

# Liposomi kao nosači djelatnih tvari biljnog porijekla

---

Palac, Mirna

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:760033>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Mirna Palac**

**Liposomi kao nosači djelatnih tvari biljnog  
porijekla**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2019.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Oblikovanje lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Željke Vanić.

Zahvala:

*Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Željki Vanić na pomoći i strpljenju pri izradi ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem svojoj obitelji, na svemu što mi je pružila, na pravom putu kojim me vodila te na tome što mi je omogućila bezbrižno studiranje i uvijek bili velika podrška.*

*Posebno želim zahvaliti svojoj sestri Zori koja mi je prije svega puno pomogla u izradi ovog diplomskog rada, bila uzor u svemu pa tako i u studiranju te bila „mentorica“ tijekom svih studentskih dana.*

*Veliko hvala mom dečku Filipu te svim mojim prijateljima koji su bili podrška i divno društvo tijekom studiranja. Bez njih studentski dani ne bi bili tako zabavni i opuštajući.*

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. BILJNI LIJEKOVI .....	1
1.2. LIPOSOMI: STRUKTURA I SVOJSTVA .....	3
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	8
3. MATERIJALI I METODE .....	9
4. RASPRAVA.....	10
4.1. ALKALOIDI .....	10
4.2. POLIFENOLI.....	17
4.2.1. Flavonoidi.....	19
4.2.2. Fenolne kiseline.....	23
4.2.3. Stilbenoidi .....	24
4.2.4. Ostali fenolni spojevi.....	25
4.3. DITERPENOIDI .....	30
4.4. SAPONINI .....	33
4.5. RAZLIČITO .....	34
5. ZAKLJUČAK .....	37
6. POPIS OZNAKA I KRATICA .....	38
7. LITERATURA .....	40
8. SAŽETAK.....	50
9. SUMMARY .....	51

# 1. UVOD

## 1.1. BILJNI LIJEKOVI

Biljni lijek je lijek koji kao djelatne tvari sadrži isključivo jednu ili više biljnih tvari, odnosno jedan ili više biljnih pripravaka te njihove kombinacije. Biljne tvari su cijele ili narezane biljke, dijelovi biljaka, alge, lišajevi ili gljive (u osušenom ili svježem obliku), te neobrađene izlučine biljaka. Biljni pripravci su pripravci dobiveni različitim postupcima iz biljnih tvari (usitnjavanje, ekstrakcija, fermentacija, destilacija, pročišćavanje, koncentriranje, tiještenje) te obuhvaćaju usitnjene ili praškaste biljne tvari, tinkture, ekstrakte, eterična ulja, istisnute sokove i prerađene izlučine biljaka (Zakon o lijekovima, 2018). Daljnjom preradom i ekstrakcijom iz biljnih se droga i pripravaka dobivaju pojedini fitokonstituenti koji pokazuju farmakološke učinke, odnosno djelatne tvari biljnog porijekla. To su uglavnom sekundarni (specijalizirani) biljni metaboliti koje biljke sintetiziraju sekundarnim reakcijama iz primarnih metabolita.

Čovjek već tisućama godina koristi biljke, biljne pripravke i biljne tvari kao lijekove. Najraniji zapis o korištenju biljaka u medicinske svrhe datira 2.600 godina prije Krista, u Mezopotamiji, gdje su ljudi kašalj liječili uljem običnog čempresa (*Cupressus sempervirens*, *Cupressaceae*) (Kufirin, 2018). Biljni lijekovi predstavljaju osnovu tradicionalne medicine od antičkih vremena, a suvremena farmaceutska industrija niknula je na znanstveno utemeljenoj upotrebi biljaka i njihovih ekstrakata. Naime, razvoj znanosti i tehnologije omogućio je detekciju, izolaciju i pročišćavanje sekundarnih metabolita iz biljnog materijala, kojima se zapravo mogu pripisati farmakološki učinci biljnih lijekova. Zahvaljujući tome, izolirani i pročišćeni fitokonstituenti danas se mogu koristiti direktno kao lijekovi, kao prototip za sintezu inovativnih (polu)sintetskih lijekova ili kao farmakološki/biokemijski alati za otkrivanje molekularnih mehanizama određenih bolesti. Istraživanja izoliranih sastavnica ljekovitog bilja veoma su intenzivna jer se pretpostavlja da je do danas svega 10 % od ukupnog broja identificiranih biljnih metabolita testirano na farmakološke učinke (Dias i sur., 2012), a preostalih 90 % predstavlja izniman biofarmaceutski potencijal koji tek preostaje istražiti i iskoristiti.

Dakle, biljni su lijekovi od starih vremena pa sve do danas korišteni i prepoznati od strane medicinskih djelatnika, kao i pacijenata (Sachan i Gupta, 2015). Usprkos sve većem broju dostupnih modernih sintetskih lijekova, procjene govore da se čak 80 % ljudi u razvijenim zemljama i dalje oslanja na tradicionalnu medicinu, temeljenu na biljkama. U usporedbi sa

sintetičkim molekulama, aktivne molekule biljnog porijekla imaju bolji sigurnosni profil, bolje su prihvaćene od strane pacijenata te su uglavnom jeftinije za proizvodnju (Verma i Singh, 2008). Međutim, učinkovitost biljnih lijekova kod kliničke primjene može biti ograničena, budući da najčešće samo manji dio doze primijenjenog lijeka dospijeva do ciljnog mjesta, a veći dio doze distribuiran je u ostale dijelove organizma, u skladu s fizičko-kemijskim svojstvima lijeka. Također, većina biljnih lijekova pokazuje slabu topljivost, smanjenu apsorpciju, nestabilnost u jako kiselom pH mediju i brzu biotransformaciju u jetri. Izrazito su podložni hidrolitičkoj i oksidacijskoj razgradnji, što predstavlja značajan problem kod skladištenja i čuvanja biljnih lijekova. Iako veliki dio biljnih lijekova pokazuje značajne biološke učinke *in vitro*, u velikom broju slučajeva ih je teško postići u *in vivo* uvjetima. Osnovni razlog je loša bioraspodijelivost djelatnih komponenti biljnih lijekova, zbog čega se ne postižu zadovoljavajuće koncentracije lijeka na mjestu djelovanja. Odstupanje postignute koncentracije lijeka od terapijske širine rezultira ili izostankom učinka ili povećanom toksičnošću (Bonifácio i sur., 2014). Nabrojane nedostatke biljnih lijekova moguće je izbjeći ili umanjiti primjenom nanotehnologije, tj. uklapanjem u terapijske nanosustave.

Nanotehnologija je znanost koja se bavi proučavanjem i razvojem nanočestica. Nanočestice u užem smislu predstavljaju čestice veličine 1-100 nm, a u širem smislu veličine do 1  $\mu\text{m}$ . Kontrola distribucije djelatne tvari (lijeka) ostvaruje se na način da je lijek uklopljen u nanonoslač, pri čemu takav sustav pokazuje bitno različita svojstva i ponašanje od samog lijeka. Među brojnim prednostima koje se postižu uklapanjem djelatnih komponenti biljnih lijekova u nanosustave, najvažnije su: povećanje topljivosti i apsorpcije, ciljana doprema na mjesto djelovanja, potenciranje farmakološkog učinka uklopljenog lijeka, smanjivanje toksičnih nuspojava, postizanje ciljanog i/ili kontroliranog učinka te osiguravanje prikladne bioraspodijelivosti i biokompatibilnosti. Sve navedeno vodi većoj terapijskoj učinkovitosti, boljem sigurnosnom profilu i smanjenju učestalosti doziranja (Verma i sur., 2013). Iako terapijski nanosustavi imaju veliki potencijal u premošćivanju ranije navedenih nedostataka biljnih lijekova, potrebno je naglasiti da kompleksnost prirodnih ljekovitih tvari predstavlja veliki izazov u razvoju terapijskih nanosustava za humanu primjenu. Nanosustavi koji se danas uvelike istražuju za uklapanje i primjenu biljnih lijekova su: liposomi, niosomi, polimerne nanočestice, mikroemulzije, nanoemulzije i čvrste lipidne nanočestice. Među njima se posebno ističu liposomi, o čemu svjedoči zaista velik broj objavljenih znanstvenih radova koje se bave istraživanjem i razvojem liposomskih pripravaka s uklopljenim biljnim lijekovima.

## 1.2. LIPOSOMI: STRUKTURA I SVOJSTVA

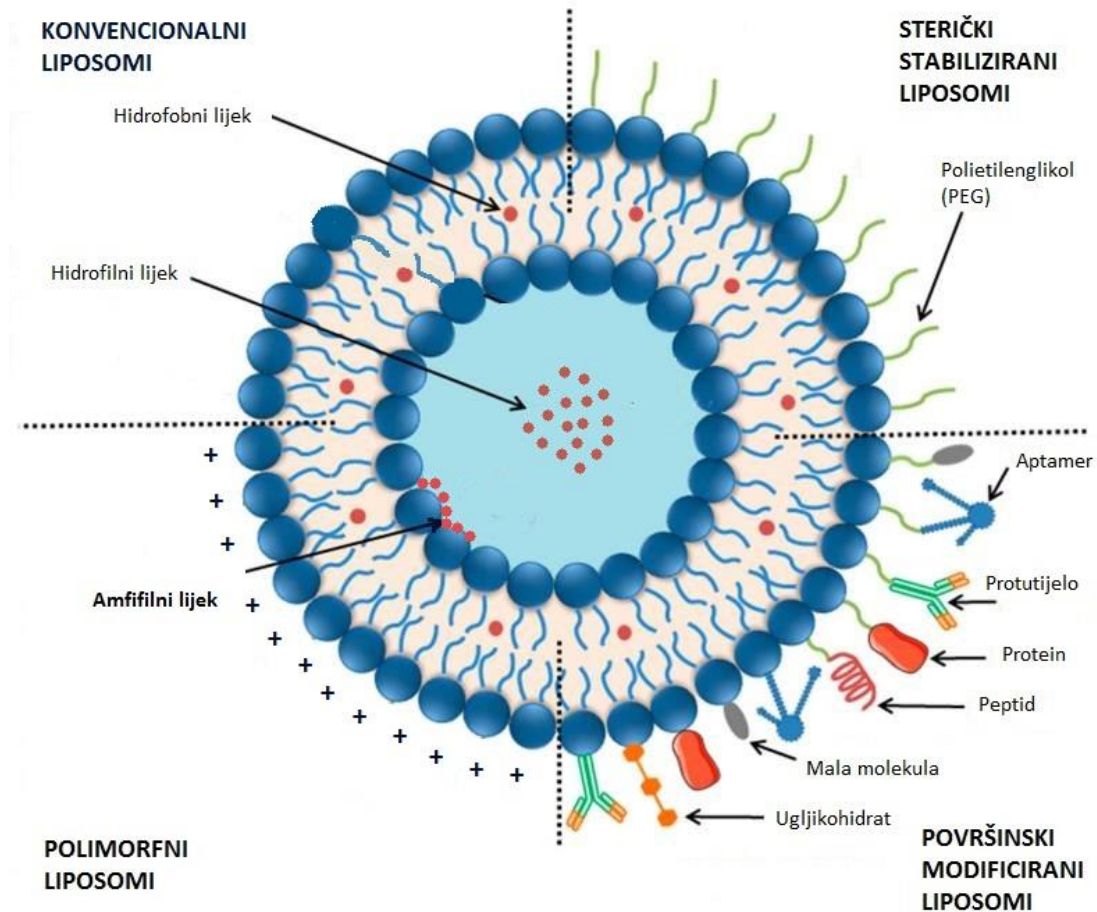
Liposomi su biorazgradive, netoksične, koloidne vezikule građene od jednog ili više fosfolipidnih dvoslojeva koji okružuju jedan ili više unutarnjih vodenih odjeljaka. Promjer im se kreće od 0,05 do nekoliko desetaka mikrometara. U njih se mogu uklopiti kako hidrofilne tako i lipofilne i amfipatske djelatne tvari. Hidrofilne tvari se uklapaju u vodeni odjeljak, lipofilne u lipidni dvosloj, a amfipatske se smještaju na granici između vodenog i lipidnog odjeljka.

Fosfolipidni dvosloj čine prirodni ili sintetički fosfolipidi. Fosfolipidi su po prirodi amfipatske molekule, diesteri fosfatne kiseline, koji su s jedne strane esterificirani derivatom sfingozina ili glicerola, a s druge strane kolinom, etanolaminom, serinom, inozitolom ili glicerolom. Sadrže hidrofilnu „glavu“ i hidrofobni „rep“. U kontaktu s vodom nastaju sferične vezikule u kojima su hidrofilne „glave“ okrenute prema vodenom odjeljku dok hidrofobni „repovi“ čine lipidni dio dvosloja. Fosfolipidi koji se koriste za izradu liposoma mogu biti neutralni (fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin) ili negativno nabijeni (fosfatidilglicerol, fosfatidilserin, fosfatidilinozitol i fosfatidna kiselina). Najčešće se za pripremu liposoma koristi lecitin koji predstavlja smjesu različitih fosfolipida s najvećim udjelom fosfatidilkolina, u čijem sastavu su lanci masnih kiselina različite duljine i stupnja zasićenosti. (Polu)sintetski proizvedeni fosfolipidi kvalitetnija su alternativa lecitinu, zbog točno definiranog sastava (Vanić, 2012a).

Fosfolipidni dvosloj liposoma, osim fosfolipida, može sadržavati i kolesterol i hidrofilne polimerne lipide. Kolesterol se ugrađuje u membranu između molekula fosfolipida te povećava čvrstoću i mikroviskoznost dvosloja te smanjuje propusnost membrane za uklopljene hidrofilne djelatne tvari. Prisustvo kolesterola u dvosloju načelno ne pokazuje utjecaj na temperaturu faznog prijelaza ( $T_c$ ), no ukoliko je taj udio velik, tada će imati utjecaj na  $T_c$ . Poznavanje  $T_c$  je iznimno važno pri proizvodnji i istraživanju liposomskih terapijskih sustava. Primjerice, što je  $T_c$  niža, fluidnost membrane je veća, a time je membrana propusnija za uklopljeni sadržaj, te je fizička stabilnost liposoma smanjena (Vanić, 2012a).

Liposomi se mogu klasificirati s obzirom na veličinu (promjer), broj dvosloja, strukturalna svojstva ili način oslobađanja uklopljenog sadržaja. Morfologiju vezikula u najvećoj mjeri definira postupak pripreme, a manjim dijelom fosfolipidni sastav. Prema veličini vezikula i broju fosfolipidnih dvoslojeva razlikuju se: unilamelarni, oligolamelarni, multilamelarni i multivezikularni liposomi. Prema strukturnim svojstvima i načinu oslobađanja uklopljenog

sadržaja liposomi se mogu podijeliti na konvencionalne, sterički stabilizirane, površinski modificirane i polimorfne liposome (Slika 1).



Slika 1. Klasifikacija liposoma prema strukturnim svojstvima i načinu oslobađanja uklopljenog sadržaja. Preuzeto i prilagođeno iz Riaz i sur. (2018), uz dozvolu izdavača (MDPI).

Fosfolipidni dvosloj prve generacije liposoma, poznatih kao klasični ili konvencionalni liposomi, čine fosfolipidi neutralnog ili negativnog naboja, uz dodatak kolesterola za povećanje kompaktnosti dvosloja. U *in vivo* ispitivanjima konvencionalni liposomi su pokazali kratko zadržavanje u sistemskej cirkulaciji te akumuliranje u stanicama retikuloendotelno sustava i makrofagima. Stoga su klasični liposomi prikladni za liječenje infektivnih oboljenja, vakcinaciju i dijagnostiku oboljenja organa u kojima se nakupljaju, poput jetre i slezene. Osim toga konvencionalni liposomi su puno istraživani kao nosači lijekova za lokalnu primjenu na kožu i sluznice (Vanić, 2012a).



Kako bi se postiglo dulje zadržavanje liposoma u cirkulaciji razvijeni su tzv. sterički stabilizirani, dugo-cirkulirajući liposomi koji sadrže hidrofilne polimere kovalentno vezane za fosfolipidnu membranu (Slika 1). Vezani hidrofilni polimeri (najčešće polietilenglikol, PEG) pružaju fizičku zaštitu ovojnice liposoma od kontakta s opsoninima i lipoproteinima u krvi, sprječavajući na taj način njihovo prepoznavanje od strane makrofaga i stanica retikuloendotelnog sustava. U odnosu na konvencionalne liposome kojima vrijeme polueliminacije iznosi do nekoliko sati, sterički stabiliziranim liposomima vrijeme polueliminacije iznosi čak do 48 sati. Ako su zadovoljavajuće veličine, sterički stabilizirani liposomi će se selektivno nakupljati u patološkom području karakteriziranom povećanom propusnosti kapilara (upale, tumori). Danas na tržištu postoje registrirani pripravci sterički stabiliziranih liposoma s antitumorskim lijekovima (npr. Doxil<sup>®</sup>, Caelix<sup>®</sup>) (Bangale i sur., 2014).

Za razliku od sterički stabiliziranih liposoma čija se terapijska učinkovitost temelji na pasivnoj ciljanoj terapiji, površinskom modifikacijom liposoma, moguće je postići aktivno ciljano djelovanje na točno određenim mjestima u organizmu zahvaljujući specifičnim strukturnim svojstvima liposoma. Površinski modificirani liposomi su zapravo konvencionalni ili sterički stabilizirani liposomi za čiju su ovojnicu, direktno ili posredno preko polimera, vezani ligandi: antitijela ili aptameri (imunoliposomi), oligo- ili polisaharidi, peptidi, (gliko)proteini, dekstrani, folati, lektini i dr. Ligandi na površini liposoma omogućuju prepoznavanje od strane odgovarajućih stanica preko specifičnih receptora ili antigena eksprimiranih na površini stanica. Liposomi čija je površina modificirana ligandima koriste se ponajviše u antitumorskoj terapiji, ali su mogućnosti primjene mnogostruke, za različite indikacije (Riaz i sur., 2018).

