Nanotehnološki nosači biljnih tvari i pripravaka

Škrbina, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:032560

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Ana Škrbina

Nanotehnološki nosači biljnih tvari i pripravaka

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmaceutika I Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Ivana Pepića.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Ivanu Pepiću na stručnom i savjesnom vođenju kroz proces izrade diplomskog rada.

1. UVOD 1
1.1. Liposomi 1
1.1.1. Deformabilni liposomi 2
1.1.2. Fitosomi 3
1.2. Niosomi 4
1.3. Micele 5
1.3.1. Polimerne micele 5
1.4. Nanoemulzije 7
1.4.1. Samoemulgirajući nanonosači djelatnih tvari 9
1.5. Nanočestice 9
1.5.1. Lipidne nanočestice 10
1.5.2. Polimerne nanočestice 12
1.6. Dendrimeri 13
1.7. Ciklodekstrini 13
1.8. Nanokristali 14
2. OBRAZLOŽENJE TEME 16
3. MATERIJALI I METODE 18
4. RASPRAVA 19
4.1. Liposomski biljni pripravci 19
4.1.1. Oblaganje nanosustava hidrofilnim polimerima 19
4.1.2. Povećanje stabilnosti prije apsorpcije u organizmu 20
4.1.3. Poboljšanje apsorpcije preko barijere rožnatog sloja 20
4.1.4. Deformabilni liposomi u (trans)dermalnoj primjeni biljnih tvari i pripravaka 21
4.1.5. Apsorpcija kroz mukoadhezivnu barijeru bukalne sluznice 23
4.1.6. Povećanje stabilnosti tijekom skladištenja 24
4.1.7. Povećanje stabilnosti i biološke aktivnosti resveratrola 24
4.2. Niosomski biljni pripravci 27
Tablica 3. Pregledni prikaz niosomskih biljnih pripravaka 27
4.2.1. Sinergistički učinak kombinacije antioksidansa u niosomima 28
4.3. Micelarni biljni pripravci 28
4.3.1. Povećanje biodostupnosti kvercetina uklapanjem u samoemulgirajuću nanoemulziju 28
4.3.2. Povećanje topljivosti artemisinina i kurkumina uklapanjem u nanomicelarne sustave 29
4.3.3. Utjecaj volumena hidrofobnog lanca surfaktanta na kapacitet uklapanja micela 30
Tablica 4. Pregledni prikaz nanoemulzija s uklopljenim biljnim tvarima (Saraf, 2010) 31

4.4. Mikro- i nanočestični biljni pripravci 31
4.4.1. Pasivno i aktivno usmjeravanje djelovanja lijeka 31
4.4.2. Oblaganje nanočestica kitozanom 33
4.4.3. Poboljšanje topljivosti u vodi uklapanjem u lipidni odjeljak lipidnih nanočestica 34
4.4.4. Kontinuirano oslobađanje biljnih tvari iz lipidnih nanočestica 34
4.4.5. Povećanje biodostupnosti i apsorpcije biljnih tvari 35
Tablica 5. Pregledni prikaz biljnih pripravaka koji se osnivaju na tehnologiji nanočestica (NČ) (Saraf, 2010) 36
4.5. Biljna tvar u obliku nanokristala 37
4.6. Zaštićeni biljni nanotehnološki oblici 40
4.7. Toksičnost nanotehnoloških sustava za dostavu lijeka 41
5. ZAKLJUČCI 43
6. LITERATURA 44
7. SAŽETAK 49
8. SUMMARY 50

1. UVOD

1.1. Liposomi

Liposomi su sferični vezikularni sustavi građeni od jedanog ili više fosfolipidnih dvosloja koji okružuju unutarnji vodeni odjeljak (Bilia i sur., 2015).

Veličina liposoma uglavnom se kreće između 20-ak nm do 10-ak μm. Nastaju spontano, hidratacijom fosfolipida u vodenom mediju kako bi se minimalizirale nepovoljne interakcije između hidrofobnog dijela molekula fosfolipida i vode (Mandić i sur., 2012).

Ovisno o vrsti fosfolipida i metodama priprave liposomi građeni su iz jedanog (unilamelarni: mali 20-100 nm, srednji 100-500 nm, veliki > 1000 nm) ili više slojeva (multilamelarni > 100 nm). Zbog amfifilnog karaktera fosfolipida, liposomi mogu prenositi hidrofilne (u središnjem vodenom odjeljku), amfifilne (zauzimaju neke od prijelaznih položaja između fosfolipidnih i vodenih odjeljka liposoma) i hidrofobne molekule (u lipidnom dvosloju). Slični su biološkim membranama, netoksični, neimunogeni i biorazgradljivi, u potpunosti su fiziološki prihvatljivi, te se mogu primjenjivati kao nosači djelatnih tvari u različitim terapijskim područjima (Mandić i sur., 2012, Pepić i sur., 2012).

Molekule uklopljene u liposomima zaštićene su od vanjskih čimbenika kao što su enzimi i inhibitori (Saraf, 2010).

Osnovni nedostatak liposoma njihova je niska fizikalna i/ili kemijska stabilnost. Broj liposoma tijekom skladištenja se smanjuje zbog agregacije liposoma. Fizikalnu stabilnost liposoma moguće je povećati oblaganjem hidrofilnim polimerima (polietilneglikolom). Oksidacija i hidroliza fosfolipida glavni su uzroci kemijske nestabilnosti liposoma. Dodatak antioksidansa sprječava oksidaciju fosfolipida, dok prilagođavanje pH oblika od 6 do 7 sprječava hidrolizu fosfolipida (Pepić i sur., 2012).

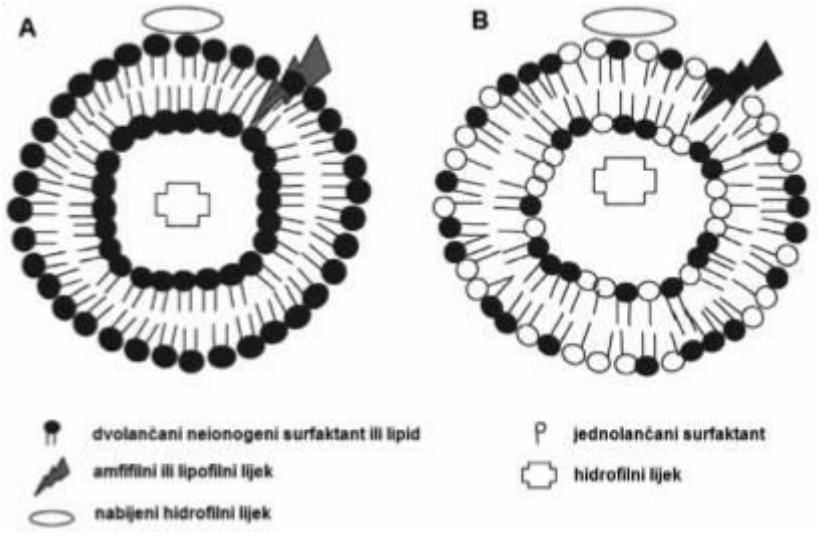
Fizikalno-kemijska svojstva liposoma lako se modificiraju različitim metodama pripravljanja ili uključivanjem različitih pomoćnih tvari u forumulaciju. Primjerice, kolesterol povećava koheziju nepolarnog dvosloja vezikule, povećavajući mehaničku čvrstoću membrane i smanjujući permeabilnost za vodu (Marianecci i sur., 2014). Dodavanjem kationa/aniona u formulaciju stvara se električni naboj na vezikularnoj površini i smanjuje agregacija liposoma.

Liposomi dostavljaju djelatnu tvar u stanicu procesom endocitoze. Stanica fagocitira intaktne liposome i internalizira ih u lizosomske mjehuriće gdje se djelatna tvar oslobađa nakon fosfolipazne razgradnje lipidnog dvosloja. Drugi predloženi mehanizam dostave djelatne tvari

je fuzijom liposomskog dvosloja sa staničnom membranom nakon koje slijedi raspodjela vezikularnog sadržaja između citoplazmatskog odjeljka i stanične membrane (Zaru, 2012).

1.1.1. Deformabilni liposomi

Deformabilni liposomi su lipidne elastične vezikule (200-300 nm) za dermalnu primjenu koje u fosfolipidnom dvosloju imaju još i rubni aktivator. Rubni aktivator je jednolančani surfaktant koji narušava strukturu i stabilnost dvosloja, čineći ga deformabilnim i elastičnim. Rubni se aktivator deformabilnih liposoma interkalira u intercelularne lipide, povećavajući lipidnu fluidnost biološke membrane. Uz povećanu fluidnost i deformabilnost membrane nosača i biološke membrane, moguće je protiskivanje vezikule s uklopljenom djelatnom tvari u dublje slojeve kože (Bilia i sur., 2015).



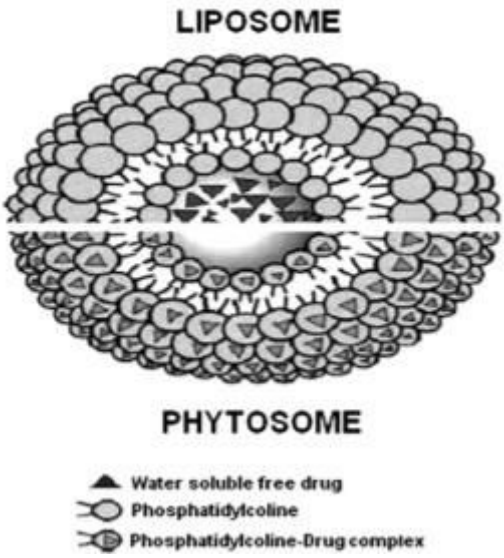
Slika 1. Shematski prikaz konvencionalog (A) i deformabilnog (B) liposoma. Nabijene hidrofilne, amfifilne ili lipofilne molekule vežu se za/u ovojnicu liposoma, dok se hidrofilne molekule uklapaju u unutarnju vodenu fazu. Konvencionalni liposomi većinom se sastoje od fosfolipida i kolesterola. Ovojnica deformabilnih liposoma sastoji se od fosfolipida i jednolančanog surfaktanta u odgovarajućem omjeru (Banović i sur., 2011).

Optimalnim omjerom fosfolipida i surfaktanta postiže se željena elastičnost ovojnice vezikula. Takve elastične vezikule zbog narušene strukture membrane imaju sposobnost protiskivanja kroz pore znatno manje od veličine vlastitog promjera.

Najčešće se kao rubni aktivatori koriste: natrijev kolat, natrijev deoksikolat, Span 60, Span 65, Span 80, Tween 20, Tween 60, Tween 80 i dikalijev glicirizinat (Banović i sur., 2011).
Transferosomi su predstavnici prve generacije visoko deformabilnih, elastičnih liposoma. Izgrađeni su iz fosfolipidnog dvosloja uz dodatak rubnog aktivatora (Romero i Morilla, 2013). Etosomi su nanoliposomi s visokim udjelom etanola (20-45 %), koji je učinkoviti promotor permeacije. Etanol reagira s polarnim glavama lipidnih molekula i na taj način snizuje temperaturu faznog prijelaza membrana, čime se povećava njihova fluidnost i permeabilnost. Visoka fleksibilnost i deformabilnost vezikularnih membrana, koja također potječe od etanola, dopušta elastičnim vezikulama da se uguraju kroz pore koje su puno uže od njihovih promjera (Verma i Pathak, 2010).

1.1.2. Fitosomi

Većina biološki aktivnih biljnih tvari (flavonoidi, tanini, terpenoidi) su topljivi u vodi, međutim zbog slabe topljivosti u lipidima, koja uvjetuje ograničen prolazak kroz lipofilne biološke membrane, ili zbog velike molekulske veličine koja sprječava ulazak u stanicu pasivnom difuzijom, vrlo se loše apsorbiraju.
Fitosom je lipokompatibilni kompleks koji inkorporira standardizirani biljni ekstrakt ili vodotopljivu biljnu tvar, u svrhu poboljšanja apsorpcije i biodostupnosti. Fitosomi su patentirana tehnologija vodećeg proizvođača lijekova i farmaceutika.
Za razliku od liposoma, u kojima ne nastaje kemijska veza između djelatne tvari i fosfatidilikolinskih molekula nosača, fitosomski proces uključuje nastajanje kemisjkih veza između fosfatidilkolina i djelatne tvari te nastajanje molekularnog kompleksa u odnosu 1:1 odnosno 2:1 ovisno o kompleksiranoj tvari.
Fosfolipidi izgrađuju biološke membrane svih živih bića, a u ljudi vrše i ulogu pomaganja probave i prenošenja hidrofilnih i lipofilnih nutrijenata. Dobro se otapaju u vodenom kao i u lipidnom okruženju i dobro se oralno apsorbiraju. Poboljšavaju biodostupnost konvencionalnih biljnih ekstrakata omogućujući im prolaženje kroz lipidne membrane i ulazak u krvotok (Saraf, 2010).



Slika 2. Razlika u građi liposoma i fitosoma (Saraf, 2010).

1.2. Niosomi

Niosomi su vezikule građene od amfifilnih neionskih površinski aktivnih tvari (Span 20 ili 60, Tween 80, Pluronic L64) koje su organizirane u dvosloje te su strukturom i fizikalnim svojstvima vrlo slični liposomima. Veličinom se kreću od 50-1000 nm (Pepić, 2014).

Niosomi zadržavaju mogućnost uklapanja hidrofilnih i hidrofobnih molekula, imaju nisku toksičnost zbog neionske prirode, biorazgradljivi su, biokompatibilni i neimunogeni, povećavaju bioraspoloživost djelatne tvari i omogućuju joj produženo djelovanje, a istovremeno su prihvatljiviji cijenom i stabilniji pri skladištenju od liposomskih farmaceutskih oblika (Pepić, 2004).

Unatoč neionskoj prirodi surfaktanata, obavezna su toksikološka ispitivanja.

Niosomi, kao i liposomi mogu biti izgrađeni od jednog ili više dvosloja, pa morfološki razlikujemo unilamelarne i multilamelarne koncentrične vezikule (Marianecci i sur., 2014).

Vrlo je važno svojstvo niosoma fluidnost njihove membrane koja omogućuje deformiranje vezikule bez utjecaja na integritet dvosloja (Marianecci i sur., 2014).

Na izradu vezikula znatno utječe HLB vrijednost surfaktanta. Izrazito hidrofilni surfaktanti (vrijednost HLB 14-17) ne mogu oblikovati slobodne hidratizirane vezikule, već agregiraju i koalesciraju tvoreći lamelarne strukture.

Za HLB vrijednosti surfaktanta oko 10, dodatak kolesterola ima ključnu ulogu u oblikovanju vezikula. Dodatak kolesterola u amfifilni dvosloj mijenja njegovu mehaničku snagu i

permeabilnost za vodu, svojstva koja su vrlo važna u uvjetima stresa, npr. u organizmu. Kolesterol povećava rigidnost strukture, štiti niosome od destabilizirajućih učinaka plazmatskih i serumskih čimbenika te smanjuje permeabilnost vezikule za uklopljeno otapalo (Marianecci i sur., 2014).
Svojstva niosomskih vezikula varijabilna su i lako se kontroliraju (Aqil i sur., 2013).

