



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

ШКОЛА ЗА ДОКТОРСКИ СТУДИИ

Пријава за
јавна презентација за учество на годишна конференција во летен семестар во
академската 2020/2021 година
(за стекнување 4 кредити, 6-ти семестар)

Студент	Душко Шалабалија
Број на индекс	58/др.
Ментор	Проф. д-р Марија Главаш Додов
Студиска програма	Трет циклус докторски студии од областа Фармација
Студиска подпрограма	
Поле на истражување	Фармацевтска технологија
Тема на докторската дисертација	Дизајн и развој на биоинспирирани ПЕГ-илирани нанолипозоми со вграден екстракт од розмарин за третман на Алцхајмерова болест
Наслов на трудот за годишната конференција	Физичко-хемиска и биофармацевтска карактеризација на ПЕГ-илирани нанолипозоми со енкапсулиран екстракт од розмарин наменети за третман на Алцхајмерова болест
Конкурс на запишување на докторски студии	Септември, 2018 година
Број на остварени кредити	74
Забелешка	

Ментор

Студент

Прилог: Извештај од рецензентската комисија за трудот кој се презентира

Скопје, 21.10.2021

УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВО СКОПЈЕ
ШКОЛА ЗА ДОКТОРСКИ СТУДИИ
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ

Студиска програма: Трет циклус за докторски студии од областа фармација

Кандидат: Душко Шалабалија

Број на индекс: 58 др

Ментор: Проф. д-р Маја Симоноска Црцаревска

Студиска година: трета

Наслов: Физичко-хемиска и биофармацевтска карактеризација на
ПЕГ-илирани нанолипозоми со енкапсулиран екстракт од розмарин
наменети 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 молекули, како што се полифенолите присутни во екстрактот од розмарин се препорачува како корисна стратегија за превенција на развојот на АБ. Меѓутоа, имајќи ги предвид ограничувањата кои потекнуваат од слабата системска биорасположливост на овие соединенија, и дополнително комплексноста на крвно-мозочната бариера (КМБ), развојот на нанолипозоми 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.

За таа цел, беа подготвени 5 оптимални формулации со модифициран метод на хидрирање на сув липиден филм и истите беа карактеризирани од аспект на нивните физичко-хемиски и биофармацевтски особини.

Оптималните нанолипозомски формулации се карактеризираа со големина околу 120 nm, тесна унимодална дистрибуција (СПАН ~ 1) и негативен зета потенцијал (од -18,50 до -48,3 mV). Енкапсулацијата на розмаринска киселина во липозомските везикули беше ~ 90%, додека пак процентот на ослободена розмаринска киселина во тек на 24 часа се движеше во опсег од 24,83 - 48,39%. Овие резултати сугерираат дека подготвените нано-носачи имаат висока ефикасност на енкапсулација и се карактеризираат со продолжено и контролирано ослободување на розмаринската киселина во тек на 24 часа.

Сите оптимални нанолипозомски примероци покажаа статистички значаен поголем антиоксидативен капацитет (> 94,15%) во споредба со екстрактот (90,04%). Најголем процент на адсорбирани протеини кај плазмата на здрави доброволци и пациенти со АБ, беше добиен за формулацијата без полиетилен гликол (ПЕГ) на површината, додека пак IR-ATR спектроскопската анализа на липозом-протеин комплексите посочи дека формулацијата со поголема содржина на ПЕГ резултира со посилено водородно поврзување помеѓу ПЕГ и говедскиот серум албумин.

Клучни зборови: Алцхајмерова болест, нанолипозоми, екстракт од розмарин, карактеризација

ВОВЕД

Резултатите од многу научни студии укажуваат на фактот дека патогенезата на некои невродегенеративни заболувања, меѓу кои и Алцхајмеровата болест (АБ), е поврзана со состојбата на оксидативен стрес, што потекнува од акумулацијата на кислородни реактивни радикали (КРР) (Chang et al., 2014). Имено, зголеменото производство на КРР е проследено со губење на митохондријалната функција, нарушена хомеостаза на металите и дополнително, намален антиоксидативен одбранбен потенцијал на клетките во мозокот. Овие настани директно влијаат на синаптичката активност и невротрансмисијата во невроните, а исто така предизвикуваат и оштетувања на клеточните структури (протеини, липиди, нуклеински киселини) што доведува до когнитивна дисфункција и прогресија на АБ (Tonnie and Trushina, 2017).