Polimorfni liposomi koriste svojstvo lipidnog polimorfizma za kontrolirano oslobađanje uklopljenog sadržaja. Različitim podražajima iz okruženja u kojem se polimorfni liposomi nalaze nastaju promjene molekularnog oblika fosfolipida ili neke druge membranske komponente, što rezultira promjenom integriteta membrane, odnosno destabilizacijom liposomske ovojnice te oslobađanjem uklopljenog lijeka. U polimorfne liposome se ubrajaju:

- a) pH-osjetljivi liposomi - pri nižim vrijednostima pH okruženja u kojem se nalaze, primjerice u endosomu stanice, podliježu destabilizaciji i fuziji s membranom endosoma te oslobađaju uklopljeni sadržaj u citoplazmu stanice prije kontakta s lizosomom;
- b) temperaturno-osjetljivi liposomi - uslijed promjene tj. porasta temperature u patološkom okruženju oslobađaju uklopljeni sadržaj;

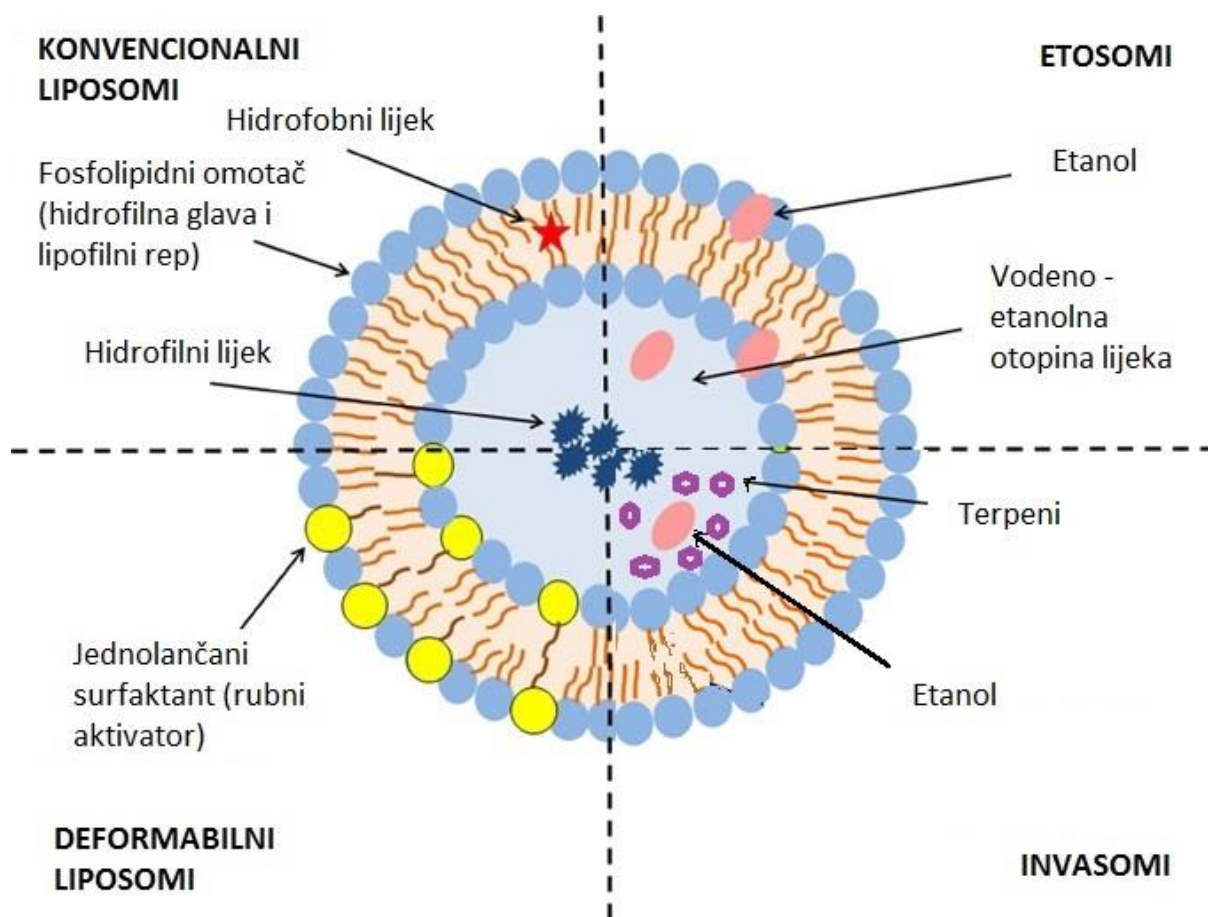
c) kationski liposomi - sastoje se od kationskog lipida koji interakcijom s nukleinskim kiselinama stvara lipid-DNA komplekse (lipoplekse), a oni fuzijom s plazmatskom membranom ulaze u stanicu (Vanić i sur., 2012b).

Dodatak određenih konstituenata u sastav lipidne membrane može bitno utjecati na elastičnost membrane te posljedično na fizikalno-kemijska svojstva i permeabilnost liposoma *in vivo*. Klasifikaciju liposoma moguće je provesti i s obzirom na rigidnost, tj. elastičnost lipidnog dvosloja. U tom kontekstu razlikuju se klasični (konvencionalni) liposomi i elastični liposomi, u koje se ubrajaju deformabilni liposomi, propilenglikol liposomi, etosomi i invasomi (Elsayed i sur., 2007) (Slika 2).

Deformabilni liposomi u svom sastavu, osim fosfolipida, imaju rubni aktivator, koji je po kemijskoj strukturi jednolančani surfaktant (kolat, deoksikolat, Brij<sup>®</sup>, Tween<sup>®</sup>, Span<sup>®</sup> itd.). Interkaliranje rubnog aktivatora u lipidni dvosloj uzrokuje njegovu djelomičnu destabilizaciju, čime liposomska ovojnica postaje elastičnija, tj. fluidnija. Pritom treba obratiti pažnju na koncentraciju rubnog aktivatora. U literaturi se deformabilni liposomi još mogu pronaći pod nazivima: elastični liposomi, fleksibilni liposomi, ultrafleksibilni liposomi ili Transferosomi<sup>®</sup> (Elsayed i sur., 2007).

Primjena propilenglikola tijekom izrade liposoma također će doprinijeti elastičnosti dvoslojeva formiranih vezikula. Propilenglikol liposome karakterizira veća uspješnost uklapanja djelatnih tvari u odnosu na konvencionalne i deformabilne liposome istog fosfolipidnog sastava zbog solubilizacijskog učinka propilenglikola (Vanić i sur., 2014; Manconi i sur., 2009).

Etosomi su liposomi s visokim udjelom etanola u disperziji (20 - 45 %). Prisutni etanol povećava fluidnost (elastičnost) membrane i solubilizaciju djelatnih tvari, te ima utjecaja na veličinu etosoma. Provedena ispitivanja potvrđuju manji promjer etosoma u odnosu na konvencionalne liposome istoga fosfolipidnog sastava (Godin i Touitou, 2000, 2003). Brojna istraživanja pokazuju da elastičnost membrane doprinosi boljoj penetraciji liposoma i/ili uklopljenog lijeka u dublje slojeve kože u odnosu na klasične liposome (Hua, 2015; Vanić, 2015).



Slika 2. Klasifikacija liposoma s obzirom na elastičnost/rigidnost lipidnog dvosloja. Preuzeto i prilagođeno iz Hua (2015), uz dozvolu izdavača (*Frontiers*).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Usprkos velikom napretku farmaceutske industrije u sintezi novih lijekova, biljke i dalje imaju nezamjenjivu ulogu u biomedicini, a biološki aktivni spojevi biljaka mogu biti izolirani i pročišćeni na jednostavan način te se potom koristiti direktno, kao lijekovi i dodaci prehrani, ili indirektno, kao modeli/ishodišne tvari za razvoj novih (polu)sintetskih lijekova. U prilog tome ide podatak da je u razdoblju između 1981. i 2006. približno polovica odobrenih lijekova porijeklom iz prirodnih izvora (Ferreira i Pinto, 2010).

Primjena biljnih lijekova i pripravaka popularna je među pacijentima zbog uvriježenih stavova o učinkovitosti, ali i manjoj štetnosti prirodnih lijekova. Međutim, osnovni problem je nedovoljna definiranost i standardiziranost njihovog kemijskog sastava. Nadalje, biološki aktivne komponente biljnih lijekova (polifenoli, terpeni, alkaloidi, saponini, itd.) uglavnom su veoma kompleksne molekule, velike molekulске mase, čija je klinička primjena limitirana kemijskom nestabilnošću, slabom topljivošću i apsorpcijom koja rezultira niskom bioraspoloživnošću. Problematičan aspekt njihove *in vivo* primjene je i potencijalna toksičnost.

Uklapanjem u liposome moguće je postići značajno poboljšanje farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava djelatnih tvari iz biljaka: veću topljivost, produljeno oslobađanje, veću koncentraciju djelatnih tvari na mjestu djelovanja, smanjenje citotoksičnosti, povećanu stabilnost i bioraspoloživost te manju potrebnu dozu lijeka za ostvarivanje terapijskog učinka. Pregledom dostupne znanstvene literature ustanovljeno je da su u liposome uklapane različite izolirane aktivne tvari iz biljnih droga, eterična ulja te biljni ekstrakti. U okviru ovog diplomskog rada obrađene su isključivo liposomske formulacije s uklopljenim aktivnim tvarima (fitokonstituensima) izoliranima iz biljnih droga, s ciljem njihove biomedicinske primjene. Pritom je sistematizacija dostupnih istraživanja provedena s obzirom na kemizam uklopljene djelatne komponente.

### 3. MATERIJALI I METODE

Za proučavanje literature u okviru teme ovog diplomskog rada pretraživane su *on-line* znanstvene baze podataka (*PubMed*, *Science Direct*) te je pregledana dostupna znanstvena literatura, udžbenici u tiskanom i elektroničkom obliku i članci u stručnim časopisima. Pritom su korištene ključne riječi na engleskom jeziku: *liposomes*, *phytochemicals*, *encapsulation*, *stability*, *solubility*, *bioavailability*, *cytotoxicity*, *targeted delivery*, *topical delivery*, *antitumor activity*, *antioxidant activity*, *antimicrobial activity*, *antiinflammatory activity*, *wound healing*, *alcaloids*, *terpens*, *polyphenols*, *taxanes*, *saponins*, *flavonoids*, *flavones*, *diterpenoids*, *Onvyde*<sup>®</sup>, *Marqibo*<sup>®</sup>, *Brakiva*<sup>®</sup>, *Lipocurc*<sup>®</sup>.

Znanstvena literatura proučavana je analitički i kritički, prvenstveno zbog definiranja znanstvenog i stručnog problema, a potom i istraživanja postojećih znanja o temi koju obrađuje ovaj diplomski rad. Pri proučavanju relevantnih znanstvenih članaka izdvojeni su najznačajniji rezultati istraživanja, rasprave i zaključci. Pri pretraživanju znanstvene literature traženi su odgovori na specifična pitanja vezana za temu ovog diplomskog rada, a na temelju pronađenih informacija izvedena su vlastita razmatranja proučavane problematike.

## 4. RASPRAVA

Djelatne tvari biljnog porijekla (biološki aktivni fitokonstituenti) uglavnom su sekundarni metaboliti biljaka, a zaslužne su za farmakološki učinak biljnih lijekova. One su nužne i za standardizaciju biljnih lijekova, pri čemu sadržaj pojedinih aktivnih tvari ovisi o vrsti i starosti biljke, vremenu sakupljanja i čimbenicima okoliša. Aktivne tvari se s obzirom na kemizam mogu svrstati u različite skupine: alkaloide, polifenole, terpeni, saponine, lektine i dr.

### 4.1. ALKALOIDI

Alkaloidi se definiraju kao biljni spojevi s dušikom, koji već u malim količinama djeluju na središnji živčani sustav (CNS) ljudi i životinja. Pojavnost alkaloida ograničena je na određene biljne porodice, a biljke koje ih sadrže većinom se ubraju u otrovne biljne vrste (Roy, 2017).

**Kapsaicin** je alkaloid karakterističan za biljne vrste iz roda *Capsicum* i porodice *Solanaceae*, a u najvećim se količinama nalazi u sjemenkama dotičnih biljnih vrsta. Kada se primjenjuje lokalno, kapsaicin djeluje kao iritans i rubefacijens, stvarajući osjećaj peckanja i žarenja, što je posljedica aktivacije vaniloidnih receptora. Zahvaljujući širokom rasponu farmakoloških učinaka na kardiovaskularni, dišni i živčani sustav, kapsaicin se intenzivno istražuje u polju medicine i farmacije. Dosad su zabilježeni protuupalni i antioksidativni učinci, učinak na smanjenje lipidne peroksidacije, učinak na pretilost, analgetski i antitumorski učinci (Cirino i sur., 2016). Međutim, klinička primjena kapsaicina limitirana je zbog loše topljivosti u vodi te kratkog poluvremena života, odnosno niske biorasploživosti. Zhu i suradnici (2015) razvili su stabilnu liposomsku formulaciju kapsaicina s ciljem povećanja njegove biorasploživosti nakon oralne primjene. Uklapanjem kapsaicina u liposome pripravljene film metodom iz sojinog fosfatidilkolina, kolesterola, natrijevog kolata i izopropil miristata, postignuto je brže oslobađanje lijeka *in vitro*, te do 3,34 puta veća biorasploživost *in vivo* (štakori) u odnosu na suspenziju kapsaicina.

Osim za sistemska primjenu, uklapanje kapsaicina u liposome pokazalo se kao dobar pristup i za topikalnu primjenu kapsaicina. *In vivo* studija na štakorima pokazala je bolji protuupalni učinak i superiornost deformabilnih liposoma s kapsaicinom u odnosu na komercijalno dostupan gel (Thermagel®) u tretiranju artritisa (Sarwa i sur., 2015). Autori pretpostavljaju da je bolja učinkovitost liposomske formulacije u odnosu na klasični gel rezultat bolje

permeabilnosti kroz kožu, što su i potkrijepili permeacijskom *ex vivo* studijom na koži štakora te primjenom konfokalne laserske mikroskopija. Prikladnost liposoma kao nosača za kapsaicin dodatno su potvrdili i testom kožne podnošljivosti *in vivo* na štakorima, kojim je utvrđena bolja tolerancija liposomskog u odnosu na klasični topikalni pripravak (gel). Naime, iritirajući učinak i osjećaj žarenja, osnovna je nuspojava i glavni nedostatak topikalne primjene kapsaicina.

Intravezikalna primjena kapsaicina predstavlja učinkovit tretman urinarne inkontinencije, ali taj put primjene, kao i topikalna primjena na kožu, uzrokuje lokalnu nadraženost i edem sluznice mokraćnog mjehura. Animalna studija na štakorima pokazala je da uklapanje u liposome ima povoljan zaštitni učinak na mokraćni mjehur, čime se značajno smanjuje iritacija u odnosu na kontrolnu, etanolnu otopinu kapsaicina (Cirino i sur., 2016). U pilot studiji iz 2015. godine ispitivana je sigurnost i analgezijski učinak liposomskog kapsaicina kod pacijenata s postherpetičkom neuralgijom. Pokazano je da je liposomski pripravak kapsaicina siguran za primjenu, usprkos tome što je kod pojedinih pacijenata, analgezijski učinak liposomskog kapsaicina bio marginalan (Teixeira i sur., 2015).

**Kamptotecin** je prirodni citotoksični alkaloid izoliran iz biljke *Camptoteca accuminata* (*Cornaceae*), koja se koristila još u tradicionalnoj kineskoj medicini za liječenje kožnih bolesti i karcinoma. Kamptotecin ima snažno antitumorsko djelovanje na mnoge vrste karcinoma (inhibitor topoizomeraze I), uključujući karcinom jajnika, mokraćnog mjehura, pluća i kolorektalni karcinom, no upotreba mu je ograničena zbog slabe topljivosti i nestabilnosti aktivnog oblika (laktona) u humanom serumu. Watanabe i suradnici (2008) su uklapanjem kamptotecina u liposome koji su sadržavali 3,5-bisdodeciloksibenzojevu kiselinu i PEG te humani serumski albumin na površini liposoma, uspjeli povećati stabilnost i antitumorski učinak kamptotecina. Takav liposomski pripravak pokazao je usporeno oslobađanje kamptotecina te produljeno zadržavanje u krvotoku miševa nakon *i.v.* primjene. Također, u usporedbi s otopinom kamptotecina, liposomski pripravak pokazao je gotovo 10 puta bolje zadržavanje u tumorskom tkivu 24 sata nakon primjene. Štoviše, pri dozi 15 mg/kg zabilježena je značajna inhibicija tumorskog rasta kod miševa, bez značajnog gubitka tjelesne mase eksperimentalnih životinja.

Osim slabe topljivosti i kemijske nestabilnosti, jedan od nedostataka primjene kamptotecina jest izražena toksičnost. Izučavanje kamptotecina kroz tri je desetljeća dovelo do razvoja polusintetskih derivata kamptotecina (topotekan, irinotekan, lurtotekan), kod kojih su zadržana protutumorska svojstva, a smanjena toksičnost. Topotekan i irinotekan su uspješno uklapani u liposomske sustave različitog sastava i površinskih modifikacija, koji su pokazali superiorna

farmakokinetička i farmakodinamička svojstva u odnosu na neliposomske analoge. Dapače, liposomske preparacije topotekana i irinotekana nadišle su okvire laboratorijskih i pilot studija te su zaživjele u klinici. Primjerice, liposomski irinotekan (Onvyde<sup>®</sup>) je 2015. godine odobren od strane Američke Agencije za hranu i lijekove (engl. *US Food and Drug Administration*, FDA) za liječenje metastatskog adenokarcinoma gušterače (*i.v.*), u kombinaciji s 5-fluorouracilom i leucovorinom, kod pacijenata koji su prethodno liječeni gemcitabinom (Wen i sur., 2017; FDA *Onivyde<sup>®</sup> Prescribing information*). I druge liposomske formulacije irinotekana, kao i njegovog aktivnog metabolita SN-28 (7-etil-10-hidroksi-kamptotecin), nalaze se trenutno u različitim fazama kliničkih istraživanja za brojne indikacije (kolorektalni karcinom, mikrocelularni karcinom pluća, karcinom želuca, karcinom dojke, gliom) (Bulbake i sur., 2017; Wen i sur., 2017). Liposomska formulacija topotekana (Brakiva<sup>®</sup>) namijenjena liječenju tumora pluća i dojke, trenutno je u fazi II kliničkih ispitivanja (BCIQ), baš kao i liposomska formulacija lurtotekana (OSI-211) koja se ispituje za liječenje tumora jajnika, vrata i glave (Bulbake i sur., 2017).