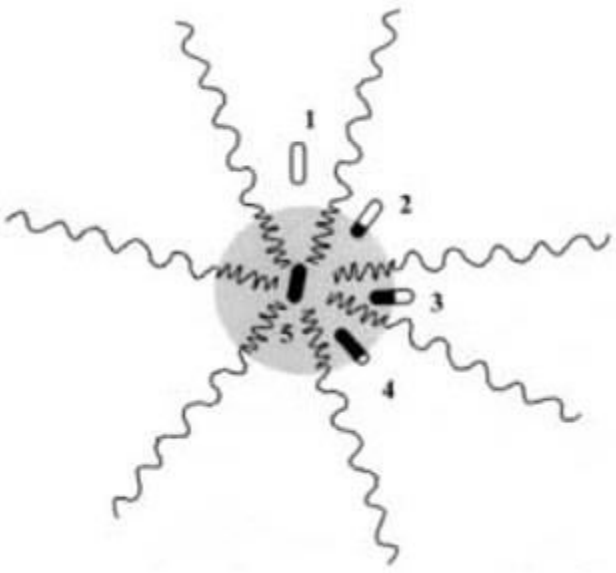
1.3. Micele

Micele nastaju samoorganizacijom surfaktantnih molekula u tekućem mediju kada je koncentracija surfaktanta iznad kritične micelizacijske koncentracije (CMC) i uz kritičnu micelizacijsku temperaturu (Bilia i sur., 2015). Tradicionalne micele fosfolipidnog su sastava (Wang i sur., 2014).
Oblikovanje micele događa se kao odgovor na amfifilnu strukturu molekula, koje se sastoje od polarne glave i hidrofobnog nepolarnog lanca. Surfaktanti se spontano orijentiraju kako bi zaštitili dio molekule koji nema sličnosti s disperzijskim sredstvom. Posljedično, u vodenom mediju nastaje micela s hidrofobnom jezgrom u koju se može uklopiti lipofilna djelatna tvar i na taj način joj povećati prividnu topljivost u vodi, biodostupnost te smanjiti razgradnju i gubitak. S obzirom da nepolarni dijelovi molekule tvore hidrofobnu jezgru, polarne glave su u dodiru s vodenim medijem i čine hidrofilni omotač micele (Bilia i sur., 2015). Najvažniji čimbenici koji uvjetuju oblik i veličinu micele su dužina nepolarnog lanca, veličina i karakter polarne ionske glave, pH otopine, temperatura i prisutnost otopljenih tvari.
Veličina micele opisuje se agregacijskim brojem, a što je broj amfifilnih molekula koje oblikuju micelu (Bilia i sur., 2015). Veličinom u promjeru micele se kreću između 10 i 100 nm (Wang i sur., 2014).

1.3.1. Polimerne micele

Polimerne micele izgrađene su od blok kopolimera koji se sastoje od hidrofobne i hidrofilne monomerne jedinice. Ukupna kopolimerna molekula naziva se unimerom (Pepić, 2005). Najčešći hidrofilni monomer je polietilenoksid (PEO) relativne molekulske mase 1000–12000 i duljine veće ili jednake duljini hidrofobnog dijela. Izložen vodenoj sredini izrazito je hidratiziran čime se postiže sterička stabilizacija sustava i sprječava koagulacija. Netoksičan je i neimunogen.

Hidrofobni dio kopolimerne micele razlikuje se i određuje različita fizikalno-kemijska svojstva te omogućuje uklapanje različitih molekula djelatnih tvari (Pepić, 2005).



Slika 3. Mogući smještaj lijeka unutar micelarnih odjeljaka (Pepić, 2005).

Primarni je razlog stvaranja micela postizanje stanja minimuma slobodne energije. Kritična micelizacijska koncentracija je minimalna koncentracija kopolimera pri kojoj u otopini nastaju micele u dinamičkoj ravnoteži sa slobodnim unimerima. Analogno tome, do kritične micelizacijske temperature u otopini su prisutni unimeri, a iznad te temperature nastaju micele. CMC vrijednosti smanjuju se s povećanjem temperature (Pepić, 2005).

Blok kopolimeri imaju veću tendenciju stvaranja micela od niskomolekulskih površinski aktivnih tvari zbog znatno veće duljine hidrofobnog dijela molekule. Nastale micele imaju niže CMC vrijednosti (mikromolarno područje) te su termodinamički stabilnije. Disocijacija je sustava nakon razrjeđenja sporija, čime je poboljšana i kinetička stabilnost sustava. Zbog toga se lijek dulje zadržava u micelarnom sustavu, zaštićen od inaktivacije vanjskim čimbenicima i povećava se mogućnost akumulacije u ciljnom tkivu. Kopolimerni micelarni sustavi imaju i veći solubilizacijski kapacitet zbog većeg broja micela koje nastaju pri samoorganiziranju (niže CMC vrijednosti) i/ili veće hidrofobne jezgre micele. Nadalje, veličina je micela nekoliko desetina nanometara, što također pridonosi postojanosti sustava nakon parenteralne primjene (Pepić, 2005).

Na oslobađanje djelatne tvari iz micele utječu: stabilnost micele, brzina difuzije djelatne tvari, koeficijent raspodjele i brzina razgradnje kopolimera, koncentracija djelatne tvari unutar micele, molekularna veličina djelatne tvari, fizikalno-kemijska svojstva djelatne tvari te

položaj djelatne tvari unutar micele. Također, oslobađanje djelatne tvari u određenom području mogu modificirati vanjski fizikalni podražaji kao što su promjena pH, temperatura, UV zračenje, svjetlost itd (Aqil i sur., 2013).

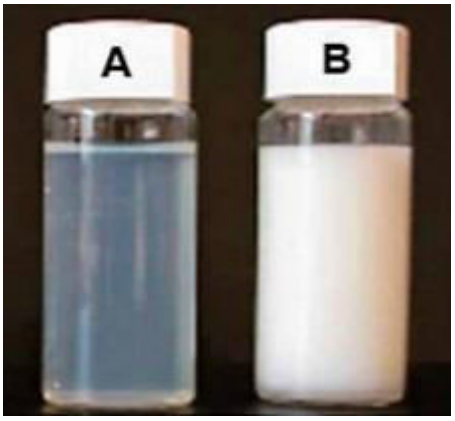
Polimerne micele povećavaju prividnu topljivost djelatne tvari, produžuju vrijeme cirkulacije djelatne tvari te omogućuju ciljanu dostavu, relativno se jednostavno mogu proizvesti i imaju nisku toksičnost. One također modificiraju farmakodinamička svojstva djelatne tvari mijenjanjem puta internalizacije i substanične lokalizacije djelatne tvari te inhibicijom P-glikoproteinskog prijenosa djelatne tvari.

Zbog povećane permeabilnosti i retencije, polimerne micele povećavaju koncentraciju djelatne tvari u tumorskom tkivu tzv. mehanizmom pasivnog ciljanja.

U usporedbi s drugim nanotehnološkim nosačima, stabilniji su sustavi s većim kapacitetom uklapanja djelatne tvari (Aqil i sur., 2013).

1.4. Nanoemulzije

Nanoemulzije su transparentni termodinamički stabilni sustavi dvaju tekućina koje se ne miješaju, kao što su ulje i voda, a koji su stabilizirani međupovršinskim filmom surfaktantih molekula. Dispergirana faza obično je u obliku kapljica veličine 5-200 nm.



Slika 4. Transparentna nanoemulzija (A) i mliječno bijela (makro)emulzija (B) (Pepić i sur., 2012).

Nanoemulzije nastaju bez velikog utroška energije, a ponekad i spontano. Takav, termodinamički stabilni sustav postiže se dodatkom kosurfaktanta smjesi ulja, vode i surfaktanta. Kosurfaktant smanjuje površinsku napetost na dodirnoj površini faza, omogućujući spontani nastanak nanoemulzija. Nažalost, zbog velike količine korišteng

surfaktanta, neophodna su ispitivanja biokompatibilnosti nanoemulzija (Devarajan i Ravichandran, 2011).

Najčešći tipovi nanoemulzija su: ulje u vodi (kapljice ulja dispergirane u vodenom disperznom sredstvu), voda u ulju (kapljice vode dispergirane u uljnoj fazi), bidisperzne nanoemulzije (mikrodomene ulja i vode su interdispergirane unutar sustava). Nanoemulzije imaju veliki kapacitet uklapanja djelatne tvari. Hidrofobne molekule uklapaju se u nanoemulzije tipa U/V, dok se hidrofilne uklapaju u nanoemulzije tipa V/U. Uklopljene molekule otopljene su u disperznoj fazi nanoemulzije (Pepić i sur., 2012).

Nanoemulzije povećavaju prividnu topljivost lipofilnih molekula, povećavaju apsorpciju i biodostupnost, štite molekulu od oksidacije i hidrolize, mogu prenositi hidrofilne i hidrofobne djelatne tvari, mogu se primjenjivati na različite načine (Devarajan i Ravichandran, 2011).

Tablica 1. Najčešće sirovine koje se koriste za izradu mikroemulzija (Pepić i sur., 2012)

Funkcija	**Podrijetlo**	**Sirovine**
Hidrofobna faza	Prirodna ulja	maslinovo, sojino, kukuruzno, kokosovo, ricinusovo, jojobino
	Sintetska ulja	izopropilni miristat, izopropilni palmitat, etilni laurat, oleinska kiselina, cetilni behenat
Površinski aktivne tvari (PAT); surfaktanti	Prirodne	lecitin, alkilni glukozidi, alkilni esteri sintetske
	Sintetske	anionske: Na-dodecilsulfat, Na-lauretsulfat neionske: Tween, Span, Brij, Pluronic, cetanol, kokoamidni monoetanolamin kationske: cetiltrimetilamonijev bromid amfolitske: dodecilni betain, kokamidopropilni betain
Kosurfaktanti	Prirodni	fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilglicerol i njihovi derivati
	Sintetski	etanol, izopropanol, propanol, transkutol, polietilenglikol (PEG), propilenglikol
Hidrofilna faza		voda

1.4.1. Samoemulgirajući nanonosači djelatnih tvari

Samoemulgirajući nanonosači djelatnih tvari (engl. Self-nanoemulsifying delivery systems; SNEDDS) formulacije su izotropne smjese ulja, nutrijenata ili djelatnih tvari, surfaktanta i kosurfaktanta. Ovi oblici znatno poboljšavaju oralnu apsorpciju jako hidrofobnih tvari.
SNEDDS se primjenjuje oralno u čvrstom, tekućem ili polutekućem obliku, a uslijed blagog podražaja u gastrointestinalnom traktu, dispergira se u gastrointestinalnoj tekućini, stvarajući finu U/V emulziju u koju je uklopljena hidrofobna aktivna tvar (Wang i sur., 2014).

1.5. Nanočestice

Nanočestice su koloidne čestice veličine od 10-1000 nm i mogu biti sintetizirane iz lipida, proteina, polisaharida, prirodnih i sintetskih polimera. Djelatna tvar može biti otopljena, uklopljena ili adsorbirana na matriks nanočestice. Nanočestice se koriste za poboljšanje terapijskog indeksa djelatne tvari zaštitom od enzimske razgradnje, prilagodbom farmakokinetičkih svojstava, smanjenjem toksičnosti ili osiguravanjem kontroliranog oslobađanja (Aqil i sur., 2013).
Prednosti korištenja nanočestica kao nosača djelatnih tvari uključuju:

- Veličina i površinska svojstva čestica mogu se jednostavno modificirati kako bi se postigla pasivna ili aktivna ciljana dostava djelatne tvari;
- Kontrolirano i kontinuirano oslobađanje djelatne tvari tijekom transporta i na mjestu djelovanja koje mijenja tkivnu raspodjelu i klirens djelatne tvari s posljedičnim povećanjem terapijskog djelovanja i smanjenja nuspojava;
- Kontrolirano oslobađanje i karakteristična razgradnja čestice mogu se modificirati odabirom različitih sirovina matriksa. Kapacitet uklapanja djelatne tvari relativno je velik te se molekule mogu inkorporirati u nanočestice bez kemijskog vezanja, što utječe na očuvanje biološke aktivnosti;
- Ciljano djelovanje može se postići vezanjem ciljanih liganada na česticu ili magnetskim usmjeravanjem;
- Farmaceutski oblici se mogu primjenjivati oralno, parenteralno, nazalno, intraokularno itd (Jahanshahi i Babaei, 2008).

Nanosfere su nanočestice s aktivnom tvari dispregiranom u matriksnoj osnovnoj strukturi, dok nanokapsule imaju polimernu ovojnicu i jezgru u koju je uklopljena aktivna tvar (Saraf, 2010).

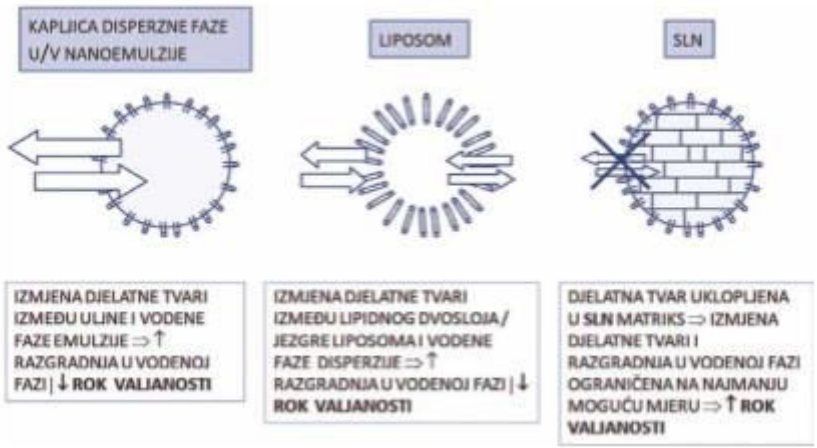
1.5.1. Lipidne nanočestice

Lipidne čestice su se razvile iz U/V emulzija s odgođenim oslobađanjem, čija je unutarnja lipidna faza zamijenjena lipidima koji su u čvrstom agregatnom stanju pri sobnoj temperaturi i temperaturi tijela. Aktivna je tvar uklopljena u čvrsti lipidni matriks čestice te je njezino oslobađanje usporeno (Xu i Lee, 2015)

Prvu generacija ovih lipidnih nanočestica predstavljaju čvrste lipidne nanočestice (engl. Solid lipid nanoparticles; SLN). Veličinom se kreću od 40-1000 nm, a s povećanjem udjela lipida povećava im se veličina (Goreta i Pepić, 2014). Njihova formulacija temelji se na krutim fiziološkim i biorazgradljivim lipidima, a glavne prednosti pred postojećim nanosustavima su izbjegavanje korištenja organskog otapala (čime je smanjena toksičnost) i visoka stabilnost *in vivo*, budući da ove čestice ostaju u krutom obliku na temperaturi tijela. Dodatno, čvrste lipidne nanočestice imaju sposobnost zaštite kemijski labilnih molekula od kemijske razgradnje i potencijal za modulaciju načina oslobađanja djelatne (aktivne) tvari.

Osnovni nedostatak SLN očituje se u vrlo niskom kapacitetu uklapanja djelatne (aktivne) tvari (Beloqui i sur., 2016; Lembo i Cavalli, 2010).

SLN se u pravilu pripravljaju iz fizioloških lipida ili lipida koji se općenito smatraju sigurnima za primjenu (engl. Generally recognized as safe; GRAS) (www.intechopen.com).