Во оваа насока, употребата на антиоксидативните и антиинфламаторните молекули, како што се полифенолите присутни во екстрактот од розмарин (ЕР) се препорачуваат како корисна стратегија за превенција на стареење на мозокот и појава на АБ (Sarubbo et al., 2017). Сепак, поради малата системска биорасположивост на овие соединенија, нивната клиничка употреба е прилично ограничена (Mignet et al., 2013). Имајќи ги во предвид овие потешкотии, и дополнително, комплексноста на крвно-мозочната бариера (КМБ), главната физиолошка бариера која селективно и специфично го контролира влезот на ендогените и егзогените молекули од крвта во мозокот, развојот на нанолипозоми (НЛ) би било соодветно и ефикасно формулациско решение за транспорт на лековитите молекули преку КМБ со можност за насочена испорака на истите до целното место во мозокот. Покрај уникатните физичко-хемиски својства, биокомпатибилноста и биоразградливоста, структурната сличност и способноста за фузија со клетките, можноста за функционализација на површината на нанолипозомските везикули се смета за еден од најперспективните пристапи за подобрување на фармакокинетиката и биодистрибуцијата на енкапсулираните лекови. Така, додавањето на полиетилен гликол (ПЕГ) на површината на НЛ ја ограничува адсорпцијата на плазматските протеини во циркулацијата, што води до намалување на клиренсот *in vivo*, па оттука и поголема можност лековите да стигнат до местото на делување во повисока концентрација (Mohamed et al., 2019). Дополнително, со ПЕГилацијата се редуцира неспецифичното клеточно врзување, а тоа резултира со подобрена биорасположивост на лековитите супстанции во паренхимот на ЦНС, што е од особен бенефит за успешниот третман на АБ (Jenkins et al., 2016).

Во овој контекст, за време на претходната фаза од ова истражување беа имплементирани студии на експериментален дизајн каде што по воспоставување и анализирање на соодветните модели кои најдобро го опишуваат влијанието на формулациските фактори врз особините од интерес, беше направена оптимизација на формулација на НЛ со енкапсулиран ЕР (Shalabalija et al., 2021). Оптимизацијата беше спроведена во насока на добивање на 5 формулации кои ќе се карактеризираат со особини (големина <200 nm, висока ефикасност на енкапсулација на екстрактот, контролирано и продолжено ослободување на истиот) за постигнување на продолжено време на циркулација и ефикасен транспорт на везикулите низ КМБ, и дополнително, високи/терапевтски концентрации на ЕР во мозочните ткива. Оттука, главната цел на ова истражување беше физичко-хемиска и биофармацевтска карактеризација на оптималните ПЕГ-илирани нанолипозоми со енкапсулиран екстракт од розмарин со потенцијал за ефикасно и безбедно лекување на АБ, од аспект на: големина, површинска наелектризираност, ефикасност на енкапсулација и *in vitro* брзина на ослободување во период од 24 часа, антиоксидативен капацитет, како и квалитативна и квантитативна карактеризација на липозом-протеин комплексите.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Материјали

Како материјали за подготовка и испитување на формулациите беа користени: соја лецитин (СЛ) (Виталија, Македонија), холестерол (ХЛ) и розмаринска киселина (РК) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA); LIPOID PE 18:0/18:0-PEG 2000 (ПЕГ) (Lipoid, Germany), Брадфорд реагенс, говедски серум албумин (БСА), флуоресцеин натриум и 2,2'-Азобис (2-амидинопропан) дихидрохлорид (ААПХ) (Sigma Aldrich, Germany); сув екстракт од растението *Rosmarinus officinalis* L. (ЕР) (Институт за Фармакогнозија, Фармацевтски факултет, УКИМ, Македонија); хлороформ, метанол, ацетонитрил со HPLC чистота и мравска киселина со аналитичка чистота (Merck KGaA, Germany). Фосфатниот пуфер pH 7,4 (PB pH 7,4) беше подготвен *ex tempore* (Ph. Eur. 9). Хумана плазма од здрави доброволци и од пациенти со АБ беше добиена од Институтот за неврологија, Клинички центар - Мајка Тереза, Скопје, Р.С. Македонија. Протоколите за студии со хумана плазма беа одобрени од етичкиот комитет на Медицинскиот факултет, УКИМ, Скопје, Р.С. Македонија (25.05.2016 година, бр. 03-2039/9).

Методи

Подготовка на НЛ

Липозомските дисперзии беа подготвени со модифицирана техника на хидрирање на сув липиден филм. За таа цел, потребните количества на СЛ, ХЛ, ПЕГ и ЕР (Табела 1) се раствараат во смеса од метанол и хлороформ во однос 1:4 (в/в). Потоа органските растворувачи се отстрануваат со помош на испарување под вакуум користејќи ротовапор на температура од 25 °C, 50 вртежи во минута (rpm) и притисок од 50 mbar (Buchi 215, Switzerland). Формираниот тенок липиден филм понатаму се хидрира со водена фаза, односно со 10 mL PB pH 7,4. Хидрирањето се врши во четири последователни циклуси во тек на 15 минути кои се состојат од по 3 чекори кои траат по 5 минути и тоа: мешање со помош на ултразвук (ултрасоникација) (50/60 Hz, ULTRASON-H, J.P. Selecta), вортексирање (Tehtnika, EV-102, Slovenia) и рачно мешање на собна температура. Добиените липозоми се подложуваат на хомогенизација (24000 rpm, 5 мин.; Ultra-Turrax T25, IkaWerke, Germany) и се оставаат 24 часа на температура од 2-8 °C. Потоа, липозомската дисперзија повторно се хомогенизира во времетраење од 3 мин. на 6000 rpm и се чува на температура од 2-8 °C. Сите примероци беа филтрирани низ мембрански филтер со големина на пори 0,22 µm (Sartorius, Germany).

За потребите на Брадфорд и IR – ATR спектроскопските анализи беа подготвени и празни аналози (без инкорпориран ЕР) на НЛ1 и НЛ2 (НЛп1 и НЛп2, соодветно). Освен тоа, за Брадфорд анализата беше подготвен и не-ПЕГилиран празен аналог на НЛ1 (НЛп01).