**Matrin** je alkaloid izoliran iz biljke (*Sophora flavescens*, *Fabaceae*) koja se tradicionalno koristi u kineskoj medicini u svrhu smanjivanja aktivnosti jetrenih enzima, kod prevencije hepatičke fibroze te kod liječenja ikterusa. Za matrin je poznato da posjeduje antibakterijsko, antialergijsko, antivirusno, antiaritmijsko te protuupalno djelovanje (Zhaowu i sur., 2009), a mnoge studije pokazuju da posjeduje i antitumorske učinke: inhibira proliferaciju tumorskih stanica, inducira staničnu proliferaciju i apoptozu te inhibira invazivnost i metastaziranje malignih tumorskih stanica (Liu i sur., 2010). Budući da je matrin relativno mala molekula ( $M_r=248,37$ ), karakterizira ga slobodan prijelaz kroz stijenku krvnih žila i brzo raspodjeljivanje u zdrava tkiva, kao i tendencija nakupljanja u jetri, slezeni i bubrezima, zbog čega samo manja količina matrina uspije stići do ciljanog tumorskog tkiva. U cilju postizanja ciljanog djelovanja matrina na tumore predloženo je njegovo uklapanje u dugo-cirkulirajuće liposome obložene PEG-om za koji je kemijski vezan ciklički RGD-peptid (arginin-glicin-apsaraginska kiselina), ligand kojeg prepoznaje nekoliko integrinskih receptora. Preliminarna ispitivanja na različitim tumorskim staničnim linijama (A375 melanomske stanice, Bcap-37 stanice tumora dojke i HT-29 stanice tumora kolona) potvrdila je ciljanu dopremu matrina u tumorske stanice te značajno bolje antitumorsko djelovanje u odnosu na kontrolu (matrin otopljen u hranidbenom mediju) (Liu i sur., 2010). Antitumorski učinak matrina potvrđen je i na gliomskoj tumorskoj staničnoj liniji BT 325 u studiji Hana i suradnika (2014), koji su koristili PEG-ilirane liposome kao nanonosače matrina.



Uzevši u obzir nedostatke/nuspojave vezane uz intramuskularni i intravenski put primjene (kratko vrijeme polueliminacije, brza razgradnja, nestabilnost, bol i upala prilikom aplikacije), Zhaowu i suradnici (2009) su istraživali mogućnost topikalne primjene matrina na kožu (transdermalna primjena). Kao nanosači odabrani su etosomi, budući da dokazano pospješuju uklapanje i dostavu teško topljivih lijekova u/kroz kožu. Prilikom pripreme etosoma, korištene su različite koncentracije etanola i fosfolipida te je ustanovljeno da veće koncentracije etanola i fosfolipida doprinose boljem i učinkovitijem uklapanju matrina. Perkutana permeacija kroz kožu štakora (*ex vivo*) značajno je pospješena primjenom etosomskog matrina u odnosu na vodenu i vodeno-etanolnu otopinu matrina. Na *in vivo* modelu induciranog eritema na štakorima, utvrđeno je da uklapanje matrina u etosome pospješuje njegovu protuupalnu aktivnost. Zanimljivo, podnošljivost etosoma *in vivo* bila je samo neznatno manja od podnošljivosti fiziološke otopine, ali i značajno veća od vodeno-etanolne otopine matrina.

Etosomi su se pokazali obećavajućim nanonosačima i kod (trans)dermalne primjene **tetrandrina** (Fan i sur., 2013), bisbenzil-izokinolinskog alkaloida koji se ekstrahira iz korijena vrste *Stephania tetrandra* (*Menispermaceae*). Tetrandrin je molekula koja pokazuje brojne biološke učinke: neselektivna inhibicija kalcijevih kanala, indukcija apoptoze kod različitih tipova stanica, hvatanje slobodnih radikala, poticanje glikogeneze i smanjenje koncentracije glukoze u krvi. Stoga farmakološki učinci tetrandrina uključuju imunosupresivno, antiproliferativno, antitumorsko i protuupalno djelovanje. Na tržištu je tetrandrin dostupan u obliku tableta i injekcija, no sistemski način primjene je problematičan zbog niske bioraspoloživosti i nuspojava u vidu intestinalnih i bubrežnih oštećenja, te potencijalne hepatotoksičnosti. Fan i suradnici (2013) su stoga ispitivali mogućnosti lokalne primjene tetrandrina u terapiji artritisa. Kako bi se postigla efektivna terapijska koncentracija tetrandrina na mjestu djelovanja, lijek je uklopljen u etosome. *Ex vivo* ispitivanjem permeabilnosti na modelu kože štakora, korištenjem Franz difuzijske ćelije, pokazano je da je permeacija etosomskog tetrandrina tijekom 24 sata značajno veća od klasičnih liposoma s tetrandrinom i otopine tetrandrina u smjesi vode, etanola i propilenglikola. Također, primjenom etosoma postignuto je i značajno bolje odlaganje tetrandrina u kožu ( $6,95 \pm 0,22$  %) u odnosu na klasične liposome ( $4,10 \pm 0,79$  %) i otopinu lijeka ( $2,60 \pm 0,44$  %), a superiornost etosoma s obzirom na dubinu i opseg penetracije dodatno je potvrđena konfokalnom laserskom pretražnom mikroskopijom. Nadalje, antiartritički učinak testiran je *in vivo* na modelu induciranog edema šape štakora. Etosomi su pokazali smanjenje volumena edema za 66 %, što je bilo značajno bolje od negativne kontrole (fiziološka otopina). Za klasične liposome i otopinu tetrandrina

utvrđeno je smanjenje volumena edema za 48 %, odnosno 45 %, pri čemu nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu. Istovjetan odnos među ispitivanim formulacijama uočen je i za utjecaj na stupanj otečenosti edema, a opisani rezultati potvrđuju značajan antiartritički učinak etosomskog tetrandrina. Posebno je zanimljivo istaknuti da je u ovoj studiji etosomski tetrandrin pokazao bolji protuupalni terapijski potencijal od komercijalno dostupnog pripravka deksametazona (mast).

**Brucin** je jedan od 16 različitih alkaloida izoliranih iz sjemenki vrste *Strychnos nux-vomica* (*Loganiaceae*). Ova se biljka tradicionalno koristi u mnogim azijskim zemljama za olakšavanje boli uzrokovane artritismom ili različitim traumama. Usprkos iznimnim protuupalnim i analgetskim svojstvima, kliničku primjenu brucina ograničava visoka stopa ozbiljnih nuspojava koje uključuju jake konvulzije, porast krvnog tlaka ili čak smrtonosno trovanje. Stoga je za farmaceutsku primjenu brucina potrebno razviti prikladan ljekoviti oblik, s ciljem uklanjanja ili minimaliziranja opasnih nuspojava, uz istovremeno zadržavanje farmakoloških učinaka. Kao sigurna i učinkovita formulacija za transdermalnu primjenu brucina predloženi su deformabilni liposomi sastavljeni od lecitina, kolesterola, natrijevog deoksikolata i Tween<sup>®</sup>-a 80. Provedena *in vitro* ispitivanja su pokazala da se uklapanjem u deformabilne liposome postiže sporije oslobađanje brucina, kao i značajno bolja permeacija kroz kožu te manje nakupljanje u koži miševa (*ex vivo*) u odnosu na otopinu lijeka. Farmakodinamička istraživanja liposomskog brucina na miševima pokazala su ne samo jači, već i dulji protuupalni i analgetski učinak liposomskog pripravka u odnosu na otopinu brucina, pri čemu je učinak bio ovisan o primijenjenoj dozi. Osim toga, na albino kunićima testirana je akutna toksičnost i provedeni su testovi iritacije liposomske formulacije, pri čemu je ustanovljeno da uklapanje brucina u deformabilne liposome rezultira smanjenjem njegove toksičnosti ( $LD_{50} > 100$  mg/kg) te izostankom iritirajućeg učinka na kožu (uključujući intaktnu kožu i kožu narušenog integriteta rožnatog sloja) (Qin i sur., 2007). Daljnja ispitivanja iste grupe autora provedena s polučvrstim pripravkom brucina (liposomi uklopljeni u karbopolski gel) pokazala su da se liposomskim pripravkom postiže produljeno i kontrolirano oslobađanje brucina (42 % brucina nakon 8 h) i dobra permeabilnost brucina kroz kožu miševa *ex vivo* (fluks  $39 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  nakon 12 h) u odnosu na kontrolni gel (otopina brucina u gelu) (Wang i sur., 2009). Kao i u prethodnoj studiji (Qin i sur., 2007), za procjenu terapijske učinkovitosti liposomskog gela brucina korišteni su miševi, odnosno nociceptivni test (engl. *acetic acid-induced writhing test*) i model inducirano edema uške (engl. *xylene-induced mouse ear edema*). Dobiveni rezultati potvrđuju protuupalni i analgetski učinak ispitivanih gelova, pri čemu je liposomski pripravak pokazao bolje učinke od

kontrolnog pripravka u ispitivanom rasponu doza (7,5-30 mg/kg). Osim toga, primjenom liposomskog gela nisu zabilježeni znakovi akutne dermalne toksičnosti ili dermalne iritacije (neovisno o integritetu kože) (Wang i sur., 2009),

Osim analgetskih i protuupalnih učinaka, alkaloidi sjemenki *Strychnos nux-vomica* pokazuju i izvrsne citotoksične učinke, a najjače inhibitorne učinke na proliferaciju humanih HepG2 i SMMC 7721 tumorskih stanica pokazao je upravo brucin. Međutim, zbog dobre topljivosti u mastima brucin pokazuje tendenciju nakupljanja u mozgu i značajnu toksičnost za središnji živčani sustav (Li i Wang, 2017), zbog čega je terapijska širina brucina veoma sužena. U svrhu poboljšanja njegovog terapijskog indeksa, Li i suradnici (2013) su proveli istraživanja s brucinom uklopljenim u dugo-cirkulirajuće liposome, a ispitivane liposomske formulacije pokazale su bolju dopremu brucina u tumorsko tkivo od jednake doze kontrolnog pripravka brucina. Komparacijom 3 različite fosfolipidne kompozicije liposoma, utvrđeno je da su s obzirom na fizikalno-kemijska svojstva, stabilnost, oslobađanje lijeka *in vitro* i tkivnu distribuciju *in vivo* (miševi), liposomi sastavljeni od sojinog fosfatidilkolina (SPC), hidrogeniranog sojinog fosfatidilkolina (HSPC), kolesterola i PEG-iliranog distearoilfosfoetanolamina (DSPE) optimalna formulacija za uklapanje brucina i njegovu kontroliranu dopremu u tumorsko tkivo nakon *i.v.* primjene.

Li i Wang (2017) su razvili stabilnu liposomsku nanoformulaciju brucina dodatkom tzv. NGR-peptida kao površinskog liganda. *In vitro* ispitivanjima je dokazano da dodatak NGR-peptida ne utječe na veličinu i zeta potencijal liposoma kao niti na brzinu oslobađanja brucina iz liposoma. Iako bez razlika u farmakokinetičkim parametrima, NGR-liposomi su pokazali povećanje bioraspoloživosti brucina u odnosu na klasične liposome (bez površinske modifikacije NGR-om). Štoviše, *in vivo* studijom na miševima dokazana je smanjena toksičnost NGR-liposoma i znatno veća učinkovitost u liječenju tumora (HepG2 model). Povećana antitumorska aktivnost povezuje se s prepoznavanjem NGR-peptida na površini liposoma posredstvom NGR-receptora prisutnog na površini tumorskih stanica.

**Vinka alkaloidi** su skupina alkaloida izolirana iz zimzelene biljke *Catharanthus roseus* (*Vinca rosea*) i drugih biljaka iz roda *Catharantus* (*Apocinaceae*). Pokazuju izvanredne citotoksične učinke, zbog čega se koriste u kemoterapiji tumorskih bolesti (limfomi, leukemije, tumori dojke, tumori pluća, neuroblastomi i dr.) te kao imunosupresivi. Djeluju na način da se vežu za tubulin, inhibirajući formiranje diobenog vretena i mitozu stanica u metafazi te blokirajući i druge funkcije stanica ovisne o mikrotubulima (fagocitoza leukocita, kemotaksija, provođenje živčanih impulsa i dr.). Najznačajniji članovi obitelji vinka alkaloida su vinkristin, vinblastin,

vindezin, vinorelbin i vinflunin. Moguće nuspojave primjene tih lijekova uključuju leukopeniju, perifernu neuropatiju, alopeciju, nekrozu mekih tkiva, pojavu čireva i dr. (Moudi i sur., 2013).

Pregledni rad Boman i suradnika (1994) donosi sažet i informativan popis ranih istraživanja **vinkristina** uklopljenog u liposome. Uspješnost uklapanja vinkristina bila je veća od 90 %, a (fosfo)lipidni sastav liposoma su činili fosfatidilkolin iz jajeta (EPC) ili distearoilfosfatidilkolin (DSPC), uz dodatak kolesterola (55/45, n/n). *In vitro* oslobađanje vinkristina iz EPC/kolesterol liposoma tijekom 24-satne inkubacije u puferu, serumu ili krvi miševa, bilo je značajno brže od DSPC/kolesterol liposoma (Mayer i sur., 1990). Nadalje, toksičnost vinkristina je značajno smanjena uklapanjem u liposomske formulacije. DSPC/kolesterol liposomi su pokazali 1,7-2,1 puta manje vrijednosti LD<sub>50</sub> nakon *i.v.* primjene u odnosu na injekcijsku otopinu vinkristinsulfata (Oncovin<sup>®</sup>), a utvrđen je i manji pad tjelesne mase životinja tretiranih liposomskim pripravkom, kao i smanjena dermalna toksičnost (miševi) (Mayer i sur., 1993). Supstitucija DSPC-a sfingomijelinom (SM) i dodatak 10 mol% gangliozida (GM<sub>1</sub>) u liposome s vinkristinom, rezultirali su značajno boljim farmakokinetičkim profilom (50-100 veća koncentracija i produljeno vrijeme zadržavanja u krvi) te boljim nakupljanjem vinkristina u tumorskom tkivu (do 60 puta veće koncentracije vinkristina unutar tumora) (Boman i sur., 1994; Webb i sur., 1995). Daljni razvoj liposomskih formulacija vinkristina pokazao je kako površinska modifikacija PEG-om rezultira dodatno produljenim zadržavanjem liposoma u cirkulaciji, ali i povećanim otpuštanjem lijeka iz liposoma. Za sve ispitivane liposomske formulacije vinkristina potvrđeni su bolji citotoksični učinci *in vitro* i antitumorski učinci *in vivo* na životinjama (Boman i sur., 1994; Mayer i sur., 1990, 1993, 1995; Webb i sur., 1995), što je pokrenulo niz daljnjih istraživanja, koja su u konačnosti dovela do razvoja injekcija liposomskog vinkristin-sulfata, prve i jedine liposomske formulacije vinkristina koja je pod zaštićenim imenom Marqibo<sup>®</sup> 2012. godine odobrena za primjenu u liječenju akutne limfoblastične leukemije kod ljudi (Silverman i Deitcher, 2013; [www.marqibo.com/](http://www.marqibo.com/)). Marqibo<sup>®</sup> sadrži vinkristin uklopljen u liposome sastavljene od sfingomijelina i kolesterola u molarnom omjeru 60:40 (tzv. Optisomi<sup>®</sup>), a u kliničkim je studijama pokazao povećanu dostavu lijeka u tumorsko tkivo, poželjan farmakokinetički profil, smanjenu incidenciju i ozbiljnost neuroloških nuspojava te mogućnost primjene i u pedijatriji (Helwick, 2013; Pathak i sur., 2014).