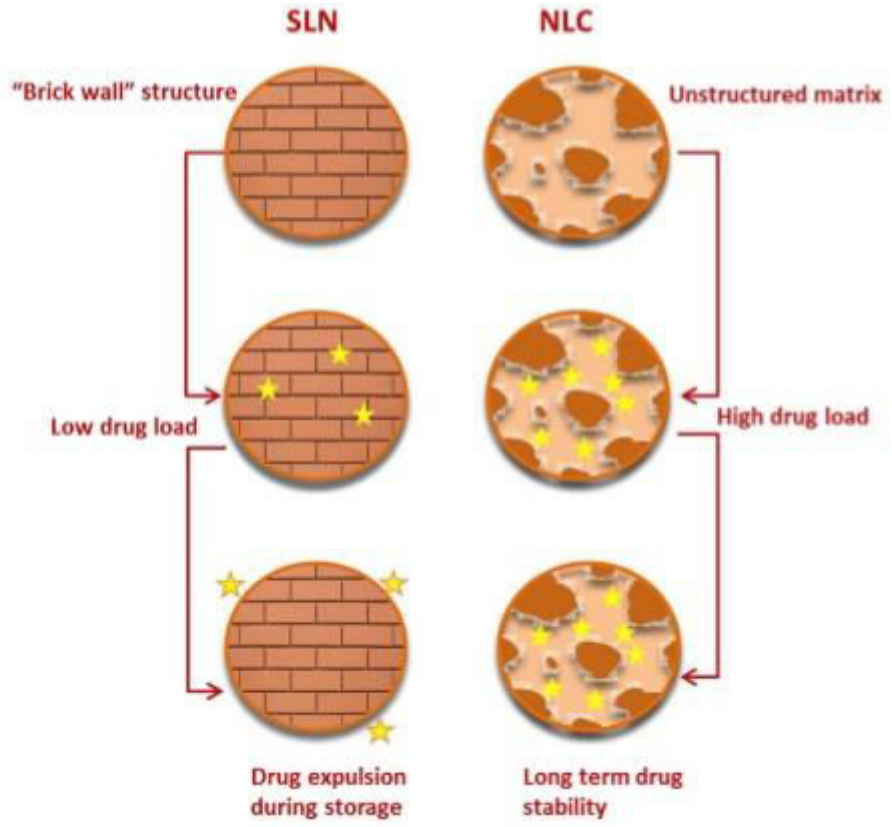
Slika 5. Čvrste lipidne nanočestice (SLN) značajno povećavaju stabilnost uklopljenih djelatnih tvari u usporedbi s djelatnim tvarima uklopljenim u hidrofobnu fazu U/V nanoemulzije i vodeni i/ili fosfolipidni odjeljak liposoma (Goreta i Pepić, 2014).

Nanostrukturirane lipidne čestice (engl. Nanostructured lipid particles; NLC) razvile su se iz potrebe za povećanjem kapaciteta uklapanja djelatne tvari u odnosu na kapacitet uklapanja u čvrste lipidne nanočestice. Korištenje kompleksnijih lipidnih struktura u hidrofobnoj jezgri omogućilo je uklapanje veće količine djelatne tvari (Wang i sur., 2014). Uklapanjem tekućih lipida u čvrsti matriks nanočestice formiraju se nesavršeni kristali u krutoj jezgri koja posljedično može uklopiti veću količinu hidrofobne djelatne tvari, uz očuvanu fizikalnu stabilnost čestice (Beloqui i sur., 2016).

Dugotrajna kemijska stabilnost uklopljenih djelatnih tvari postiže se njihovom učinkovitom zaštitom od oksidacije, hidrolize i/ili fotorazgradnje (npr. retinol, tokoferol, koenzim Q 10, askorbil-palmitat). Struktura i kompozicija lipidnog matriksa određuje profil oslobađanja uklopljenih tvari (Goreta i Pepić, 2014).

NLC se sastoje od nestrukturiranog krutog lipidnog matriksa izgrađenog od smjese čvrstih i tekućih lipida i vodene faze s jednim ili više surfaktanata. Udio čvrstih lipida kreće se od 70-99,9 %, tekućih lipida 30 %-0,1 %, a surfaktanta 1,5-5 % (Beloqui i sur., 2016).

Lipidne nanočestice potencijalno prevladavaju probleme stabilnosti lipidnog dvosloja i gubitka djelatne tvari koji su povezani s liposomima i konvencionalnim emulzijama (Lembo i Cavalli, 2010).



Slika 6. Razlika u građi čvrstih lipidnih nanočestica i nanostrukturiranih lipidnih nosača (Beloqui i sur., 2016).

Uklopljene hidrofobne djelatne tvari se nakon oralne primjene apsorbiraju u limfnim kapilarama tankog crijeva koje apsorbiraju masti iz hrane. Zatim se transportiraju iz intestinalnih limfnih žila u torakalni limfni dukt odakle, na račvištu jugularne i lijeve subklavikularne vene, ulaze u sistemski krvotok. Transport zaobilazi učinak prvog prolaska kroz jetru i time je biodostupnost lijeka značajno poboljšana (Wang i sur., 2014).

1.5.2. Polimerne nanočestice

Polimerne čestice oblikovane su iz prirodnih ili sintetskih polimera koji su visoko biokompatibilni. Prirodni polimeri koji se koriste su obično podijeljeni u dvije skupine: proteini (albumin, želatin i biljni proteini) i polisaharidi (celuloza, škrob, alginati, hitin, kitozan) (Saraf, 2010).

Jedini sintetski polimeri odobreni od FDA za humanu uporabu su: poli-D,L-mliječna kiselina (PLA), poliglikolna kiselina, kopolimer mliječne i glikolne kiseline (PLGA), poli-ε-kaprolakton i polimetilmetakrilat (Lembo i Cavalli, 2010).

PLGA je biokompatibilan i biorazgradljiv polimer koji u tijelu hidrolizira na mliječnu i glikolnu kiselinu. PLGA je odobren kao nosač za neke biljne djelatne tvari koji mogu biti uklopljeni unutar PLGA nanočestice ili adsorbirani na površinu nosača (Wang i sur., 2014).

1.6. Dendrimeri

Dendrimeri su savršeno uređeni monodisperzni nanostrukturirani polimeri s karakterističnom razgranatom strukturom koja potječe iz središnje jezgre. Veličinom su manji od 100 nm u promjeru i pružaju mogućnost vezanja ciljnih liganada na svoje ogranke (Lembo i Cavalli, 2010).

Dendrimere možemo podijeliti u tri različite regije: jezgra, ogranci i površinsko područje. Jezgra određuje oblik, veličinu, usmjerenje i multiplicitet dendrimera. Oko jezgre smještene su razgrante jedinice čije funkcionalne terminalne skupine čine periferni dio makromolekule. Identične monomerne jedinice vežu se oko jezgre tvoreći račvišta i strukturalno se razgranjuju u polimer nalik krošnji drveta. Povezani monomeri tvore slojeve oko jezgre, trodimenzionalno analogne slojevima glavice luka. Svaki od ovih slojeva između jezgre i periferije naziva se generacijom dendrimera (Silva i sur., 2012).

Sa svakom novom generacijom dendrimera (razgranatih jedinica), promjer čestice raste linearno, a broj skupina na površini čestice raste eksponencijalno. Gusto poredane skupine na površini mogu se konjugirati s molekulama djelatne tvari, ciljnim ligandima ili se mogu modificirati kako bi omogućile permeaciju kroz biološke barijere ili aktivirale citotoksičnost (www.intechopen.com).

1.7. Ciklodekstrini

Enzimskom razgradnjom škroba pomoću glukozil-transferaze nastaju ciklički oligomeri α-1,4 povezanih α-D-glukopiranozida nazvani ciklodekstrini. Takvi oligomeri od najmanje 6 glukopiranozidnih jedinica tvore supramolekularne strukture oblika krnjeg stošca s lipofilnom unutrašnjom šupljinom i hidrofilnom vanjskom površinom (Martin Del Valle, 2004). Ciklodekstrini stvaraju nekovalentne inkluzijske komplekse s različitim molekulama. U unutrašnju hidrofobnu domenu lako se uklapaju molekule koje su slabo topljive u vodi, dok vanjska hidrofilna površina omogućuje otapanje kompleksa u vodenom mediju.

Povećanjem topljivosti indirektno se povećava biodostupnost kompleksiranih djelatnih tvari. Takvi inkluzijski kompleksi štite molekulu djelatne tvari od razgradnje.

Ciklodekstrini povećavaju permeabilnost netopljivih lipofilnih djelatnih tvari dostavljajući ih na površinu biološke barijere, otkuda hidrofobna molekula slobodno difundira u biološke membrane, bez narušavanja strukture lipidnog dvosloja.

S obzirom da su aktivne molekule vezane na ciklodekstrine pomoću nespecifičnih hidrofobnih interakcija, one mogu lako disocirati na mjestima gdje postoji veći afinitet, npr. na vrlo lipofilnoj površini intestinalnog zida nakon oralne primjene lijeka, ili u dodiru s plazmatskim proteinima.

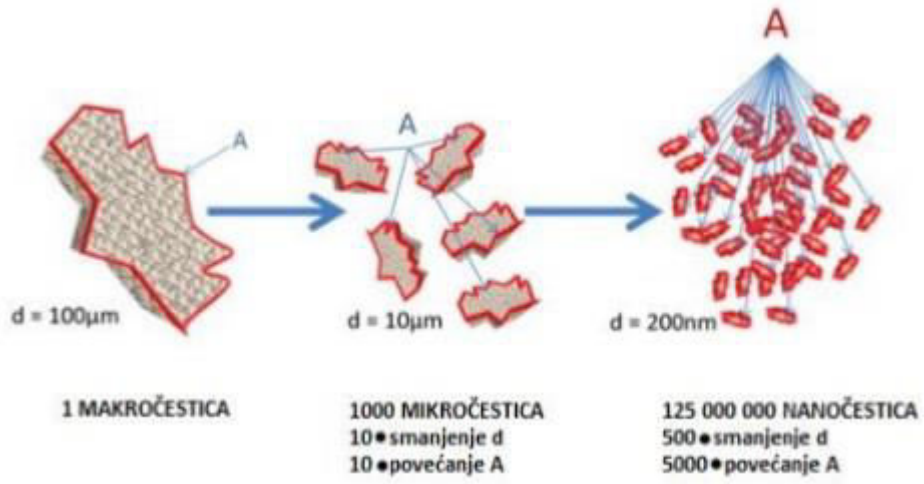
Ciklodekstrini se zbog svoje netoksičnosti i farmakološke inaktivnost koriste kao nosači djelatnih tvari i kao sirovina za izradu liposoma, mikrosfera, mikrokapsula i nanočestica (Aqil i sur., 2013).

1.8. Nanokristali

Nanonkristali su nanonizirane čestice teško topljivih djelatnih tvari, tj. smanjene na veličinu <1000 nm. To su agregati 100-10000 atoma udruženih u „klastere“ (Pepić, 2014).

Smanjivanjem veličine čestica krutine djelatne tvari povećava se broj čestica i specifična površina krutine, dok se istodobno smanjuje promjer čestica krutine.

Smanjivanjem veličine jedne makročestice krutine djelatne tvari promjera 100 μm na promjer od 10 μm standardnim postupkom mikronizacije, u sustavu od jedne makročestice nastaje 1000 mikročestica pri čemu se istodobno 10 puta povećava specifična površina krutine djelatne tvari. Međutim, ako se umjesto postupka mikronizacije primijeni postupak nanonizacije i veličina jedne makročestice promjera 100 μm smanji do veličine od 200 nm, tada u sustavu od jedne makročestice nastaje 125 000 000 nanočestica pri čemu se istodobno 5 000 puta povećava specifična površina krutine djelatne tvari, a promjer čestice smanjuje 500 puta (Beloqui i sur., 2016).



Slika 7. Povećanje specifične površine čestice smanjenjem njezine veličine (Pepić, 2014).

Brzina otapanja krutine djelatne tvari veća je što je veća specifična površina krutine s koje se odvija proces otapanja, pa je brzina otapanja nanonizirane krutine djelatne tvari u odnosu na mikroniziranu krutinu iste djelatne tvari značajno veća. Tako značajno povećanje specifične površine krutine djelatne tvari vrlo povoljno utječe i na njezina biofarmaceutska svojstva (adhezivnost i vrijeme zadržavanja na mjestu apsorpcije te varijacije u bioraspoloživosti nakon oralne primjene).

Nanokristali su vrlo jednostavan farmaceutski oblik razvijen u svrhu povećanja topljivosti teško topljivih djelatnih tvari, odnosno u svrhu poboljšanja bioraspoloživosti uz smanjenjenje učestalosti nuspojava. U odnosu na druge terapijske nanosustave, gdje je omjer djelatne tvari prema drugim sirovinama koje čine nanonosač nepovoljan zbog niskog uklapanja, nanokristali djelatne tvari građeni su gotovo u potpunosti od djelatne tvari, dok samo mali dio takvih nanosustava čine pomoćne tvari (stabilizatori) koji su odobreni za izradu lijekova. Kako bi se sprječila agregacija nanokristala u pripravku, oni se oblažu hidrofilnim polimerima (Pepić, 2014).

Uz vrlo mali udio sigurnih pomoćnih tvari, izrada lijeka korištenjem nanokristala djelatne tvari jednostavno se prilagođava laboratorijskom i industrijskom mjerilu (10 mg – 500 kg) i osigurava relativno brzi razvoj konačnog farmaceutskog oblika.

Dosad odobreni nanokristalni lijekovi primjenjuju se isključivo oralnim i parenteralnim putovima (Lovrić i sur., 2015).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Prirodni produkti naročito su važni u kliničkoj primjeni. Procjenjuje se da je u zadnjih 30 godina više od 50 % odobrenih farmaceutskih oblika prirodnog porijekla ili inspirirano prirodnim produktima. Kao sekundarni metaboliti bioloških sustava, često se smatraju sigurnijima za primjenu i aktivnijim od sintetičkih djelatnih tvari.

Biljni lijekovi općenito djeluju na više signalnih bioloških putova i opsežno mijenjaju gensku ekspresiju, što rezultira širokim spektrom djelovanja, prikladnijim za liječenje multifaktorijalnih bolesti. Međutim, fizikalno-kemijska svojstva takvih lijekova često ograničavaju njihovu farmaceutsku upotrebu. Molekule biološkog podrijetla često su nestabilne i podložne razgradnji ili oksidaciji. Većina njih praktično je netopljiva u vodi, pokazujući slabu biodostupnost na mjestu djelovanja i zahtijevajući vrlo visoku primjenjenu dozu za postizanje učinka. S druge strane, mnoge djelatne tvari iz bioloških ekstrakata vrlo su dobro topljive u vodi i/ili imaju veliku molekularnu veličinu, zbog čega ne mogu prolaziti lipidne biološke barijere i stoga pokazuju lošu apsorpciju.

Opisani nedostatci pokušavaju se prevladati primjenom nanotehnoloških nosača za dostavu djelatnih tvari. Uklapanjem djelatnih tvari u nanonosače moguće je poboljšati njihovu topljivost i biodostupnost, povećati stabilnost, smanjiti toksičnost te poboljšati biološku aktivnost.

Nanotehnološki nosači omogućuju uvođenje niza poželjnih svojstava za dostavu djelatne tvari uključujući:

- Kontinuirano i kontrolirano oslobađanje djelatne tvari;
- Duboka penetracija u tkivo zbog nanometarske veličine;
- Stanični unos djelatne tvari i prijenos na substaničnoj razini;
- Zaštita uklopljenih molekula na ekstracelularnoj i intracelularnoj razini (Bilia i sur., 2015).

