



UNIVERZITET U NIŠU
TEHNOLOŠKI FAKULTET U LESKOVCU



Ivana Lj. Gajić

**RAZVOJ I KARAKTERIZACIJA
SAVREMENIH FARMACEUTSKIH OBLIKA
SA BIOHANINOM A I BIOLOŠKE
AKTIVNOSTI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Leskovac, 2024.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF TECHNOLOGY IN LESKOVAC



Ivana Lj. Gajić

**DEVELOPMENT AND
CHARACTERIZATION OF MODERN
PHARMACEUTICAL FORMS WITH
BIOCHANIN A AND BIOLOGICAL
ACTIVITIES**

DOCTORAL DISSERTATION

Leskovac, 2024.

MENTOR:

Prof. dr Ljiljana Stanojević, redovni profesor
Univerzitet u Nišu
Tehnološki fakultet u Leskovcu

ČLANOVI KOMISIJE:

Prof. dr Goran Nikolić, redovni profesor
Univerzitet u Nišu
Tehnološki fakultet u Leskovcu

Prof. dr Stevo Najman, redovni profesor
Univerzitet u Nišu
Medicinski fakultet u Nišu

Prof. dr Tatjana Mihajilov Krstev, redovni profesor
Univerzitet u Nišu
Prirodno-matematički fakultet u Nišu

Dr Ana Dinić, naučni saradnik
Univerzitet u Nišu
Tehnološki fakultet u Leskovcu

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:

prof. dr Ljiljana Stanojević, redovni profesor
Tehnološki fakultet u Leskovcu, Univerzitet u Nišu

Naslov:

Razvoj i karakterizacija savremenih farmaceutskih oblika sa biohaninom A i biološke aktivnosti

Rezime:

Biohanin A (BHA) je O-metilovani izoflavon koji po hemijskoj strukturi predstavlja 5,7-dihidroksi-3-(4-metoksifenil)-hromen-4-on. Sličan je estrogenu tako da ispoljava agonističku i antagonističku interakciju sa estrogenim receptorima. BHA ispoljava antioksidativnu, antiinflamatornu, antidijabetsku, antialergijsku, antihiperlglikemijsku, antihiperlipidemijsku i antikancersku aktivnost. Uprkos velikom broju korisnih efekata njegova klinička upotreba je ograničena zbog niske rastvorljivosti u vodi i slabe bioraspodivnosti.

Inkluzioni kompleks BHA sa 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom pripremljen je koprecipitacionom metodom i okarakterisan različitim instrumentalnim metodama koje ukazuju na postignutu inkluziju BHA u šupljine ciklodekstrina. Zbog povećane rastvorljivosti u vodi inkluzioni kompleks BHA:HP- β -CD ispoljio je bolju inhibitornu aktivnost na holinesteraze i povećanu antimikrobnu i antioksidativnu aktivnost. Isti ili bolji inhibitorni efekat BHA zapažen je na tirozinazu, α -amilazu i α -glukozidazu.

Kopolimer p(NiPAm-ko-AA) je sintetisan radikalskom polimerizacijom monomera NiPAm sa 5 mol% AA korišćenjem 1,5 mol% EGDM-a kao umreživača. U liofilizirani i neliofilizirani kopolimer inkorporiran je BHA. Ispitan je uticaj pH i temperature na brzinu oslobađanja BHA iz kopolimera. Pokazano je da pH- i termo-osetljiv kopolimer p(NiPAm-ko-AA) može biti pogodan kao nosač za modifikovano oslobađanje BHA u kiseloj i slabo alkalnoj sredini.

Tehnikom elektrospininga izrađena su polimerna vlakna od PLA i PVP sa 2% i 5% BHA na sobnoj temperaturi. Pokazano je da morfologija vlakana nije promenjena sa dodatkom BHA, da je potpuno ugrađen i da nema interakcije BHA sa polimernim matricama. Oslobađanje BHA iz

PLA elektrospinovanih vlakana je produženo, dok je iz PVP vlakana brzo i kompletno. Ispitan je uticaj elektrospinovanih PLA i PVP vlakna sa i bez BHA na proliferaciju ćelija L929 fibroblasta i *in vitro* zarastanje rana.

Metodom tankog filma izrađeni su MLV liposomi sa BHA, dok su ekstrudiranjem dobijeni SUV liposomi odgovarajuće veličine, sa uskom raspodelom veličina i zadovoljavajuće stabilnosti. Otpuštanje BHA iz liposoma praćeno je tehnikom dijaliznih vrećica u odnosu na puferski rastvor.

Naućna oblast:

Tehnološko inženjerstvo

Uža naućna
oblast:

Hemija i hemijske tehnologije

Ključne reći:

Biohanin A, inkluzioni kompleks, 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin, hidrogel, elektrospinovana vlakna, liposomi.

UDK:

615.01 : 615.322 + 577.175.5 (043.3)

CERIF

klasifikacija:

T 410 Farmaceutska i srodne tehnologije

Tip licence

Kreativne
zajednice:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	prof. dr Ljiljana Stanojević, full professor Faculty of Technology in Leskovac, University of Niš
Title:	Development and characterization of modern pharmaceutical forms with biochanin A and biological activities
Abstract:	<p>Biochanin A (BHA) is an O-methylated isoflavone whose chemical structure is 5,7-dihydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-chromen-4-one. It is similar to estrogen, so it exhibits agonistic and antagonistic interaction with estrogen receptors. BHA exhibits antioxidant, anti-inflammatory, anti-diabetic, anti-allergic, anti-hyperglycemic, anti-hyperlipidemic and anti-cancer activity. Despite a large number of beneficial effects, its clinical use is limited due to its low solubility in water and poor bioavailability.</p> <p>The inclusion complex of BHA with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin was prepared by the coprecipitation method and characterized by various instrumental methods which indicate the achieved inclusion of BHA in the cavities of cyclodextrin. Due to the increased solubility in water, the BHA:HP-β-CD inclusion complex exhibited better cholinesterase inhibitory activity and increased antimicrobial and antioxidant activity. The same or better inhibitory effect of BHA was observed on tyrosinase, α-amylase and α-glucosidase.</p> <p>Copolymer p(NiPAm-co-AA) was synthesized by radical polymerization of NiPAm monomer with 5 mol% AA using 1.5 mol% EGDM as crosslinker. BHA was incorporated into the lyophilized and non-lyophilized copolymer. The effect of pH and temperature on the release rate of BHA from the copolymer was investigated. It was shown that the pH- and thermosensitive copolymer p(NiPAm-co-AA) can be suitable as a carrier for the modified release of BHA in acidic and slightly alkaline environments.</p> <p>Using the electrospinning technique, polymer fibers from PLA and PVP with 2% and 5% BHA were made at room temperature. It was shown that the morphology of the fibers was not changed with the addition of BHA, that it was fully incorporated and that there was no interaction of BHA with the polymer matrices. The release of BHA from PLA electrospun fibers was prolonged, whereas it was rapid and complete from PVP fibers. The influence of electrospun PLA and PVP fibers with and without BHA on L929 fibroblast cell proliferation and wound healing was investigated.</p> <p>MLV liposomes with BHA were obtained using the thin film method, while SUV liposomes of appropriate size and with a narrow size distribution and satisfactory stability were obtained by extrusion. The</p>

release of BHA from liposomes was monitored using the dialysis bag technique against a buffer solution.

Scientific Field: Technological engineering

Scientific Discipline: Chemistry and chemical technology

Key Words: Biochanin A, inclusion complex, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, hydrogel, electrospun fibers, liposomes.

UDC: 615.01 : 615.322 + 577.175.5 (043.3)

CERIF Classification: T 410 Pharmaceuticals and related technologies

Creative Commons License Type: **CC BY-NC-ND**

Izrazi zahvalnosti

Ekperimentalni deo doktorske disertacije je urađen u laboratorijama Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, Departmana za hemiju, bihemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, Departmana za fiziku Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, Tehnološkog fakulteta u Novom sadu, Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu, Medicinskog fakulteta u Nišu, Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, Departmana za biologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Sındzuku u Turskoj i Departmana za molekularnu biologiju i genetiku Univerziteta u Istanbulu. Rezultati ove doktorske disertacije su postignuti u okviru rada na projektu TR-34012 (ev. br. 451-03-1283/2018-14/34012 i 451-03-1302/2019-14/34012), naučnoistraživačkog rada u NVO (ev. br. 451-03-68/2020-14/200133, 451-03-9/2021-14/200133 i 451-03-68/2022-14/200133) koga je finansiralo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i naučnoistraživačkog rada u NVO (ev. br. 451-03-47/2023-01/200133 i 451-03-66/2024-03/200133) koga je finansiralo Ministarstvo nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije. Koristim priliku da izrazim veliku i iskrenu zahvalnost svima koji su mi nesebično pružili dragocenu pomoć u izradi ove doktorske disertacije.

Iskrenu i posebnu zahvalnost dugujem svojoj mentorici prof. dr Ljiljani Stanojević koja me je prihvatila kao doktoranda i pružala nesebičnu pomoć i razumevanje tokom svih godina zajedničkog rada na ovoj doktorskoj disertaciji.

Izuzetno mi je bila draga i korisna pomoć prof. dr Steve Najmana i dr Sanje Stojanović, docenta (Medicinski fakultet, Niš) u izradi eksperimentalnog dela i diskusiji rezultata koji se odnose na SEM analizu, zarastanje rana i proliferaciju ćelija fibroblasta i koristim priliku da im se od srca zahvalim za utrošeno vreme i uloženi trud.

Dugujem posebnu zahvalnost prof. dr Tatjani Mihajilov-Krstev (Prirodno-matematički fakultet, Niš) koja mi je pružila nesebičnu i dragocenu pomoć u ispitivanju mikrobiološke aktivnosti. Hvala na svim korisnim diskusijama i sugestijama.

Prof. dr Goranu Nikoliću (Tehnološki fakultet u Leskovcu) veliko hvala na svim dobronamernim savetima, sugestijama i na ukazanoj časti prihvatanjem članstva u Komisiji.

Veliku zahvalnost dugujem dr Ani Dinić, naučnom saradniku, (Tehnološki fakultet u Leskovcu) za spremnost da mi izade u susret uvek kada mi je bilo potrebno, na svim dobronamernim savetima i sugestijama i iskrenom prijateljstvu.

Prof. dr Ivanu Ristiću i njegovim saradnicima (Tehnološki fakultet Novi Sad) posebnu zahvalnost dugujem za dragocenu pomoć koju su mi pružili u izradi elektrospinovanih polimernih vlakana i njihovoj karakterizaciji. Hvala na izdvojenom vremenu, podršci i svemu što sam naučila u ovoj oblasti.

Posebnu i neizmernu zahvalnost upućujem dr Aleksandri Cvetanović Kljakić (Tehnološki fakultet Novi Sad), koja mi je pružila izuzetnu pomoć u ispitivanju enzimске aktivnosti i molekularskom modelovanju u saradnji sa kolegama na Prirodno-matematičkom fakultetu u Seldžuku u Turskoj i Univerzitetu u Istanbulu.

Prof. dr Mirjani Popsavin (Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine) sam zahvalna za pomoć prilikom snimanja NMR spektara a Prof. Dr Srdanu Rakiću (Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, departman za fiziku) za pomoć pri snimanju XRD spektara.

Veliko hvala prof. dr Aleksandru Marinkoviću (Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd) koji mi je omogućio pristup u njihovim laboratorijama gde je urađena karakterizacija liposoma.

Takođe, koristim priliku da zahvalim svim kolegama i profesorima posebno dr Ivanu Saviću, vanrednom profesoru, prof. dr Ivani Savić-Gajić i dr Aleksandru Zdravkoviću koji su mi pomogli na bilo koji način u izradi ove doktorske disertacije.

I na kraju hvala mojim roditeljima, sestri i suprugu koji su uvek bili tu za mene. Hvala i mom Ognjenu koji je svemu ovome dao smisao. Hvala na ljubavi, strpljenju i podršci koje su mi podarili.

LISTA VAŽNIJIH SKRAĆENICA I SIMBOLA

¹ H-NMR	protonska nuklearna magnetna rezonanca (eng. <i>Proton nuclear magnetic resonance</i>)
AA	akrilna kiselina (eng. <i>acrylic acid</i>)
AAm	akrilamid (eng. <i>acrylamide</i>)
ABTS	(2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonska kiselina) (eng. <i>2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)</i>)
ACE	ekvivalent akarboze (eng. <i>acarbose equivalent</i>)
AChE	acetilholinesteraza (eng. <i>acetylcholinesterase</i>)
ATCI	acetiltioholin jodid (eng. <i>acetylthiocholine iodide</i>)
AZDN	2,2'-azobis(2-metilpropionitril) (eng. <i>2,2'-azobis(2-methylpropionitrile)</i>)
BACE1	beta-sekretaze 1 (eng. <i>beta-secretase 1</i>)
BHA	biohanin A (eng. <i>biochanin A</i>)
BTCI	butiriltioholin hlorid (eng. <i>butyrylthiocholine chloride</i>)
BuChE	butirilholinesteraza (eng. <i>butyrylcholinesterase</i>)
CD	ciklodekstrini (eng. <i>cyclodextrins</i>)
CE	efikasnost kompleksacije (eng. <i>complexation efficiency</i>)
ChE	holinesteraze (eng. <i>cholinesterase</i>)
CUPRAC	bis(neokuproin) bakar(II) katjon (eng. <i>bis(neocuproine) copper(II) cation</i>)
DEAM	N,N-dietilakrilamid (eng. <i>N,N-diethyl acrylamide</i>)
DHT	dihidrotestosteron (eng. <i>dihydrotestosterone</i>)
DMEM	Dulbeko modifikovani Iglov medijum (eng. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMSO	dimetilsulfoksid (eng. <i>dimethylsulfoxide</i>)
DPP-4	dipeptidilpeptidaza-4 (eng. <i>dipeptidyl peptidase-4</i>)
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (eng. <i>1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical</i>)
DPPH-H	1,1-difenil-2-(2,4,6-trinitrofenil) hidrazin (eng. <i>1,1-diphenyl-2-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazine</i>)

DSC	diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (eng. <i>differential scanning calorimetry</i>)
DTNB	5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoeva kiselina) (eng. <i>5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)</i>)
EDTA	dinatrijum etilendiamin tetraacetat (eng. <i>ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt</i>)
EDTAE	ekvivalent dinatrijum etilendiamin tetraacetata (eng. <i>ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt equivalent</i>)
EGCG	epigalokatehin-3-galat (eng. <i>epigallocatechin-3-gallate</i>)
EGDM	etilenglikoldimetakrilat (eng. <i>ethylene glycol dimethacrylate</i>)
ER	estrogeni receptori (eng. <i>estrogen receptors</i>)
FAD	flavin adenin dinukleotid fosfat (eng. <i>flavin adenine dinucleotide phosphate</i>)
FBS	goveđi serum (eng. <i>fetal bovine serum</i>)
FDA	Agencija za hranu i lekove (eng. <i>Food and Drug Administration</i>)
TPTZ	2,4,6-tripiridil-S-triazin (eng. <i>2,4,6-tripyridyl-S-triazine</i>)
FGF	faktor rasta fibroblasta (eng. <i>fibroblast growth factor</i>)
FTIR	infracrvena spektroskopija sa Fourier-ovom transformacijom (eng. <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>)
GALAE	ekvivalent galantamina (eng. <i>galantamine equivalent</i>)
GalN	D-galaktozamin (eng. <i>D-galactosamine</i>)
GEN	genistein (eng. <i>genistein</i>)
GUV	gigantske unilamelarne vezikule (eng. <i>giant unilamellar vesicles</i>)
HAT	transfer atoma vodonika (eng. <i>hydrogen atom transfer</i>)
HDL	lipoproteini velike gustine (eng. <i>high density lipoproteins</i>)
HERP	vodeno-etanolni ekstrakti crvenog propolisa (eng. <i>hydroalcoholic extracts of red propolis</i>)
HPLC	tečna hromatografija visokih performansi (eng. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
HP-β-CD	2-hidroksipropil-β-ciklodekstrin (eng. <i>2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin</i>)
IL-1β	interleukin 1β (eng. <i>interleukin 1 beta</i>)
IL-6	interleukin 6 (eng. <i>interleukin 6</i>)
iNOSs	inducibilna sintaza azot-oksida (eng. <i>inducible nitric oxide synthase</i>)

IPN	interpenetrirajuće mreže (eng. <i>interpenetrating networks</i>)
KAE	ekvivalent kojične kiseline (eng. <i>kojic acid equivalent</i>)
LCST	donja kritična temperatura rastvora (eng. <i>lower critical temperature of the solution</i>)
LDL	lipoproteini male gustine (eng. <i>low density lipoproteins</i>)
L-DOPA	L-3,4-dihidroksifenilalanin (eng. <i>L-3,4-dihydroxyphenylalanine</i>)
LPS	lipopolisaharid (eng. <i>lipopolysaccharide</i>)
LUV	velike unilamelarne vezikule (eng. <i>large unilamellar vesicles</i>)
MAO	monoamin oksidaza (eng. <i>monoamine oxidase</i>)
MBC	minimalna baktericidna koncentracija (eng. <i>minimum bactericidal concentration</i>)
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija (eng. <i>minimum inhibitory concentration</i>)
MLV	multilamelarne vezikule (eng. <i>multilamellar vesicles</i>)
MMPs	matriks metaloproteinaze (eng. <i>matrix metalloproteinases</i>)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolijum bromid (eng. <i>3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide</i>)
MVE	metilviniletar (eng. <i>methyl vinyl ether</i>)
MVL	multivezikularni liposomi (eng. <i>multivesicular liposomes</i>)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (eng. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NiPAm	N-izopropilakrilamid (eng. <i>N-isopropylacrylamide</i>)
NSAIL	nesteroidni antiinflamatorni lekovi (eng. <i>non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>)
NVCl	N-vinilkaprolaktam (eng. <i>N-vinylcaprolactam</i>)
OLV	oligolamelarne vezikule (eng. <i>oligolamellar vesicles</i>)
PAAm/PAAc	poli(akrilamid-ko-akrilna kiselina) (eng. <i>poly(acrylamide-co-acrylic acid)</i>)
PAR-2	proteaza aktivirani receptor (eng. <i>protease-activated receptor 2</i>)
PCL	poli(kaprolakton) (eng. <i>poly(caprolactone)</i>)
PDB	baza podataka o proteinima (eng. <i>protein database</i>)
PDEAM	poli(N,N-dietilakrilamid) (eng. <i>poly(N,N-diethylacrylamide)</i>)
PDI	indeks polidisperznosti (eng. <i>polydispersity index</i>)

PDT	fotodinamička terapija (eng. <i>photodynamic therapy</i>)
PEO-b-PPO	poli(etilenoksid)-blok-poli(propilenoksid) (eng. <i>poly(ethylene oxide)-block-poly(propylene oxide)</i>)
PLA	poli(laktid) (eng. <i>poly(lactide)</i>)
PMVE	poli(metilviniletar) (eng. <i>poly(methyl vinyl ether)</i>)
pNPG	<i>p</i> -nitrofenil- α -glukopiranozid (eng. <i>p-nitrophenyl-α-glucopyranoside</i>)
PNVCl	poli(N-vinilkaprolaktam) (eng. <i>poly(N-vinylcaprolactam)</i>)
poli(NiPAm)	poli(N-izopropilakrilamid) (eng. <i>poly(N-isopropylacrylamide)</i>)
poli(NiPAm-ko-AA)	poli(N-izopropilakrilamid-ko-akrilna kiselina) (eng. <i>poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid)</i>)
PVP	poli(vinilpirolidon) (eng. <i>poly(vinylpyrrolidone)</i>)
RP-HPLC	tečna hromatografija visokih performansi sa reversnim fazama (eng. <i>reversed-phase high-performance liquid chromatography</i>)
SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija (eng. <i>scanning electron microscopy</i>)
SET	transfer elektrona (eng. <i>single electron transfer</i>)
SUV	male unilamelarne vezikule (eng. <i>small unilamellar vesicles</i>)
TE	troloks ekvivalent (eng. <i>trolox equivalent</i>)
TNF- α	faktor-alfa nekroze tumora (eng. <i>tumor necrosis factor-alpha</i>)
TTC	2,3,5-trifeniltetrazolijum hlorid (eng. <i>2,3,5-triphenyltetrazolium chloride</i>)
UCST	gornja kritična temperatura rastvora (eng. <i>upper critical temperature of the solution</i>)
UV/Vis	ultraljubičasta/vidljiva spektroskopija (eng. <i>Ultra-violet visible/ spectroscopy</i>)
UV	ultraljubičasto zračenje (eng. <i>ultraviolet radiation</i>)
VEGF	faktor rasta vaskularnog endotela (eng. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
VLDL	lipoproteini veoma niske gustine (eng. <i>very low density lipoproteins</i>)
XRD	difrakcija X-zraka (eng. <i>X-Ray diffraction</i>)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO	4
2.1. SAVREMENI FARMACEUTSKI OBLICI	4
2.1.1. <i>Inkluzioni kompleksi sa ciklodekstrinima</i>	5
2.1.2. <i>Hidrogelovi kao nosači bioaktivnih supstanci</i>	11
2.1.2.1. Hidrogelovi koji reaguju na promenu temperature i/ili pH	13
2.1.3. <i>Elektrospinovana polimerna vlakna</i>	16
2.1.4. <i>Liposomi</i>	22
2.2. FITOESTROGENI	25
2.2.1. <i>Izoflavoni</i>	26
2.2.2. <i>Biohanin A</i>	30
2.2.2.1. Biološke aktivnosti biohanina A.....	33
2.2.2.2. Antioksidativna aktivnost biohanina A	34
2.2.2.3. Uticaj biohanina A na dijabetes melitus tip 2	35
2.2.2.4. Uticaj biohanina A na tumorske bolesti.....	36
2.2.2.5. Antiinflamatorni i antialergijski efekat biohanina A	38
2.2.2.6. Uticaj biohanina A na osteoartritis	39
2.2.2.7. Uticaj biohanina A na Parkinsonovu i Alchajmerovu bolest	40
2.2.2.8. Antihiperlipidni efekti biohanina A.....	42
2.2.2.9. Osteogeni efekat biohanina A	42
2.2.2.10. Biohanin A u tretmanu rasta i održavanja zdravlja kose	43
2.2.2.11. Uticaj biohanina A na depigmentaciju kože	45
2.2.2.12. Poboljšanje rastvorljivosti i bioraspoloživosti biohanina A.....	45
3. EKSPERIMENTALNI DEO	47
3.1. MATERIJALI I REAGENSI	47
3.2. FARMACEUTSKI OBLICI SA BIOHANINOM A	49
3.2.1. <i>Priprema inkluzionog kompleksa i fizičke smeše</i>	49
3.2.2. <i>Sinteza pH- i termoosetljivog kopolimera poli(N-izopropilakrilamid-ko-akrilna kiselina)</i>	49
3.2.2.1. Liofilizacija sintetisanog kopolimera p(NiPAm-ko-AA).....	50
3.2.2.2. Inkorporiranje biohanina A u kopolimer p(NiPAm-ko-AA)	50
3.2.2.3. Oslobađanje biohanina A iz kopolimera p(NiPAm-ko-AA).....	50
3.2.3. <i>Izrada polimernih vlakana elektrospining metodom</i>	51
3.2.3.1. Oslobađanje biohanina A iz elektrospinovanih polimernih vlakana	51
3.2.4. <i>Priprema liposoma sa biohaninom A</i>	52
3.2.4.1. Priprema multilamelarnih vezikula (MLV) sa biohaninom A	52
3.2.4.2. Priprema malih unilamelarnih vezikula (SUV) sa biohaninom A.....	52
3.2.4.3. Oslobađanje biohanina A iz liposoma	53
3.3. METODE KARAKTERIZACIJE	53
3.3.1. <i>Ultraljubičasta/vidljiva spektrofotometrija (UV/Vis)</i>	53
3.3.2. <i>Studija fazne rastvorljivosti</i>	54
3.3.3. <i>Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)</i>	55
3.3.4. <i>Protionska nuklearna magnetna rezonantna spektroskopija (¹H-NMR)</i>	55
3.3.5. <i>Difrakcija rendgenskih zraka (XRD)</i>	55
3.3.6. <i>Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)</i>	56