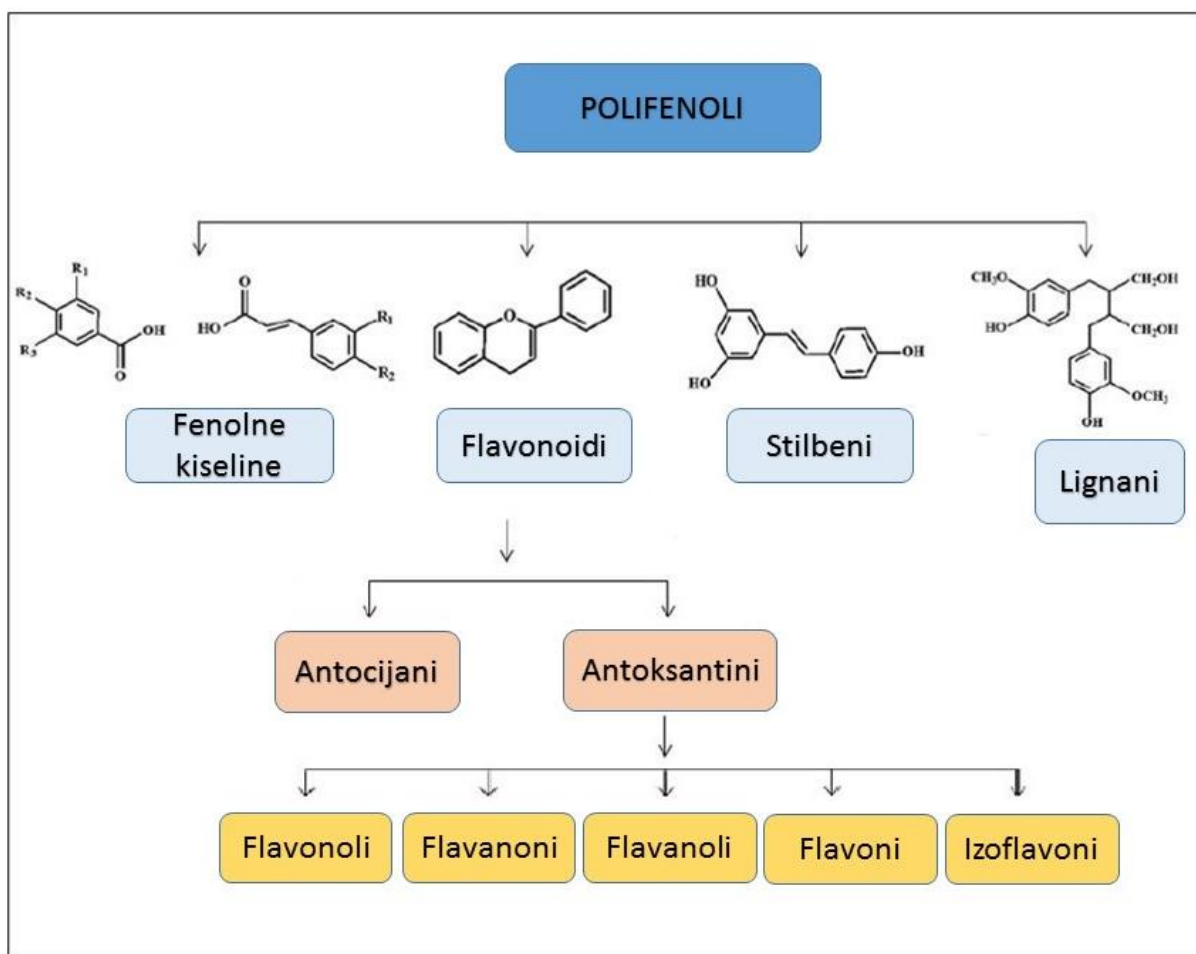
Osim vinkristina, uklapanjem u liposome poboljšana su farmakokinetička i farmakodinamička svojstva **vinblastina**, polusintetičkog vinka alkaloida. Alocrest<sup>®</sup>, *i.v.* liposomski pripravak vinblastina (Optisomi<sup>®</sup>) indiciran je za liječenje tumora dojke i pluća, a trenutno se nalazi u fazi

I kliničkih ispitivanja. Sfingosomska formulacija vinorelbin tartarata (INX-0125), namijenjena terapiji solidnih tumora, također se trenutno nalazi u fazi I kliničkih ispitivanja (Bulbake i sur., 2017).

Za razliku od spomenutih sfingosomskih formulacija vinkristina i vinblastina (Marqibo<sup>®</sup>, Alocrest<sup>®</sup>), čija se primjena temelji na pasivnoj ciljanoj dopremi lijeka u tumorsko tkivo, Noble i suradnici (2009) su uklopili vinkristin u imunoliposome za aktivnu ciljanu terapiju karcinoma dojke. Pokazali su da se površinskom modifikacijom DSPC/kolesterol/PEG-DSPE liposoma s fragmentima HER2-antitijela može postići 63 puta jači citotoksični učinak vinkristina na stanice raka dojke BT474 te čak 233 puta jači citotoksični učinak na SKBR3 stanice *in vitro* (Noble i sur., 2009).

## 4.2. POLIFENOLI

Polifenoli su vrlo raznolika skupina bioloških spojeva, a zajedničko im je da nastaju biosintezom iz zajedničkog intermedijera, fenilalanina, odnosno bliskog prekursora šikiminske kiseline. Osnovu kemijske strukture polifenola čini aromatski prsten s jednom ili više hidroksilnih skupina. Polifenoli se, s obzirom na broj fenolnih prstenova koje sadrže i s obzirom na strukturne elemente koji te prstenove povezuju, mogu podijeliti u nekoliko glavnih skupina: flavonoidi, stilbeni, fenolne kiseline i lignani, koji se zatim dijele u manje podskupine (Slika 3). U prirodi su prisutni uglavnom u konjugiranom obliku, tj. u obliku glikozida, s jednom ili više šećernih jedinica koje su vezane na hidroksilne skupine, a mogu se konjugirati i s drugim tvarima, kao što su različite karboksilne i organske kiseline, amini, lipidi ili drugi fenolni spojevi (Pandey i sur., 2009).



Slika 3. Strukturna klasifikacija polifenola

Pregledom znanstvene literature objavljene tijekom proteklih 20-ak godina moguće je uočiti trend rasta istraživanja primjene polifenola u području biomedicine, nutricionizma i prehrambene tehnologije. Razlog tome su ubikvitarnost u biljnom svijetu, velika zastupljenost u hrani biljnog porijekla, iznimna antioksidativna svojstva te moguća uloga u prevenciji različitih bolesti i poremećaja kojima je uzrok oksidativni stres, poput karcinoma, kardiovaskularnih bolesti i neurodegenerativnih bolesti. Osim toga, poznato je da polifenoli mogu modulirati aktivnost velikog broja enzimskih sustava i staničnih receptora (Manach i sur., 2004). Međutim, zbog kemijske raznolikosti polifenola, opseg apsorpcije i bioraspoloživost im značajno varira, a u velikoj mjeri podliježu i metaboliziranju u jetri i u crijevima od strane intestinalne mikroflore. Jedan od načina kojima se nastoje optimizirati svojstva polifenola i omogućiti njihova klinička primjena je uklapanje u liposome.

### 4.2.1. Flavonoidi

Flavonoidi su široko rasprostranjeni u prirodi, mješovitog su biogenog podrijetla, a nastaju kombinacijom puta šikiminske kiseline i acilpolimalonatnog puta. Dosad je identificirano više od 6.400 flavonoida, a prema topljivosti se dijele na lipofilne i hidrofilne flavonoide. U prirodi su najrasprostranjeniji flavoni i flavonoli, a zajedno s flavanonima, antocijanidinima i izoflavonoidima čine više od 80 % poznatih flavonoidnih spojeva. Flavoni i flavonoli se konkretno razlikuju u prisutnosti hidroksilne skupine u flavonolima. Što se tiče izoflavonoida, oni su ograničeni na porodicu *Fabaceae*, a otkriveno je više stotina izoflavonoida s različitom primjenom (antifungalna primjena, insekticidi, fitoestrogeni i dr.) (Vladimir-Knežević i Blažeković, 2015). Zbog visokog stupnja kemijske nezasićenosti flavonoidi su relativno nestabilni, posebice u biološkom okruženju. Također, pokazuju nisku topljivost i lošu bioraspoloživost, te im je stoga primjena u nutraceutske i farmaceutske svrhe limitirana (Huang i sur., 2017).

#### 4.2.1.1. Flavoni

**Baikalein** je flavon prisutan u korijenu biljke *Scutellaria baicalensis* (*Lamiaceae*), a po kemijskoj strukturi je 7-D-glukuronska kiselina. Značajan je zbog svog antivirusnog, antibakterijskog, antitumorskog, antioksidativnog i protuupalnog djelovanja, no kao i većina sekundarnih biljnih metabolita, pokazuje slabu topljivost i slabu oralnu bioraspoloživost koja iznosi svega 2,2 %. Uklapanjem u različite vrste liposoma zabilježeno je značajno poboljšanje bioraspoloživosti baikaleina. Primjerice, u odnosu na suspenziju baikaleina, liposomi pripremljeni iz Tween-a 80<sup>®</sup>, Phospholipon-a 90H<sup>®</sup> i limunske kiseline (maseni omjer 50/96/50) pokazali su čak trostruko bolju oralnu bioraspoloživost i 2,94 puta veću vršnu koncentraciju baikaleina u plazmi štakora *in vivo*. Uz navedeno, postignuta je 1,25-5,59 puta veća koncentracija flavona u jetri, slezeni i plućima eksperimentalnih životinja (Wei i sur., 2014).

Na tragu prethodnih studija koje su dokazale značajan inhibitorni učinak baikaleina na stanice tumora mjehura i grlića maternice (HeLa i U14 stanične linije), Li i suradnici (2016) su pripravili liposome s baikaleinom s kojima je povećana inhibicija rasta tumorskih stanica *in vitro* (HeLa tumorska stanična linija) i *in vivo* na miševima (cervikalni tumor), te postignuto sporije oslobađanje baikaleina *in vitro*.

Zanimljivo je spomenuti da je primjenom liposomski uklopljenog baikaleina inhibirano nakupljanje lipida i formiranje ekstracelularnog matriksa na Hs68 humanim dermalnim fibroblastima, te je povećana supresija enzima lipogeneze i povećan proupalni odgovor. Takvi rezultati idu u prilog mogućoj primjeni preparacije liposoma s baikaleinom za poticanje cijeljenja rana i obnavljanje integriteta kože (Fang i sur., 2018).

**Vogonin** je, kao i baikalein, flavon izoliran iz korijena biljke *Scutellaria baicalensis*, koji također pokazuje širok spektar djelovanja: protuupalno, antioksidativno, antikonvulzijsko, antitumorsko, neuroprotektivno i antivirusno djelovanje (posebice kod hepatitisa B). Antitumorsko djelovanje zasniva se na inhibiciji proliferacije i migracije stanica, inhibiciji angiogeneze te indukciji apoptoze i diferencijacije stanica. Međutim, slaba topljivost vogonina u vodi ograničava njegovu potencijalnu medicinsku primjenu. Kako bi se povećala bioraspoloživost, Tian i suradnici (2014) su uklopili vogonin u SPC/kolesterol liposome uz dodatak gliciretinične kiseline (GA) kao površinskog liganda. GA je izabrana radi postizanja selektivnosti liposoma, budući da je dokazano postojanje specifičnih veznih mjesta za GA na membrani hepatocita te povećan afinitet nanočestica modificiranih s GA za humane jetrene stanice. Kako bi dokazali da GA omogućuje ciljanu dopremu vogonina, uspoređivali su učinke postignute otopinom vogonina, konvencionalnim SPC/kolesterol liposomima s vogoninom i GA-modificiranim liposomima s vogoninom. *In vitro* testovi citotoksičnosti na trima različitim staničnim linijama (hepatociti L-02, hepatičke neparenhimalne stanice LX-2, HepG2 tumorske stanice) potvrdili su da uklapanje u liposome doprinosi boljem unosu vogonina u stanice i potenciranju citotoksičnog učinka u odnosu na kontrolni pripravak vogonina. GA-liposomima je postignut 1,6 puta veći unos u HepG2 stanice u odnosu na liposome bez GA, te 2,5 puta veći unos u HepG2 stanice nego u L-02 stanice. To znači da se vezanjem GA za površinu liposoma omogućuje razlikovanje tumorskih od zdravih stanica, odnosno selektivni unos lijeka u tumorsko tkivo, što je potvrđeno i *in vivo*. Nakon sistemske primjene GA-liposoma s vogoninom (injekcija) potvrđeno je brzo nakupljanje vogonina u tumoru i jetri miševa. Najveća koncentracija vogonina utvrđena je u tumorskom tkivu, te je bila veća od one postignute primjenom liposoma bez površinske modifikacije. Terapijska superiornost GA-modificiranih liposoma u odnosu na konvencionalne liposome s vogoninom, potvrđena je i *in vivo*, ispitivanjem inhibitornog učinka na rast solidnih tumora.

**Luteolin**, tj. 3',4',5,7-tetrahidroksiflavon je široko rasprostranjen u prirodi. Nalazi se u brojnim vrstama voća, povrća i ljekovitog bilja. Posjeduje brojne biološke učinke, a najvažniji su kemoprotektivno, protuupalno, antialergijsko i antitumorsko djelovanje. Antitumorski učinci



luteolina su ispitivani na različite tipove tumora: tumore pluća, glave, vrata, prostate, dojke, kolona, jetre, cervikalne tumore i melanome (Wu i sur., 2018). Slaba bioraspodijeljenost nakon oralne primjene, uz nisku topljivost u vodi osnovni su motivi za istraživanje i razvoj novih formulacija i načina primjene luteolina. Wu i suradnici (2018) su proveli istraživanja s liposomskim pripravkom luteolina za moguću terapiju kolorektalnog karcinoma. Uklapanjem u liposome postignuto je produljeno oslobađanje luteolina *in vitro* pri čemu je nakon 120 h oslobođeno 80 % luteolina. Također, koncentracija luteolina u plazmi miševa izmjerena 2 h nakon intravenske injekcije (50 mg/kg) bila je 10 puta veća za liposomski luteolin nego za kontrolu (otopina luteolina u dimetilsulfoksidu, DMSO), što znači da se uklapanjem u liposome smanjuje klirens luteolina. Usporedba antitumorskog učinka liposomskog i kontrolnog pripravka luteolina provedena je *in vitro* i *in vivo* na tumorskim stanicama (nediferencirani adenokarcinom debelog crijeva). Utvrđeno je da liposomski pripravak luteolina inhibira rast tumorskih stanica efikasnije od kontrolnog pripravka. Usprkos evidentnoj superiornosti liposomskog luteolina s obzirom na promatrane farmakokinetičke i farmakodinamičke parametre, u studiji nije zabilježena potpuna inhibicija rasta tumora *in vivo*, zbog čega autori navode potrebu daljnje optimizacije preparacije liposoma po pitanju (fosfo)lipidnog sastava, veličine i površinskih svojstava.

Setyawati i suradnici (2017) su uklopili luteolin u deformabilne liposome pripravljene iz Phospholipon-a 90H<sup>®</sup> i Tween-a 80<sup>®</sup>. Međutim, u tom je istraživanju naglasak bio na tehnološkim aspektima razvoja formulacije, bez ispitivanja farmakoloških učinaka *in vivo*.

#### 4.2.1.2. Flavonoli

Flavonol koji se smatra jednim od najboljih antioksidansa među flavonoidima jest **kvercetin**. Kvercetin je ubikvitaran u biljnom svijetu, a u većim se količinama može naći u brojnim vrstama voća i povrća. Istraživanja pokazuju da se antioksidativni učinci kvercetina ostvaruju na nekoliko načina: direktnim „hvatanjem“ slobodnih radikala, modulacijom genske ekspresije, interakcijom s različitim enzimskim sustavima, inhibicijom lipidne peroksidacije ili keliranjem iona prijelaznih metala (Baghel i sur., 2012). Nadalje, na molekularnoj razini kvercetin izravno inhibira različite proupalne medijatore i signalne molekule kao što su ciklooksigenaza-2 (COX-2), inducibilna sintaza dušikovog oksida (iNOS) i transkripcijski nuklearni faktor-B (NF-κB). Priprem i Sutthiparinyanont (2013) su proveli istraživanja u kojima je ispitan utjecaj 6 različitih liposomskih formulacija kvercetina na inhibiciju proupalnih medijatora (COX-2, NF-

κB) u humanim epitelnim MCF-10A stanicama. Testirane liposomske formulacije pripravljene su film metodom iz smjese EPC-a, kolesterola i Span<sup>®</sup>-a 60 u molarnom omjeru 1:1:1, kvercetina (0,3 mM) bez ili uz dodatak PEG-a (25 %, m/m), natrijevog alginata (0,05 %, m/m) i piperina (0,035 mM). Piperin je alkaloid karakterističan za crni papar, za koji je dokazano da povećava permeabilnost i bioraspoloživost različitih djelatnih tvari kada se primjenjuju oralnim putem. Smatra se da piperin povećava fluidnost i dinamiku membrana, stupajući u interakcije s fosfolipidima, te bi mogao utjecati na bioraspoloživost uklopljenog kvercetina. Western blot analizom utvrdili su da je ekspresija COX-2 potpuno inhibirana upotrebom PEG-iliranih liposoma s kvercetinom. Istovremeno, upotrebom piperin-kvercetin liposoma zabilježeno je smanjenje ekspresije COX-2 za oko 40 %, dok za ostale liposomske preparacije i neliposomski kvercetin nije zabilježena značajnija COX-2 inhibicija. Za PEG-ilirane liposome s kvercetinom (7,5 μM) dokazano je inhibitorno djelovanje na transkripcijsku aktivnost NF-κB, tj. citoprotektivna i protuupalna aktivnost, za razliku od slobodnog kvercetina u jednakoj dozi (DMSO otopina). Rezultati provedenih istraživanja ukazuju na važnost lipidnog sastava i površinske modifikacije liposoma na citoprotektivni učinak kvercetina. Naime, za razliku od alginata, dodatak piperina ili površinska modifikacija liposoma PEG-om, rezultirali su poboljšanim citoprotektivnim učincima formulacije *in vitro*, pri čemu se PEG-ilirana liposomska formulacija pokazala optimalnom.

Za kvercetin je dosada potvrđeno protuupalno, antialergijsko, imunomodulatorno, antimikrobno, kardioprotektivno i antitumorsko djelovanje (Fan i sur., 2003), a veoma su zanimljivi pozitivni učinci kvercetina na CNS: neuroprotektivno i antianksiozno djelovanje te potenciranje kognitivnih funkcija mozga. No, za potencijalnu primjenu kvercetina u moduliranju neuroloških funkcija, potrebno je premostiti problem niske distribucije kvercetina u mozak nakon oralne primjene, brzog metabolizma i slabe penetracije kroz krvno-moždanu barijeru. Kombinacijom nazalnog puta primjene i liposoma moguće je postići učinkovitu dopremu u mozak, budući da liposomi štite kvercetin od razgradnje i brze eliminacije te potiču penetraciju lijeka kroz krvno-moždanu barijeru i njegovu distribuciju u moždano tkivo. Učinkovitost oralno primjenjene suspenzije kvercetina u vodi (300 mg/kg dnevno) uspoređivana je s oralnom i nazalnom primjenom liposomskog kvercetina (20 μg dnevno) *in vivo*. Rezultati bihevioralnih testova na glodavcima potvrdili su anksiolitički učinak i porast kognitivnih funkcija za slobodni i liposomski kvercetin. Intranazalnom primjenom postignut je brži učinak pri nižoj dozi u odnosu na oralno primijenjen kvercetin. Pritom su za isti put primjene PEG-ilirani liposomi s kvercetinom pokazali značajno bolji anksiolitički i kognitivni

učinak pri nižoj primjenjenoj dozi od konvencionalnog kvercetina (Priprem i sur., 2008). Tong-Un i suradnici (2010) su pokazali da intranazalna primjena PEG-iliranog liposomskog kvercetina povećava gustoću i preživljavanje kolinergičkih neurona u hipokampusu, čime je potvrđen neuroprotektivni potencijal kvercetina i mogućnost primjene u prevenciji neurodegenerativnih bolesti.