Nanometarski sustavi veličinom se nalaze na skali do 100 nm, a na istoj skali se događa i većina bioloških procesa uključujući signalne procese, enzimske reakcije itd (Wang i sur., 2014).

Nanolijekovi su stabilni u krvotoku, netoksični, netrombogeni, neimunogeni, ne izazivaju upalni odgovor, ne aktiviraju neutrofile, biorazgradljivi su i primjenjivi za dostavljanje širokog spektra različitih molekula (Aqil i sur., 2013).

Osnovne značajke nanosustava koje određuju njihovu funkciju su:

- Veličina čestice;
- Zeta potencijal čestice iz kojeg saznajemo o naboju na površini čestice;
- Indeks polidisperznosti koji opisuje raspodjelu veličina čestica u sustavu;
- Fizikalna i kemijska stabilnost;
- Uspješnost uklapanja koja je definirana kao masa uklopljene djelatne tvari podijeljena s teorijskom masom djelatne tvari korištene za izradu sustava ×100 %;
- Kapacitet uklapanja koji je definiran kao masa uklopljene djelatne tvari podijeljena s masom nanočestica × 100% (Wang i sur., 2014).

3. MATERIJALI I METODE

Pretraživanje literature online baza podataka obavljeno je elektroničkim putem pomoću umreženog računala koje ima online pristup bazama podataka. Pretražene su bibliografska baza podataka (PubMed) i baza podataka s cjelovitim tekstom (Science Direct).

Literatura je pretražena prema temi istraživanja, predmetu istraživanja, autorima i časopisu. Pri pretraživanju literature traženi su odgovori na specifična pitanja vezana za problematiku ovoga diplomskog rada. Literatura je pretraživana od općih prema specijaliziranim člancima pri čemu su odabrani članci relevantni za problematiku ovoga diplomskog rada.

Relevantni članci proučavani su analitično i kritično, a vezano uz: definiranje znanstvenog i/ili stručnog problema, istraživanje postojećih znanja o definiranom problemu (literaturni navodi), oblikovanje radne hipoteze, odabir eksperimentalnih metoda za ispitivanje hipoteze, prikaz i analizu rezultata te izvedene zaključke. Pri proučavanju relevantnih članaka izdvojeni su najvažniji rezultati, rasprave i zaključci, koji su prikazani ovim diplomskim radom. Na temelju proučavanih članaka izvedena su vlastita razmatranja proučavane problematike, koja sastavni su dio ovoga diplomskog rada.

4. RASPRAVA

4.1. Liposomski biljni pripravci

4.1.1. Oblaganje nanosustava hidrofilnim polimerima

Nanosustavi s hidrofobnom površinom (liposomi, niosomi, nanočestice...) su podložni endocitozi i fagocitozi. Plazmatski proteini prepoznaju takve čestice kao strano tijelo te ih vrlo brzo opsoniziraju i odstranjuju lokalnim makrofagima u retikuloendotelnom sustavu (Aqil i sur., 2013, Wang i sur., 2014).

Nakupljanje nanočestica u lokalnim makrofagima može biti iskorišteno pasivnim usmjeravanjem djelovanja lijeka u slučajevima kronične upale ili tumora (Naksuriya i sur., 2014).

Ako se pak želi izbjeći prebrza eliminacija i dostaviti nanočestice u periferno bolesno tkivo, pomoću učinka permeacije i retencije, nanočestice se mogu obložiti polietilenglikolom (PEG) ili hidrofilnim kopolimerima koji povećavaju hidrofilnost sustava te omogućavaju produženu cirkulaciju u krvotoku (Aqil i sur., 2013, Naksuriya i sur., 2014).

Oblaganje hidrofilnim polimerima smanjuje interakcije među nanočesticama, kao i interakcije nanočestica s drugim molekulama, sprječava nespecifično vezanje na površinu nanočestice te izbjegava hvatanje mononuklearnim fagocitoznim sustavom (Sanna i sur., 2013).

Uspoređivana su farmakokinetička svojstva konvencionalnih i PEGiliranih liposoma. Obje liposomske formulacije imale su uspješnost uklapanja oko 70 % i prosječni promjer čestica oko 130-140 nm. Zdravim miševima intraperitonealno je primjenjivan slobodni artemisinin, liposomi i PEGilirani liposomi s uklopljenim artemisininom. Slobodni artemisinin brzo je uklonjen iz plazme te je jedva detektiran 1 sat nakon primjene. Obje liposomske formulacije su se mnogo dulje zadržale u krvotoku, artemisinin je bio detektibilan 3 odnosno 24 sata nakon primjene za konvencionalne odnosno PEGilirane liposome. $AUC_{0–24h}$ vrijednosti se se povećale otprilike 6 puta za obje liposomske formulacije u usporedbi sa slobodnim artemisininom. Nanouklapanjem u dugocirkulirajuće liposome se poluživot artemisinina povećao više od 5 puta (Isacchi i sur., 2011).

4.1.2. Povećanje stabilnosti prije apsorpcije u organizmu

Katehini zelenog čaja (*Camellia sinensis*) čine oko 8-15% ukupne mase sušenih listova čaja. Najveću biološku aktivnost među njima posjeduje epigalokatehin galat (EGCG), koji je također i najrasprostranjeniji i čini 25-55 % ukupnih katehina. EGCG ima antioksidativno, protuupalno, antikancerogeno i antiangiogeno djelovanje. Stabilan je u kiselom mediju, ali se brzo razgrađuje pri biološkom pH (7,4), stoga se uklapa u nanočestice sa svrhom povećanja stabilnosti.

Wang i suradnici uspoređivali su stabilnost EGCG, EGCG uklopljenog u liposome i EGCG uklopljenog u liposome s kitozanskom ovojnicom. Stabilnost je ispitana u staničnim kulturama (Wang i sur., 2014).

Pri 4° C, slobodni EGCG u 0,5 mM otopini potpuno se razgradio nakon 8 dana.

Pri istim uvjetima, udio raspadnutog EGCG uklopljenog u liposome odnosno u liposome s kitozanskom ovojnicom iznosio je 62 % odnosno 38 %.

Pri 37° C i nakon 1 sata inkubacije, u 0,5 mM otopini slobodnog EGCG, liposomskog EGCG odnosno liposomskog EGCG s kitozanskom ovojnicom, udio razgrađenog EGCG iznosio je 100 %, 46% odnosno 32%.

U drugom istraživanju slobodni EGCG, odnosno EGCG uklopljen u čvrste lipidne nanočestice, razgrađuju su se u vodenom mediju u potpunosti tijekom 4 sata odnosno tijekom više od 4 tjedna (Wang i sur., 2014).

4.1.3. Poboljšanje apsorpcije preko barijere rožnatog sloja

Verbaskozid je fenilpropanoidni glikozid prirodnog podrijetla, široko rasprostranjen u biljkama kineske medicine i biljkama istočnih zemalja. Njegovo biološko djelovanje je protuupalno, antitumorsko, antioksidativno i imunomodulacijsko.

Verbaskozid je vrlo dobro topljiv u vodi, međutim nestabilan u blago kiselom, neutralnom ili bazičnom vodenom mediju, što je ograničavajući čimbenik za njegovu kutanu primjenu (Bilia i sur., 2015).

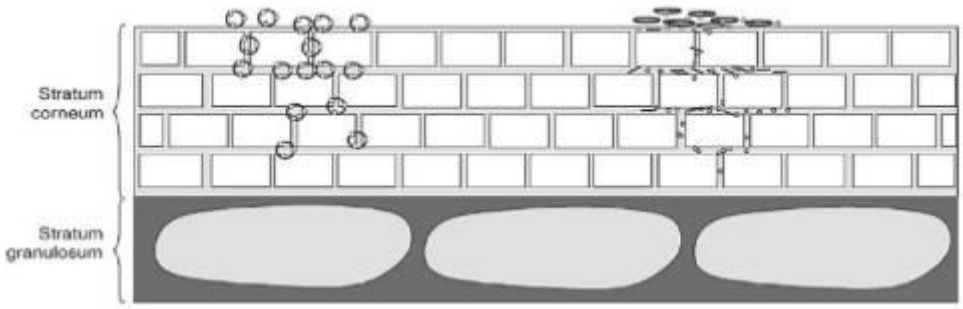
Kako bi se poboljšala njegova stabilnost i permeabilnost kroz kožu, verbaskozid je uklopljen u liposome. Ispitivanje *in vitro* na koži svinje je pokazalo da su liposomi povećali akumulaciju djelatne tvari u rožnatom sloju, međutim bez značajnog povećanja u

transdermalnoj dostavi. Tako uklopljeni verbaskozid zadržao je svoja antioksidativna svojstva i sposobnost hvatanja slobodnih radikala (Sinico i sur., 2008).

4.1.4. Deformabilni liposomi u (trans)dermalnoj primjeni biljnih tvari i pripravaka

Budući da konvencionalni liposomi povećavaju nakupljanje djelatne tvari u rožnatom sloju kože, ali ga ne uspijevaju dostaviti kroz slojeve kože, razvijenu su deformabilni liposomi.

Caddeo i suradnici ispitivali su u uvjetima *in vitro* sposobnost penetracije deformabilnih liposoma kroz slojeve kože. Korištene su dvije liposomske formulacije sa sigurnim i biokompatibilnim rubnim aktivatorima, lipofilnijih (HLB vrijednost 4) i hidrofilnijih (HLB vrijednost 16) svojstava. Rezultati ispitivanja difuzije kroz kožu pokazali su povećano lokalno nakupljanje djelatne tvari za deformabilne u usporedbi s konvencionalnim liposomima. Za svaku ispitivanu formulaciju, najveći udio resveratrola pronađen je u rožnatom sloju, a vrlo mali udio penetrirao je u dublje slojeve kože, živi epidermis i dermis. Deformabilni liposomi su pokazali 1,3-2,5 puta veći udio resveratrola u epidermisu u usporedbi s konvencionalnim liposomima. Nije zabilježen prolaz resveratrola u receptorski medij *in vitro* (oponaša biološke tekućine) niti za jednu formulaciju tijekom trajanja pokusa.
Dakle, podatci upućuju kako sinergistički učinak rubnih aktivatora s fosfolipidnim slojem može poboljšati penetraciju resveratrola kroz barijeru rožnatog sloja.
Slično ovim rezultatima, uklapanje resveratrola u niosome pokazalo je veliko nakupljanje u koži i nisku transdermalnu dostavu.
U drugom istraživanju resveratrol je uklopljen u transferosome i etosome. Oba sustava uspješno su uklapala resveratrol. Etosomi su omogućili difuziju resveratrola kroz kožu, za razliku od transferosoma čija permeacija u kožu nije zabilježena pri *in vitro* ispitivanju (Bilia i sur., 2015).



Slika 8. Ovisnost elastičnosti membrane vezikule na učinkovitost apsorpcije vezikule i/ili djelatne tvari u pojedine slojeve kože; intaktne deformabilne vezikule prodiru kroz rožnati sloj (lijevo); fuzija/disocijacija liposoma na površini kože i oslobađanje djelatne tvari (desno) (Goreta i Pepić, 2014).

Kvercetin je flavonoid biljnog podrijetla s farmakološkim djelovanjem hvatanja slobodnih kisikovih radikala, prevencije lipidne peroksidacije, kelacije metala i suzbijanja upale. Unatoč dobrom farmakološkom i sigurnosnom profilu, uporaba je kvercetina ograničena zbog slabe topljivosti u vodi i niske permeabilnosti kroz kožu.

Provedeno ispitivanje u kojem je kvercetin uklopljen u deformabilne liposome s različitim rubnim aktivatorima, pokazalo je poboljšanu permeaciju i nakupljanje u koži. Isto istraživanje ispitalo je biološku aktivnost ovog pripravka *in vivo* primjenom na kožu, na miševma kojima je kemijski izazvana upala kože. Određivana su dva biomarkera: stvaranje edema i mijeloperoksidazna aktivnost.

Pokazalo se da sve ispitivane vezikule kvercetina, među njima najviše liposomi s 5 % polietilenglikola, smanjuju upalu smanjenjem iritacije, edema i nakupljanja leukocita. Kvercetinske vezikule su također pokrenule obnovu strukture kože deorganizirane TPA-om, pokazale su mikroskopske metode.

U sljedećem ispitivanju mjerena je sposobnost biljnih tvari u smanjivanju oksidativne upale i infiltracije neutrofila, koja je ključna za cijeljenje kroničnih rana. Kvercetin i kurkumin su uklopljeni u konvencionalne i deformabilne liposome te su primjenjeni na TPA-om upaljenu kožu miševa. Mijeloperoksidazna aktivnost, koja se koristi za procjenu stadija upale, bila je značajno inhibirana kvercetinskim liposomima (59 %) te podjednako kurkuminskim konvencionalnim i PEG-iliranim deformabilnim liposomima (~68 %). Nadalje, histologija je pokazala da su PEG-ilirani deformabilni liposomi potaknuli ekstenzivnu reepitelizaciju oštećene kože, s višeslojnim debelim epidermisom (Bilia i sur., 2015).

Glicerosomi su fosfolipidne vezikule s visokim udjelom glicerola. Prisutnost glicerola može povećati stabilnost, elastičnost vezikula te njihovu dermalnu apsorpciju.
U istraživanju je uklopljen kvercetin u glicerosome s različitim koncentracijama glicerola (10-50 %). Ispitivana je prikladnost glicerosomskih vezikula za dermalnu upotrebu. Kvercetin uklopljen u glicerosomima, u usporedbi sa slobodnim i liposomskim oblikom, pokazao je snažnu sposobnost hvatanja slobodnih radikala i zaštite humanih keratinocita *in vitro* od vodikovog peroksida. Rezultati su pokazali da su glicerosomi s 40 i 50 % glicerola obećavajući sustavi za poboljšanje kutane dostave QUE i zaštite keratinocita od oksidativnog stresa (Bilia i sur., 2015).

4.1.5. Apsorpcija kroz mukoadhezivnu barijeru bukalne sluznice

Sikavica (*Silybum marianum*) je biljka izvrsnog farmakološkog profila. Silibin je glavni aktivni flavonoid iz standardiziranog ekstrakta sikavice, silimarina. Silimarin posjeduje hepatoprotektivno, antioksidativno djelovanje i sposobnost hvatanja slobodnih radikala, te protuupalno i antikancerogeno djelovanje. Aktivnost silibina je zbog slabe apsorpcije iz probavnog sustava (20-50 %) jače izražena nakon parenteralne u odnosu na oralnu primjenu (Fraschini i sur., 2002).
Niska biodostupnost koja proizlazi iz slabe gastrointestinalne apsorpcije, može se povećati uklapanjem silimarina u liposomske bukalne oblike. Za izradu stabilnih bukalnih liposomskih oblika koristi se lecitin iz soje.
U svrhu prevencije stvaranja liposomskih agregata, liposomi s uklopljenim silimarinom su pomiješani s praznim liposomima u omjeru 1:1. Ovakva smjesa pokazala je stabilnost mjerenjem učinkovitosti uklapanja, vizualnog zamućenja i veličine čestica nakon 3 mjeseca u uvjetima čuvanja pri 4 °C i pri sobnoj temperaturi.
Takva formulacija pokazuje mukoadhezivni učinak te deformabilnost uvjetovanu prisutnošću rubnog aktivatora Tween 20, a koja omogućuje protiskivanje liposoma kroz stanice bukalne mukoze. Formulacija se pokazala sigurnom pri kontaktu s bukalnom mukozom štakora (Saraf, 2010).