Табела 1. Количества на компонентите кои влегуваат во состав на оптималните НЛ.

Форм. бр.	ЕР (mg)	СЛ (mg)	ПЕГ (mg)	ХЛ (mg)
НЛ1	400	261,08	50	30
НЛ2	400	272,18	5	30
НЛ3	400	250,01	50	30
НЛ4	400	307,58	5	30
НЛ5	400	257,41	50	30

Определување на антиоксидативен капацитет (ORAC анализа)

Антиоксидативниот капацитет на ЕР и оптималните формулации на НЛ 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 (ААПХ). 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, САД). Потоа, беа додадени 25 µL ААПХ (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 ЕР и на нанолипозомските формулации беше пресметан како % од иницијалната флуоресценција на секој примерок (Рав. 4).

$$\% \text{ од иницијална флуоресценција} = \frac{\text{флуоресценција на примерокот во дадено време}}{\text{флуоресценција на примерокот во 0 мин}} * 100 \quad \text{Рав. 4}$$

Студии за определување на адсорпција на протеини (Брадфорд анализа)

Формирањето на комплексите помеѓу липозомските везикули и протеините беше испитано со инкубирање на празни формулации на НЛ1 и НЛ2 (НЛп1 и НЛп2), како и не-ПЕГилиран празен аналог на НЛ1 (НЛп01) со хумана плазма од здрави доброволци и пациенти со АБ. Формулациите на НЛ беа разредени со дестилирана вода до крајна концентрација на липиди од 1 mM, а потоа беа инкубирани со хумана плазма (НЛ:хумана плазма = 1:1 (в/в)). Инкубацијата се изведуваше на водена бања со постојано хоризонтално мешање (37 °C, 1 час, Haake SVB 20, JP Selecta, Шпанија) и последователно, примероците беа центрифугирани (10 мин, 12000 rpm, MiniSpin Plus, Eppendorf International, Germany). Процентот на адсорбирани протеини беше определен индиректно, по изведената Брадфорд анализа на супернатантот (Рав. 5). Како контрола се користеше разредена плазма, претходно неинкубирана со нанолипозомски формулации. Секој примерок беше анализиран во трипликат.

$$\% \text{ адсорбирани протеини} = \frac{\text{количество на протеини адсорбирани на НЛ}}{\text{вкупно количество на протеини во плазма}} * 100 \quad \text{Рав. 5}$$

IR – ATR спектроскопски анализи

Со цел да се откријат можните интеракции помеѓу компонентите кои влегуваат во состав на НЛ и дополнително, да се добијат подетални сознанија за липозом-протеин врските формирани при администрација на нано-носачите *in vivo*, беше направена IR-ATR анализа. За таа цел, 150 µL на подготвените формулации (НЛ1 и НЛ2) и нивните празни аналози (НЛп1 и НЛп2) беа инкубирани со 1 mg/mL раствор на БСА во PB pH 7,4 на водена бања со хоризонтално мешање (37 °C, 75 rpm, Haake SVB 20, JP Selecta, Шпанија). После адсорпцијата, неврзаната фракција на БСА беше одделена со центрифугална ултрафилтрација (3 циклуси, 15 минути, 4000 rpm, 25 °C, Rotofix 32 - Hettich Zentrifugen, Германија). Последователно, формираните НЛ-протеински комплекси беа лиофилизирани (-40 °C, 0,052 mBar; FreeZone 2.5 Freeze Dry System - LABCONCO, САД). За споредба, беа снимени и спектрите на СЛ, ХЛ, ПЕГ, ЕР и БСА. 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 скенови за позадината и за спектрите на примероците (двонасочни, двострани).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Физичко-хемиска карактеризација на НЛ

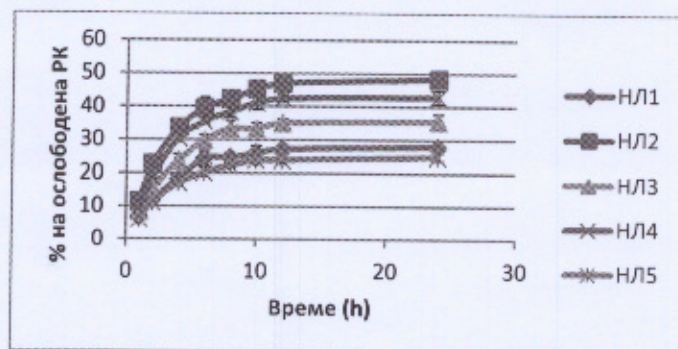
D_{50} на подготвените нанолипозоми се движеше во опсег од $116 \pm 2,25$ до $122 \pm 4,30$ nm и истите се карактеризираа со тесна унимодална дистрибуција (СПАН ~ 1) (Табела 2), што е важно од аспект на постигнување на продолжено време на циркулација на везикулите како и ефикасен транспорт низ КМБ. Како што може да се забележи, формулациите со 50 mg ПЕГ на површината (НЛ1, НЛ3, НЛ5) имаат помалку негативни вредности за ЗП (~ -20 mV) во споредба со зета потенцијалот (~ -45 mV) на НЛ2 и НЛ4 (5 mg ПЕГ), што сугерира на фактот 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 НЛ, што исто така води до намалување на ЗП (Nakamura et al., 2012). ЕЕ (%) 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 розмаринска киселина / 100 mg липид (Табела 2).