Kao jedan od ključnih probavnih organa koji iz organizma neprestano eliminira toksine, jetra je podložna oštećenjima uzorkovanim oksidativnim stresom. Budući da kvercetin djeluje kao odličan antioksidans, izrodila se ideja o mogućim hepatoprotektivnim učincima ovog flavona. *Ex vivo* testovi inhibicije lipidne peroksidacije na homogenatu jetre štakora pokazali su da je antioksidativni učinak 50 puta jači u slučaju liposomskog kvercetina ( $IC_{50} = 136,94 \pm 52 \mu\text{g/ml}$ ) u usporedbi sa suspenzijom kvercetina ( $IC_{50} = 3.198,86 \pm 43 \mu\text{g/ml}$ ). *In vivo* evaluacija hepatoprotektivnog djelovanja potvrdila je učinkovitost oralno primijenjenog kvercetina, bilo u suspenziji ili u liposomskoj formulaciji. Pritom su razine biokemijskih markera hepatotoksičnosti kod pokusnih životinja bile značajno niže za skupinu tretiranu liposomskim kvercetinom u odnosu na skupinu tretiranu kvercetinom u suspenziji (Shaji i Iyer, 2012).

#### 4.2.2. Fenolne kiseline

**Ružmarinska kiselina** (RA) je ester kavene kiseline i 3,4-dihidroksifenil mliječne kiseline. Nalazi se u mnogim biljkama, posebice iz porodice *Lamiaceae*, a prvi je put izolirana iz ružmarina (*Rosmarinus officinalis*). Brojna istraživanja potvrđuju širok raspon bioloških učinaka RA: antioksidativno, antimutageno, antibakterijsko, antivirusno, antifungalno, neuroprotektivno i hepatoprotektivno djelovanje. Iako je iznimno snažan antioksidans, RA je slabo topljiva u vodi te kemijski vrlo nestabilna. S ciljem poboljšanja topljivosti i fizikalno-kemijske stabilnosti, RA je uklopljena u dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC)/kolesterol liposome i nanosfere pripravljene iz kopolimera mliječne i glikolne kiseline (PLGA). Fizikalno-kemijska karakterizacija pokazala je uspješno uklapanje RA i u liposome (55,6 %) i u nanosfere (43,4 %). Srednji promjer liposoma bio je nešto manji od nanosfera (426 nm u odnosu na 736 nm), dok je zeta potencijal bio blago negativan za oba tipa nanočestica. Stabilitetna studija provedena je pri različitim temperaturama uskladištenja (4 °C, 25 °C, 40 °C) tijekom 3 mjeseca. Utvrđeno je da fizička stabilnost nanosustava s RA ovisi o uvjetima pohrane pripravaka; nanosustavi su ostali stabilni pri 4 °C, dok je pri višim temperaturama uskladištenja opažena agregacija nanočestica. Degradacija nanočestica pratila je kinetiku prvog reda te je također bila značajno

brža pri višim temperaturama skladištenja. Iako su se liposomi pokazali nešto stabilnijima od nanosfera, oba testirana nanoterapijska sustava povoljno su utjecala na stabilnost RA. Procjena antioksidativnih učinaka RA nanosustava provedena je *in vitro*, primjenom sintetskih slobodnih radikala i testa fosfolipidne peroksidacije, kojima je dokazana produljena antioksidativna aktivnost RA-nanoformulacija tijekom 24 sata, uz nešto bolju učinkovitost liposoma u odnosu na nanosfere (Yücel i Şeker Karatoprak, 2017). Ista istraživačka grupa provela je istraživanja moguće topikalne primjene RA korištenjem etosoma. Etosomi pripremljeni s 30 % etanola su pokazali sličnu uspješnost uklapanja RA (66 %) kao i konvencionalni liposomi analognog lipidnog sastava (62 %), te sličan profil oslobađanja RA *in vitro*. Uklapanje RA u etosome ili konvencionalne liposome nije značajno utjecalo na sposobnost inhibicije enzima kolagenaze i elastaze, niti na sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije, a konvencionalni su se liposomi po tom pitanju pokazali nešto uspješnijima od etosoma. S druge strane, u odnosu na vodeno-etanolnu otopinu RA, oba su tipa liposoma omogućila bolju penetraciju fenolne kiseline u kožu miševa *ex vivo*. Pritom su etosomi pokazali permeaciju RA u dublje slojeve kože u odnosu na konvencionalne liposome (Yücel i suradnici, 2019), što se može pripisati djelovanju etanola kao promotora penetracije te je u skladu s brojnim prethodnim studijama koje potvrđuju bolji penetracijski potencijal etosoma u odnosu na konvencionalne liposome (Elsayed i sur., 2007).

#### 4.2.3. Stilbenoidi

**Resveratrol** (RES) i **epikatehin** (EPI) su prirodni polifenoli poznati po svojim antioksidativnim i protuupalnim učincima, zbog čega imaju potencijala u liječenju različitih upalnih stanja, uključujući i vaginitis. Međutim, klinička primjena RES-a i EPI-a limitirana je njihovom slabom topljivosti u vodi koja se odražava u niskoj bioraspoloživosti. Uklapanjem u liposome poboljšana je bioraspoloživost RES-a, a time i njegova i biološka učinkovitost te je omogućeno kontrolirano oslobađanje uklopljenog RES-a u vaginalnom tkivu (Jøraholmen i sur., 2015). Kako bi se omogućilo zadržavanje liposoma s RES-om i EPI-om na mjestu primjene, isti su uklopljeni u kitozanski gel. Kitozan je izabran kao polimer za izradu hidrogela zbog svoje biokompatibilnosti, biorazgradljivosti i intrinzičnih antimikrobnih svojstava. Kitozanski gel također omogućava kontrolirano oslobađanje uklopljene aktivne tvari, a posjeduje i mukoadhezivna svojstva, zbog čega je prikladna podloga za lijekove namijenjene liječenju vaginalnih infekcija. Protuupalni učinak ispitan djelovanjem EPI- i RES-liposoma na inhibiciju stvaranja dušikovog oksida (NO) u lipopolisaharid-induciranim makrofagima, pokazao je da EPI-liposomi uzrokuju jaču inhibiciju stvaranja NO. Antioksidativni učinak

promatran je na diamonijevoj soli 2-azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonske kiseline (ABTS) i 1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) slobodnim radikalima te je ustanovljeno da liposomski EPI ima značajno jače antioksidativno djelovanje na spomenute slobodne radikale od vitamina C i E. Umješavanjem liposoma u kitozanski gel dodatno je usporeno oslobađanje uklopljenih polifenola. RES-liposomi u hidrogelu uzrokovali su smanjenu sposobnost preživljavanja HaCaT stanica (keratinociti) pri koncentraciji od 10 µg/ml, dok pri nižim (1 µg/ml) i višim (50 µg/ml) koncentracijama RES-a nisu zabilježeni citotoksični učinci. S druge strane, EPI-liposomi, kako u tekućoj disperziji, tako i u obliku gela, nisu bili citotoksični do koncentracije 50 µg/ml (Jøraholmen i sur., 2019).

#### 4.2.4. Ostali fenolni spojevi

**Kurkumin** je spoj koji pripada posebnoj skupini polifenola, tzv. kurkuminoidima, a izolira se iz korijena biljne vrste *Curcuma longa* (*Zingiberaceae*). Lipofilna je molekula te stoga lako ulazi u stanicu permeacijom kroz staničnu membranu. Posjeduje iznimno širok spektar bioloških djelovanja, uključujući antibakterijski, antispazmolitički, antikoagulantni, protuupalni i antitumorski učinak. Međutim, spoj je iznimno osjetljiv na svjetlo, loše je topljivosti, nestabilan je pri gastrointestinalnom pH, brzo se metabolizira i eliminira iz organizma. Brojne provedene studije pokazuju da je loša fizikalno-kemijska i farmakokinetička svojstva kurkumina moguće poboljšati njegovim uklapanjem u liposome. Primjerice, uklapanjem u PEG-ilirane liposome omogućeno je produljeno oslobađanje kurkumina *in vitro* te produljeno zadržavanje u sistemske cirkulaciji nakon *i.v.* primjene (štakori), pri čemu je vrijeme polueliminacije bilo 13 puta dulje od kontrolnog pripravka kurkumina, odnosno 1,8 puta dulje od klasičnih liposoma (You i sur., 2014). Dulje zadržavanje PEG-iliranih liposoma s kurkuminom u sistemske cirkulaciji dokazano je i u ranijoj animalnoj studiji na zečevima (Awasthi i sur., 2003), dok je *ex vivo* studijom u serumu krava utvrđena ravnomjernija distribucija vezikula, bez agregacije te značajno povećanje stabilnosti PEG-iliranih liposoma s kurkuminom u odnosu na klasične liposome (Guo i Wang, 2013).

Osim PEG-iliranih liposoma (You i sur., 2014; Awasthi i sur., 2003; Guo i Wang, 2013; Hong i sur., 2008; Lin i sur., 2012), kao nosači kurkumina ispitivani su i liposomi čije je površina modificirana ligandima za postizanje aktivne ciljane terapije, smanjenje potrebne doze lijeka i mogućih nuspojava te kraće trajanje terapije. Lu i suradnici (2012) su primjenom film metode

priredili tzv. folat-modificirane liposome s kurkuminom, za koje je dokazano značajno povećanje stabilnosti i topljivosti kurkumina u odnosu na vodeno-etanolnu otopinu kurkumina. S obzirom da su folatni receptori hiperekprimirani u mnogim tumorskim stanicama, primjenom liposoma čija je površina modificirana folatima moglo bi se postići ciljano antitumorsko djelovanje (Gupta i sur., 2017).

Kombinacija hijaluronske kiseline (Zhao i sur., 2013) ili natrijevog hijaluronata s kurkuminskim liposomima (Manca i sur., 2015), također se pokazala zanimljivim pristupom za unaprijeđenje fizikalno-kemijskih svojstava liposoma, povećanje njihove stabilnosti te postizanje odgođenog i kontroliranog oslobađanja uklopljenog kurkumina. Hijalurosomi s kurkuminom komparirani su s klasičnim liposomskim kurkuminom uzimajući u obzir fizikalno-kemijske parametre i sposobnost dopreme lijeka u kožu *in vitro* (koža svinje). Također, provedena je i evaluacija biokompatibilnosti i prevencije oksidativnog stresa na humanim keratinocitima *in vitro*, dok je učinkovitost takvog inovativnog terapijskog sustava u pospješivanju cijeljenja rana i reepitelizaciji kože provedena *in vitro* (humani keratinociti) i *in vivo* (miševi). Rezultati opisanog istraživanja potvrdili su da dodatak hijaluronana imobilizira fosfolipidne vezikule, značajno povećava uspješnost uklapanja kurkumina, povećava stabilnost vezikula, optimizira reološka svojstva terapijskog sustava za topikalnu primjenu te potencira biološke učinke uklopljenog kurkumina, čime su potvrđeni potencijali primjene takvog nanosustava za liječenje strukturalnih i funkcionalnih oštećenja kože (Zhao i sur., 2013).

Svojstva liposoma, njihov terapijski potencijal i ponašanje *in vivo* ovisit će o fizikalno-kemijskim svojstvima lijeka, ali i samih vezikula. Zato prilikom razvoja liposomske formulacije veliku pažnju treba obratiti na metodu pripreme liposoma i odabir konstitutensa. U istraživanju kojeg su proveli Hasan i suradnici (2014) pripremljeni su liposomi s kurkuminom koristeći lecitin iz 3 različita izvora: sojin lecitin, lecitin uljane repice i lecitin izoliran iz lososa, dok su metoda izrade i količine fosfolipida bile jednake za sve preparacije. Rezultati fizikalno-kemijske karakterizacije su pokazali da je prosječni promjer vezikula manji za liposome s kurkuminom u odnosu na „prazne” liposome. Maksimalna topljivost liposomskog kurkumina bila je 0,25-0,28 mg/ml za liposomski kurkumin, što je mnogostruko povećanje u odnosu na 8,33 µg/ml, kolika iznosi topljivost kurkumina u vodi. Utjecaj kompozicije i koncentracije pojedinih konstituenta na citotoksičnost testiranih liposomskih formulacija ispitan je na stanicama tumora dojke MCF7. Uklapanjem u liposome citotoksičnost kurkumina je značajno smanjena te su se optimalnom formulacijom pokazali liposomi pripremljeni iz lecitina lososa.

Antiinflamatorni, antiproliferacijski i citotoksični učinci Lipocurc<sup>®</sup>-a, inovativne liposomske formulacije kurkumina koja je nedavno prošla fazu I kliničkog istraživanja, ispitivani su na humanim sinovijalnim fibroblastima (SW982) i makrofagima miševa (RAW264). Naime, slobodni kurkumin (DMSO otopina kurkumina) čak i pri malim koncentracijama (5 µg/ml) ima toksične učinke na sinovijalne fibroblaste i makrofage dok liposomski oblik (Lipocurc<sup>®</sup>) značajno smanjuje toksičnost kurkumina. Uz spomenutu toksičnost otopine kurkumina, prisutna je i inhibicija stanične proliferacije od oko 50 % koja kod liposomskog kurkumina iznosi svega 10 %. Lipocurc<sup>®</sup> je u koncentraciji od 10 µg/ml pokazao antiinflamatorni učinak tako što u potpunosti blokira sintezu IL-6, a sintezu TNF- $\alpha$  za 80 %. Iz rezultata proizlazi da liposomski kurkumin (Lipocurc<sup>®</sup>) učinkovito reducira ekspresiju proupalnih citokina/kemokina u sinovijalnim fibroblastima i makrofagima, bez značajnijeg utjecaja na vijabilnost stanica (Kloesch i sur., 2016). Studija Ng i suradnika (2018) također ukazuje na potencijale liposomskog kurkumina za liječenje upalnih bolesti. Naime, na imortaliziranim humanim stanicama dišnih puteva (Bci-NS1) postignuta je značajna redukcija ekspresije proupalnih markera (IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), pri čemu se uspješnijom pokazala liposomska preparacija s nižom koncentracijom kurkumina (1 µg/ml) u odnosu na pripravak liposoma s 5 µg/ml kurkumina.

Antitumorski učinci kurkumina posebno su zanimljivi za moguću primjenu u kliničkoj praksi. *In vitro* studije su potvrdile da kurkumin snažno utječe na aktivnost nekoliko enzima i koenzima, na transkripcijske faktore, protein kinaze i faktore rasta (Feng i sur., 2017). Osim dokazane učinkovitosti, kurkumin se pokazao sigurnim i tolerabilnim pri vrlo visokim dozama, a sve nabrojano čini ga atraktivnom molekulom za brojne istraživače koji se bave razvojem onkoloških lijekova, što je danas najaktualnije i jedno od najkompleksnijih područja suvremene medicine i farmacije. Stoga ne iznenađuje zaista pozamašan broj publikacija koje se bave razvojem liposomskih formulacija kurkumina za ciljano djelovanje na određene vrste tumora pluća, prostate, dojke, jetre, cerviksa, osteosarkom i druge tumore (Feng i sur., 2017). Sažeti pregled takvih istraživanja prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Ispitivanja liposomskih formulacija kurkumina za (ciljano) djelovanje na određene vrste tumora. Preuzeto i prilagođeno iz *Feng i sur., (2017)*, uz dozvolu *Dove Medical Press-a*.

TUMOR	TIP ISTRAŽIVANJA	REZULTATI	LITERATURA
Pluća	<i>In vitro</i> (Lewis LL/2 stanice) <i>In vivo</i> (miševi)	Stagnacija LL/2 stanica u G2/M fazi	Wang i sur., 2013
	<i>In vitro</i> (A549 stanice)	Poboljšana dostava i poboljšani antitumorski učinak	Lin i sur., 2012
		Poboljšan inhibitorski učinak na proliferaciju tumorskih stanica	Rahman i sur., 2012
		Veća citotoksičnost, poticanje stanične apoptoze	Apiratikul i sur., 2013
Grlić maternice	<i>In vitro</i> (HeLa i SiHa stanice)	Veća citotoksičnost, poticanje stanične apoptoze	Saengrit i sur., 2014
	<i>In vitro</i> (HeLa stanice)	Povećana stabilnost i dostava u stanice; veća citotoksičnost	Huang i sur., 2014
Dojka	<i>In vitro</i> (MCF-7 stanice)	Poboljšana bioraspoloživost; inhibicija staničnog ciklusa; indukcija apoptoze	Hasan i sur., 2014
		Povećana antitumorska aktivnost	Dhule i sur., 2012



Prostata	<i>In vitro</i> (PC-3 stanice)	Povećani unos lijeka u stanice; ciljani antitumorski učinak; inhibicija stanične proliferacije	Tian i sur., 2014
	<i>In vitro</i> (LNCaP i C4-2B stanice)	Poboljšana bioraspodjeljivost; poboljšani antitumorski učinak	Thangapazham i sur., 2008
	<i>In vivo</i> (miševi)	Povećana koncentracija kurkumina u serumu i tkivu prostate; inhibicija rasta stanica; indukcija apoptoze	Narayanan i sur., 2009
Jetra	<i>In vitro</i> (Bel-7402 stanice)	Inhibicija proliferacije stanica; indukcija apoptoze	Li i sur., 2006
	<i>In vitro</i> (HepG2 stanice)	Povećana citotoksičnost	Apiratikul i sur., 2013
Osteosarkom	<i>In vitro</i> (KHOS stanice)	Stagnacija stanica u G2/M fazi; poboljšana citotoksičnost	Dhule i sur., 2014
		Veći unos u stanice; poboljšani antitumorski učinak	Dhule i sur., 2012

### 4.3. DITERPENOIDI

Diterpenoidi pripadaju širokoj skupini prirodnih spojeva koji nastaju metabolizmom 2E, 6E, 10E-geranil-geranil-difosfata (GGPP), a sadrže 20 ugljikovih atoma. Pronađeni su u različitim životinjskim organizmima, ali su rasprostranjeniji u biljkama. Najzastupljeniji su u biljkama porodice *Lamiaceae* (forskolin) i *Asteraceae* (steviozid) (Vladimir-Knežević i Blažeković, 2015). Diterpenoidima se smatraju diterpeni kod kojih su metilne skupine pomaknute/uklonjene ili su dodani atomi kisika u molekulu.