4.1.6. Povećanje stabilnosti tijekom skladištenja

Ispitivana su svojstva deformabilnih liposoma ovisno o kompoziciji formulacije, a izabrano je 8 različitih biokompatibilnih rubnih aktivatora s različitim HLB vrijednostima od 16 do 1, koji su dodani u lipofilni medij zajedno s resveratrolom i fosfolipidom, kako bi se dobila jasna slika učinka hidrofilnosti odnosno lipofilnosti surfaktanta na svojstva vezikula. Sve nastale vezikule bile su slične veličine (~100 nm), negativnog naboja (~-30 mV) i uspješno uklopljenog resveratrola u velikom udjelu (>74 %). Procijenjena je stabilnost vezikula tijekom 3 do 6 mjeseci skladištenja. *In vitro* ispitivanje pokazalo je da uklapanje djelatne tvari u vezikule ne utječe na njegovu antioksidativnu vrijednost niti na sposobnost hvatanja slobodnih radikala (Bilia i sur., 2015).

Drugo istraživanje proučavalo je stabilnost liposoma s uklopljenim verbaskozidom tijekom 6 mjeseci. Mjerenja su pokazala da su vezikule ostale stabilne 90 dana tijekom kojih nije došlo niti do gubitka djelatne tvari niti do promjene veličine vezikula (Sinico i sur., 2008).

4.1.7. Povećanje stabilnosti i biološke aktivnosti resveratrola

Resveratrol je polifenol biljnog porijekla antioksidativnog djelovanja sa svojstvom hvatanja slobodnih radikala, što bi se potencijalno moglo iskoristiti u zaštiti od UV zračenja i prevenciji malignih kožnih oboljenja. Resveratrol je vrlo slabo topljiv u vodi, slabo se apsorbira nakon oralne primjene. Dolazi u 2 strukturno izomerna oblika: cis i trans resveratrol. Pod utjecajem UV zračenja, trans-resveratrol prelazi u manje stabilan cis oblik. Takve nedostake moguće je prevladati dermalnom primjenom liposomskih oblika s uklopljenim resveratrolom (Bilia i sur., 2015).

Detoni i suradnici istraživali su fotostabilnost različitih oblika trans-resveratrola uključujući nanoliposome, SLN, nanosfere i polimerne nanočestice s lipidnom jezgrom. Stupanj fotostabilnosti takvih oblika uspoređivan je s onim etanole otopine trans-resveratrola. Svi ispitivani nanooblici *in vitro* odgodili su fotoizomerizaciju resveratrola, među njima je nanoliposomalni oblik trans-resveratrola ostao stabilan tijekom najdužeg vremena (Detoni i sur., 2012).

Dizajnirani su liposomi za primjenu *in vitro* na humane embrionske bubrežne stanice. Kolorimetrijski je praćen njihov učinak na preživljenje i proliferaciju stanica u normalnim i uvjetima stresa izazvanim UV-B zračenjem. Rezultati su uspoređivani s onima slobodnog RSV. Neočekivano, slobodni RSV pokazao je proliferacijski učinak obrnuto proporcionalan koncentraciji, tako je pri koncentraciji od 10 μM pokazao najveću fotozaštitu i povećanje proliferacije, dok je pri koncentraciji od 100 μM smanjio životnu aktivnost stanica. RSV uklopljen u liposome povećao je staničnu proliferaciju do 165 % neovisno o uklopljenoj dozi RSV koja je primjenjena (10 μM odnosno 100 μM). Nije primjećena toksičnost uklopljenog RSV čak niti u dozi od 100 μM. S obzirom na uspješnost uklapanja RSV u liposome i povećanje njegove biološke aktivnosti, ovo istraživanje upućuje na moguću strategiju u prevenciji i liječenju kožnih problema uzrokovanih UV zračenjem (Bilia i sur., 2015).

Tablica 2. Pregledni prikaz liposomskih biljnih pripravaka (Saraf, 2010)

Formulacija	**Aktivna tvar**	**Primjena nanoformulacije**	**Biološka aktivnost**	**Uspješnost uklapanja, %**	**Put primjene / model ispitivanja**
Liposomi s kvercetinom	Kvercetin	Smanjenje doze, lakši prolaz krvno moždane barijere	Antioksidativno, antitumorski	60	Intranazalno
Liposomi sa silimarinom	Silimarin	Povećana biodostupnost	Hepatoprotektivno	69,22+/-0,6	Bukalno
Liposomi s artemisia arborescens	Artemisia arborescens	Usmjeravanje esencijalnih ulja u stanice, povećana penetracija	Antiviralno	60-74	*In vitro*
Liposomi s ampelopsinom	Ampelopsin	Povećana učinkovitost	Antitumorski	62,30	*In vitro*
Liposomi s paklitakselom	Paklitaksel	Visoka uspješnost kapsuliranja i pH osjetljivost liposoma	Antitumorski	94	*In vitro*
Liposomi s kurkuminom	Kurkumin	Dugoživući liposomi s visokom uspješnosti kapsuliranja	Antitumorski	88,27+/-2,16	*In vitro*
Liposomi s garlicinom	Garlicin	Povećana učinkovitost	Pluća	90,77	-

Liposomi s flavonoidima	Kvercetin i rutin	Pojačano vezanje flavonoida s hemoglobinom	Hemoglobin	-	*In vitro*
Liposomi s β-CD s usninskom kiselinom	Usninska kiselina	Povećanje topljivosti i pasivno ciljanje djelovanja lijeka s produženim oslobađanjem	Antimikobakterijski	99,5	*In vitro*
Liposomi s vogoninom	Vogonin	Kontinuirano oslobađanje	Antitumorski	81,20+/-4,20	*In vivo*
Liposomi s kolhicinom	Kolhicin	Povećano nakupljanje u koži, produženo oslobađanje i povećana specifičnost mjesta djelovanja	Protiv gihta	66,3+/-2,2	Topikalno
Liposomi s katehinima	Katehini	Povećana permeacija kroz kožu	Antioksidativno i kemopreventivno	93,0+/-0,1	Trandermalno
Liposomi s breviskapinom	Breviskapin	Kontinuirano oslobađanje	Kardiovaskularne bolesti	87,9+/-3,1	Intramuskularno

4.2. Niosomski biljni pripravci

Tablica 3. Pregledni prikaz niosomskih biljnih pripravaka

Uklopljena biljna tvar	**Niosomski sastav**	**Tip ispitivanja**	**Poredbeni pripravak**	**Učinak niosomskog pripravka**	**Literatura**
Ginkgo biloba ekstrakt	Tw 80, Sp 80, CHOL	*In vivo*	Tablete ekstrakta	Povećana *in vivo* distribucija nakon oralne primjene	Jin i sur., 2013
Gymnema sylvestre ekstrakt	Sp 40	*In vivo*	Parenteralni pripravak ekstrakta	Značajno smanjenje glukoze u krvi i pojačana antihiperglikemijska aktivnost	Kamble i sur., 2013
Silimarin	Različiti niosomski pripravci	*In vivo*	Silimarinska suspenzija	Smanjenje razina transaminaza i serumske fosfataze	El-Ridy i sur., 2012
Papain u gelu	Elastični niosomi uklopljeni u gel (Tw 61:CHOL:natrij kolat, 1:1:0,1)	*In vivo*	PLGA nanosfere s uklopljenim papainom	Bolja transdermalna apsorpcija papaina i smanjenje ožiljaka	Manosroi i sur., 2013
Ekstrakt rižinih mekinja	Kationski niosomi (Tw 61/CHOL/cetil-trimetilamonij bromid)	*In vitro*		Prikladan pripravak za topikalnu anti-androgenu alopeciju, visoka transfolikularna penetracija u kožu s zanemarivim sistemskim učinkom	Manosroi i sur., 2012
Elaginska kiselina	Sp 60, Tw 60	*In vitro*	Otopina elaginske kiseline	Učinkovitija dostava elaginske kiseline kroz epidermis i dermis	Junyaprasert i sur., 2012
Amonijev glicirizinat	Tw85, Sp 20, CHOL	*In vitro/in vivo*		Netoksičnost, dobra podnošljivost na koži i povećanje protuupalnog učinka	Marianecci i sur., 2012

4.2.1. Sinergistički učinak kombinacije antioksidansa u niosomima

Zanimljivo je da vezikularni sustavi istovremeno mogu uklopiti više različitih molekula. Tavano i suradnici razvili su nisome za kozmetičku upotrebu s resveratrolom, alfa tokoferolom i kurkuminom u pojedinačnim oblicima i u kombinacijama. Uklapanje resveratrol/kurkumin i alfa tokoferol/kurkumin kombinacija uzrokovalo je promjenu fizikalno-kemijskih svojstava niosoma, kao i njihovu uspješnost uklapanja aktivne tvari, u usporedbi s oblicima s pojedinačnim antioksidansima. *In vitro* ispitivanje pokazalo je kontroliranu i povećanu perkutanu permeaciju u usporedbi sa slobodnim otopinama antioksidansa koje su korištene kao kontrola. Nadalje, kombinacije antioksidansa pokazale su sinergistički učinak u redukciji slobodnih radikala (Tavano i sur., 2014).

4.3. Micelarni biljni pripravci

4.3.1. Povećanje biodostupnosti kvercetina uklapanjem u samoemulgirajuću nanoemulziju

Kvercetin se u tijelu vrlo brzo metabolizira jetrenim i drugim tkivnim enzimima, pa su pronađeni 21 metabolit kvercetina u urinu. Krvne koncentracije slobodnog kvercetina nakon oralne primjene su vrlo niske, ali su izmjerene visoke koncentracije njegovih konjugiranih oblika (glukuronid, sulfat, o-metil oblici itd.). Izradom nanooblika pokušava se odgoditi njegov metabolizam i održati razinu slobodnog kvercetina u krvi i drugim tkivima tijekom dužeg perioda (Wang i sur., 2014).

Li i suradnici pratili su plazmatske koncentracije aktivnih sastojaka ekstrakta lista kakija na animalnom modelu nakon oralne primjene. Ekstrakt je primjenjen u tabletiranom obliku, odnosno u samoemulgirajućem nanoobliku na dvijema grupama kratkonogih pasa zečara. Grupa kojoj je dan SNEDDS zabilježila je 1,5 puta veću plazmatsku koncentraciju kvercetina, glavnog aktivnog sastojka ekstrakta, nakon primjene (Li i sur., 2011).

4.3.2. Povećanje topljivosti artemisinina i kurkumina uklapanjem u nanomicelarne sustave

Artemisinin je djelatna tvar iz *Artemisia annus* L, biljke iz tradicionalne kineske medicine, koja se koristi za liječenje vrućice, uključujući i malariju. Artemisinin je seskviterpenski lakton koji je vrlo učinkovit protiv rezistentnih sojeva malarijskih uzročnika *Plasmodium* te ima nisku toksičnost (Bilia i sur., 2006). WHO preporučuje liječenje artemisininom ili nekim od semisintetskih derivata u kombinaciji sa konvencionalnim antimalarikom (engl. Artemisinin based combination therapy; ACT) u područjima zahvaćenim mutantnim, multirezistantnim sojevima plazmodija. Nedavna istraživanja upućuju na citotoksično djelovanje artemisinina prema tumorskim stanicama. Unatoč potencijalno vrlo zanimljivom biološkom djelovanju, uporaba artemisinina je ograničena zbog loše topljivosti u vodi i uljima. Laktonska endoperoksidna skupina ključna je za antimalarijski i antitumorski učinak, međutim također uvjetuje kemijsku nestabilnost i sklonost razgradnji (Bilia i sur., 2015).

Billia i suradnici uklopili su artemisinin u micelarnu disperziju oktanoil-6-O-askorbinske kiseline (ASC8). ASC8 je inovativni surfaktant s niskom CMC te s očuvanim antioksidativnim djelovanjem vitamina C, zbog čega djeluje kao hvatač slobodnih radikala. U istraživanju topljivosti korišten je NMR (nuklearna magnetska rezonanca, metoda spektroskopije) temeljen na translacijskoj difuziji (DOSY). DOSY razlikuje i identificira molekularne komponente u smjesi i istovremeno daje informaciju o veličini agregata i drugih struktura. Utvrđeno je da relativno male količine otopljenog artemisinina ne utječu na micelizaciju ASC8. Iz izmjerene konstante vezanja artemisinina na ASC8 i agregacijskog broja micele, izračunato je da se otprilike jedna molekula artemisinina veže na jednu ASC8 micelu. Topljivost artemisinina u D2O funkcija je koncentracije ASC8. Zasićena koncentracija artemisinina raste približno linearno s ASC8 koncentracijom iznad CMC, kao izravni dokaz topljivosti artemisinina u micelama. ASC8 micele povećale su prividnu topljivost artemisinina u vodi, te smanjivanjem dodira s otapalom, njegovu stabilnost (Bilia i sur., 2015).

U daljnjem ispitivanju, DOSY je korišten za proučavanje kapaciteta micela izgrađenih iz natrijevog dodecil sulfata (SDS) u koje su uklopljeni artemisinin i kurkumin, pojedinačno i u kombinaciji. Smještanjem hidrofobnih komponenti u unutarnju hidrofobnu jezgru, micele

povećavaju njihovu prividnu topljivost u vodenoj otopini i štite ih od razgradnje i gubitka (Bilia i sur., 2015).

Kurkumin je jeftin i dobro podnošljiv te bi njegovo kombiniranje s artemisininom moglo smanjiti dozu artemisinina i troškove terapije malarije. Nedostaci ovih dvaju spojeva kao što su niska topljivost u vodi, nepotpuna adsorpcija i brzi klirens, čine ih neprikladnima za farmaceutsku upotrebu.

40 mM SDS povećao je vodenu topljivost artemisinina 25 puta, 81 mM SDS 50 puta, dok je topljivost kurkumina povećana na 2 mM uz SDS 81 mM. Topljivost artemisinina i kurkumina u vodi, pojedinačno ili u kombinaciji, funkcija je koncentracija SDS ili ASC8 (Bilia i sur., 2015).

U drugom djelu istraživanja, ispitavano je ponašanje smjesa SDS i ASC8 u vodi i njihova sposobnost stvaranja micela i poboljšanja topljivosti i zaštite od oksidacije artemisinina. Otopina sa 40 mM SDS i 60mM ASC8 povećala je topljivost artemisinina 16 puta. Nakon dodatka 60 mM hidrogen peroksida (30 puta previše), gotovo pola artemisinina je ostalo stabilno, upućujući na potencijalno korisnu kombinaciju površinske aktivnosti i antioksidativnih svojstava (ASC8) (Bilia i sur., 2015).

4.3.3. Utjecaj volumena hidrofobnog lanca surfaktanta na kapacitet uklapanja micela

Kavain je kavalakton iz biljke *Piper methysticum* koja se tradicionalno koristi zbog narkotičkog djelovanja. Kavain posjeduje lokalno anestetsko djelovanje te je ispitivano njegovo uklapanje u micele za pripremu relativno jeftinog i jednostavnog topikalnog farmaceutskog oblika. U ispitivanju su korištene različite koncentracije različitih surfaktanata (SDS, ASC8, SLES-natrij lauril eter sulfat) i fizioloških otopina (glukoza i NaCl). Ispitivana je i struktura i svojstva micelarnih sustava. Korišteni surfaktanti imali su sličnu CMC, micelarni promjer i dužinu hidrofobnog lanca, ali su se značajno razlikovali u volumenu hidrofobnog lanca i hidrofilnog dijela micele. SDS micele imale su najveći hidrofobni volumen što je značajno utjecalo na kapacitet uklapanja kavaina koji je vrlo hidrofobna molekula. Hidrofobna jezgra SDS micela imala je najveći volumen u koji je mogla smjestiti najviše molekula kavaina. Posljedično, kavain je imao najveću prividnu topljivost u SDS micelama, u usporedi sa drugim ispitivanim micelarnim sustavima.