3.3.7. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)	56
3.3.8. Tečna hromatografija visokih perfomansi (HPLC)	56
3.3.9. Analiza bubrenja gelova	58
3.3.10. Modelovanje procesa bubrenja kopolimera p(NiPAm-ko-AA)	59
3.3.11. Istezanje materijala	60
3.3.12. Određivanje ugla kvašenja	61
3.3.13. Karakterizacija liposoma sa biohaninom A	61
3.4. ODREĐIVANJE BIOLOŠKIH AKTIVNOSTI	61
3.4.1. Antimikrobna aktivnost	61
3.4.1.1. Mikrobni sojevi	61
3.4.1.2. Antimikrobni esej	62
3.4.2. Antioksidativna aktivnost	64
3.4.2.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti primenom DPPH metode	64
3.4.2.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti primenom ABTS metode	65
3.4.2.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti primenom CUPRAC metode	66
3.4.2.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti primenom FRAP metode	67
3.4.2.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti primenom fosfomolibdenske metode	69
3.4.2.6. Određivanje antioksidativne aktivnosti heliranjem metala	69
3.4.3. Uticaj biohanina A i inkluzionog kompleksa na aktivnost enzima	70
3.4.3.1. Uticaj na aktivnost holinesteraza (ChE)	70
3.4.3.2. Uticaj na aktivnost tirozinaze	71
3.4.3.3. Uticaj na aktivnost α -amilaze	71
3.4.3.4. Uticaj na aktivnost α -glukozidaze	71
3.4.3.5. Inhibicija enzima određena molekulskim modelovanjem	72
3.4.4. Test proliferacije ćelija	72
3.4.5. In vitro test zarastanja rana	74
3.4.6. Statistička analiza	74
4. REZULTATI I DISKUSIJA	75
4.1. INKLUZIONI KOMPLEKS BIOHANINA A SA CIKLODEKSTRINOM	75
4.1.1. Studija fazne rastvorljivosti	75
4.1.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)	76
4.1.3. Spektroskopija protonske nuklearne magnetne rezonance ($^1\text{H-NMR}$)	78
4.1.4. Difrakcija rendgenskih zraka (XRD)	81
4.1.5. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)	82
4.1.6. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)	83
4.1.7. Antimikrobna aktivnost biohanina A i inkluzionog kompleksa	84
4.1.8. Antioksidativna aktivnost biohanina A i inkluzionog kompleksa	86
4.1.9. Inhibicija enzimske aktivnosti	90
4.1.10. Molekulsko modelovanje inhibicije enzima	92
4.2. HIDROGELOVI KAO NOSAČI BIOAKTIVNIH SUPSTANCI	98
4.2.1. Sinteza kopolimera p(NiPAm-ko-AA)	98
4.2.2. Strukturna karakterizacija kopolimera p(NiPAm-ko-AA)	100
4.2.2.1. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)	100
4.2.2.2. Analiza sadržaja rezidualnih monomera	103
4.2.2.3. Analiza bubrenja gelova	104
4.2.3. Ispitivanje kopolimera p(NiPAm-ko-AA) kao matrice za modifikovano oslobađanje biohanina A	109
4.2.3.1. Strukturna analiza kopolimera p(NiPAm-ko-AA) sa biohaninom A	109
4.2.3.2. Morfološka analiza primenom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM)	112
4.2.4. Efikasnost inkorporiranja biohanina A u p(NiPAm-ko-AA) hidrogel	113
4.2.5. In vitro otpuštanje biohanina A iz kopolimera p(NiPAm-ko-AA)	114

4.3. ELEKTROSPINOVANA POLIMERNA VLAKNA KAO NOSAČI BIOHANINA A	116
4.3.1. Priprema i karakterizacija elektrospinovanih polimernih vlakana sa i bez biohanina A	116
4.3.2. Mehanička svojstva elektrospinovanih vlakana.....	117
4.3.3. Svojstva površine elektrospinovanih vlakana.....	118
4.3.4. Termička svojstva elektrospinovanih vlakana.....	118
4.3.5. Morfologija elektrospinovanih polimernih vlakana	120
4.3.6. FTIR analiza elektrospinovanih vlakana.....	121
4.3.7. Modifikovano oslobađanje biohanina A iz elektrospinovanih polimernih vlakna.....	125
4.3.8. Biološke aktivnosti	130
4.3.8.1. Proliferacija ćelija	130
4.3.8.2. <i>In vitro</i> zarastanje rana	133
4.4. LIPOSOMI KAO NOSAČI BIOAKTIVNIH SUPSTANCI	137
4.4.1. Karakterizacija liposoma sa biohaninom A.....	137
4.4.2. Oslobađanje biohanina A iz MLV i SUV liposoma	138
5. ZAKLJUČAK.....	142
6. LITERATURA	147
BIOGRAFIJA	169
BIBLIOGRAFIJA.....	170

1. UVOD

Biohanin A (BHA) je *O*-metilovani izoflavon koji po hemijskoj strukturi predstavlja 5,7-dihidroksi-3-(4-metoksifenil)-hromen-4-on. Metaboliše se do farmakološki aktivnog genisteina pa se smatra derivatom genisteina. Hemijska struktura BHA je slična estrogenu tako da ispoljava agonističku i antagonističku interakciju sa estrogenim receptorima. Istraživanja pokazuju da BHA ispoljava i druga farmakološka dejstva koja ostvaruje različitim mehanizmima. BHA ispoljava antioksidativnu, antiinflamatornu, antidijabetsku, antialergijsku, antihiperглиkemijsku i antihiperlipidemijsku aktivnost. Većina korisnih efekata se pripisuje njegovoj antioksidativnoj aktivnosti. On inhibira proliferaciju ćelija, indukuje apoptozu ćelija kancera i reguliše gensku ekspresiju enzimskih proteina od kojih je većina uključena u metabolizam lekova. Takođe, ometa transdukciju signala koja je neophodna za ćelijski rast čime inhibira aktivnost tirozin kinaze i time smanjuje preživljavanje ćelija kancera. Uprkos velikom broju korisnih efekata njegova klinička upotreba je ograničena zbog niske rastvorljivosti u vodi i slabe bioraspoloživosti.

Različiti pristupi u izradi formulacija BHA mogu poboljšati njegove fizičko-hemijske karakteristike, povećati rastvorljivost i bioraspoloživost i omogućiti bezbednu i efikasnu primenu. U ove svrhe u literaturi su opisane formulacije sa enterorezistentnim filmom, čvrste disperzije i nanočestice na bazi lipida u kojima je BHA značajno povećana rastvorljivost u vodi i bioraspoloživost. Iako se klinički koristi za ublažavanje postmenopauzalnih simptoma, potrebno je više studija da bi se ocenila efikasnost i sigurnost upotrebe BHA. To podrazumeva da se dalje učine značajni istraživački naporu u izradi nekonvencionalnih farmaceutskih oblika koji će poboljšati farmakološku aktivnost, omogućiti ciljanu dostavu, zaštitu od spoljnih uticaja i umanjiti neželjene efekte BHA.

Brojni su primeri inkluzionih kompleksa ciklodekstrina i različitih lekova koji su izrađeni sa ciljem da se poveća biološka raspoloživost slabo rastvornih ili u vodi nerastvornih lekovitih supstanci, promeni brzina rastvaranja i izvrši zaštita nestabilnih aktivnih supstanci od dejstva spoljašnjih faktora (svetlost, pH). Za izradu inkluzionih kompleksa, od ciklodekstrina, se najčešće koristi β -ciklodekstrin i takve formulacije su namenjene oralnoj primeni. Inkluzioni kompleksi sa derivatom β -ciklodekstrina, 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom (HP- β -CD), koji nije toksičan, pogodni su za molekulska inkapsulaciju lekova za oralnu i parenteralnu primenu.

Hidrogelovi su polimerni materijali čija svojstva zavise od izbora monomera i načina sinteze. Bubre u vodi i fiziološkim tečnostima, pri čemu njihova struktura ostaje nepromenjena. U medicini i farmaciji posebno su važni hidrogelovi osetljivi na promenu temperature i pH sredine, tzv. *inteligentni gelovi*. Poli(N-izopropilakrilamid), poli(NiPAm), je temperaturno osetljiv, nebiodegradabilan polimer koji poseduje hidrofilne i hidrofobne funkcionalne grupe. Donja kritična temperatura rastvora (LCST) na kojoj ovaj polimer prolazi kroz fazni prelaz iznosi 32 °C. Na temperaturi ispod LCST, polimer ispoljava hidrofilnu prirodu i bubri, pri čemu može apsorbovati rastvore farmakološki aktivnih supstanci, dok na temperaturama iznad LCST, polimer ispoljava hidrofobnu prirodu, kontrahuje se i oslobađa apsorbovane supstance. Sposobnost poli(NiPAm)-a da apsorbuje i oslobađa aktivne supstance, usled promene temperature sredine, omogućava njegovu primenu kao nosača lekova. Svojstva poli(NiPAm)-a mogu se bitno modifikovati kopolimerizacijom N-izopropilakrilamida (NiPAm) sa akrilnom kiselinom (AA).

Mikro-vlakna od polimernih biodegradabilnih i biokompatibilnih materijala kao što su poli(laktid) (PLA), poli(vinilpirolidon) (PVP), kopolimer mlečne i glikolne kiseline i sl., pokazala su se korisnim za formulacije sa bioaktivnim supstancama. Dobijaju se metodom elektrospinovanja (elektropredenja) iz rastvora polimera sa isparljivim organskim rastvaračima. Ovakav postupak izrade mikro-vlakana, kao nosača lekovitih supstanci, ne zahteva visoke temperature što je povoljno za termolabilne bioaktivne supstance. Fleksibilnost u odabiru polimera omogućava širok izbor terapeutika koji se mogu ugraditi u mikro-vlakna. Kao pogodni lekoviti agensi za ugradnju u mikro-vlakna mogu se primeniti anestetici, antibiotici, antikancerski lekovi i drugi. Modifikacijom osnovne elektrospining metode izrade mikro-vlakana mogu se stvoriti konstrukcije sa različitim načinom punjenja lekovitim supstancama (ugrađene, obložene i sl.). Polimerna mikro-vlakna nastala elektrospinovanjem oslobađaju bioaktivnu supstancu na definisan način i predstavljaju pogodne savremene nosače za kontrolisanu dostavu lekova.

Liposomi su mikropartikularne vezikule izrađene od biorazgradivih, netoksičnih i neimunogenih fosfolipidnih molekula. Njihova građa je veoma slična biološkim membranama pa su fiziološki prihvatljivi za primenu kao nosači lekovitih supstanci. Svojstva liposoma mogu se menjati izborom fosfolipida koji grade lipidni dvosloj. Građa liposoma pruža mogućnost da se u njima mogu uklopiti hidrofilni, lipofilni i amfifilni lekovi. Efikasnost inkorporiranja leka zavisi od fizičko-hemijskih karakteristika samog leka (lipofilni lekovi se uklapaju u visokom, a hidrofilni u niskom procentu). Oslobađanje leka zavisi pre svega od količine inkorporiranog leka, fosfolipidnog sastava, veličine, stabilnosti i biološke

interakcije liposoma sa ćelijama. Liposomi kao nosači lekova mogu se izraditi kao suspenzije, aerosoli, gelovi, kreme ili suvi praškovi i mogu se primeniti parenteralno ili topikalno. Terapijski liposomi poboljšavaju farmakokinetička svojstva, smanjuju nuspojave i toksičnost i obezbeđuju kontrolisano oslobađanje i ciljanu dostavu leka.

Predmet i cilj istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji su ispitivanje bioloških aktivnosti BHA u *in vitro* uslovima na mikroorganizmima, enzimima i ćelijskim kulturama i određivanje antioksidativnog potencijala u jednostavnim sistemima u kojima se generišu slobodni radikali izazivači oksidativnih procesa primenom primarnih bioloških testova, izrada različitih naprednih farmaceutskih sistema sa BHA kao model supstancom (inkluzioni kompleks sa HP- β -CD, hidrogelovi na bazi poli(N-izopropilakrilamid-ko-akrilna kiselina) (poli(NiPAm-ko-AA)), mikro-vlakna na bazi PLA i PVP i liposomske formulacije) i njihova karakterizacija primenom odgovarajućih metoda.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. SAVREMENI FARMACEUTSKI OBLICI

Razvoj savremenih farmaceutskih oblika sa sofisticiranim nosačima za isporuku aktivnih supstanci (lekova) predstavlja jedan od izazova i novih pristupa za unapređenje postojeće farmakoterapije (Milić i sar., 2003). Ovi novi sistemi za isporuku lekovitih supstanci imaju prednost u odnosu na konvencionalne oblike jer obezbeđuju:

- odgovarajuće farmakokinetičke profile oslobađanja aktivne supstance u skladu sa ciljevima koje treba postići u terapiji (mesto i brzinu oslobađanja aktivne supstance, kao i brzinu kojom se apsorbuje aktivna supstanca sa površina membrana ćelija),
- efikasnost, bezbednost i selektivnost u delovanju,
- značajno poboljšanje karakteristika lekovite supstance (rastvorljivost, stabilnost, bioraspoloživost) i
- poboljšanje komplijanse (prihvatljivost od strane pacijenata).

Osnovni cilj u dizajniranju savremenih farmaceutskih oblika jeste da se pojača efikasnost postojećih lekova ili novih hemijskih entiteta (novih lekova). Postupci izrade savremenih farmaceutskih oblika i uspešnih nosača za isporuku lekovite supstance su složeni i zahtevni. Uključuju različite faktore kao što su način aplikacije (oralni, parenteralni, transdermalni, transmukozni, inhalacioni, vaginalni), fizičko-hemijske karakteristike i indikacije aktivne supstance. Posebno su u savremenoj farmakoterapiji važni farmaceutski oblici sa modifikovanim oslobađanjem aktivnih supstanci. Oni su dizajnirani tako da obezbede modifikovanu brzinu i mesto oslobađanja aktivne supstance. U ove sisteme spadaju:

- inkapsulirani i matriks sistemi (kontrolni mehanizam otpuštanja aktivne supstance je rastvaranje) i
- matriks sistemi sa dispergovanom aktivnom supstancom i sistemi tipa rezervoara obloženi membranom (kontrolni mehanizam otpuštanja aktivne supstance je difuzija).

Brzina kojom se oslobađa aktivna supstanca iz farmaceutskog oblika je takođe parametar na osnovu koga ove sisteme možemo podeliti na:

- preparate za brzo delovanje i
- preparate sa usporenim oslobađanjem.

Preparati za brzo delovanje izrađuju se kao molekulske disperzije lekovite supstance i polimernog matriksa koga čine amorfni dobro rastvorni polimeri velike specifične površine kao što su PVP, dekstrini i sl. Brzina oslobađanja aktivne supstance u ovakvim preparatima isključivo zavisi od brzine rastvaranja polimera (Milić i sar., 2003).

Preparati sa usporenim oslobađanjem obezbeđuju održavanje potrebne koncentracije lekovite supstance u krvi za duži vremenski period. Ukupna količina lekovite supstance u ovim preparatima podeljena je najčešće u dve doze, inicijalnu dozu i dozu održavanja. Inicijalna doza odgovara pojedinačnoj dozi leka, a doza održavanja nastavlja da oslobađa lek za duže vreme u potrebnoj koncentraciji (Milić i sar., 2003).

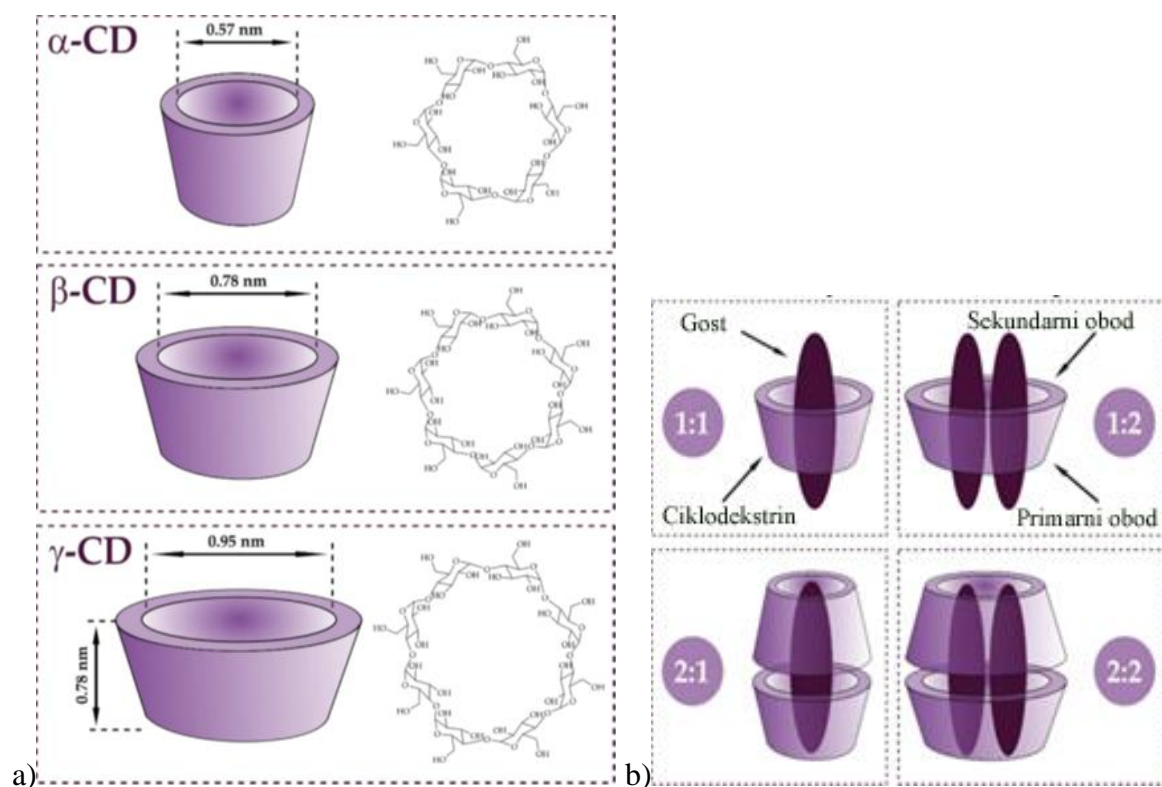
Napredniji sistemi u odnosu na preparate sa usporenim oslobađanjem su preparati sa kontrolisanim oslobađanjem aktivne supstance u kojima je tačno definisana brzina i mesto oslobađanja aktivne supstance. Osnovni cilj je da se izbegne poddoziranje i predoziranje lekovite supstance kako bi se sproveda bezbedna i efikasna terapija (Milić i sar., 2003).

Koncept ciljane terapije, koji sve više dobija na značaju, može se ostvariti upotrebom pogodnih nosača koji mogu dopremiti aktivnu supstancu do ciljanog mesta (organa, ćelija) i osloboditi je kontrolisanom brzinom iz sistema. Za ove svrhe koriste se koloidni nosači kao što su liposomi, niosomi, mikročestice i nanočestice (Krajišnik i sar., 2019; Milić i sar., 2003; Savić i sar., 2005).

Nosači u naprednim sistemima mogu biti sintetičkog i prirodnog porekla. Za ove nosače bitno je da su inertni, biokompatibilni, biodegradabilni, netoksični i određenih fizičkih karakteristika kako bi omogućili efikasnost u delovanju savremenih farmaceutskih oblika (Krajišnik i sar., 2019; Milić i sar., 2003; Savić i sar., 2005).

