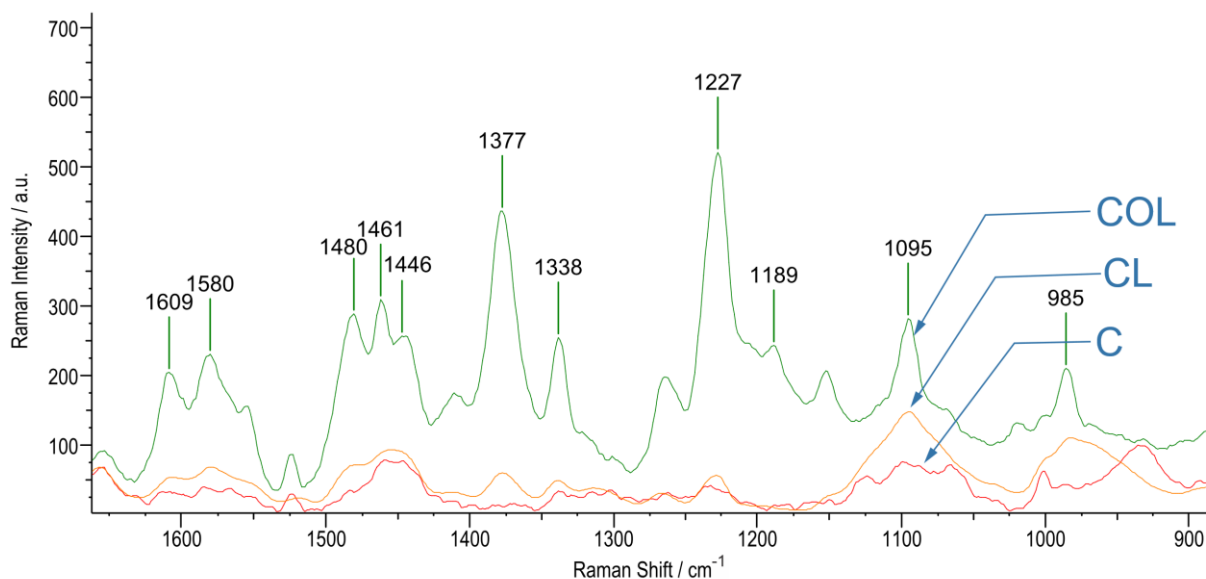


Слика 36. Потврда за стабилност на маркираните липозоми со Oil red O. Елуатот од липозомските дисперзии (чувани во рок од 7 дена на температура од $8\text{ }^{\circ}\text{C}$) после центрифугирање не покажува карактеристичен апсорпциски пик кој потекнува од Oil red O што е доказ за стабилноста на бојата во липозомот.

Промени во релативниот интензитет на карактеристичните пикови (поместување на вибрациите на C–O растегнувањето од 1228 на 1225 cm^{-1} , видливо намалување на интензитетот на CH_3 деформацијата на 1203 cm^{-1} и појава на нов многу слаб пик на 1253 cm^{-1} - CH свиткувања), беа забележани во спектрите на маркираните липозоми (OL) што најверојатно се должат на интеракцијата и ориентацијата на молекулите на Oil Red O во фосфолипидниот двослој (Huth et al., 2006). Во Раманските спектри на клетките инкубирани со маркирани липозоми (COL), интернализацијата на везикулите се потврди со присуството на два карактеристични пика кои не беа присутни во спектрите на немаркираните липозоми и спектрите на клетките со интернализирани немаркирани липозоми (Табела 14, Сл. 37 и 38), односно пиковите на C–O растегнување и CCH свиткување на нафталанскиот прстен на 1227 cm^{-1} , како и вибрациите од $\text{N}=\text{N}$ растегнувањето на 1377 cm^{-1} .



Сл. 37. Рамански спектри на Oil Red O (O), маркирани нанолипозоми со Oil Red O (OL) и клетки инкубирани со нанолипозоми маркирани со Oil Red O.



Сл. 38. Рамански спектри на контролната група на клетки (C), клетки инкубирани со немаркирани нанолипозоми (CL) и клетки инкубирани со нанолипозоми маркирани со Oil Red O (COL).

И покрај тоа што добиените Рамански спектри на клетките со интернализирани липозоми содржат суперпозиција на ленти од различни клеточни компоненти и интернализирани структури, врз основа на разликите помеѓу спектрите што произлегуваат од немаркираните липозоми, контролната група на клетки и клетките со интернализирани липозоми, може да се направат неколку претпоставки релевантни за процесот за интернализација.

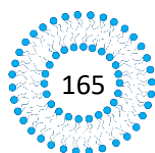
Литературните податоци укажуваат на потенцијални разлики во Раманските спектри на клетките во различни клеточни региони поради хетерогениот хемиски состав на клетката во различните компартменти. Униваријантната анализа на спектрите добиени во една точка не е ефективно решение на овој проблем. За да се надмине овој проблем и со цел да се добијат споредливи, репродуцибилни спектри кои можат да се интерпретираат, снимањата беа изведени под исти експериментални услови и споредливи точки во клетката. Со цел да се претпостави соодветното место на фокус за мерењата, беа евалуирани регионите на CH_3 (2935 cm^{-1}) до CH_2 (2854 cm^{-1}) растегнувањата (Табела 14). Литературните податоци за Рамански спектри снимани со фокус во липидните региони на клетката (липидни телца, делбена бразда) во споредба со спектрите снимани со фокус во цитоплазмата посочија кон разлики во интензитетот на лентите околу 2850 cm^{-1} . Овие разлики се потенцираат со зголемувањето на липидната концентрација при снимања со фокус во липидниот двослој на плазма

мембраната (Hsu et al., 2015; Romero et al., 2011). Имено, лентите на регионот на симетрично растегнување од CH_3 (2935 cm^{-1}) до CH_2 (2853 cm^{-1}) се поинтензивни кога се снима во липидните региони на клетката во споредба со регионите на цитоплазмата. Исто така, лентите на CH_3 симетричното растегнување (2935 cm^{-1}) до CH_2 (2854 cm^{-1}) беа поинтензивни во деловите богати со липиди отколку во цитоплазмата поради помалата густина на CH_2 групите во протеините во споредба со липидите. Имајќи го предвид овој ефект, може да се претпостави дека добиените ленти од снимените Рамански спектри во нашите експерименти произлегуваат од регионот на цитоплазмата. Како што беше напоменато, лентите во спектралниот регион на CH_3 симетричните растегнувања (2935 cm^{-1}) и CH_2 (2854 cm^{-1}) беа поинтензивни во спектрите на липозомските примероци во споредба со спектрите на клетките инкубирани со липозоми или контролните клетки (Сл. 35).

Спектрите на контролната група на клетки (примерок С), немаркираните липозоми (примерок L) и клетките инкубирани со немаркирани липозоми (примерок CL) покажаа различни варијации во регионот $1150\text{-}1030 \text{ cm}^{-1}$ (C–C растегнување на липиди) (Сл. 35). Спектарот на контролната група на клетки даде три различни пикови од 1066 cm^{-1} , 1099 cm^{-1} и 1124 cm^{-1} (Табела 14). Врвовите на 1066 cm^{-1} и 1124 cm^{-1} се асигнирани како *trans* конформери во и вон рамнина (*trans* маркери) додека пак пикот на 1099 cm^{-1} е асигниран како *gauche* конформер (Fox et al., 2007). Регионот на C–C растегнувањето во немаркираните липозоми (примерок L) со карактеристичен широк пик на 1087 cm^{-1} посочува кон поголема содржина на молекулите на *gauche* конформерот и можно прекоплопување на предоминантниот пик со *trans* индикаторите. Понатаму, спектрите на клетките инкубирани со немаркирани липозоми (примерок CL) исто така се разликуваат од спектрите на контролните клетки (примерок С) со присуство на проминентна *gauche* конформер лента која што се шири кон повисоки и пониски бранови должини слично како кај липозомите.

Друга важна карактеристика е прилично силниот сигнал на 981 cm^{-1} во спектрите на клетките инкубирани со немаркирани липозоми (примерок CL), припишани на O–C–C–N⁺ растегнувањето на поларните лецитински групи (Živanović et al., 2021) (Табела 14, Сл. 35). Оваа лента карактеристична за липозомите може да биде клучна за проучување на нивната интернализација поради отсуството на други јаки сигнали во овој дел на спектарот кои би потекнувале од контролните клетки.

Од приказот може да се забележи дека вибрацијата на C–N растегнувањето не е чиста и зависи од конформацијата на O–C–C–N⁺ ланецот, па оттука примероците со



различна конформација може да се разликуваат. Лентата на C=C симетричното растегнување на холестеролот (Tantipolphan et al., 2006) беше карактеристична во спектрите на сите три примероци: односно за липозомите (на 1657 cm^{-1}), контролните клетки (на 1655 cm^{-1}) и клетките инкубирани со липозоми (на 1655 cm^{-1}) (Табела 14, Сл. 35).

Табела 14. Тентативни асигнации на лентите во раманските спектри на: липозомите (L), контролните клетки (CC), клетките со не-маркирани липозоми (CL), Oil red O (OR), липозомите маркирани со Oil red O (ORL), клетки со интернализирани маркирани липозоми

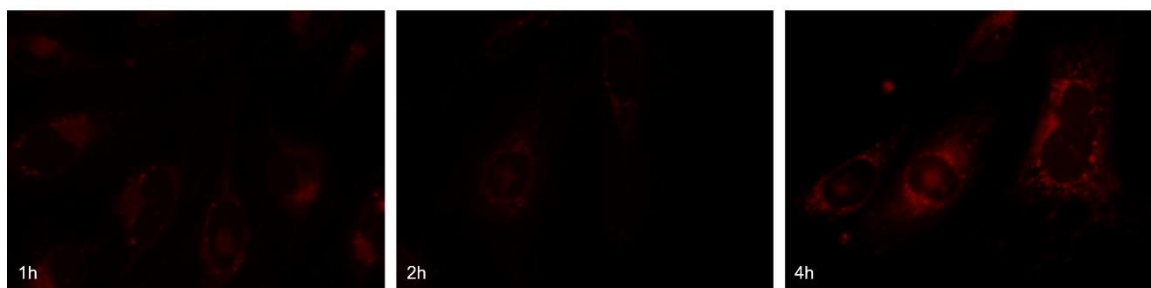
	CC	CL	OR	ORL	CLL	Assignment
3015 w						NCH ₃ асиметриско растегнување на холин
2925 sh	2937 vs	2932 s			2938 m	CH ₃ и CH ₂ асиметриско растегнување
2895 sh	2878 sh					CH ₂ симетриско растегнување и CH растегнување на липиди и протеини
1657 m						C=C симетриско растегнување на холестерол
	1655 m	1656 w				C=C растегнување и амид I врски, комбинација
			1607 m	1609 w	1609 w	v(C-N) растегнување во C=C-N=N
				1580 m	1580 w	
1499 m		1481sh				CH ₂ деформациски мод, холестерол
			1479 m	1481 m	1480 m	CH ₃ свиткување симетрично и асиметрично
	1459 m	1455 m			1461 m	Модови на нуклеинските киселини
			1458 m	1453 sh	1447/1446 m	C-H свиткување во рамнина на додатниот бензенски прстен
1440 vw		1446 vw				CH ₂ свиткување (лецитин + холестерол)
			1376 s	1377 s	1377 s	N=N растегнување и C-H свиткување во рамнина, CH ₃ -Phenyl
1369 w		1375 w				Amide III random coils
1338 w		1339 w				CH ₂ /CH ₃ превивање (wag) & завртување на колаген, нуклеински киселини и триптофан
			1338 m	1338 w	1338 m	CH свиткување
1298 w						CH ₂ завртување
1277 sh						
	1266 vw					
	1233 w					Амид III β-sheet
		1227 w				Амид III random coils
			1228 vs	1225v s	1227 s	C-O растегнување и CCH сецкање (свиткување) на нафталенскиот прстен
			1202 sh			CH свиткување на Oil red O, □(CH)
			1188 m	1187 sh	1189 sh	CH bend oil red, □(CH) + v(C-N _{azo})
				1151 w		v(C-N _{azo}), □(CH)
	1124 sh					C-N од протеините, C-C растегнување на липиди и протеини
	1099 w					C-C растегнување на липиди, Изолирани gauche конформери
1087 s		1095 s				C-C растегнување на липиди (лецитин), Изолирани gauche конформери
			1094 m	1095 m	1095 m	Ароматично CH свиткување во рамнина, □(CH)
	1066 w					Транс конформери во и вон рамнина
	1001 m	1001 w				Фенилаланин, C-C растегнување на ароматичниот прстен
			983 w	983 w	985 w	=N-Фенил растегнување
981 sh		983 m				O-C-C-N+ холин
	935 m					C-C растегнување на пролин, валин и протеинските ланци (α-helix)/гликоген (протеинска асигнација)
	573 vw					Триптофан/цитозине, гванин
	481 w					ДНК

5.3.16. Студии на интернализација на NLs во живи клетки на hCMEC/D3 и SH-SY5Y клеточните линии со флуоресцентна и конфокална микроскопија

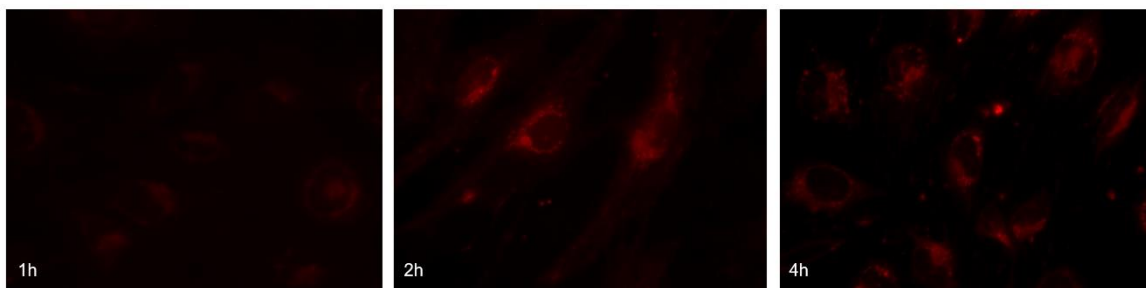
Согласно резултатите добиени во студиите на клеточно преземање на нанолипозомските примероци во клетките на КМБ и неуробластома, интернализацијата и нивниот интрацелуларен транспорт зависи од многу фактори, вклучувајќи ги физичко-хемиските карактеристики на овие формулации, со посебен акцент на нивниот површински полнеж. Оттука, може да се заклучи дека овие својства во голема мера би влијаеле на нивното *in vitro* и *in vivo* однесување (Kang et al., 2017). Со цел да се направи уште една потврда на горенаведените резултати, интернализацијата на празните примероци на NLs – NLb0, NLb1 и NLb2 (примерок без PEG, со 50 и 5 mg PEG, соодветно) во hCMEC/D3 и SH-SY5Y клеточните линии беше испитана со помош на флуоресцентна микроскопија на живи клетки, како и со конфокална микроскопија.

На Сл. 39 и 40 се претставени микрографиите добиени со флуоресцентна микроскопија каде што трите формулации на NLs беа инкубирани во двете клеточни линии во периоди од 1, 2 и 4 часа. Од направените фотомикрографии може да се увиди успешната временско-зависна интернализација на испитуваните формулации.

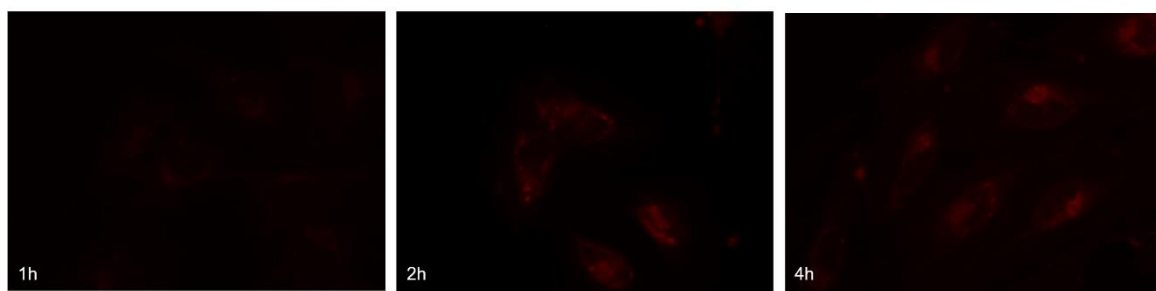
а)



б)

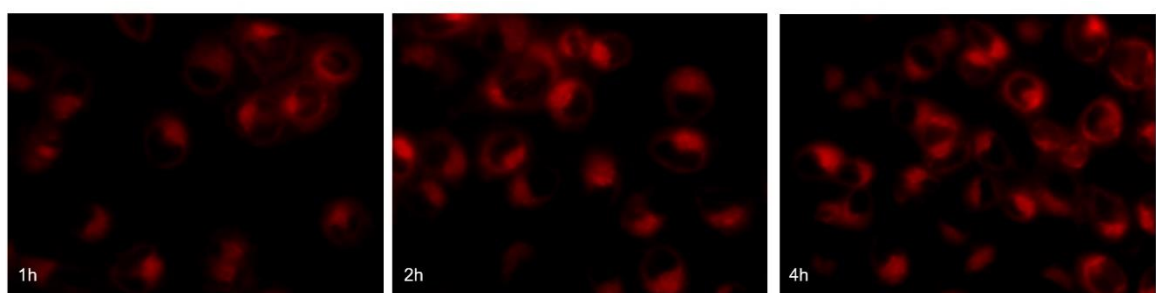


В)

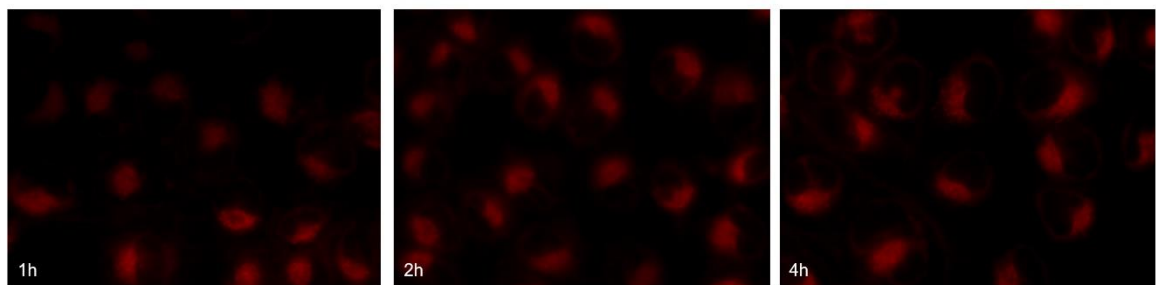


Сл. 39. Интернализација во живи hCMEC/D3 клетки на а) NLb0; б) NLb1; в) NLb2.

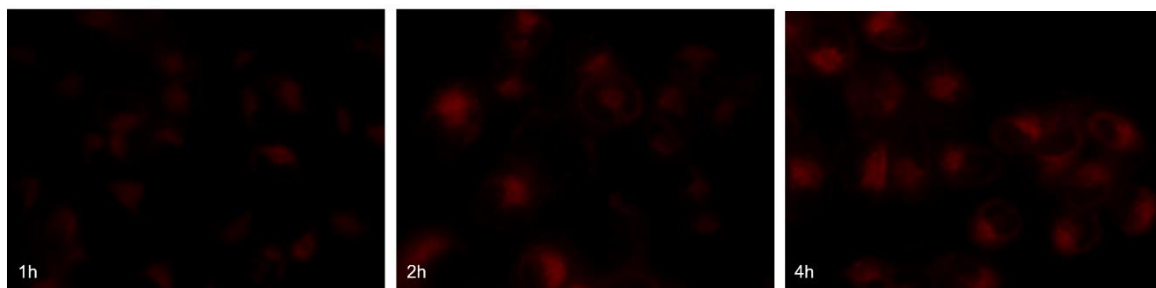
а)



б)



в)

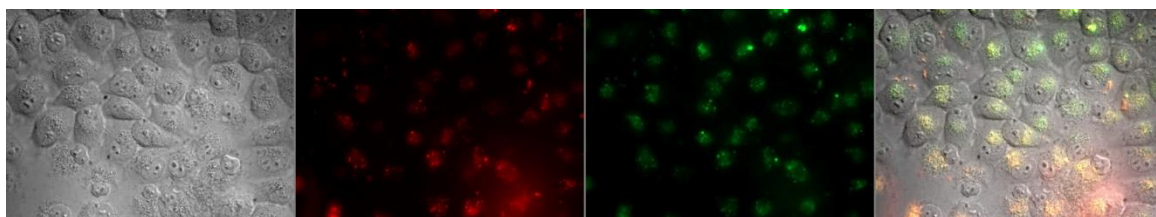


Сл. 40. Интернализација во живи SH-SY5Y клетки на а) NLb0, б) NLb1, в) NLb2

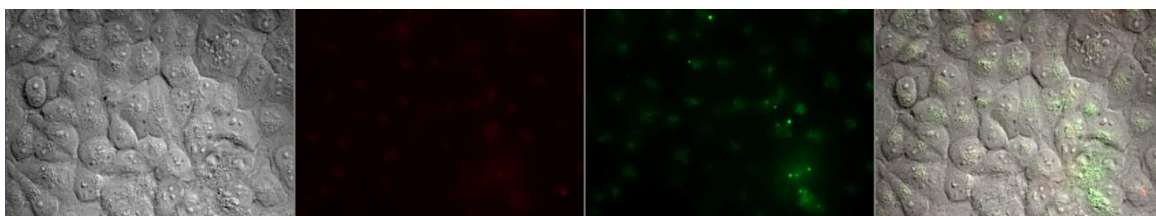
Исто така, во студиите на клеточно преземање на празните примероци на NLs во присуство на инхибитори на клатрин и кавеолин-едноцитните патеки и воедно, при инхибиција на АТР-зависните транспортни механизми беше утврдено дека нано-везикулите имаат тенденција да го следат ендоцитниот механизам на клеточна интернализација.

Па така, од интерес беше да се визуелизира патеката на интернализација на формулациите NLb0, NLb1 и NLb2 и да се потврди нивната ко-локализација во ендозомите. Во таа насока, овие три празни нанолипозомски примероци беа инкубирани 4 часа во присуство на боја која сигнализира ендоцитоза што во кисела средина (ендозоми и лизозоми) дава зелена флуоресценција. Од прикажаните фотомикрографии на Сл. 41 може да се види и потврди дека сите испитувани формулации на NLs се интернализирани и колокализирани во ендозомите и лизозомите на SH-SY5Y клетките.

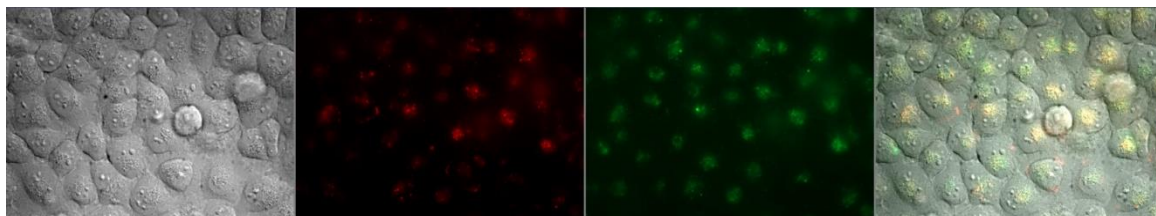
а)



б)



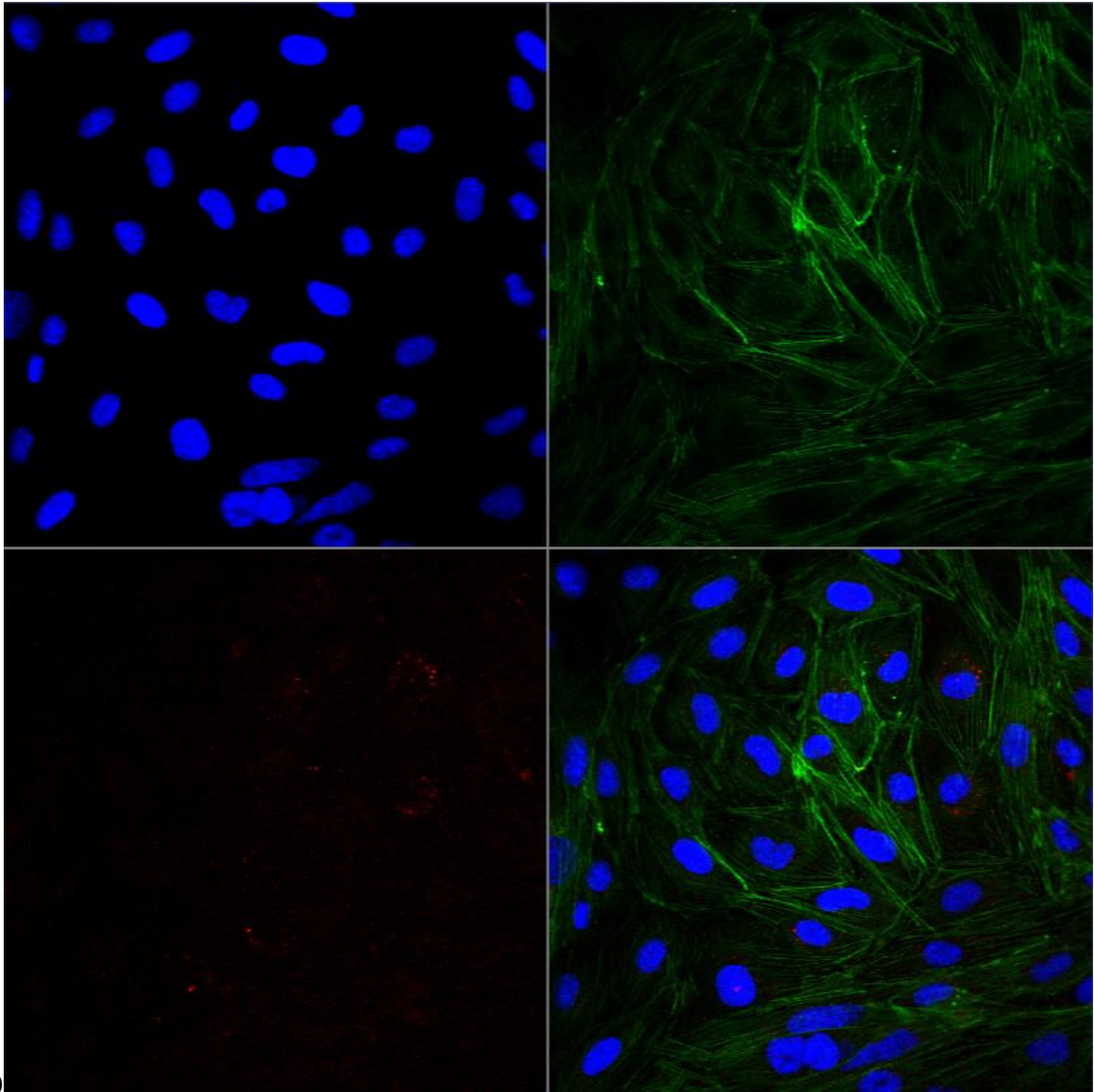
в)



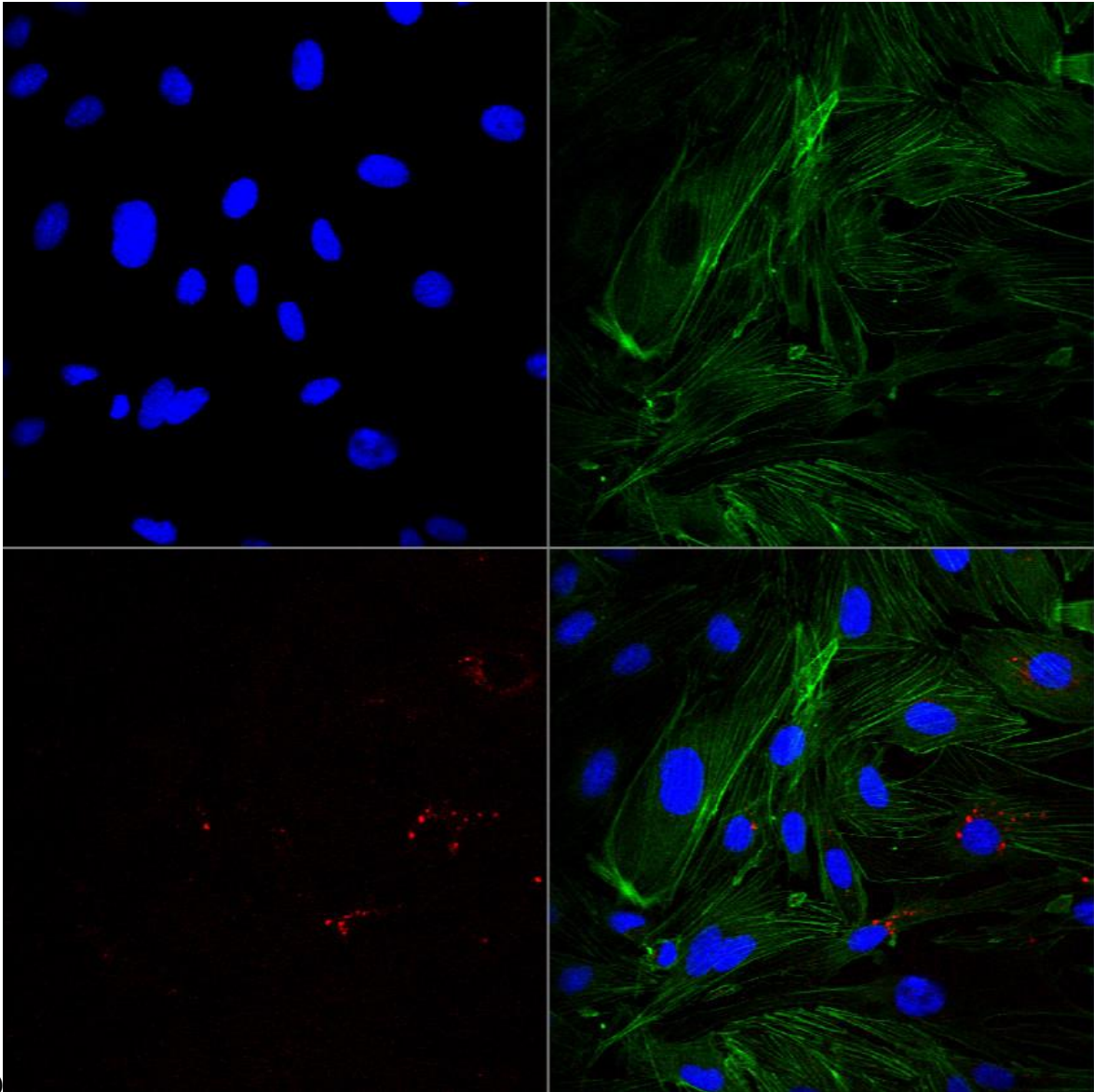
Сл. 41. Инкубација на а) NLb0, б) NLb1 и в) NLb2, во живи SH-SY5Y (4 часа) (NLs се маркирани со црвена, а ендозомите со зелена флуоресцентна боја).

Сликите добиени со примена на конфокалната микроскопија, повторно ја потврдија успешната интернализација на NLs во клеточната линија hCMC/D3.