Prisutstvo NaCl ili glukoze nije značajno utjecalo na topljivost kavaina u micelarnim sustavima. Učinak glukoze prisutan je kod vrlo visokih koncentracija SDS i moguće je da utječe na smanjenje CMC SDS-a, povećavajući agregacijski broj, što za posljedicu ima smanjenu uspješnost kapsuliranja kavaina. Micele su značajno i linearno povećale prividnu topljivost kavaina u vodi. Pri maksimalnoj ispitivanoj koncentraciji surfaktanta, topljivost kavaina bila je 1600 puta povećana uz SDS micele, 1100 puta povećana za SLES micele i 160 puta povećana za ASC8 micele (Bilia i sur., 2015).

Tablica 4. Pregledni prikaz nanoemulzija s uklopljenim biljnim tvarima (Saraf, 2010)

Formulacija	**Aktivna tvar**	**Primjena nanoformulacije**	**Biološka aktivnost**	**Veličina kapljice, nm**	**Uspješnost uklapanja, %**	**Put primjene**
SNEDDS s Zedoary eteričnim uljem	Zedoary kurkuminsko ulje	Povećana disperzibilnost u vodi, stabilnost i oralna biodostupnost	Hepatoprotektivno, antitumorski, antibakterijski	68,3+/-1,6	30	Oralno
Triptolid mikroemulzija	Triptolid	Poboljšana penetracija kroz rožnati sloj kože	Protuupalno	<100	-	Topikalno
Docetaksel submikroemulzija	Docetaksel	Povećano vrijeme zadržavanja	Antitumorski	166,00	90	Intravenski
Berberin nanoemulzija	Berberin	Povećano vrijeme zadržavanja i apsorpcija	Antitumorski	56,80	0,50	Oralno
Silibin nanoemulzija	Silibin	Kontinuirano oslobađanje	Hepatoprotektivno	21,20	-	Intramuskularno
Kvercetin mikroemulzija	Kvercetin	Povećana penetracija u rožnati sloj i epidermis	Antioksidativno	10-100	0,3 %-na otopina	Topikalno

4.4. Mikro- i nanočestični biljni pripravci

4.4.1. Pasivno i aktivno usmjeravanje djelovanja lijeka

Nanosustavi pokazuju tzv. učinak pojačane permeacije i retencije kojim se objašnjava njihovo pojačano nakupljanje u tumorskom i upalnom tkivu. Zbog propustljive i razgranate

vaskulature bolesnog tkiva, više nanočestica iz krvotoka ulaze u njega nego u zdravo tkivo (Sanna i sur., 2013, Wang i sur., 2014). Zadnje se naročito odnosi na nanočestice s produženim vremenom cirkulacije (dugocirkulirajuće ili PEGilirane nanočestice) koje se onda pasivno nakupljaju u bolesnom tkivu (Aqil i sur., 2013).

Istraživanja su pokazala da nanokurkumin u odnosu na slobodni kurkumin djeluje pojačano inhibitorno na stanice raka, što proizlazi iz pojačanog nakupljanja nanokurkumina u tumorskom tkivu. Važno je napomenuti da prazne nanočestice (prazne nanoemulzije, PLGA nanočestice i nanočestice sa humanim serumskim albuminom) nisu utjecale na rast tumorskih stanica, iz čega se može zaključiti da su prazne nanočestice sigurne za primjenu (Wang i sur., 2014).

Kim i suradnici inokulirali su muške miševe s tumorskim stanicama, zatim, 5 dana nakon inokulacije, intravenski su im primjenjivali 10 mg/kg težine slobodnog odnosno nanokapsuliranog kurkumina svaki drugi dan tijekom 10 dana. U usporedbi sa kontrolnom skupinom kojoj je davana fiziološka otopina, slobodni odnosno nanokapsulirani kurkumin smanjili su veličinu tumora za 20 % odnosno za 45%, bez utjecaja na tjelesnu težinu miševa (Wang i sur., 2014).

Wang i suradnici su peritonejski injektirali slobodni odnosno nanokapsulirani kurkumin (SLN s kurkuminom) miševima. Nanokurkumin je dramatično povećao kurkuminske koncentracije u plućima i udvostručio inhibitorni učinak slobodnog kurkumina na upalne procese u plućima, što upućuje na moguću primjenu u terapiji astme (Wang i sur., 2014).

Hiperproliferativno tumorsko tkivo vrlo je metabolički aktivno te dodatnu energiju dobiva glikolizom koja uvjetuje kiselo okruženje. Stoga, moguće je dizajnirati pH osjetljive nanoprototipove koji će biti stabilni pri fiziološkom pH, ali će se raspadati i oslobađati aktivnu tvar pri promjeni pH u ciljanom tkivu, primjerice u kiselom okruženju tumorskog tkiva (Sanna i sur., 2013).

Paklitaksel uklopljen u pH osjetljive nanočestice u in vitro istraživanju na stanicama humanog raka dojke pokazao je značajno veću citotoksičnost u usporedbi sa pH neosjetljivim polimernim nanočesticama. U sljedećem istraživanju, pH osjetljive nanočestice s paklitakselom pokazale su veću antitumorsku aktivnost in vivo u odnosu na slobodni oblik lijeka (Aqil i sur., 2013).

Aktivno usmjeravanje podrazumijeva modifikaciju površine nanosustava vezanjem ciljanog liganda koji je specifičan za određeno tkivo (Sanna i sur., 2013). Ciljni ligandi uključuju

protutijela, peptide te domene koje se vežu na receptore. Povećana specifičnost lijeka omogućuje smanjenje doze i učestalosti doziranja te smanjenje nuspojava (Wang i sur., 2014). Punfa i suradnici konjugirali su protutijelo za P-glikoprotein na površinu PLGA nanočestica s uklopljenim kurkuminom. P-glikoprotein je izraženo eksprimiran na MDR (engl. Multi drug resistance) stanicama raka. Ciljna protutijela značajno su povećala specifično usmjeravanje i vezanje nanočestica za stanice tumora te dodatno povećala unos nanočestica u tumorske stanice (Punfa i sur., 2014).

Sanna i suradnici dizajnirali su polimerne nanočestice (PLGA-PEG) s uklopljenim EGCG za ciljanu dostavu. Na ovakve nanočestice vezan je dipeptid koji se veže na PSMA (engl. Prostate specific membrane antigen) i služi kao ciljni ligand. PSMA je transmembranski glikoprotein karakteristično eksprimiran na stanicama tumora prostate. Takav nanosustav značajno je pojačao vezanje za PSMA i povećao antiproliferativnu aktivnost *in vitro* na stanice koje eksprimiraju PSMA, bez utjecaja na normalne stanice (Sanna i sur., 2013).

4.4.2. Oblaganje nanočestica kitozanom

Kitozan je biokompatibilni polisaharid koji produžuje vrijeme cirkulacije nanočestica u krvi i djeluje kao promotor apsorpcije zbog svog pozitivnog naboja (Wang i sur., 2014). Proces endocitoze, kojim se većina nanočestica apsorbira, može se promovirati pridavanjem pozitivnog naboja na površinu čestice (Wang i sur., 2014).

Pozitivni naboj čestice povećava njezinu interakciju s epitelnim stanicama, koje nose negativni naboj na svojoj površini, te narušava lipidnu strukturu rožnatog sloja, što dovodi do povećane permeabilnosti (Argenta i sur., 2014).

Epigalokatehin galat (EGCG) katehin je biljnog porijekla koji se vrlo slabo apsorbira u ljudskom organizmu. Kitozanske nanočestice EGCG-a znatno povećavaju njegovu biodostupnost, povećavajući njegov unos u stanicu (Wang i sur., 2014).

In vitro istraživanje permeacije kroz stanice Caco-2, pokazalo je 2 puta povećan prolaz kitozanskih nanočestica s uklopljenim EGCG u usporedbi sa slobodnim oblikom EGCG. Sljedeće *in vitro* ispitivanje na izvađenom mišjem jejunumu pokazalo je 2 puta veći transport kitozanskih nanočestica s EGCG u odnosu na slobodni EGCG. Povećanje transcelularnog transporta može pridonijeti povećanoj intestinalnoj apsorpciji lijeka jer se nanočestice u

enterocitima apsorbiraju transcelularnim transportom, tj internaliziraju se u stanice enterocita (Wang i sur., 2014).
Dube i suradnici mjerili su plazmatske koncentracije EGCG u miševa nakon oralne primjene slobodnog oblika odnosno kitozanskih nanočestica s EGCG. Rezultati su pokazali povećanje plazmatske koncentracije EGCG od 1,5 puta za kitozanske nanočestice EGCG (Dube i sur., 2011).

Kurkuminske PLGA nanočestice mogu smanjiti akumulaciju reaktivnih slobodnih radikala u neuronima, smanjiti oštećenja nastala od oksidativnog stresa in vitro te povećati akumulaciju kurkumina u mozgu štakora. Takva istraživanja upućuju na potencijalnu primjenu kurkumina u prevenciji neurodegenerativnih bolesti (Wang i sur., 2014).

4.4.3. Poboljšanje topljivosti u vodi uklapanjem u lipidni odjeljak lipidnih nanočestica

Topljivost resveratrola u vodi je neznatna, međutim zbog svoje visoke topljivosti u organskim otapalima, lako se uklapa u lipidne odjeljke nanočestica, naročito u lipidne nanočestice. Uklapanjem u nanočestice, povećava se njegova prividna topljivost u vodi. Istraživanje je pokazalo 100 puta veću vodenu topljivost resveratrola uklopljenog u NLC (Wang i sur., 2014).
Drugo ispitivanje pokazalo je da nanostrukturirani lipidni nosači s uklopljenim kvercetinom imaju čak 1000 puta veću vodenu topljivost od slobodnog kvercetina (Wang i sur., 2014).

4.4.4. Kontinuirano oslobađanje biljnih tvari iz lipidnih nanočestica

Kontinuirano oslobađanje smanjuje potrebu učestalosti doziranja, dozu, nuspojave i povećava suradljivost pacijenata (Wang i sur., 2014).
Li i suradnici istraživali su na animalnom modelu kontinuirano oslobađanje kvercetina uklopljenog u čvrste lipidne nanočestice. Dvijema skupinama štakora dana je otopina slobodnog kvercetina, odnosno nanokvercetina, u dozi od 50 mg/kg te im je mjerena koncentracija u krvi tijekom 48 sati. Rezulati su pokazali 5 puta veću oralnu biodostupnost SLN-uklopljenog kvercetina (Wang i sur., 2014). Isto istraživanje pokazalo je kako su

primarna mjesta apsorpcije kvercetina ileum i kolon, zbog čega ga je potrebno uklapati u oblik sa sporim oslobađanjem, kao što su lipidne nanočestice.
Za razliku od slobodnog resveratrola, nanokapsulirani resveratrol se oslobađa kontinuirano. Iz NLC i SLN inkubiranih tijekom 4 sata na 25 °C i 37° C, oslobođeno je manje od 10 % resveratrola (Wang i sur., 2014).
Zapaženo je da se kvercetin iz nanočestica PLGA ili polimliječne kiseline, NLC, SLN oslobađa kontinuirano (Wang i sur., 2014). Također je zapaženo kontinuirano oslobađanje epigalokatehin galata i kurkumina iz nanooblika.

4.4.5. Povećanje biodostupnosti i apsorpcije biljnih tvari

Provedeno je *in vivo* istraživanje na muškom animalnom modelu. Nakon intravenske (10 mg/kg težine) i oralne (50 mg/kg težine) primjene slobodnog i nanokvercetina (nanostrukturirani lipidni nosači s kvercetinom) muškim Sprague-Dawley štakorima, mjerenja su pokazala 2,8 odnosno 2,0 puta veću biodostupnost plazmatskih koncentracija intravenske odnosno oralne primjene kvercetina u NLC obliku u odnosu na slobodni kvercetin.
Također je izmjereno značajno povećanje koncentracije nemetaboliziranog (slobodnog) kvercetina u krvi i produženo vrijeme zadržavanja u krvotoku NLC-vezanog kvercetina.
Povećanje topljivosti i biodostupnosti uz kontinuirano oslobađanje može povećati bioaktivnost kvercetina. Neki eksperimentalni podaci upućuju na mogući antikancerogeni učinak kvercetina, međutim još uvijek ne postoje klinički dokazi koji bi potvrdili tu tezu. Povećane tkivne koncentracije kvercetina potencijalno mogu otvoriti nova područja istraživanja (Wang i sur., 2014).
EGCG se vrlo slabo apsorbira u ljudi i pokusnih životinja. Uklapanje u nanosustave bi potencijalno moglo povećati stanični unos EGCG uslijed povećane stabilnosti i kontinuiranog oslobađanje (Wang i sur., 2014).

Frozza i suradnici oralno su primjenivali NLC s 5 mg/kg težine resveratrola *in vivo* na animalnom modelu tijekom 14 dana. U usporedbi sa slobodnim resveratrolom, NLC su povećali tkivne koncentracije resveratrola u tkivima štakora više od 2 puta. Trans resveratrol potentni je inhibitor ciklooksigenaze 1, te uzrokuje gastrointestinalna oštećenja kada se primjenjuje u slobodnom obliku, međutim uklapanjem u nanostrukturirane lipidne nosače, pokazuje veću gastrointestinalnu sigurnost (Frozza i sur., 2010).

Nanoresveratrol, uspoređivan sa slobodnim resveratrolom i praznim nanočesticama, može smanjiti produkciju reaktivnih slobodnih radikala i povećati antioksidativni kapacitet u staničnim kulturama i pokusnim životinjama (Wang i sur., 2014).