2.1.1 Inkluzioni kompleksi sa ciklodekstrinima

Ciklodekstrini (CD) su ciklični oligosaharidi u kojima su glukozne jedinice povezane α -1,4-glikozidnom vezom. Dobijaju se dejstvom enzima glukoziltransferaze na skrob. U zavisnosti od broja glukoznih jedinica razlikuju se α -CD, β -CD i γ -CD koji sadrže šest, sedam i osam jedinica glukoze, redom. Imaju oblik zarubljene kupe sa šupljinom čiji prečnik zavisi od broja glukoznih jedinica. Primarne i sekundarne hidroksilne grupe su smeštene na užem i širem obodu. Primarne hidroksilne grupe mogu da rotiraju i smanjuju prečnik CD dok sekundarne hidroksilne grupe formiraju vodonične veze i obezbeđuju krutost CD. Strukture i dimenzije CD prikazane su na slici 1a (Cid-Samamed i sar., 2022).



Slika 1. Strukture i dimenzije α -CD, β -CD i γ -CD (a); stehiometrijski odnos domaćin:gost u inkluzionim kompleksima (b) (Cid-Samamed i sar., 2022)

CD mogu inkapsulirati različite molekule (polarne i nepolarne) u svoje šupljine i stvarati inkluzionne komplekse različitih stehiometrijskih odnosa domaćin:gost (Slika 1b) (Cid-Samamed i sar., 2022). Za formiranje inkluzionih kompleksa uglavnom su odgovorne veličine šupljina CD i molekula koji se inkluduje. Interakcije između inkludovanog molekula i CD uglavnom su slabe, tipa vodoničnih veza, dipol-dipol i Van der Valsovih interakcija. Pored osnovnih CD za izradu inkluzionih kompleksa koriste se i derivati CD kao što su sulfobutiletar-, hidroksipropil- i karboksimetil- β -CD (Cid-Samamed i sar., 2022). Inkluzionni kompleksi sa CD našli su primenu u različitim industrijama, a posebno u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji jer su od strane Agencije za hranu i lekove (FDA) generalno proglašeni bezbednim naročito kada se koriste oralno u odgovarajućoj dozi jer imaju nisku biodostupnost (Braga i sar., 2021, Cid-Samamed i sar., 2022; Ogunbadejo i Al-Zuhair, 2021). U literaturi (Carneiro i sar., 2019; Cid-Samamed i sar., 2022; Jansook i sar., 2018; Lima i sar., 2016; Matencio i sar., 2020) je pokazano da u inkluzionom kompleksu molekul gosta postiže:

- bolju rastvorljivost,

- povećanu stabilnost (termičku, oksidativnu i foto stabilnost),
- korigovanje neprijatnog ukusa i mirisa,
- smanjenje isparljivosti lako isparljivih aktivnih jedinjenja,
- izbegavanje interakcija (lek-lek ili lek-pomoćna supstanca) i
- kontrolisano oslobađanje.

Zbog izmene nepoželjnih fizičko-hemijskih karakteristika molekula gosta u inkluzionim kompleksima, ovakva vrsta kompleksa ima posebnu važnost u izradi savremenih farmaceutskih oblika. Selektivnom upotrebom CD u izradi inkluzionih kompleksa može se obezbediti ubrzano, usporeno ili ciljano terapijsko dejstvo (Hirayama i Uekama, 1999; Qi i Sikorski, 2001; Uekama i sar., 1998). Stoga se razlikuju sledeći savremeni farmaceutski oblici:

- sa trenutnim ili ubrzanim oslobađanjem aktivne supstance,
- sa produženim oslobađanjem aktivne supstance,
- sa modifikovanim oslobađanjem aktivne supstance i
- sa ciljanim oslobađanjem aktivne supstance.

Za pripremu inkluzionih kompleksa postoje različite metode:

- koprecipitacija,
- gnječenje (metoda paste),
- mlevenje,
- pomoću superkritičnog ugljen-dioksida,
- mikrotalasno zračenje i
- sušenje raspršivanjem.

Od primenjene metode u izradi inkluzionog kompleksa zavise osobine krajnjeg proizvoda (Cid-Samamed, 2022).

Koprecipitacija je jednostavna i efikasna metoda pa je stoga i najviše korišćena za izradu inkluzionih kompleksa. Primenuje se za molekule goste nerastvorne u vodi. Postupak zahteva rastvaranje molekula gosta u etanolu ili nekom drugom organskom rastvatraču i dodavanje ovog rastvora u vodeni rastvor CD uz intenzivno mešanje. Nakon hlađenja i kristalizacije talog se odvaja, ispira i suši (Cid-Samamed i sar., 2022).

Metoda gnječenja je takođe visoko efikasan i jednostavan metod za dobijanje inkluzionih kompleksa. Zasniva se na stvaranju paste mešanjem odmerene količine ciklodekstrina i minimalne količine destilovane vode, a zatim se dodaje molekul gost koji se

intenzivnim mešanjem sa nastalom pastom inkluduje u šupljine ciklodekstrina. Nastali čvrsti kompleks se ispere malom količinom rastvarača i suši (Cid-Samamed i sar., 2022).

Metoda mlevenja je mehanička metoda za izradu inkluzionih kompleksa sa ciklodekstrinima. Ne zahteva primenu rastvarača pa se smatra čistom i ekološki prihvatljivom metodom. S druge strane u farmaceutskoj industriji mlevenje je uobičajena i česta tehnološka operacija tako da metod mlevenja ne bi zahtevao posebnu izmenu tehnoloških procesa na industrijskom nivou, što ovu metodu čini ekonomski opravdanom. Metod mlevenja je brz i visoko efikasan što ga dodatno čini pogodnim za primenu u industrijskim uslovima. Tačan mehanizam stvaranja inkluzionih kompleksa postupkom mlevenja nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se da se mlevenjem smanjuje veličina čestica čime se povećava kontaktna površina za interakciju između molekula gosta i ciklodekstrina, a da je mehanička energija mlevenja dovoljna da nastanu metastabilne strukture kompleksa (Cid-Samamed i sar., 2022).

Metoda izrade inkluzionih kompleksa superkritičnim ugljen-dioksidom je alternativna metoda tradicionalnim tehnikama izrade inkluzionih kompleksa (koprecipitacija, gnječenje i mlevenje) koje imaju izvesne nedostatke kao što su duže vreme izvođenja procesa, prisustvo rezidua (organski rastvarači) i manja efikasnost enkapsulacije. Metod izrade inkluzionih kompleksa sa superkritičnim ugljen-dioksidom ima prednost jer daje dobar prinos, potpuno odvajanje inkluzionog kompleksa od superkritičnog fluida i može se primeniti za komercijalnu upotrebu (Banchemo, 2021). Ugljen-dioksid je u superkritičnom stanju (na temperaturi većoj od 31,3 °C i pritisku iznad 72 bar) dobar rastvarač. Osim toga ima nisku toksičnost i stoga se sve češće koristi u različitim procesima i istraživanjima. Izrada inkluzionih kompleksa ovom metodom se izvodi na određenoj temperaturi i pritisku u autoklavu u kome je uneta određena količina ciklodekstrina i agensa koji se inkluduje u prisustvu ugljen-dioksida. Smanjenjem pritiska, ugljen-dioksid brzo ispari i odvaja se formiran inkluzioni kompleks (Cid-Samamed i sar., 2022).

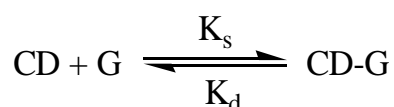
Izrada inkluzionih kompleksa primenom mikrotalasnog zračenja je obećavajuća metoda i može biti takođe alternativa tradicionalnim tehnikama. Prednosti ove metode su kraće vreme trajanja procesa i odsustvo organskih rastvarača u inkluzionom kompleksu. Proces se izvodi u mikrotalasnoj pećnici tako što se odgovarajuće količine ciklodekstrina i inkludujuće komponente pomešaju sa malom zapreminom mešavine etanol/voda (v/v) i tretiraju u mikrotalasnoj peći određeno vreme. Dobijeni prah se ispira čistim etanolom da se odstrane neinkludovani molekuli gosta, a dobijeni proizvod je inkluzioni kompleks (Cid-Samamed i sar., 2022; Khushbu i Jindal, 2022).

Sušenje raspršivanjem je najstarija i najčešće korišćena metoda koja se odvija u tri koraka (Watson i sar., 2017):

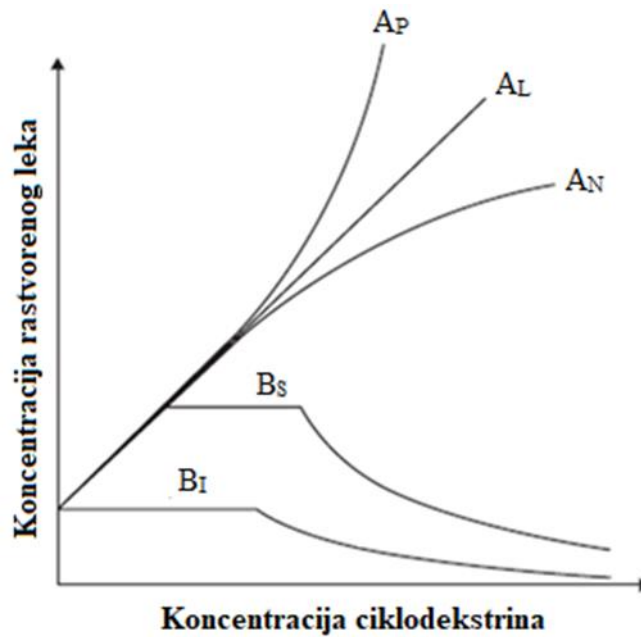
- atomizacija uzorka,
- sušenje fino raspršenih kapljica i
- odvajanje osušenih čestica od vazdušne struje.

Metoda se lako izvodi i može se primeniti na industrijskom nivou, daje visok prinos i brzo sušenje. Nedostatak ove metode je što se nosač ograničeno disperguje i rastvara u vodi (Liu i sar., 2022).

Kao što se može videti iz prikazanih metoda, inkluzioni kompleksi se mogu formirati u vodenim i čvrstim sistemima. Proces je reverzibilan i može se prikazati za komplekse koji se formiraju u molskom odnosu 1:1 (CD:G) na sledeći način:



Stvaranje kompleksa opisuje konstanta stabilnosti, K_s , čija vrednost ukazuje na afinitet inkludujućeg molekula (G) prema CD. Ako K_s ima vrednost 0 M^{-1} inkluzioni kompleks se ne formira. Konstanta stabilnosti i stehiometrija u inkluzionom kompleksu se uglavnom određuju kvantitativnom analizom izoterme rastvorljivosti, koje pokazuju zavisnost rastvorljivosti molekula gosta od koncentracije CD. Postoje dva tipa izoterme, tip A koji obuhvata A_L , A_P i A_N podtip, gde rastvorljivost raste linearno sa porastom koncentracije ciklodekstrina ili odstupa pozitivno ili negativno od linearnosti, što ukazuje da je formirani kompleks prvog reda u odnosu na ciklodekstrin i prvog ili višeg reda u odnosu na lek. Ovaj tip izoterme je karakterističan za inkluzione komplekse rastvorne u vodi. Drugi tip su B izoterme rastvorljivosti i obuhvataju B_S i B_I podtip. B_S podtip izoterme pokazuje da nakon inicijalnog povećanja rastvorljivosti inkludovane supstance, sledi konstantna rastvorljivost, a zatim pad rastvorljivosti uz precipitaciju inkluzionog kompleksa i karakteristična je za komplekse koji imaju ograničenu rastvorljivost u vodi. B_I podtip izoterme rastvorljivosti ukazuje na stvaranje inkluzionog kompleksa koji nije rastvorljiv u vodi (Higuchi i Connors, 1965). Izoterme rastvorljivosti prikazane su na slici 2.



Slika 2. Različiti tipovi izoterme rastvorljivosti (preuzeto iz Higuchi i Connors, 1965)

Za inkluzione komplekse rastvorljive u vodi sa stehiometrijskim odnosom 1:1 koji se pokoravaju A_L tipu izoterme rastvorljivosti, konstanta stabilnosti kompleksa, $K_{S(1:1)}$, se izračunava na osnovu jednačine 1:

$$K_{S(1:1)} = \frac{\text{nagib}}{S_0(1-\text{nagib})} \quad (1)$$

gde je S_0 rastvorljivost molekula gosta u vodi bez uticaja CD, a nagib je nagib izoterme rastvorljivosti koja daje zavisnost koncentracije rastvorenog molekula gosta od CD i očitava se sa grafika (Loftsson i Brewster, 2010; Loftsson i Brewster, 2012).

Ukupna rastvorljivost molekula gosta u kompleksu se određuje na osnovu jednačine 2:

$$S_{tot} = S_0 + m \frac{D_m}{CD} \quad (2)$$

pri čemu je m broj molova molekula gosta i može imati vrednost ≥ 1 .

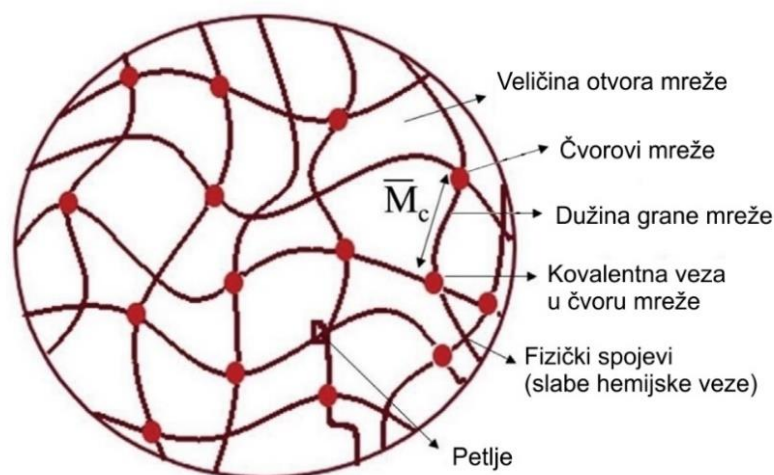
Za nagib izoterme rastvorljivosti koji je manji od 1 efikasnost kompleksacije (CE) se može izračunati na osnovu jednačine 3:

$$CE = S_0 K_{S(1:1)} = \frac{\text{nagib}}{1-\text{nagib}} \quad (3)$$

2.1.2. Hidrogelovi kao nosači bioaktivnih supstanci

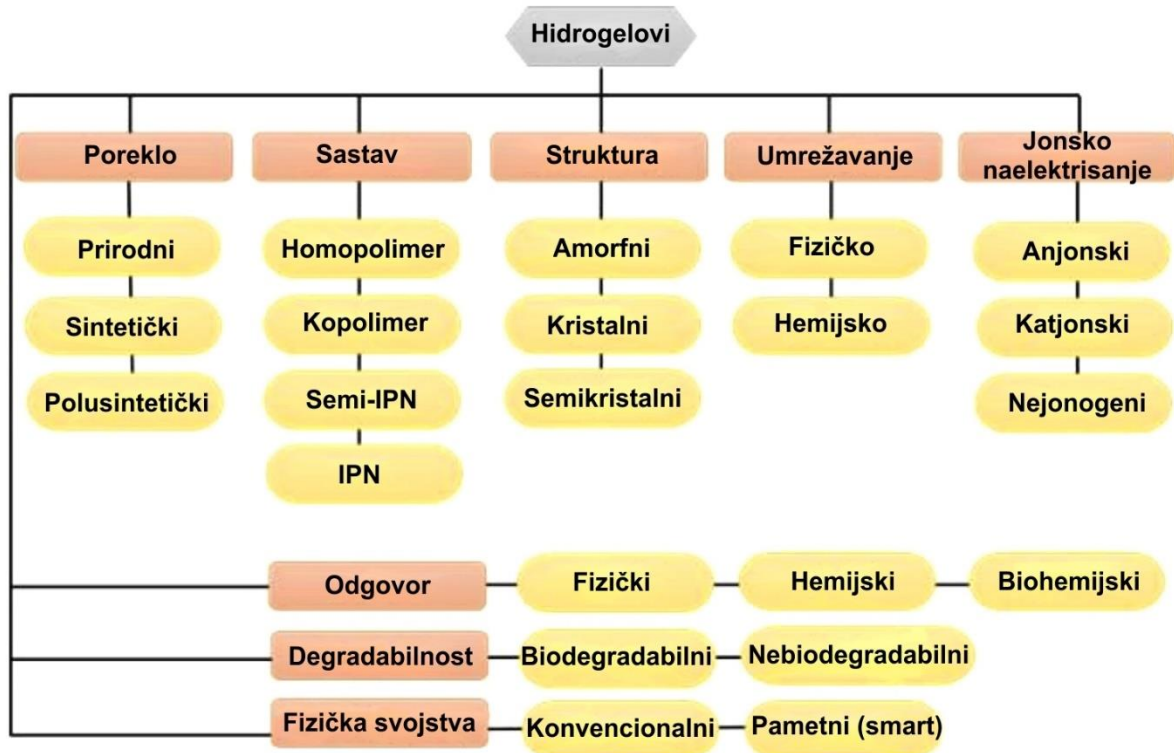
Hidrogelovi su slabo umreženi polimerni materijali koji u svom sastavu imaju bar jedan hidrofilni monomer koji im omogućava bubrenje u vodenim fluidima. Oni su postali veoma korisni materijali za primenu u medicini i izradi farmaceutskih preparata, naročito za kontrolisano oslobađanje biološki aktivnih molekula iz svoje mreže. Pri tom, polimerni materijali moraju da ispune čitav niz uslova za upotrebu u obliku matriks sistema iz kojih se oslobađaju molekuli bioaktivnih supstanci: da su netoksični, neimunogeni, bezbedni u svim fazama isporuke leka (pre, u toku i posle isporuke leka) kao i u toku izlučivanja polimernih molekula ili njihovih degradacionih proizvoda.

Svojstva hidrogelova, naročito njihov stepen bubrenja zavise od strukture mreže. Šematski prikaz mreže hidrogela dat je na slici 3. Ako su u strukturi hidrogela dužine grana male a čvorovi mreže gusto pozicionirani stepen bubrenja će biti manji. Nasuprot tome, ako su čvorovi mreže ređi a dužine grana veće i stepen bubrenja će biti veći. Zato je važan parametar u strukturi mreže hidrogelova stepen umreženja od koga zavise i veličine otvora mreže. Čvorovi mreža se formiraju hemijskim povezivanjem atoma i to kovalentnim vezama i od njihove gustine direktno zavisi stepen umreženja. Fizička povezivanja grana, slabe hemijske veze i uplitanja uglavnom ne doprinose stepenu umreženja hidrogelova.



Slika 3. Struktura hidrogela na molekularnom nivou (Aswathy i sar., 2020)

Na slici 4 je prikazana klasifikacija hidrogelova prema: poreklu, sastavu, strukturi, umrežavanju, jonskom naelektrisanju, ostvarenom odgovoru na spoljne stimulanse, degradabilnosti i fizičkim svojstvima.



IPN - Interpenetrirajuće mreže

Slika 4. Šematski prikaz klasifikacije hidrogelova (Aswathy i sar., 2020)

Posebno mesto u ulozi nosača bioaktivnih supstanci su dobili hidrogelovi koji reaguju na spoljašnje stimulanse pomoću kojih može da se kontroliše i modifikuje brzina oslobađanja bioaktivne supstance. Ovakvi hidrogelovi mogu da povećaju ili smanje nivo bubrenja, da se degradiraju ili da prolaze kroz fazni prelaz sa promenom temperature ili pH vrednosti okoline, delovanjem rastvarača, jonske sile rastvora ili enzima. Ta jedinstvena sposobnost da ostvare neku funkciju, uključujući i oslobađanje bioaktivne supstance kao odgovor na promene spoljašnjih faktora učinila je ovu klasu materijala korisnim za terapijsku isporuku bioaktivnih sastojaka (Buwalda i sar., 2017). Na slici 5 su prikazani mogući stimulanse i odgovori hidrogelova na te stimulanse. Kao stimulanse se mogu pojaviti električna polja, mehaničke sile i naponi, promena temperature i pH sredine, pojava elektromagnetnog zračenja, dejstvo rastvarača, soli, drugih hemijskih ili bioloških agenasa. Na te stimulanse hidrogelovi mogu reagovati promenom oblika ili propustljivosti (što je veoma korisno svojstvo za izradu membrana), razdvajanjem faza, promenama na površini ili nekim drugim hemijskim, mehaničkim, električnim ili optičkim odgovorima.



Slika 5. Potencijalni stimulansi i odgovori hidrogelova (Schmaljohann, 2006)

2.1.2.1. Hidrogelovi koji reaguju na promenu temperature i/ili pH

Hidrogelovi koji reaguju na promenu temperature pokazuju promenu zapremine u obliku faznog prelaza na nekoj temperaturi što naglo menja stanje solvatacije hidrogela. Hidrogelovi koji postaju manje rastvorni pri zagrevanju (imaće manji stepen bubrenja) su tzv. hidrogelovi sa donjom kritičnom temperaturom rastvora (LCST). Ako hidrogelovi postaju rastvorljiviji sa povećanjem temperature (povećava se stepen bubrenja) to su tzv. hidrogelovi sa gornjom kritičnom temperaturom rastvora (UCST). LCST i UCST sistemi su od interesa za biomedicinsku primenu. Promena stanja hidratacije, koja izaziva fazni prelaz zapremine, je posledica promene odnosa intenziteta vodoničnih veza i hidrofobnih interakcija, i zavisi od toga da li je intra- ili intermolekulska vodonična veza molekula polimera favorizovana u poređenju sa intenzitetom solubilizacije. Stepen bubrenja se smanjuje kada se poveća intenzitet hidrofobnih interakcija (Schild, 1992).