Табела 2. Физичко-хемиски својства на оптималните НЛ.

Примерок	$D_{50} \pm SD$ (nm)	СПАН	ЗП (mV)	ЕЕ (%)	ИЛ
					mg PK / 100 mg липид
НЛ1	$122 \pm 4,30$	1,055	$-18,50 \pm 1,32$	$85,93 \pm 1,93$	$4,10 \pm 0,09$
НЛ2	$116 \pm 2,25$	0,979	$-45,10 \pm 1,52$	$93,15 \pm 2,43$	$4,28 \pm 0,11$
НЛ3	$120 \pm 2,97$	1,197	$-21,45 \pm 1,28$	$80,94 \pm 3,67$	$4,01 \pm 0,18$
НЛ4	$120 \pm 3,95$	0,984	$-48,30 \pm 1,17$	$85,81 \pm 2,36$	$3,53 \pm 0,10$
НЛ5	$120 \pm 2,45$	1,000	$-23,00 \pm 1,23$	$85,77 \pm 2,54$	$4,14 \pm 0,13$

In vitro определување на брзината на ослободување

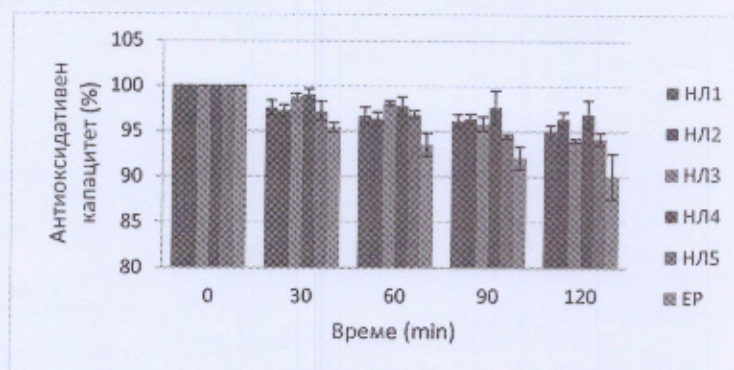
In vitro профилите на ослободување (Сл. 1), покажаа дека подготвените липозомски дисперзии се карактеризираат со продолжено ослободување на РК ($24,83 \pm 1,22$ - $48,39 \pm 2,32\%$ во период од 24 часа), при што беше забележана спротивна зависност на брзината на ослободување и количината на ПЕГ присутна на површината на нано-системите. Имено, формулациите НЛ1, НЛ3 и НЛ5 каде што ПЕГ беше присутен во поголемо количество резултираа со побавно ослободување на активната компонента ($24,83 \pm 1,22$ - $35,64 \pm 2,12\%$ РК ослободена во текот на 24 часа), што беше добиено и во прелиминарните студии (Shalabali et al., 2017). Се претпоставува дека за овој ефект придонесуваат долгите хидрофобни алкилни ланци на ПЕГ што најверојатно дејствуваат како дифузиска бариера за розмаринската киселина при нејзиното ослободување во дисолуциониот медиум и истата ја заробуваат (Panwar et al., 2010). Земајќи го во предвид липофилниот карактер на РК, дополнителен можен механизам што ја објаснува оваа разлика во брзината на ослободување на РК од различните формулации на НЛ, е брзата хидратација што се јавува како резултат на присуството на ПЕГ на површината на везикулите (Begum et al., 2012). Неколку кинетички модели на ослободување на РК од подготвените формулации беа тестирани со помош на софтверот DDSolver 1.0. Врз основа на добиените коефициенти на корелација ($R^2 > 0,897$), најсоодветниот модел што најдобро ја опишува кинетиката на ослободување на РК од подготвените НЛ беше моделот на Peppas-Sahlin. Високите вредности за k_1 ($> 11,149$ h⁻ⁿ) посочија дека преовладувачкиот механизам при ослободувањето на РК е дифузија (Mady, 2013).



Сл. 1. *In vitro* профили на ослободување на РК од оптималните НЛ.

Определување на антиоксидативен капацитет (ORAC анализа)

Сите оптимални примероци на НЛ (НЛ1-НЛ5) беа релативно стабилни во текот на експериментот, и покажаа статистички значаен поголем антиоксидативен капацитет ($> 94,15\%$) во споредба со ЕР ($90,04 \pm 2,51\%$) (Сл. 2). Формулациите со поголем удел на СЛ во липидниот филм (НЛ2 и НЛ4), 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 ($<95,03\%$), што е очекувано поради фактот што НЛ2 и НЛ4 се карактеризираат со најбрзо *in vitro* ослободување во период од 2 часа ($22,57 \pm 0,73$ и $18,06 \pm 0,25\%$ на РК, соодветно).