Tablica 5. Pregledni prikaz biljnih pripravaka koji se osnivaju na tehnologiji nanočestica (NČ) (Saraf, 2010)

Formulacija	**Aktivna tvar**	**Primjena nanoformulacije**	**Biološka aktivnost**	**Uspješnost uklapanja, %**	**Put primjene**
NČ triptolida	Triptolid	Pojačana penetracija kroz rožnati sloj kože	Protuupalna	-	Topikalno
NČ Cuscuta chinensis	Flavonoidi i lignani	Povećanje topljivosti u vodi	Hepatoprotektivni antioksidativni učinak	90	Oralno
SLN s uklopljenim triptolidom	Triptolid	Smanjenje toksičnosti	Protuupalni	-	Oralno
Nanokapsule s artemisininom	Artemisinin	Kontinuirano oslobađanje lijeka	Antitumorski	90-93	*In vitro*
NČ Radix Salvia Miltiorrhiza	Radix Salvia Miltiorrhiza	Povećanje biodostupnosti	Koronarna bolest srca, angina pectoris, infarkt miokarda	Do 96,68	*In vitro*
NČ s takselom	Taksel	Povećanje biodostupnosti i kontinuirano oslobađanje	Antitumorski	99,44	-
NČ s berberinom	Berberin	Kontinuirano oslobađanje	Antitumorski	65,40+/-0,70	*In vitro*
NČ s silibinom	Silibin	Visoka uspješnost uklapanja i stabilnost	Hepatoprotektivno	95,64	-
NČ s tetrandrinom	Tetrandrin	Kontinuirano oslobađenje	Pluća	84	*In vitro*
NČ s glicirizinskom kiselinom	Glicirizinska kiselina	Povećanje biodostupnosti	Protuupalno, antihipertenzivno	91,76	-

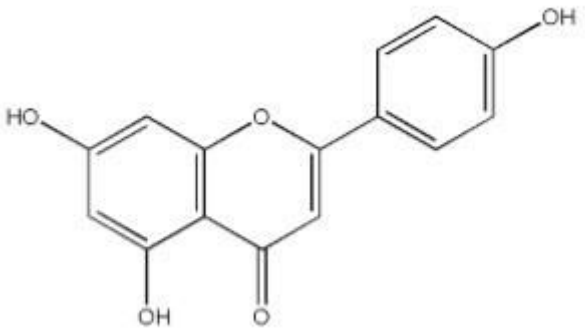
NČ s kvercetinom	Kvercetin	Povećanje antioksidativnog djelovanja i veće oslobađanje lijeka	Antioksidativno	Preko 99	*In vitro*
NČ s breviskapinom	Breviskapin	Duži poluživot lijeka i smanjenje odstranjenja RES-om	Kardiovaskularno i cerebrovaskularno	93,1	i.v.
Nanokapsule s Zedoary uljem kurkume	Zedoary ulje kurkume	Povećanje kapaciteta uklapanja lijeka i stabilnosti ulja	Hepatoprotektivno, antitumorski i antibakterijski	1,62+/-0,15	-
NČ s naringeninom	Naringenin	Povećanje topljivosti i oslobađanja naringenina	Hepatoprotektivno	-	Oralno
SLN s kurkuminoidima	Kurkuminoidi	Produženo oslobađanje kurkuminoida	Antitumorski i antioksidativno	70	In vitro
NČ s enkapsuliranim kamptotekanom	Kamptotekan	Produženo vrijeme cirkulacije i povećano nakupljanje u tumorskom tkivu	Antitumorski	>80	In vitro
NČ s ginkgo biloba ekstraktom	Gingko biloba ekstrakt	Poboljšanje cerebralnog protoka krvi i metabolizma	Aktivacija moždanih funkcija	-	oralno

4.5. Biljna tvar u obliku nanokristala

Jedno istraživanje proučavalo je nanokristalne djelatne tvari redom biljne flavonoide. Flavonoidi su skupina molekula sa istim flavonskim kosturom. U posljednje vrijeme otkriveni su različiti farmakološki učinci flavonoida: protuupalni, antioksidativni, *antiaging*, antikancerogeni i neuroprotektivni učinak. Nažalost, većina flavonoida, prema biofarmaceutskoj klasifikaciji, pripada u skupinu slabo topljivih, a permeabilnih djelatnih tvari. Zbog tog svojstva, njihova primjena je ograničena, ali zato su dobri kandidati za

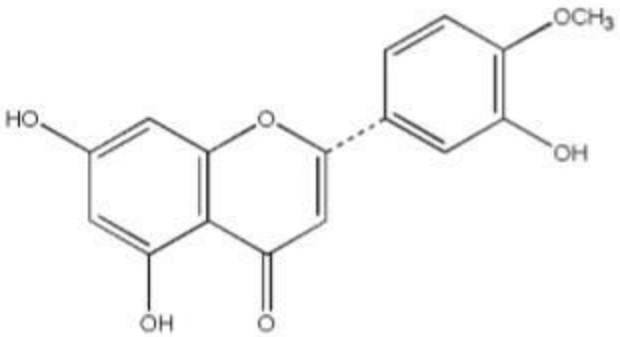
primjenu nanokristalne tehnologije koja bi im povećala topljivost i omogućila praktičnu upotrebu.

Apigenin, 5,7-dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4H-1-benzopiran-4-on,
ima–OH grupu na 5C, 7C i 4C' flavonskog kostura. Nalazi se u peršinu i celeru. Apigeninski prašak korišten je u komparativnom ispitivanju različitih flavonoida u proizvodnji nanokristala.



Slika 9. Strukturna formula molekule apigenina (Chen, 2013)

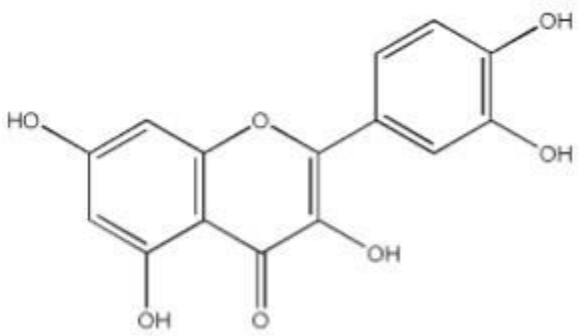
Hesperetin, (S)-2,3-dihidro-5,7-dihidroksi-2-(3-hidroksi-4-metoksifenil)-4H-1-benzopiran-4 on, ima–OH grupu na 5C, 7C, 5'C i–OCH3 grupu na 4'C flavonskog kostura.
Uglavnom se nalazi u citrusnim plodovima. Hesperetinski prašak korišten je u komparativnom ispitivanju različitih flavonoida u proizvodnji nanokristala.



Slika 10. Strukturna formula molekule hesperetina (Chen, 2013)

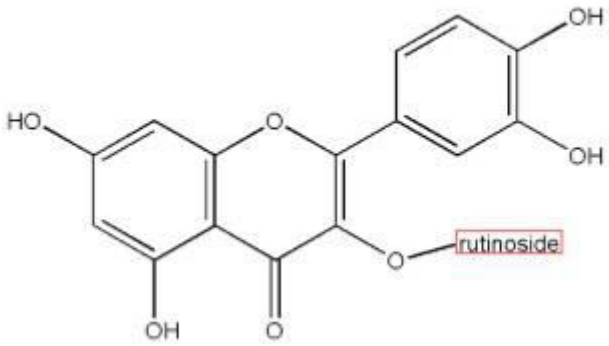
Kvercetin, 2-(3,4-dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksi-4H-1-benzopiran-4-on, ima –OH grupu na 5C, 7C, 4'C i 5'C na flavonolskom kosturu. Ima dokazano antioksidativno djelovanje. Široko je rasprostranjen u voću, povrću, zelenim listovima i žitaricama. Kvercetinski prašak

korišten je u komparativnom ispitivanju različitih flavonoida u proizvodnji nanokristala i u ispitivanju neuroprotekcije.



Slika 11. Strukturna formula molekule kvercetina (Chen, 2013)

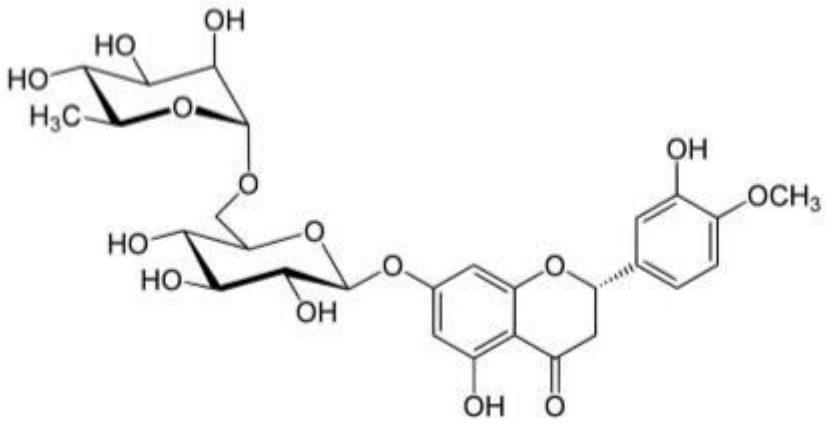
Rutin, 2-(3,4-dihidroksifenil)-5,7-dihidroksi-3-{[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-({[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihidroksi-6-metiloksan-2-il]oksi}metil)oksan-2-il]oksi}-4 H-kromen-4-on, još se naziva kvercetin-3-O-rutinozid. Vrlo je rasprostranjen u citrusnim plodovima. Rutinski prašak korišten je u komparativnom ispitivanju različitih flavonoida u proizvodnji nanokristala i kao model za razvijanje nove metode proizvodnje.



Slika 12. Strukturna formula molekule rutina (Chen, 2013)

Hesperidin, (2S)-5-hidroksi-2-(3-hidroksi-4-metoksifenil)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihidroksi-6-metiloksan-2-il]oksimetil]oksan-2-il]oksi-2,3-dihidrokromen-4-on, je 7O glikozid hesperetina. Također je vrlo rasprostranjen u citrusnim plodovima.

Hesperidin je korišten u industrijskom mjerilu proizvodnje nanokristala kako bi se ispitala reproducibilnost (Chen, 2013).



Slika 13. Strukturna formula molekule hesperidina (Chen, 2013)

4.6. Zaštićeni biljni nanotehnološki oblici

Liposome Herbasec (Cosmetochem) su standardizirani botanički ekstrakti uklopljeni su liposomske praške koji se rekonstituiraju pri dispergiranju u vodi. Takvi oblici dostavljaju biljne aktivne tvari u dublje slojeve epidermisa, izbjegavajući pritom upotrebu otapala. Dostupni su ekstrakti bijelog i zelenog čaja, standardizirani za kofein i ukupne polifenole, ekstrakt bijelog hibiskusa za voćne kiseline, ekstrakt guarane za kofein i bezaloinski ekstrakt aloe vere.

Slično, Indena je patentirala formulaciju Phytosome koja povećava dermalnu apsorpciju biljnih lijekova ili sistemsku biodostupnost pri oralnoj primjeni. Phytosome povećava mogućnost prelaženja bioloških barijera i ulaska lijeka u krvotok zbog svog fosfolipidnog sastava na koje su vezane aktivne tvari. Silipide je fitosomski pripravak Indene formuliran uz Phytosome tehnologiju kako bi premostio vrlo slabu gastrointestinalnu apsorpciju silibina, aktivnog sastojka iz silimarina, tj. ekstrakta sikavice. Silipide kompleks povećao je oralnu biodostupnost silibina u ljudi za 4,6 puta.

Ginkgoselect Phytosome ispitivan je na bolesnicima od Raynaudove bolesti u dvostruko slijepom, placebo-kontroliranom ispitivanju. Rezultati su pokazali zadovoljavajuće i značajno smanjenje učestalosti (56 %) i težine vazospastičnih Raynaudovih napadaja u danu.

Meriva Phytosome je kompleks kurkumina sa sojinim fosfatidilkolinima koji pokazuje značajno veću oralnu biodostupnost od standardiziranih ekstrakta kurkumina (www.phytosome.info, Saraf, 2010).

Paklitaksel je praktično netopljiv u vodi. Proteinske (albuminske) nanočestice s vezanim paklitakselom (Abraxane) klinički su odobrena formulacija kojom se izbjegava toksičnost kombiniranog otapala koji je dugo bio u upotrebi (Sanna i sur., 2013).

Istraživanja upućuju na pleotropni učinak kurkumina u terapiji tumora te se smatra da bi zbog toga mogao biti učinkovitiji od konvencionalnih citostatika (Naksuriya i sur., 2014). Iako kurkumin slobodno prelazi biološke membrane zbog svog lipofilnog karaktera, vrlo loša topljivost u vodi (0,6 μg/ml) i podložnost degradaciji pri fiziološkom pH, rezultiraju vrlo lošom oralnom biodostupnošću (oko 1 %) (Naksuriya i sur., 2014, Yallapu i sur., 2012).

Nanooblici kurkumina mogu povećati njegovu topljivost i zaštiti ga od inaktivacije hidrolizom (Naksuriya i sur., 2014). U upotrebi su pripravci s nanokurkuminom za poboljšanje farmakokinetičkih svojstava i/ili biološke aktivnosti: Liposomal curcumin (NanoLiposomal Nutritionals), NanoBioSphere complex (Life Enhancement Products), Curcumin C3 Complex vegetarian capsules (BestVite), Nanocurcumin (Konark Herbals & Health Care), CurcuPlus D Ultra (Advanced Orthomolecular Research), Nanocurcumin (SignPath Pharmaceuticals), Nutrivene Longvida curcumin (International Nutrition), Enhansa (Lee Silsby Compounding Pharmacy), Nanocurcumin/Nanocurcuma (Nano Tech Miso-N) (Yallapu i sur., 2012).

4.7. Toksičnost nanotehnoloških sustava za dostavu lijeka

Neke komponente nanočestica potencijalno su toksične. Nukleinske kiseline, fragmenti protutijela, peptidi i proteini mogu funkcionirati kao antigeni i djelovati imunotoksično.

Dodatno, ako su uspješnost enkapsuliranja i kapacitet enkapsuliranja nanosustava loši, bolesnici koji primaju terapiju bi konzumirali preveliku količinu surfaktanata i kosurfaktanata koji uzrokuju nuspojave.

Klinička ispitivanja mogu ustanoviti kratkoročnu toksičnost ovih sustava, međutim dugoročna toksičnost zbog kroničnog izlaganja ili nakupljanja je nepoznata. Problem leži u neprikladnosti in vivo modela za ispitivanje, nedostatku smjernica i standardiziranih varijabli testova sigurnosti (Wang i sur., 2014).

Jedan od primarnih mehanizama toksičnosti nanočestica je nastajanje reaktivnih kisikovih spojeva i slobodnih radikala uslijed imunološke reakcije na strano tijelo koja vodi do oksidativnog stresa, upale te poslejdičnog oštećenja membrana, proteina i DNA. Dodatno,

neka istraživanja ukazuju na neistražene učinke nanočestica na staničnim, substaničnim i razinama proteina (Aqil i sur., 2013).

Usmjeravanje nanosustava pomoću ciljanih liganada za dostavu na određeno mjesto djelovanja potencijalno bi moglo smanjiti toksičnost i nuspojave (Wang i sur., 2014).

5. ZAKLJUČCI

- Nanotehnološki nosači značajno povećavaju terapijski potencijal biljnih tvari i pripravaka.
- Uklapanjem biljnih tvari i pripravaka u nanonosače moguće je poboljšati njihovu topljivost, apsorpciju kroz fiziološke barijere te posljedično biodostupnost i biološku aktivnost.
- Nanotehnološki nosači štite uklopljenu djelatnu tvar od vanjskih čimbenika, čime se povećava stabilnost djelatne tvari, a smanjuje sistemska toksičnost.
- Fizikalno-kemijska svojstva nanotehnoloških oblika mogu se modificirati uporabom različitih sirovina pri izradi pripravka, oblaganjem hidrofilnim polimerima ili uporabom ciljnih liganada.
- Modifikacijom fizikalno-kemijskih svojstava nanoterapeutika postiže se pasivno ili aktivno usmjeravanje djelovanja lijeka i upravlja profilom oslobađanja lijeka.
- Nanotehnološki oblici biljnih tvari i pripravaka potencijalno mogu pomoći u terapiji i prevenciji kroničnih bolesti.
- Povećanjem biološke aktivnosti biljnih tvari i pripravaka otkrivaju se nova terapijska područja djelovanja.
- Vrlo je teško ustanoviti dugoročnu neškodljivost i netoksičnost nanotehnoloških pripravaka zbog nedostatka primjene u praksi i neprikladnosti *in vivo* modela.