Taksani su kompleksni diterpenoidi, prirodni produkti biljnih vrste *Taxus brevifolia*, *Taxaceae* (paklitaksel) ili njihovi polusintetski derivati (docetaksel). Za taksane kao skupinu spojeva karakteristična je slaba topljivost u vodi, zbog čega ih je potrebno uklopiti u prikladne ljekovite oblike.

**Paklitaksel** se dobiva izolacijom iz vrste *Taxus brevifolia*, *Taxaceae* i jedan je od najznačajnijih biljnih lijekova koji se koristi u kemoterapiji zadnjih 20-25 godina. Vrlo slaba topljivost u vodi, ali i u uljima, predstavlja veliki izazov u razvoju novih terapijskih sustava (formulacija) prikladnih za primjenu u kemoterapiji. Jedan od pokušaja razvoja terapijskog sustava za paklitaksel bilo je uklapanje paklitaksela u Cremophor<sup>®</sup> (neionogena površinski aktivna tvar, solubilizator i emulgator). Međutim, u toj je formulaciji paklitaksel ispoljio svoju toksičnost i uzrokovao po život opasne anafilaktičke reakcije. Nasuprot Cremophor<sup>®</sup>-u, uklapanjem paklitaksela u liposome smanjila bi se njegova toksičnost na zdrave stanice, poboljšao antitumorski učinak i podnošljivost čime bi se značajno unaprijedila terapija. Bitnu ulogu kod uklapanja paklitaksela u liposome ima omjer lijeka i lipida. Velika koncentracija lipida može biti problematična po pitanju potencijalne toksičnosti liposomske formulacije te je otežavajući parametar tijekom proizvodnje liposoma u industrijskim razmjerima (Straubinger i Balasubramanian, 2005). Rane i Prabhakar (2009) su uklapali paklitaksel u pH-osjetljive liposome različitog fosfolipidnog sastava. Liposomi sastavljeni od Phospholipon<sup>®</sup>-a 90G, dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPC) i kolesteril-hemisukcinata pokazali su optimalna svojstva s čak 94 %-tnom uspješnošću uklapanja lijeka te brzim otpuštanjem lijeka pri pH 5,5. Liposomi s paklitakselom pokazali su djelovanje na različite ekstrakranijalne tumore, uključujući glioblastom. Glioblastom je jedan od najagresivnijih primarnih malignih tumora mozga, s veoma lošom prognozom za pacijenta. Na staničnoj liniji humanog glioblastoma U87 MG dokazan je značajan antiproliferativni učinak formulacije PTX-LIPO (liposomi s

paklitakselom), pri čemu je zabilježeno značajno smanjenje vijabilnosti tumorskih stanica u ispitivanom rasponu koncentracija (0,01-100 µg/ml). Antitumorski (antigliomski) učinak potvrđen je i *in vivo* ispitivanjima na miševima. Naime, nakon primjene PTX-LIPO u kombinaciji s pulsним ultrazvukom zabilježeno je značajno nakupljanje paklitaksela u tumorskom tkivu i produljenje životnog vijeka za 20,8 % u odnosu na netretirane životinje (Shen i sur., 2017).

**Docetaksel** je taksan polusintetskog porijekla koji se koristi u liječenju različitih vrsta tumora, a značajan je zbog letalnog učinka na rast tumorskih stanica. Posebno je učinkovit kod solidnih tumora, uključujući tumore jajnika, dojke, pluća te glave i vrata. Neki podaci govore da je docetaksel učinkovitiji i sigurniji za primjenu od paklitaksela, međutim, docetaksel, kao i paklitaksel pokazuje slabu topljivost u vodi i uzrokuje razne nuspojave kao što su neutropenija, periferna neuropatija i reakcije preosjetljivosti. Stoga su brojna istraživanja usmjerena na uklapanje docetaksela u nanosustave poput liposoma, polimernih micela i nanosfera kako bi se nadvladala loša fizička svojstva i podnošljivost. Najprihvatljivijim i najučinkovitijim nosačima pokazali su se upravo liposomi i to pH-osjetljivi liposomi koji omogućuju kontrolirano oslobađanje uklopljene djelatne tvari u blago kiselom okruženju ( $\approx$  pH 5,5), kakva su i tumorska tkiva (Vanić, 2012a). U istraživanju kojeg su proveli Zhang i suradnici (2012), učinak pH-osjetljivih docetaksel liposoma pripremljenih iz fosfatidiletanolamina (PE) i oleinske kiseline je uspoređivan s klasičnim oblikom docetaksela (Duopafei<sup>®</sup>) *ex vivo* na uzorcima seruma i tkiva miševa nakon intravenske primjene te praćenjem farmakokinetičkih parametara *in vivo*. *In vitro* studija je pokazala da se unutar 8 sati oslobodilo 80 % lijeka iz Duopafei<sup>®</sup> pripravka dok se samo 20 % oslobodilo iz liposoma. Kontrolirano otpuštanje docetaksela iz liposoma, rezultiralo je njegovim produljenim zadržavanjem u cirkulaciji. Također, u usporedbi s Duopafei<sup>®</sup> pripravkom, za liposomski docetaksel zabilježene su veće koncentracije u jetri i slezeni što upućuje na veću distribuciju lijeka u organe retikuloendotelnog sustava, bez akumulacije u ostalim organima.

Liposomski pripravci paklitaksela LED-ETU (DOPC/kolesterol/kardiolipin) i Endotag-I (dioleoiltrimetilamonijpropan/DOPC) trenutno se nalaze u fazi II kliničkih studija. U fazu II kliničkih testiranja ušla je i preparacija docetaksela (ATI-1123) bazirana na tehnologiji protein-stabiliziranih liposoma (PSL<sup>®</sup>, Azaya Therapeutic) (Bulbake i sur., 2017).

**Triptolid** (TP) je diterpenoid prisutan u biljci *Tripterygium wilfordii* (*Celastraceae*), koja se tradicionalno koristi u kineskoj medicini. TP pokazuje višestruke biološke učinke poput: protuupalnog, imunosupresivnog i antitumorskog djelovanja te suprimirajućeg učinka na

plodnost mužjaka u sisavaca. Zbog njegovog protuupalnog djelovanja moguća je primjena u liječenju autoimunih bolesti, posebice reumatoidnog artritisa. Međutim, klinička upotreba TP-a je ograničena zbog ozbiljne toksičnosti koju ispoljava na gastrointestinalni, hepatički, kardiovaskularni, hematopoetski i urogenitalni sustav. Kako bi se zaobišao prvi prolazak kroz jetru i smanjila incidencija i ozbiljnost gastrointestinalnih nuspojava primjene TP-a, predložena je njegova transdermalna primjena, u obliku flastera s liposomskim hidrogelom (TP-LHP) (Chen i suradnici, 2015). Prvi korak u razvoju TP-LHP terapijskog sustava, bila je priprava liposoma s uklopljenim TP-om, pri čemu su kao konstituenti korišteni EPC i kolesterol, a film metoda kao metoda pripreme. Srednji promjer liposoma iznosio je 202 nm, a uspješnost uklapanja TP-a bila je 84 %. Liposomske disperzije uklopljene su u hidrogel, koji je potom nanesen u obliku filma na flastere, a dobiveni kompleksni terapijski sustav (TP-LHP) kombiniran je s tretmanom mikroigla u svrhu pospješivanja transdermalne apsorpcije TP-a. Farmakokinetička i farmakodinamička analiza TP-LHP-a provedena je na animalnom modelu kolagenom induciranog artritisa na štakorima. Farmakokinetička analiza pokazala je da se primjenom TP-LHP u kombinaciji s mikroiglama sporije postiže vršna koncentracija u plazmi, uz značajno dulje zadržavanje TP-a u plazmi i značajno povećanje bioraspodivnosti u usporedbi s intraglutealnom injekcijom TP-a. Farmakodinamička analiza je pokazala da primjena TP-LHP-a tijekom 4 tjedna rezultira smanjenjem stupnja oteknuća zglobova u svim testiranim dozama (10, 20 i 40 mg/kg). Istovremeno je utvrđeno značajno smanjenje razine IL-6 i IL-1 $\beta$  u serumu štakora, a imunokemijskim testovima utvrđena je i supresija ekspresije jetrene fetalne kinaze-1, jetrene tirozin kinaze-4 i hipoksijom-inducibilnog faktora-1 $\alpha$  u sinovijalnoj tekućini. Opisani rezultati potvrđuju prikladnost liposomske formulacije TP-a u kombinaciji s tehnologijom mikroigala, kao sigurnog i učinkovitog pristupa u liječenju reumatoidnog artritisa (Chen i suradnici, 2015).

Protuupalni učinci TP-a uklopljenog u liposome potvrđeni su i u studiji Yuan i suradnika (2017). Liposomi sastavljeni od HSPC-a i kolesterola (4:1, n/n) te površinski modificirani dodatkom 3,5-dipentadeciloksibenzamin hidroklorida (TRX-20) u različitim koncentracijama (6 %, 11 % ili 14 %, m/m), pripremljeni po uzoru na formulaciju Morimota i suradnika (2007). Oni su naime dokazali da se TRX-modifikacijom liposoma promovira njihov unos u mezangijalne stanice (MS), a TRX-liposomi u studiji Yuan i suradnika (2017) dodatno su modificirani polietilenglikolom (PEG<sub>5000</sub>) kako bi se povećalo vrijeme polueliminacije i zadržavanje TP-a u ciljanom tkivu (glomeruli). Značajni protuupalni učinci TRX-liposoma i PEG<sub>5000</sub>-TRX-liposoma dokazani su *in vitro* (MS u kulturi), praćenjem inhibicije oslobađanja

dušikovog oksida (NO) i TNF- $\alpha$  nakon stimulacije stanica lipopolisaharidima, pri čemu je dokazan bolji učinak od neliposomskog TP-a u istoj dozi (DMSO otopina TP-a razrijeđena hranjivim medijem). Liposomske formulacije su pokazale učinkovitost i *in vivo*, uspješno reducirajući simptome membranske nefropatije kod štakora i značajno poboljšavajući relevantne biokemijske markere (proteinurija, serumski kolesterol i albumin). Usprkos pozitivnim rezultatima, valja napomenuti da su *in vitro* eksperimenti na izoliranim MS u kulturi pokazali citotoksične učinke TRX-liposoma, ovisne o udjelu TRX-20 u formulaciji. Iz tog razloga sigurnost primjene TX-liposoma ostaje otvorenim pitanjem, koje zahtjeva dodatne testove toksičnosti *in vivo* i/ili daljnju optimizaciju liposomskog pripravka.

Ciljana doprema TP-a posredstvom liposoma istraživana je i u području antitumorske terapije. Naime, nekoliko je studija pokazalo da TP ne djeluju samo citotoksično na stanice tumora pluća, već ih ujedno čine podložnijima za djelovanje drugih kemoterapeutika *in vitro*. Međutim, slaba topljivost (0,017 mg/ml) i toksični učinci na niz organskih sustava ograničavaju iskorištavanje značajnog antitumorskog potencijala TP-a. Kako bi se usmjerilo djelovanje uklopljenog TP-a na ciljane tumorske stanice u organizmu, Lin i suradnici (2017) su pripravili imunoliposome vezanjem antitijela za karbonsku anhidrazu IX na površinu liposoma. Nakon *in vivo* pulmonarne primjene TP-imunoliposoma (miševi), zabilježeno je nakupljanje liposoma u plućima i zadržavanje na ciljanom mjestu djelovanja tijekom 96 sati. Takav visokospecifični biodistribucijski profil TP-imunoliposoma omogućio je značajno bolju inhibiciju rasta tumora u odnosu na klasične TP-liposome i kontrolni pripravak TP-a, pri čemu za ispitivane liposomske formulacije (imunoliposome i klasične liposome) histopatološkom analizom jetre nisu detektirani hepatotoksični učinci.

#### 4.4. SAPONINI

Saponini su skupina bioloških spojeva koji su u manjem ili većem udjelu prisutni u brojnim biljnim vrstama. Po kemijskoj strukturi saponini su amfipatski glikozidi, a postoje dvije osnovne skupine saponina koje se razlikuju prema aglikonskom dijelu (sapogeninu): triterpenski saponini i steroidni saponini, koji služe kao ishodne supstancije za polusintezu steroidnih lijekova. Naziv ove skupine spojeva vezan je uz zajedničko svojstvo saponina da otapanjem u vodi stvaraju intenzivnu pjenu poput sapuna (Vladimir-Knežević i Blažeković, 2015).

*Glycyrrhiza glabra* (sladić) je zeljasta biljka koja pripada porodici *Fabaceae*. Bioaktivni ekstrakt sladića sadrži mnoge ljekovite spojeve kao što su primjerice izoflavonoid glabridin, različiti polifenoli i saponini. Dikalijev glicirizinat je saponin koji je moguće izolirati iz korijena sladića ekstrakcijom s vodom. Uvelike se koristi u dermatologiji za kondicioniranje kože te kao protuupalni i smirujući agens. Kemijski je stabilna molekula, dobro topljiva u vodi, a zbog emulgirajućeg djelovanja te izrazito slatkog okusa koristi se i kao pomoćna tvar u izradi ljekovitih i kozmetičkih pripravaka (Trotta i sur., 2002). Mogućnost uklapanja dikalijevog glicirizinata (DKG) u liposome te primjene u liječenju akutnog/kroničnog dermatitisa istraživali su Trotta i suradnici (2002). Njihova se formulacija temeljila na deformabilnim liposomima pripremljenima iz SPC-a ili HSPC-a, u kombinaciji s DKG-om (2:1, 4:1 ili 8:1; m/m) koji je istovremeno bio djelatna tvar i rubni aktivator (surfaktant koji doprinosi elastičnosti liposomske membrane). Na temelju srednjeg promjera vezikula prije i poslije ekstruzije kroz membranske filtere (promjera pora 100 nm) utvrđeno je da dodatak DKG-a u liposome rezultira značajnim povećanjem deformabilnosti fosfolipidne membrane u odnosu na klasične PC- i HPC-liposome. Povećana elastičnost membrane liposoma može biti korisno svojstvo za (trans)dermalnu primjenu uklopljenog lijeka, budući da se na taj način olakšava prolazak liposoma kroz intercelularne prostore rožnatog sloja kože u dublje slojeve epidermisa te fuzija liposoma sa stanicama kože. Superiornost deformabilnih liposoma s DKG-om, s obzirom na permeaciju i zadržavanje u koži, dokazana je *ex vivo* na uzorcima svinjske kože. Za liposomski DKG zabilježena je značajno bolja doprema DKG-a u kožu u odnosu na vodenu otopinu DKG-a, micelarni DKG i U/V emulziju DKG-a.

#### 4.5. RAZLIČITO

**Usnična kiselina (UA)** je dibenzofuranski spoj koji je u prirodi dosad pronađen isključivo u različitim vrstama lišajeva (rod *Usnea*). Ekstrakti lišajeva tradicionalno su se koristili u narodnoj medicini: eksterno za tretiranje i poboljšano cijeljenje rana ili interno za grlobolju, zubobolju i vrućicu. I zaista, moderna znanost dokazala je značajno antibakterijsko, antifungalno i antivirusno djelovanje UA *in vitro* (NIH), što je potaknulo istraživanja u području pročišćavanja i izolacije UA. Osim antibakterijskog učinka na Gram-pozitivne bakterije i mikobakterije, UA posjeduje antifungalni učinak, djeluje protuupalno, inhibitor je mitoze i antitumorski agens. Kao i brojni drugi sekundarni metaboliti biljaka s dokazanim biološkim učincima, UA je uklapana u liposome s ciljem poboljšanja njezinih farmakokinetičkih i

farmakodinamičkih svojstava. U istraživanjima brazilskog istraživačkog tima (Lira i suradnici, 2009), UA je uklopljena u liposome različitog površinskog naboja, a potom je provedeno određivanje antimikrobnog učinka, dostava UA u makrofage te citotoksičnost pripremljenih formulacija na kulturi stanica J774 makrofaga. Pozitivno nabijeni PC/kolesterol/stearilamin liposomi bili su fizički stabilni tijekom 180 dana pohrane pri 4 °C. Za razliku od njih, kod negativno nabijenih PC/kolesterol/fosfatidna kiselina liposoma zabilježena je precipitacija UA 7 dana nakon priprave liposoma, a kod neutralnih liposoma u roku 2 sata. Pozitivno nabijeni liposomi su bili stabilni i u testovima ubrzanog starenja, zbog čega je ta formulacija odabrana za daljnja testiranja. Njihov srednji promjer iznosio je oko 100 nm, zeta potencijal 9 Mv, a uspješnost uklapanja UA bila je gotovo 100 %-tna ( $99,6 \pm 0,2$  %). Uklapanjem UA u liposome postignuto je kontrolirano oslobađanje lijeka iz liposoma zbog snažne interakcije UA s fosfolipidima liposoma. *In vitro* ispitivanja oslobađanja UA iz liposoma pokazala su bimodalnu kinetiku. Pritom se u prvih 8 sati oslobodilo oko 20 % uklopljene UA, nakon čega se oslobađanje usporava i prati kinetiku prvog reda. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) i minimalna baktericidna koncentracija (MBK) ispitana je na kulturama *Mycobacterium tuberculosis*. MIK za UA liposome iznosio je 5,8 µg/ml, dok je za DMSO otopinu UA iznosio 6,5 µg/ml. Razlika u MBK-ovima bila je dvostruka: 32 µg/ml za otopinu UA u odnosu na 16 µg/ml za UA liposome. Međutim, UA liposomi pokazali su i značajnije citotoksične učinke ( $IC_{50}=12,5$  µg/ml) u odnosu na otopinu UA ( $IC_{50}=22,5$  µg/ml), što se može dovesti u vezu s efikasnijim unosom liposomske UA u stanice makrofaga J774 te duljim zadržavanjem u njima (30 sati) (Lira i sur., 2009). U nastavku istraživanja, autori su pokazali da se uklapanjem UA u liposome postiže snažan antimikobakterijski učinak UA na rezistentne sojeve *M. tuberculosis* te da se istovremenom primjenom UA liposoma i antituberkulotika rifampicina, mogu postići sinergistički antimikobakterijski učinci *in vitro* (Ferraz-Carvalho i sur., 2016).