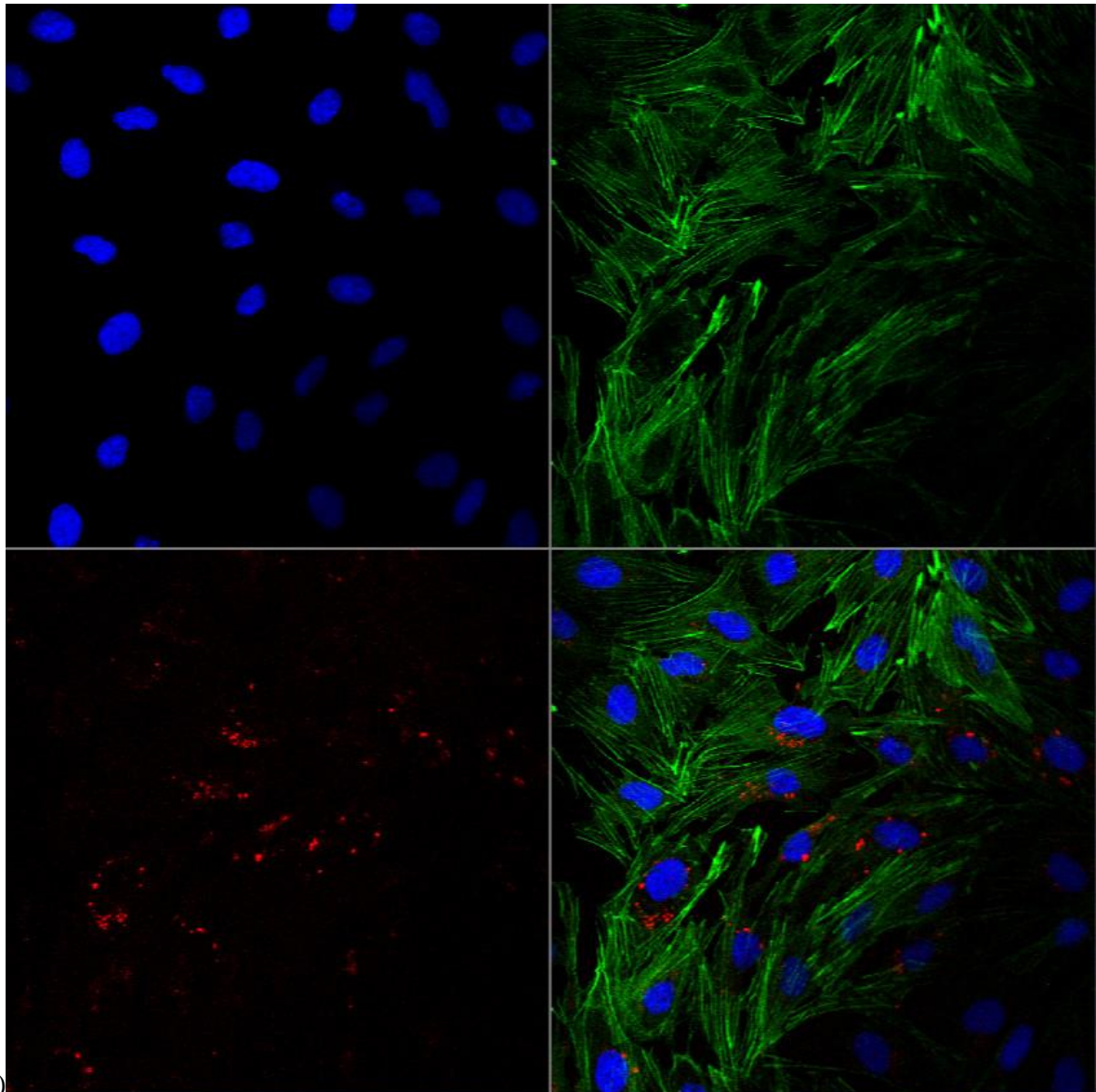
Во литературата може да се најдат бројни студии кои ја покажуваат способноста на липидните нано-системи да ја преминат КМБ и покрај нејзината високо рестриктивна природа, и згора на тоа да ги испорачуваат енкапсулираните активни компоненти во различни клеточни оддели (Reginald-Opara et al., 2022). Како што може да се види од прикажаните микрографии (Сл. 42), нашите примероци покажуваат тенденција за акумулација околу перинуклеарната област (Boado и Pardridge, 2011). Во однос на нивната интрацелуларна локализација, добиените резултати покажаа дека нема разлика во клеточната дистрибуција помеѓу трите формулации (NLb0, NLb1 и NLb2, примерок без PEG, 50 и 5 mg PEG, соодветно) од аспект на присуството и количеството на PEG на нивната површина.



a)



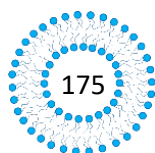
6)



в)

Сл. 42. Конфокална микроскопија на интернализација и дистрибуција на а) NLb0, б) NLb1 и с) NLb2 во hSMC/D3 клетките (цитоскелетот е обележан со зелена, јадрото со сина, а NLs со црвена флуоресцентна боја, соодветно).

6. Заклучок



Во рамките на оваа докторска дисертација беше направен дизајн, развој, оптимизација и физичко-хемика и биофармацевтска карактеризација на формулации на ПЕГ-илирани нанолипозоми со енкапсулиран екстракт од рузмарин со потенцијал за успешен премин низ КМБ и ефикасно и безбедно лекување на АБ.

Врз основа на добиените резултати од испитувањата направени во ова истражување може да се заклучи следново:

- Во тек на прелиминарната фаза од истражувањата подготвени беа различни формулации на празни конвенционални нанолипозоми со модифицираната техника на хидрација на сув липиден филм каде што беше вариран соодносот на SL и CH со цел да се добијат нановезикули со големина во ранг од 100 до 130 nm. Големината на подготвените формулации се движеше од 129 до 134 nm (SL:CH од 5:1 до 20:1, *m/m*, соодветно). Врз основа на овие резултати, формулацијата чијшто масен сооднос на SL и CH изнесуваше 10:1 (*m/m*) беше одбрана за понатамошна површинска модификација. Последователно, PEG беше инкорпориран во липидната фаза (сооднос SL:CH:PEG = 10:1:0.5, *m/m*), при што беа добиени везикули со средна големина од 129 nm и тесна унимодална дистрибуција. Со цел ефикасно инкорпорирање на RE во нанолипозомските носачи беше утврдено дека повисок % на енкапсулација се добива кога екстрактот е инкорпориран во липидната фаза.

Со изведените OFAT експерименти утврдено беше дека промената на количествата на SL, PEG и RE во формулацијата сигнификантно влијаат врз големината на везикулите, апсолутното количество на енкапсулирана RA и *in vitro* профилите на ослободување на RA во тек на 24 часа. Подготвените нанолипозоми претставуваа мултивезикуларни системи со среден дијаметар од $119 \pm 1,76$ до $141 \pm 2,53$ nm, унимодална дистрибуција (SPAN фактор < 1,83), ефикасност на енкапсулација од 75 до 90% и продолжено ослободување на RA како маркер компонента во тек на 48 часа (35,55-56,27%). Од спроведените *in vitro* студии на адсорпција на протеини со користење на Брадфорд метод беше потврдено дека ПЕГ-илацијата на овие нано-системи е успешна формулациска стратегија за спречување на формирањето на ПК.

- Имплементираниот централно композитен дизајн овозможи квалитативна и квантитативна идентификација на влијанието на значајните формулациски променливи (количествата на SL, RE и PEG) врз својствата од интерес на нанолипозомите (големина на везикулите, апсолутно количество на енкапсулирана киселина (RA) како маркер компонента и *in vitro* брзина на нејзино ослободување во тек на 24 часа). По направената

анализа и воспоставените модели и равенки на зависноста на параметрите од интерес, беше направена оптимизација на формулациите во насока на добивање нано-везикули кои ќе се карактеризираат со големина <200 nm, максимален % на енкапсулирана активна компонента и продолжено ослободување во тек на 24 часа, од каде што произлегоа пет предложени формулациски решенија.

- Оптимизираните пет примероци на нанолипозоми кои содржеа различни количества на PEG се карактеризираа со D_{50} од ~ 120 nm, со тесна унимодална дистрибуција и ефикасност на енкапсулација на RA од $\sim 90\%$. Анализата на површинската наелектризираност покажа дека формулациите со поголемо количество на PEG присутен на површината на нановезикулите (50 mg – примероци NL1, NL3 и NL5) имаат помалку негативни вредности за ZP во споредба со формулациите со 5 mg на PEG (примероци NL2 и NL4). Испитувањето на *in vitro* брзината на ослободување на RA од нанолипозомските системи укажаа на нејзино продолжено ослободување во тек на времето, при што беше согледана спротивна зависност помеѓу количеството на ослободена RA и количеството на PEG присутен на површината на нанолипозомите. Најсоодветен модел што најдобро ја опиша кинетиката на ослободување на RA од овие формулации беше Peppas-Sahlin.

Што се однесува до антиоксидативниот потенцијал, сите формулации покажаа статистички значаен подобар антиоксидативен капацитет во споредба со чистиот екстракт (RE) што укажува на синергистичкото дејство помеѓу компонентите во составот на нанолипозомите и инкорпорираниот екстракт.

Добиените резултати од студиите за стабилност на нанолипозомите во човечка плазма и медиум за клеточни култури покажаа дека нано-везикулите во биолошките течности веднаш се покриени со биомолекули кои ја менуваат нивната големина и површински својства. Од друга страна пак, не беа забележани значајни разлики во просечната големина и ZP на везикулите во тек на 24 часа инкубација со физиолошки релевантен медиум (фосфатен пуфер pH 7,4), што укажува на нивната физичка стабилност.

Во насока на евалуација на подготвените нанолипозоми како системи-носачи за ефикасен транспорт преку КМБ и целно делување во мозочните ткива, во понатамошните испитувања беа користени празни нанолипозомски формулации (NLb1 и NLb2), аналогни на примероците со највисоко (50 mg) и најниско количество (5 mg) на PEG (NL1 и NL2, соодветно), како и празна неПЕГ-илирана формулација (NLb0).

Спроведената Брадфорд анализа по инкубацијата на нано-носачите во плазмата на здрави доброволци и плазмата на пациенти со АБ покажа дека формулацијата со 50 mg на PEG (NLb1) се карактеризира со најниско количество на атсорбирани плазма протеини.

IR-ATR спектроскопските анализи дополнително потврдија дека содржината на PEG има клучна улога во формирањето и природата на врските помеѓу овие нанолипозомски носачи и говедскиот серум албумин. Формулацијата со поголемо количество на PEG (50 mg) којашто имаше најнизок % на атсорбирани протеини укажа на формирање на посилни водородни врски со албуминот, во споредба со формулацијата со 5 mg на PEG, што упатува на различноста во составот и интеракциите на формираната ПК.

Применетата AF4 анализа во студиите на стабилност на испитуваните нано-носачи во клеточен медиум за церебрални микроваскуларни еднотелни клетки (hCMEC/D3) укажа дека нема промени во големината на везикулите кај примерокот со најголемо количество на PEG (50 mg, NLb1), за разлика од неПЕГ-илираната формулација (NLb0) и онаа со 5 mg PEG (NLb2). Овие резултати беа уште една потврда дека ПЕГ-илацијата претставува успешна формулациска стратегија за супримирање на процесот на формирање на ПК што понатаму влијае врз ефикасноста на транспортот на овие носачи низ КМБ.

Со користење на автоматска електрофореза идентификувано беше дека ПК се формира уште во првиот час од инкубацијата на нано-носачите во клеточен медиум, при што албуминот беше атсорбиран во најголем % на површината на нанолипозомите.

- Во студиите за цитотоксичност врз hCMEC/D3 и SH-SY5Y клеточните линии утврдено беше дека испитуваните формулации не покажуваат намалување на клеточната вијабилност и нарушување на интегритетот на клеточната мембрана во тек на 24 часа при различни нивни концентрации.

Во експериментите на квантитативното клеточно преземање на нано-носачите беше увидено дека со зголемување на концентрацијата на примероците и продолжување на времето на инкубација расте и процентот на нивна интернализација. Статистичката анализа на моделот на клеточно преземање во hCMEC/D3 клеточната линија покажа најголемо преземање на формулацијата со најмногу PEG на површината (NLb1), за разлика од клеточното преземање во SH-SY5Y клетките, каде што формулацијата без PEG (NLb0) даде најуспешна интернализација.

Експериментите на клеточно преземање на формулациите со користење на инхибитори за ендоцитни патеки покажаа дека нано-везикулите следат енергетски зависен ендоцитен транспорт и процес на пасивна дифузија.

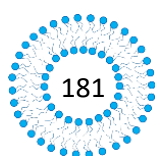
Транспортните студии на комбинираната hCMEC/D3/SH-SY5Y клеточна линија го потврдија успешниот транспорт на сите испитувани нано-носачи низ клетките на КМБ и нивното последователно преземање од страна на неуробластома клетките ($25,17 \pm 2,65$ - $33,27 \pm 1,95\%$).

Спектрите од Микро-Раманската спектроскопија ја потврдија успешната интернализација на нано-носачите, а микрографските прикази од флуоресцентната и конфокалната микроскопија открија дека флуоресцентно маркираните празни нанолипозоми се ко-локализираат во перинуклеарните клеточни региони.

Од сите горенаведени заклучоци од оваа докторска дисертација, може да се согледа дека составот на компонентите во нанолипозомските носачи, површинската модификација со ПЕГ и енкапсулираниот екстракт од рузмарин резултираат со формулациско решение што се одликува со оптимална големина, висок процент на енкапсулација на екстрактот, низок процент на адсорбирани плазматски протеини што би го продолжило времето на циркулација *in vivo*, ефикасен и безбеден транспорт низ КМБ и целно доспевање и интернализација во невроните. Дополнително, продолженото ослободување на активните компоненти од екстрактот со докажан силен антиоксидативен, односно невропротективен ефект ќе овозможи одржување на нивна ефективна концентрација во мозочните ткива, и оттука ќе доведе до супресија на појавата и развојот на примарните патофизиолошки настани на АБ.

Севкупните резултати за потенцијалот на дизајнираните ПЕГ-илирани нанолипозоми со енкапсулиран екстракт од рузмарин испитувани во рамките на оваа докторска дисертација упатуваат на можноста за нивна понатамошна *in vivo* евалуација со цел развивање на финална дозирана форма со практична, ефикасна и безбедна примена во третманот на АБ.

7. Литература



- Abreu, S.A., Castanheira, M.S.E., Queiroz, R.P.M-J. Ferreira, M.T.P., Vale-Silva, A.L., Pinto, E., 2011. Nanoliposomes for encapsulation and delivery of the potential antitumoral methyl 6-methoxy-3-(4-methoxyphenyl)-1H-indole-2-carboxylate. *Nanoscale Res. Lett.* 6 (1), 482. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-6-482>
- Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R., Begley, D.J., 2010. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol. Dis.* 37, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>
- Adams, G.P., Schier, R., 2001. Developing anti-HER2/neu single-chain Fv fragments from phage display libraries. *Methods in Molecular Medicine* 39, 729-747. <https://doi.org/10.1385/1-59259-071-3:729>.
- Almela, L., Blas, S., Fern, A., Roca, J., Rabe, V., 2006. 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), 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.02.056>
- Alagawany, M., Abd El-Hack, M.E., Farag, M.R., Gopi, M., Karthik, K., Malik, Y.S., Dhama, K., 2017. Rosmarinic acid: modes of action, medicinal values and health benefits. *Anim. Health Res. Rev.* 18, 167–176. <https://doi.org/10.1017/S1466252317000081>
- Allen, T.M., Cullis, P.R., 2013. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>
- Aliyandi, A., Reker-Smit, C., Bron, R., Zuhorn, I.S., Salvati, A., 2021. Correlating Corona Composition and Cell Uptake to Identify Proteins Affecting Nanoparticle Entry into Endothelial Cells. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 7, 5573–5584. <https://doi.org/10.1021/acsbio.1c00804>
- Alshaer, W., Hillaireau, H., Vergnaud, J., Ismail, S., Fattal, E., 2015. Functionalizing Liposomes with anti-CD44 Aptamer for Selective Targeting of Cancer Cells. *Bioconjug. Chem.* 26, 1307–1313. <https://doi.org/10.1021/bc5004313>
- Altamura, S., Muckenthaler, M.U., 2009. Iron toxicity in diseases of aging: Alzheimer’s disease, Parkinson’s disease and atherosclerosis. *J. Alzheimers. Dis.* 16 (4), 879–895. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1010>
- Angst, M.S., Drover, D.R., 2006. Pharmacology of drugs formulated with DepoFoam: a sustained release drug delivery system for parenteral administration using multivesicular liposome technology. *Clin. Pharmacokinet.* 45, 1153–1176. <https://doi.org/10.2165/00003088-200645120-00002>
- Annunziata, G., Sureda, A., Orhan, I.E., Battino, M., Arnone, A., Jiménez-García, M., Capó, X., Cabot, J., Sanadgol, N., Giampieri, F., Tenore, G.C., Kashani, H.R.K., Silva, A.S., Habtemariam, S., Nabavi, S.F., Nabavi, S.M., 2021. The neuroprotective effects of polyphenols, their role in innate immunity and the interplay with the microbiota. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 128, 437–453. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.07.004>
- Arora, S., Layek, B., Singh, J., 2021. Design and Validation of Liposomal ApoE2 Gene Delivery System to Evade Blood-Brain Barrier for Effective Treatment of Alzheimer’s Disease. *Mol. Pharm.* 18, 714–725. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00461>
- Azanza, J.R., Sádada, B., Reis, J., 2015. Liposomal formulations of amphotericin B: differences according to the scientific evidence. *Rev. Espanola Quimioter. Publicacion Of. Soc. Espanola Quimioter.* 28, 275–281.
- Balducci, C., Mancini, S., Minniti, S., La Vitola, P., Zotti, M., Sancini, G., Mauri, M., Cagnotto, A., Colombo, L., Fiordaliso, F., Grigoli, E., Salmona, M., Snellman, A., Haaparanta-Solin, M., Forloni, G.,

Masserini, M., Re, F., 2014. Multifunctional liposomes reduce brain β -amyloid burden and ameliorate memory impairment in Alzheimer's disease mouse models. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 14022–14031. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0284-14.2014>

Bana, L., Minniti, S., Salvati, E., Sesana, S., Zambelli, V., Cagnotto, A., Orlando, A., Cazzaniga, E., Zwart, R., Scheper, W., Masserini, M., Re, F., 2014. Liposomes bi-functionalized with phosphatidic acid and an ApoE-derived peptide affect A β aggregation features and cross the blood-brain-barrier: implications for therapy of Alzheimer disease. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 10, 1583–1590. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.12.001>

Barar, J., Rafi, M.A., Pourseif, M.M., Omid, Y., 2016. Blood-brain barrier transport machineries and targeted therapy of brain diseases. *BioImpacts BI* 6, 225–248. <https://doi.org/10.15171/bi.2016.30>

Backer, M.V., Gaynutdinov, T.I., Patel, V., Jehning, B.T., Myshkin, E., Backer, J.M., 2004. Adapter protein for site-specific conjugation of payloads for targeted drug delivery. *Bioconjug. Chem.* 15, 1021–1029. <https://doi.org/10.1021/bc0499477>

Begum, A.N., Jones, M.R., Lim, G.P., Morihara, T., Kim, P., Heath, D.D., Rock, C.L., Pruitt, M.A., Yang, F., Hudspeth, B., Hu, S., Faull, K.F., Teter, B., Cole, G.M., Frautschy, S.A., 2008. Curcumin Structure-Function, Bioavailability, and Efficacy in Models of Neuroinflammation and Alzheimer's Disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326, 196–208. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.137455>

Begum, M.Y., Abbulu, K., Sudhakar, M., 2012. Flurbiprofen-loaded stealth liposomes: studies on the Development, characterization, pharmacokinetics and biodistribution. *Journal of Young Pharmacists* 4 (4), 209-219. <https://doi.org/10.4103/0975-1483.104364>.

Behzadi, S., Serpooshan, V., Tao, W., Hamaly, A.M., Alkawareek, Y.M., Dreaden, C.E., Brown, D., Alkilany, M.A., Farokhzad, C.O., Mahmoudi, M., 2017. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chem. Soc. Rev.* 46 (14), 4218–4244. <https://doi.org/10.1039/c6cs00636a>.

Behzadi, S., Serpooshan, V., Tao, W., Hamaly, M.A., Alkawareek, M.Y., Dreaden, E.C., Brown, D., Alkilany, A.M., Farokhzad, O.C., Mahmoudi, M., 2017. Cellular Uptake of Nanoparticles: Journey Inside the Cell. *Chem. Soc. Rev.* 46, 4218–4244. <https://doi.org/10.1039/c6cs00636a>

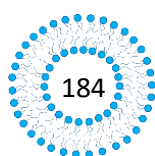
Bertrand, N., Leroux, J.-C., 2012. The journey of a drug-carrier in the body: an anatomo-physiological perspective. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 161, 152–163. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.098>

Blundell, L.C.J.E., Healey, J.M., Holton, E., Sivakumaran, M., Manstana, S., Platt, M., 2016. 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), 5757–5768. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9678-6>.

Boado, R.J., Pardridge, W.M., 2011. The Trojan Horse Liposome Technology for Nonviral Gene Transfer across the Blood-Brain Barrier. *J. Drug Deliv.* 2011, 296151. <https://doi.org/10.1155/2011/296151>

Borrás-Linares, I., Stojanović, Z., Quirantes-Piné, R., Arráez-Román, D., Švarc-Gajić, J., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A., 2014. Rosmarinus officinalis leaves as a natural source of bioactive compounds. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 20585–20606. <https://doi.org/10.3390/ijms151120585>

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



Cauwenberghe Van, C., Broeckhoven Van, C., Slegers K., 2015. The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. *Genetics in Medicine* 18, 421-430. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.117>.

Cabezas, M.D., Guiotto, N.E., Diehl, W.K.B, Tomás, C.M., 2013. Antioxidant and emulsifying properties of modified sunflower lecithin by fractionation with ethanol-water mixtures. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/53165>.

Cambuleva, Lj., Shalabalija, D., Cvetkovikj Karanfilova, I., Simonoska Crcarevska, M., Glavas Dodov, M., 2016. Formulation and characterization of Rosmarinic extract loaded PEG-ylated liposomes for brain delivery, *Macedonian pharmaceutical bulletin* 62 (suppl), 641-642.

Chang, H.-I., Yeh, M.-K., 2012. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. *Int. J. Nanomedicine* 7, 49–60. <https://doi.org/10.2147/IJN.S26766>

Chen, H., Tang, L., Qin, Y., Yin, Y., Tang, J., Tang, W., Sun, X., Zhang, Z., Liu, J., He, Q., 2010. Lactoferrin-modified procationic liposomes as a novel drug carrier for brain delivery. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 40, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.03.007>

Chen, Y.-C., Chiang, C.-F., Chen, L.-F., Liang, P.-C., Hsieh, W.-Y., Lin, W.-L., 2014. Polymersomes conjugated with des-octanoyl ghrelin and folate as a BBB-penetrating cancer cell-targeting delivery system. *Biomaterials* 35, 4066–4081. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.01.042>

Chen, Z., Zhong, C., 2014. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci. Bull.* 30 (2), 271–281. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1423-y>.

Chirico, G., Pallavicini, P., Collini, M., 2014. Gold nanostars for superficial diseases: a promising tool for localized hyperthermia? *Nanomed.* 9, 1–3. <https://doi.org/10.2217/nnm.13.186>

Chou, H., Lin, H., Liu, J.M., 2015. A tale of the two PEGylated liposomal doxorubicins. *Oncotargets Ther.* 8, 1719–1720. <https://doi.org/10.2147/OTT.S79089>

Colla, A.R.S., Rosa, J.M., Cunha, M.P., Rodrigues, A.L.S., 2015. Anxiolytic-like effects of ursolic acid in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 758, 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.077>

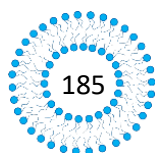
Confaloni, A., Tosto, G., Tata, A.M., 2016. Promising Therapies for Alzheimer's Disease. *Curr. Pharm. Des.* 22, 2050–2056. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160215154218>

Corbo, C., Molinaro, R., Taraballi, F., Furman, N.T., Sherman, M., Parodi, A., Salvatore, F., Tasciotti, E., 2016. Effects of the protein corona on liposome-liposome and liposome-cell interactions. *International Journal of Nanomedicine* 11, 3049-3063. <https://doi.org/10.2147/IJN.S109059>.

Cornejo, A., Aguilar Sandoval, F., Caballero, L., Machuca, L., Muñoz, P., Caballero, J., Perry, G., Ardiles, A., Areche, C., Melo, F., 2017. Rosmarinic acid prevents fibrillization and diminishes vibrational modes associated to β sheet in tau protein linked to Alzheimer's disease. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 32, 945–953. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1347783>

Cvetkovikj, I., Stefkov, Gj., Acevska, J., Petreska-Stanoeva, J., Karapandzova, M., Stefova, M., Dimitrovska, A., Kulevanova, S., 2013. Polyphenolic characterization and chromatographic methods for fast assessment of culinary *Salvia* species from South East Europe. *J. Chromatogr. A* 1282, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.068>.

d'Avanzo, N., Torrieri, G., Figueiredo, P., Celia, C., Paolino, D., Correia, A., Moslova, K., Teesalu, T., Fresta, M., Santos, H.A., 2021. LinTT1 peptide-functionalized liposomes for targeted breast cancer therapy. *Int. J. Pharm.* 597, 120346. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120346>



- Dabaghzadeh, F., Mehrabani, M., Abdollahi, H., Karami-Mohajeri, S., 2022. Antioxidant and anticholinesterase effects of rosemary (*Salvia rosmarinus*) extract: A double-blind randomized controlled trial. *Adv. Integr. Med.* 9, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.aimed.2021.03.002>
- Dass, C.R., 2003. Improving anti-angiogenic therapy via selective delivery of cationic liposomes to tumour vasculature. *Int. J. Pharm.* 267, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.08.010>
- Davtyan, H., Bacon, A., Petrushina, I., Zagorski, K., Cribbs, D.H., Ghochikyan, A., Agadjanyan, M.G., 2014. Immunogenicity of DNA- and recombinant protein-based Alzheimer disease epitope vaccines. *Hum. Vaccines Immunother.* 10, 1248–1255. <https://doi.org/10.4161/hv.27882>
- Derakhshandeh, K., Hochhaus, G., Dadashzadeh, S., 2011. In-vitro Cellular Uptake and Transport Study of 9-Nitrocamptothecin PLGA Nanoparticles Across Caco-2 Cell Monolayer Model. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* 10, 425–434. Ezzat, A.A., Tammam, S.N., Hanafi, R.S., Rashad, O., Osama, A., Abdelnaby, E., Magdeldin, S., Mansour, S., 2022. Different Serum, Different Protein Corona! The Impact of the Serum Source on Cellular Targeting of Folic Acid-Modified Chitosan-Based Nanoparticles. *Mol. Pharm.* 19, 1635–1646. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00108>
- Dhakal, S., Schmidt, W.F., Kim, M., Tang, X., Peng, Y., Chao, K., 2019. Detection of Additives and Chemical Contaminants in Turmeric Powder Using FT-IR Spectroscopy. *Foods* 8, 143. <https://doi.org/10.3390/foods8050143>
- Di, L., Kerns, E., 2016. Drug-Like Properties: Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization, 2nd ed. Academic Press.
- Dos Santos Rodrigues, B., Arora, S., Kanekiyo, T., Singh, J., 2020. Efficient neuronal targeting and transfection using RVG and transferrin-conjugated liposomes. *Brain Res.* 1734, 146738. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146738>
- Drummond, D.C., Noble, C.O., Guo, Z., Hayes, M.E., Connolly-Ingram, C., Gabriel, B.S., Hann, B., Liu, B., Park, J.W., Hong, K., 2010. Development of a highly stable and targetable nanoliposomal formulation of topotecan. *J. Controlled Release* 141, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.08.006>
- Eisenberg, D., Jucker, M., 2012. The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell* 148, 1188–1203. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.022>
- Farr, S.A., Niehoff, M.L., Ceddia, M.A., Herrlinger, K.A., Lewis, B.J., Feng, S., Welleford, A., Butterfield, D.A., Morley, J.E., 2016. Effect of botanical extracts containing carnosic acid or rosmarinic acid on learning and memory in SAMP8 mice. *Physiol. Behav.* 165, 328–338. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.08.013>
- Fassas, A., Anagnostopoulos, A., 2005. The use of liposomal daunorubicin (DaunoXome) in acute myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* 46, 795–802. <https://doi.org/10.1080/10428190500052438>
- Fernandes, C., Martins, C., Fonseca, A., Nunes, R., Matos, M.J., Silva, R., Garrido, J., Sarmiento, B., Remião, F., Otero-Espinar, F.J., Uriarte, E., Borges, F., 2018. PEGylated PLGA Nanoparticles As a Smart Carrier to Increase the Cellular Uptake of a Coumarin-Based Monoamine Oxidase B Inhibitor. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 10, 39557–39569. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b17224>
- Fox, C.B., Uibel, R.H., Harris, J.M., 2007. Detecting Phase Transitions in Phosphatidylcholine Vesicles by Raman Microscopy and Self-Modeling Curve Resolution. *J. Phys. Chem. B* 111, 11428–11436. <https://doi.org/10.1021/jp0735886>

Francia, V., Reker-Smit, C., Boel, G., Salvati, A., 2019. Limits and challenges in using transport inhibitors to characterize how nano-sized drug carriers enter cells. *Nanomed.* 14, 1533–1549. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0446>

Fujii, A., Fujimaki, E., Ebata, T., Mikami, N., 2000. Infrared spectroscopy of CH stretching vibrations of jet-cooled alkylbenzene cations by using the “messenger” technique. *J. Chem. Phys.* 112, 6275–6284. <https://doi.org/10.1063/1.481272>

Fukuda, A., Tahara, K., Hane, Y., Matsui, T., Sasaoka, S., Hatahira, H., Motooka, Y., Hasegawa, S., Naganuma, M., Abe, J., Nakao, S., Takeuchi, H., Nakamura, M., 2017. Comparison of the adverse event profiles of conventional and liposomal formulations of doxorubicin using the FDA adverse event reporting system. *PloS One* 12, e0185654. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185654>

Gaber, B.P., Yager, P., Peticolas, W.L., 1978. Interpretation of biomembrane structure by Raman difference spectroscopy. Nature of the endothermic transitions in phosphatidylcholines. *Biophys. J.* 21, 161–176. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(78\)85516-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(78)85516-7)

Gaillard, P.J., Appeldoorn, C.C.M., Dorland, R., van Kregten, J., Manca, F., Vugts, D.J., Windhorst, B., van Dongen, G.A.M.S., de Vries, H.E., Maussang, D., van Tellingen, O., 2014. Pharmacokinetics, brain delivery, and efficacy in brain tumor-bearing mice of glutathione pegylated liposomal doxorubicin (2B3-101). *PloS One* 9, e82331. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082331>

Gaillard, P.J., Appeldoorn, C.C.M., Rip, J., Dorland, R., van der Pol, S.M.A., Kooij, G., de Vries, H.E., Reijerkerk, A., 2012. Enhanced brain delivery of liposomal methylprednisolone improved therapeutic efficacy in a model of neuroinflammation. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 164, 364–369. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.022>

Geldenhuis, W., Wehrung, D., Groshev, A., Hirani, A., Sutariya, V., 2015. Brain-targeted delivery of doxorubicin using glutathione-coated nanoparticles for brain cancers. *Pharm. Dev. Technol.* 20, 497–506. <https://doi.org/10.3109/10837450.2014.892130>

Giau, V-V., Park, Y-H., Shim, K-H., Son, S-W., An, S-S.A., 2019. Dynamic changes of protein corona compositions on the surface of zinc oxide nanoparticle in cell culture media. *Frontiers of Front. Chem. Sci. Eng.* 13, 90–97. <https://doi.org/10.1007/s11705-018-1766-z>

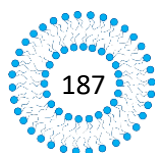
Gradolnik, J., Marechal, Y., 2001. Bovine Serum Albumin observed by infrared spectrometry. I. Methodology, structural investigation and water Uptake. *Biopolimers* 62, 40-53. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2001\)62:1<40::AID-BIP60>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2001)62:1<40::AID-BIP60>3.0.CO;2-C)

Gregori, M., Taylor, M., Salvati, E., Re, F., Mancini, S., Balducci, C., Forloni, G., Zambelli, V., Sesana, S., Michael, M., Michail, C., Tinker-Mill, C., Kolosov, O., Sherer, M., Harris, S., Fullwood, N.J., Masserini, M., Allsop, D., 2017. Retro-inverso peptide inhibitor nanoparticles as potent inhibitors of aggregation of the Alzheimer’s A β peptide. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 13, 723–732. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.10.006>

Guan, J., Jiang, Z., Wang, M., Liu, Y., Liu, J., Yang, Y., Ding, T., Lu, W., Gao, C., Qian, J., Zhan, C., 2019. Short Peptide-Mediated Brain-Targeted Drug Delivery with Enhanced Immunocompatibility. *Mol. Pharm.* 16, 907–913. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b01216>

Gubernator, J., 2011. Active methods of drug loading into liposomes: recent strategies for stable drug entrapment and increased in vivo activity. *Expert Opin. Drug Deliv.* 8, 565–580. <https://doi.org/10.1517/17425247.2011.566552>

Gupta, S., Gupta, M.K., 2017. Possible role of nanocarriers in drug delivery against cervical cancer. *Nano Rev. Exp.* 8, 1335567. <https://doi.org/10.1080/20022727.2017.1335567>



Haass, C., Selkoe, D.J., 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 101–112. <https://doi.org/10.1038/nrm2101>

Habtemariam, S., 2016. The therapeutic potential of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes for Alzheimer's Disease. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2016, 2680409. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2680409>.

Hadjidemetriou, M., Kostarelos, K., 2017. Evolution of the nanoparticle corona. *Nature Nanotechnology* 12, 288–290. <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.61>.