6. LITERATURA

Aqil F, Mungala R, Jeyabalan J, Vadhanam MV. Bioavailability of Phytochemicals and its enhancement by drug delivery systems. *Cancer Lett*, 2013, 334, 133-141.

Argenta DF, Mattos CB, Misturini FD, Koester LS, Bassani VL, Simoes CMO, Teixeira HF. Factorial Design Applied to the Optimization of Lipid Composition of Topical Antiherpetic Nanoemulsions Containing Isoflavone Genistein, *Int J Nanomedicine*, 2014, 9, 4737-4747.

Banović J, Bego M, Cuković N, Vanić Ž. Lipidne vezikule za (trans)dermalnu primjenu lijekova, *Farm Glas*, 2011, 67, 229-241.

Beloqui A, Solinis MA, Rodríguez-Gascón A, Almeida AJ, Preat V. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine*, 2016, 12, 143-161.

Bilia AR, Bergonzi MC, Guccione C, Manconi M, Fadda AM, Sinico C. Vesicles and Micelles: Two Versatile Vectors for the Delivery of Natural Products. *J Drug Deliv Sci Tec,* 2015, 1-15.

Chen R. Tailor-made antioxidative nanocrystals: production and in vitro efficacy. Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin, 2013, 27-31.

Detoni CB, Souto GD, Maurer da Silva AL, Pohlmann AR, Guterres SS. Photostability and Skin Penetration of Different *E*-Resveratrol-Loaded Supramolecular Structures. *Photochem Photobiol*, 2012, 88, 913-921.

Devarajan V, Ravichandran V. Nanoemulsions: As Modified Drug Delivery Tool. Pharmacie Globale IJCP, 2011, 2.

Dube A, Nicolazzo JA, Larson I. Chitosan nanoparticles enhance the plasma exposure of (−)-epigallocatechin gallate in mice through an enhancement in intestinal stability. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 44, 422-426

.

El-Ridy MS, Badawi AA, Safar MM, Mohsen AM. Niosomes as a novel pharmaceutical formulation encapsulating the hepatoprotective drug silymarin. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2012, 4, 549-559.

Fraschini F, Demartini G, Esposti D. Pharmacology of Silymarin. *Clin Drug Invest*, 2002, 22-25.

Frozza RL, Bernardi A, Paese K, Hoppe JB, Silva T, Battastini AMO, Pohlmann AR, Guterres SS, Salbego C. Characterization of *trans*-Resveratrol-Loaded Lipid-Core Nanocapsules and Tissue Distribution Studies in Rats. *J Biomed Nanotech*, 2010, 6, 694-703.

Goreta R, Pepić I. Funkcionalne podloge i pripravci za dermalnu primjenu. *Farm Glas*, 2014, 70, 551-576.

Isacchi B, Arigucci S, Marca G, Bergonzi C, Vannucchi MG, Novelli A, Bilia AR. Conventional and long-circulating liposomes of artemisinin: preparation, characterization, and pharmacokinetic profile in mice. *J Liposome Res*, 2011, 21, 237-244.

Jahanshahi M, Babaei Z. Protein nanoparticle: A unique system as drug delivery vehicles. *Afr J Biotechnol*, 2008, 7, 4926-4934.

Jin Y, Wen J, Garg S, Liu D, Zhou Y, Teng L, Zhang W. Development of a novel niosomal system for oral delivery of *Ginkgo biloba* extract. *Int J Nanomedicine*, 2013, 8, 421-430.

Junyaprasert VB, Singhsa P, Suksiriworapong J, Chantasart D. Physicochemical properties and skin permeation of Span 60/Tween 60 niosomes of ellagic acid. *Int J Pharm*, 2012, 423, 303-311.

Kamble B, Talreja S, Gupta A, Patil D, Pathak D, Moothedath I, Duraiswamy B. Development and biological evaluation of *Gymnema sylvestre* extract-loaded nonionic surfactant-based niosomes. *Nanomedicine*, 2013, 8, 1295-1305.

Lembo D, Cavalli R. Nanoparticulate Delivery Systems for Antiviral Drugs. *Antivir Chem Chemother*, 2010, 21, 53-70.

Li W, Yi S, Wang Z, Chen S, Xin S, Xie J, Zhao C. Self-nanoemulsifying drug delivery system of persimmon leaf extract: Optimization and bioavailability studies. *Int J Pharm*, 2011, 420, 161-171.

Lipid Nanoparticulate Drug Delivery Systems: A Revolution in Dosage Form Design and Development, http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-novel-drug-carrier-systems/lipid-nanoparticulate-drug-delivery-systems-a-revolution-in-dosage-form-design-and-development, pristupljeno 21. 6. 2016.

Lovrić J, Hafner A, Radiković M, Juretić M, Dürrigl M, Lakoš Gp, Pepić I. Nanokristali djelatne tvari: fizičko-kemijska, farmaceutsko-tehnološka, biofarmaceutska i terapijska svojstva. *Farm Glas*, 2015, 71, 355-384.

Manosroi A, Chankhampan C, Manosroi W, Manosroi J. Transdermal absorption enhancement of papain loaded in elastic niosomes incorporated in gel for scar treatment. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 48, 474-483.

Manosroi A, Ruksiriwanich W, Abe M, Manosroi W, Manosroi J. Transfollicular enhancement of gel containing cationic niosomes loaded with unsaturated fatty acids in rice (Oryza sativa) bran semi-purified fraction. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 81, 303-313.

Marianecci C, Marzio L, Rinaldi F, Celia C, Paolino D, Alhaique F, Esposito S, Carafa M. Niosomes from 80s to Present: The State of the Art. *Adv Colloid Interface Sci,* 2014, 205, 187-206.

Marianecci C, Rinaldi F, Mastriota M, Pieretti S, Trapasso E, Paolino D, Carafa M. Anti-inflammatory activity of novel ammonium glycyrrhizinate/niosomes delivery system: human and murine models. *J Control Release*, 2012, 164, 17-25.

Martin Del Valle EM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem*, 2004, 39, 1033-1046.

Naksuriya O, Okonogi S, Schiffelers RM, Hennink WE. Curcumin Nanoformulations: A Review of Pharmaceutical Properties and Preclinical Studies and Clinical Data Related to Cancer Treatment. *Biomaterials*, 2014, 35, 3365-3383.

PAMAM Dendrimer as Potential Delivery System for Combined Chemotherapeutic and MicroRNA-21 Gene Therapy, http://www.intechopen.com/books/non-viral-gene-therapy/pamam-dendrimer-as-potential-delivery-system-for-combined-chemotherapeutic-and-microrna-21-gene-ther, pristupljeno 21. 6. 2016.

Pepić I, Vujičić M, Lovrić J, Filipović-Grčić J. Nanočestice u dermatokozmetičkim pripravcima: liposomi, mikroemulzije i polimerne micele. *Farm Glas*, 2012, 68, 763-772.

Pepić I. Kopolimerne micele: terapijski sustav za primjenu lijeka. *Farm Glas*, 2005, 61, 295-315.

Pepić I. Nanosustavi u kozmetičkim pripravcima. Predavanje, Zavod za farmaceutsku tehnologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2014.

Pepić I. Novi sustavi za primjenu lijeka u oko. *Farm Glas*, 2004, 60, 523-539.

Phytosome products, http://www.phytosome.info/, pristupljeno 22.6.2016.

Punfa W, Suzuki S, Pitchakarn P, Yodkeeree S, Naiki T, Takahashi S, Limtrakul P. Curcumin-loaded PLGA nanoparticles conjugated with anti- P-glycoprotein antibody to overcome multidrug resistance. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15, 9249-9258.

Romero EL, Morilla MJ. Highly deformable and highly fluid vesicles as potential drug delivery systems: theoretical and practical considerations. *Int J Nanomedicine*, 2013, 8, 3171-3186.

Sanna V, Siddiqui IA, Sechi M, Mukhtar H. Nanoformulation of Natural Products for Prevention and Therapy of Prostate Cancer. *Cancer Lett*, 2013, 334, 142-151.

Saraf AS. Application of Novel Drug Delivery System for Herbal Forlmulations, *Fitoterapia*, 2010, 81, 680-689.

Silva JR, Menacho F, Chorilli. Dendrimers as potential platform in nanotechnology-based drug delivery systems. *IOSR-PHR*, 2012, 2, 23-30.

Sinico C, Caddeo C, Valenti D, Fadda AM, Bilia AR, Vincieri FF. Liposomes as carriers for verbascoside: stability and skin permeation studies. *J Liposome Res*, 2008, 18, 83-90.

Tavano L, Muzzalupo R, Picci N, de Cindio B. Co-encapsulation of lipophilic antioxidants into niosomal carriers: Percutaneous permeation studies for cosmeceutical applications. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2014, 114, 144-149.

Verma P, Pathak K. Therapeutic and cosmeceutical potential of ethosomes: An overview. *J Adv Pharm Technol Res*, 2010, 1, 274-282.

Wang S, Su R, Nie S, Sun M, Zhang J, Wu D, Moustaid-Moussa N. Application of Nanotechnology in Improving Bioavailability and Bioactivity of Diet Derived Phytochemicals, *J Nutr Biochem,* 2014, 25, 363-376.

Xu W, Lee MK. Development and evaluation of lipid nanoparticles for paclitaxel delivery: a comparison between solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. *J Pharm Investig*, 2015, 45, 675-680.

Yallapu MM, Jaggi M, Chauhan SC. Curcumin Nanoformulations: a Future Nanomedicine for Cancer, *Drug Discov Today*, 2012, 17, 71-80.

7. SAŽETAK

Biljne tvari naročito su važne u kliničkoj primjeni zbog djelovanja na više signalnih bioloških putova i opsežnom mijenom genske ekspresije te posljedičnim širokim spektrom djelovanja, prikladnijim za liječenje multifaktorijalnih bolesti. Međutim, fizikalno-kemijska svojstva takvih tvari često ograničavaju njihovu farmaceutsku upotrebu. Molekule biološkog podrijetla često su nestabilne, praktično netopljive u vodi, zanemarive biodostupnosti ili imaju veliku molekularnu veličinu, zbog čega ne mogu prolaziti lipidne biološke barijere i stoga pokazuju lošu apsorpciju.

Uklapanjem biljnih tvari u nanonosače moguće je poboljšati njihovu topljivost i biodostupnost, povećati stabilnost, smanjiti toksičnost te poboljšati biološku aktivnost. Nadalje, nanotehnološki nosači omogućuju kontinuirano i kontrolirano oslobađanje biljne tvari, duboku penetraciju u tkivo te unos biljne tvari u stanice. Prilagodbom fizikalno-kemijskih svojstava nanoterapeutika postiže se pasivno ili aktivno usmjeravanje djelovanja djelatne tvari i upravlja se profilom njezinog oslobađanja, što bi potencijalno moglo pomoći u terapiji i prevenciji kroničnih bolesti.

Unatoč brojnim pozitivnim rezultatima pretkliničkih ispitivanja različitih nanotehnoloških oblika, njihovu djelotvornost i sigurnost primjene potrebno je potvrditi budućim kliničkim ispitivanjima.

8. SUMMARY

Natural products are especially important in clinical use due to their effect on various biological signal pathwys and due to their ability to change gene expression and act in broad spectrum, which makes them suitable for treatment of multifactorial diseases. Unfortunately, phisicochemical attributes of natural molecules often limit their pharmaceutical use. These products are usually unstable, insoluble in water, have very low bioavailability or have big molecular size, which prevents them from crossing lipid biological barriers and lowers the absorption.

Incapsulation of active molecules in nanotechnological carriers improves their solubility, bioavailability and stability, decreases toxicity and can increase biological activity. Additionally, nanotechnological carriers enable sustained and controlled release of active molecule, deep tissue penetration and intracellular delivery. By modifying phisicochemical properties of nanotherapeutics it is possible to achieve passive or active targeting and to control drug release patterns, which could help fighting chronical diseases.

Altough many successful preclinical trials of various nanotechnological carriers have been conducted, it is still necessary to affirm their effectivness, safety and nontoxicity in clinical trials and in practical use.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

NANOTEHNOLOŠKI NOSAČI BILJNIH TVARI I PRIPRAVAKA

Ana Škrbina

SAŽETAK

Biljne tvari naročito su važne u kliničkoj primjeni zbog djelovanja na više signalnih bioloških putova i opsežnom mijenom genske ekspresije te posljedičnim širokim spektrom djelovanja, prikladnijim za liječenje multifaktorijalnih bolesti. Međutim, fizikalno-kemijska svojstva takvih tvari često ograničavaju njihovu farmaceutsku upotrebu. Molekule biološkog podrijetla često su nestabilne, praktično netopljive u vodi, zanemarive biodostupnosti ili imaju veliku molekularnu veličinu, zbog čega ne mogu prolaziti lipidne biološke barijere i stoga pokazuju lošu apsorpciju. Uklapanjem biljnih tvari u nanonosače moguće je poboljšati njihovu topljivost i biodostupnost, povećati stabilnost, smanjiti toksičnost te poboljšati biološku aktivnost. Nadalje, nanotehnološki nosači omogućuju kontinuirano i kontrolirano oslobađanje biljne tvari, duboku penetraciju u tkivo te unos biljne tvari u stanice. Prilagodbom fizikalno-kemijskih svojstava nanoterapeutika postiže se pasivno ili aktivno usmjeravanje djelovanja djelatne tvari i upravlja se profilom njezinog oslobađanja, što bi potencijalno moglo pomoći u terapiji i prevenciji kroničnih bolesti.
Unatoč brojnim pozitivnim rezultatima pretkliničkih ispitivanja različitih nanotehnoloških oblika, njihovu djelotvornost i sigurnost primjene potrebno je potvrditi budućim kliničkim ispitivanjima.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 50 stranica, 13 grafičkih prikaza, 5 tablica i 46 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Nanotehnološki nosači, liposomi, niosomi, nanoemulzije, nanočestice, nanokristali, biljni pripravci

Mentor: **Dr. sc. Ivan Pepić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ivan Pepić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Jasmina Lovrić, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Marijana Zovko Končić, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2016.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Technology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Nanotechnological carriers of herbal preparations and substances

Ana Škrbina

SUMMARY

Natural products are especially important in clinical use due to their effect on various biological signal pathwys and due to their ability to change gene expression and act in broad spectrum, which makes them suitable for treatment of multifactorial diseases. Unfortunately, phisicochemical attributes of natural molecules often limit their pharmaceutical use. These products are usually unstable, insoluble in water, have very low bioavailability or have big molecular size, which prevents them from crossing lipid biological barriers and lowers the absorption.

Incapsulation of active molecules in nanotechnological carriers improves their solubility, bioavailability and stability, decreases toxicity and can increase biological activity. Additionally, nanotechnological carriers enable sustained and controlled release of active molecule, deep tissue penetration and intracellular delivery. By modifying phisicochemical properties of nanotherapeutics it is possible to achieve passive or active targeting and to control drug release patterns, which could help fighting chronical diseases.

Altough many successful preclinical trials of various nanotechnological carriers have been conducted, it is still necessary to affirm their effectivness, safety and nontoxicity in clinical trials and in practical use.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 50 pages, 13 figures, 5 tables and 46 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Nanotechnological carriers, liposomes, niosomes, nanoemulsions, nanoparticles, nanocrystals, herbal preparations

Mentor: **Ivan Pepić, Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ivan Pepić, Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Jasmina Lovrić, Ph.D. *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marijana Zovko Končić, Ph.D. *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2016.