Po uzoru na narodnu medicinu i tradicionalnu primjenu ekstrakata lišajeva za tretiranje rana, razvijeni su inovativne obloge s UA za tretiranje opekotina. Prvi korak u razvoju funkcionalnih obloga bilo je uklapanje UA u liposome (PC:UA=18:1, w/w), nakon čega su liposomi pomiješani s kolagenskom disperzijom (2 %-tna disperzija kolagena u 0,5 M octenoj kiselini i 20 % plastifikatora) u omjeru 1:4 (v/v). Iz dobivene smjese izrađen je tanki film koji je korišten kao obloga za tretiranje opekline drugog stupnja na *in vivo* animalnom modelu (štakori). Životinje su tretirane kolagenskim filmom, kolagenskim filmom s praznim liposomima ili kolagenskim filmom s UA-liposomima. Rezultati histološke i imunohistokemijske analize potvrdili su da obloge s UA liposomima nakon 14 dana omogućuju bržu supstituciju kolagena

tipa III s kolagenom tipa I, a nakon 21 dan omogućuju značajno gušću kolagenizaciju i brzu epitelizaciju rana.

**Dialil-sulfid** (DAS) je djelatna tvar izolirana iz češnjaka (*Allium sativum*, *Liliaceae*) za koju je dokazano da posjeduje široki spektar bioloških učinaka od kojih su najizraženiji: snižavanje koncentracije lipida u krvi, antimikrobno i antitumorsko djelovanje. Smatra se da se antitumorski učinak DAS-a temelji na modulaciji detoksifikacijskih enzima i izraženom antioksidativnom učinku, što je dokazano *in vivo* na animalnim modelima kemijski induciranih karcinoma (Khan i sur., 2007).

Na animalnom je modelu (albino miševi) ispitano djelovanje DAS-liposoma kao kemoterapeutika u liječenju papiloma tumora kože inducirano policikličkim aromatskim ugljikovodikom (2,4-dimetoksibenzaldehid, DMBA) (Khan i suradnici, 2007). Studija je bila koncipirana na način da su miševi 3 puta tjedno tijekom 12 tjedana bili izlagani djelovanju DMBA-om koji ima citotoksično, mutageno i kancerogeno djelovanje na ljude i životinje te su unutar sat vremena od DMBA ekspozicije primjenjivani liposomi s uklopljenim DAS-om. Pritom su korištene 2 različite liposomske formulacije; konvencionalni EPC/kolesterol liposomi i pH-osjetljivi liposomi, sastavljeni od dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) i kolesteril-hemisukcinata. Primjenom DAS-liposoma postignuto je odgađanje tumorigeneze te značajna redukcija u broju i veličini DMBA induciranih papiloma tumora. Inhibicija rasta tumora (u odnosu na netretirane životinje) iznosila je 94 % u miševa tretiranih pH osjetljivim liposomima, odnosno 84 % u miševa tretiranih konvencionalnim liposomima, što predstavlja značajno poboljšanje učinka u odnosu na slobodni, neliposomski DAS (70 %). Štoviše, tretman liposomskim formulacijama rezultirao je boljim preživljavanjem životinja, pri čemu je na kraju istraživanja potvrđen izostanak pojave tumora u 23 % životinja tretiranih konvencionalnim liposomima, odnosno 34 % u skupini tretiranoj pH-osjetljivim liposomima. Western blot analizom na citogenetskoj je razini potvrđena pojačana ekspresija gena za supresiju tumora.



## 5. ZAKLJUČAK

Uklapanjem djelatnih tvari biljnog porijekla u liposome odgovarajućeg sastava i fizikalno-kemijskih svojstava moguće je premostiti brojne problematične aspekte biomedicinske primjene fitokonstituenta. Rezultati brojnih *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* ispitivanja opisanih u ovom radu pokazuju da uklapanje djelatnih tvari biljnog porijekla u liposome rezultira: povećanjem stabilnosti uklopljene djelatne tvari tijekom skladištenja i u biološkom okruženju, produljenim i kontroliranim oslobađanjem, povećanjem biorasploživosti, potenciranjem farmakoloških učinaka i terapijske učinkovitosti, kao i smanjenjem iritacija i toksičnosti.

Najveći dio istraživanja provedenih s liposomski uklopljenim biljnim djelatnim tvarima odnosi se na antitumorsku terapiju. O iznimnoj vrijednosti i kliničkoj primjenjivosti liposoma kao nosača biljnih lijekova svjedoči ne samo ogroman broj provedenih *in vivo* istraživanja, već i respektabilan broj liposomskih formulacija koje su u fazama kliničkih ispitivanja (Alocrest<sup>®</sup>, Brakiva<sup>®</sup>, INX-0125, OSI-211, LED-ETU, Endotag-I, LE-SN38, ATI-1123) ili su čak odobrene za humanu primjenu (Marqibo<sup>®</sup>, Onivyde<sup>®</sup>).

## 6. POPIS OZNAKA I KRATICA

ABTS	diamonijeva sol 2-azino bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonske kiseline
CNS	središnji živčani sustav
COX – 2	ciklooksigenaza 2
DAS	dialil-sulfid
DKG	dikalijev glicirizinat
DMBA	2,4-dimetoksibenzaldehid
DOPC	diolilfosfatidilkolin
DMSO	dimetilsulfoksid
DPPC	dipalmitoilfosfatidilkolin
DPPH	1-difenil-2-pikrilhidrazil
DSPC	distearoilfosfatidilkolin
DSPE	distearoilfosfoetanolamin
EPC	fosfatidilkolin iz jajeta
EPI	epikatehin
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove
GA	gliciretinična kiselina
GGPP	2E, 6E, 10E-geranil-geranil-difosfat
HPC	hidrogenirani fosfatidilkolin
HSPC	hidrogenirani sojin fosfatidilkolin
Inos	inducibilna sintaza dušikovog oksida
IL-6	interleukin
IL-1 $\beta$	interleukin 1 $\beta$
MBK	minimalna baktericidna koncentracija
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MS	mezigijalne stanice
NO	dušikov oksid
NF- $\kappa$ B	transkripcijski nuklearni faktor
NGR	asparagin-glicin-arginin
PC	fosfatidilkolin
PE	fosfatidiletanolamin
PEG	polietilenglikol

PEG-DSPE	PEG-ilirani distearoilfosfoetanolamin
PLGA	kopolimer mliječne i glikolne kiseline
PTX-LIPO	liposomi s paklitakselom
RA	ružmarinska kiselina
RES	resveratrol
RGD	arginin-glicin-aparaginska kiselina
SN-28	7-etil-10-hidroksikamptotecin
SPC	sojin fosfatidilkolin
TNF- $\alpha$	faktor nekroze tumora $\alpha$
TP	triptolid
TP-LHP	flaster s liposomskim hidrogelom triptolida
TRX-20	3,5-dipentadeciloksibenzamin hidroklorid
UA	usnična kiselina

## 7. LITERATURA

Apiratikul N, Penglong T, Suksen K, Svasti S, Chairoungdua A, Yingyongnarongkula B. In vitro delivery of curcumin with cholesterolbased cationic liposomes. *Russ J Bioorganic Chem* 2013; 39(4):444-450.

Assessment report No. EMEA/H/C/004125/0000;

[https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/onivyde-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/onivyde-epar-public-assessment-report_en.pdf), pristupljeno 20.05.2019.

Awasthi VD, Garcia D, Goins BA, Phillips WT. Circulation and biodistribution profiles of long-circulating PEG-liposomes of various sizes in rabbits. *Int J Pharm* 2003; 253(1-2):121-132.

Baghel SS, Shrivastava N, Baghel Rs, Agrawal P, Rajput S. A review of quercetin: antioxidant and anticancer properties. *WJPPS* 2012; 1(1):146-160.

Bangale GS, Rajesh KS, Shinde GV. Stealth liposomes: a novel approach of targeted drug delivery in cancer therapy. *IJSPR* 2014; 5(11):750-759.

BCIQ; [https://bciq.biocentury.com/products/brakiva\\_optisomal\\_topotecan\\_\(inx-0076\\_sphingosome-encapsulated\\_topotecan\)](https://bciq.biocentury.com/products/brakiva_optisomal_topotecan_(inx-0076_sphingosome-encapsulated_topotecan)), pristupljeno 19.05.2019.

Boman NL, Masin D, Mayer LD, Cullis PR, Bally MB. Liposomal vincristine which exhibits increased drug retention and increased circulation longevity cures mice bearing P388 tumors. *Cancer Res* 1994; 54(11):2830-2833.

Bonifácio BV, Silva PB, Ramos MA, Negri KM, Bauab TM, Chorilli M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. *Int J Nanomedicine* 2014; 9(1): 1-15.

Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal formulations in clinical use: An updated review. *Pharmaceutics* 2017; 9(2):12.

Chen G, Hao B, Ju D, Liu M, Zhao H, Du Z, Xiac J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of triptolide-loaded liposome hydrogel patch under microneedles on rats with collagen-induced arthritis. *Acta Pharm Sin B* 2015; 5(6):569-576.

Cirino LMD, Vergne DMC, Santana PF, de Almeida E, da Costa LP, de Albuquerque-Junior RLC, Lima-Verde I, Padilha F, Cardoso J. Decreased inflammatory response in rat bladder after

intravesical administration of capsaicin-loaded liposomes. *An Acad Bras Cienc* 2016; 88(3):1-9.

Dhule SS, Penfornis P, Frazier T, Walker R, Feldman J, Tan G, He J, Alb A, John V, Pochampally R. Curcumin-loaded  $\gamma$ -cyclodextrin liposomal nanoparticles as delivery vehicles for osteosarcoma. *Nanomedicine* 2012; 8(4):440-451.

Dhule SS, Penfornis P, He J, Harris MR, Terry T, John V, Pochampally R. The combined effect of encapsulating curcumin and C6 ceramide in liposomal nanoparticles against osteosarcoma. *Mol Pharm* 2014; 11(2):417-427.

Dias D, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drugdiscovery. *Metabolites* 2012; 2(2):303-336.

Elsayed MM, Abdallah OY, Naggar VF, Khalafallah NM. Deformable liposomes and ethosomes as carriers for skin delivery of ketotifen. *Pharmazie* 2007; 62(2):133-137.

Fan C, Li X, Zhou Y, Zhao Y, Ma S, Li W, Liu Y, Li G. Enhanced topical delivery of tetrandrine by ethosomes for treatment of arthritis. *BioMed Research International* 2013; 161943.

Fan PS, Gu ZL, Sheng R, Liang ZQ, Wang XX, Zhu Y. Inhibitory effect of quercetin on proliferation of human microvascular endothelial cells *in vitro*. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24(12):1231-1234.

Fang CL, Wang Y, Tsai KH, Chang HI. Liposome-encapsulated baicalein suppressed lipogenesis and extracellular matrix formation in Hs68 human dermal fibroblasts. *Front Pharmacol* 2018; 9:155.

FDA Onivyde Prescribing information;

[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2015/207793lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/207793lbl.pdf), pristupljeno 19.05.2019.

Feng T, Wei Y, Lee RJ, Zhao L. Liposomal curcumin and its application in cancer. *Int J Nanomedicine* 2017; 12:6027-6044.

Ferraz-Carvalho RS, Pereira MA, Linhares LA, Lira-Nogueira MC, Cavalcanti IM, Santos-Magalhães NS, Montenegro LM. Effects of the encapsulation of usnic acid into liposomes and interactions with antituberculous agents against multidrug-resistant tuberculosis clinical isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2016; 111(5):330-334.

Ferreira VF, Pinto AC. A fitoterapia no mundo atual (Phytotherapy in the world today). *Quim Nova* 2010; 33(9):1829.

Godin B, Touitou E. Ethosomes: new prospects in transdermal delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2003; 20(1):63-102.

Guo HY, Wang XY. Preparation and characterization of long-circulating PEGy-lated curcumin liposomes. *Guangzhou Chem Ind* 2013; 41(13):131-133.

Gupta A, Kaur CD, Saraf S, Saraf S. Targeting of herbal bioactives through folate receptors: a novel concept to enhance intracellular drug delivery in cancer therapy. *J Recept Signal Transduct Res* 2017; 37(3):314-323.

Han SR, Gong H, Wang YM, Lv XY, Zhang C, Tong AN, Yuan GH, Zhang BY. The preparation of matrine liposome and its antiglioma activity study. *J Chem* 2014; 317320.

Hasan M, Belhaj N, Benachour H, Barberi-Heyob M, Kahn CJ, Jabbari E, Linder M, Arab-Tehrany E. Liposome encapsulation of curcumin: physico-chemical characterizations and effects on MCF7 cancer cell proliferation. *Int J Pharm* 2014; 461(1-2):519-528.

Helwick C. Liposomal vincristine allows for greater dose density without increased neurotoxicity. *Hematologic Cancers* 2013; 6:1.

Hong W, Chen DW, Zhao XL, Qiao MX, Hu HY. Preparation and study in vitro of long-circulating nanoliposomes of curcumin. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2008; 33(8):889-892.

Hua S. Lipid-based nano-delivery systems for skin delivery of drugs and bioactives. *Front Pharmacol* 2015; 6219.

Huang M, Su E, Zheng F, Tan C. Encapsulation of flavonoids in liposomal delivery systems: the case of quercetin, kaempferol and luteolin. *Food Funct* 2017; 8(9):3198-3208.

Huang Q, Zhang L, Sun X, Zeng K, Li J, Liu YN. Coating of carboxymethyl dextran on liposomal curcumin to improve the anticancer activity. *RSC Adv* 2014; 4(103):59211-59217.

Jøraholmen MW, Basnet P, Tostrup MJ, Moueffaq S, Škalko-Basnet N. Localized therapy of vaginal infections and inflammation: liposomes-in-hydrogel delivery system for polyphenols. *Pharmaceutics* 2019; 11(2). pii: E53.

Jøraholmen MW, Škalko-Basnet N, Acharya G, Basnet P. Resveratrol-loaded liposomes for topical treatment of the vaginal inflammation and infections. *Eur J Pharm Sci* 2015; 79:112-121.

Khan A, Shukla Y, Kalra N, Alam M, Ahmad MG, Hakim SR, Owais M. Potential of diallyl sulfide bearing pH-sensitive liposomes in chemoprevention against DMBA-induced skin papilloma. *Mol Med* 2007; 13(7-8):443-451.

Kloesch B, Gober L, Loebisch S, Vcelar B, Helson L, Steiner G. *In vitro* study of a liposomal curcumin formulation (Lipocurc<sup>®</sup>): toxicity and biological activity in synovial fibroblasts and macrophages. *In Vivo* 2016; 30(4):413-419.

Kufrin V. Biljni sekundarni metaboliti kao model za razvoj lijekova [Završni rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2018 [pristupljeno 20.05.2019.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:782817>

Li HM, Yan XS, Ming AP, Peng YQ, Gui WJ. Stability of anti-liver cancer efficacy by liposomes-curcumin in water solution. *Chin Tradit Herb Drugs* 2006; 37(4):286-291.

Li J, Chen J, Cai BC, Yang T. Preparation, characterization and tissue distribution of brucine stealth liposomes with different lipid composition. *Pharm Dev Technol* 2013; 18(4):772-778.

Li K, Zhang H, Gao L, Zhai Y, Shi M, Li J, Xiu C, Cao J, Cheng S, Jiang L, Di H. Preparation and characterization of baicalein-loaded nanoliposomes for antitumor therapy. *J Nanom* 2016; 2016(12):1-9.

Li S, Wang XP. *In vitro* and *in vivo* evaluation of novel NGR-modified liposomes containing brucine. *Int J Nanomedicine* 2017; 12:5797-5804.

Lin C, Wong BCK, Chen H, Bian Z, Zhang G, Zhang X, Riaz MK, Tyagi D, Lin G, Zhang Y, Wang J, Lu A, Yang Z. Pulmonary delivery of triptolide loaded liposomes decorated with anti-carbonic anhydrase IX antibody for lung cancer therapy. *Scientific Reports* 2017; 7(1):1097.

Lin YL, Liu YK, Tsai NM, et al. A Lipo-PEG-PEI complex for encapsulating curcumin that enhances its antitumor effects on curcumin-sensitive and curcumin-resistance cells. *Nanomedicine* 2012; 8(3):318-327.

Lira MCB, Siqueira-Moura MP, Rolim-Santos HM, Galetti FC, Simioni AR, Santos NP, Tabosa Do Egito ES, Silva CL, Tedesco AC, Santos-Magalhães NS. *In vitro* uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. *J Liposome Res* 2009; 19(1):49-58.

Liu XY, Ruan LM, Mao WW, Wang JQ, Shen YQ, Sui MH. Preparation of RGD-modified long circulating liposome loading matrine, and its *in vitro* anti-cancer effects. *Int J Med Sci* 2010; 7(4):197-208.