Han, X., Li, Z., Sun, J., Luo, C., Li, L., Liu, Y., Du, Y., Qiu, S., Ai, X., Wu, C., Lian, H., He, Z., 2015. Stealth CD44-targeted hyaluronic acid supramolecular nanoassemblies for doxorubicin delivery: probing the effect of uncovalent pegylation degree on cellular uptake and blood long circulation. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 197, 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.10.024>

Hanson, J.R., 2016. Rosemary, the Beneficial Chemistry of a Garden Herb. *Sci. Prog.* 99, 83–91. <https://doi.org/10.3184/003685016X14495646283298>

Haqqani, A.S., Thom, G., Burrell, M., Delaney, C.E., Brunette, E., Baumann, E., Sodja, C., Jezierski, A., Webster, C., Stanimirovic, D.B., 2018. Intracellular sorting and transcytosis of the rat transferrin receptor antibody OX26 across the blood-brain barrier in vitro is dependent on its binding affinity. *J. Neurochem.* 146, 735–752. <https://doi.org/10.1111/jnc.14482>

Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>

Hartwig, F., Köll-Weber, M., Süß, R., 2021. Preclinical In Vitro Studies with 3D Spheroids to Evaluate Cu(DDC)2 Containing Liposomes for the Treatment of Neuroblastoma. *Pharmaceutics* 13, 894. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060894>

Hase, T., Shishido, S., Yamamoto, S., Yamashita, R., Nukima, H., Taira, S., Toyoda, T., Abe, K., Hamaguchi, T., Ono, K., Noguchi-Shinohara, M., Yamada, M., Kobayashi, S., 2019. Rosmarinic acid suppresses Alzheimer's disease development by reducing amyloid β aggregation by increasing monoamine secretion. *Sci. Rep.* 9, 8711. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45168-1>

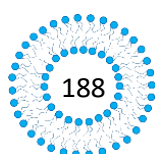
Hattori, Y., 2016. Delivery of Plasmid DNA into Tumors by Intravenous Injection of PEGylated Cationic Lipoplexes into Tumor-Bearing Mice. *Pharmacol. Amp Pharm.* 07, 272–282. <https://doi.org/10.4236/pp.2016.77034>

Henriques, S.T., Castanho, M.A.R.B., 2008. Translocation or membrane disintegration? Implication of peptide-membrane interactions in pep-1 activity. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* 14, 482–487. <https://doi.org/10.1002/psc.1003>

Heo, J.-H., Lee, S.-T., Chu, K., Oh, M.J., Park, H.-J., Shim, J.-Y., Kim, M., 2008. An open-label trial of Korean red ginseng as an adjuvant treatment for cognitive impairment in patients with Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* 15, 865–868. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2008.02157.x>

Hernandez, C., Shukla, S., 2022. Liposome based drug delivery as a potential treatment option for Alzheimer's disease. *Neural Regen. Res.* 17, 1190. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.327328>

Hervé, F., Ghinea, N., Scherrmann, J.-M., 2008. CNS delivery via adsorptive transcytosis. *AAPS J.* 10, 455–472. <https://doi.org/10.1208/s12248-008-9055-2>



- Hoosain, F.G., Choonara, Y.E., Tomar, L.K., Kumar, P., Tyagi, C., du Toit, L.C., Pillay, V., 2015. Bypassing P-Glycoprotein Drug Efflux Mechanisms: Possible Applications in Pharmacoresistant Schizophrenia Therapy. *BioMed Res. Int.* 2015, 484963. <https://doi.org/10.1155/2015/484963>
- Hoshyar, N., Gray, S., Han, H., Bao, G., 2016. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine (Lond)*. 11 (6), 673–692. <https://doi.org/10.2217/nmm.16.5>
- Hossain, S.S., Zhang, Y., Liang, X., Hussain, F., Ferrari, M., Hughes, T.J.R., Decuzzi, P., 2013. In silico vascular modeling for personalized nanoparticle delivery. *Nanomed.* 8, 343–357. <https://doi.org/10.2217/nmm.12.124>
- Hourfar, H., Aliakbari, F., Aqdam, S.R., Nayeri, Z., Bardania, H., Otzen, D.E., Morshedi, D., 2023. The impact of α -synuclein aggregates on blood-brain barrier integrity in the presence of neurovascular unit cells. *Int. J. Biol. Macromol.* 229, 305–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.134>
- Hsu, J.-F., Hsieh, P.-Y., Hsu, H.-Y., Shigeto, S., 2015. When cells divide: Label-free multimodal spectral imaging for exploratory molecular investigation of living cells during cytokinesis. *Sci. Rep.* 5, 17541. <https://doi.org/10.1038/srep17541>
- Hu, Y., Hammarlund-Udenaes, M., Fridén, M., 2019. Understanding the Influence of Nanocarrier-Mediated Brain Delivery on Therapeutic Performance Through Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling. *J. Pharm. Sci.* 108, 3425–3433. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.05.029>
- Huang, W.-J., Zhang, X., Chen, W.-W., 2016. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomed. Rep.* 4 (5), 519–522. <https://doi.org/10.3892/br.2016.630>
- Huang, S.-M., Kuo, C.-H., Chen, C.-A., Liu, Y.-C., Shieh, C.-J., 2017. RSM and ANN modeling-based optimization approach for the development of ultrasound-assisted liposome encapsulation of piceid. *Ultrason. Sonochem.* 36, 112–122. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.11.016>
- Hussain, S.M., Syeda, A.F., Alshammari, M., Alnasser, S., Alenzi, N.D., Alanazi, S.T., Nandakumar, K., 2022. Cognition enhancing effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in lab animal studies: a systematic review and meta-analysis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 55, e11593. <https://doi.org/10.1590/1414-431X2021e11593>
- Huth, U.S., Schubert, R., Peschka-Süss, R., 2006. Investigating the uptake and intracellular fate of pH-sensitive liposomes by flow cytometry and spectral bio-imaging. *J. Controlled Release* 110, 490–504. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.10.018>
- Idris, F., Muharram, S.H., Zaini, Z., Diah, S., 2018. Establishment of murine in vitro blood-brain barrier models using immortalized cell lines: co-cultures of brain endothelial cells, astrocytes, and neurons. <https://doi.org/10.1101/435990>
- Inglut, C.T., Sorrin, A.J., Kuruppu, T., Vig, S., Cicalo, J., Ahmad, H., Huang, H.-C., 2020. Immunological and Toxicological Considerations for the Design of Liposomes. *Nanomater. Basel Switz.* 10, 190. <https://doi.org/10.3390/nano10020190>
- Jenkins, S., Weinberg, D., Al-Shakli, A.F., Fernandes, A.R., Yiu, H.H.P., Telling, N.D., Roach, P., Chhari, D.M., 2016. ‘Stealth’ nanoparticles evade neural immune cells but also evade all major brain cell populations: Implications for PEG-based neurotherapeutics. *Journal of Controlled Release* 224, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.013>
- Jiang, L., Li, X., Liu, L., Zhang, Q., 2013. Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified pullulan nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* 8, 1825–1834. <https://doi.org/10.2147/IJN.S44342>

Jovanović, A.A., Balanč, B.D., Ota, A., Ahlin Grabnar, P., Djordjević, V.B., Šavikin, K.P., Bugarski, B.M., Nedović, V.A., Poklar Ulrih, N., 2018. Comparative Effects of Cholesterol and β -Sitosterol on the Liposome Membrane Characteristics. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 120, 1800039. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800039>

Juhairiyah, F., de Lange, E.C.M., 2021. Understanding Drug Delivery to the Brain Using Liposome-Based Strategies: Studies that Provide Mechanistic Insights Are Essential. *AAPS J.* 23, 114. <https://doi.org/10.1208/s12248-021-00648-z>

Kaddah, S., Khreich, N., Kaddah, F., Charcosset, C., Greige-Gerges, H., 2018. Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 113, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.017>

Kang, J.H., Jang, W.Y., Ko, Y.T., 2017. The Effect of Surface Charges on the Cellular Uptake of Liposomes Investigated by Live Cell Imaging. *Pharm. Res.* 34, 704–717. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2097-3>

Kannan, R., Chakrabarti, R., Tang, D., Kim, K.J., Kaplowitz, N., 2000. GSH transport in human cerebrovascular endothelial cells and human astrocytes: evidence for luminal localization of Na⁺-dependent GSH transport in HCEC. *Brain Res.* 852, 374–382. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)02184-8](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)02184-8)

Katsuji Sakaguchi, Nobuki Kudo, Katsuyuki Yamamoto, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, 2008. Characterization of bubble liposomes by measurements of ultrasound attenuation: Effects of shell materials, in: 2008 IEEE Ultrasonics Symposium. Presented at the 2008 IEEE Ultrasonics Symposium (IUS), IEEE, Beijing, China, pp. 1675–1678. <https://doi.org/10.1109/ULTSYM.2008.0409>

Kepeczynski, M., Nawalany, K., Kumorek, M., Kobierska, A., Jachimska, B., Nowakowska, M., 2008. Which physical and structural factors of liposome carriers control their drug-loading efficiency? *Chem. Phys. Lipids* 155 (1), 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2008.05.174>.

Khetan, J., Shahinuzzaman, M., Barua, S., Barua, D., 2019. Quantitative Analysis of the Correlation between Cell Size and Cellular Uptake of Particles. *Biophys. J.* 116, 347–359. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.11.3134>

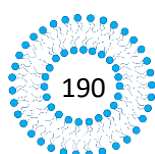
Kim, D.S.H.L., Park, S.-Y., Kim, J.-Y., 2001. Curcuminoids from *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) that protect PC12 rat pheochromocytoma and normal human umbilical vein endothelial cells from β A(1–42) insult. *Neurosci. Lett.* 303, 57–61. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01677-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01677-9)

Knudsen, K.B., Northeved, H., Kumar, P.E.K., Permin, A., Gjetting, T., Andresen, T.L., Larsen, S., Wegener, K.M., Lykkesfeldt, J., Jantzen, K., Loft, S., Møller, P., Roursgaard, M., 2015. In vivo toxicity of cationic micelles and liposomes. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 11, 467–477. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.08.004>

Kola, A., Hecel, A., Lamponi, S., Valensin, D., 2020. Novel Perspective on Alzheimer's Disease Treatment: Rosmarinic Acid Molecular Interplay with Copper(II) and Amyloid β . *Life* 10, 118. <https://doi.org/10.3390/life10070118>

Konduru, V.N., Molina, M.R., Swami, A., Damiani, F., Pyrgiotakis, G., Lin, P., Andreozzi, P., Donaghey, C.T., Demokritou, P., Krol, S., Kreyling, W., Brain, D.J., 2017. Protein corona: implications for nanoparticle interactions with pulmonary cells. *Part. Fibre. Toxicol.* 14. <https://doi.org/10.1186/s12989-017-0223-3>.

Kong, L., Li, X., Ni, Y., Xiao, H., Yao, Y., Wang, Y., Ju, R., Li, H., Liu, J., Fu, M., Wu, Y., Yang, J., Cheng, L., 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>

Kontsekova, E., Zilka, N., Kovacech, B., Novak, P., Novak, M., 2014. First-in-man tau vaccine targeting structural determinants essential for pathological tau–tau interaction reduces tau oligomerisation and neurofibrillary degeneration in an Alzheimer's disease model. *Alzheimers Res. Ther.* 6, 44. <https://doi.org/10.1186/alzrt278>

Kouhzaei, S., Alijanvand, S.H., Mobasheri, H., 2012. Polyethylene Glycol Repairs Damaged Membrane; Biophysical Application of Artificial Planar Bilayer to Mimic Biological Membrane 2.

Koren, E., Apte, A., Jani, A., Torchilin, V.P., 2012. Multifunctional PEGylated 2C5-immunoliposomes containing pH-sensitive bonds and TAT peptide for enhanced tumor cell internalization and cytotoxicity. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 160, 264–273. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.12.002>

Koudelka, S., Turánek, J., 2012. Liposomal paclitaxel formulations. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 163, 322–334. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.09.006>

Kraus, N.A., Ehebauer, F., Zapp, B., Rudolphi, B., Kraus, B.J., Kraus, D., 2016. Quantitative assessment of adipocyte differentiation in cell culture. *Adipocyte* 5, 351–358. <https://doi.org/10.1080/21623945.2016.1240137>

Krstic, D., Knuesel, I., 2013. Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 9, 25–34. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.236>

Kuo, Y.-C., Tsao, C.-W., 2017. Neuroprotection against apoptosis of SK-N-MC cells using RMP-7- and lactoferrin-grafted liposomes carrying quercetin. *Int. J. Nanomedicine* 12, 2857–2869. <https://doi.org/10.2147/IJN.S132472>

Kuzmin, V.V., Novikov, V.S., Ustynyuk, L.Yu., Prokhorov, K.A., Sagitova, E.A., Nikolaeva, G.Yu., 2020. Raman spectra of polyethylene glycols: Comparative experimental and DFT study. *J. Mol. Struct.* 1217, 128331. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128331>

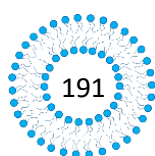
Labouta, H.I., Gomez-Garcia, M.J., Sarsons, D.C., Nguyen, T., Kennard, J., Ngo, W., Terefe, K., Irigorri, N., Lai, P., Rinker, D.K., Cramb, T.D., 2018. Surface-grafted polyethylene glycol conformation impacts the transport of PEG-functionalized liposomes through a tumour extracellular matrix model. *R.S.C. Adv.* 18, 7697-7708. <https://doi.org/10.1039/c7ra13438j>.

Lai, F., Schlich, M., Sinico, C., Fadda, A.M., 2021. Liposomes as Brain Targeted Delivery Systems, *Nanomedicines for Brain Drug Delivery*, Springer, pp. 29-59.

Lamichhane, N., Udayakumar, T.S., D'Souza, W.D., Simone, C.B., Raghavan, S.R., Polf, J., Mahmood, J., 2018. Liposomes: Clinical Applications and Potential for Image-Guided Drug Delivery. *Mol. Basel Switz.* 23, 288. <https://doi.org/10.3390/molecules23020288>

Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Limayem-Blouza, I., Sfar, S., Charcosset, C., Fessi, H., 2012. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *J. Colloid Sci. Biotechnol.* 1, 147–168. <https://doi.org/10.1166/jcsb.2012.1020>

Lataliza, A.A.B., De Assis, P.M., Da Rocha Laurindo, L., Gonçalves, E.C.D., Raposo, N.R.B., Dutra, R.C., 2021. Antidepressant-like effect of rosmarinic acid during LPS -induced neuroinflammatory model: The potential role of cannabinoid receptors/ PPAR γ signaling pathway. *Phytother. Res.* 35, 6974–6989. <https://doi.org/10.1002/ptr.7318>



- Lee, Y., Thompson, D.H., 2017. Stimuli-responsive liposomes for drug delivery. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 9. <https://doi.org/10.1002/wnan.1450>
- Lee, K.Y., Choi, E-J., Webster, J.T., Kim, S-H., Khang, D., 2015. Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity. *Int. J. Nanomedicine* 10, 97-113. <https://doi.org/10.2147/IJN.S72998>.
- Lee, H.J., Yeo, Y., 2015. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chem. Eng. Sci.* 125, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.08.046>.
- 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>
- Lim, G.P., Chu, T., Yang, F., Beech, W., Frautschy, S.A., Cole, G.M., 2001. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 8370–8377. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-21-08370.2001>
- Lindgren, M., Hällbrink, M., Prochiantz, A., Langel, U., 2000. Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 99–103. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(00\)01447-4](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(00)01447-4)
- Liu, Chia-Chen, Liu, Chia-Chan, Kanekiyo, T., Xu, H., Bu, G., 2013. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat. Rev. Neurol.* 9, 106–118. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.263>
- Loureiro, J.A., Gomes, B., Coelho, M.A., Do Carmo Pereira, M., Rocha, S., 2015. Immunoliposomes doubly targeted to transferrin receptor and to α -synuclein. *Future Sci. OA* 1, fso.15.71. <https://doi.org/10.4155/fso.15.7>
- Lv, R., Du, L., Zhou, F., Yuan, X., Liu, X., Zhang, L., 2020. Rosmarinic Acid Alleviates Inflammation, Apoptosis, and Oxidative Stress through Regulating miR-155-5p in a Mice Model of Parkinson's Disease. *ACS Chem. Neurosci.* 11, 3259–3266. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.0c00375>
- Mady, O., 2013. Mechanisms and percent of drug release of each new mathematic approach. *Int. Res. J. Pharm. App. Sci.* 3 (6), 56-69.
- Mahapatro, A., Singh, D.K., 2011. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J. Nanobiotechnology* 9, 55. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-55>
- Maina, M.B., Bailey, L.J., Doherty, A.J., Serpell, L.C., 2018. The Involvement of A β 42 and Tau in Nucleolar and Protein Synthesis Machinery Dysfunction. *Front. Cell. Neurosci.* 12.
- Majzner, K., Kaczor, A., Kachamakova-Trojanowska, N., Fedorowicz, A., Chlopicki, S., Baranska, M., 2013. 3D confocal Raman imaging of endothelial cells and vascular wall: perspectives in analytical spectroscopy of biomedical research. *The Analyst* 138, 603–610. <https://doi.org/10.1039/C2AN36222H>
- Mancini, S., Minniti, S., Gregori, M., Sancini, G., Cagnotto, A., Couraud, P.-O., Ordóñez-Gutiérrez, L., Wandosell, F., Salmona, M., Re, F., 2016. The hunt for brain A β oligomers by peripherally circulating multi-functional nanoparticles: Potential therapeutic approach for Alzheimer disease. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 12, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.09.003>
- Markoutsas, E., Papadia, K., Clemente, C., Flores, O., Antimisiaris, S.G., 2012. Anti-A β -MAB and dually decorated nanoliposomes: Effect of A β 1-42 peptides on interaction with hCMEC/D3 cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 81, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.02.006>
- Martin, D., Rojo, A.I., Salinas, M., Diaz, R., Gallardo, G., Alam, J., De Galarreta, C.M.R., Cuadrado, A., 2004. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt

pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J. Biol. Chem.* 279, 8919–8929. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309660200>

Matthäus, C., Chernenko, T., Stiebing, C., Quintero, L., Miljković, M., Milane, L., Kale, A., Amiji, M., Lorkowski, S., Torchilin, V., Popp, J., Diem, M., 2018. Raman Micro-spectral Imaging of Cells and Intracellular Drug Delivery Using Nanocarrier Systems, in: Toporski, J., Dieing, T., Hollricher, O. (Eds.), *Confocal Raman Microscopy*, Springer Series in Surface Sciences. Springer International Publishing, Cham, pp. 273–305. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75380-5_13

Maussang, D., Rip, J., van Kregten, J., van den Heuvel, A., van der Pol, S., van der Boom, B., Reijkerkerk, 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>

Mazza, M., Capuano, A., Bria, P., Mazza, S., 2006. Ginkgo biloba and donepezil: a comparison in the treatment of Alzheimer's dementia in a randomized placebo-controlled double-blind study. *Eur. J. Neurol.* 13, 981–985. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2006.01409.x>

Mazumdar, S., Chitkara, D., Mittal, A., 2021. Exploration and insights into the cellular internalization and intracellular fate of amphiphilic polymeric nanocarriers. *Acta Pharm. Sin. B* 11, 903–924. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.02.019>

McCright, J., Skeen, C., Yarmovsky, J., Maisel, K., 2020. Dense poly(ethylene glycol) coatings maximize nanoparticle transport across lymphatic endothelial cells. <https://doi.org/10.1101/2020.08.01.232249>

Meng, P., Yoshida, H., Matsumiya, T., Imaizumi, T., Tanji, K., Xing, F., Hayakari, R., Dempoya, J., Tatsuta, T., Aizawa-Yashiro, T., Mimura, J., Kosaka, K., Itoh, K., Satoh, K., 2013. Carnosic acid suppresses the production of amyloid-1–42 by inducing the metalloprotease gene TACE/ADAM17 in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neuroscience Research* 75, 94–102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2012.11.007>

Meyers, P.A., Chou, A.J., 2014. Muramyl tripeptide-phosphatidyl ethanolamine encapsulated in liposomes (L-MTP-PE) in the treatment of osteosarcoma. *Adv. Exp. Med. Biol.* 804, 307–321. https://doi.org/10.1007/978-3-319-04843-7_17

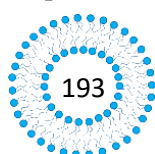
Miclăuş, T., Bochenkov, V.E., Ogaki, R., Howard, K.A., Sutherland, D.S., 2014. Spatial Mapping and Quantification of Soft and Hard Protein Coronas at Silver Nanocubes. *Nano Lett.* 14, 2086–2093. <https://doi.org/10.1021/nl500277c>

Mignet, N., Seguin, J., Chabot, G.G., 2013. Bioavailability of polyphenol liposomes: a challenge ahead. *Pharmaceutics* 5 (3), 457–471. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics5030457>

Mihailova, L., Shalabalija, D., Cvetkovikj Karanfilova, I., Simonoska Crcarevska, M., Glavas Dodov, M., 2018. Influence of the release properties on the antioxidant capacity of encapsulated Rosemary extract, 7th Serbian Congress of Pharmacy with International participation, October 10th – 14th, Belgrade, Serbia.

Mihailova, 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.

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*, in press. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.09.012>



- Mirza, A.Z., Siddiqui, F.A., 2014. Nanomedicine and drug delivery: a mini review. *Int. Nano Lett.* 4, 94. <https://doi.org/10.1007/s40089-014-0094-7>
- Mirza, F.J., Amber, S., Sumera, Hassan, D., Ahmed, T., Zahid, S., 2021. Rosmarinic acid and ursolic acid alleviate deficits in cognition, synaptic regulation and adult hippocampal neurogenesis in an A β 1-42-induced mouse model of Alzheimer's disease. *Phytomedicine* 83, 153490. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153490>
- Mirza, F.J., Zahid, S., 2022. Ursolic acid and rosmarinic acid ameliorate alterations in hippocampal neurogenesis and social memory induced by amyloid beta in mouse model of Alzheimer's disease. *Front. Pharmacol.* 13, 1058358. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1058358>
- Mohamed, M., Abu Lila, A.S., Shimizu, T., Alaaeldin, E., Hussein, A., Sarhan, H.A., Szebeni, J., Ishida, T., 2019. PEGylated liposomes: immunological responses. *Science and Technology of Advanced Materials* 20 (1), 710-724. <https://doi.org/10.1080/14686996.2019.1627174>.
- Montesinos, R.N., 2017. *Liposomal Drug Delivery to the Central Nervous System*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70055>.
- Morales, I., Navarrete, L., Maccioni, R.B., Fari, G., 2010. The revitalized Tau hypothesis on Alzheimer's disease. *Arch. Med. Res.* 41 (3), 226–231. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2010.03.007>
- Morteza-Semnani, K., Ahadi, H., Hashemi, Z., 2016. The genus *Hymenocrater*: a comprehensive review. *Pharm. Biol.* 54, 3156–3163. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1197285>
- Mourtas, S., Lazar, A.N., Markoutsas, E., Duyckaerts, C., Antimisiaris, S.G., 2014. Multifunctional nanoliposomes with curcumin-lipid derivative and brain targeting functionality with potential applications for Alzheimer disease. *Eur. J. Med. Chem.* 80, 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.04.050>
- Mozafari, M.R. and Mortazavi, S.M., 2005. *Nanoliposomes: From Fundamentals to Recent Developments*. Oxford: Trafford Publishing Ltd.
- Mozetič, M., 2019. Surface Modification to Improve Properties of Materials. *Materials* 12, 441. <https://doi.org/10.3390/ma12030441>
- Murry, D.J., Blaney, S.M., 2000. Clinical pharmacology of encapsulated sustained-release cytarabine. *Ann. Pharmacother.* 34, 1173–1178. <https://doi.org/10.1345/aph.19347>
- Mutlu, N.B., Değim, Z., Yilmaz, Ş., Eşsiz, D., Nacar, A., 2011. New perspective for the treatment of Alzheimer diseases: liposomal rivastigmine formulations. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 37, 775–789. <https://doi.org/10.3109/03639045.2010.541262>
- Mursaleen, L., Chan, S.H.Y., Noble, B., Somavarapu, S., Zariwala, M.G., 2023. Curcumin and N-Acetylcysteine Nanocarriers Alone or Combined with Deferoxamine Target the Mitochondria and Protect against Neurotoxicity and Oxidative Stress in a Co-Culture Model of Parkinson's Disease. *Antioxidants* 12, 130. <https://doi.org/10.3390/antiox12010130>
- Mursaleen, L., Noble, B., Somavarapu, S., Zariwala, M.G., 2021. Micellar Nanocarriers of Hydroxytyrosol Are Protective against Parkinson's Related Oxidative Stress in an In Vitro hCMEC/D3-SH-SY5Y Co-Culture System. *Antioxid. Basel Switz.* 10, 887. <https://doi.org/10.3390/antiox10060887>
- Myshakina, S.N., Ahmed, Z., Asher, A.S., 2008. Dependence of amide vibrations on hydrogen bonding. *J. Phys. Chem. B.* 112 (38), 11873–11877. <https://doi.org/10.1021/jp8057355>.
- Nakamura, K., Yamashita, K., Itoh, Y., Yoshino, K., Nozawa, S., Kasukawa, H., 2012. Comparative studies of polyethylene glycol-modified liposomes prepared using different PEG-modification

methods. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1818 (11), 2801–2807. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.06.019>.

Nance, E.A., Woodworth, G.F., Sailor, K.A., Shih, T.-Y., Xu, Q., Swaminathan, G., Xiang, D., Eberhart, C., Hanes, J., 2012. A Dense Poly(Ethylene Glycol) Coating Improves Penetration of Large Polymeric Nanoparticles Within Brain Tissue. *Sci. Transl. Med.* 4. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003594>

Nematollahi, P., Mehrabani, M., Karami-Mohajeri, S., Dabaghzadeh, F., 2018. Effects of *Rosmarinus officinalis* L. on memory performance, anxiety, depression, and sleep quality in university students: A randomized clinical trial. *Complement. Ther. Clin. Pract.* 30, 24–28. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2017.11.004>

Neves, A.R., Queiroz, J.F., Weksler, B., Romero, I.A., Couraud, P.-O., Reis, S., 2015. Solid lipid nanoparticles as a vehicle for brain-targeted drug delivery: two new strategies of functionalization with apolipoprotein E. *Nanotechnology* 26, 495103. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/26/49/495103>

Nguyen, T.-T.-L., Duong, V.-A., Maeng, H.-J., 2021. Pharmaceutical Formulations with P-Glycoprotein Inhibitory Effect as Promising Approaches for Enhancing Oral Drug Absorption and Bioavailability. *Pharmaceutics* 13, 1103. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13071103>

Nie, Y., Ji, L., Ding, H., Xie, L., Li, L., He, B., Wu, Y., Gu, Z., 2012. Cholesterol Derivatives Based Charged Liposomes for Doxorubicin Delivery: Preparation, In Vitro and In Vivo Characterization. *Theranostics* 2(11), 1092-1103. <https://doi.org/10.7150/thno.4949>

Novak, P., Kontsekova, E., Zilka, N., Novak, M., 2018. Ten Years of Tau-Targeted Immunotherapy: The Path Walked and the Roads Ahead. *Front. Neurosci.* 12.

Nsairat, H., Khater, D., Sayed, U., Odeh, F., Al Bawab, A., Alshaer, W., 2022. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon* 8, e09394. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394>

Nunes, S., Madureira, A.R., Campos, D., Sarmento, B., Gomes, A.M., Pintado, M., Reis, F., 2017. Therapeutic and nutraceutical potential of rosmarinic acid-Cytoprotective properties and pharmacokinetic profile. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 1799–1806. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1006768>

Nunes, S.N., Fernandes, S.R., Cavalcante, H.C., da Costa, C.I., Leite, A.E., Lopes, A.C.S., Ferretti, A., Rubello, D., Townsend, M.D., Oliveira, C.M., Cardoso, N.V., de Barros, B.A.L., 2019. Influence of PEG coating on the biodistribution and tumor accumulation of pH-sensitive liposomes. *Drug Deliv Transl Res.* 9 (1), 123-130. <https://doi.org/10.1007/s13346-018-0583-8>.

Ong, G.M.S., Ming, C.L., Lee, S.K., Yuen, H.K., 2016. Influence of the encapsulation efficiency and size of liposome on the oral bioavailability of Griseofulvin-loaded liposomes. *Pharmaceutics* 8 (3), 25. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8030025>.

Ono, K., Hasegawa, K., Naiki, H., Yamada, M., 2004. Anti-amyloidogenic activity of tannic acid and its activity to destabilize Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 1690, 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.06.008>

Ordóñez-Gutiérrez, L., Re, F., Bereczki, E., Ioja, E., Gregori, M., Andersen, A.J., Antón, M., Moghimi, S.M., Pei, J.-J., Masserini, M., Wandosell, F., 2015. Repeated intraperitoneal injections of liposomes containing phosphatidic acid and cardiolipin reduce amyloid- β levels in APP/PS1 transgenic mice. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 11, 421–430. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.09.015>

Ordóñez-Gutiérrez, L., Wandosell, F., 2020. Nanoliposomes as a Therapeutic Tool for Alzheimer's Disease. *Front. Synaptic Neurosci.* 12.

Ou, Y., Pei, L., Lai, K., Huang, Y., Rasco, B.A., Wang, X., Fan, Y., 2017. Rapid Analysis of Multiple Sudan Dyes in Chili Flakes Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Coupled with Au–Ag Core-Shell Nanospheres. *Food Anal. Methods* 10, 565–574. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0618-z>

Ozarowski, M., Mikolajczak, P.L., Bogacz, A., Gryszczynska, A., Kujawska, M., Jodynis-Liebert, J., Piasecka, A., Napieczynska, H., Szulc, M., Kujawski, R., Bartkowiak-Wieczorek, J., Cichocka, J., Bobkiewicz-Kozłowska, T., Czerny, B., Mrozikiewicz, M.P., 2013. *Rosmarinus officinalis* L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain. *Fitoterapia* 91, 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.09.012>.

Palchetti, S., Colapicchioni, V., Digiaco, L., Caracciolo, G., Pozzi, D., Capriotti, A.L., La Barbera, G., Laganà, A., 2016. The protein corona of circulating PEGylated liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1858, 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2015.11.012>

Palchetti, S., Caputo, D., Digiaco, L., Capriotti, A.L., Coppola, R., Pozzi, D., Caracciolo, G., 2019. Protein corona fingerprints of liposomes: new opportunities for targeted drug delivery and early detection in pancreatic cancer. *Pharmaceutics* 11(1). PMID: 30650541. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11010031>.

Panza, F., Lozupone, M., Seripa, D., Imbimbo, B.P., 2019. Amyloid- β immunotherapy for alzheimer disease: Is it now a long shot?: A β Immunotherapy Gamble. *Ann. Neurol.* 85, 303–315. <https://doi.org/10.1002/ana.25410>

Panwar, P., Pandey, B., Lakhera, P.C., Singh, K.P., 2010. Preparation, characterization, and in vitro release study of albendazole-encapsulated nanosize liposomes. *Int. J. Nanomedicine* 5, 101–108. <https://doi.org/10.2147/ijn.s8030>.

Paolino, D., Cosco, D., Racanicchi, L., Trapasso, E., Celia, C., Iannone, M., Puxeddu, E., Costante, G., Filetti, S., Russo, D., Fresta, M., 2010. Gemcitabine-loaded PEGylated unilamellar liposomes vs GEMZAR: biodistribution, pharmacokinetic features and in vivo antitumor activity. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 144, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.02.021>

Passero, F.C., Grapsa, D., Syrigos, K.N., Saif, M.W., 2016. The safety and efficacy of Onivyde (irinotecan liposome injection) for the treatment of metastatic pancreatic cancer following gemcitabine-based therapy. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 16, 697–703. <https://doi.org/10.1080/14737140.2016.1192471>

Patching, S.G., 2017. Glucose Transporters at the Blood-Brain Barrier: Function, Regulation and Gateways for Drug Delivery. *Mol. Neurobiol.* 54, 1046–1077. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9672-6>

Patra, J.K., Das, G., Fraceto, L.F., Campos, E.V.R., Rodriguez-Torres, M.D.P., Acosta-Torres, L.S., Diaz-Torres, L.A., Grillo, R., Swamy, M.K., Sharma, S., Habtemariam, S., Shin, H.-S., 2018. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J. Nanobiotechnology* 16, 71. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>

Partikel, K., Korte, R., Stein, N.C., Mulac, D., Herrmann, F.C., Humpf, H.-U., Langer, K., 2019. Effect of nanoparticle size and PEGylation on the protein corona of PLGA nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* 141, 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.05.006>

Peng, Y., Zhao, Y., Chen, Y., Yang, Z., Zhang, L., Xiao, W., Yang, J., Guo, L., Wu, Y., 2018. Dual-targeting for brain-specific liposomes drug delivery system: Synthesis and preliminary evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* 26, 4677–4686. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.08.006>

Perry, N.S.L., Menzies, R., Hodgson, F., Wedgewood, P., Howes, M.-J.R., Brooker, H.J., Wesnes, K.A., Perry, E.K., 2018. A randomised double-blind placebo-controlled pilot trial of a combined extract of sage, rosemary and melissa, traditional herbal medicines, on the enhancement of memory in normal healthy subjects, including influence of age. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* 39, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.08.015>

Phachonpai, W., Wattanathorn, J., Muchimapura, S., Tong-Un, T., Preechagoon, D., 2010. Neuroprotective effect of quercetin encapsulated liposomes: a novel therapeutic strategy against Alzheimer's disease. *Am. J. Appl. Sci.* 7, 480–485.