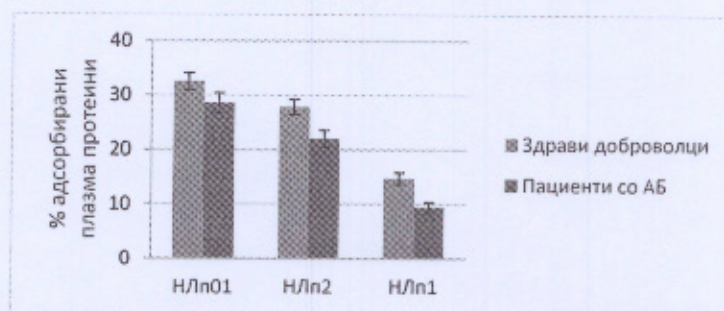
Сл. 2. Антиоксидативен капацитет на ЕР и оптималните НЛ.

Различните вредности за антиоксидативен капацитет се должат не само на различните профили на продолжено ослободување на РК од различните липозомски формулации, туку и на синергистичкиот антиоксидативен ефект на компонентите во ЕР и СЛ присутни во составот на фосфолипидниот слој на липозомите. Литературните податоци сугерираат дека фосфатидилхолинот (ФХ) и фосфатидилетаноламинот (ФЕ), главните компоненти на СЛ, 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 ФХ и ФЕ и антиоксидативниот ефект (Cabezas et al., 2012), што е во прилог на добиените резултати.

Студии за определување на адсорпција на протеини (Брадфорд анализа)

Во тек на ОФАТ експериментите, беше покажано дека зголемувањето на количината на ПЕГ е проследено со намалување на процентот на БСА адсорбиран на површината на нановезикулите (Shalabali et al., 2017). Во оваа фаза од истражувањето, беше потребно да се разгледаат интеракциите помеѓу НЛ и хуманите

плазматски протеини со цел да се добијат порелевантни информации за процесот на формирање на протеинската корона (ПК) *in vivo*. Од Сл. 3 може да се забележи спротивната поврзаност помеѓу количината на ПЕГ присутна во формулациите и процентот на плазматските протеини адсорбирани на површината на нано-носачите. Како што се очекуваше, најмал процент на плазматските протеини беше адсорбиран на површината на формулацијата НЛп1 со 50 mg ПЕГ ($14,69 \pm 1,11$ и $9,39 \pm 0,99\%$ по 1 час инкубација во хумана плазма од здрави доброволци и пациенти со АБ, соодветно). Најголемата количина на 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 адсорбирана на формулацијата без ПЕГ на површината (НЛп01). Добиените резултати се во согласност со литературните податоци кои потврдуваат дека присуството на ПЕГ 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 на тој начин, се продолжува времето на циркулација на НЛ во крвта (Sahil et al., 2011).



Сл. 3. Процент на адсорбирани плазматски протеини на површината на НЛп1, НЛп2 и НЛп01.

IR – ATR спектроскопски анализи

IR – ATR спектроскопската анализа на празните аналози на НЛ1 и НЛ2 (НЛп1 и НЛп2) по нивна инкубација со БСА, покажаа дека главниот придонес во спектрите на обете формулации доаѓа од СЛ, ПЕГ и БСА, што го потврдува феноменот на формирање на ПК. Дополнително, НЛп1 и НЛп2 покажаа скоро идентични спектрални карактеристики со НЛ1 и НЛ2, соодветно. Причината за отсуството на екстрактот во спектрите на НЛ1 и НЛ2, веројатно се должи на успешното инкорпорирање на ЕР во сферичните честички. Со цел да се утврди влијанието на количината на ПЕГ врз јачината на водородните врски помеѓу БСА и нано-системите, беше направена деконволуција на спектрите НЛп1 и НЛп2, претходно инкубирани со БСА. Фреквенциите на чиста БСА и онаа присутна во НЛп1 и НЛп2 беа различни, што значи дека присуството на други супстанции како што се: ХЛ, СЛ и ПЕГ играат улога во секундарната структура на протеинот и јачината на водородните врски. Исто така, беше увидено дека сите фреквенции на НЛ61 во амид II регионот беа повисоки од оние на НЛ62 (Shalabali et al., 2021), со што може да се заклучи дека формираните водородни врски помеѓу ПЕГ и БСА се посилни кај НЛп1 како резултат на поголемото количество на ПЕГ во формулацијата, а со тоа и поголемиот број на етилен гликолски поединици кои може да реагираат со водородниот атом од N-H групата на БСА.

ЗАКЛУЧОК

Оптималните формулации на ПЕГ-илирани нанолипозоми со енкапсулиран екстракт од розмарин се карактеризираа со $D_{50} \sim 120$ nm, тесна унимодална дистрибуција, проследено со висока ЕЕ (%) и негативен ЗП. Сите подготвени липозомски дисперзии резултираа со продолжено ослободување на розмаринската

киселина, а врз основа на добиените коефициенти на корелација, моделот што најдобро ја опишува кинетиката на ослободување на РК е моделот на Peppas- Sahlin. Во однос на антиоксидативниот капацитет, сите оптимални примероци на липозомски везикули покажаа статистички значаен поголем антиоксидативен капацитет во споредба со екстрактот. Како што се очекуваше, најмал процент на адсорбирани плазматски протеини во плазмата кај здрави доброволци и пациенти со АБ, беше добиен за формулацијата со најголемо количество на ПЕГ на површината. IR-ATR спектроскопската анализа посочи дека формулациите со поголема содржина на ПЕГ резултираат со посилно водородно поврзување помеѓу ПЕГ и БСА. Оттука, може да се заклучи дека добиените податоци од физичко-хемиската и биофармацевтска карактеризација на оптималните НЛ формулации, укажуваат на нивниот потенцијал за успешен транспорт преку КМБ и следствено, ефикасен и безбеден третман на АБ.