Tipični LCST hidrogelovi su sintetisani od monomera N-izopropilakrilamida (NiPAm) (Schild, 1992; Shibayama i sar., 1996), N,N-dietilakrilamida (DEAM) (Idziak i sar., 1999), metilviniletra (MVE) (Horne i sar., 1971; Mikheeva i sar., 1997.) ili N-vinilkaprolaktama (NVCi) (Makhaeva i sar., 1998; Van Durme i sar., 2004). Tipičan UCST sistem je zasnovan na kombinaciji akrilamida (AAm) i akrilne kiseline (AA) (Aoki i sar., 1994). U tabeli 1 su prikazane temperature faznih prelaza nekih hidrogelova.

Tabela 1. Temperature faznih promena zapremine hidrogelova u vodenim sredinama koji se mogu primeniti za biomedicinske svrhe

Hidrogel	Temperatura fazne promene zapremine u vodenoj sredini, °C	Referenca
<i>LCST</i>		
Poli(N-izopropilakrilamid), PNiPAm	30 - 34	Schild, 1992; Shibayama i sar., 1996.
Poli(N,N-dietilakrilamida), (PDEAM)	32 - 34	Idziak i sar., 1999.
Poli(metilviniletar), (PMVE)	37	Horne i sar., 1971; Mikheeva i sar., 1997.
Poli(N-vinilkaprolaktam), (PNVCl)	30 - 50	Van Durme i sar., 2004; Makhaeva i sar., 1998.
Poli(etilenoksid-b-propilenoksid), PEO-b-PPO	20 - 85	Kwon i sar., 2005.
<i>UCST</i>		
Poli(akrilamid-ko-akrilna kiselina), PAAm/PAAc	25	Aoki i sar., 1994.

Hidrogelovi koji reaguju na promenu pH vrednosti okoline promenom stepena bubrenja u sebi sadrže monomer koji može disosovati, uglavnom akrilnu ili metakrilnu kiselinu (Bami i sar., 2022). Promena stepena bubrenja je posledica manjeg ili većeg stepena disocijacije karboksilnih grupa u sastavu hidrogela sa promenom pH sredine. Naime, na nižoj vrednosti pH sredine disocijacija karboksilnih grupa je suzbijena i stepen bubrenja je manji. Nasuprot tome, na višim pH vrednostima je disocijacija karboksilnih grupa favorizovana, veći je broj stvorenih anjonskih centara u strukturi hidrogela koji deluju tako da se međusobno odbijaju, stvaraju uslove za razmicanje grana hidrogela, apsorbuju veću količinu vode u svojim porama i povećavaju stepen bubrenja hidrogela.

Kopolimerizacijom monomera koji su odgovorni za promenu svojstava hidrogela sa promenom temperature (kao što je NiPAm) i monomera koji reaguju na promenu pH sredine (AA) dobijaju se kopolimerni hidrogelovi sa dvostrukum odgovorom tj. hidrogelovi koji reaguju na promenu temperature i pH sredine (Dong i sar., 1991).

U tabeli 2 prikazane su pH vrednosti u nekim organima, tkivima i delovima ćelija kod čoveka (Florence i sar., 1998; Grabe i sar., 2001; Watson i sar., 2005). Pošto postoji promena pH vrednosti duž gastrointestinalnog trakta od kiselog u želucu (pH od 1 do 3) do višeg pH u crevima (pH od 4,8 do 8,2 i od 7,0 do 7,5) kao što je prikazano u tabeli 2 (Schmaljohann, 2006) može se diktirati oslobađanje lekovite supstance na određenom mestu time što će pH-osetljivi polimer menjati svoja svojstva promenom pH sredine. Takođe, zdrava tkiva imaju

uobičajeni pH 7,4 dok npr. tumorska, upaljena ili oštećena tkiva imaju drugačiji pH (7,2 do 6,5; Tabela 2) što se može iskoristiti za kontrolisano oslobađanje leka samo u nezdravim tkivima dok bi oslobađanje u zdravom tkivu bilo minimalno. Takođe se mogu iskoristiti da bi se prevazišla kisela gastrointestinalna barijera pa da se iz ovakvih formulacija lekovita supstanca oslobađa tek kada dospe u creva (Dissemond i sar., 2003; Rofstad i sar., 2006; Vaupel i sar., 1989).

Tabela 2. Vrednosti pH u različitim organima, tkivima i delovima ćelije (Florence i sar., 1998; Grabe i sar., 2001; Watson i sar., 2005)

Organi, tkiva ili delovi ćelije	pH
Krv	7,35 - 7,45
Želudac	1,0 - 3,0
Dvanaestopalačno crevo	4,8 - 8,2
Debelo crevo	7,0 - 7,5
Rani endozomi	6,0 - 6,5
Kasni endozomi	5,0 - 6,0
Lizozomi	4,5 - 5,0
Goldžijev kompleks	6,4
Tumorska tkiva, ekstracelularno	7,2 - 6,5

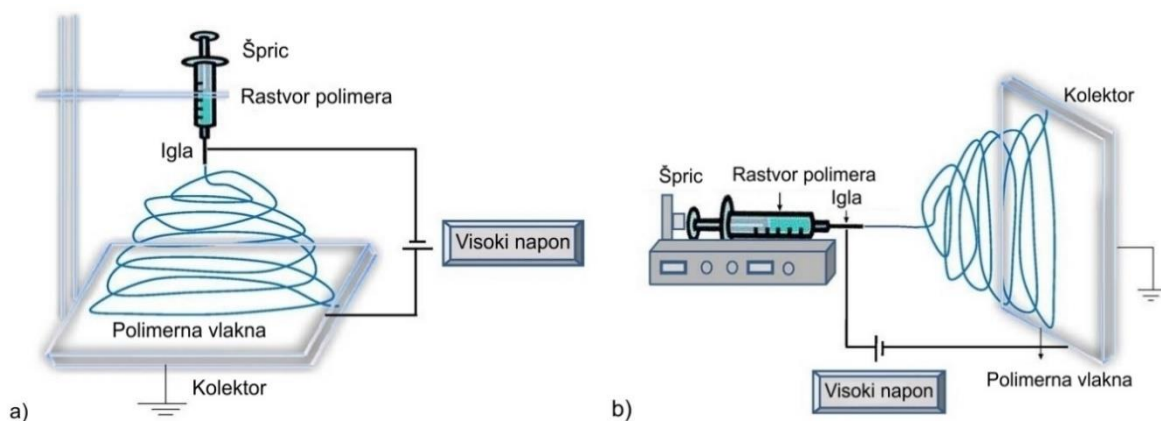
Hidrogelovi na bazi NiPAm su korišćeni za oralnu isporuku kalcitonina i insulina imobilisanih u polimerne kuglice koje su stabilne dok prolaze kroz kiselu sredinu želuca. Zatim se u alkalnoj sredini creva raspadaju i lek se oslobađa (Kim i sar., 1994; Ramkisson-Ganorkar i sar., 1999; Serres i sar., 1996). Formulacije doksorubicina u kopolimernom hidrogelu poli(N-izopropilakrilamid-ko-akrilna kiselina) (poli(NiPAm-ko-AA)) pripremali su Xiong i saradnici (Xiong i sar. 2011), a Ma i saradnici u blok kopolimernom hidrogelu poli(N-izopropilakrilamid-blok-akrilna kiselina) sa ciljanom isporukom za terapiju kancera (Ma i sar., 2017). Hidrogelovi (LCST) se smanjenjem temperature kontrahuju i mogu da istisnu lekovitu supstancu pa su poželjni za primenu analgetika i BHA kao fitoestrogena za ublažavanje valunga u periodu postmenopauze. Xu i saradnici su imobilisali ibuprofen u hidrogel poli(NiPAm-ko-AA) (Xu i sar., 2022). Takođe, publikovane su formulacije različitih lekovitih supstanci (ciklosporin, doksorubicin, prednizon acetat, metotreksat, docetaksel, indometacin, diflunizal, paklitaksel, dipiridamol) sa hidrogelovima na bazi NiPAm-a (Wei i sar., 2009).

2.1.3. Elektrospinošana polimerna vlakna

Elektrospining (elektropredenje) je jednostavna metoda, zasnovana na elektrostatičkim silama, kojom se mogu izraditi strukturirana polimerna vlakna od različitih polimernih materijala čiji prečnik varira od mikrometarskih do nanometarskih veličina. Specifična struktura tako izrađenih polimernih vlakana čini da imaju veliki odnos površine i zapremine i veliku poroznost. Morfologija i veličina elektrospinovanih vlakana zavise od svojstava rastvora polimera (relativna molekulska masa polimera, koncentracija polimera, viskozitet rastvora, provodljivost, površinski napon i polarnost rastvarača), procesnih parametara (napon, brzina protoka rastvora i udaljenost igle od kolektora), i ambijentalnih uslova (temperatura, pritisak i vlažnost vazduha). Polimeri koji se koriste za izradu elektrospinovanih vlakana mogu biti prirodnog ili sintetskog porekla, a mogu se koristiti i njihove međusobne kombinacije ili kombinacije sa neorganskim supstancama (Chuangchote i sar., 2009; Sun i sar., 2019). Elektrospinošana vlakana se u biomedicini mogu primeniti za imobilizaciju enzima, tretman rana i u tkivnom inženjerstvu, ali i kao nosači u sistemima za isporuku lekova namenjeni za oralnu, transdermalnu, okularnu, nazalnu, rektalnu i vaginalnu primenu (Kurakula i sar., 2020; Sun i sar., 2019).

Upravo zbog mogućnosti izrade veoma poroznih mreža vlakana sa velikim odnosom specifične površine i zapremine, ova vrsta nosača privukla je značajnu pažnju istraživača za primenu u različitim oblastima, a pre svega u farmaciji. U elektrospinošana vlakna sa navedenim karakteristikama mogu se inkorporirati različite lekovite supstance, od antibiotika i citostatika do proteina i molekula DNK, čime se postiže povećanje njihove bioraspoloživosti, kao i kontrolisano i ciljano otpuštanje (Mei i sar., 2016; Torres-Martínez i sar., 2018). S obzirom da je elektrospinošanje jednostavna tehnika smatra se opravdanom i ekonomičnom za izradu nosača tipa polimernih vlakana (Li i sar., 2021).

Izrada polimernih vlakana elektrospining tehnikom podrazumeva pripremu rastvora određenog polimera u odgovarajućem rastvaraču. Pripremljeni rastvor se pomoću igle pod dejstvom napona istiskuje u vidu mlaza uz isparavanje rastvarača. Formirana polimerna vlakna sakupljaju se na suprotno naelektrisanom kolektoru pri čemu formiraju porozni film (Slika 6).



Slika 6. Šematski prikaz procesa elektrospinninga: vertikalna (a) i horizontalna (b) orijentacija (Bhardwaj i Kundu, 2010)

Morfologija elektrospinninganih vlakana se može modifikovati promenom viskoziteta rastvora polimera, podešavanjem dielektrične konstante i površinskog napona rastvarača za polimere, promenom napona električnog polja, korigovanjem rastojanja između igle i kolektora, odabirom tipa kolektora, brzinom protoka rastvora polimera, kao i podešavanjem parametara sredine poput temperature i vlažnosti vazduha (Kishan i Cosgriff-Hernandez, 2017). Elektrospinningovana vlakna imaju široku primenu u mnogim oblastima: proizvodnji energije, u izradi zaštitne odeće, membrana, filtera i kompozitnih materijala i farmaciji (Huang i sar., 2003; Venugopal i Ramakrishna, 2005; Fang i sar., 2011; Rojas i sar., 2009).

Primenom elektrospinninganih nanovlakana mogu se postići različiti profili oslobađanja aktivne supstance i to: trenutno, kontinuirano, odloženo, oslobađanje kao reakcija na neki stimulans, višefazno i oslobađanje više aktivnih supstanci istovremeno (Li i sar., 2020).

Polimer PLA se dobija polimerizacijom monomera mlečne kiseline koja nastaje fermentacijom saharoze iz melase šećerne trske. Prisustvo dva hiralna centra u molekulu mlečne kiseline daju mogućnost za modifikaciju fizičko-hemijskih svojstava PLA (Lasprilla i sar., 2012). Mogućnost prilagođavanja mehaničkih, fizičkih, mikrostrukturnih, hemijskih i degradacionih svojstava za specifične primene je podstaklo opsežna istraživanja čiji je cilj korišćenje ovih materijala na inovativne načine. Postoji širok spektar mogućnosti za poboljšanje svojstava PLA, poput variranja hemijskog sastava (odnosa D/L izomera), načina prerade, dodavanja aditiva i plastifikatora unutar PLA matrice (Farah i sar., 2016; Murariu i Dubois, 2016). PLA pokazuje veoma dobre karakteristike poput biokompatibilnosti, biorazgradivosti (hidrolizom i enzimskom aktivnošću) i niske imunogenosti, i kao takav predstavlja jedan od osnovnih biomaterijala za brojne primene u medicini i farmaciji (Farah i sar., 2016; Raquez i sar. 2013; Tyler i sar. 2016). Zbog odlične biokompatibilnosti i

mehaničkih svojstava, PLA i njegovi kopolimeri koriste se u tkivnom inženjerstvu za obnavljanje funkcije oštećenih tkiva. Takođe, PLA nalazi veliku primenu u izradi različite vrste sistema za isporuku lekova poput nanočestica, liposoma, dendrimera i micela, u kojima se mogu inkapsulirati različite vrste lekova uključujući i citostatike. Formulacije koje sadrže PLA odobrene su od FDA (Lasprilla i sar., 2012; Tyler i sar., 2016).

U radu Assalia i saradnika (Assali i sar., 2018) reakcijom esterifikacije je izvršeno spajanje dva molekula poznatih lekova, deksametazona i diklofenaka, u jedno jedinjenje nakon čega je izvršena njihova inkapsulacija u nanočestice PLA sa efikasnošću od 66%. Oslobođanje leka praćeno je metodom dijalize u medijumu fosfatnog pufera pH vrednosti 7,4. Brzo oslobađanje (oko 28%) lekovite supstance ostvareno je u prvih nekoliko sati nakon čega je oslobađanje (oko 70%) bilo usporeno i produženo do 52 h. Brzezinski i saradnici (Brzeziński i sar., 2018) su pokazali da temperatura i pH vrednosti spoljašnjeg medijuma utiču na oslobađanje leka doksorubicina iz sintetisanih nanočestica PLA. Ubrzano oslobađanje leka nastupa usled smanjenja pH vrednosti sa 7,4 na 5 i povećanja temperature sa 25 na 37 °C, naročito u prvih 6 h. Kontrolisano i postepeno oslobađanje je moguće održavati narednih 72 h. Oslobođanje doksorubicina iz nanočestica izrađenih od PLA i smeše metalnih oksida odgovara matematičkom modelu nultog reda i produženo je za više od 252 h (Mhlanga i Ray, 2015). U radu Zonga i saradnika (Zong i sar., 2015) dokazana je efikasnost mukoadhezivnih elektrospinovanih nanovlakana dobijenih od smeše polimera poli(etilen oksid)/poli(laktid) sa cisplatinom za lokalnu hemoterapiju raka grlića materice kod miševa.

Zbog svojih osobina PLA je veoma popularan za izradu sistema za kontrolisanu isporuku leka primenom elektrospining tehnike za različite vrste farmakološki aktivnih supstanci. Studija koju su sprovedeli Cui i saradnici (Cui i sar., 2019) ispituje mogućnost korišćenja polimera PLA kao sistema za isporuku antimikrobnog agensa, doksiciklina, izrađenog jednostavnom elektrospining tehnikom. Kontrolisano i produženo oslobađanje se može postići podešavanjem samo sadržaja lekovite supstance u izrađenim polimernim vlaknima. Koncentracija od 10 do 20% doksiciklina je pokazala najbolji profil kontinuiranog i konstantnog oslobađanja leka iz PLA elektrospinovanih vlakana u toku dve nedelje. Prednost ovakvog sistema za isporuku lekova u lečenju rana je i njegova mogućnost upijanja eksudata što je naročito značajno kod lečenja rana koje vlaže. Ispitivanja su pokazala da PLA elektrospinovana nanovlakna koja sadrže 20% doksiciklina zapravo imaju najveću moć upijanja vode, mogu da upiju količinu vode koja je 12,4 - 17,3 puta veća od mase samih vlakana. Takođe, PLA vlakna dozvoljavaju prolaz vodene pare što omogućava „disanje“ rana

iako se ta sposobnost vlakana smanjuje sa porastom sadržaja leka u polimeru. MTT testom je pokazano da izostaje citotoksični efekat, najverovatnije zbog postepenog i dugotrajnog oslobađanja antimikrobnog agensa (oko 2 nedelje), dok su njegove antimikrobne aktivnosti bile očuvane i nakon dve nedelje što ukazuje na očuvanje fizičko-hemijske stabilnosti aktivnog molekula inkorporiranjem u ovaj tip nosača. *In vivo* testovima je potvrđena prednost u lečenju hroničnih rana kod pacova sa dijabetesom tip 1, u odnosu na konvencionalne preparate za lokalnu primenu.

U radu Srithepa i saradnika (Srithep i sar., 2021) ispitivan je uticaj odnosa D i L izomera PLA od kojih su izrađena nanovlakna na oslobađanje metronidazola. Oslobađanje metronidazola iz nanovlakna praćeno je u uslovima koji simuliraju pljuvačku (fosfatni pufer pH vrednosti 6,8) i pokazano je da se iz vlakana izrađenih od LPLA/DPLA u odnosu 50:50 (odnos L i D izomera u PLA), oslobađa 57% lekovite supstance u roku od 12 sati, a 85% u roku od 7 dana. Količina oslobađanja metronidazola iz čistih LPLA vlakana je 40% u roku od 12 sati i 58% u roku od 7 dana. Takođe je utvrđeno da je oslobađanje leka iz čistog DPLA znatno veće od onog iz čistog LPLA, uglavnom zato što je DPLA imao manji stepen kristalnosti od LPLA. Faza brzog oslobađanja aktivne supstance desila se u prvih 24 h da bi nakon toga profil oslobađanja bio linearan. Način oslobađanja najviše odgovara Higuchi matematičkom modelu gde je primarni mehanizam kontrolisanog otpuštanja iz elektrospinovanih vlakana PLA bio difuzija.

Takođe, ispitivan je uticaj sadržaja aktivne supstance i prečnika nanovlakana dobijenih elektrospining metodom na profil oslobađanja leka. Cui i saradnici (Cui i sar., 2006) su izradili nanovlakna DPLA prečnika 400 nm sa 2%, 5% i 8% paracetamola kao i nanovlakna različitog prečnika od 212 nm, 551 nm i 1,3 μ m sa 5% paracetamola. Svaki primer je pokazivao dvofazno oslobađanje, u početku brzo, a kasnije sporo ali konstantno oslobađanje leka tokom dve nedelje. Nanovlakna različitih prečnika sa 5% paracetamola su pokazala gotovo linearno oslobađanje leka tokom prve faze i to 80%, 50% i 80% iz nanovlakana prečnika 212 nm, 551 nm i 1,31 μ m, redom. S druge strane, sa porastom koncentracije leka u nanovlaknima prečnika približno 400 nm, postiže se oslobađanje i do 50% lekovite supstance u prvih 4 h. Ujednačeno i kontinuirano oslobađanje i do 16 h se postiže sa 2% paracetamola ali njegova farmakološka aktivnost postaje minimalna posle 14 dana. Elektrospinovana vlakna sa većim prečnikom omogućavaju duži period oslobađanja leka kinetikom nultog reda dok je veća koncentracija leka dispergovanog u polimeru dovela do značajnijeg brzog oslobađanja. Na osnovu ovoga se može zaključiti da unutrašnja struktura nanovlakana i koncentracija dispergovanog leka mogu uticati na profil oslobađanja.

Oslobađanje lekovite supstance iz nanovlakana PLA izrađenih iz rastvora i rastopa polimera pokazuje izvesne razlike. Praćeno je oslobađanje farmakološki aktivne supstance hloramfenikola u simuliranim fiziološkim uslovima (37°C, opseg pH vrednosti 7,2–7,4) pri čemu se uočava kašnjenje početka brzog oslobađanja od 1 h iz nanovlakana PLA izrađenih iz rastopa polimera. Sa promenom sastava medijuma i dodavanjem etanola postignuto je potpuno oslobađanje hloramfenikola za 7 h i 40 h iz nanovlakana PLA dobijenih iz rastvora polimera i rastopa polimera, redom. Oslobađanje leka najviše odgovara Higuchi-jevom matematičkom modelu oslobađanja supstanci. Sa smanjenjem prečnika nanovlakana i povećanjem sadržaja leka u polimeru uočava se veći procenat oslobođenog leka u prvoj brznoj fazi ali i oslobađanje leka većom brzinom (Valenti i sar., 2021).

U radu Liu-a i saradnika (Liu i sar., 2015) ispitan je efekat asimetričnih višeslojnih filmova izrađenih od nanovlakana PLA elektrospining metodom u kojima su inkorporirani antineoplastici oksaliplatin i ciklofosamid na pojavu recidiva hepatocelularnog karcinoma *in vitro* i *in vivo*. Slojevi filmova izrađeni od čistog PLA koji su služili kao barijera koja treba dodatno da uspori oslobađanje leka imali su značajnu ulogu u ovom procesu. Postavljanjem višeslojnih filmova kao nosača leka na mestu resekcije jetre sprečava se širenja leka u okolne organe i sistemska toksičnost.

PVP se dobija polimerizacijom monomera N-vinil piroolidona. Amfifilnost PVP potiče od prisustva dve različite grupe u strukturi, polarne laktamske grupe i nepolarnog metilenskog dela. PVP se koristi kako u konvencionalnim, tako i u savremenim sistemima za isporuku lekova zbog svoje rastvorljivosti, dostupnosti, mogućnosti formiranja filmova, sposobnosti kompleksiranja, solubilizacije, vezivanja, stabilizacije, suspendovanja i ugušnjavanja (Kurakula i Koteswara Rao, 2020). PVP je važan sintetički polimer koji ima dobra adheziona i kompleksaciona svojstva, nisku toksičnost, visoku hidrofilitnost, biodegradabilnost, biokompatibilnost i dobru rastvorljivost u vodi i različitim organskim rastvaračima (Chuangchote i sar., 2009). Zbog izuzetnih osobina PVP i jednostavnosti elektrospininga, elektrospinovala vlakna na bazi PVP se često koriste u izradi nosača za isporuku različitih aktivnih supstanci.