Porfire, A., Achim, M., Barbalata, C., Rus, I., Tomuta, I., Cristea, C., 2019. Pharmaceutical development of liposomes using the QbD approach. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85374>.

Porkoláb, G., Mészáros, M., Tóth, A., Szecskó, A., Harazin, A., Szegletes, Z., Ferenc, G., Blastyák, A., Mátés, L., Rákhely, G., Deli, M.A., Veszelka, S., 2020. Combination of Alanine and Glutathione as Targeting Ligands of Nanoparticles Enhances Cargo Delivery into the Cells of the Neurovascular Unit. *Pharmaceutics* 12, 635. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070635>

Poudel, P., Park, S., 2022. Recent Advances in the Treatment of Alzheimer's Disease Using Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics* 14, 835. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040835>

Pozzi, D., Colapicchioni, V., Caracciolo, G., Piovesana, S., Capriotti, A.L., Palchetti, S., De Grossi, S., Riccioli, A., Amenitsch, H., Laganà, A., 2014. Effect of polyethyleneglycol (PEG) chain length on the bio-nano-interactions between PEGylated lipid nanoparticles and biological fluids: from nanostructure to uptake in cancer cells. *Nanoscale* 6, 2782. <https://doi.org/10.1039/c3nr05559k>

Qin, J., Yang, X., Mi, J., Wang, J., Hou, J., Shen, T., Li, Y., Wang, B., Li, X., Zhu, W., 2014. Enhanced antidepressant-like effects of the macromolecule trefoil factor 3 by loading into negatively charged liposomes. *Int. J. Nanomedicine* 9, 5247–5257. <https://doi.org/10.2147/oph.s69335>

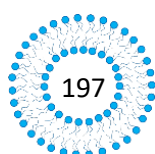
Qu, M., Lin, Q., He, S., Wang, L., Fu, Y., Zhang, Z., Zhang, L., 2018. A brain targeting functionalized liposomes of the dopamine derivative N-3,4-bis(pivaloyloxy)-dopamine for treatment of Parkinson's disease. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 277, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.03.019>

Rabanel, J.-M., Piec, P.-A., Landri, S., Patten, S.A., Ramassamy, C., 2020. Transport of PEGylated-PLA nanoparticles across a blood brain barrier model, entry into neuronal cells and in vivo brain bioavailability. *J. Controlled Release* 328, 679–695. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.09.042>

Ramos-Cabrer, P., Campos, F., 2013. Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on neurological targets. *International Journal of Nanomedicine* 951. <https://doi.org/10.2147/ijn.s30721>.

Ramos-Hryb, A.B., Platt, N., Freitas, A.E., Heinrich, I.A., López, M.G., Leal, R.B., Kaster, M.P., Rodrigues, A.L.S., 2019. Protective Effects of Ursolic Acid Against Cytotoxicity Induced by Corticosterone: Role of Protein Kinases. *Neurochem. Res.* 44, 2843–2855. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02906-1>

Rangger, C., Helbok, A., von Guggenberg, E., Sosabowski, J., Radolf, T., Prassl, R., Andreae, F., Thurner, G.C., Haubner, R., Decristoforo, C., 2012. Influence of PEGylation and RGD loading on the



targeting properties of radiolabeled liposomal nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* 7, 5889–5900. <https://doi.org/10.2147/IJN.S36847>

Re, F., Cambianica, I., Sesana, S., Salvati, E., Cagnotto, A., Salmona, M., Couraud, P.-O., Moghimi, S.M., Masserini, M., Sancini, G., 2011. Functionalization with ApoE-derived peptides enhances the interaction with brain capillary endothelial cells of nanoliposomes binding amyloid-beta peptide. *J. Biotechnol.* 156, 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.037>

Refaat, J., Desoky, S.Y., Ramadan, M.A., Kamel, M.S., 2013. Bombacaceae: a phytochemical review. *Pharm. Biol.* 51, 100–130. <https://doi.org/10.3109/13880209.2012.698286>

Reginald-Opara, J.N., Svirskis, D., Paek, S.Y., Tang, M., O’Carroll, S.J., Dean, J.M., Chamley, L.W., Wu, Z., 2022. The involvement of extracellular vesicles in the transcytosis of nanoliposomes through brain endothelial cells, and the impact of liposomal pH-sensitivity. *Mater. Today Bio* 13, 100212. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2022.100212>

Rip, J., Chen, L., Hartman, R., van den Heuvel, A., Reijerkerk, A., van Kregten, J., van der Boom, B., Appeldoorn, C., de Boer, M., Maussang, D., de Lange, E.C.M., Gaillard, P.J., 2014. Glutathione PEGylated liposomes: pharmacokinetics and delivery of cargo across the blood-brain barrier in rats. *J. Drug Target.* 22, 460–467. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2014.888070>

Rizk, T., Montero-Menei, C., Jollivet, C., Benoit, J.P., Menei, P., 2004. Pitfalls in the detection of lipid vectors in neural cell culture and in brain tissue. *J. Biomed. Mater. Res.* 68A, 360–364. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.20060>

Robson, A.-L., Dastoor, P.C., Flynn, J., Palmer, W., Martin, A., Smith, D.W., Woldu, A., Hua, S., 2018. Advantages and Limitations of Current Imaging Techniques for Characterizing Liposome Morphology. *Front. Pharmacol.* 9, 80. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00080>

Romero, G., Rojas, E., Estrela-Lopis, I., Donath, E., Moya, S.E., 2011. Spontaneous confocal Raman microscopy--a tool to study the uptake of nanoparticles and carbon nanotubes into cells. *Nanoscale Res. Lett.* 6, 429. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-6-429>

Ross, C., Taylor, M., Fullwood, N., Allsop, D., 2018. Liposome delivery systems for the treatment of Alzheimer’s disease. *Int. J. Nanomedicine* 13, 8507–8522. <https://doi.org/10.2147/IJN.S183117>

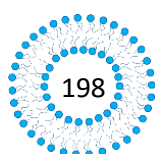
Rotman, M., Welling, M.M., Bunschoten, A., de Backer, M.E., Rip, J., Nabuurs, R.J.A., Gaillard, P.J., van Buchem, M.A., van der Maarel, S.M., van der Weerd, L., 2015. Enhanced glutathione PEGylated liposomal brain delivery of an anti-amyloid single domain antibody fragment in a mouse model for Alzheimer’s disease. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 203, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.02.012>

Rudramurthy, S.M., Jatana, M., Singh, R., Chakrabarti, A., 2013. In vitro antifungal activity of Indian liposomal amphotericin B against clinical isolates of emerging species of yeast and moulds, and its comparison with amphotericin B deoxycholate, voriconazole, itraconazole and fluconazole. *Mycoses* 56, 39–46. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2012.02197.x>

Sabourian, P., Yazdani, G., Ashraf, S.S., Frounchi, M., Mashayekhan, S., Kiani, S., Kakkar, A., 2020. Effect of Physico-Chemical Properties of Nanoparticles on Their Intracellular Uptake. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 8019. <https://doi.org/10.3390/ijms21218019>

Saher, G., Simons, M., 2010. Cholesterol and myelin biogenesis. *Subcell. Biochem.* 51, 489–508. https://doi.org/10.1007/978-90-481-8622-8_18

Sahil, K., Premjeet, S., Ajay, B., Middha, A., Bhawna, K., 2011. Stealth liposomes: a review. *IJRAP* 2 (5), 1534-1538. ISSN 2229-3566.



Sailor, G., Seth, A.K., Parmar, G., Chauhan, S., Javia A., 2015. Formulation and in vitro evaluation of berberine containing liposome optimized by 32 full factorial designs. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 5 (7), 23-28. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50704>.

Salih Istifli, E., Tahir Hüsünet, M., Basri Ila, H., 2019. Cell Division, Cytotoxicity, and the Assays Used in the Detection of Cytotoxicity, in: Salih Istifli, E., Basri Ila, H. (Eds.), *Cytotoxicity - Definition, Identification, and Cytotoxic Compounds*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88368>

San, H., Yang, Z.Y., Pompili, V.J., Jaffe, M.L., Plautz, G.E., Xu, L., Felgner, J.H., Wheeler, C.J., Felgner, P.L., Gao, X., 1993. Safety and short-term toxicity of a novel cationic lipid formulation for human gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 4, 781–788. <https://doi.org/10.1089/hum.1993.4.6-781>

Satoh, T., McKercher, S.R., Lipton, S.A., 2013. Nrf2/ARE-mediated antioxidant actions of pro-electrophilic drugs. *Free Radic. Biol. Med.* 65, 645–657. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.022>

Satoh, T., Izumi, M., Inukai, Y., Tsutsumi, Y., Nakayama, N., Kosaka, K., Shimojo, Y., Kitajima, C., Itoh, K., Yokoi, T., Shirasawa, T., 2008. 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, 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.01.079>.

Satoh, T., Okamoto, S. -i, Cui, J., Watanabe, Y., Furuta, K., Suzuki, M., Tohyama, K., Lipton, S.A., 2006. Activation of the Keap1/Nrf2 pathway for neuroprotection by electrophilic [correction of electrophilic] phase II inducers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 768–773. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505723102>

Senior, J., Gregoriadis, G., 1982. Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation: the effect of the phospholipid and cholesterol components. *Life Sci.* 30, 2123–2136. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(82\)90455-6](https://doi.org/10.1016/0024-3205(82)90455-6)

Shalabalija, D., Cambuleva, Lj., Simonoska Crcarevska, M., Slaveska Raicki, R., Cvetkovikj Karanfilova, I., Glavas Dodov, M., 2017. Rosmarinic acid loaded PEGylated liposomes for treatment of Alzheimer's disease: influence of the formulation variables on vesicle properties, 2nd European Conference on Pharmaceutics, April 3rd-4th, Krakow, Poland.

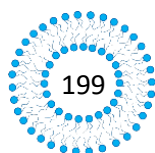
Shalabalija, D., Mihailova, Lj., Simonoska Crcarevska, M., Cvetkovikj Karanfilova, I., Ivanovski, V., Kapedanovska Nestorovska, A., Novotni, G., Glavas Dodov, M., 2021. Formulation and optimization of bioinspired rosemary extract loaded PEGylated nanoliposomes for potential treatment of Alzheimer's disease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

Shen, Z., Ye, H., Kröger, M., Li, Y., 2018. Aggregation of polyethylene glycol polymers suppresses receptor-mediated endocytosis of PEGylated liposomes. *Nanoscale* 10, 4545–4560. <https://doi.org/10.1039/C7NR09011K>

Shi, R., 2013. Polyethylene glycol repairs membrane damage and enhances functional recovery: a tissue engineering approach to spinal cord injury. *Neurosci. Bull.* 29, 460–466. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1364-5>

Shilo, M., Sharon, A., Baranes, K., Motiei, M., Lellouche, M.J-P., Popovtzer, R., 2015. 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>.

Sigurdsson, E.M., 2018. Tau Immunotherapies for Alzheimer's Disease and Related Tauopathies: Progress and Potential Pitfalls. *J. Alzheimers Dis.* 66, 855–856. <https://doi.org/10.3233/JAD-189010>



Sigurdsson, E.M., 2016. Tau Immunotherapy. *Neurodegener. Dis.* 16, 34–38. <https://doi.org/10.1159/000440842>

Silva, D.F., Selfridge, J.E., Lu, J., Lezi, E., Cardoso, S.M., Swerdlow, R.H., 2012. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's Disease: possible targets for therapeutic intervention. *Adv. Pharmacol.* 64, 83–126. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394816-8.00003-9>.

Simonoska Crcarevska, M., Slaveska-Raicki, R., Glavas-Dodov, M., 2016, Current therapeutic options and trends in drug development for Alzheimer's disease. *Macedonia Pharmaceutical Bulletin* 62 (suppl), 401 – 402.

Skoumalova, A., Hort, J., 2012. Blood markers of oxidative stress in Alzheimer's disease Biochemical processes related to underlying AD pathology. *J. Cell. Mol. Med.* 16 (10), 2291–2300. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01585.x>.

Strooper De, B., Karran, E., 2016. Review the cellular phase of Alzheimer's Disease. *Cell* 164 (4), 603–615. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.056>.

Sun, C., 2017. BUBBLE LIPOSOME: A MODERN THERANOSTIC APPROACH OF NEW DRUG DELIVERY. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 1290–1314. <https://doi.org/10.20959/wjpps20175-9222>

Syama, K., Jakubek, Z.J., Chen, S., Zaifman, J., Tam, Y.Y.C., Zou, S., 2022. Development of lipid nanoparticles and liposomes reference materials (II): cytotoxic profiles. *Sci. Rep.* 12, 18071. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23013-2>

Taboada, J., Grooters, A.M., 2008. Chapter 9 - Systemic antifungal therapy, in: Maddison, J.E., Page, S.W., Church, D.B. (Eds.), *Small Animal Clinical Pharmacology (Second Edition)*. W.B. Saunders, Edinburgh, pp. 186–197. <https://doi.org/10.1016/B978-070202858-8.50011-7>

Tanaka, T., Shiramoto, S., Miyashita, M., Fujishima, Y., Kaneo, Y., 2004. Tumor targeting based on the effect of enhanced permeability and retention (EPR) and the mechanism of receptor-mediated endocytosis (RME). *Int. J. Pharm.* 277, 39–61. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.09.050>.

Tang, F.R., Loke, W.K., Wong, P., Khoo, B.C., 2017. Radioprotective effect of ursolic acid in radiation-induced impairment of neurogenesis, learning and memory in adolescent BALB/c mouse. *Physiol. Behav.* 175, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.027>

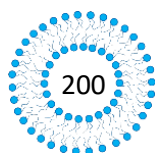
Tantipolphan, R., Rades, T., Strachan, C.J., Gordon, K.C., Medicott, N.J., 2006. Analysis of lecithin-cholesterol mixtures using Raman spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, 476–484. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2005.12.018>

Tattini Jr, V., Parra, F.D., Polakiewicz, B., Pitombo, N.M.R., 2005. Effect of lyophilization on the structure and phase changes of PEGylated-bovine serum albumin. *International Journal of Pharmaceutics* 304, 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.08.006>.

Tefas, L.R., Sylvester, B., Tomuta, I., Sesarman, A., Licarete, E., Banciu, M., Porfire, A., 2017. Development of antiproliferative long-circulating liposomes co-encapsulating doxorubicin and curcumin, through the use of a quality-by-design approach. *Drug Design, Development and Therapy* 11, 1605-1621. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S129008>.

Teppola, H., Sarkanen, J.-R., Jalonen, T.O., Linne, M.-L., 2016. Morphological Differentiation Towards Neuronal Phenotype of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by Estradiol, Retinoic Acid and Cholesterol. *Neurochem. Res.* 41, 731–747. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1743-6>

Theunis, C., Crespo-Biel, N., Gafner, V., Pihlgren, M., López-Deber, M.P., Reis, P., Hickman, D.T., Adolfsson, O., Chuard, N., Ndao, D.M., Borghgraef, P., Devijver, H., Van Leuven, F., Pfeifer, A.,



- Muhs, A., 2013. Efficacy and Safety of A Liposome-Based Vaccine against Protein Tau, Assessed in Tau.P301L Mice That Model Tauopathy. *PLoS ONE* 8, e72301. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072301>
- Tonnies, E., Trushina, E., 2017. Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 57 (4), 1105–1121. <https://doi.org/10.3233/JAD-161088>.
- Varga, Z., Mihály, J., Berényi, Sz., Bóta, A., 2013. Structural characterization of the poly(ethylene glycol) layer of sterically stabilized liposomes by means of FTIR spectroscopy. *Eur. Polym. J.* 49, 2415–2421. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.02.025>
- Veronese, F.M., Mero, A., 2008. The impact of PEGylation on biological therapies. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* 22, 315–329. <https://doi.org/10.2165/00063030-200822050-00004>
- Vieira, D., Gamarra, L., 2016. Getting into the brain: liposome-based strategies for effective drug delivery across the blood–brain barrier. *Int. J. Nanomedicine* Volume 11, 5381–5414. <https://doi.org/10.2147/IJN.S117210>
- Vis, M.A.M., Ito, K., Hofmann, S., 2020. Impact of Culture Medium on Cellular Interactions in in vitro Co-culture Systems. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8.
- Vranic, S., Boggetto, N., Contremoulins, V., Mornet, S., Reinhardt, N., Marano, F., Baeza-Squiban, A., Boland, S., 2013. Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate evaluation of internalization using imaging flow cytometry. Part. *Fibre Toxicol.* 10, 2. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-2>
- Waite, L.M., 2015. Treatment for Alzheimer's disease: has anything changed? *Aust. Prescr.* 38 (2), 60–63. <https://doi.org/10.18773/austprescr.2015.018>.
- Wang, T., Guo, Y., He, Y., Ren, T., Yin, L., Fawcett, J.P., Gu, J., Sun, H., 2020. Impact of molecular weight on the mechanism of cellular uptake of polyethylene glycols (PEGs) with particular reference to P-glycoprotein. *Acta Pharm. Sin. B* 10, 2002–2009. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.02.001>
- Watkins, R., Wu, L., Zhang, C., Davis, R.M., Xu, B., 2015. Natural product-based nanomedicine: recent advances and issues. *Int. J. Nanomedicine* 10, 6055–6074. <https://doi.org/10.2147/IJN.S92162>
- Xu, W., Xu, M., Xiao, Y., Yu, L., Xie, H., Jiang, X., Chen, M., Gao, H., Wang, L., 2022. Changes in target ability of nanoparticles due to protein corona composition and disease state. *Asian J. Pharm. Sci.* 17, 401–411. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2022.03.002>
- Xu, X., Costa, A.P., Khan, M.A., Burgess, D.J., 2012. Application of quality by design to formulation and processing of protein liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 434(1-2), 349-359. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.002>.
- Yamini, D., Devanand Venkatasubbu, G., Kumar, J., Ramakrishnan, V., 2014. Raman scattering studies on PEG functionalized hydroxyapatite nanoparticles. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 117, 299–303. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.07.064>
- Yan, Y., Gause, K.T., Kamphuis, M.M.J., Ang, C.-S., O'Brien-Simpson, N.M., Lenzo, J.C., Reynolds, E.C., Nice, E.C., Caruso, F., 2013. Differential roles of the protein corona in the cellular uptake of nanoporous polymer particles by monocyte and macrophage cell lines. *ACS Nano* 7, 10960–10970. <https://doi.org/10.1021/nn404481f>
- Amatsubo, T., Morikawa, S., Taguchi, H., Urushitani, M., Shirai, N., Hirao, K., Shiino, A., Inubushi, T., Tooyama, I., 2011. In vivo detection of amyloid β deposition using ^{19}F magnetic resonance imaging

with a ^{19}F -containing curcumin derivative in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 184, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.03.071>

Yang, B., Jiang, J., Jiang, L., Zheng, P., Wang, F., Zhou, Y., Chen, Z., Li, M., Lian, M., Tang, S., Liu, X., Peng, H., Wang, Q., 2020. Chitosan mediated solid lipid nanoparticles for enhanced liver delivery of zedoary turmeric oil in vivo. *Int. J. Biol. Macromol.* 149, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.222>

Yang, F., Lim, G.P., Begum, A.N., Ubada, O.J., Simmons, M.R., Ambegaokar, S.S., Chen, P.P., Kaye, R., Glabe, C.G., Frautschi, S.A., Cole, G.M., 2005. Curcumin Inhibits Formation of Amyloid β Oligomers and Fibrils, Binds Plaques, and Reduces Amyloid in Vivo. *J. Biol. Chem.* 280, 5892–5901. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404751200>

Yoshiyama, Y., Lee, V.M.Y., Trojanowski, J.Q., 2013. Therapeutic strategies for tau mediated neurodegeneration. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 84, 784–795. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-303144>

Youn, P., Chen, Y., Furgeson, D.Y., 2014. A myristoylated cell-penetrating peptide bearing a transferrin receptor-targeting sequence for neuro-targeted siRNA delivery. *Mol. Pharm.* 11, 486–495. <https://doi.org/10.1021/mp400446v>

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>

Yuri, L., Marco, D., Venneri, A., Farkas, E., Evans, P.C., Marzo, A., Frangi F.A., 2015. Vascular dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease - A review of endothelium-mediated mechanisms and ensuing vicious circles. *Neurobiol. Dis.* 62, 593–606. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2015.08.014>

Zamani, P., Momtazi-Borojeni, A.A., Nik, M.E., Oskuee, R.K., Sahebkar, A., 2018. Nanoliposomes as the adjuvant delivery systems in cancer immunotherapy. *J. Cell. Physiol.* 233, 5189–5199. <https://doi.org/10.1002/jcp.26361>

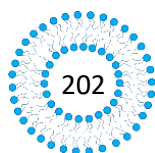
Zhang, L., Fiala, M., Cashman, J., Sayre, J., Espinosa, A., Mahanian, M., Zaghi, J., Badmaev, V., Graves, M.C., Bernard, G., Rosenthal, M., 2006. Curcuminoids enhance amyloid- β uptake by macrophages of Alzheimer's disease patients. *J. Alzheimers Dis.* 10, 1–7. <https://doi.org/10.3233/JAD-2006-10101>

Zhang, Q., Jiang, Li, Liu, 2013. Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified pullulan nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* 1825. <https://doi.org/10.2147/IJN.S44342>

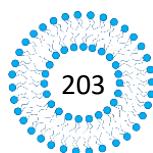
Zheng, X., Shao, X., Zhang, C., Tan, Y., Liu, Q., Wan, X., Zhang, Q., Xu, S., Jiang, X., 2015. Intranasal H102 Peptide-Loaded Liposomes for Brain Delivery to Treat Alzheimer's Disease. *Pharm. Res.* 32, 3837–3849. <https://doi.org/10.1007/s11095-015-1744-9>

Zhigaltsev, I.V., Winters, G., Srinivasulu, M., Crawford, J., Wong, M., Amankwa, L., Waterhouse, D., Masin, D., Webb, M., Harasym, N., Heller, L., Bally, M.B., Ciufolini, M.A., Cullis, P.R., Maurer, N., 2010. Development of a weak-base docetaxel derivative that can be loaded into lipid nanoparticles. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 144, 332–340. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.02.029>

Živanović, V., Milewska, A., Leosson, K., Kneipp, J., 2021. Molecular Structure and Interactions of Lipids in the Outer Membrane of Living Cells Based on Surface-Enhanced Raman Scattering and Liposome Models. *Anal. Chem.* 93, 10106–10113. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00964>

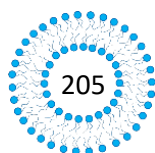


Zucker, D., Marcus, D., Barenholz, Y., Goldblum, A., 2009. Liposome drugs' loading efficiency: A working model based on loading conditions and drug's physicochemical properties. *J. Controlled Release* 139, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.05.036>



8. Прилог 1

Мислења по доставеното авторезиме на оваа докторска дисертација



KARL - FRANZENS - UNIVERSITÄT GRAZ
INSTITUT FÜR PHARMAZEUTISCHE WISSENSCHAFTEN
Institutsleiter

Univ.-Prof. Dr. Andreas Zimmer

Universitätsplatz 1, A-8010 Graz, Austria

Tel. (+43) 316-380 8881 e-mail: andreas.zimmer@uni-graz.at



03.07.2023

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

EXTERNAL REVIEW

of the doctoral dissertation submitted by the candidate:

Dushko Shalabalija with the title:

**Design and Development of bioinspired PEG-ylated Nanoliposomes loaded with Rosemary
Extract for Treatment of Alzheimer's Disease**

I. OBJECTIVE

The pathogenesis of neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease (AD), is associated with the state of oxidative stress. Hence, the use of antioxidants and anti-inflammatory molecules, such as polyphenols in the rosemary extract (RE), which was subject of the thesis, is recommended as a useful strategy for preventing the progression of AD. Taking into consideration the limitations arising from the poor bioavailability of these compounds to the central nervous system (CNS), and additionally, the complexity of the blood-brain barrier (BBB), the aim of the doctoral thesis was the design, development, optimization and *in vitro* physicochemical and biopharmaceutical characterization of PEG-ylated nanoliposomes with encapsulated rosemary extract (RE) for efficient and safe treatment of Alzheimer's disease.

The research plan of the thesis is structured in four phases:

1. Development, preparation and characterization of PEG-ylated nanoliposomes with encapsulated RE:
 - Development and preparation of non-PEGylated nano-vesicles and their characterization in terms of size and size distribution.
 - Development and preparation of blank PEG-ylated nano-vesicles and their characterization in terms of size and size distribution.
 - Development and preparation of PEG-ylated nano-vesicles with encapsulated RE and their characterization in terms of: size, size distribution, encapsulation efficiency of RE through rosmarinic acid (RA) as a marker component.

2. Experimental design and optimization of formulation of PEG-ylated nanoliposomes with RE.
 - Preparation and characterization of nanoliposomes' formulations with encapsulated RE with different ratios of constituent components and their characterization in terms of size, size distribution, morphology, encapsulation efficiency, *in vitro* release rate of the extract monitored by RA over 48 hours and protein adsorption studies using bovine serum albumin (BSA) (OFAT experiments).
 - Implementation of central composite design.
 - Preparation and characterization of various proposed PEG-ylated nanoliposome formulations with encapsulated RE and their characterization in terms of size, size distribution, encapsulation efficiency and *in vitro* release of the extract over 24 hours.
 - Establishment and analysis of mathematical models that qualitatively and quantitatively describe the influence of formulation variables on the properties of interest of the nano-vesicles.
 - Optimization of formulation.

3. Preparation and characterization of optimal formulations of PEG-ylated nanoliposomes with encapsulated RE.
 - Preparation of optimal formulations of PEG-ylated nanoliposomes with incorporated RE.
 - Physico-chemical characterization of prepared nano-vesicles with encapsulated RE (size and size distribution, determination of surface charge and encapsulation efficiency of RE).
 - Determination of the *in vitro* release rate and the release mechanism of the marker component RA.
 - *In vitro* determination of the antioxidant potential of RE as a pure extract and of the nanoliposomes with incorporated RE.
 - Qualitative and quantitative characterization of nanoliposome - protein complexes with proteomics methods.
 - Examination of the stability of nano-systems in physiologically relevant and biological media.

4. *In vitro* cell culture studies in order to investigate the cytotoxicity and the uptake efficiency of the prepared nanoliposomes by two cell lines
 - Cytotoxicity studies of the blank formulations of nanoliposomes (without incorporated RE) on human cerebral microvascular endothelial cells and human neuroblastoma cells.
 - Optimization of the process of fluorescent dye labelling of the blank nano-formulations
 - Quantitative determination and investigation of the uptake mechanism of the fluorescent dyed nanoliposomes by human cerebral microvascular endothelial cells and human neuroblastoma cells.
 - Cellular internalization studies of the blank nano-vesicles in human cerebral microvascular endothelial cells and human neuroblastoma cells.

As major result from this thesis optimal nano liposomal formulations were manufactured and characterized with mean particle size ~ 120 nm and narrow unimodal distribution, as well as a negative zeta potential. The encapsulation of the RA into the liposomal vesicles was about 90%, while the percentage of the *in vitro* release within 24 hours ranged from 24.83 - 48.39%. These

results indicated that the prepared nanoliposomes have high encapsulation efficacy and the rosmarinic acid follows prolonged and controlled release over a period of up to 24 hours.

Further, Dushko showed in his doctoral thesis that the optimal nano liposomal samples showed a statistically significant higher antioxidant capacity (> 94.15%) compared to the extract (90.04%). In addition, the *in vitro* viability did not show a significant decrease in the cell viability, nor a violation of the integrity of their cell membrane. Micro-Raman spectra confirmed the successful internalization of the nano-vesicles, while fluorescence and confocal microscopy micrographs revealed that the internalized nanoliposomes co-localize in the perinuclear cell regions.

In conclusion, the data presented from the PhD thesis of Dushko showed a huge potential of the optimized NLs to overcome the BBB and therefore, efficient and safe AD treatment in the future.

II. CONCLUSION AND OPINION

Based on the obtained PhD thesis it is my pleasure to summarize that Dushko Shalabalija has successfully accomplished the objectives and scientific aims of the study: **“Design and Development of bioinspired PEG-ylated Nanoliposomes loaded with Rosemary Extract for Treatment of Alzheimer’s Disease”**

Dushko published the results of the thesis in 9 publication, with two of them he served as first author. Three publications are proceedings from international conferences and two are abstracts from local conferences. Further the work was financed and part of 5 different research grants.

My general impression of the PhD thesis of Dushko is very positive. The topic and aim of the doctoral work are very up-to date and definitely an urgent need exists in the treatment of AD. Methods applied by Dushko are described precisely and are appropriate for the experimental design. The results are presented clearly and are discussed in context with current knowledge from the scientific literature.

Opinion:

Concerning all above aspects, I am excited to express my enthusiasm for the proposed doctoral dissertation of Dushko Shalabalija. I strongly recommend the presentation of his doctoral thesis to the faculty and further to the academic administration for obtaining a PhD degree at your university.



Univ.-Prof. Dr. Andreas Zimmer
Head of the Institute of Pharmaceutical Sciences



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

July 4th, 2023, Los Angeles, CA, USA

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

"DESIGN AND DEVELOPMENT OF BIOINSPIRED PEG-YLATED NANOLIPOSOMES LOADED WITH ROSEMARY EXTRACT FOR TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE"

According to the document N°: 03-412/4 dated on 22.05.2023, signed by the Dean of the Faculty of Pharmacy, Prof. Dr. Zoran Sterjev, University SS. Cyril and Methodius, Skopje and obtained documentation, I am presenting the following:

EXTERNAL REVIEW

of the doctoral dissertation submitted by the candidate:

Dusko Shalabalija

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

entitled: "DESIGN AND DEVELOPMENT OF BIOINSPIRED PEG-YLATED NANOLIPOSOMES LOADED WITH ROSEMARY EXTRACT FOR TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE ".



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

Age-related memory impairments correlate with a decrease in brain and plasma antioxidants. Oxidative stress leads to protein-, lipid-, DNA oxidation, and glycooxidation which are closely related to cognitive decline during development of Alzheimer's disease (AD). AD is characterized by neuronal and synaptic loss, extracellular A β plaques and intracellular neurofibrillary tangles composed of hyperphosphorylated tau proteins, in addition to astrocyte proliferation, microglia activation and neuroinflammation. Oxidative stress is generally characterized by an imbalance in production of reactive oxygen species (ROS) relative to the limited capacity of antioxidative defense which is responsible for the removal of ROS. Certain antioxidants including glutathione, α -tocopherol (vitamin E), carotenoids, ascorbic acid, and antioxidant enzymes such as catalase and glutathione peroxidases detoxify ROS under physiological conditions. However, intracellular glutathione concentrations decrease with increasing age and are found to affect the hippocampus with rate of ROS production exceeding the rate of ROS removal, resulting in gross neurobiological dysfunction.

Many studies have provided evidence for the deleterious consequences of oxidative stress on cellular targets in the parietal cortex, hippocampus, and temporal lobe where most histopathologic alterations in AD patients accumulate. Even the AD idiosyncrasy in reference to apolipoprotein E (APOE) genotype in the most common sporadic AD links $\epsilon 4$ allele to peroxidation as a potential mechanism.

Therefore, early antioxidant protection seems to constitute an important approach in the disease management. Some plant extracts such as the rosemary extract (RE) emerge with strong antioxidant properties however these preparations are limited in accessing the brain in therapeutic formulation and dosage.

Therefore, the development, preparation, and characterization of PEG-ylated nanoliposomes with encapsulated RE demonstrate a powerful approach to circumvent limitations of RE application in the brain. In his PhD Thesis Dr. Shalabaliya designed and optimized formulation of PEG-ylated nanoliposomes with RE, prepared and characterized optimal formulations of PEG-ylated nanoliposomes with encapsulated RE and performed *in vitro* cell culture studies to assess the cytotoxicity and the uptake efficiency utilizing two different cell lines. Dr. Shalabaliya developed lipid film hydration technique, with RE incorporated into the lipid phase for higher encapsulation efficiency. He identified the main formulation independent variables' impact on the nanoliposomes using CCD.