БЛАГОДАРНОСТ

Овој докторски труд влегува во рамките на проектот: „Формулациски развој на биоинспирирани нанолипозоми како носачи на активни супстанции за третман на Алцхајмерова болест“, финансиран од УКИМ (2016-2017 година), и притоа, дел од искористените материјали за изведувањето на експериментите беа обезбедени од средствата на истиот.

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

- Begum, M.Y., Abbulu, K., Sudhakar, M. (2012) Flurbiprofen-loaded stealth liposomes: studies on the Development, characterization, pharmacokinetics and biodistribution. *J Young Pharm.* 4 (4), 209-219.
- 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*.
- Chang, Y-T., Chang, W-N., Tsai, N-W., Huang, C-C., Kung, C-T., Su, Y-J., Lin, W-C., Cheng, B-C., Su, C-M., Chiang, Y-F., Lu, C-H. (2014) The Roles of Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant in Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Biomed Res Int.* 2014, 182303.
- 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.
- 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. *J. Control. Release* 224, 136-145.
- Mady, O. (2013) Mechanisms and percent of drug release of each new mathematic approach. *Int. Res. J. Pharm. App. Sci.* 3 (6), 56-69.
- Mignet, N., Seguin, J., Chabot, G.G. (2013) Bioavailability of polyphenol liposomes: a challenge ahead. *Pharmaceutics* 5 (3), 457-471.
- Mohamed, M., Abu Lila, A.S., Shimizu, T., Alaaeldin, E., Hussein, A., Sarhan, H.A., Szebeni, J., Ishida, T. (2019) PEGylated liposomes: immunological responses. *Sci Technol Adv Mater.* 20 (1), 710-724.
- 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. *BBA - Biomembranes* 1818 (11), 2801-2807.
- 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.
- Tonnies, E., Trushina, E. (2017) Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 57 (4), 1105-1121.
- Sahil, K., Premjeet, S., Ajay, B., Middha, A., Bhawna, K. (2011) Stealth liposomes: a review. *IJRAP* 2 (5), 1534-1538. ISSN 2229-3566.
- Sarubbo, F., Moranta, D., Asensio, V.J., Miralles, A., Esteban, S. (2017) Effects of Resveratrol and Other Polyphenols on the Most Common Brain Age-Related Diseases. *Curr Med Chem.* 24 (38), 4245-4266.
- 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, 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 (2021), 102434.

УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВО СКОПЈЕ
ШКОЛА ЗА ДОКТОРСКИ СТУДИИ
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ

Студиска програма: Трет циклус за докторски студии од областа фармација

РЕЦЕНЗИЈА

на семинарски труд од V семестар под наслов „Физичко-хемиска и биофармацевтска карактеризација на ПЕГ-илирани нанолипозоми со енкапсулиран екстракт од розмарин наменети за третман на Алцхајмерова болест“ на докторандот, магистер по фармација Душко Шалабалија.

Со одлука на Советот на докторски студии на Фармацевтскиот факултет во Скопје, определена е рецензентска комисија за оцена на семинарскиот труд од трет циклус на докторски студии во состав: проф. д-р Маја Симоноска Црцаревска, проф. д-р Марија Главаш Додов и проф. д-р Никола Гешковски.

По прегледот на доставениот семинарски труд, Рецензентската комисија го доставува следниот

ИЗВЕШТАЈ

Семинарскиот труд под наслов „Физичко-хемиска и биофармацевтска карактеризација на ПЕГ-илирани нанолипозоми со енкапсулиран екстракт од розмарин наменети за третман на Алцхајмерова болест“ претставува самостојно изработен труд. Во трудот детално се разработени резултатите добиени од физичко-хемиската и биофармацевтската карактеризација на оптималните формулации на ПЕГ-илирани нанолипозоми со енкапсулиран екстракт од розмарин за потенцијален третман на Алцхајмерова болест. Резултатите од трудот кандидатот ги има објавено во научна статија во списанието *Journal of Drug Delivery Science and Technology* бр. 63, 2021 (doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102434).

Трудот е структуриран во следните поглавја: вовед, материјали и методи, резултати и дискусија, заклучок и литература. Систематизацијата на деловите во наслови и поднаслови обезбедува соодветно следење на материјата која е обработена во трудот.