Formulacije sa brzorastvarajućim polimerima kakav je PVP dobijaju na značaju poslednjih godina. Naime, takve formulacije mogu se rastvoriti ili dezintegrisati u roku od nekoliko sekundi ili više minuta u kontaktu sa vlažnom površinom, što omogućava njihovu primenu bez tečnosti ili žvakanja. Brzo oslobađanje uslovljava i brz početak dejstva, a time se može povećati i bioraspoloživost inkorporiranih aktivnih supstanci. Ovakve formulacije

moгу biti naročito korisne kod nepokretnih pacijanata, starih i dece, u tretmanu upale grla i oralnih ulcera (Balusamy i sar., 2020).

Ultrafina PVP K30 vlakna izrađena su elektrospiningom sa ibuprofenom kao aktivnom supstancom. Rezultati fizičko-hemijskih ispitivanja su pokazali dobru kompatibilnost ibuprofena i polimera, kao i da je ibuprofen u vlaknima u amorfnom obliku. *In vitro* testom rastvaranja je pokazano da se vlakna rastvaraju u toku 10 s mehanizmom kontrolisanim rastvaranjem polimera (Yu i sar., 2009). Brzorastvarajuće membrane za dostavu lekova slabo rastvorljivih u vodi su pripremljene elektrospiningom, pri čemu je kao polimerni matriks korišćen PVP, a feruloil-oleil-glicerol kao model supstanca. Primenom PVP u koncentraciji od 5% (m/v) i napona od 14 kV, dobijena su uniformna, glatka vlakna prečnika 700-800 nm. Testom kvašenja je potvrđeno brzo rastvaranje ovih vlakana, pri čemu je prosečno vreme rastvaranja iznosilo $2 \pm 1,5$ s (Quan i sar., 2011). Elektrospinovana vlakna na bazi PVP su iskorišćena kao nosač za slabo rastvorljiv holekalciferol (vitamin D₃). Prečnik elektrospinovanih vlakana PVP sa holekalciferolom je iznosio 0,2-2,9 μm . Oslobođena količina holekalciferola u toku prvih 20 s iznosila je 82,1%, odnosno 51,9% iz vlakana u kojima je odnos leka i PVP bio 1:4, odnosno 1:2 (Li i sar., 2013).

Antibakterijska elektrospinovana nanovlakna za oralnu primenu izrađena su od PVP K90 polimera sa ekstraktom propolisa (5% m/v). Dobijena su glatka i uniformna vlakna, koja povećavaju rastvorljivost propolisa u vodi uz istovremeno smanjenje adhezije bakterija na glatke površine, čime povećavaju antibakterijsku aktivnost propolisa (Asawahame i sar., 2015). Razvijene su brzorastvarajuće formulacije elektrospinovanih PVP nanovlakana sa ornidazolom za tretman gingivitisa. Mehanička i mukoadhezivna ispitivanja su pokazala da je optimalna formulacija nanovlakana sa 15% PVP. Oslobođanje ornidazola iz formulacije sa elektrospinovanim PVP vlaknima je bilo efektivnije u odnosu na formulacije gela i rastvora sa ornidazolom, pri čemu je celokupna količina ornidazola oslobođena za 5 minuta (Tort i sar., 2019).

PVP K90 je zbog svoje biokompatibilnosti, netoksičnosti, hidrofилnosti i bioadhezivnosti iskorišćen kao nosač za izradu sublingvalnih brzooslobađajućih formulacija karvedilola. Izrađena vlakna su imala glatku, cilindričnu, umreženu strukturu, a prosečan prečnik iznosio je 745 ± 57 nm. Oslobođanje i permeabilnost leka su bili značajno veći u poređenju sa fizičkom smešom. Rezultati *in vitro* ispitivanja oslobađanja pokazuju da se čak 80% karvedilola oslobodi u toku 30 minuta, čemu doprinose amorfnost struktura leka u elektrospinovanim vlaknima, hidrofилnost PVP i velika površina vlakana (Li i sar., 2020).

Inkorporiranjem inkluzionog kompleksa resveratrola sa hidroksipropil- β -ciklodekstrinom u elektrospinovala PVP nanovlakna značajno je povećana rastvorljivost resveratrola. Pored toga, povećana je antioksidativna aktivnost resveratrola, verovatno kao posledica povećanja njegove rastvorljivosti u vodi. Takođe, povećana je i njegova penetracija kroz *stratum corneum* u dublje slojeve kože, a dokazan je i njegov antiinflamatorni efekat (smanjenje ekspresije inflamatornih proteina COX-2 i MMP-9 u keratinocitima) (Lin i sar., 2020).

Elektrospinovala nanovlakna na bazi poli(kaprolaktona) (PCL) i PVP u odnosu 70:30 su iskorišćena kao nosač za *trans*-anetol i ispitan je njegov uticaj na osteogenezu. Prečnik tako pripremljenih elektrospinovalih vlakana iznosio je 242 ± 36 nm. Dodatak *trans*-anetola nije uticao na debljinu vlakana, kao ni na svojstva bubrenja, adsorpciju proteina, degradaciju i biomineralizaciju vlakana. Postignuto je kontinuirano oslobađanje *trans*-anetola iz nanovlakana i pokazan je njegov efekat na diferencijaciju osteoblasta na ćelijskom i molekulskom nivou. Oslobađanje *trans*-anetola iz nanovlakna je praćeno 25 dana, nakon čega je oslobođeno 44,37%, 49,72%, odnosno 60,23% iz vlakana sa 5, 10 i 20 μ M *trans*-anetola, redom. Inicijalno brže oslobađanje *trans*-anetola usled erozije PVP praćeno je sporijim oslobađanjem po principu Fick-ove difuzije kod koje je brzina oslobađanja direktno proporcionalna koncentracionom gradijentu (Shadamarshan i sar., 2018).

Brzo oslobađanje slabo rastvorljivih aktivnih supstanci iz elektrospinovalih nanovlakana kao nosača je posebno važno, jer je rastvaranje slabo rastvorljivih supstanci veliki izazov za farmaceutske industriju.

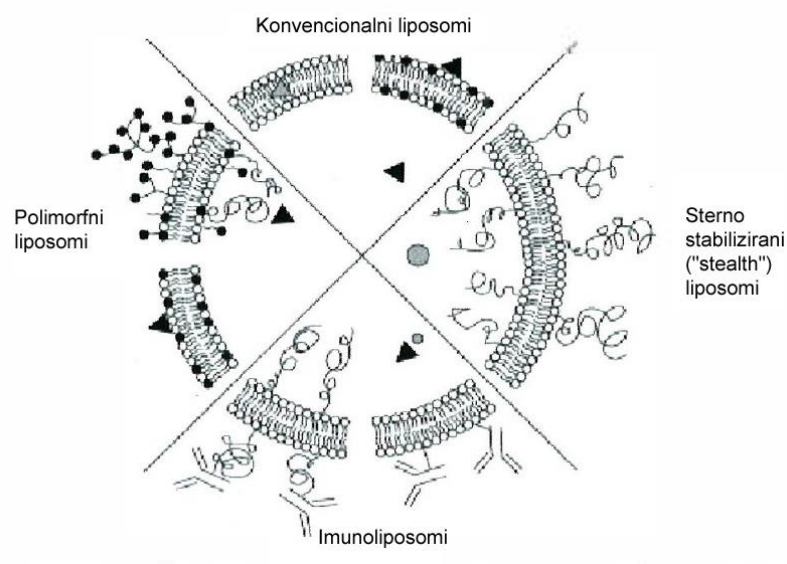
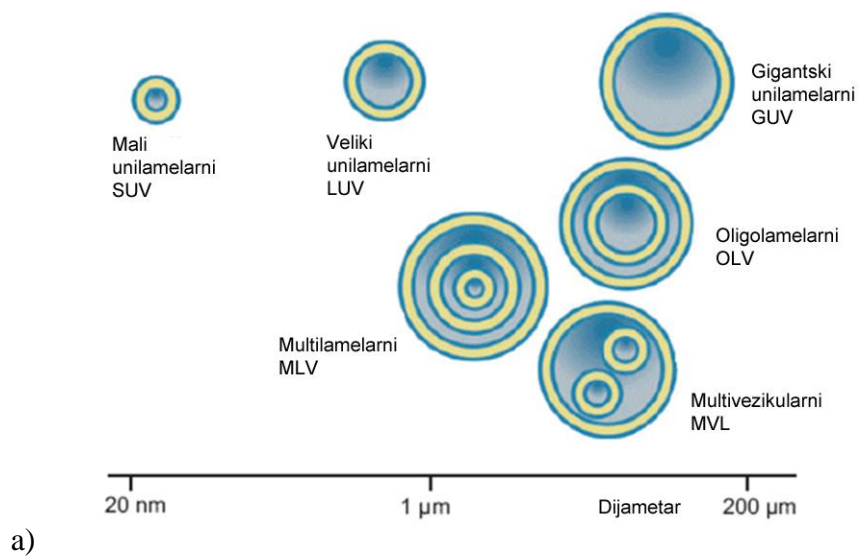
2.1.4. Liposomi

Liposomi kao nosači lekovitih supstanci jedni su od brojnih predstavnika kompleksnih lekova. Kod ovakvih struktura ceo kompleks, aktivna supstanca i nosač, se posmatra kao aktivna supstanca. Liposomi prenose aktivnu supstancu na mesto dejstva, oslobađaju je i tek onda aktivna supstanca ostvaruje terapijski efekat. Većina aktivnih supstanci koje nisu inkorporirane u nosače ostvaruju svoje dejstvo direktno, vezivanjem za receptore. Postoji veliki broj registrovanih lekova sa aktivnom supstancom inkapsuliranom u nosače tipa liposoma i za sada su najduže u kliničkoj upotrebi tako da su njihove osobine i karakteristike najviše proučavane. Neki od njih odobreni od strane FDA prikazani su u tabeli 3 (Zangabad i sar., 2018).

Tabela 3. Sistemi za isporuku liposomalnih lekova koji se koriste u kliničkoj praksi

Proizvod	Lek koji se oslobađa	Tretman
Doxil	Doksorubicin	Kapošijev sarkom, kancer dojke
Myocet	Doksorubicin	Metastaze kancera dojke
Lipodox	Doksorubicin	Kancer dojke, Kapošijev sarkom, kancer jajnika
Daunoxome	Daunorubicin	Kapošijev sarkom
Marqibo	Vinkristin	Akutna leukemija limfoblasta
Amphotec	Amfotericin B	Invazivne aspergiloze, ozbiljne gljivične infekcije
Depocyt	Citarabin	Neoplastični meningitis i limfomatozni meningitis
Estrasorb	Estrogen	Terapija u menopauzi
DepoDur	Morfin sulfat	Terapija bola
Visudyne	Verteporfin	PDT (fotodinamička terapija, fotohemoterapija) za starosnu makularnu degeneraciju
Epaxal	Inaktivirana vrsta hepatitis A virusa RG-SB	Vakcina za hepatitis A

Liposomi su sferne vezikule koje su sastavljene od jedne ili više dvoslojnih lipidnih membrana u čijem se jezgri i između membrana nalazi rastvarač (voda) u kome oni slobodno flotiraju. Razlikuju se po veličini, broju dvoslojeva, njihovoj rigidnosti i naelektrisanju. Lipidni dvoslojevi su najčešće izgrađeni od fosfolipida (fosfatidilholin, fosfatidilglicerol, fosfatidildietilamin, fosfatidilserin i sfingomijelin). Po potrebi fosfolipidi se mogu kombinovati sa holesterolom, katjonskim lipidima i/ili lizofosfatidilholinom. Cilj ovih kombinacija je da se postigne bolja stabilizacija dvoslojeva, pozitivno naelektrisanje ili osetljivost na stimuluse izrađenih liposoma (pH vrednosti sredine, prisustvo enzima, promena redoks potencijala, promena svetlosti) (Lee i Thompson, 2017). Produženo zadržavanje liposoma u sistemskej cirkulaciji može se postići modifikacijom površine liposoma tj. oblaganjem hidrofilnim polimerima (PVP, poli(vinilalkohol), poli(etilenglikol)) (Crommelin i sar., 2015.; Krajišnik i sar., 2019). S toga se liposomi mogu podeliti prema veličini, broju fosfolipidnih dvoslojeva (Slika 7a) i prema strukturnim svojstvima (Slika 7b).



Slika 7. Podela liposoma prema veličini i broju lipidnih dvoslojeva (a) i prema strukturnim svojstvima (b) (Vanić, 2012)

Karakteristike liposoma (fizičke, morfološke, biološke) zavise uglavnom od načina izrade liposoma i odabira lipida i bitno utiču na vreme zadržavanja u cirkulaciji, distribuciju u određena tkiva i brzinu oslobađanja lekovite supstance *in vivo*. Postoje različite metode za izradu liposoma: hidratacija, hidratacija-rehidratacija, smrzavanje-odmrzavanje, tretiranje ultrazvukom i homogenizacija pod visokim pritiskom. Navedene metode se baziraju na sušenju lipidnog sloja (uklanjanje organskog rastvarača), dispergovanju fosfolipida u polarnom rastvaraču (vodi/puferovanim rastvorima) i određivanju neinkorporirane komponente (lipofilne ili hidrofilne). Liposomi su visoko biokompatibilni, nisu toksični,

neimunogeni su i biodegradabilni. Ove karakteristike ih čine prihvatljivim za različite terapijske i dijagnostičke primene. Liposomi imaju značajnu perspektivu u terapiji:

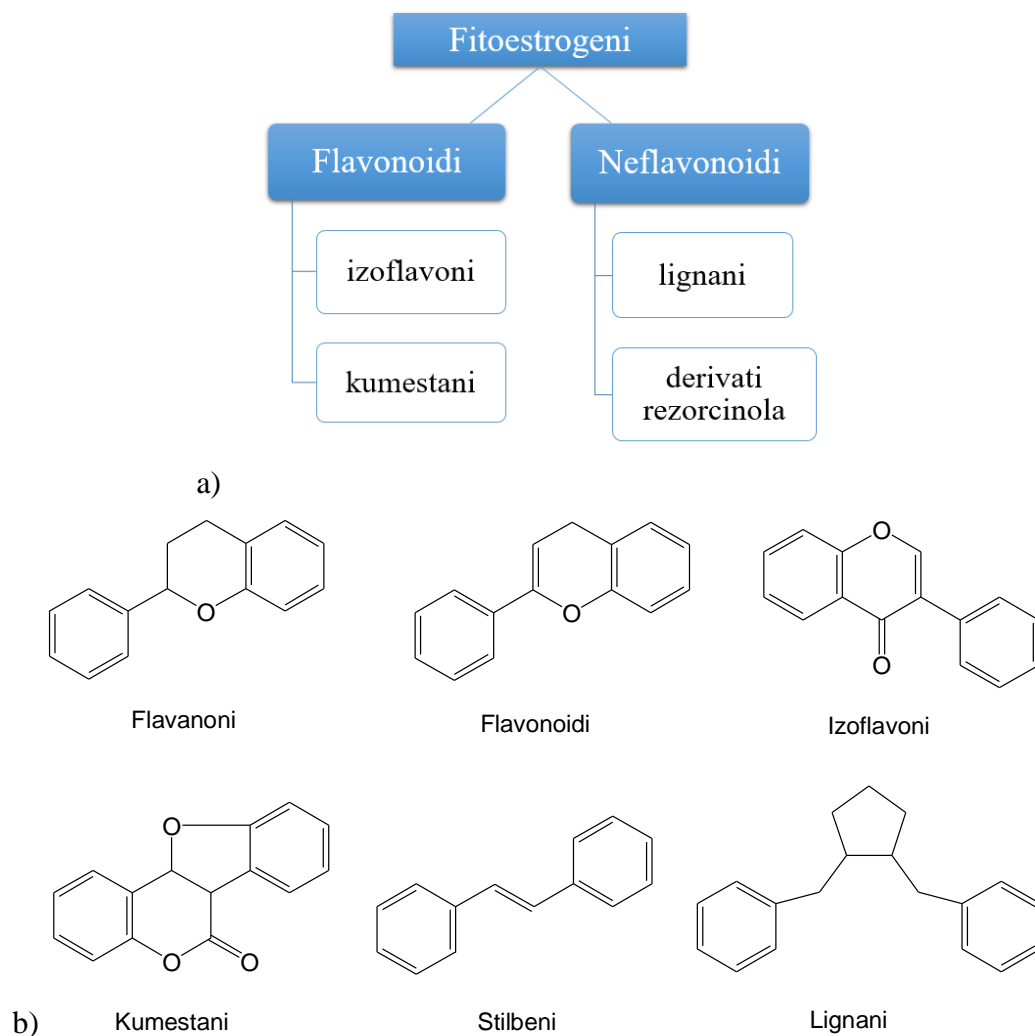
- štite nestabilne aktivne supstance od dejstva spoljnih uticaja,
- smanjuju toksičnost i neželjena dejstva aktivnoj supstanci,
- obezbeđuju ciljano i produženo dejstvo,
- povećavaju permeabilnost i dermalnu dostupnost lipofilnih aktivnih supstanci,
- obezbeđuju isporuku nižih doza čime se poboljšava odnos rizik/korist od aktivne supstance,
- povećavaju isporuku leka na ciljano mesto,
- obezbeđuju bolji i duži efekat,
- poseduju sposobnost promene karakteristika i leka i nosača.

Ograničavajući faktor kod liposomnih formulacija je njihova nestabilnost (fizička i hemijska). Jedna od metoda kojom se prevazilazi ovaj problem je liofilizacija liposoma koja produžava rok trajanja formulacije. Na tržištu postoje komercijalni liposomski lekovi koji su stabilizovani liofilizacijom. Od ovakvih preparata treba pomenuti LEP-ETU[®], AmBisome[®], Amphotec[®], Myocet[®] i Visudyne[®] koji sadrže kao aktivne supstance paklitaksel, amfotericin B, kompleks amfotericina B i holeseril sulfata, ciklofosamid i verteporfin (El-Nesr i sar., 2010).

2.2. FITOESTROGENI

Fitoestrogeni su prvi put otkriveni 1926. godine. Naziv potiče od reči *phyto* što znači biljka i *estrogen* što znači polni hormon (Tepavčević, 2013). Imaju sličnost u hemijskoj strukturi sa ženskim polnim hormonom 17 β -estradiolom (fenolni prsten koji je neophodan za vezivanje za receptor estrogena, prsten izoflavona koji oponaša prsten estrogena, malu molekulska masu i udaljenost između dve hidroksilne grupe koja je slična kao kod estradiola) (Yildiz, 2005). Mogu se vezivati za α i β estrogene receptore i na taj način ostvarivati mnoge zdravstvene benefite kod hormon zavisnih oboljenja (Vitale i sar., 2013). Prisutni su u preko 300 različitih biljnih vrsta, a najzastupljeniji su u mahunarkama (Dixon, 2004; Gašparević-Ivanek, 2003). Fitoestrogeni su difenolne, nesteroidne supstance biljnog porekla koje pripadaju prvoj grupi sekundarnih biljnih metabolita (Baber, 2010; Nelson, 2008).

Predstavljaju raznovrsnu grupu biljnih supstanci, čija je zajednička karakteristika da oni ili njihovi aktivni metaboliti ispoljavaju biološku aktivnost sličnu humanom estrogenu. Podela fitoestrogena zasniva se na njihovoj hemijskoj strukturi. Dele se na flavonoidne i neflavonoidne fitoestrogene. Flavonoidnoj grupi fitoestrogena pripadaju izoflavoni i kumestani, dok u neflavonoidne fitoestrogene spadaju lignani i derivati rezorcinola (Slika 8) (Cos i sar., 2003; Crozier i sar., 2006; Gašparević-Ivanek, 2003; Tepavčević, 2013).

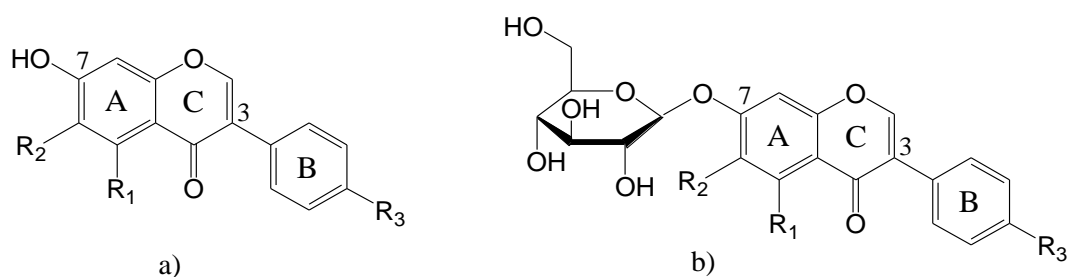


Slika 8. Fitoestrogeni: podela fitoestrogena (a); strukture pojedinih klasa fitoestrogena (b)

2.2.1. Izoflavoni

Najznačajnija grupa fitoestrogena su izoflavoni (Jacquot i sar., 2003; Miksicek, 1995). Ova jedinjenja imaju strukturu sličnu estrogenima što im omogućava da ispoljavaju estrogene i anti-estrogene efekte (Duncan i sar., 2003).

Izoflavoni su strukturno specifična grupa flavonoida kod kojih je prsten B vezan u položaju 3 prstena C (Slika 9a). Izoflavoni se, u aglikonskom obliku, međusobno razlikuju prema rasporedu supstituenata na izoflavonskom jezgru. Vezivanjem jednog molekula glukoze za hidroksilnu grupu u položaju 7, nastaje 7-*O*-glikozid izoflavona (Slika 9b). Ovo je najčešća grupa glikozida izoflavona u prirodi. Mogu postojati u obliku acetil-glikozida i malonil-glikozida (Tan, 2011; Tepavčević, 2013). Hidroksilne grupe iz šećernih jedinica povećavaju rastvorljivost izoflavona u vodi, dok metil grupe, izopentil jedinice i drugi slični supstituenti čine molekule izoflavona lipofilnim (Crozier i sar., 2006). U tabeli 4 prikazane su osnovne strukture aglikona i glikozida najzastupljenijih izoflavona u prirodi (Cos i sar., 2003; Tan, 2011; Tepavčević, 2013).