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

Dr. Shalabalija prepared liposomal dispersions with prolonged RA release, based on the PEG amount present onto nanoliposome surface. Based on the obtained correlation coefficients, he used the Peppas-Sahlin model that best described the release kinetics of RE. Optimized nanoliposomes were stable and showed higher antioxidant capacity compared to RE alone. Stability studies in human plasma and cell culture media, showed that upon release, nanoparticles are immediately covered with biomolecules that change their size and physicochemical properties. Formulations with larger content of PEG showed a stronger hydrogen bonding between PEG and BSA. Protein corona composed of mainly albumin formed readily in the cell culture medium. Since no significant differences in the mean vesicle size were noted during 24 h in media, native formulations were deemed stable. The results on stability were corroborated by AF4 analysis. Serum proteins were found to likely stabilize the PEG-free formulation in terms of preventing the aggregation process. All three nanoliposome formulations didn't affect cell viability of cell culture lines when tested at increasing concentrations.

Cell uptake analyses revealed time, concentration, and PEG dependency in hCMEC/D3 cell line unlike in SH-SY5Y, where the PEG-free formulation had highest internalization. Cellular uptake was determined to be energy-dependent endocytic transport and passive diffusion. The transport studies on the combined hCMEC/D3/SH-SY5Y cell lines confirmed the successful transport of the nanoformulations across the BBB and subsequent uptake by the neuroblastoma cells. These experimentations confirmed successful delivery across BBB and indicated a potential for efficient and safe AD treatment.

II. CONCLUSION AND OPINION

Based on the obtained resume of the work it is my pleasure to conclude that Dushko Shalabalija has successfully accomplished the objectives and scientific aims of the study: "" DESIGN AND DEVELOPMENT OF BIOINSPIRED PEG-YLATED NANOLIPOSOMES LOADED WITH ROSEMARY EXTRACT FOR TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE "".

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



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

General impression of the doctoral dissertation

Presented work and results are innovative and give rise to development of blood-brain barrier (BBB) permissive nanoliposomes for targeted brain delivery of plant extracts with antioxidant properties. The quality of the results is exceptional. Results are presented in a very neat and logical way. 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 nanoliposome formulations 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

Obtained results are well described and evaluated. The results and their presentation are of exceptional quality. The scientific importance and added value of the results are well discussed and explained. The evaluation is objective and reflective of gained expertise.



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

Summary

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

Organization and presentation

The dissertation is well organized, the results are beautifully presented, and they can be easily understood.

Opinion

Concerning all above aspects, it is my pleasure whereby I want to express my strongest enthusiasm for the proposed doctoral dissertation of Dushko Shalabalija and recommend the presentation of his doctoral thesis for obtaining a PhD degree.

A handwritten signature in black ink, appearing to read '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

Предмет: Мислење по доставено авторезиме на докторска дисертација на кандидатот м-р Душко Шалабалија со наслов: „ДИЗАЈН И РАЗВОЈ НА БИОИНСПИРИРАНИ ПЕГ-ИЛИРАНИ НАНОЛИПОЗОМИ СО ВГРАДЕН ЕКСТРАКТ ОД РУЗМАРИН ЗА ТРЕТМАН НА АЛЦХАЈМЕРОВА БОЛЕСТ“.

Од авторезимето на докторската дисертација може да се увиди дека станува збор за оригинални научни резултати добиени од истражувања насочени кон примената на нанолипозоми како системи-носачи на екстракт од рузмарин со цел поефикасна испорака на компонентите од екстрактот во мозочните ткива, наменети за ефикасен третман на Алцхајмерова болест.

Цели на истражувањето:

Предметот на ова истражување претставува дизајн, развој, оптимизација и целосна *in vitro* физичко-хемиска и биофармацевтска карактеризација на ПЕГ-илирани нанолипозоми со вграден екстракт од рузмарин за потенцијален и ефикасен третман на Алцхајмеровата болест. Работните активности од оваа докторска дисертација се добро осмислени, структурирани и поделени во четири последователни фази, односно:

1) Развој, подготовка и карактеризација на ПЕГ-илирани нанолипозоми со енкапсулиран екстракт од рузмарин со цел да се избере една формулација за понатамошна модификација.

2) Подготовка и карактеризација на формулации на нанолипозоми со енкапсулиран екстракт од рузмарин со различен сооднос на составните компоненти, нивна карактеризација и последователна имплементација на експериментален дизајн како корисна статистичка алатка за оптимизација на формулацијата.

3) Подготовка и карактеризација на оптимални ПЕГ-илирани формулации на нанолипозоми со енкапсулиран екстракт од рузмарин, каде што се наведени повеќе работни задачи и активности со цел комплетна физичко-хемиска и биофармацевтска карактеризација на овие системи, како и испитување на нивната стабилност во различни физиолошки релевантни медиуми. Во насока на потенцирање на предностите на подотвените формулации, направени се и *in vitro* експерименти за проценка на антиоксидативниот капацитет на екстрактот и на нанолипозомите со енкапсулиран екстракт.

4) Во завршната фаза спроведени се *in vitro* истражувања на испитување на токсичност и компаративни студии на ефикасност на преземање на празните нанолипозомски носачи од страна на различни клеточни линии кои ја симулираат функцијата на КМБ и невроните.

Краток опис на резултатите од спроведените истражувања:

Во рамките на ова истражување, направен е дизајн, развој, формулација и карактеризација на различни формулации на ПЕГ-илирани нанолипозоми со вграден екстракт од рузмарин каде што е опфатена и компаративна анализа на однесувањето на овие нано-носачи во избрани клеточни култури, а исто така и нивниот антиоксидативен потенцијал како еден од механизмите за превенција и третман на Алцхајмеровата болест.

Прелиминарните студии опфаќаат дизајн и развој на неПЕГ-илирани празни нанолипозоми, а понатамошните чекори влучуваат подготовка и карактеризација на нанолипозомски формулации со полимер за стерна стабилизација (ПЕГ) и следствено на тоа, ПЕГ-илирани нанолипозоми со енкапсулиран екстракт од рузмарин. Понатаму е продолжено со експерименти во кои е вариран еден фактор во дадено време со чија помош се поставени границите на дизајн просторот. Во следната фаза, применет е експериментален дизајн во насока на оптимизација на формулацијата од аспект на вкупните физичко-хемиски и биофармацевтски особини на нанолипозомите кои се во насока на ефикасен транспорт низ крвно-мозочната бариера, а со тоа и успешен и безбеден третман на Алцхајмеровата болест.

Оптималните липозомски примероци се карактеризирани со големина од околу 120 nm, со тесна дистрибуција по големина и негативна површинска наелектризираност и истите се карактеризираат со висок процент на вградување на екстрактот (>85 %). Резултатите од *in vitro* ослободувањето на рузмаринската киселина како маркер компонента за следење на ослободувањето на екстрактот, покажуваат дека сите нанолипозомски формулации резултираат со негово продолжено ослободување во текот на 24 час, при што доминантен механизам на ослободување е процесот на дифузија.

Квантитативната карактеризација на нано-систем - протеин комплексите после инкубација на нанолипозомите во хумана плазма од здрави доброволци и плазма од пациенти со Алцхајмерова болест потврдува дека ПЕГ-илацијата претставува успешен пристап во намалување на процентот на адсорбирани серумски протеини на површината на нанолипозомите, со што понатаму би влијаело на превенција на последователниот процес на клиренс од организмот. Во оваа насока, IR – ATR спектроскопските анализи даваат увид во природата на интеракциите помеѓу нанолипозомите и говедскиот серум албумин, при што е увидено дека посилни врски се формираат кај формулациите со повисоко количество на ПЕГ. На крајот од оваа фаза испитана е и стабилноста на оптималните нанолипозоми во физиолошки релевантни медиуми, каде што добиените резултати сугерираат на физичката стабилност на формулациите.

Од испитувањата на вијабилноста и цитотоксичноста врз клеточни модели на крвно-мозочна бариера и човечки неуробластома клетки по 24 часа утврден е безбедносниот интервал на дозирање на нано-формулациите и дополнително е увидено дека дизајнираните нано-носачи не је намалуваат клеточната вијабилност, ниту пак го нарушуваат интегритетот на клеточната мембрана. Во квантитативните студии на клеточно преземање на нанолипозомите од страна на овие две клеточни линии се покажува дека концентрацијата на нано-везикулите и времето на инкубација играат клучна улога врз процентот на нивната интернализација, додека пак статистичката анализа на моделите на клеточно преземање во hCMC/D3 и SH-SY5Y клеточната линија, покажуваат дека присуството на ПЕГ игра клучна улога во ефикасноста на интернализација во двете клеточни култури, одделно.

Што се однесува до механизмот на клеточна интернализација, сите испитани нанолипозомски формулации се карактеризираат со енергетски зависен ендоцитен транспорт и пасивна дифузија, додека пак транспортните студии на комбинираната hCMC/D3 / SH-SY5Y клеточна линија го потврдуваат успешниот транспорт на нано-формулациите низ клетките на КМБ и нивното последователно преземање од страна на неуробластома клетките. Спектрите од Микро-Раманската спектроскопија ја потврдуваат успешната интернализација на нано-везикулите, а микрографските прикази од флуоресцентната и конфокалната микроскопија откриваат дека интернализираните нанолипозоми се колокализираат во перинуклеарните клеточни региони.

Научни трудови произлезени од докторската дисертација

За научната релевантност и тежина на оваа докторска дисертација сведочат и четирите оригинални научни трудови објавени во престижни списанија како што се: *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (IF = 5,062 за 2022 г.), *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.) и *Croatica Chemica Acta* (IF = 0,659 за 2022 г.). Дополнително, во периодот од 2018 до 2022 година, дел од резултатите од оваа докторска дисертација се презентирани како орални презентации и објавени во кратки соопштенија во меѓународните списанија *Macedonian Pharmaceutical Bulletin* и *Acta Pharmaceutica Hungarica*.

Завршно мислење во однос на докторската дисертација

По деталното разгледување на доставеното авторезиме со огромно задоволство можам да изјавам дека докторската дисертација „ДИЗАЈН И РАЗВОЈ НА БИОИНСПИРИРАНИ ПЕГ-ИЛИРАНИ НАНОЛИПОЗОМИ СО ВГРАДЕН ЕКСТРАКТ ОД РУЗМАРИН ЗА ТРЕТМАН НА АЛЦХАЈМЕРОВА БОЛЕСТ“ на кандидатот м-р Душко Шалабалија опфаќа детален и систематски пристап на работните задачи и активности, а презентираниите резултати и квалитетот на објавените научни трудови сведочат за релевантноста и тежината на обработената тематика. Дополнително, дисертацијата целосно ги задоволува поставените цели, истовремено давајќи значаен и оригинален придонес во полето на нанотехнологијата. Заклучно, добиените сознанија се во насока на отворање на нови хоризонти во современите пристапи за поефикасна испорака на лековитите супстанции во мозокот наменети за третман на невродегенеративните болести.

Со почит,

Доц. д-р Габриела Новотни

Универзитетска клиника за неврологија
Медицински факултет
Универзитет Св. Кирил и Методиј- Скопје



EUROPEAN COMMISSION
JOINT RESEARCH CENTRE

Directorate F – Health and Food
Technologies for Health

Ispra, 28 June 2023
JRC.F.2/ggo

**FACULTY OF PHARMACY
ATT. PROF. MARIJA GLAVAS DODOV
SS CYRIL AND METHODIUS UNIVERSITY IN SKOPJE,
N. MACEDONIA**

SUBJECT: OPINION ON THE PHD THESIS OF MR. DUSHKO SHALABALIJA

Dear Prof. Marija Glavas Dodov,

We had the pleasure of reading Mr. Shalabalija's doctoral thesis.

The aim of the work described in the dissertation was the development/production of nanoliposomes loaded with rosmarinic acid (RA), which are able to cross the BBB barrier and can therefore potentially be used to prevent Alzheimer's disease.

The work included the synthesis and characterization of different types of liposomes, the selection of the most suitable among the tested liposomes in terms of size/stability and encapsulation efficiency of RA, in vitro viability and cytotoxicity tests on BBB cells and cell uptake tests.

The dissertation extensively discusses the design, implementation, and outcomes of the research. It is both captivating and well-written.

As we are not experts in the field of the activity described, we have mainly focused on the parts in which we were directly involved.

For Mr. Shalabalija's consideration, we offer some minor suggestions for improvement. We have provided more detailed comments in the manuscript that Mr. Shalabalija previously shared. We encourage him to review those comments as well.

We congratulate Mr. Shalabalija on this interesting work and wish him all the best for his future career.

Yours sincerely,

Otmar GEISS
Project Leader

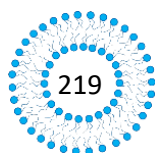
Pascal COLPO
Responsible for Open Access Activity
JRC Nanobiotechnology laboratory

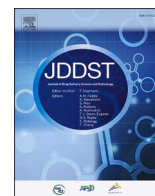
Commissione Europea, Via Enrico Fermi 2749, 21027 Ispra VA, ITALIA – Tel. +39 332786323
Commission européenne/Europese Commissie, Retieseweg 111, 2440 Geel, BELGIQUE/BELGIË

Email-Address: otmar.geiss @ec.europa.eu

9. Прилог 2

Листа на објавени трудови поврзани со оваа докторска дисертација





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 ($A\beta$) 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; ULTRASONS-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 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 hCMEC/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 \pm 1.74	13.59 \pm 0.07	0.43 \pm 0.03	1.09 \pm 0.05	1.99 \pm 0.06	2.35 \pm 0.05
8	2	400	310	50	128 \pm 1.45	17.02 \pm 0.09	0.56 \pm 0.02	1.60 \pm 0.03	1.78 \pm 0.05	1.97 \pm 0.06
20	3	300	280	27.5	126.37 \pm 1.56	13.10 \pm 0.07	0.58 \pm 0.05	1.43 \pm 0.04	1.62 \pm 0.02	1.89 \pm 0.09
14	4	300	280	50	125 \pm 1.31	13.61 \pm 0.08	0.28 \pm 0.02	0.80 \pm 0.02	0.94 \pm 0.04	1.32 \pm 0.04
7	5	200	310	50	131 \pm 1.91	7.26 \pm 0.10	0.17 \pm 0.02	0.56 \pm 0.04	0.66 \pm 0.03	0.97 \pm 0.06
2	6	400	250	5	126 \pm 1.84	18.18 \pm 0.07	0.91 \pm 0.04	1.77 \pm 0.02	1.96 \pm 0.05	2.65 \pm 0.05
11	7	300	250	27.5	126.85 \pm 1.44	13.83 \pm 0.06	0.37 \pm 0.04	0.92 \pm 0.03	1.11 \pm 0.03	1.34 \pm 0.06
16	8	300	280	27.5	126 \pm 1.87	13.06 \pm 0.09	0.58 \pm 0.03	1.46 \pm 0.04	1.58 \pm 0.03	1.85 \pm 0.07
17	9	300	280	27.5	127 \pm 2.36	13.06 \pm 0.04	0.59 \pm 0.03	1.52 \pm 0.04	1.61 \pm 0.03	1.90 \pm 0.05
3	10	200	310	5	129 \pm 1.85	8.80 \pm 0.08	0.39 \pm 0.01	1.03 \pm 0.05	1.32 \pm 0.06	1.45 \pm 0.04
9	11	200	280	27.5	133 \pm 2.60	8.42 \pm 0.07	0.21 \pm 0.03	0.89 \pm 0.03	0.83 \pm 0.01	1.12 \pm 0.04
5	12	200	250	50	127 \pm 2.79	7.79 \pm 0.05	0.18 \pm 0.01	0.61 \pm 0.03	0.87 \pm 0.03	1.01 \pm 0.08
12	13	300	310	27.5	127 \pm 1.85	13.33 \pm 0.07	0.37 \pm 0.02	1.05 \pm 0.03	1.22 \pm 0.05	1.46 \pm 0.04
4	14	400	310	5	120 \pm 1.65	18.46 \pm 0.05	0.64 \pm 0.03	1.55 \pm 0.06	1.51 \pm 0.03	2.03 \pm 0.05
18	15	300	280	27.5	127 \pm 2.25	13.07 \pm 0.03	0.56 \pm 0.04	1.51 \pm 0.03	1.60 \pm 0.07	1.88 \pm 0.09
15	16	300	280	27.5	126 \pm 0.95	13.05 \pm 0.04	0.59 \pm 0.02	1.49 \pm 0.06	1.63 \pm 0.05	1.92 \pm 0.06
6	17	400	250	50	123 \pm 1.75	18.83 \pm 0.06	0.45 \pm 0.04	1.07 \pm 0.04	1.30 \pm 0.05	1.51 \pm 0.08
10	18	400	280	27.5	122 \pm 1.37	17.81 \pm 0.04	0.66 \pm 0.03	1.60 \pm 0.03	1.90 \pm 0.03	2.06 \pm 0.03
1	19	200	250	5	127.7 \pm 1.57	8.70 \pm 0.06	0.80 \pm 0.02	1.97 \pm 0.06	2.11 \pm 0.02	2.39 \pm 0.04
13	20	300	280	5	124 \pm 1.91	13.98 \pm 0.08	0.47 \pm 0.04	1.07 \pm 0.05	1.37 \pm 0.03	1.47 \pm 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										

The formulation parameters and factor interactions that had significant influence on each of the responses ($p < 0.05$) can be seen in Table 5.

As previously mentioned, the nanoparticle size influences the therapeutic and diagnostic agent delivery to the brain, including vesicles' blood circulation half-life, targeting, cellular uptake and drug release kinetics [27,28]. PEGylated nano-liposomes smaller than 200 nm are characterized by reduced RES clearance and a prolonged circulation half-life which facilitates drug ability to interact with specific molecules expressed on the luminal side of BBB endothelial cells, and consequently to cross the BBB. Therefore, optimizing nanoparticle size and the molecular weight of the PEG coating is crucial segment in the development of nano-brain delivery carriers [29,30]. Obtained equations and “*p*” values of the formulation variables and their interactions suggested that factors A, C and the interactions AB, BC, A², C², ABC and AB² had statistically significant influence on D₅₀ ($p < 0.05$). Positive sign in front of the factor C means that there was a proportional dependence between the PEG amount and D₅₀. Consequently, the interaction BC revealed that NLS size tended to increase while increasing the PEG and SL amounts in the formulation at the same time, which is a logical conjecture that bigger NLS will be formed by higher concentrations of components present in the lipid film (Eq. (6)). On the other hand, from Fig. 1a it can be noticed that after the PEG amount in the formulation reached a certain value, at lower amounts of SL, NLS size started to decrease exponentially probably due to the fact that as PEG amount was augmented, PEG strands were forced closer together on the surface of the liposome, leading to increment of the lateral repulsive forces

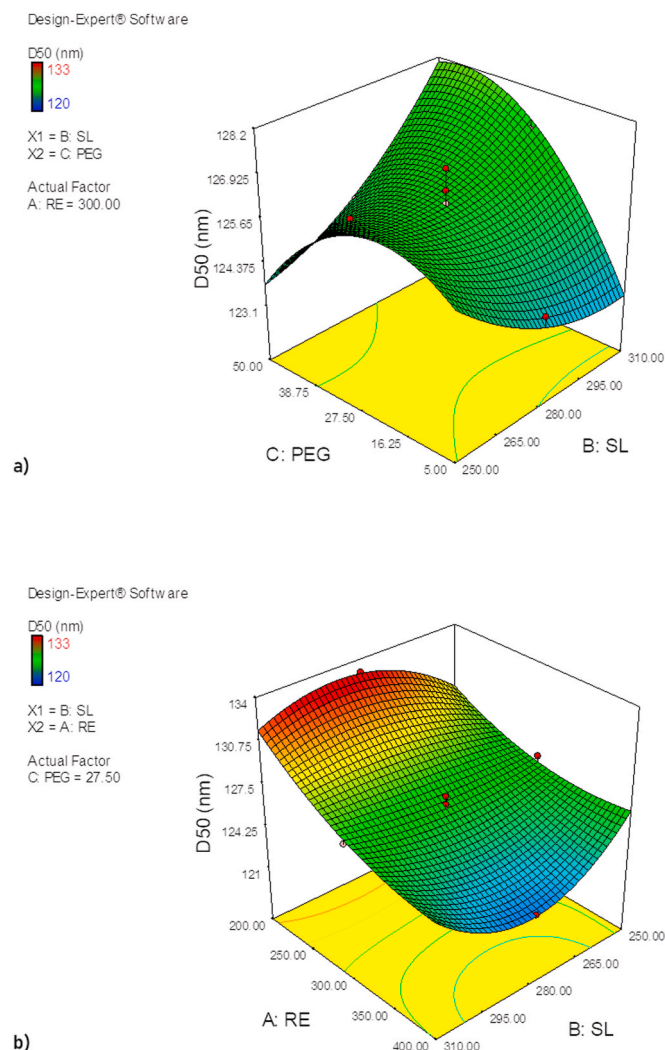


Fig. 1. 3D graphic representation of the influence of a) studied variables (SL and PEG) on D₅₀, b) studied variables (RE and SL) on D₅₀.

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 D₅₀ 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 A² 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 D₅₀. 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].

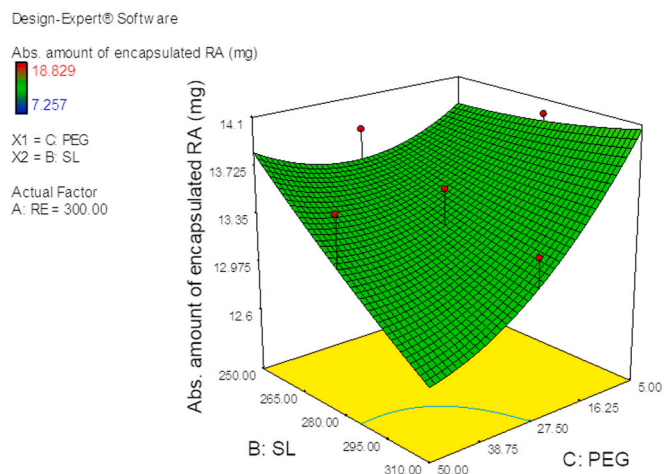


Fig. 2. 3D graphic representation of the influence of studied variables (SL and PEG) on absolute amount of encapsulated RA.

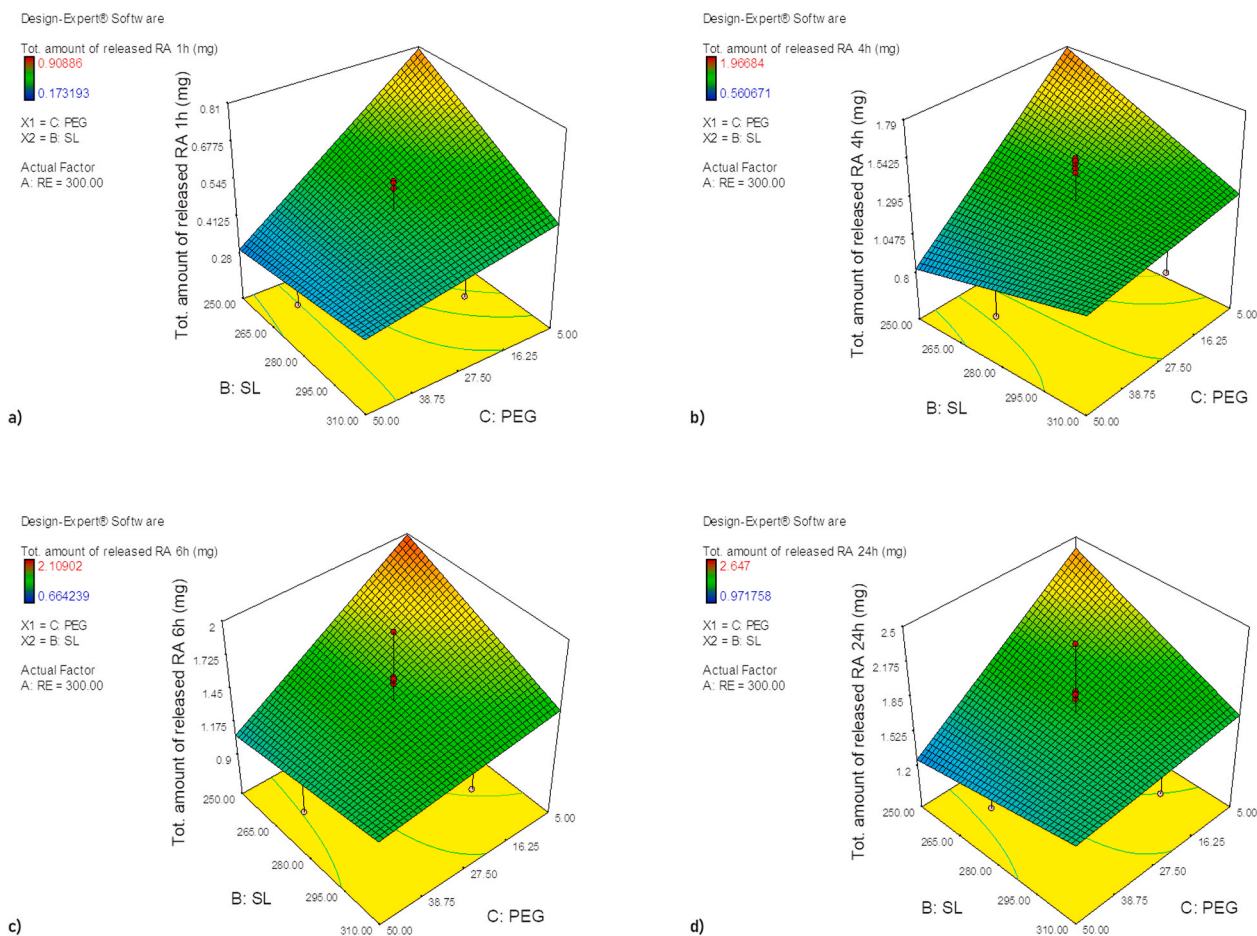


Fig. 3. 3D graphic representation of the influence of studied variables (SL and PEG) on a) total amount of released RA in 1 h, b) total amount of released RA in 4 h, c) total amount of released RA in 6 h, d) total amount of released RA in 24 h.

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 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	min.	max.	max.	max.	max.	max.
NL2	in	in	in	min.	max.	max.	max.	max.	max.
NL3	range	range	range	min.	max.	min.	min.	min.	min.
NL4	in	in	in	min.	max.	max.	min.	min.	max.
NL5	range	range	range	min.	max.	max.	min.	min.	min.

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 (D₅₀) 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 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
			-45.10 ± 1.52	93.15 ± 2.43	
NL2	116 ± 2.25	0.979	-21.45 ± 1.28	80.94 ± 3.67	4.01 ± 0.18
			-48.30 ± 1.17	85.81 ± 2.36	
NL3	120 ± 2.97	1.197	-23.00 ± 1.23	85.77 ± 2.54	4.14 ± 0.13
			-48.30 ± 1.17	85.81 ± 2.36	
NL4	120 ± 3.95	0.984	-23.00 ± 1.23	85.77 ± 2.54	4.14 ± 0.13
			-48.30 ± 1.17	85.81 ± 2.36	
NL5	120 ± 2.45	1.000	-23.00 ± 1.23	85.77 ± 2.54	4.14 ± 0.13
			-48.30 ± 1.17	85.81 ± 2.36	

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 $93.15 \pm 2.43\%$, 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 – $48.39 \pm 2.32\%$ over a 24-h period), which was proportionally dependent on the PEG amount present onto NLs surface. Namely, formulations NL1, NL3, and

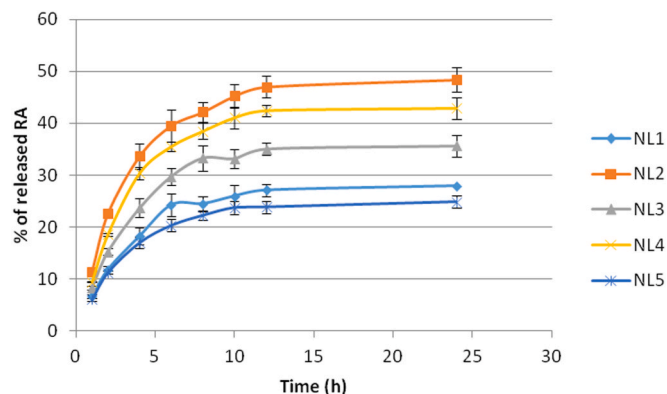


Fig. 4. *In vitro* release profile of NL1-NL5 in a period of 24 h.

NL5 where PEG was present in greater proportion resulted in slower release of the active component (24.83 ± 1.22 – $35.64 \pm 2.12\%$ 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 $42.90 \pm 2.07\%$, 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].

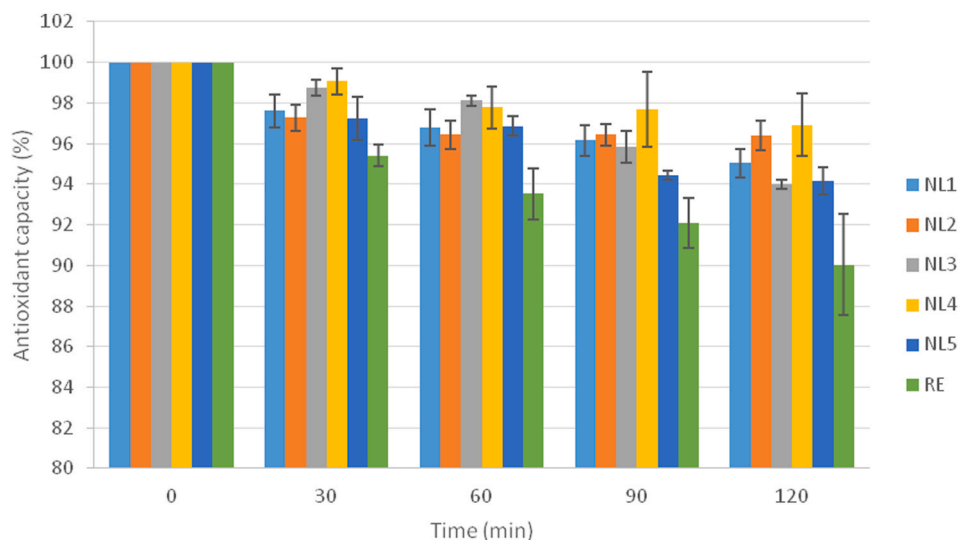
As described before, the RE components exhibit with multifunctional properties including free radical scavenging, metal chelation and activation of antioxidant pathways, thus leading to induction of gene transcription for different antioxidant enzymes and in the same time contributing against A β polymerisation 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 ($90.04 \pm 2.51\%$) (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 $96.92 \pm 1.54\%$, 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 $18.06 \pm 0.25\%$, 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

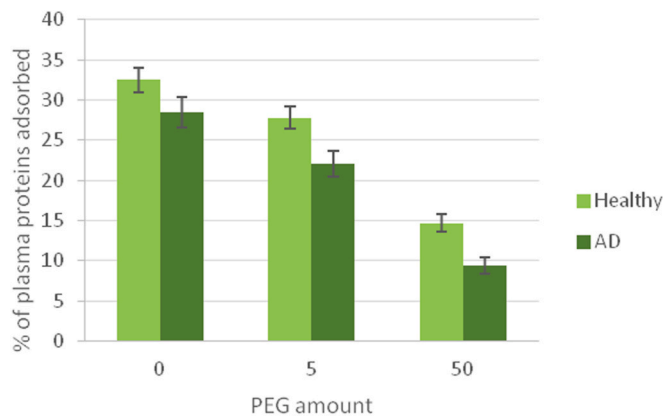
**Fig. 5.** Antioxidant capacity of RE and optimal NLS formulations (NL1-NL5).

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

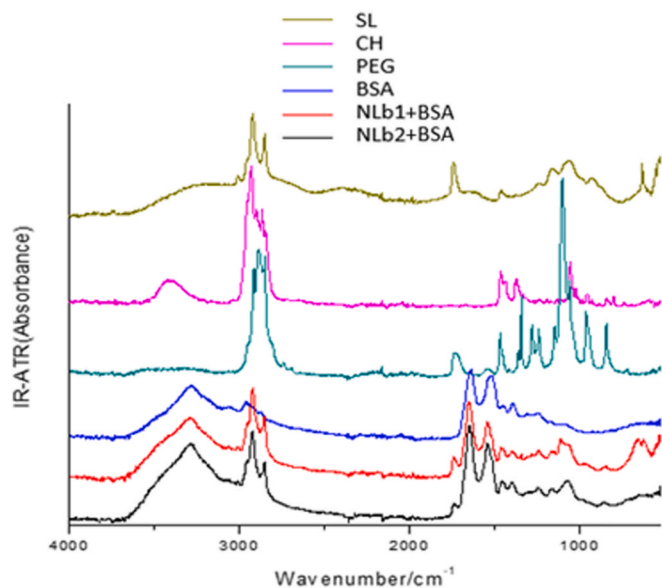


Fig. 7. IR-ATR spectra of SL, CH, PEG, BSA, NLb1 and NLb2.