Во „Воведот“, докторандот се осврнува на фактот дека патогенезата на некои невродегенеративни заболувања, меѓу кои и Алцхајмеровата болест (АБ), е поврзана со состојбата на оксидативен стрес. Дополнително, ги потенцира и оштетувањата што произлегуваат како последица на зголеменото производство и акумулација на кислородните реактивни радикали во мозокот. Понатаму, докторандот ја нагласува употребата на антиоксидативните и антиинфламаторните молекули, како што се полифенолите присутни во екстрактот од розмарин (ЕР) како корисна стратегија за превенција на стареење на мозокот и појава на АБ. Меѓутоа имајќи ја во предвид слабата системска биорасположливост на овие компоненти и комплексноста на крвно-мозочната бариера (КМБ), развојот на нанолипозоми (НЛ) би било соодветно и ефикасно

формулациско решение за транспорт на лековитите молекули преку КМБ со можност за насочена испорака на истите до целното место во мозокот. Дополнително, литературните податоци сугерираат дека додавањето на полиетилен гликол (ПЕГ) на површината на НЛ везикули ја ограничува адсорпцијата на плазматските протеини во циркулацијата, што води до намалување на клиренсот *in vivo*, па оттука и поголема можност лековитите супстанции да стигнат до местото на делување во повисока концентрација. Исто така, докторандот наведува дека со ПЕГилацијата се редуцира неспецифичното клеточно врзување, а тоа резултира со подобрена биорасположливост на лековитите супстанции во паренхимот на ЦНС, што е од особен бенефит за успешниот третман на АБ.

Земајќи ги предвид овие информации, на крајот од воведниот дел, докторандот се осврнува кон претходната фаза, односно студиите на експериментален дизајн каде што била направена оптимизација на НЛ формулации со енкапсулиран ЕР во насока на добивање на 5 формулации кои ќе се карактеризираат со соодветни особини (големина <200 nm, висока ефикасност на енкапсулација на екстрактот, контролирано и продолжено ослободување на истиот) за постигнување на продолжено време на циркулација и ефикасен транспорт на везикулите низ КМБ и дополнително, високи/терапевтски концентрации на ЕР во мозочните ткива. Па оттука, наведена е и главната цел на ова истражување, односно, физичко-хемиска и биофармацевтка карактеризација (големина, површинска наелектризираност, ефикасност на енкапсулација, *in vitro* брзина на ослободување во период од 24 часа, антиоксидативен капацитет, како и квалитативна и квантитативна карактеризација на липозом-протеин комплексите) на оптималните ПЕГ-илирани НЛ со енкапсулиран ЕР со потенцијал за ефикасно и безбедно лекување на АБ.

Во делот „Материјали и методи“, соодветно се прикажани потребните материјали за подготовка и карактеризација на оптималните формулации на нано-носачи, односно опишани се методите за подготовка (хидрирање на сув липиден филм) и карактеризирање (средна големина и дистрибуција по големина на НЛ, ефикасност на енкапсулација на розмаринската киселина (РК) и *in vitro* брзина на ослободување на истата по 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 и 24 часа, определување на зета потенцијалот, определување на адсорпцијата на протеини и спроведување на IR-ATR спектроскопски анализи) на нанолипозомските дисперзии. Имено, подготвени се 5 различни оптимални формулации (НЛ1-НЛ5) кои се разликуваат по употребените количества на соја лецитин (СЛ) и полиетилен гликол (ПЕГ). За потребите на IR-ATR спектроскопските анализи и Брадфорд анализата се подготвени и празни аналози на НЛ1 и НЛ2 (НЛп1 и НЛп2, соодветно). Освен тоа, за Брадфорд анализата е подготвен и не-ПЕГ-илиран празен аналог на НЛ1 (НЛп01).

Во делот „Резултати и дискусија“, јасно се прикажани добиените резултати од карактеризацијата на подготвените примероци, а дискусијата е водена разбирливо и со логичен редослед. Резултатите добиени од карактеризацијата на нанолипозомските формулации укажуваат дека сите формулации имаат средна големина во опсег од $116 \pm 2,25$ до $122 \pm 4,30$ nm и истите се карактеризираат со тесна унимодална дистрибуција (СПАН ~ 1), што е важно од аспект на постигнување на продолжено време на циркулација на везикулите како и ефикасен транспорт низ КМБ. Од друга страна пак, забележано е дека зета потенцијалот на формулациите со 50 mg ПЕГ на површината (НЛ1, НЛ3, НЛ5) имаат помалку негативни вредности за зета потенцијалот (~ -20 mV) во споредба со НЛ2 и НЛ4 (5 mg ПЕГ) (~ -45 mV). Како што објаснува докторандот, со намалување на концентрацијата на ПЕГ на површината, доаѓа до израз негативниот полнеж на структурните липиди кои влегуваат во состав на двослојот на нанолипозомите, што

резултира со понегативни вредности за зета потенцијалот. Оптималните формулации се карактеризираат со висок процент на енкапсулација на розмаринската киселина (од $80,94 \pm 3,67$ до $93,15 \pm 2,43\%$), додека пак вредностите за инкорпорација на розмаринска киселина во липидниот филм се во опсег од $3,53 \pm 0,10$ до $4,28 \pm 0,11$ mg PK / 100 mg липид.