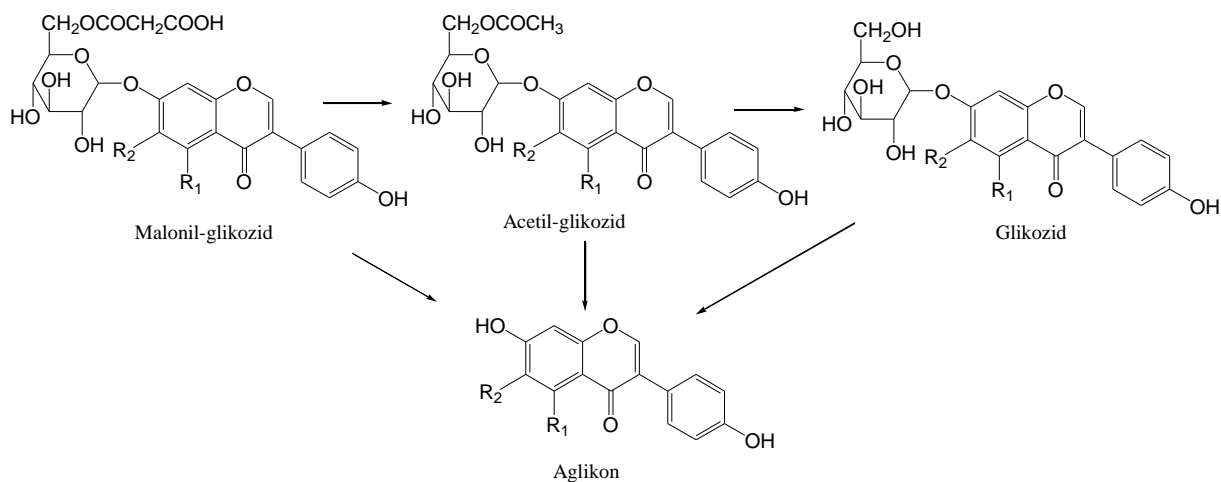
Slika 9. Osnovna struktura izoflavona: aglikona (a); glikozida (b)

Tabela 4. Najzastupljeniji izoflavoni (aglikoni i glikozidi) u prirodi

Aglikon	Glikozid	R ₁	R ₂	R ₃
Daidzein	Daidzin (daidzein-7- <i>O</i> -glikozid)	H	H	OH
Genistein	Genistin (genistein-7- <i>O</i> -glikozid)	OH	H	OH
Glicitein	Glicitin (glicitein-7- <i>O</i> -glikozid)	H	OCH ₃	OH
Formononetin	Sizotrin (formononetin-7- <i>O</i> -glikozid)	H	H	OCH ₃
Biohanin A	Ononin (biohanin A-7- <i>O</i> -glikozid)	OH	H	OCH ₃

Izoflavonski fitoestrogeni su ograničeno rasprostranjeni u biljnom svetu. Nalaze se isključivo u biljkama iz familije Fabaceae. Za svega nekoliko vrsta kao što su lucerka (*Medicago sativa* L.), boranija (*Vigna radiata* L.), kudžu koren (*Pueraria lobata*), psoralea (*Psoralea corylifolia* L.), crvena detelina (*Trifolium pratense* L.) i soja (*Glycine max* L.) je dokazano da su bogate izoflavonima (Dixon, 2004; Fawwaz, 2022; Shinde i sar. 2010; Tan, 2011; Tepavčević, 2013).

Acetil- i malonil-oblici izoflavona, kao i glikozidi, podložni su degradaciji u kiseloj i baznoj sredini, pri čemu nastaju odgovarajući aglikoni. Mogući načini razlaganja konjugata izoflavona prikazani su na slici 10 (Tan, 2011).



Slika 10. Najčešći mogući načini razlaganja konjugata izoflavona do aglikona

Postupak hidrolize glikozida može biti izveden pre, tokom ili nakon postupka ekstrakcije izoflavona. Za ove svrhe koristi se bazna i kisela hidroliza (Piskula, 2000; Rostagno i sar., 2009), a u poslednje vreme i enzimaska hidroliza (Pandit i sar., 2011; Rostagno i sar, 2009).

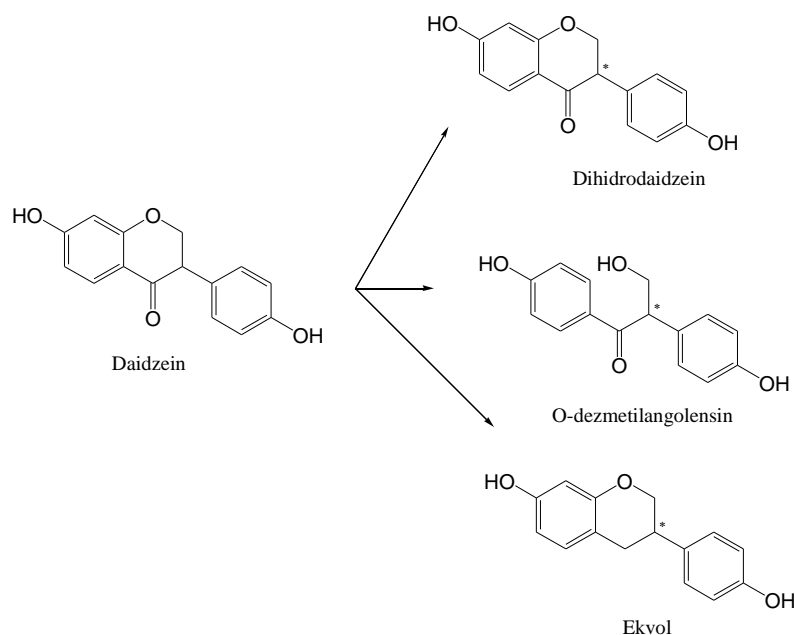
Izoflavoni tj. njihovi glikozidi uneti hranom se u organizmu mogu razložiti pod dejstvom enzima digestivnog trakta, što dovodi do stvaranja biološki aktivnih aglikona (Piskula, 2000).

Aglikoni izoflavona su relativno otporni na degradaciju u gastrointestinalnom traktu i uglavnom se apsorbuju iz debelog creva. Većina aglikona, na primer daidzein i genistein koji su i najviše proučavani se u digestivnom traktu prevode u metabolite. Ekvol je aktivan metabolit daidzeina i poseduje veću estrogenu aktivnost od daidzeina (Tan, 2011).

Ekvol se vezuje za oba oblika estrogenskih receptora ($ER\alpha$ i $ER\beta$), ima visoku antioksidativnu aktivnost i relativno je stabilan. Ispitivanja pokazuju da nemaju svi ljudi podjednaku sposobnost da produkuju ekvol (Dixon, 2004).

Pored ekvola, pod dejstvom bakterija crevne flore, daidzein daje i druge metabolite, kao što su 7-glukuronid (54%), 4'-glukuronid (25%), monosulfat (13%), slobodni aglikon (7%), sulfoglukuronid (0,9%), diglukuronid (0,4%) i disulfat (0,1%), kao i dihidrodaidzein i

O-desmetilangolensin. Strukture nekih značajnijih metabolita prikazane su na slici 11 (Dixon, 2004).

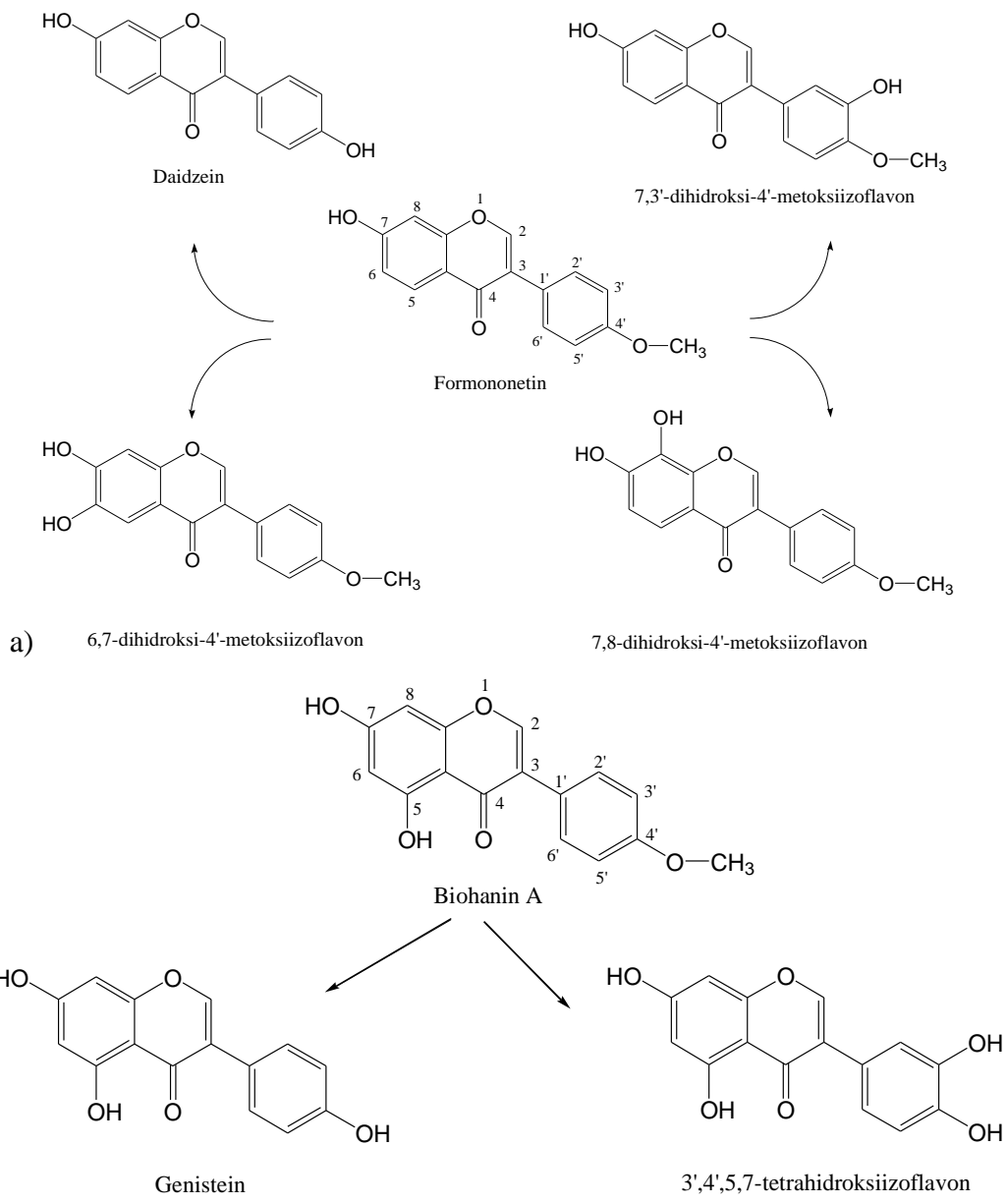


Slika 11. Strukture metabolita daidzeina

BHA i formononetin, 4'-*O*-metilovani derivati izoflavona, mogu se takođe metabolisati u ljudskoj jetri i crevima pod dejstvom odgovarajućih enzima do aktivnih metabolita, genisteina i daidzeina, redom i nekih drugih hidrosilovanih metabolita (Tolleson i sar., 2002) (Slika 12).

S obzirom da je BHA manje ispitivan od drugih izoflavona nedavno su Yin i saradnici u cilju boljeg razumevanja farmakološke aktivnosti, mehanizama delovanja, bezbednosti i toksičnosti BHA, primenom tačne hromatografije ultra visokih performansi u kombinaciji sa kvadrupolnom masenom spektrometrijom (UHPLC-QTOF-MS/MS) identifikovali 22 metabolita u mikrozomima jetre i 18 metabolita u crevnoj flori, nastalih razgradnjom BHA u *in vivo* i *in vitro* uslovima (Yin i sar., 2019).

Glavni procesi koji su uključeni u biotransformaciju BHA su mnogobrojni i obuhvataju oksidaciju, demetilovanje, hidrogenizaciju, unutrašnju hidrolizu i konjugaciju (npr. glukuronidaciju, sulfonovanje, vezivanje glukoze, metilovanje i acilovanje). Navedene transformacije dovode do nastanka velikog broja različitih metabolita, koji mogu biti odgovorni za mnogobrojne biološke aktivnosti koje ispoljava BHA (Yin i sar., 2019).

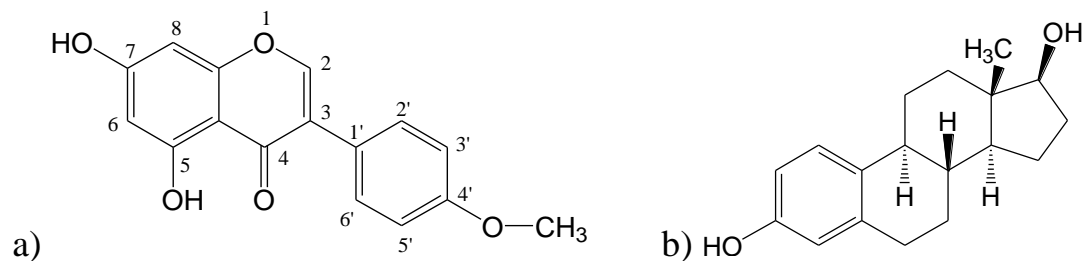


Slika 12. Strukture metabolita formononetina (a) i BHA (b)

2.2.2. Biohanin A

BHA je prirodni izoflavon i prema hemijskoj strukturi predstavlja 5,7-dihidroksi-4'-metoksiizoflavon. On je 4'-*O*-metilovani izoflavon ili 5,7-dihidroksi-3-(4-metoksifenil)-hromen-4-on molekulske formule $C_{16}H_{12}O_5$, čija je molekulska masa 284,267. BHA se smatra derivatom genisteina, tačnije on je 4'-metil estar genisteina i u crevima se metabolše do genisteina. Po konzistenciji je beli kristalni prašak sa tačkom topljenja 210-213 °C i ima hemijsku strukturu koja podseća na estrogen (Slika 13) tako da ispoljava agonističku i antagonističku interakciju sa estrogenim receptorima (ER) (Schrepfer i sar., 2006).

Istraživanja pokazuju da BHA ispoljava i druge biološke aktivnosti za koje su uglavnom odgovorne hidroksilne grupe u poziciji C5 i C7 i metoksi grupa u poziciji C4' (Hodnick i sar., 1986). Fizičko-hemijska svojstva BHA su data u tabeli 5.



Slika 13. Hemijske strukture BHA (a) i 17β-estradiol (b)

Tabela 5. Fizičko-hemijska svojstva BHA

CAS broj	491-80-5
IUPAC-ov naziv	5,7-dihidroksi-3-(4-metoksifenil) hromen-4-on
Sinonimi	4'-metilgenistein; genistein 4-metiletar; biohanin A; 5,7-dihidroksi-4'-metoksiizoflavon
Molekulska formula	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
Molekulska masa	284,267 g/mol
Izgled	beo kristalni prah
Rastvorljivost	etanol: 1mg/cm ³ ; DMSO i DMF: 30 mg/cm ³ ; voda: 0,0583 mg/cm ³
Vodonična veza broj akceptora	5
Vodonična veza broj donora	2
Tačka topljenja	210-213 °C
Stabilnost	≥2 godine na -20 °C
λ _{max}	262 nm
Koeficijent permeabilnosti	11,11 ± 0.51 × 10 ⁻⁶ cm/s kroz monosloj Caco-2 ćelija

BHA se uglavnom nalazi u mahunarkama, a crvena detelina (*Trifolium pratense* L.) je najbogatiji izvor ovog izoflavona. Pokazano je da se u ekstraktu crvene deteline nalazi 60% BHA (Beck i sar., 2005; Messina i sar., 2006). Izoflavonski suplement, Promensil®, dobijen iz crvene deteline je komercijalno dostupan za ublažavanje valunga kod žena u postmenopauzi (Coon i sar., 2007; Gartoulla i sar., 2014; Ghazanfarpour i sar., 2016). BHA

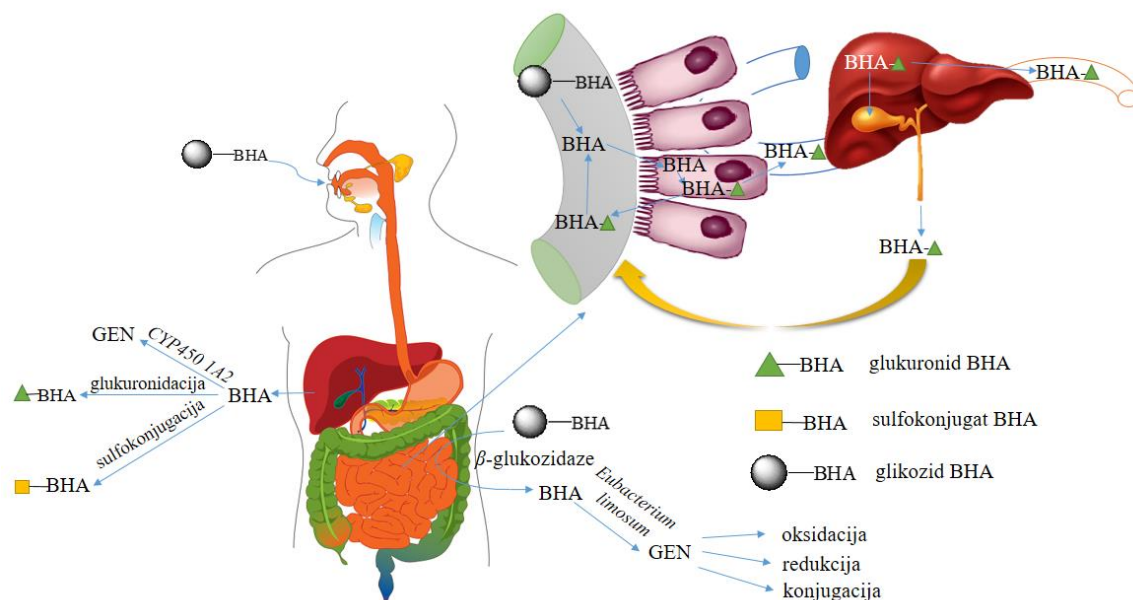
je takođe dosta zastupljen u leblebiji (*Cicer arietinum* L.), soji (*Glycine max* (L.) Merr.), kikirikiju (*Arachis hypogaea* L.), kupusu (*Brassica oleracea* L.), lucerki (*Medicago sativa* L.) i mnogim drugim biljkama (Jalaludeen i sar., 2015). Prvi put je izolovan 1945. godine iz leblebije (*C. arietinum* L.) (Siddiqui i sar., 1976).

Za ekstrakciju BHA, primenjuju se konvencionalne (Soxhlet ekstrakcija i ekstrakcija uz mešanje) i savremene metode (ultrazvučna ekstrakcija, mikrotalasna, tečna ekstrakcija pod sniženim pritiskom i ekstrakcija superkritičnim fluidima) (Raheja i sar., 2018). Savremenim metodama ekstrakcije se postiže kraće vreme ekstrakcije, manji utrošak rastvarača, visok kvantitativni i neizmenjeni profil izoflavona pa su pogodnije za izolaciju (Rostagno i sar., 2007; Rostagno i sar. 2009; Vacek i sar. 2008).

Nakon oralne primene BHA u obliku glikozida dolazi do izvesnih promena u strukturi ovog jedinjenja. Molekul BHA najpre podleže brzom hidrolizi pod uticajem bakterijskih β -glukozidaza i oslobađa se aglikona da bi nakon toga ovaj molekul bio podvrgnut različitim metaboličkim promenama. U reakciji 4'-*O*-demetilovanja učestvuju anaerobne bakterije *Eubacterium limosum* i prevode određeni procenat BHA u njegov aktivni metabolit genistein (Tolleson i sar., 2002). Genistein dalje može da se redukuje i oksiduje ali i konjuguje do sulfata i glukuronida (Yang i sar., 2012). Izvesni procenat neizmenjenih molekula BHA resorpcijom iz tankog creva putem vene porte ulazi u jetru gde 4'-*O*-demetilovanje vrše mikrozomalni enzimi jetre i to najviše P450 1A2 zatim 2E1, 2C9*1, 2C19 i 2D6*1 (Tolleson i sar., 2002). Ovde takođe dolazi i do formiranja glukuronida i sulfata pod uticajem glukuroniltransferaze i sulfotransferaze. Veći broj rezultata ukazuje na to da BHA podleže enterohepatičkoj recirkulaciji. Nastali konjugati iz jetre se jednim delom izlučuju putem žuči u lumen creva. Tu se ponovo mogu izložiti mikrobnim transformacijama i daljoj hidrolizi do aglikona nakon čega se ponovo slobodni BHA resorbuje i stiže u jetru. U zidu creva takođe nastaju konjugati, glukuronidi, koji se nakon transportovanja u jetru izlučuju putem žuči u duodenum i stižu u kolon gde se metabolišu do aglikona (Moon i sar., 2006, Zeng i sar., 2016). U urinu je identifikovano sedam različitih metabolita BHA za čiji su nastanak odgovorne reakcije oksidacije, demetilovanja, redukcije, hidrolize, glukuronidacije, sulfokonjugacije, metilovanja i acetilovanja (Heinonen i sar., 2004). Dodatno *in vivo* i *in vitro* istraživanja pokazuju da se u 23 različita metabolička puta (I i II faza metabolizma) mogu formirati više od 43 različitih metabolita od kojih neki poseduju i određene biološke aktivnosti (Yin i sar., 2019). Takođe, BHA može da inhibira enzime CYP1A2 i enzime CYP3A4/5, i na taj način utiče na metabolizam lekova ili drugih flavonoida primenjenih u kombinaciji sa BHA. Uglavnom, zbog visokog klirensa i velikog volumena distribucije

procenat slobodnog BHA u krvi je nizak (oko 1%). U krvnoj plazmi dominiraju glukuronidi (oko 75%) i sulfati (oko 24%), dok se različiti metaboliti mogu izlučiti i putem urina, fecesa i žuči.