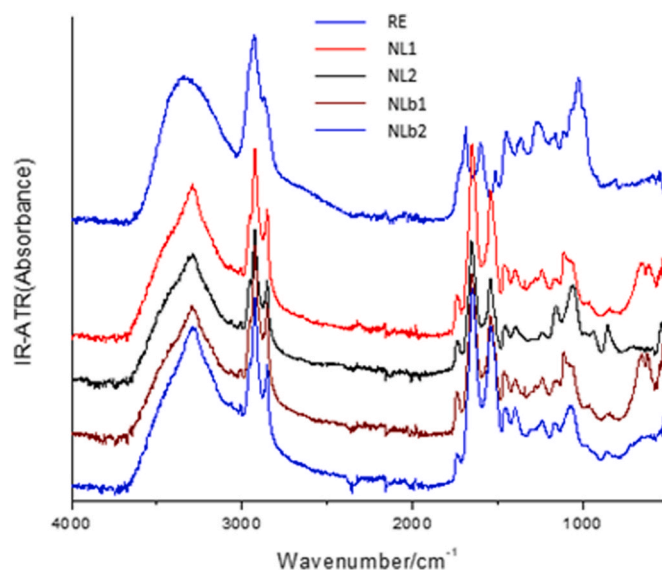


Fig. 8. IR-ATR spectra of RE and samples NL1 and NL2 converted to absorbance and ATR corrected. The spectra of NLb1 and NLb2 blank samples are given for comparison.

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

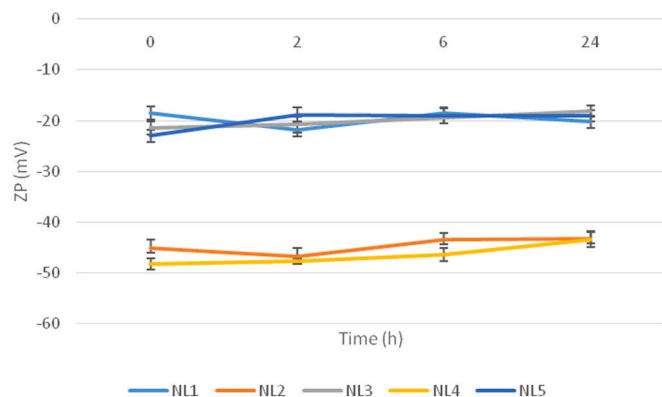


Fig. 9. ZP of NL1-NL5 in PB pH 7.4 during a period of 24 h.

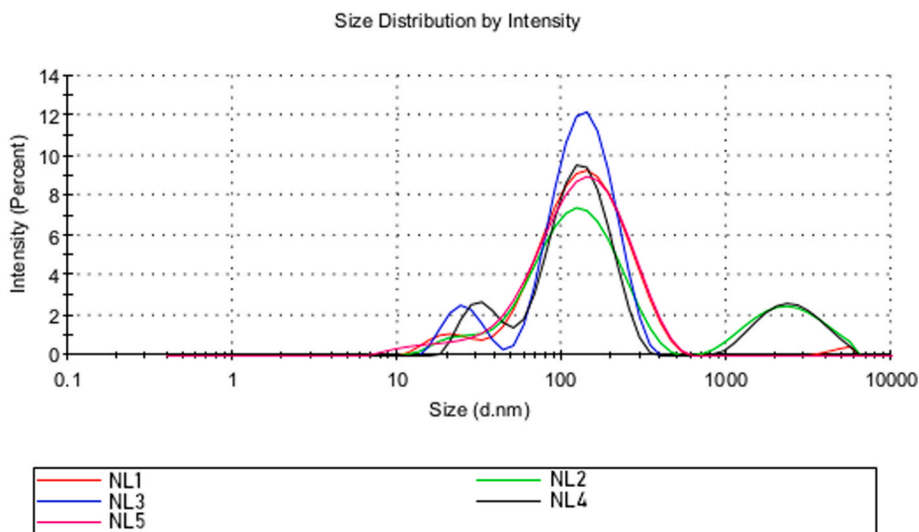


Fig. 10. Size distribution of NL1-NL5 after 24 h incubation in human plasma.

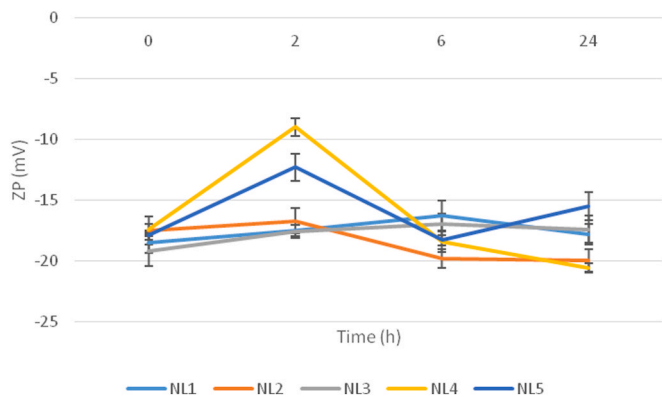


Fig. 11. ZP of NL1-NL5 in human plasma during a period of 24 h.

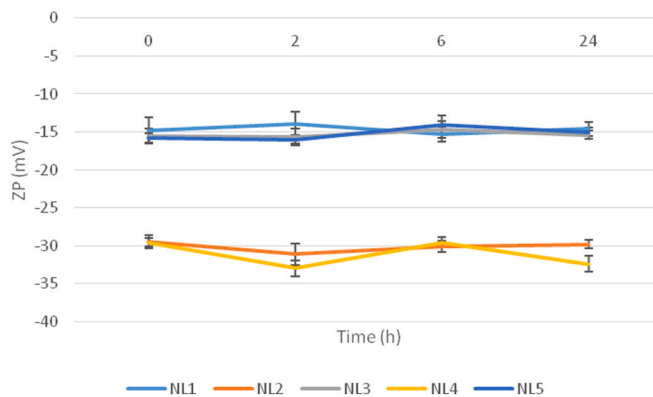


Fig. 13. ZP of NL1-NL5 in cell culture media during a period of 24 h.

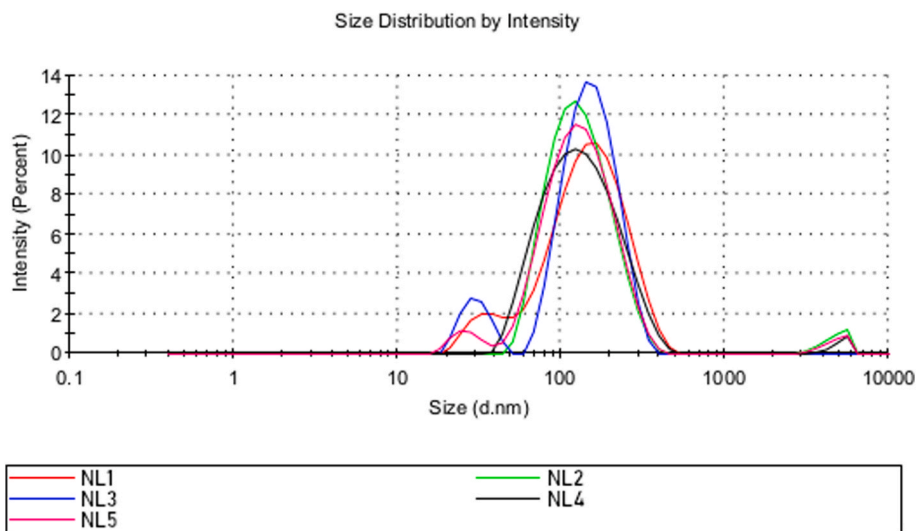


Fig. 12. Size distribution of NL1-NL5 after 24 h incubation in cell culture media.

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. Cauwenberghe 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. Gryszczyńska, M. Kujawska, J. Jodynis-Liebert, A. Piasecka, H. Napieczynska, M. Szulc, R. Kujawski, J. Bartkowiak-Wieczorek, J. Cichocka, T. Bobkiewicz-Kozłowska, 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>.
- 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/10.2147/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 acid loaded PEG-ylated liposomes for brain delivery, *Macedonian Pharmaceut. Bull.* 62 (suppl) (2016) 641–642.
- W. Geldenhuis, 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/nmm.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 antitumor 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. Irargorri, 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. Sylvestre, 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. Tonnie, 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. Shalabaliya, I. Cvetkovikj 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. Caraciolo, 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. Shalabaliya, 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>.

Micro-Raman Spectroscopy for Detection of Label-Free and Oil Red O Labeled PEGylated Nanoliposomes in hCmec/D3 Cell Internalization Studies

Filip Gorachinov,^{1,*} Petre Makreski,² Dushko Shalabalija,¹ Ljubica Mihailova,¹ Maja Simonoska Crcarevska,¹ Marija Glavas Dodov,¹ Katerina Goracinova,¹ Gligor Jovanovski,³ Nikola Geskovski^{1,#}

¹ Ss Cyril and Methodius University in Skopje, Faculty of Pharmacy, Institute of Pharmaceutical technology, Majka Tereza 47, 1000 Skopje, Republic of North Macedonia

² Ss Cyril and Methodius University in Skopje, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Institute of Chemistry, Arhimedova 5, 1000 Skopje, Republic of North Macedonia

³ Macedonian Academy of Science and Arts, Research Center for Environment and Materials, Bul. Krste Misirkov 2, 1000 Skopje, Republic of North Macedonia

* Corresponding author's e-mail address: filip.gorachinov@gmail.com

Corresponding author's e-mail address: ngeskovski@ff.ukim.edu.mk

RECEIVED: August 31, 2022 * REVISED: February 4, 2023 * ACCEPTED: February 6, 2023

THIS PAPER IS DEDICATED TO PROF. BRANKO KAITNER ON THE OCCASION OF HIS 80TH BIRTHDAY

Abstract: Rapid development of nanomedicines necessitates advancement in internalization techniques which can accurately distinguish between the complex environments of cells and nanocarriers. Internalization (or endocytosis) studies of oil red O labeled and label-free PEGylated-lecithin/cholesterol nanoliposomes was performed using micro-Raman spectroscopy. The C–O stretching vibrations and CCH scissoring bendings of naphthalene ring around 1225 cm⁻¹ as well as the N=N stretching vibrations at 1377 cm⁻¹ are prominent peaks absent from the label-free spectra which can be used for detection of internalized oil red O labeled nanoliposomes. Suitability of oil red O as a liposome marker was confirmed by stability studies of the incorporated dye and automated fluorescence cell counting. The C–C stretching region with a prominent wide band centered at 1080 cm⁻¹ indicative of larger gauche conformer content typical for the lecithin-cholesterol nanoliposomes and the strong maximum at 980 cm⁻¹ associated with O–C–N⁺ stretching vibrations of the liposome polar head groups are important for studying label-free nanoliposome cell internalization.

Keywords: PEGylated nanoliposomes, oil red O labeled PEGylated-nanoliposomes, cell internalization studies, micro-Raman spectroscopy.

INTRODUCTION

NANOTECHNOLOGY is a rapidly developing field that demonstrates growing applications in many areas. Its subdiscipline, nano-engineered medicine, brings numerous clinical advantages and unique biological properties mainly due to the nanosize and specific physicochemical features of the evaluated biosystems. In this regard, vast technological advances in drug delivery and in biopharmaceutics emerge to act as therapeutic vehicles for molecules such as drugs, proteins, DNA and monoclonal antibodies.^[1] Nanomedicines currently in use or under investigation include long circulating PEGylated liposomes, polymer nanoparticles or micelles, nanostructured lipid nanoparticles, lipid-polymer hybrid nanoparticles, and dendrimers. Due to their

favorable physicochemical and biophysical properties, liposomes are considered as one of the most biocompatible nanocarriers capable of surpassing different biological barriers. In addition, multifunctional liposomal carriers equipped to support the EPR effect, also capable to transform into a “recognition” state and induce ligand-receptor interaction in different biological compartments, evolved to improve the lack of selectivity, increase the localization and cell internalization of conventional nanocarriers.^[2–4]

Bioimaging technologies for cellular processing and intracellular fate of liposomes are crucial for optimization of these design approaches. However, understanding the nature of the interaction of nanoscale material with biological systems, their biodistribution and potential to

cross biological barriers, tissue accumulation and cell internalization, as accurate predictors of toxicity as well as effectiveness of therapeutics of interest, is restricted by the limitations of the available techniques. Most liable adopted methodologies for biological and biomedical imaging are fluorescence microscopy, flow cytometry, small-angle X-ray scattering and spectral bioimaging.^[1]

Flow cytometry (fluorescence-activated cell sorting analysis) allows quantification of liposomal uptake but it cannot distinguish among the cell surface attached and internalized liposomes.^[5] Localization studies may be performed using fluorescence microscopy in living or fixed cells stained with multiple fluorescent markers for endocytic compartments, organelles, or different endocytic pathways and incubated with fluorescently labelled liposomes. However, accurate localization is often hindered by low spatial and spectral resolution leading to overlapping of the fluorescent signals due to their proximity in the microscopic structure.^[1,6,7] In order to achieve higher spatial resolution and segregate mixed fluorescence signals, confocal laser scanning microscopy (CLSM) is usually coupled with spectral imaging detector to secure high spectral resolution and resolve spatial contribution of each fluorophore. CLSM gives the 3D aspect of a sample with the exact spatial position of the nanoparticle and the spectral imaging measures the spectral information. Thus, a 3D emission spectral profile of each fluorophore spatially with a high spectral resolution is constructed, enabling the separation of fluorescent dyes in a multi-stained system.^[8] Combined flow-cytometry and spectral bioimaging may also be applied to unravel the internalization mechanism and intracellular fate of liposomes and other nanomedicines.^[9] However, fluorescent label induced changes in the physico-chemical and biological properties as well as modifications of the cellular fate, dye leakage and/or reattachment to different structures, dye stability and photobleaching that lead to loss of tracking confidence or decrease of the signal over time are major limitations that cannot be easily resolved. Furthermore, the high energy wavelengths used to excite the fluorophores might damage the cells and cause the production of reactive oxygen species which is severe obstacle throughout time-course studies during which the toxicity imparted by reactive oxygen species (ROS) can become evident, impacting cell permeability and integrity.^[7] The variety of problems introduced by fluorescent dyes need to be overcome by techniques that are able to compare and distinguish dye-free and dye-labeled nanocarriers. In order to circumvent the limitation of the fluorescent techniques, a viable approach delivered by use of other methods are explored.

Due to its high resolution and applicability to target live cells in both an aqueous environment and in fixed samples, confocal micro-Raman spectroscopy is commonly

used for cell visualization. The technique enables noninvasive chemical imaging based on vibrational properties of functional groups within the sample and occasionally does not require compound labeling.^[1,10] Direct visualization of components in the sample is usually performed by obtaining three-dimensional confocal Raman images and integrating the intensity of characteristic spectral bands measured at one location and at several sample layers.^[11] Spectra can be obtained by focusing the laser beam at the point of interest or by mapping experiments that would be further processed by multivariate data analysis (chemometrics). Compared to the univariate methods, where information is extracted through the relative comparison of isolated band shifting and intensity changes observed in the spectra of individual samples, multivariate methods are more powerful and very accurate as they derive and compare the information from a number of whole spectra obtained from different sample points.^[12]

In biological cells and other complex tissues, the observed spectra exhibit bands with various intensities and shapes that originate from the vibration of the various building blocks that constitute the biochemical components: nucleic acids, proteins, lipids, phospholipids, and carbohydrates. Due to the rich spectral content, apart from investigation of the molecular compositions and structures, the technique could be exploited to track the optical signals arising from internalized liposomes, provided that the uptake is sufficiently large. Considering the scarcity of data regarding the use of spontaneous confocal micro-Raman spectroscopy to study cell internalization of labeled and label-free nanomedicines,^[13] the aim of this study was to test and highlight the potential of the technique for evaluation of the internalization of PEGylated-lecithin/cholesterol oil red O labeled and label-free liposomes in brain microvascular endothelial hCmec/D3 cell line. The approach represents an established *in-vitro* blood-brain barrier (BBB) model in the development of brain targeted drugs and drug delivery systems.

EXPERIMENTAL

Materials

Soybean lecithin (SL) was purchased from Vitalia, N. Macedonia. LIPOID PE 18:0/18:0-PEG 2000 (PEG) was donated from Lipoid, Germany. Cholesterol (CH) was purchased from Sigma Aldrich, Germany. Oil red O was purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Methanol, chloroform, and formic acid were of HPLC grade purity and supplied from Merck, Germany. EndoGRO-MV Complete Culture Media Kit SCME004 (cell culture media) was purchased from Merck, Germany. Phosphate buffer (PB) with pH 7.4 was prepared *ex tempore* (Ph. Eur. 9).

Preparation of PEGylated Nanoliposomes and Oil Red O Labeled Nanoliposomes

Liposome dispersion was prepared according to the procedure outlined by Shalabaliya et al.^[14] SL (261.02 mg), CH (30 mg), PEG (50 mg) were dissolved in a 1 : 4 methanol : chloroform mixture (V/V). The organic solvents were removed under vacuum using a rotavapor (25 °C, 50 rpm, 50 mbar; Buchi 215 Switzerland). The obtained film was hydrated using PB pH 7.4 in four, consecutive three-step cycles (step 1: ultrasonification ULTRASON-H, J.P Selecta; step 2: vortexing Tehnika, EV-102; step 3: manual mixing at room temperature) and further submitted to high shear homogenization (Ultra-Turrax T25, IkaWerke, Germany). Then, the samples were left for 24h at 4–8 °C, and again homogenized at 6000 rpm for 3 minutes. Finally, the preparations were washed and concentrated in four consecutive cycles (Rotofix 32 - Hettich Zentrifugen, Germany) at 4500 rpm, 25 °C for 15 minutes using Vivaspin 20 ultrafiltration cuvettes 1000 kDa (Sartorius, Germany). The labeled liposomes were prepared with the previously stated procedure that was modified as described by Mozfari et al.^[15] In brief, the Oil red (0.1 ml 25mM solution in chloroform) was added during the dissolution of the SL, CH, PEG in the 1 : 4 methanol:chloroform mixture (V / V) with no further changes in the liposome preparation procedure. The eluate from the last washing step was analyzed by UV spectroscopy in the 200–400 nm region (Carry 60, Agilent, USA) to confirm the absence of bands from free Oil red O. The stability of the encapsulated dye was analyzed after 7-days storage at 8 °C by washing and ultrafiltration of the labeled nanoliposomes and further UV scanning of the obtained eluate.

Determination of Particle Size, Size Distribution and Zeta Potential

Particle size and zeta potential (Zetasizer Nano Series, Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) were measured in disposable transparent cuvettes at 25 °C following dilution of NL dispersion 1 : 5 (V / V) in 10mM PB pH 7.4.

Cell Culture

Cell culture hCmec/D3 (human brain endothelial vasculature cells) was used as a model for blood-brain barrier translocation of the prepared nanoliposomes. The cells were maintained in EndoGRO-MV Complete Culture Media (MerckMilipore, Germany) on 37 °C, 10 % CO₂ and saturated humidity. The seeding was performed on a rat collagen coated sterile cell culture flasks and multiwall plates.

Internalization Studies

The cell internalization experiments were guided according to a method described by *Mourtas et al.* with slight modification.^[16] In brief, cells were seeded in a rat collagen coated

6-well plate at a density of 1×10^6 cells/well and left overnight. The label-free and oil-red labeled liposomes were added to cell culture medium in concentration of 200 nM (calculated on liposomal lipids) for a period of 4 h. Untreated cells were liposome free samples and used as blanks. Afterward, the cells were triply washed with Dulbecco PBS (Thermo Scientific, USA) and detached from the wells using Trypsin-EDTA solution, and further washed with cell culture medium to remove the detachment reagent. The cells were again washed with Dulbecco PBS and were fixed using 10 % paraformaldehyde solution in PBS for 30 min. The fixed cells were washed three times with PBS and further stored on 4 °C until analyzed.

Fluorescent Microscopy

Luna fluorescence cell counter (Logos Biosystems, Republic of Korea) was used for quantification of the cell population internalized with Oil red labelled nanoliposomes. Twelve microliters of the fixed cell suspension in PBS, was transferred on cell counting slide and inserted in the instrument. The counting was performed in fluorescent cell counting mode using the following parameters: red channel excitation 20, red channel threshold 5, cell size gating 3–60 μ m. The number of cells counted per run was 400–600 and the percent of cells with internalized nanoliposomes above the set threshold was calculated as an average of three counts.

Micro-Raman Spectroscopy

The micro-Raman spectra of the samples were collected on the LabRam 300 spectrometer (Horiba Jobin Yvon, USA) coupled to Olympus LMPlanFL confocal microscope by using the second harmonic of Nd:YAG laser (532 nm). The backscattered radiation (180° configuration) was analyzed with an 1800 lines / mm diffraction grating. Raman intensities were collected on a cooled CCD array detector. A long-distance $\times 50$ objective (N.A = 0.5) with a working distance of 10.6 mm was selected. The pinhole of 500 μ m and the slit of 100 μ m were selected. No attenuation filter was used and the laser power on samples (0.99 mW) was measured by LaserCheck TM Handheld Power Meter (Coherent Scientific, Australia). The acquisition time was 12 seconds, and the accumulation number (number of scans) was set to 10 for each spectral collection. The fixed cell samples were drop-added on a microscope slide, which was further air-dried to a dry film while the nanoliposomes (labeled and label-free) were scanned as freeze-dried samples.

RESULTS AND DISCUSSION

Two different detection strategies, including label-free and label-mediated, were developed to achieve accurate analysis of liposome internalization in brain microvascular endothelial hCmec/D3 cell line and to evaluate the capacity

Table 1. Z-average hydrodynamic diameter ($n = 3$), polydispersity index (PDI) and zeta potential of the analyzed nanoliposomes.

Sample	Z-average hD / nm \pm SD	$PDI \pm$ SD	ζ potential / mV \pm SD
Nanoliposomes	106.20 \pm 1.05	0.31 \pm 0.03	-18.03 \pm 1.52
Oil red labeled nanoliposomes	106.23 \pm 1.85	0.29 \pm 0.02	-20.38 \pm 1.36

of micro-Raman spectroscopy for direct detection of internalized liposomes without labels as well as detection of internalized oil red O labeled liposomes. Direct detection of internalized nanocarriers is increasingly attracting attention as it has the potential to simplify and accelerate testing of the toxicity and efficacy of nanocarriers. Introducing labels, which may enable specific detection without influencing physicochemical and biological properties of the nanocarriers, is also of specific interest for more accurate and rapid imaging of nanocarriers' biological fate.

Two types of nanoliposomes, non-labeled PEGylated lecithin/cholesterol and oil red O labeled PEGylated-lecithin/cholesterol liposomes, were prepared and the results from the Z-average hydrodynamic diameter (hD) ($n = 3$), polydispersity index (PDI) and zeta potential of nanoliposomes are presented in Table 1.

The results of zeta potential measurements, Z-average hD and PDI pointed to great resemblance between the prepared samples of labeled and non-labeled nanoliposomes. Similar parameters were measured one hour after incubation in biorelevant media used for cell culture internalization studies revealing minor differences, which confirmed their stability during the cell culture experiments.

To evaluate the internalization behavior of the nanoliposomes in the hCmec/D3 cells, an established fluorescence microscopy technique was employed using automated fluorescence cell counter capable of detecting Oil red O epifluorescence. After 4 h of exposure, Oil red O labelled nanoliposomes could be detected in 95.3 ± 4.2 % of the counted cells ($n = 3$). The Oil red O epifluorescence was clearly distinguishable from the background (Fig. 1, a and b). The cells were intact, and neither cell necrosis nor toxicity were evidenced considering the short incubation time. In addition, the presence of cell aggregates in the samples was minimal, indicating towards negligible errors in the automated cell counting (Fig. 1c).

The samples of labeled and non-labeled PEGylated-cholesterol/lecithin nanoliposomes, control hCmec/D3 cells and hCmec/D3 incubated with each of the samples (as described in the internalization experiments) (Fig 2, a–e) were measured and evaluated by micro-Raman spectroscopy.

The most prominent features in the Raman spectra of the hCmec/D3 cells (C) can be found in the C–H stretching region ($3100\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$) and the fingerprint region

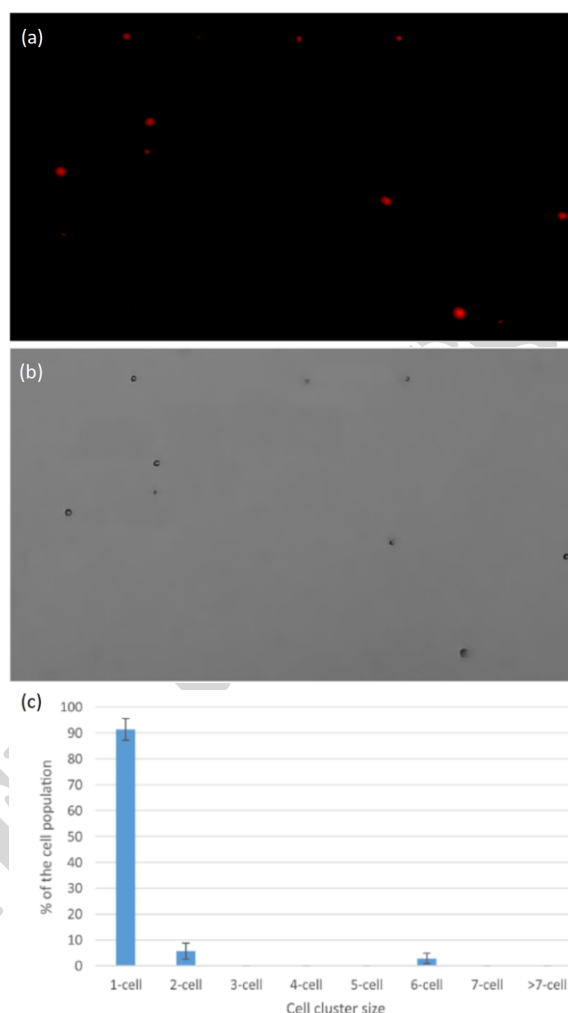


Figure 1. Microscopy image of hCmec/D3 cells after the internalization experiments with Oil red O labeled liposomes: (a) epifluorescence exposure; (b) phase contrast; (c) cluster size distribution of counted cell population.

($1700\text{--}900\text{ cm}^{-1}$) (Fig. 3, C). Details about the tentative band assignments are in agreement with the literature and are accordingly reported (Table 2). The Raman spectra of label-free liposomes (L), control cells (C) and cells incubated with internalized (label-free) liposomes (CL) are similar, but still exhibit notable spectral differences (Fig. 3). The assignment of the bands extracted from these spectra are reported in Table 2 (first three columns). The Raman spectra of the liposome containing samples (L and CL) present characteristic bands assigned to the vibrations of the lipid tails (methylene C–C skeletal stretching modes of the trans and gauche conformations in the acyl chains of the lipids)^[17] detected in the $1150\text{--}1030\text{ cm}^{-1}$ region with the strongest maximum at 1087 cm^{-1} and 1095 cm^{-1} in the L and CL spectrum, respectively). In addition, weak bands around

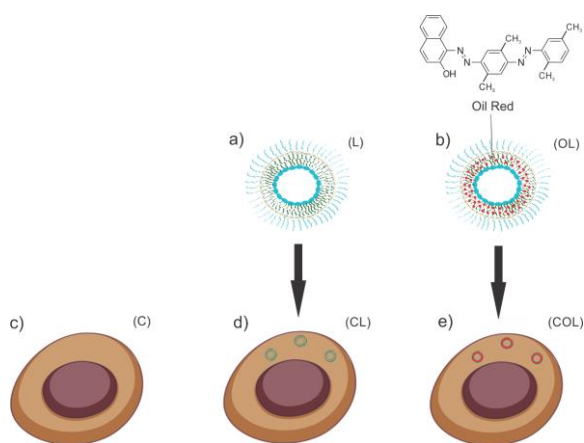


Figure 2. Schematic presentation of the experimental setup: (a) non-labeled PEGylated-cholesterol/lecithin nanoliposomes (L); (b) Oil Red O labeled PEGylated-cholesterol/lecithin nanoliposomes (OL); (c) control hCmec/D3 cells (C); (d) hCmec/D3 cells incubated with non-labeled PEGylated-cholesterol/lecithin nanoliposomes (CL); (e) hCmec/D3 cells incubated with Oil Red O labeled PEGylated-cholesterol/lecithin nanoliposomes (COL). The samples were further subjected to micro-Raman spectroscopy measurements.

1440 (L and CL) and 1300 cm^{-1} (L) from the CH_2 deformation modes^[18,19] (twist and bending mode, respectively) were registered. Despite their weak intensity, these spectral features are very informative because no overlap with the bands of other structural units occurred. The symmetric C=C bond stretching^[18] of cholesterol is manifested as a well-defined peak at 1657 (L) and 1656 cm^{-1} (CL). Three very prominent bands between 3100 and 2800 cm^{-1} are very important. Namely, the band at 2854 cm^{-1} (L and CL) and the bands at 2895 (L) and 2878 cm^{-1} (CL) are assigned to asymmetric and symmetric C-H methylene stretching, respectively.^[19] Symmetric C-H stretching band of terminal methyl groups evolved at 2925 (L) and 2932 cm^{-1} (CL). The peak at 3015 cm^{-1} is attributed to the choline methyl asymmetric stretching mode and to Ar(C-H) stretching vibrations.^[18,20] Both, the methylene C-C stretching and the methylene C-H stretching regions are good indicators of the liposome membrane order.^[19,21,22] Spectral regions of 3000-2750 cm^{-1} ; 1180-1000 cm^{-1} ; 1300-1200 cm^{-1} ; and 1500-1400 cm^{-1} , might also carry information about the PEG moieties (symmetric and antisymmetric stretching of PEG's methylene group);^[22] C-O-C vibrations of polyethylene glycol chains trans and gauche conformation,^[23,24] CH_2 twisting vibrations;^[18,22] and CH_2 - CH_2 symmetric and antisymmetric bending vibrations,^[25] respectively. Many of these bands in the spectra of liposome containing samples (L and CL) overlap with phospholipid vibrations and cannot be clearly distinguished.

Oil red O is a lysochrome diazo dye that stains neutral triglycerides, fatty acids, cholesterol esters and some lipoproteins, and is used to monitor and understand physiological and pathophysiological events in lipid metabolism as well as excessive accumulation of lipids in tissues and cells as a key feature of several metabolic diseases.^[26,27] Despite their high lipophilicity and preference for neutral lipids such as triglycerides and cholesterol esters, due to its amphiphilic properties and presence of polar groups, -OH and -N=N-, oil red O may also interact with the polar head groups of phospholipid and cholesterol molecules from the liposome bilayer, and therefore can be utilized to improve their visualization. Oil red O is often preferred over Sudan red IV dye due to more intense staining offering improved visualization capabilities, while maintaining similar physico-chemical properties and staining capacity.^[28]

Only sparse data exists regarding the labeling of liposomes with Sudan red dyes.^[29] Li *et al.* in 2007 pointed to the existence of hydrophobic interaction among Sudan IV and acyl chains of phosphatidylcholine, as well as to formation of hydrogen bonds with the lecithin head groups. More structurally complicated molecules from the Sudan red family dyes, with larger number of polar and lipophilic groups, like Oil red O, would potentially form more stable non-covalent bond complexes, which cannot be easily reversed. Further, larger molecules with greater steric effect will contribute to a lesser number of molecules internalized in the phospholipid bilayer. In that respect, it was calculated by the Langmuir isothermal equation that 314 lecithin molecules bind to one Sudan IV molecule, compared to 31 lecithin molecules bound to one Sudan II molecule in the Sudan red liposome complex, due to a lesser steric effect of Sudan II dye.^[29] Compared to Sudan red IV, Oil red O molecule contains one additional methyl group in the para position in benzene, and is used as a lecithin/cholesterol liposome label that would result in a formation of a very stable non-covalent complex.

Our results confirmed the stability of the created oil red O PEGylated-lecithin/cholesterol liposome complex as there was no free dye present in the eluate after 7 days of storage (Fig. S1). This was expected, as once entrapped in the lipid phase the partitioning out of Oil red O is unfavorable due to the dye's very low aqueous solubility. As expected, the most prominent bands (Table 2; Fig. 4 in the Raman spectra of Oil red O emerged at 1228 cm^{-1} (naphthyl group C-O vibration and CCH scissoring bending of naphthalene ring),^[30] 1377 cm^{-1} (N=N stretching vibration),^[30,31] 1479 cm^{-1} (CH_3 bending asymmetric and symmetric),^[32] and 1581 cm^{-1} (C-C stretching vibrations from the aromatic rings and N=N stretching vibration).^[30] The Oil red O labeled liposome spectra resemble the Raman spectra of free analogues and all spectral bands of the Oil red O also appear in the Raman spectra of dye labeled liposomes

Table 2. Tentative assignment of the bands observed in the Raman spectra of: non-labeled PEGylated-cholesterol/lecithin nanoliposomes (L), hCmec/D3 control cells (C), hCmec/D3 cells incubated with non-labeled PEGylated-cholesterol/lecithin nanoliposomes (CL), Oil Red O (O), Oil Red O labeled PEGylated-cholesterol/lecithin nanoliposomes (OL), hCmec/D3 incubated with Oil Red O labeled PEGylated-cholesterol/lecithin nanoliposomes (COL).