Lu Y, Ding N, Yang C, Huang L, Liu J, Xiang G. Preparation and in vitro evaluation of a folate-linked liposomal curcumin formulation. *J Liposomes Res* 2012; 22(2):110-119.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79(5):727-747.

Manca ML, Castangia I, Zaru M, Nácher A, Valenti D, Fernández-Busquets X, Fadda AM, Manconi M. Development of curcumin loaded sodium hyaluronate immobilized vesicles (hyalurosomes) and their potential on skin inflammation and wound restoring. *Biomaterials* 2015; 71:100-109.

Manconi M, Mura S, Sinico C, Fadda AM, Vila AO, Molina F. Development and characterization of liposomes containing glycols as carriers for diclofenac. *Colloid Surface A* 2009; 342(1-2):53-58.

Mayer LD, Bally MB, Loughrey H, Masin D, Cullis PR. Liposomal vincristine preparations which exhibit decreased drug toxicity and increased activity against murine L1210 and P388 tumors. *Cancer Res* 1990; 50(3):575-579.

Mayer LD, Masin D, Nayar R, Boman NL, Bally MB. Pharmacology of liposomal vincristine in mice bearing L1210 ascitic and B16/BL6 solid tumors. *Brit J Cancer* 1995; 71(3):482-488.

Mayer LD, Nayar R, Thies RL, Boman NL, Cullis PR, Bally MB. Identification of vesicle properties that enhance the anti-tumor activity of liposomal vincristine against murine L1210 leukemia. *Cancer Chemother. Pharmacol* 1993; 33(1):17-24.

Morimoto K, Kondo M, Kawahara K, Ushijima H, Tomino Y, Miyajima M, Kimura J. Advances in targeting drug delivery to glomerular mesangial cells by long circulating cationic liposomes for the treatment of glomerulonephritis. *Pharm Res* 2007; 24(5):946-954.

Moudi M, Go R, Yien CY, Nazre M. Vinca alkaloids. *Int J Prev Med*. 2013; 4(11):1231-1235.

Narayanan NK, Nargi D, Randolph C, Narayanan BA. Liposome encapsulation of curcumin and resveratrol in combination reduces prostate cancer incidence in PTEN knockout mice. *Int J Cancer* 2009; 125(1):1-8.

Ng ZY, Wong JY, Panneerselvam J, Madheswaran T, Kumar P, Pillay V, Hsu A, Hansbro N, Bebawy M, Wark P, Hansbro P, Dua K, Chellappan DK. Assessing the potential of liposomes loaded with curcumin as a therapeutic intervention in asthma. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2018; 172:51-59.



NIH - National Institutes of Health, <https://livertox.nih.gov/UsnicAcid.htm>, pristupljeno 15.05.2019.

Noble CO, Guo Z, Hayes ME, Marks JD, Park JW, Benz CC, Kirpotin DB, Drummond DC. Characterization of highly stable liposomal and immunoliposomal formulations of vincristine and vinblastine. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; 64(4):741-751.

Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2009; 2(5):270-278.

Pathak P, Hess R, Weiss MA. Liposomal vincristine for relapsed or refractory pH-negative acute lymphoblastic leukemia: a review of literature. *Ther Adv Hematol* 2014; 5(1):18-24.

Priprem A, Sutthiparinyanont S, Na H.-K, Surh YJ, Chulasiri M. Effect of formulations of nanosized quercetin liposomes on COX-2 and NF-Kb in MCF-10A cells. *Pharm Nanotech* 2013; 1(1):26-34.

Priprem A, Watanatorn J, Sutthiparinyanont S, Phachonpai W, Muchimapura S. Anxiety and cognitive effects of quercetin liposomes in rats. *Nanomedicine* 2008; 4(1):70-78.

Qin XQ, Yuan Y, Liu CS, Wang QY, Shen X, Yang BC. Preparation of liposomal brucine and its pharmaceutical/pharmacodynamic characterization. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28(11):1851-1858.

Rahman S, Cao S, Steadman KJ, Wei M, Parekh HS. Native and  $\beta$ -cyclodextrin-enclosed curcumin: entrapment within liposomes and their cytotoxicity in lung and colon cancer. *Drug Deliv* 2012; 19(7):346-353.

Rane S, Prabhakar B. Influence entrapment and pH sensitivity of liposomes. *Int J PharmTech Res* 2009; 1(3):914-917.

Riaz MK, Riaz MA, Zhang X, Lin C, Wong KH, Chen X, Zhang G, Lu A, Yang Z. Surface functionalization and targeting strategies of liposomes in solid tumor therapy: a review. *Int J Mol Sci* 2018; 19(1):195.

Roy A. A Review on the alkaloids an important therapeutic compound from plants. *IJPB* 2017; 3(2):1-9.

Sachan AK, Gupta A. A review on nanotized herbal drugs. *Int J PharmTech Res* 2015; 6(3):961-970.

Saengkrit N, Saesoo S, Srinuanchai W, Phunpee, S, Ruktanonchai UR. Influence of curcuminloaded cationic liposomes on anticancer activity for cervical cancer therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014; 114(10):349-356.

Sarwa KK, Mazumder B, Rudrapal M, Verma VK. Potential of capsaicin-loaded transfersomes in arthritic rats. *Drug Deliv* 2015; 22(5):638-646.

Setyawati DR, Surini S, Mardiyati E. Optimization of luteolin-loaded transfersome using response surface methodology. *Int Journal App Pharm* 2017; 9:107-111.

Shaji J, Iyer S. Preparation, optimization and in vivo hepatoprotective evaluation of quercetin liposomes. *Int J Curr Pharm Res* 2012; 4(2):24-32.

Shen Y, Pi Z1, Yan F, Yeh CK, Zeng X, Diao X, Hu Y, Chen S, Chen X, Zheng H. Enhanced delivery of paclitaxel liposomes using focused ultrasound with microbubbles for treating nude mice bearing intracranial glioblastoma xenografts. *Int J Nanomedicine* 2017; 12:5613-5629.

Silverman JA, Deitcher SR. Marqibo<sup>®</sup> (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 71(3):555-564.

Straubinger RM, Balasubramanian SV. Preparation and characterization of taxane-containing liposomes. *Methods Enzymol* 2005; 391:97-117.

Teixeira MJ, Menezes LM, Silva V, Galhardoni R, Sasson J, Okada M, Duarte KP, Yeng LT, Andrade DC. Liposomal topical capsaicin in post-herpetic neuralgia: a safety pilot study. *Arq Neuropsiquiatr* 2015; 73(3):237-240.

Thangapazham RL, Puri A, Tele S, Blumenthal R, Maheshwari RK. Evaluation of a nanotechnology-based carrier for delivery of curcumin in prostate cancer cells. *Int J Oncol* 2008; 32(5):1119-1123.

Tian J, Wang L, Wang L, Ke X. A wogonin-loaded glycyrrhetic acid-modified liposome for hepatic targeting with anti-tumor effects. *Drug Deliv* 2014; 21(7):553-559.

Tian YD, Guan YB, Zhang YQ, Wei XC, Du ZY, Conney AH, Zhang K, Zheng X. Inhibitory effect of curcumin liposomes on PC-3 human prostate cancer cells. *Chin J Exp Surg* 2014; 31(5):1075-1078.

Tong-Un T, Phachonpai W, Muchimapura S, Warranathom J. Effects of quercetin encapsulated liposomes via nasal administration: a novel cognitive enhancer. *Am J App Sci* 2010; 7(7):906-913.

Touitou E, Godin B. Ethosome novel vesicular carrier for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *J Cont Rel.* 2000; 65(3):403-418.

Trotta M, Peira E, Debernardi F, Gallarate M. *Int J Pharm* 2002; 241(2):319-327.

Vanić Ž, Hurler J, Ferderber K, Golja Gašparović P, Škalko-Basnet N, Filipović-Grčić J. Novel vaginal drug delivery system: deformable propylene glycol liposomes-in-hydrogel. *J Liposome Res* 2014; 24(1):27-36.

Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: metode priprave. *Farm Glas* 2012b; 68:7-8.

Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: strukturalna svojstva i klasifikacija. *Farm Glas* 2012a; 68:6.

Vanić Ž. Phospholipid vesicles for enhanced drug delivery in dermatology. *J Drug Discov Develop and Deliv* 2015; 2:1-9.

Verma H, Prasad SB, Yashwant, Harmanpreet S. Herbal Drug Delivery System: A Modern Era Prospective. *Int J Curr Pharm Res* 2013; 4(3):88-101.

Verma S, Singh SP. Current and future status of herbal medicines. *Vet World* 2008; 1(11): 347-350.

Vladimir-Knežević S, Blažeković B. *Praktikum iz farmakognozije, interna skripta* 2015; Zagreb

Wang J, Yuan Y, Liu C, Zhu D, Shen X, Yang B. Preparation and pharmaceutical/pharmacodynamic evaluation of topical brucine-loaded liposomal hydrogel. *J Mater Sci Mater Med* 2009; 20(10):2075-2084.

Wang LQ, Shi HS, Wang YS. Liposomal curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in lewis lung cancer. *J Sichuan Univ Med Sci Edn* 2013; 44(1):46-48.

Watanabe M, Kawano K, Toma K, Hattori Y, Maitani Y. In vivo antitumor activity of camptothecin incorporated in liposomes formulated with an artificial lipid and human serum albumin. *J Control Release* 2008; 127(3):231-238.

Webb MS, Harasym TO, Masin D, Bally MB, Mayer LD.. Sphingomyelin-cholesterol liposomes significantly enhance the pharmacokinetic and therapeutic properties of vincristine in murine and human tumor models. *Br J Cancer* 1995; 72(4):896-904.

Wei Y, Guo J, Zheng X, Wu J, Zhou Y, Yu Y, Ye Y, Zhang L, Zhao L. Preparation, pharmacokinetics and biodistribution of baicalin-loaded liposomes. *Int J Nanomedicine* 2014; 9(1):3623-3630.

Wen Y, Wang Y, Liu X, Zhang W, Xiong X, Han Z, Liang X. Camptothecin-based nanodrug delivery systems. *Cancer Biol Med* 2017; 14(4):363-370.

Wu G, Li J, Yue J, Zhang S, Yunusi K. Liposome encapsulated luteolin showed enhanced antitumor efficacy to colorectal carcinoma. *Mol Med Rep* 2018; 17(2):2456-2464.

You J, Dai DB, He WJ, Li G, Song SC, Wei YH, Li FZ, Xu XL. Preparation of curcumin-loaded long-circulating liposomes and its pharmacokinetics in rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2014; 39(7):1238-1242.

Yuan ZX, Jia L, Lim LY, Lin JC, Shu G, Zhao L, Ye G, Liang XX, Ji H, Fu HL. Renal-targeted delivery of triptolide by entrapment in pegylated TRX-20-modified liposomes. *Int J Nanomedicine* 2017; 12:5673-5686.

Yücel Ç, Şeker Karatoprak G, Değim İT. Anti-aging formulation of rosmarinic acid-loaded ethosomes and liposomes. *J Microencapsul* 2019; 36(2):180-191.

Yücel Ç, Şeker Karatoprak G. Development and evaluation of the antioxidant activity of liposomes and nanospheres containing rosmarinic acid. *Farmacia* 2017; 65(1):40-45.

Zakon o lijekovima; <https://www.zakon.hr/z/399/Zakon-o-lijekovima>, pristupljeno 05.05.2019.

Zhang H, Li RY, Lu X, Mou ZZ, Lin GM. Docetaxel-loaded liposomes: preparation, pH sensitivity, pharmacokinetics, and tissue distribution. *J Zhejiang Univ Sci B* 2012; 13(12):981-989.

Zhao Y, Meng LH, Wang C. Study on preparation of hyaluronic acid-targeted curcumin liposome and its quality evaluation. *J Mod Med Health* 2013; 29(2):169-174.

Zhaowu Z, Xiaoli W, Yangde Z, Nianfeng L. Preparation of matrine ethosome, its percutaneous permeation in vitro and anti-inflammatory activity in vivo in rats. *J Liposome Res* 2009; 19(2):155-162.

Zhu Y, Wang M, Zhang J, Peng W, Firempong CK, Deng W, Wang Q, Wang S, Shi F, Yu J, Xu X, Zhang W. Improved oral bioavailability of capsaicin via liposomal nanoformulation: preparation, in vitro drug release and pharmacokinetics in rats. *Arch Pharm Res* 2015; 38(4):512-521.

## 8. SAŽETAK

Biološki aktivni spojevi poput alkaloida, terpena, polifenola i saponina mogu biti izolirani iz biljaka te se potom koristiti kao lijekovi ili kao ishodišne sirovine za razvoj novih (polu)sintetskih lijekova. Međutim, djelatne tvari biljnog porijekla uglavnom su kompleksne organske molekule, velike molekulske mase, kemijski nestabilne i slabe topljivosti što ograničava njihovu kliničku primjenu zbog loše apsorpcije te posljedično niske bioraspoloživosti. Uklapanjem u biorazgradive i biokompatibilne nanosustave moguće je poboljšati farmakokinetička i farmakodinamska svojstva biljnih lijekova i time značajno unaprijediti terapiju. Među brojnim istraživanim nanosustavima primjena liposoma je od iznimnog značaja zbog mogućnosti postizanja ciljane terapije na nivou oboljelih organa, tkiva ili unutarstaničnom nivou, potenciranja biološkog učinka, povećanju stabilnosti uklopljenog biljnog materijala, povećanja bioraspoloživosti, poboljšanog sigurnosnog profila formulacije, smanjenja neželjenih nuspojava i toksičnosti na zdrave stanice. Provedena najznačajnija *ex vivo*, *in vivo* i klinička istraživanja obuhvaćena ovim radom sistematizirano su prikazana prema kemizmu uklopljene djelatne tvari.

## 9. SUMMARY

Biologically active phytochemicals such as alkaloids, terpenes, polyphenols and saponins can be isolated from plants and formulated as drugs or used as crude materials for development of (semi)synthetic drugs. Generally, phytochemicals are complex organic molecules, characterized by a large molecular weight, chemical instability and low water solubility, causing poor absorption, low bioavailability and therefore limited clinical use. Incorporation of phytochemicals into biodegradable and biocompatible nanosystems can improve their pharmacokinetic and pharmacodynamic properties and thus significantly enhance the therapeutic outcome. Among the numerous investigated nanocarriers, liposomes have been demonstrated to be particularly suitable due to the proven ability to: achieve accumulation of the phytochemicals in the diseased tissues or intracellularly, potentiate biological effects and bioavailability, enhance stability of the incorporated plant material, promote safety profile of the formulation and decrease undesirable side effects or potential cytotoxicity. This work presents an overview of the selected *ex vivo*, *in vivo* and clinical investigations, systematized according to the chemical features of the incorporated phytoconstituent.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### LIPOSOMI KAO NOSAČI DJELATNIH TVARI BILJNOG PORIJEKLA

Mirna Palac

#### SAŽETAK

Biološki aktivni spojevi poput alkaloida, terpena, polifenola i saponina mogu biti izolirani iz biljaka te se potom koristiti kao lijekovi ili kao ishodišne sirovine za razvoj novih (polu)sintetskih lijekova. Međutim, djelatne tvari biljnog porijekla uglavnom su kompleksne organske molekule, velike molekulske mase, kemijski nestabilne i slabe topljivosti što ograničava njihovu kliničku primjenu zbog loše apsorpcije te posljedično niske biorasploživosti. Uklapanjem u biorazgradive i biokompatibilne nanosustave moguće je poboljšati farmakokinetička i farmakodinamska svojstva biljnih lijekova i time značajno unaprijediti terapiju. Među brojnim istraživanim nanosustavima primjena liposoma je od iznimnog značaja zbog mogućnosti postizanja ciljane terapije na nivou oboljelih organa, tkiva ili unutarstaničnom nivou, potenciranja biološkog učinka, povećanju stabilnosti uklopljenog biljnog materijala, povećanja biorasploživosti, poboljšanog sigurnosnog profila formulacije, smanjenja neželjenih nuspojava i toksičnosti na zdrave stanice. Provedena najznačajnija *ex vivo*, *in vivo* i klinička istraživanja obuhvaćena ovim radom sistematizirano su prikazana prema kemizmu uklopljene djelatne tvari.

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

Rad sadrži: 51 stranicu, 3 grafička prikaza, 1 tablicu i 105 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: liposomi, biljne djelatne tvari, topljivost, biorasploživost, biološki učinci

Mentor: **Dr. sc. Željka Vanić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Željka Vanić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2019.



## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### LIPOSOMES AS CARRIERS FOR BIOACTIVE COMPOUNDS OF HERBAL ORIGIN

**Mirna Palac**

#### SUMMARY

Biologically active phytochemicals such as alkaloids, terpenes, polyphenols and saponins can be isolated from plants and formulated as drugs or used as crude materials for development of (semi)synthetic drugs. Generally, phytochemicals are complex organic molecules, characterized by a large molecular weight, chemical instability and low water solubility, causing poor absorption, low bioavailability and therefore limited clinical use. Incorporation of phytochemicals into biodegradable and biocompatible nanosystems can improve their pharmacokinetic and pharmacodynamic properties and thus significantly enhance the therapeutic outcome. Among the numerous investigated nanocarriers, liposomes have been demonstrated to be particularly suitable due to the proven ability to: achieve accumulation of the phytochemicals in the diseased tissues or intracellularly, potentiate biological effects and bioavailability, enhance stability of the incorporated plant material, promote safety profile of the formulation and decrease undesirable side effects or potential cytotoxicity. This work presents an overview of the selected *ex vivo*, *in vivo* and clinical investigations, systematized according to the chemical features of the incorporated phytoconstituent.

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

Thesis includes: 51 pages, 3 figures, 1 table and 105 references. Original is in Croatian language.

Keywords: liposomes, phytochemicals, solubility, bioavailability, biological activity

Mentor: **Željka Vanić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Željka Vanić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Sanda Vladimir-Knežević, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Renata Jurišić Grubešić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2019.