Na slici 14 prikazana je apsorpcija i metabolički putevi BHA u ljudskom organizmu.



Slika 14. Apsorpcija i metabolički putevi BHA u ljudskom organizmu

2.2.2.1. Biološke aktivnosti biohanina A

Većinu bioloških aktivnosti izoflavoni ostvaruju vezivanjem za estrogene receptore, što je posledica njihove strukturne sličnosti sa humanim estrogenima. Pored toga, izoflavoni mogu ispoljiti i biološke aktivnosti nezavisno od njihovih interakcija sa estrogenim receptorima i to:

- inhibicijom sinteze i aktivnosti određenih enzima uključenih u estrogene metabolizam, čime utiču i na biološku aktivnost endogenih estrogena i testosterona;
- inhibicijom aktivnosti tirozin-kinaze, enzima koji ima važnu ulogu u brojnim signalnim putevima, tako da mogu uticati na ćelijsku proliferaciju;
- antioksidativnom aktivnošću, čime povoljno utiču na zaštitu organizma od oksidativnog stresa (Tepavčević, 2013).

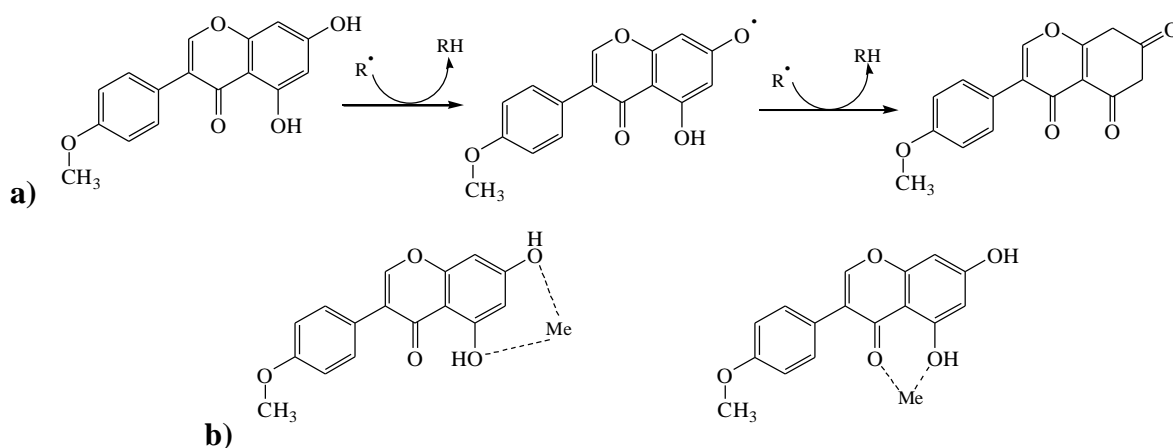
BHA je pored toga što ublažava simptome menopauze, u poslednje vreme postao predmet istraživanja velikog broja istraživača pre svega kao agensa sa potencijalnom primenom u lečenju kancera, neurodegenerativnih bolesti, dijabetesa, ublažavanja simptoma menopauze i lečenja osteoartritisa. Uprkos ograničenjima poput niske rastvorljivosti u vodi i niske

bioraspoloživosti, BHA je pokazao višestruke biološke efekte što je pokazano *in vivo* istraživanjima. S obzirom na značajne koristi BHA po zdravlje ljudi važno je istaći i opisati pojedine aktivnosti ovog izoflavona.

2.2.2.2. Antioksidativna aktivnost biohanina A

Povećanje oksidativnog stresa i peroksidacija lipida su glavni uzroci određenog broja bolesti. Izoflavoni, uključujući i BHA, imaju sposobnost uklanjanja slobodnih radikala i smanjenje oksidativnog stresa. Prvu liniju antioksidanasa u odbrani protiv reaktivnih kiseoničnih vrsta čine enzimi poput superoksid dismutaze i katalaze. BHA sprečava oksidativni stres povećanjem nivoa ovih antioksidativnih enzima. Antioksidativni efekat BHA i drugih izoflavona je dokazan u različitim studijama (Rüfer i sar., 2006; Sadri i sar., 2017; Wang i sar., 2015). Sadri i saradnici istraživali su antioksidativni efekat BHA (15 mg/kg, oralno) kod pacova sa izazvanim dijabetesom i pokazali da smanjuje oksidativni stres smanjenjem nivoa malondialdehida i povećanjem nivoa katalaze i superoksid dismutaze (Sadri i sar., 2017).

BHA može delovati i kao hvatač slobodnih radikala. Visoko reaktivne hidroksilne grupe koje sadrži BHA direktno reaguju sa slobodnim radikalima pri čemu nastaju manje reaktivni i stabilniji fenolni radikali (Slika 15a) (Hertzog i sar. 2012).



Slika 15. BHA kao hvatač reaktivnih kiseoničnih vrsta (R^\bullet) (a); mesta vezivanja za metale (b), (Me predstavlja metalni jon)

Još jedan način antioksidativnog delovanja BHA je stvaranje helatnih kompleksa sa jonima metala (Slika 15b). Slobodni joni metala povećavaju formiranje reaktivnih

kiseoničnih vrsta redukujući vodonik peroksid pri čemu nastaje visoko reaktivni hidroksilni radikal. Stvaranjem helatnih kompleksa sa jonima metala izoflavoni sprečavaju stvaranje tih radikala (Nijveldt i sar., 2001). Izoflavoni mogu ostvariti interakciju i sa drugim fiziološkim antioksidansima kao što su vitamin C ili vitamin E i tako pojačati svoje antioksidativno delovanje (Kumar i sar., 2013).

2.2.2.3. Uticaj biohanina A na dijabetes melitus tip 2

Dijabetes melitus (*diabetes mellitus*) je hronična metabolička bolest sa visokom prevalencom mortaliteta širom sveta. Izazvan je apsolutnim ili relativnim nedostatkom insulina i smanjenom aktivnošću insulina, što dovodi do hiperglikemije i abnormalnosti u metabolizmu ugljenih hidrata, proteina i masti (Harini i sar., 2012). Postoje dva osnovna tipa dijabetes melitusa. Kod diabetes melitusa tip 1 dolazi do potpunog, uglavnom autoimunskog, uništavanja beta ćelija i apsolutnog nedostatka insulina gde je za preživljavanje pacijenata neophodna primena insulina (Alberti i Zimmet, 1998). Dijabetes melitus tip 2 se definiše kao hronični metabolički poremećaj koga karakteriše povećanje koncentracije glukoze u krvi usled nedovoljne sinteze insulina kome uglavnom prethodi pojava rezistencije na insulin. Za lečenje dijabetes melitus tip 2 koriste se oralni antihiperglikemijski lekovi, sa različitim mehanizmima delovanja, kao što su sulfonilurea, bigvanidini (metformin), inhibitori alfa-glukozidaze, meglitinid, inhibitori dipeptidilpeptidaze 4 (DPP-4) i tiazolidindioni (rosiglitazon i pioglitazon) (Wang i sar., 2014). Zbog komplikacija koje mogu nastupiti i neželjenih dejstava usled dugotrajne upotrebe antidijabetičkih lekova (Ghadimi i sar., 2016) ispitivanja su usmerena na neke biljne vrste i njihove metabolite (flavonoidi, izoflavonoidi, flavanoni, halkoni, kumestani, stilbeni i lignani) koji predstavljaju obećavajuće agense za kontrolu dijabetes melitus tip 2 (Wysowski i sar. 2003). BHA je u nekoliko studija ispitivan kao potencijalni antidijabetik. Istraživanja pokazuju da bi mogući antidijabetički mehanizmi BHA mogli biti: stimulacija sekrecije insulina iz beta ćelija pankreasnih ostrvca, efekat sličan insulinu, povećanje preuzimanja glukoze u periferna tkiva i regulacija ključnih enzima u metabolizmu ugljenih hidrata. Međutim tačan mehanizam dejstva BHA nije u potpunosti razjašnjen i predstavlja izazov za dalja istraživanja (Ghadimi i sar., 2016).

2.2.2.4. Uticaj biohanina A na tumorske bolesti

Signalni putevi koji regulišu osnovne ćelijske procese (rast, proliferaciju, diferencijaciju, preživljavanje i apoptozu) su veoma složeni i uključuju veliki broj enzima, proteina i drugih signalnih molekula. Bilo kakav poremećaj u navedenim signalnim putevima, može dovesti do kancerogeneze. Stoga je za uspešno lečenje tumora neophodno pronaći agense sa što širim opsegom delovanja na različita ciljna mesta i u različitim putevima apoptoze.

Antitumorno delovanje izoflavona samim tim i BHA uključuje različite mehanizme. BHA se ponaša kao selektivni modulator estrogenih receptora, indukuje apoptozu, utiče na gensku ekspresiju i različite enzimske sisteme na pozitivan način, što pomaže u smanjenju povećane estrogene stimulacije u hormonski zavisnim tkivima. Specifični steroidni enzimski sistemi na koje utiču izoflavoni uključuju aromataze, dehidrogenaze, sulfotransferaze i reduktaze (Ying i sar., 2002).

Cisplatin je citostatik koji pokazuje blagu mijelotoksičnost i izuzetno ozbiljnu nefrotoksičnost kod primene, zbog čega je ograničena njegova upotreba. Najveće oštećenje pokazuje u distalnim i proksimalnim tubulama, i dovodi do izraženog smanjenja telesne težine. Oksidativni stres koji izazivaju molekuli cisplatine pokreću nuklearni faktor kapa beta (NF- κ B) signalni put i povećavaju produkciju faktora nekroze tumora-alfa (TNF- α). Međutim, istovremena primena BHA sa cisplatinom je značajno umanjila gubitak telesne težine, aktivaciju kaspaze i tumor supresornog proteina p53. Nefroprotektivni efekat BHA se pripisuje njegovoj sposobnosti da inhibira aktiviranje NF- κ B signalnog puta, transkripciju nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze, količinu TNF- α i aktivaciju gena inducibilne azot-oksida sintaze. Na ovaj način, kombinovanom primenom cisplatina i BHA se sprečava akutna nefrotoksičnost cisplatina (Suliman i sar., 2018).

Karcinom štitne žlezde se javlja kod žena čak tri puta češće nego kod muškaraca, što je povezano sa uticajem 17β -estradiola u razvoju ove bolesti. Kod ljudi koji su u svojoj ishrani koristili namirnice bogate fitoestrogenima, značajno je bio smanjen rizik od karcinoma štitne žlezde (Somjen i sar., 2011). Takođe, eksprimiranje enzima aromataze u kanceroznom i nekanceroznom tkivu štitne žlezde dodatno može omogućiti konverziju androgena u estrogene. Ćelije određenih vrsta ćelijskih linija karcinoma štitne žlezde pokazuju izvestan rast kao odgovor na 17β -estradiol. Istraživanja su pokazala da aktivacija ER- α receptora doprinosi povećanju neoplastičnih transformacija ćelija štitne žlezde kod žena. Izoflavoni BHA, genistein i daidzein u koncentracijama $> 20 \mu\text{mol/l}$ mogu inhibirati

rast ćelija različitih ćelijskih linija karcinoma štitne žlezde. Smatra se da u proliferaciji tumorskih ćelija igra određenu ulogu i aktivacija mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) signalnog puta i povećana ekspresija ciklin D1 preko GRP30 receptora (Somjen i sar., 2011).

Osteosarkom je najčešći maligni tumor kostiju, a obično nastaje u dugim kostima. Uglavnom pogađa mlađu populaciju, ali se može javiti i kod starijih ljudi. Osim hirurškog tretmana u lečenju ovog kancera koriste se doksorubicin, metotreksat, cisplatin. U poslednje vreme razvija se sve veća rezistencija na hemoterapiju sa sve većom incidencom smrtnih slučajeva (Hsu i sar., 2018). Smatra se da su mutacije na p53 genu najzaslužnije za razvoj ovog kancera. Najnoviji rezultati istraživanja pokazuju da BHA značajno inhibira rast i indukuje apoptozu u humanim ćelijama osteosarkoma *in vitro*. Glavni mehanizam delovanja BHA jeste aktivacija intrinzičnog mitohondrijalnog puta apoptoze u kome dolazi do oslobađanja citohroma c i apaf-1 i posledične aktivacije kaspaze 3 i 9. Apoptoza koju izaziva BHA u ćelijama osteosarkoma nije zavisna od p53 signalnog puta. Takođe, pokazano je da su Bcl-2 i Bcl-X_L inhibirani nakon lečenja BHA, dok su Bax, Bax/Bcl-2 i Bax/Bcl-X_L odnosi povećani (Hsu i sar., 2018).

Stanovnici Istočne Azije u poređenju sa stanovnicima zapadnog sveta imaju manju stopu kancera prostate koja je takođe povezana sa većom količinom konzumiranja izoflavona putem hrane. Istraživanja su vršena na humanim ćelijskim linijama karcinoma prostate i to na hormon zavisnim LNCaP ćelijama i hormon nezavisnim DU145 ćelijama. BHA je značajno povećao indukciju apoptoze putem TRAIL (ligand koji inducira apoptozu vezan za TNF) signalnog puta i to kod obe ispitivane ćelijske linije tumora prostate, jer ove tumorske ćelije pokazuju rezistenciju na TRAIL-posredovanu citotoksičnost. On značajno povećava ekspresiju TRAIL-R2 receptora na površini LNCaP ćelija. Takođe, u ćelijama tumora prostate LNCaP postoji konstantna aktivacija NF-kB puta, za koji se smatra da posreduje u rezistenciji LNCaP ćelija na TRAIL posredovanu apoptozu. BHA takođe inhibicijom aktivacije NF-kB puta povećava apoptotski efekat (Szliszka i sar., 2013). Istraživanjima je pokazano da prirodni izoflavoni, uključujući i BHA, genistein i apigenin imaju izuzetan apoptotski efekat u PC-3 i LNCaP ćelijama raka prostate kroz regulaciju P21 i supresiju serin/treonin-protein kinaza (PLK-1) puteva koji su ključni regulatori ćelijskog ciklusa (Seo i sar., 2011).

Akutna insuficijencija jetre (fulminantni hepatitis) može biti izazvana različitim agensima kao što su alkohol, hemikalije i virusi. Lipopolisaharid (LPS) i D-galaktozamin (GalN) su agensi koji dovode do veoma brzog i ozbiljnog oštećenja hepatocita, pa samim tim

do nekroze i inflamacije tkiva jetre, što je praćeno indukcijom inflamatornih citokina TNF- α , interleukina 1 β (IL-1 β) i interleukina 6 (IL-6) pri čemu se smatra da je IL-1 β u najvećoj mjeri odgovoran za insuficijenciju jetre. BHA inhibira LPS/GalN-indukovanu proizvodnju TNF- α i IL-1 β u zavisnosti od doze (Liu i sar., 2016). Takođe, rezultati pokazuju da BHA indukuje translokaciju Nrf2 (nuklearni faktor 2 povezan sa nuklearnim faktorom eritroidom 2) u jedro i aktivira ovaj antioksidativni i antiinflamatorni signalni put. Na ovaj način BHA sprečava oksidativni stres izazavan LPS/GalN. Nrf se inače nalazi u neaktivnom stanju u citoplazmi ćelije. Njegovom aktivacijom se inhibira NF-kB signalni put, a samim tim i dalji proces inflamacije, tj. oslobađanje proinflamatornih citokina. Rezultati pokazuju da BHA inhibira interakciju između TXNIP (proteina koji deluje na tioredoksin) i NLRP3 (domen koji vezuje nukleotide) (Liu i sar., 2016).

Kod ljudi, gliomi čine većinu malignih tumora sa visokim procentom smrtnosti. Nastaju iz glija ćelija parenhima mozga. Glioblastomi imaju najviši stepen maligniteta i invazivnosti i visoku rezistenciju na hemoterapeutike. Jedan od problema je nedostatak specifičnih lekova kao i nemogućnost postizanja efikasne koncentracije leka na ciljnom mestu delovanja (Gandhari i sar., 2010). Kod glioblastoma, angiogeneza je posredovana preko ekspresije vaskularnog endotelnog faktora rasta tako da je on ključna meta za terapiju glioma. Istraživan je anti-angiogeni efekat BHA kod pacova na tumorskim ćelijama mozga i zaključeno da BHA inhibira angiogenezu inhibiranjem faktora rasta vaskularnog endotela i ERK/AKT/276 mTOR pro-angiogenog proteina (Raheja i sar., 2018).

Različite studije takođe su istraživale uticaj BHA na razvoj i progresiju karcinoma dojke. Izlaganje estrogenu je glavni faktor u razvoju raka dojke koji je pokazao genotoksične efekte u MCF-7 ćelijama karcinoma dojke. Aromataza je enzim uključen u sintezi estrogena i inhibicija njegove aktivnosti je koristan pristup u suzbijanju rasta karcinoma dojke. BHA je pokazao inhibitorni efekat na aktivnost aromataze u MCF-7 ćelijama i regulaciju gena promotera odgovornih za ekspresiju aromataze. Takođe kombinacija BHA sa kvercetinom i epigalokatehin-3-galatom dovodi do smanjenja veličine tumora dojke (Raheja i sar., 2018).

2.2.2.5. Antiinflamatorni i antialergijski efekat biohanina A

Inflamatorni proces je povezan sa povećanom produkcijom pro-inflamatornih medijatora poput citokina koji povećavaju ekspresiju inducibilne sintaze azot-oksida (iNOSs). Aktivacija nuklearnog faktora-kB u NF-kB signalnom putu igra ključnu ulogu u

oslobađanju citokina uključujući TNF- α i IL-6. Aktivacija NF-kB i I κ B kinaze dovodi do inhibicije ekspresije iNOS. BHA inhibira indukciju NF-kB i I κ B kinaze indukovane lipopolisaharidom, što rezultira inhibicijom proizvodnje azot-oksida i iNOS sintaze koji ukazuje na njegov antiinflamatorni potencijal (Kole i sar., 2011). Takođe, signalni put p38 mitogenom aktivirane protein kinaze (p38 MAPK) reguliše produkciju lipopolisaharidom indukovanih proinflamatornih citokina kao što je TNF- α . Produkcija IL-1 β i IL-6 kao i njihova fosforilacija su takođe uključeni u razvoju inflamacije. Pro-inflamatorni odgovori izazvani lipopolisaharidima i aktivacija MAPK puta u BV2 ćelijama mikroglije takođe su inhibirani BHA (Wu i sar., 2015). MAPK fosforilacija je takođe uključena u proces alergijske reakcije koji rezultira oslobađanjem proinflamatornih medijatora kao što su citokini, proizvodnjom reaktivnih kiseoničnih vrsta i degranulacijom mastocita. Ispitivanjem antialergijskog efekta BHA je pokazano da on inhibira IgE-posredovane alergijske reakcije ublažavanjem proizvodnje reaktivnih vrsta kiseonika i oslobađanje β -heksozaminidaze iz ćelija RBL-2H3 (pacovska bazofila leukemijska ćelijska linija) (Chung i sar., 2013).

RAR srodni orfan receptori (ROR- α i - γ) su transkripcioni faktori, transduktori signala i aktivatori transkripcije 3 (STAT3) i presudni su u regulaciji transkripcije gena i proizvodnji proinflamatornog IL-17, citokina koji dalje igra važnu ulogu u zapaljenskim reakcijama i aktivaciji imuniteta. Takahashi i sar. (Takahashi i sar., 2017) pokazali su da BHA aktivira ROR- α zavisnu IL-17 transkripciju kroz pojačanje STAT3 fosforilacije. Takođe stabilizuje interakcije između ROR α/γ i koaktivatora 1 nuklearnog receptora koji je takođe poznat i kao koaktivator steroidnog receptora i komunicira sa ROR- γ radi poboljšanja ROR- γ -posredovane transkripcijske aktivacije. Drugi mehanizam koji je predložen za antiinflamatorno dejstvo BHA je preko PPAR γ receptora (receptori aktivirani proliferatorom peroksizoma). PPAR γ je uključen u regulaciji inflamacije, osetljivosti na insulin, skladištenje masnih kiselina i metabolizam glukoze. Različita prirodna jedinjenja poput BHA, genisteina i resveratrola vezivanjem za PPAR γ receptore dovode do njihove aktivacije. Pokazano je takođe, da BHA inaktivira NF-kB signalni put koji zavisi od PPAR γ (Qiu i sar., 2012).

2.2.2.6. Uticaj biohanina A na osteoartritis

Rezultati istraživanja pokazuju da upotreba agenasa koji inhibiraju transdukciju signala TNF- α i IL-1 β zapravo inhibiraju signalne puteve NF-kB i mogu biti potencijalna terapijska strategija u cilju smanjenja degradacije zglobne hrskavice pomoću matriks

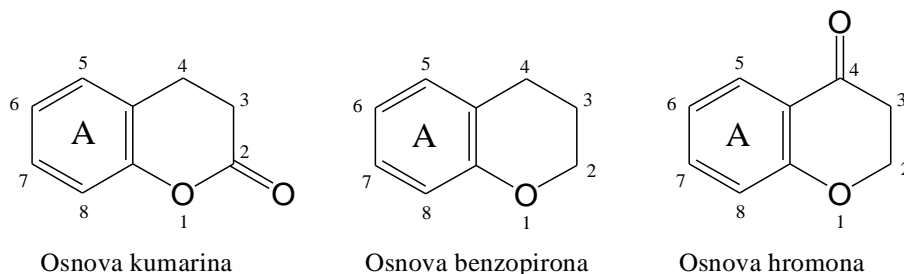
metaloproteinaza (MMPs) kod artritisa (Roman-Blas i Jimenez., 2006). Glukokortikoidi indukuju ekspresiju I κ B kinaza, uzrokujući povećano zadržavanje nuklearnog faktora-kB u citosolu. Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL), kao što su aspirin, ibuprofen i sulindak, značajno inhibiraju IKK aktivnost, sprečavajući I κ B fosforilaciju, čime se blokira aktivacija NF-kB puta. Nove terapijske strategije usmerene na specifičnu inhibiciju ključnih elemenata u aktivaciji NF-kB puta su u razvoju, pogotovo poslednjih nekoliko godina, što stvara veliko očekivanje u pogledu njihovih efekata na tretman artritisa (Roman-Blas i Jimenez., 2006).