L	C	CL	O	OL	COL	Assignment
3015 m						NCH ₃ choline asymmetric stretch ^[18] and Ar(C–H) stretchings ^[20]
2925 vs	2937 vs	2932 s			2938 m	CH ₃ asymmetric stretch and CH ₂ asymmetric stretch ^[19,35]
2895 s	2878 s	2878 s				CH ₂ symmetric stretch and CH stretch of lipids and proteins ^[19]
2854 s	2854 sh	2854 sh				
1657 m	1655 m	1656 w				C=C symmetric stretch, cholesterol ^[18]
			1607 m	1609 w	1609 w	v(C–N) stretching in C=C–N=N ^[32]
			1581 m	1580 m	1580 w	C–C stretching vibrations from the aromatic rings and N=N stretching vibration ^[30]
1499 m		1481sh				CH ₂ deformation mode, cholesterol ^[18]
			1479 m	1481 m	1480 m	CH ₃ bending asymmetric and symmetric ^[31]
	1459 m	1455 m			1461 m	Uracil, cytosine ring stretching, CH deformations ^[44]
			1458 m	1453 sh	1447/1446 m	C–H in plane bending of extra benzene ring ^[38]
1440 vw		1446 vw				CH ₂ bend (lecithin + cholesterol) ^[19]
			1377 s	1377 s	1377 s	N=N stretching vibration and C–H in plane bending, CH ₃ -Phenyl ^[31]
1369 w		1375 w				Amide III random coils ^[39]
1338 w		1339 w				CH ₂ /CH ₃ wagging & twisting mode in collagen, nucleic acid & tryptophan ^[40]
			1338 m	1338 w	1338 m	CH bending ^[38]
1298 w						CH ₂ twist ^[19]
	1266 vw				1253 vw	CH bending ^[38]
	1233 w					Amide III β-sheet ^[39]
		1227 w				Amide III random coils ^[39]
			1228 vs	1225 vs	1227 s	C–O stretching vibration and CCH scissoring bending of naphthalene ring ^[30]
			1203 m	1203 sh	1203 sh	CH bend oil red, δ(CH) ^[38,41]
			1188 m	1187 sh	1189 sh	CH bend oil red, δ(CH) + v(C–N _{azo}) ^[41,42]
					1151 w	v(C–N _{azo}), δ(CH) ^[41,42]
	1124 w					C–C stretching mode of lipids, trans conformers ^[19]
	1099 w					C–C stretch lipids, Isolated gauche conformers ^[19,43]
1087 s		1095 s				C–C stretch lipids region (lecithin), Isolated gauche conformers ^[17]
			1094 m	1095 m	1095 m	Aromatic CH bending in plane, δ(CH) ^[32]
	1066 w					Out of phase trans conformers, In phase trans conformers ^[17]
	1001 m	1001 w				Phenylalanine, C–C aromatic ring stretching ^[17]
			983 w	983 w	985 w	=N-Phenyl stretching ^[41]
981 m		981 m				O–C–N ⁺ stretching choline ^[17]
	935 m					C–C stretching mode of proline & valine & protein backbone (α-helix)/glycogen (protein assignment) ^[17]
	573 vw					Skeletal ring modes, Tryptophan/cytosine, guanine ^[43]
	481 w					out of plane ring deformations, guanine ^[44]

Intensity codes: s – strong, m – medium, w – weak, sh – shoulder, v – very.

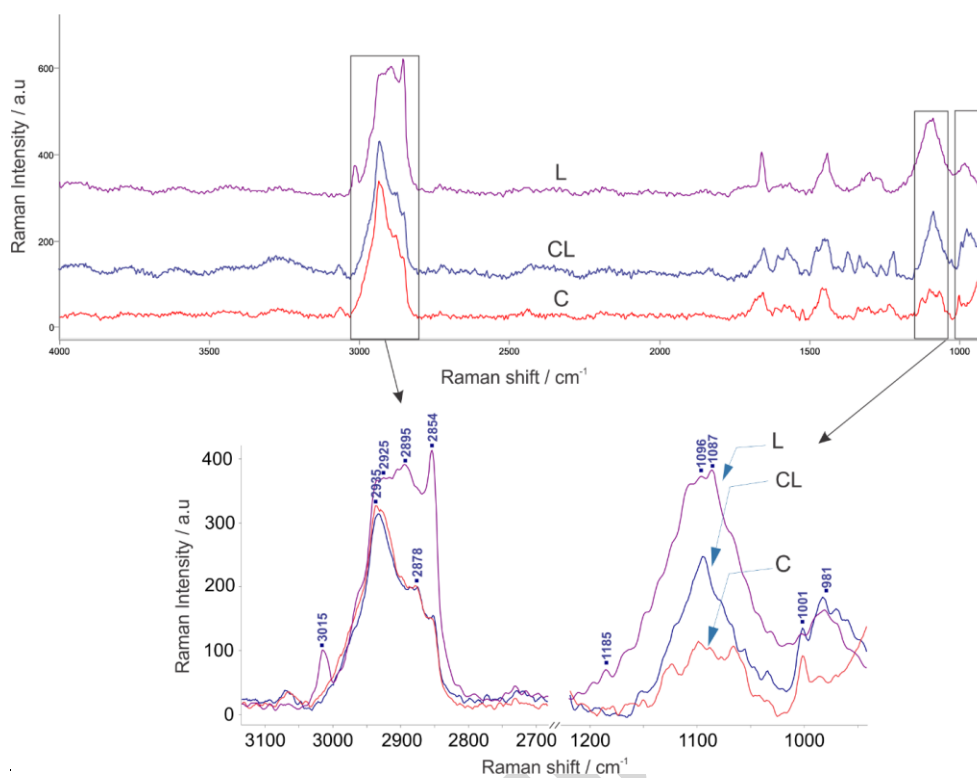


Figure 3. Raman spectra of: label-free liposomes (L); cells incubated with label-free liposomes (CL); and control cells (C) (top panel). The spectral regions of interest are marked by rectangles and further zoomed in and overlaid for better visualization (bottom panel).

(Table 2; Fig. 4). Changes in relative intensities of characteristic peaks (red shift of C–O stretching vibration from 1228 to 1225 cm^{-1} , abrupt decrease in the intensity of CH_3 deformation band at 1203 cm^{-1} and appearance of a new very

weak peak at 1253 cm^{-1} (CH bendings), observed in the labeled liposome (OL) spectra might be due to the interaction and orientation of oil red O molecules within the phospholipid bilayer.^[29] In the Raman spectra of the cells incubated with oil red O labeled liposomes (COL) the internalization of the nanoparticles can be detected by several distinct peaks, of which two are the prominent and are not present in the label-free spectra (Table 2; Fig. 4; Fig. 5), namely C–O stretching vibration and CCH scissoring bending of naphthalene ring^[30] at 1227 cm^{-1} and N=N stretching vibration at 1377 cm^{-1} .

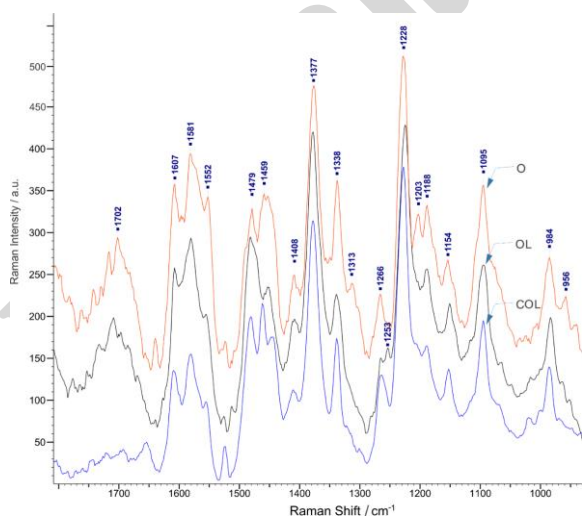


Figure 4. Raman spectra of Oil Red O (O); Oil Red O labeled liposomes (OL); and cells incubated with Oil Red O labeled liposomes (COL).

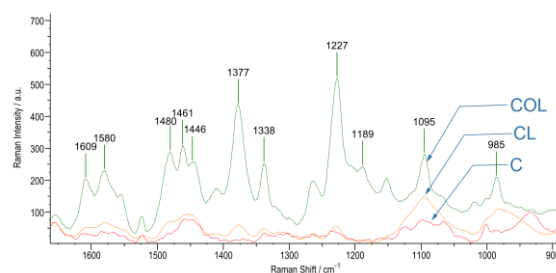


Figure 5. Raman spectra of control cells (C); cells incubated with label-free liposomes (CL); and cells incubated with Oil Red O labeled liposomes (COL).

Although the resulting Raman spectra of the cells with internalized liposomes comprise superposition of bands from various cellular components and internalized structures within the focal volume, based on the differences among the spectra arising from non-labeled liposomes, free cells and the cells with internalized liposomes, several assumptions relevant to the internalization procedure are emphasized. Literature data point to potential differences in the spectra of the cells when performing spontaneous Raman spectra of different cellular regions due to heterogenous chemical distribution within a cell at different locations. One spot spectrum and univariate analysis cannot find an effective solution to this problem, and in order to record interpretable, repeatable, reproducible and comparable spectra, the measurements were conveyed under similar experimental conditions and spots inside the cell. In addition, the spectral region of the vibrations from the symmetric stretching of CH_3 (2935 cm^{-1}) and CH_2 (2854 cm^{-1}) and their intensities were evaluated to assume the proper focusing spot for the measurements (Fig. 3 and Table 2). Namely, space resolved Raman spectra of contrasting lipid rich regions (lipid bodies, cleavage furrow)^[13,34] and the cytoplasm pointed to the augmented intensity of the bands around 2850 cm^{-1} with increased lipid concentration in the lipid bilayer of the plasma membrane as opposed to decrease of its band intensity in the cytoplasm spectrum. Also, the symmetric stretching bands of CH_3 (2935 cm^{-1}) and CH_2 (2854 cm^{-1}) are much more intense in lipid rich regions than in the cytoplasm due to a lower density of CH_2 groups in proteins compared to lipids. Considering this effect, it can be assumed that the recorded spontaneous Raman spectra and the respective bands in our experiments arise from the region of the cytoplasm.^[13,34] As expected, the bands in the spectral region of the symmetric CH_3 stretchings (2935 cm^{-1}) and CH_2 stretchings (2854 cm^{-1}) are much more intense in the spectrum of the liposomes compared to the collected spectra of either the cells incubated with liposomes or control cells (Fig. 3).

The label-free spectra of the hCmec/D3 cells (C), the liposomes (L), and the cells incubated with liposomes (CL) showed distinct variations in the region $1150\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$ (C–C stretch of lipids) (Fig. 3). The cell spectrum exhibits three distinct peaks at 1066 cm^{-1} , 1099 cm^{-1} and 1124 cm^{-1} (Table 2). The peaks at 1066 cm^{-1} and 1124 cm^{-1} are assigned as out of phase and in phase trans conformers (so called trans markers) while the peak at 1099 cm^{-1} is tentatively assigned to appear from the gauche conformer.^[19] The C–C stretching region in the liposome (L) presented by a broad peak centered at 1087 cm^{-1} indicates a larger gauche content and probable superposition with the trans indicators. Further, the spectra of cells incubated with liposomes (CL) distinguishes itself from the spectra of the control cells (C) by the presence of a much more prominent gauche

conformer band which expands toward lower and higher wavenumbers resembling the band in the liposomes.

Another important feature is a rather strong signal at 981 cm^{-1} in the spectra of the cells incubated with liposomes (CL), associated with O–C–N⁺ stretching vibrations of the polar head groups^[17] (Fig. 3 and Table 2). This key band characteristic for phosphatidylcholine/cholesterol liposomes may be important for studying their internalization due to the absence of the strong signals associated with the vibrations of the choline head groups in the spectra of the control cells. The C–N stretching vibration is not pure and depends upon the conformation of the O–C–N⁺ backbone, hence, samples with different conformation can be differentiated. Cholesterol symmetric C=C stretching band^[18] appeared in the spectra of all three samples: the liposomes (1657 cm^{-1}), control cells (1655 cm^{-1}) and cells incubated with liposomes (1655 cm^{-1}) (Fig. 3 and Table 2).

CONCLUSION

Raman spectroscopy is a versatile characterization technique that could be employed in almost every stage of the development and production of drug delivery systems. Herein, we demonstrated its capability for detection of label and label-free nanoliposomal carriers in an hCmec/D3 *in vitro* cell culture experiments that constitute an established *in vitro* BBB model, which is an important tool in the early phase of the development of drug delivery systems.

Eliminating the post-processing procedure, as labeling of drug-delivery carriers in such experiments, presents significant advantage both in sparing resources and preserving the original chemical and physical properties of the carrier surface. The data from our experiments clearly pointed out the unique Raman spectral features for detecting both labeled and label-free nanoliposomal carriers located inside the cells, which is very important taking into consideration the complexity of the matrix (cell environment) and the chemical similarity among the liposomal carriers and certain cell components. The valuable data gathered from this study could be further used in conjunction with multivariate analysis for label-free intracellular localization or quantitative cellular uptake of nano-sized drug delivery systems.

Acknowledgment. This work was part of a research project financed by Faculty of Pharmacy, Ss. Cyril and Methodius University in Skopje.

Supplementary Information. Supporting information to the paper is attached to the electronic version of the article at: <http://doi.org/10.5562/cca3912>.

PDF files with attached documents are best viewed with Adobe Acrobat Reader which is free and can be downloaded from [Adobe's web site](http://www.adobe.com).

REFERENCES

- [1] M. E. Keating, H. J. Byrne, *Nanomedicine* **2013**, *8*, 1335–1351.
[http://doi: 10.2217/nnm.13.108](http://doi:10.2217/nnm.13.108)
- [2] G. Bozzuto, A. Molinari, *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 975–999.
[http://doi: 10.2147/IJN.S68861](http://doi:10.2147/IJN.S68861)
- [3] B. Yu, H. C. Tai, W. Xue, L. J. Lee, R. J. Lee, *Mol. Membr. Biol.* **2010**, *27*, 286–298.
[http://doi: 10.3109/09687688.2010.521200](http://doi:10.3109/09687688.2010.521200)
- [4] K. M. Aguilar-Pérez, J. I. Avilés-Castrillo, D. I. Medina, R. Parra-Saldivar, H. M. N. Iqbal, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, Article 579536.
[http://doi: 10.3389/fbioe.2020.579536](http://doi:10.3389/fbioe.2020.579536)
- [5] S. Vranic, N. Boggetto, V. Contremoulins, S. Mornet, F. Marano, A. Squiban, S. Boland, *Part. Fibre Toxicol.* **2013**, *10*, 1–16.
[http://doi: 10.1186/1743-8977-10-2](http://doi:10.1186/1743-8977-10-2)
- [6] A. Ostrowski, D. Nordmeyer, A. Boreham, C. Holzhausen, L. Mundhenk, C. Graf, M. C. Meinke, A. Vogt, S. Hadam, J. Lademann, E. Ruhl, U. Alexiev, A. D. Gruber, *Beilstein J. Nanotechnol.* **2015**, *6*, 263–280. [http://doi: 10.3762/BJNANO.6.25](http://doi:10.3762/BJNANO.6.25)
- [7] A. L. Robson, P. C. Dastoor, J. Flynn, W. Palmer, A. Martin, D. W. Smith, A. Woldu, S. Hua, *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, Article 80.
[http://doi: 10.3389/FPHAR.2018.00080](http://doi:10.3389/FPHAR.2018.00080)
- [8] H. C. Ishikawa-Ankerhold, R. Ankerhold, G. P. C. Drummen, *Molecules* **2012**, *17*, 4047–4132.
[http://doi: 10.3390/MOLECULES17044047](http://doi:10.3390/MOLECULES17044047)
- [9] U. S. Huth, R. Schubert, R. Peschka-Süss, *J. Controlled Release* **2006**, *110*, 490–504.
[http://doi: 10.1016/J.JCONREL.2005.10.018](http://doi:10.1016/J.JCONREL.2005.10.018)
- [10] H. J. Byrne, F. Bonnier, E. Efeoglu, C. Moore, J. McIntyre, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, Article 544311. [http://doi: 10.3389/FBIOE.2020.544311](http://doi:10.3389/FBIOE.2020.544311)
- [11] K. Majzner, A. Kaczor, N. Kachamakova-Trojanowska, A. Fedorowicz, S. Chlopicki, M. Baranska, *Analyst* **2013**, *138*, 603–607.
[http://doi: 10.1039/c2an36222h](http://doi:10.1039/c2an36222h)
- [12] C. Matthäus, C. Matthaus, T. Chernenko, C. Stiebing, L. Quintero, M. Miljković, L. Milane, A. Kale, M. Amiji, S. Lorkowski, V. Torchilin, J. Popp, M. Diem, *Springer Ser. Surf. Sci.* **2018**, *66*, 273–305.
[http://doi: 10.1007/978-3-319-75380-5_13](http://doi:10.1007/978-3-319-75380-5_13)
- [13] G. Romero, E. Rojas, I. Estrela-Lopis, E. Donath, S. E. Moya, *Nanoscale Res. Lett.* **2011**, *6*, 1–4.
[http://doi: 10.1186/1556-276X-6-429](http://doi:10.1186/1556-276X-6-429)
- [14] D. Shalabalija, L. Mihailova, M. Simonoska Crcarevska, I. Cvetković Karanfilova, V. Ivanovski, A. Kapedanovska Nestorovska, G. Novotni, M. Glavas Dodov, *J. Drug Delivery Sci. Technol.* **2021**, *63*, Article 102434. [http://doi: 10.1016/J.JDDST.2021.102434](http://doi:10.1016/J.JDDST.2021.102434)
- [15] M. R. Mozafari, M. H. Zareie, E. Piskin, V. Hasirci, *Drug Delivery* **2009**, *5*, 135–141.
[http://doi: 10.3109/10717549809031389](http://doi:10.3109/10717549809031389)
- [16] S. Mourtas, A. N. Lazar, E. Markoutsas, C. Duyckaerts, S. G. Antimisiaris, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *80*, 175–183. [http://doi: 10.1016/J.EJMECH.2014.04.050](http://doi:10.1016/J.EJMECH.2014.04.050)
- [17] V. Živanović, A. Milewska, K. Leosson, J. Kneipp, *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 10106–10113.
[http://doi: 10.1021/acs.analchem.1c00964](http://doi:10.1021/acs.analchem.1c00964)
- [18] R. Tantipolphan, T. Rades, C. J. Strachan, K. C. Gordon, N. J. Medicott, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *41*, 476–484.
[http://doi: 10.1016/J.JPBA.2005.12.018](http://doi:10.1016/J.JPBA.2005.12.018)
- [19] C. B. Fox, R. H. Uibel, J. M. Harris, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 11428–11436.
[http://doi: 10.1021/JP0735886](http://doi:10.1021/JP0735886)
- [20] A. Fujii, E. Fujimaki, T. Ebata, N. Mikami, *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 6275–6284.
[http://doi: 10.1063/1.481272](http://doi:10.1063/1.481272)
- [21] B. P. Gaber, P. Yager, W. L. Peticolas, *Biophys. J.* **1978**, *21*, 161–176.
[http://doi: 10.1016/S0006-3495\(78\)85516-7](http://doi:10.1016/S0006-3495(78)85516-7)
- [22] R. K. Bista, R. F. Bruch, University of Nevada, Reno, **2009**. Accessed: Jan. 22, 2022. [Online]. Available: <https://scholarworks.unr.edu/handle/11714/4046>
- [23] V. V. Kuzmin, V. S. Novikov, L. Y. Ustyniuk, K. A. Prokhorov, E. A. Sagitova, G. Y. Nikolaeva, *J. Mol. Struct.* **2020**, *1217*, 128331.
[http://doi: 10.1016/J.MOLSTRUC.2020.128331](http://doi:10.1016/J.MOLSTRUC.2020.128331)
- [24] Z. Varga, J. Mihály, S. Berényi, A. Bóta, *Eur. Polym. J.* **2013**, *49*, 2415–2421.
[http://doi: 10.1016/J.EURPOLYMJ.2013.02.025](http://doi:10.1016/J.EURPOLYMJ.2013.02.025)
- [25] D. Yamini, G. D. Venkatasubbu, J. Kumar, V. Ramakrishnan, *Spectrochim. Acta, Part A* **2014**, *117*, 299–303. [http://doi: 10.1016/J.SAA.2013.07.064](http://doi:10.1016/J.SAA.2013.07.064)
- [26] T. Rizk, C. Montero-Menei, C. Jollivet, J. P. Benoit, P. Menei, *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2004**, *68*, 360–364. [http://doi: 10.1002/JBM.A.20060](http://doi:10.1002/JBM.A.20060)
- [27] N. A. Kraus, F. Ehebauer, B. Zapp, B. Rudolphi, B. J. Kraus, D. Kraus, *Adipocyte* **2016**, *5*, 351–358.
[http://doi: 10.1080/21623945.2016.1240137](http://doi:10.1080/21623945.2016.1240137)
- [28] J. Thomas Bell, *Stain Technol.* **2009**, *34*, 219–221.
[http://doi: 10.3109/10520295909114678](http://doi:10.3109/10520295909114678)
- [29] L. Li, H. W. Gao, J. R. Ren, L. Chen, Y. C. Li, J. F. Zhao, H. P. Zhao, Y. Yuan, *BMC Struct. Biol.* **2007**, *7*, 1–9.
[http://doi: 10.1186/1472-6807-7-16](http://doi:10.1186/1472-6807-7-16)
- [30] Y. Ou, T. Ou, L. Pei, K. Lai, Y. Huang, B. A. Rasco, X. Wang, Y. Fan, *Food Anal. Methods* **2016**, *103*, 565–574.
[http://doi: 10.1007/S12161-016-0618-Z](http://doi:10.1007/S12161-016-0618-Z)
- [31] B. Çatıkkaş, *Period. Eng. Nat. Sci.* **2017**, *5*, 237–244.
[http://doi: 10.21533/pen.v5i2.139](http://doi:10.21533/pen.v5i2.139)

- [32] S. Dhakal, W. F. Schmidt, M. Kim, X. Tang, Y. Peng, K. Chao, *Foods* **2019**, *8*, Article 143.
<http://doi: 10.3390/FOODS8050143>
- [33] J. Coates, *Encyclopedia of Analytical Chemistry Vol. 12*. John Wiley & Sons, Ltd, Sep. 15, **2001**.
<http://doi: 10.3109/09687688.2010.521200>
- [34] J. F. Hsu, P. Y. Hsieh, H. Y. Hsu, S. Shigeto, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–8. <http://doi: 10.1038/srep17541>
- [35] C. J. Frankt, R. I. Mccreey, D. C. B. Redd, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 7–26. <http://doi: 10.1021/ac00101a001>
- [36] N. Stone, C. Kendall, J. Smith, P. Crow, H. Barr, *Faraday Discuss.* **2004**, *126*, 141–157.
<http://doi: 10.1039/B304992B>
- [37] A. W. Auner J. C. Thomas, *Biochem. Anal. Biochem.* **2016**, *5*, Article 1000284.
<http://doi: 10.4172/2161-1009.1000284>
- [38] L. Pei, Y. Ou, W. Yu, Y. Fan, Y. Huang, K. Lai, *J. Nanomater.* **2015**, *2015*, Article 430925.
<http://doi: 10.1155/2015/430925.34>
- [39] I. Notingher, S. Verrier, S. Haque, J. M. Polak, L. L. Hench, *Biopolymers* **2003**, *72*, 230–240.
<http://doi: 10.1002/BIP.10378>
- [40] W. T. Cheng, M. T. Liu, H. N. Liu, S. Y. Lin, *Microsc. Res. Tech.* **2005**, *68*, 75–79.
<http://doi: 10.1002/JEMT.20229>
- [41] C. Chen, F. Peng, Q. Cheng, D. Xu, 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, 2010, pp. 1–4.
<http://doi: 10.1109/ICBBE.2010.5517260>
- [42] S. Dhakal, W. F. Schmidt, M. Kim, X. Tang, Y. Peng, K. Chao, *Foods* **2019**, *8*, Article 143.
<http://doi: 10.3390/FOODS8050143>
- [43] Z. Movasaghi, S. Rehman, I. U. Rehman, *Appl. Spectrosc. Rev.* **2007**, *42*, 493–541.
<http://doi: 10.1080/05704920701551530>
- [44] A. J. Hobro, M. Rouhi, E. W. Blanch, G. L. Conn, *Nucl. Acids Res.* **2007**, *35*, 1169–1177.
<http://doi: 10.1093/nar/gkm012>

Rosmarinic acid loaded PEGylated liposomes for treatment of Alzheimer's disease: influence of the formulation variables on vesicle properties

Dushko Shalabalija¹, Ljubica Cambuleva¹, Maja Simonoska Crcarevska¹, Ivana Cvetkovikj Karanfilova², Renata S. Raicki¹, Marija Glavas Dodov¹

¹ Ss. Cyril and Methodius University, Faculty of Pharmacy, Institute of Pharmaceutical Technology, Majka Tereza 47, 1000 Skopje, Macedonia, d_salabalija@hotmail.com

² Ss. Cyril and Methodius, Faculty of Pharmacy, Institute of Pharmacognosy, Majka Tereza 47, 1000 Skopje, Macedonia

INTRODUCTION

Aging and its related diseases are consequences of free radical damage to cellular molecules and the inability of endogenous antioxidants to counter balance these changes [Wang et al., 2014]. Also, the pathogenesis of several neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease, has been linked to a condition of oxidative stress [Polidori et al., 2007]. Different endogenous and exogenous molecules can provide an efficient protection against lipid peroxidation. Among the wide range of exogenous antioxidants, polyphenols constitute probably one of the most efficient classes of compounds against oxidative stress. However, low water solubility, poor absorption and extensive and rapid metabolism contribute to the low oral bioavailability of polyphenols [Chen et al., 2003]. These problems lead to the necessity of developing different drug delivery approaches. Among different carriers, liposomes can increase polyphenol solubility and stability, which translate into improved bioavailability and therapeutic benefit. However, for efficient BBB targeting and treatment of neurodegenerative diseases, liposomes should possess particle size <200 nm, neutral and sterically stabilized surfaces as well as prolonged blood circulation time.

The presented study focuses on the formulation optimization of the surface stabilized rosmarinic extract loaded liposomes for efficient treatment of Alzheimer's disease and their physicochemical and biopharmaceutical characterization.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Soybean lecithin (SL) was purchased from Vitalia, Macedonia. LIPOID PE 18:0/18:0-PEG 2000 (PEG) was kindly donated from Lipoid, Germany. Cholesterol (CH) and bovine serum albumin (BSA) were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Rosmarinic extract (RA-E) was a generous gift from the Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Skopje, Macedonia. All the other

chemicals and reagents were of the highest purity grade commercially available and used as received.

Methods

Preparation of liposomes

During the preliminary studies, one factor at a time variation experiments were performed with a rationale of determination of key formulation and process factors influencing vesicle properties. Optimized parameters were further used for formulation modification. Samples were prepared by the modified lipid film hydration technique [Cambuleva et al., 2016]. Briefly, required amounts of SL, CH and PEG (mass ratio SL:CH:PEG = 7.5:1:3, 9:1:1.5, 10:1:0.5, 10.25:1:0.25 and 10:1:0; samples 1-5 respectively) were dissolved in chloroform/methanol mixture 4:1 (v/v). Afterwards, the organic solvents were removed by evaporation under vacuum using a rotavapor (25 °C, 50 rpm; Buchi 215, Switzerland). Thus obtained dried lipid film was hydrated with aqueous phase, phosphate buffer pH 7.4, under three hydration steps: ultrasonication (50/60 Hz), vortexing and gentle shaking. Every step lasted 5 min and four cycles of hydration were performed. Obtained liposomes were submitted to high shear homogenization (24 000 rpm, 5 min; Ultra-Turrax T25, Ika-Werke, Germany) and were allowed to stand for 24 h at 4 °C. For preparation of drug loaded liposomes, RA-E (200 mg initially added) was dissolved in organic solvents mixture required for lipid phase formation (samples 1a-5a).

Liposome characterization

The morphology and the surface appearance of the prepared nanoliposomes (NLs) were examined by TEM (JEM-1400, Jeol, Japan).

Mean particle size (D_{50}) and particle size distribution (SPAN factor) of NLs were determined using laser diffractometry (Mastersizer 2000, Hydro 2000S, Malvern Instr. Ltd., UK).

In order to determine the drug loading (DL, mg drug/100 mg lipid) and encapsulation efficiency (EE%), the vesicle suspensions were subjected to centrifugal ultrafiltration

using Vivaspin 20, 1000 KDa (15 min, 4500 rpm, 4 washing cycles; Hettich, Rotofix 32, Germany). The concentration of the drug in the supernatants was determined by previously validated HPLC method [Cambuleva et al., 2016].

The protein adsorption studies were performed in order to determine the amount of adsorbed BSA on the surface of the blank NLs. Briefly, 150 µl aliquots of the prepared samples were incubated with 5 mg of BSA in 5 ml of phosphate buffer pH 7.4 for 1 h on shaking water bath (37 °C, 75 rpm). After adsorption, the unbound protein was separated by centrifugal ultrafiltration (15 min, 4000 rpm, 3 washing cycles). The adsorbed amount of BSA/mg lipid was calculated indirectly by determining the total amount of protein remaining in the filtrate by UV spectroscopy (595 nm; Bio-Rad's Model 3550-UV Microplate Reader) after reaction with Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, USA), based on the method of Bradford (microtiter plate protocol) and subsequent subtraction from the initial BSA amount.

In vitro release of RA-E from PEGylated NLs (3 ml) was carried out using simple dissolution cells with semi permeable membrane (MEMBRA-CEL dialysis tubing; Serva Feinbiochemica GmbH, Germany) in 30 ml of phosphate buffer pH 7.4 at 37±1 °C and 100 rpm. At regular time intervals, aliquots were taken and were replaced by an equal volume of pre-warmed fresh medium. The concentration of RA-E in each sample was assayed using HPLC method mentioned above. Dissolution data modeling was performed with DDSolver 1.0 program.

RESULTS AND DISCUSSION

The mean size of the prepared blank NLs was 109 to 134 nm with unimodal narrow size distribution. TEM images showed that all samples were with similar morphology and well-formed spherical shape (see Figure 1). The properties of RA-E loaded NLs are presented in Table 1.

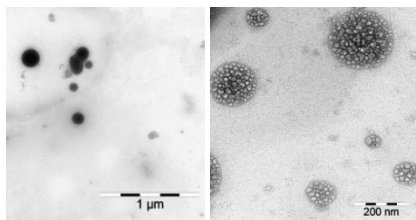


Figure 1. TEM images of PEGylated blank NLs

Concentration dependent pattern of BSA adsorption onto PEGylated NLs was observed (26.23, 26.57, 27.69 and 28.94% of adsorbed BSA for samples 1-4, respectively). Also, PEGylated formulations had considerable lower BSA adsorption onto their surface compared to non-PEGylated one (69.57% adsorbed BSA for sample 5). As the PEG concentration increased the protein adsorption onto NLs surface decreased, thus pointing to probable increment of steric stabilization and reduced surface-surface interactions favoring prolonged blood circulation time *in vivo*.

Samples	D ₅₀ (nm±SD)	SPAN factor	EE (%)	DL
1a	128 ± 1.58	1.32	74.77	2.22
2a	121 ± 0.42	1.83	75.94	2.25
3a	119 ± 1.76	1.52	82.26	2.53
4a	123 ± 2.22	1.63	89.55	2.26
5a	141 ± 2.53	2.83	88.00	2.73

Table 1. Physicochemical properties of PEGylated NLs

The drug release profiles of PEGylated NLs are presented in Figure 2. Obtained results pointed that prepared formulations were characterized with controlled drug release properties (35.55 - 56.27% for 48 h). Dissolution data modeling best fitted to Peppas-Sahlin kinetics.