Резултатите од студиите за определување на *in vitro* брзината на ослободување покажуваат дека подготвените липозомски дисперзии се карактеризираат со продолжено ослободување на розмаринска киселина ($24,83 \pm 1,22$ - $48,39 \pm 2,32\%$ во период од 24 часа), при што брзината на ослободување покажува спротивна зависност со количината на ПЕГ присутна на површината на НЛ, феномен забележан и за време на прелиминарните студии. Докторандот сугерира дека за овој ефект најверојатно придонесуваат долгите хидрофобни алкилни ланци на ПЕГ што дејствуваат како дифузииска бариера за РК при нејзиното ослободување во дисолуциониот медиум и истата ја заробуваат. По тестирањето на неколку кинетички модели на ослободување на РК од липозомските везикули, наведено е дека најсоодветниот модел што најдобро ја опишува кинетиката на ослободување на истата од подготвените НЛ е моделот на Peppas-Sahlin.

Понатаму, забележано е дека сите 5 оптимални формулации покажуваат статистички значаен поголем антиоксидативен капацитет ($>94,15\%$) во споредба со екстрактот ($90,04 \pm 2,51\%$). Дополнително, формулациите со поголем удел на соја лецитин во липидниот филм (НЛ2 и НЛ4), се карактеризираат 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 ($<95,03\%$), што е очекувано поради фактот што НЛ2 и НЛ4 се карактеризираат и со најбрзо *in vitro* ослободување на РК во период од 2 часа. Како што наведува докторандот, различните вредности за антиоксидативен капацитет се должат не само на различните профили на продолжено ослободување на РК од различните липозомски формулации, туку и на синергистичкиот антиоксидативен ефект на компонентите во екстрактот и соја лецитинот присутни во составот на НЛ, што е во согласност и со литературните податоци.

Кога станува збор за квантитативното определување на адсорпцијата на протеини (Брадфорд анализа), на почетокот од овој дел, докторандот ја нагласува потребата да се разгледаат интеракциите помеѓу НЛ и хуманите плазматски протеини со цел да се добијат порелевантни информации за процесот на формирање на протеинската корона *in vivo*. Со овие студии е потврдено дека присуството на ПЕГ на површината на НЛ го спречува формирањето на протеинската корона, што оди во прилог на продолжување на времето на циркулација на НЛ *in vivo*. Имено, најмал процент на плазматските протеини е адсорбиран на површината на НЛп1 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), додека пак најголем процент на 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) е адсорбирана на формулацијата без ПЕГ на површината (НЛп01).

Добиените податоци од IR-ATR спектроскопската анализа на празните аналози на НЛ1 и НЛ2 (НЛп1 и НЛп2) по нивна инкубација со говедски серум албумин (БСА) го потврдуваат феноменот на формирање на протеинска корона. Дополнително, покажано е дека НЛп1 и НЛп2 имаат скоро идентични спектрални карактеристики со НЛ1 и НЛ2, соодветно (отсуство на спекарот на ЕР), што веројатно се должи на успешното инкорпорирање на ЕР во сферичните честички. Во продолжение на овој дел, добиени се информации дека фреквенциите на чистиот БСА и оној инкорпориран во НЛп1 и НЛп2 се

различни, што имплицира на фактот дека присуството на други супстанции како што се: холестерол, СЛ и ПЕГ играат улога во секундарната структура на протеинот и јачината на водородните врски. Исто така, увидено е дека сите фреквенции на НЛп1 во амид II регионот се повисоки од оние на НЛп2 со што може да се заклучи дека формираните водородни врски помеѓу ПЕГ и БСА се посилни кај НЛп1 како резултат на поголемото количество на ПЕГ во формулацијата, а со тоа и поголемиот број на етилен гликолски поединици кои може да реагираат со водородниот атом од N-H групата на БСА.

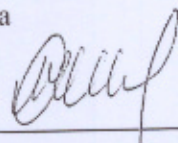
Во **заклучните согледувања**, докторандот ги сублимира резултатите од спроведените студии на физичко-хемиска и биофармацевтска карактеризација на оптималните ПЕГилирани нанолипозомски формулации со енкапсулиран екстракт од розмарин и истите укажуваат на нивниот потенцијал за успешен транспорт преку КМБ и следствено, ефикасен и безбеден третман на АБ.

ОЦЕНКА

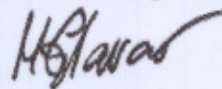
По прегледот на семинарскиот труд под наслов „Физичко-хемиска и биофармацевтска карактеризација на ПЕГ-илирани нанолипозоми со енкапсулиран екстракт од розмарин наменети за третман на Алцхајмерова болест“ на докторандот Душко Шалабалија, и имајќи в предвид дека кандидатот резултатите ги објавил во престижно научно списание со фактор на влијание, Рецензентската комисија констатира дека станува збор за научен труд кој детално ја обработува физичко-хемиската и биофармацевтска карактеризација на оптималните формулации на нанолипозоми со енкапсулиран екстракт од розмарин и истите ги поткрепува со автентични истражувања кои докторандот во трудот ги пренел на соодветен начин.

Севкупно добиените резултати и изнесените заклучоци укажуваат на потенцијалот на оптималните формулации да бидат применети за третман на АБ.

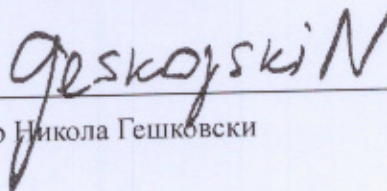
Рецензентска комисија



Проф. д-р Маја Симоноска Цираревска



Проф. д-р Марија Главаш Додов



Проф. д-р Никола Гешковски