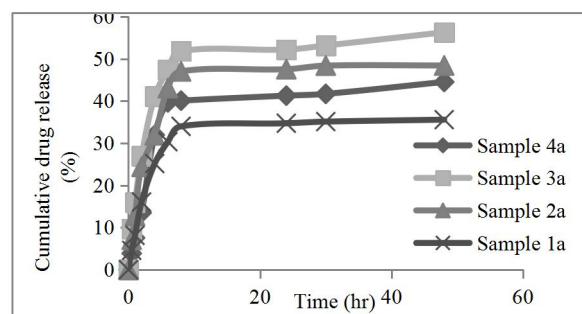


Figure 2. *In vitro* RA-E release from PEGylated NLs

CONCLUSION

In this study, RA-E loaded PEGylated NLs were prepared and characterized. Obtained results indicated the potential of formulations for RES recognition avoidance, prolonged blood circulation time and successful BBB targeting.

REFERENCES

- Cambuleva Lj., Shalabalija D., Cvetkovikj I., Simonoska-Crcarevska M., Glavas-Dodov M., Formulation and characterization of rosmarinic extract loaded PEGylated liposomes for brain delivery. *Maced. Pharm. Bull.* 62(suppl), 641-642 (2016).
- Chen J., Lin H., Hu M., Metabolism of flavonoids via enteric recycling: Role of intestinal disposition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304(3), 1228-1235 (2003).
- Polidori M.C., Griffiths H.R., Mariani E., Mecocci P., Hallmarks of protein oxidative damage in neurodegenerative diseases: focus on Alzheimer's disease. *Amino Acids* 32(4), 553-559 (2007).
- Wang X., Wang W., Li L., Perry G., Lee HG., Zhu X., Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1842(8), 1240-1247 (2014).

Influence of the surface properties of nanoliposomes on protein corona formation

Dushko Shalabaliija,^a Ljubica Cambuleva,^a Ivana C. Karanfilova,^b Maja S. Crcarevska,^a Krtistina Mladenovska,^a Vladimir Ivanovski,^c Marija Glavas Dodov^a

^a Institute of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University Ss. Cyril and Methodius, Majka Tereza 47, 1000, Skopje, R. Macedonia; ^b Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University Ss. Cyril and Methodius, Majka Tereza 47, 1000, Skopje, R. Macedonia; ^c Department of Chemistry, Faculty of Natural Science and Mathematics, University Ss. Cyril and Methodius, Arhimedova, 1000, Skopje, R. Macedonia.

Email of presenting author: d_salabaliija@hotmail.com

One of the biggest problems upon nanoparticles' administration *in vivo* is their interaction with blood proteins and the formation of the protein corona (PC), followed by the rapid recognition and uptake of the particles by the mononuclear phagocyte cells, thus leading to quick removal from the circulation. Therefore, understanding of the particle–PC complex formation is a prerequisite for successful development of drug carrier system and proper characterization is essential.

This problem could be partially overcome by the decoration of the particles' surface with polyethylene glycol (PEG) [1]. In order to investigate the effect of PEG on the PC formation, as well as to characterize the interaction, two formulations of nanoliposomes (NLs) (lechitin:cholesterol:PEG = 8.7:1:1.7 and 9:1:0.17 for *sample 1* and *2*, respectively) loaded with rosmarinic extract (RE) were prepared by the modified lipid film hydration technique [2]. Blank samples were prepared for comparison. The mean size of the prepared NLs was ~120 nm, with unimodal narrow size distribution and high encapsulation efficiency (~90%). *In vitro* release studies showed that the prepared vesicles had prolonged drug release properties (26 and 46% for 24h, for *sample 1* and *2*, respectively). The slower release of RE from *sample 1* could be probably due to the fast hydration process of the higher amount of PEG present on the surface of the vesicles. NLs–PC complex formation was confirmed using SDS-PAGE. Our previous investigations using Bradford assay confirmed that the PEG increases the hydrophilicity of the NLs surface thus resulting in reduced PC formation. These results were confirmed using FTIR and quantitative information of protein–NLs interactions was gained. From the obtained spectra it could be concluded that NLS-protein interaction was mainly due to the hydrogen bonds formed between C = O...N-H or C = O...H-OH. These interactions were stronger between the NLs prepared with lower PEG amount and the protein. Incorporation of RE into the NLs did not affect the intensity of the interactions.

1. M. Sangrà, J. Estelrich, R. Sabaté, A. Espargaró, M.A. Busquets, *Nanomaterials (Basel)*, **2017**, 7(2), 37.

2. Lj. Cambuleva, D. Shalabaliija, I. Cvetkovikj, M. Simonoska Crcarevska, M. Glavas Dodov, *Maced. Pharm. Bull.*, **2016**, 62(suppl), 641.

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 OC 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-

Lipid nano-carriers with herbal extracts for targeted brain delivery and treatment of CNS disorders

Dushko Shalabaliija^{*}, 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; neurotrophin 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 ($iA\beta 5$ - 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 (Lampteu 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.shalabaliija@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, gallic 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 (Shalabaliija 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>
- Shalabaliija, 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>



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-HT1A 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 thermostatted 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 (MEMBRACEL® 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 (NLO 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 Prism 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

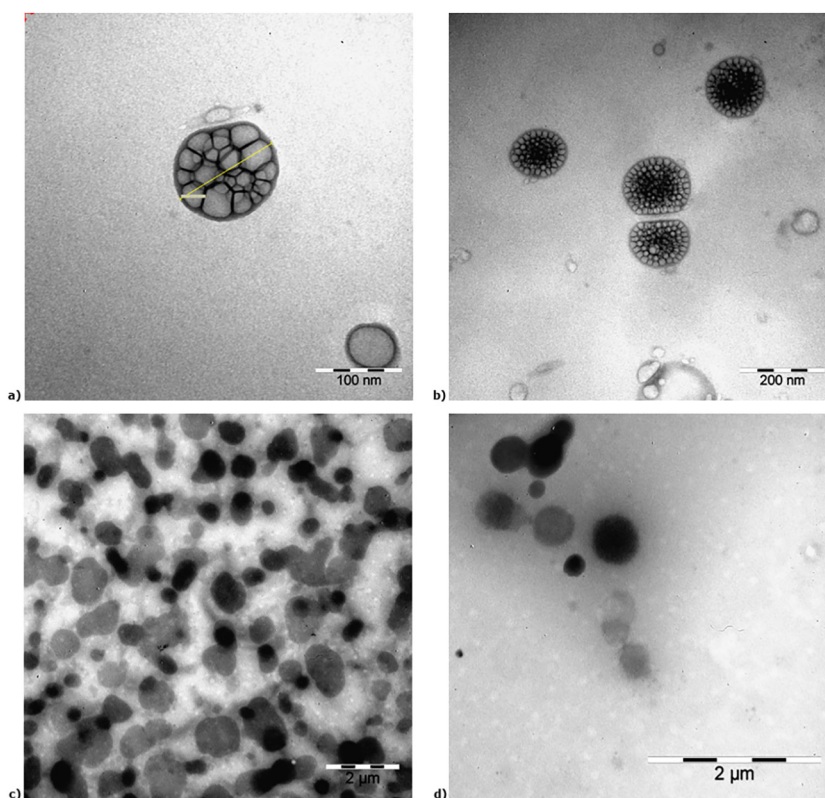


Fig. 1. TEM images of prepared formulations a) NL1; b) NL2; c) NLC1; d) NLC2.

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 h 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

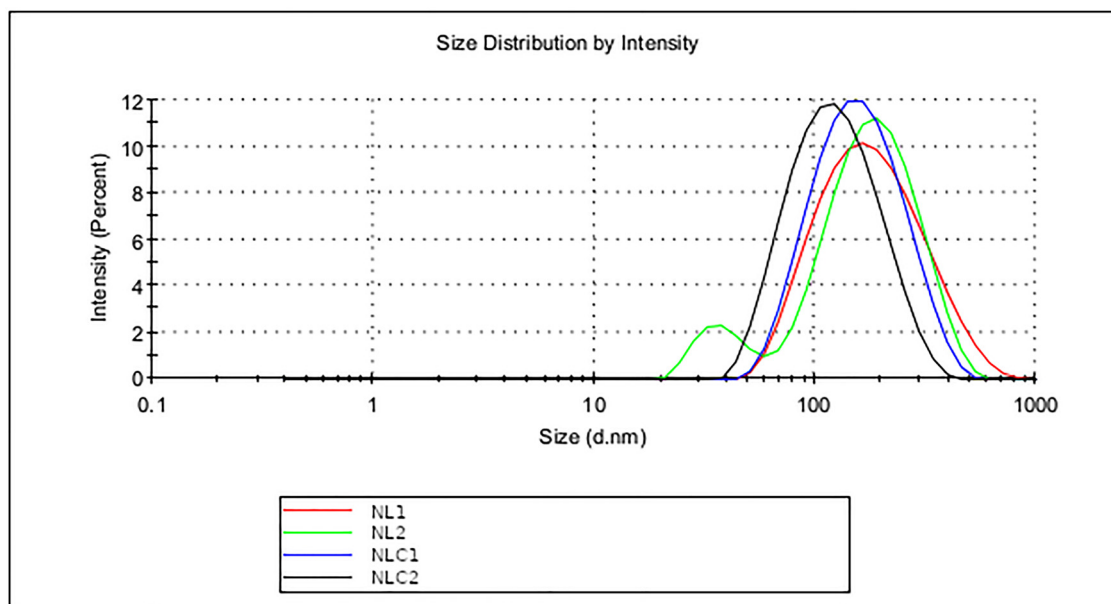


Fig. 2. Z-average diameter distribution plot of NL and NLC formulations.

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).

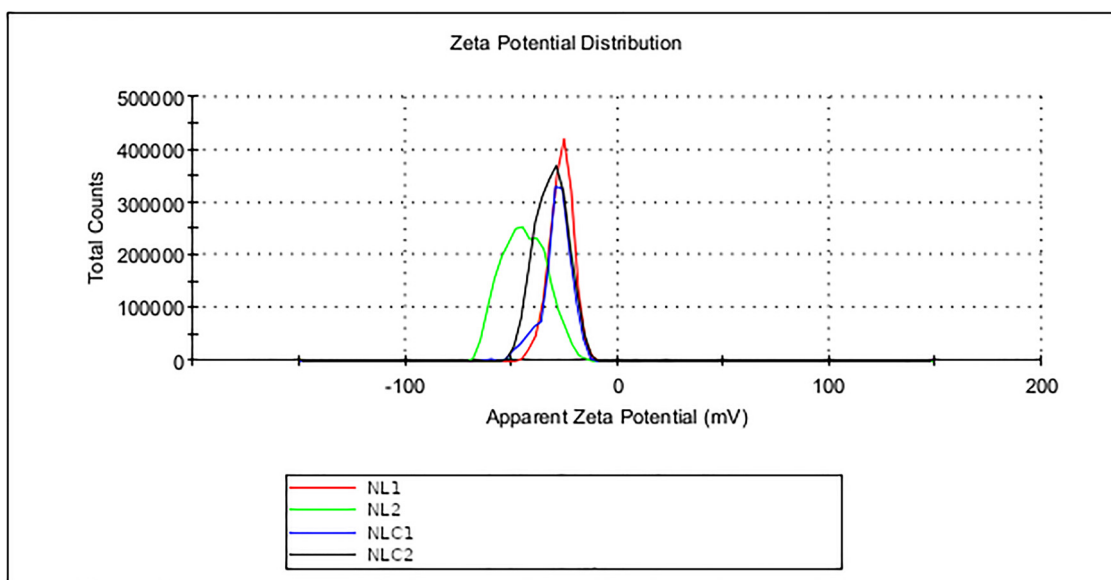


Fig. 3. Zeta potential distribution plot of NL and NLC formulations.

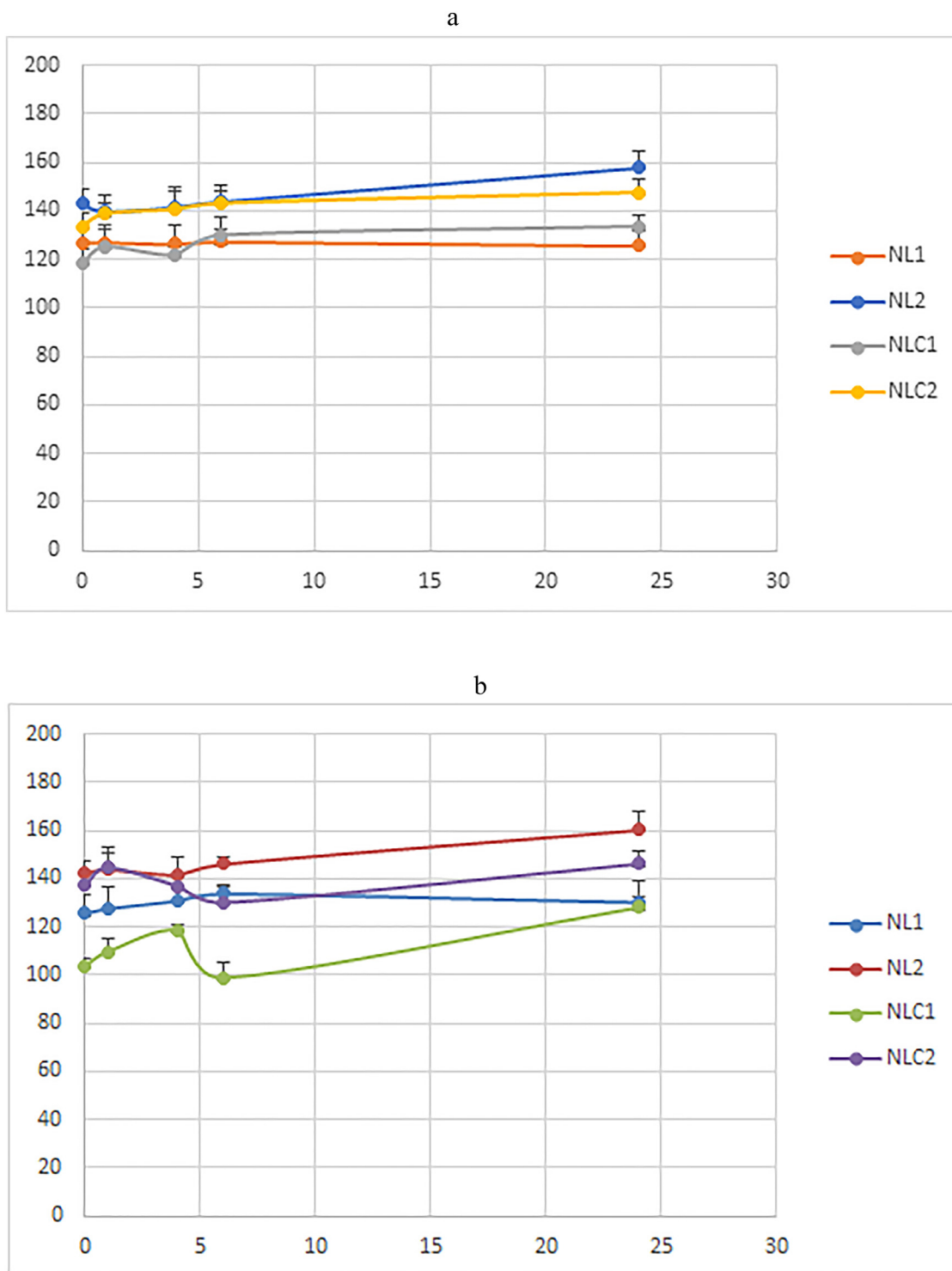


Fig. 4. a) Z-average diameter distribution plot of NL and NLC after 24 h incubation in a) phosphate buffer pH 7.4; b) human plasma.

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

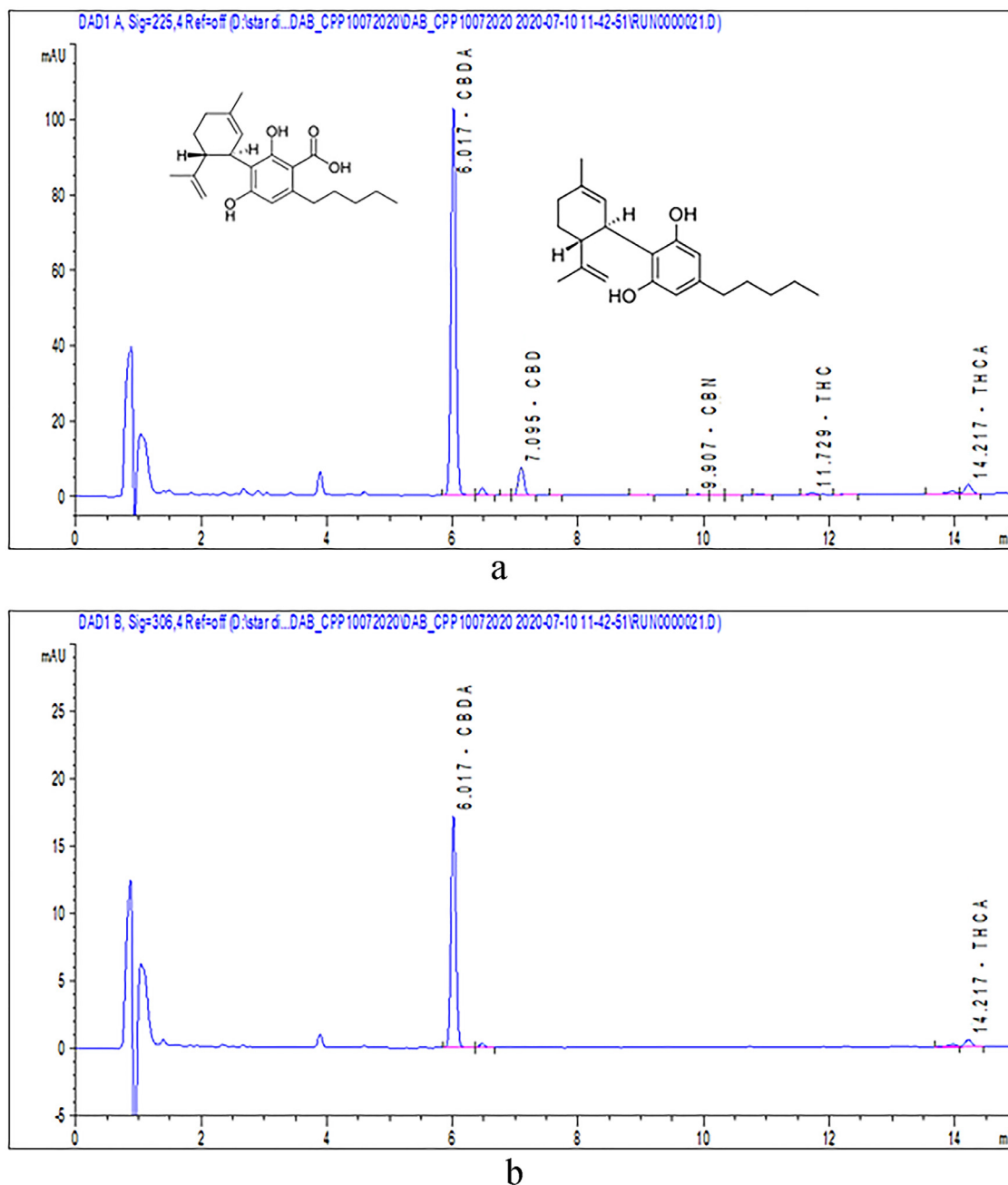


Fig. 5. Representative HPLC chromatogram of *Cannabis sativa* extract recorded at a) 225 and b) 306 nm for CBD and CBDA, respectively. The chemical structures which have been selected for quantitative analysis are presented in the slot; Standard mix recorded at c) 225 and d) 306 nm.

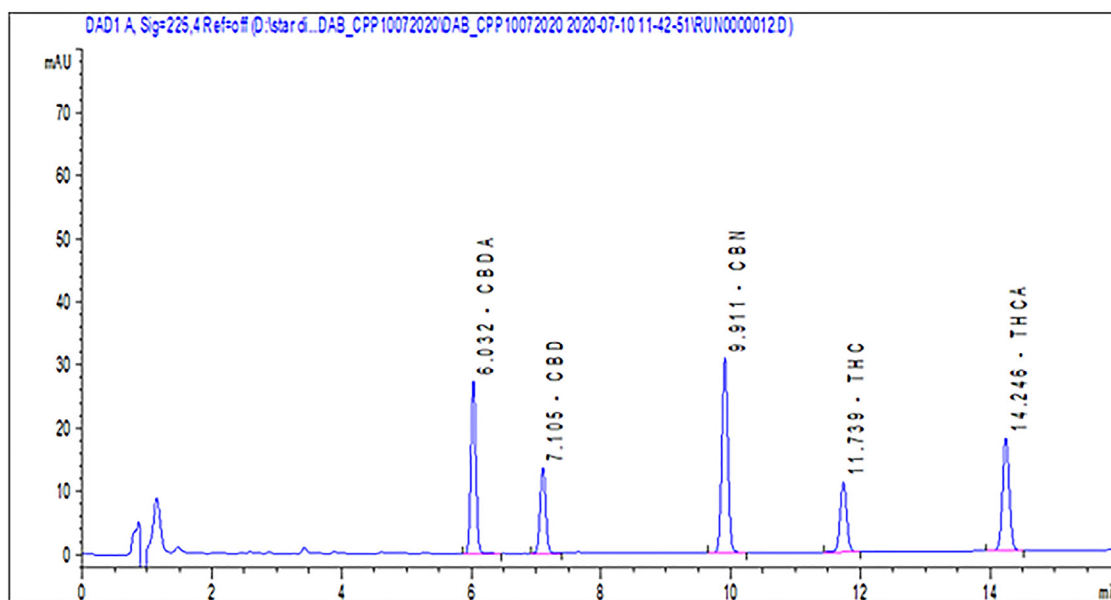
(bearing positive loading coefficient) where NL demonstrates lower antioxidant activity probably due to fewer interactions with the ROS generator (AAPH), needed to prevent the oxidation of the fluorescent probe, while the NLC demonstrates the opposite effect. However, these differences diminish as both 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,

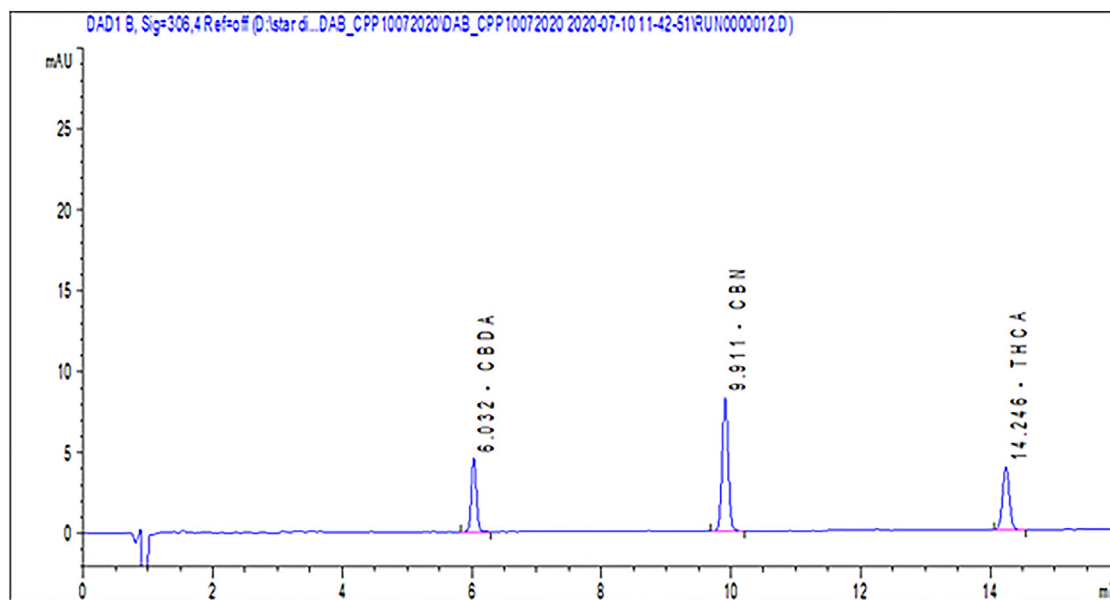
NLC1, NLC2 and their analogues without the polymer for steric stabilization. Namely, NL1, NL2, NLC1 and NLC2 formulations had shown higher antioxidant activity over time than NL01, NL02, NLC01 and NLC02 (93.47 ± 2.47 , 95.73 ± 1.02 , 95.13 ± 1.97 and 96.67 ± 1.65 , respectively), which is probably due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

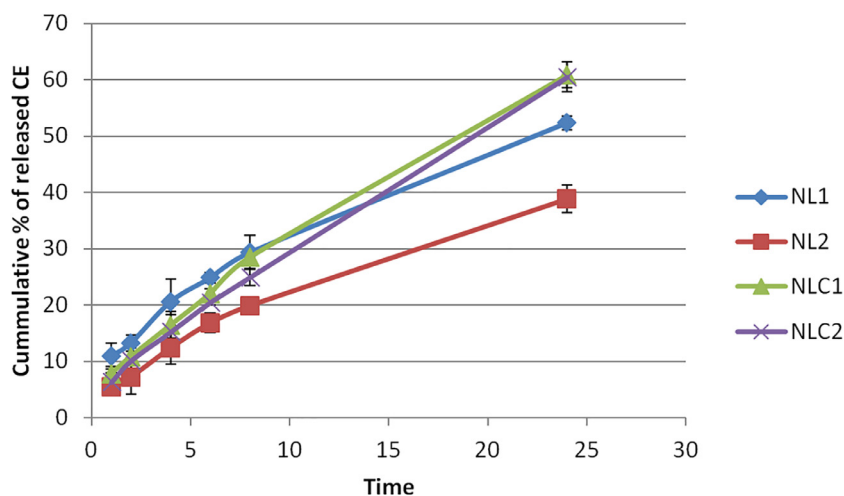


Fig. 6. *In vitro* release profile of CE loaded NL and NLC (n = 3) Fig. 2. 3D graphic representation of the influence of studied variables (SL and PEG) on absolute amount of encapsulated RA.

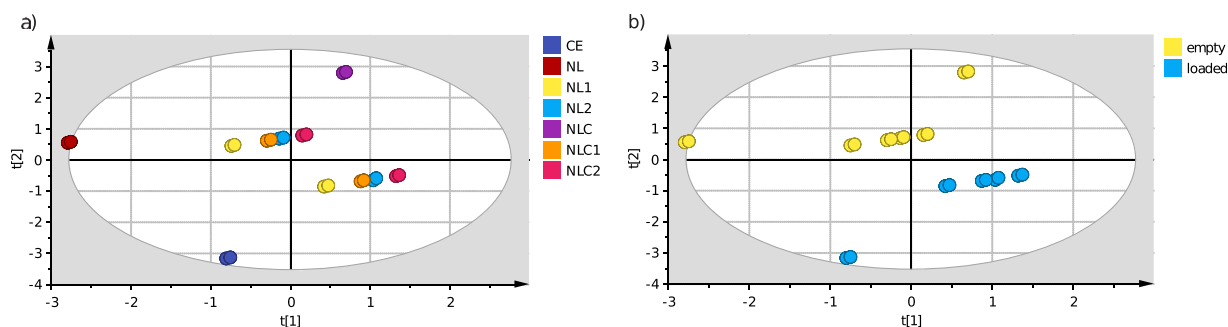


Fig. 7. Score scatter plot colored according to a) formulation type b) empty/loaded formulations.

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

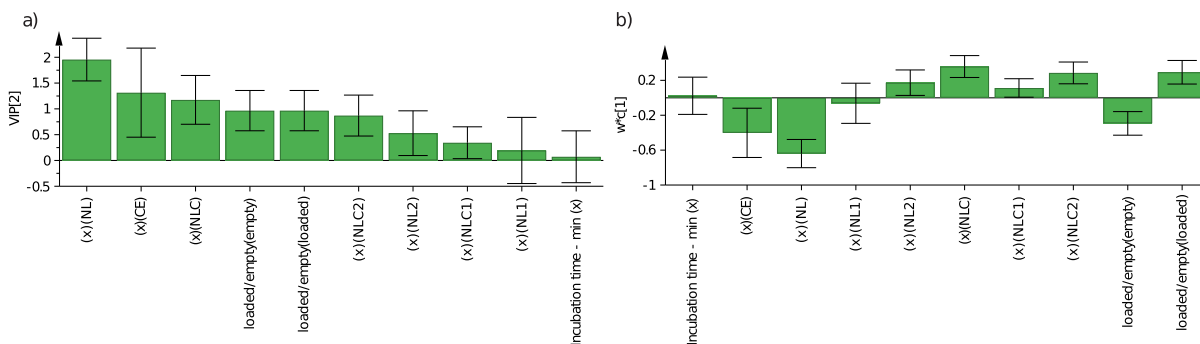


Fig. 8. a) Variable importance for projection (VIP) plot and b) loading score plot for discriminant analysis of formulations and the presence of CE as well as the incubation time.

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).

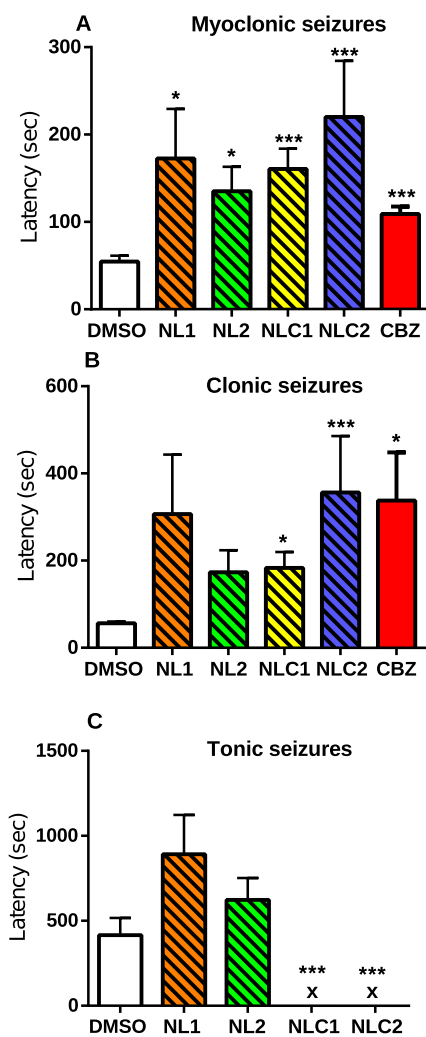


Fig. 9. Effects of NL1, NL2, NLC1 and NLC2 samples and the positive control CBZ (30 mg/kg, i.p.) on the latency for onset of the myoclonic (A), clonic (B) and tonic (C) seizures elicited by scPTZ injection (85 mg/kg) in mice. Asterisks mark significant differences between drugs and controls. * $p < 0.05$;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

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

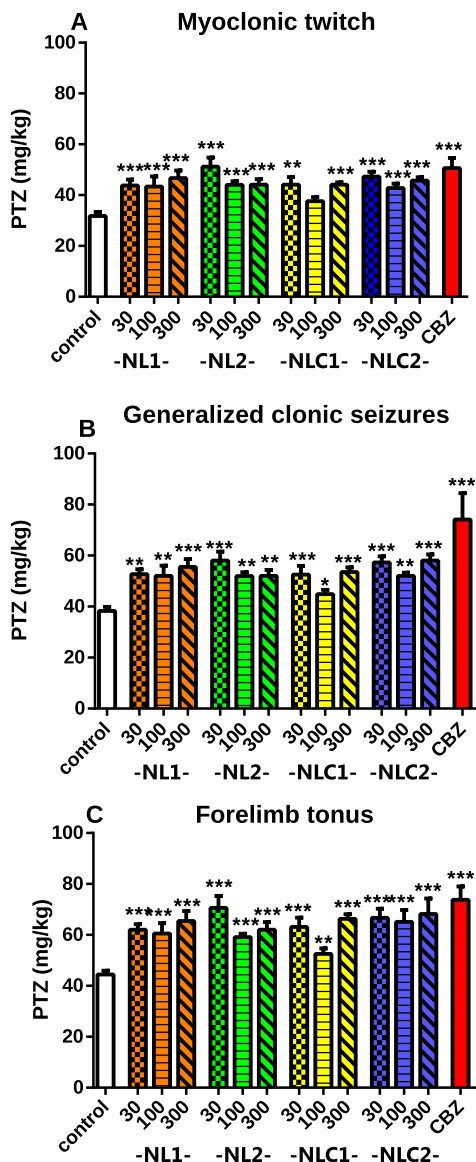


Fig. 10. Effects of NL1, NL2, NLC1 and NLC2 compounds and the positive control CBZ (30 mg/kg, i.p.) on the threshold for three seizure phases: the myoclonic twitch (A), generalized clonic seizures (B) and forelimb tonus (C) elicited by ivPTZ injection (1 %) in mice. Asterisks mark significant differences 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 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, Froiio 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 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 hCMC/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 aroylhydrazones 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, Kostarelos 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, Ettcheto 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. Shalabalija 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

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/10.1101/2Feshperspect.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>