Sprovedene studije na primarnim hondrocitima pacova i hrskavici zglobova kolena, ukazuju na to da BHA može sprečiti gubitak proteoglikana putem inhibicije enzima matriksnih metaloproteinaza MMP-13, MMP-3, MMP-1 i ADAMTS-5 indukovanih od strane IL-1 β . BHA takođe suprimira ekspresiju kataboličkih faktora indukovanih od strane IL-1 β , kao što su azot-oksida sintaza 2, ciklooksigenaza-2, prostaglandini E2 i ostali citokini koji učestvuju u zapaljenskim reakcijama. Pored toga, BHA može suprimirati fosforilaciju NF-kB indukovanu IL-1 β i nuklearnu translokaciju. Rezultati studija pokazuju da BHA kroz antiinflamatorne aktivnosti koje mogu da moduliraju NF-kB signalni put zapravo antagonizuje kataboličke efekte izazvane IL-1 β . BHA može inhibirati IL-1 β -indukovanu translokaciju NF-kB u jedro ćelije i ostvariti pozitivne efekte kod osteoartritisa (Oh i sar., 2016).

2.2.2.7. Uticaj biohanina A na Parkinsonovu i Alchajmerovu bolest

Parkinsonova bolest je druga po redu najčešća neurodegenerativna bolest posle Alchajmerove bolesti od koje boluje veliki broj ljudi širom sveta. Uglavnom iz nepoznatog razloga dolazi do smrti dopaminergičkih neurona koji sintetišu i oslobađaju dopamin. Usled smanjene koncentracije dopamina dolazi do razvoja viška nevoljnih pokreta (motorni simptomi) ali i pojave nemotornih simptoma. Za kontrolu simptoma Parkinsonove bolesti pažljivo se uvode antiparkinsonici, koje ukoliko pacijenti koriste duži vremenski period i u višim dozama dovode do ozbiljnih neželjenih dejstava (Valmarska i sar., 2018). Mozak pacijenata koji boluju od Alchajmerove bolesti je upadljivo atrofičan. U frontalnom, parijetalnom i temporalnom režnju se uočava značajan gubitak neurona. U terapiji Parkinsonove i Alchajmerove bolesti se koriste sintetički lekovi koji pokazuju veću selektivnost prema monoamin oksidazi B (MAO-B) izoenzimu i najviše dovode do njegove

inhibicije. Osim ovih lekova i prirodna jedinjenja mogu biti korisna u lečenju neuroloških poremećaja jer pokazuju snažne efekte na sintezu katecholamina i nastanak oksidativnog stresa. Benzopironska struktura koja postoji kod flavonoida i kumarina je važna za inhibiciju enzima MAO-B. Na slici 16 prikazane su osnovne strukture kumarina, benzopirona i hromona.



Slika 16. Osnovne strukture kumarina, benzopirona i hromona

Rađene su studije sa šest različitih i poznatih kumarinskih i flavonoidnih jedinjenja koja u svojoj strukturi poseduju benzopiron. Od kumarinskih jedinjenja to su psoralen, izopsoralen i psoralidin. Od ispitivanih flavonoidnih jedinjenja to su 6-prenilnaringenin, neobavaizoflavon i BHA. Rezultati su pokazali da je BHA najjači i najselektivniji MAO-B inhibitor (Zarmouh i sar., 2017).

BHA se takođe pokazao kao reverzibilni inhibitor MAO-B. On može formirati sa aktivnim centrima enzima tri hidrofobne veze i dve reverzibilne vodonične veze. Ove vodonične veze BHA gradi zahvaljujući grupama C7-OH i C4'-OCH₃, pri čemu je C7-OH akceptor a C4'-OCH₃ donor vodonične veze. Za razliku od sintetičkih lekova ispitivana flavonoidna i kumarinska jedinjenja nemaju u svojoj strukturi amino grupu koja formira kovalentne veze sa aktivnim centrom u enzimu što doprinosi reverzibilnom vezivanju za sam enzim. Dakle, mogućnost građenja dve vodonične veze i postojanje tri hidrofobne grupe u molekulu BHA, daju prednost u korišćenju BHA kao reverzibilnog MAO-B inhibitora. Od svih ispitivanih benzopirona BHA je pokazao najveću selektivnost prema MAO-B enzimu. Ova selektivnost se može objasniti i formiranjem jedne vodonične veze sa molekulom kofaktora flavin adenin dinukleotid fosfatom (FAD) u molekulu izoenzima MAO-A. Međutim, u veoma visokim koncentracijama dolazi do smanjenja njegove selektivnosti čemu doprinosi sličnost u strukturi oba izoenzima (Zarmouh i sar., 2017).

BHA zbog svoje lipofilnosti prolazi krvno-moždanu barijeru. Pod uticajem CYP1A2 BHA se metaboliše do aktivnog metabolita genisteina koji takođe može inhibirati monoamino oksidaze (Zarmouh i sar., 2017). BHA je predstavljen i kao nekompetitivni

inhibitor beta-sekretaze 1 (BACE1), ključnog enzima uključenog u cepanju amiloidnog prekursorškog proteina i proizvodnji amiloid- β peptida, još jednog ciljnog mesta za lečenje Alchajmerove bolesti (Raheja i sar., 2018).

2.2.2.8. Antihiperlipidni efekti biohanina A

Ispitivanja pokazuju da izoflavoni, BHA i formononetin, ispoljavaju antihiperlipidni efekat. Kod pacova sa indukovanim dijabetesom koji su tretirani sa BHA, došlo je do porasta lipoproteina velike gustine (HDL) i smanjenja lipoproteina male gustine (LDL) i lipoproteina veoma niske gustine (VLDL) (Harini i sar., 2012). BHA može imati ovakav efekat zahvaljujući regulaciji metabolizma masnih kiselina preko nuklearnih receptora PPAR α i PPAR γ ali i zbog inhibicije oslobađanja IL-6.

Konkretno, aktivacija PPAR α receptora stimuliše ekspresiju enzima lipoprotein lipaze i povećava njenu aktivnost stimulisanjem apolipoproteina A-V (aktivator lipoprotein lipaze) i redukcijom apolipoproteina C-III (inhibitor lipoprotein lipaze). Efekat koji se postiže na ovaj način odnosi se na smanjenje nivoa triglicerida i VLDL, zatim povećanje HDL holesterola. Ono što BHA razlikuje od genisteina jeste metilovana OH grupa na C4' poziciji, ali ga ujedno i čini nekoliko puta snažnijim od njegovog prekursora. Dakle, prsten A i metilovana C4'-OH grupa je odgovorna za aktivaciju i moduliranje PPAR α receptora i hipolipidemijski efekat kod BHA (Rigano i sar., 2017).

2.2.2.9. Osteogeni efekat biohanina A

Osteoporoza nastala kao posledica starenja ili menopauze je povezana sa progresivnom degeneracijom u formiranju kostiju i povećanom adipogenezom u koštanoj srži. Studije pokazuju da izoflavoni mogu sprečiti gubitak koštane mase (Atkinson i sar. 2004; Kawakita i sar. 2009). Su i saradnici (Su i sar., 2013) su proučavali dejstvo BHA na osteoblaste i diferencijaciju adipocita od matičnih ćelija dobijenih iz adipoznog tkiva. Rezultati su pokazali da BHA inhibira diferencijaciju adipocita, aktivnost lipoproteinske lipaze, kao i ekspresiju leptina i osteopontina. On takođe povećava ekspresiju i aktivnost alkalne fosfataze i stimuliše mineralizaciju povećanjem ekspresije osteoklastičnih gena markera i osteokalcina. Pored toga BHA indukuje ekspresiju inhibitora faktora osteoklastogeneze 2 (osteoprotegerina) i Ras proteina. Ove promene sugerišu na korisnu

ulogu BHA u formiranju kostiju. Takođe, BHA ispoljava preventivni efekat na gubitak kostiju kod ovariektomiranih pacova (Su i sar., 2013).

2.2.2.10. Biohanin A u tretmanu rasta i održavanja zdravlja kose

Kosa je jedinstvena filamentna struktura koja se proteže od dermisa do spoljašnjeg dela tela. Različite promene unutar organizma (stres, nepravilna ishrana, prisustvo bolesti, korišćenje lekova - citostatika, kontraceptiva, kortikosteroida, zatim trudnoća, starenje), promena uslova okoline (zagađenost, izloženost suncu i vetru) i različiti tretmani (mehanički, fizički i hemijski - češljanje, feniranje, farbanje) često menjaju stanje kose i dovode do oštećenja (Schmid i sar., 2009).

Gubitak kose, alopecija, se javlja kao posledica nesklada ciklusa rasta kose koji mogu biti uzrokovani različitim faktorima (androgeni metabolizam, genetika, stres). U zavisnosti od uzroka i simptoma gubitka kose postoje više vrsta alopecija:

- androgena (androgenetska alopecija);
- alopecija areata (ćelavost na pečate, autoimunski poremećaj gde imunski sistem napada folikule dlake);
- telogeni efluvijum (svakodnevno opadanje kose prilikom pranja i češljanja uzrokovano stresom, trudnoćom i sl.);
- vučna alopecija (opadanje kose zbog prekomernog zatezanja);
- trihotilomanija (čupanje kose kao simptom poremećaja kontrole impulsa);
- *tinea capitis* (površinska gljivična oboljonja kože glave) i
- *tinea barbae* (površinska gljivična oboljonja kože brade).

Androgena alopecija je difuzni gubitak kose i genetski je predisponirana. Uzrok androgene alopecije je povećana osetljivost folikula dlake na hormon dihidrotestosteron (DHT), koji se u toku ovog procesa stvara u povećanom obimu iz testosterona. Dihidrotestosteron je pet puta potentniji androgen u odnosu na testosteron pa se stoga snažnije veže za androgeni receptor (Kaufman, 2002). Dihidrotestosteron dovodi do skraćivanja aktivne faze rasta dlake, zatim do istanjivanja i na kraju do opadanja dlake. U stanju androgene alopecije kod muškaraca javlja se smanjenje ukupnog testosterona, ali su uvećane vrednosti za enzim 5-alfa reduktazu, slobodne androgene, dihidrotestosteron i slobodni testosteron. Kod žena androgena alopecija je najčešće izazvana hormonskim

promenama. Androgeni su važni regulatori rasta kose, a ključni enzim je 5-alfa reduktaza koji metaboliše testosteron do DHT. Pored delovanja na androgene receptore DHT stimuliše sintezu i drugih faktora rasta kao što su faktor rasta fibroblasta (FGF), faktor rasta fibroblasta 7 (FGF-7), faktor rasta vaskularnog endotela (VEGF) i brojne druge koji kontrolišu anagenu fazu (Loing i sar., 2013; Ramos i Miot, 2015). Loing i saradnici (Loing i sar., 2013) ispitivali su uticaj BHA na alopeciju i pokazali da je ovaj izoflavon veoma jak inhibitor aktivnosti 5-alfa reduktaze u intaktnim ćelijama tkiva i da je superiorniji u odnosu na epigalokatehin-3-galat (EGCG) iz zelenog čaja.

BHA (100 μ mol) inhibira oba podtipa 5-alfa reduktaze i to podtip I 64% i podtip II 93%, u poređenju sa 11% (podtip I) i 5% (podtip II) za EGCG. Oba podtipa 5-alfa reduktaze nalaze se u kosmatoj koži glave i postoje jaki dokazi da podtip II doprinosi alopeciji kod muškaraca (Loing i sar., 2013). Ovo potvrđuje i činjenica da muškarci koji su genetski predodređeni da imaju deficit 5-alfa reduktaze tip II nemaju gubitak kose. Ovi rezultati pokazuju da bi ekstrakti obogaćeni BHA mogli da inhibiraju aktivnost 5-alfa reduktaze i da se primene za sprečavanje alopecije kod muškaraca (Loing i sar., 2013). Takođe je utvrđeno da ekstrakt izdanaka graška (*Pisum Sativum* Sprout Extract) koji sadrži visoku koncentraciju izoflavona stimuliše specifične signalne molekule koji su odgovorni za rast kose i to noggin protein koji skraćuje trajanje telogene faze i faktor rasta fibroblasta 7 koji podstiče aktivnost proliferacije keratinocita za početak nove anagene faze. Ispitivanje je rađeno sa ekstraktom koji je u koncentraciji od 2% inkorporiran u neutralan proizvod za negu kože i kose glave i nanošen dva puta dnevno u periodu od dve nedelje. Utvrđeno je da ekstrakt izdanaka graška snažno aktivira gene oba ova faktora. Ekspresija FGF7 je povećana za 56% dok je ekspresija za noggin 85% u proseku nakon dve nedelje tretmana. Oba ova molekula se uglavnom sintetišu u ćelijama dermalne papile. Prema navodima kompanije koja proizvodi ekstrakt izdanaka graška, *Mibelle Biochemistry*, u kliničkim studijama sprovedenim tokom tri meseca na dobrovoljcima sa blagim do umerenim opadanjem kose, utvrđeno je da se gustina dlake u anagenoj fazi povećala za 8%, a gustina dlaka u telogenoj fazi smanjila za više od 28%. Ovi rezultati su potvrđeni fototrihogram tehnikom. Reaktivacijom rasta kose, ekstrakt izdanaka graška omogućava očuvanje originalne gustine, sjaj i vitalnost kose (Schmid i sar., 2001; Schmid i sar., 2009).

2.2.2.11. Uticaj biohanina A na depigmentaciju kože

Abnormalna pigmentacija dovodi do pojave fleka na koži. One su estetski jako nepovoljne i to je dovelo do razvoja mnogih kozmetičkih i terapijskih proizvoda različite efikasnosti. Melanociti, ćelije za proizvodnju pigmenata, poseduju specijalizovanu organelu koja se naziva melanozom. U melanozomima se sintetiše biopolimerni pigment melanin, koji daje kosi, koži i drugim tkivima odgovarajuću boju (Turner i sar., 1975). Hiperpigmentni poremećaji kože, staračke fleke (*solarni lentigo* - pigmentne lezije na koži koja je zahvaćena fotostarenjem) mogu biti uzročnik prekomerne proizvodnje i akumulacije melanina (Virador i sar., 2001). Trenutno dostupni topikalni agensi koji se koriste za tretman hiperpigmentacije su inhibitori tirozinaze, retinoidi, hidrohinoni i agensi koji su toksični za melanocite. Nažalost, rezultati ovih tretmana su ponekad razočaravajući i postoji potreba za efikasnijim, bezbednijim i manje iritantnim depigmentacionim agensima. Ovim su stvoreni podsticaji za veću primenu prirodnih preparata. Proteazom aktivirani receptor (PAR-2) pripada podfamiliji receptora vezanih za G protein. Poznata su četiri PAR receptora i numerisani su od 1 do 4. Aktiviraju se dejstvom serinskih proteaza. Tripsin i triptaze u mastocitima su jedini poznati prirodni aktivatori PAR-2 receptora. PAR-2 je eksprimiran u keratinocitima, ali ne i u melanocitima i uključen je u regulaciju pigmentacije (Seiberg i sar., 2000a; Seiberg i sar., 2000b; Sharlow i sar., 2000). Seme soje se u Aziji vekovima koristi kao dijetetski izvor proteina. Sojino mleko i proteini iz sojinog mleka inhibiraju PAR-2 aktivaciju i izazivaju depigmentaciju kože time što smanjuju fagocitozu melanozoma keratinocita čime se u stvari smanjuje transfer melanina. Važno je napomenuti da ekstrakti soje ne treba da budu denaturisani da bi bili efikasni. Lin i saradnici (Lin i sar., 2011) su proučavali inhibiciju melanogeneze pomoću BHA u *in vitro* i *in vivo* uslovima. Pokazano je da nema značajnijeg citotoksičnog efekta BHA na B16 ćelije u koncentraciji od 22 μmol . U toj koncentraciji BHA ima inhibitorni potencijal na melanogenezu (Lin i sar., 2011). BHA takođe umanjuje i aktivnost tirozinaze u ćelijama koji je ključni enzim u melanogenezi. Prema tome BHA inhibira melanogenezu inhibirajući direktno aktivnost tirozinaze (Lin i sar., 2011).

2.2.2.12. Poboljšanje rastvorljivosti i bioraspoloživosti biohanina A

Uprkos širokom terapijskom potencijalu i bezbednosti (nije toksičan za normalne ćelije), glavni razlog ograničene primene BHA je njegova niska rastvorljivost u vodi i slaba

bioraspoloživost (1-2%). BHA se u velikoj meri metaboliše do glukuronida i sulfatnih konjugata u jetri i crevima što objašnjava njegovu malu bioraspoloživost. Štaviše, on pokazuje visok klirens i veliku zapreminu distribucije kod pacova, što je dokazano u farmakokinetičkim studijama (Moon i sar 2006). Poslednjih godina su uloženi mnogi naponi da se poboljša rastvorljivost BHA u vodi, a samim tim i njegova bioraspoloživost. Za ove potrebe u literaturi su opisane i ispitane različite formulacije BHA (čvrste disperzije, čvrste lipidne nanočestice, micle, nanostrukturirani lipidni nosači i sl.) (Raheja i sar., 2018).

Ovakav pristup, tj. razvoj savremenih formulacija BHA sa različitim nosačima je u cilju efikasnijeg i bezbednijeg ostvarivanja terapijskog dejstva i predstavlja poseban izazov u daljim istraživanjima.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1 MATERIJALI I REAGENSI

- Biohanin A (BHA), 98%, Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany);
- 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin (HP- β -CD), 98%, približne molarne mase $M_r \approx 1540$ g/mol, Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany);
- kalijum bromid, KBr, spektroskopske čistoće, >99,9%, Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany);
- dimetilsulfoksid (DMSO), 99,8%, Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany);
- 2,3,5-trifeniltetrazolijum hlorid (TTC), $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany);
- deuterijum oksid, D_2O , 99,9%, Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany);
- deuterisani aceton, CD_3COCD_3 , 99%, Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany);
- etanol, CH_3CH_2OH , 96% v/v, Zorka Pharma (Šabac, Srbija);
- N-izopropilakrilamid (NiPAm), 99% (Acros Organics, New Jersey, SAD);
- 2,2'-azobis(2-metilpropionitril) (AZDN), 98% (Acros Organics, New Jersey, SAD);
- etilen glikol dimetakrilat (EGDM), 97% (Fluka Chemical Corp, CH);
- akrilna kiselina (AA), 98% (Fluka Chemical Corp, CH);
- metanol, CH_3OH , 99,9% HPLC čistoće (Chromoslov, Sigma-Aldrich GmbH, DE);
- hlorovodonična kiselina, HCl, ~36,5%, Zorka Pharma (Šabac, Srbija);
- natrijum hidroksid, NaOH (Centrohem, Beograd, RS);
- Hankov puferski rastvor pH 7,4 (PAA Laboratories, GmbH, Pasching, AUT);
- 2-propanol, 99,5% (Centrohem, Beograd, RS);
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolijum bromid, MTT, $\geq 97.5\%$ (Sigma Aldrich, Steinheim, DE);
- semi-kristalni poli(laktid) (sadrži D, L-mlečno kiselinske jedinice sa malim sadržajem L-mlečne kiseline, oko 10%), čistoće 99% (PLA), (Shenzhen Esun Industrial Co., Ltd, Shenzhen, China), čija je srednja brojučana molarna masa $M_n = 60520$ g/mol, srednje masena molarna masa $M_w = 160780$ g/mol i indeks polidisperznosti $PDI = 2,66$;
- poli(vinilpirolidon) (PVP), $\geq 99,9\%$, $M_w \approx 1300000$ g/mol, (Acros Organics, Geel, Belgium);
- hloroform, $CHCl_3$ $\geq 99,5\%$ (Lachner, Neratovice, CZ);
- dimetilformamid, $\geq 99,8\%$ (Fischer Scientific, Waltham, USA);

- fosfatidilholin, 99% (Sigma Aldrich, Taufkirhen, Nemačka);
- DMEM medijum za ćelijsku kulturu (Dulbeko modifikovani Iglow medijum - Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Capricorn Scientific GmbH, Nemačka);
- ćelijska kultura fibroblasta L929 (Capricorn Scientific GmbH, Nemačka);
- ultračista voda iz Millipore Milli-Q sistema (provodljivost $<0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$).
- Mueller-Hinton agar, (Torlak, Beograd, Srbija);
- Brain Heart Infusion agar (BHI), (Torlak, Beograd, Srbija);
- Sabouraud-dextrose agar, (Torlak, Beograd, Srbija);
- trifenil tetrazolijum hlorid (TTC), (Sigma-Aldrich, Poznan, Poland);
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH), (Sigma Chemical Company, St.Luis, USA);
- (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonska kiselina) (ABTS), (Sigma Chemical Company, St.Luis, USA);
- neokuproin, (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Nemačka);
- 2,4,6-tripiridil-S-triazin, (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Nemačka);
- 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoeva kiselina) (DTNB), Sigma, St. Louis, MO, USA);
- acetilholinesteraza (AChE - Electric eel acetilholinesteraza, Tip-VI-S, EC 3.1.1.7, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Nemačka);
- butirilholinesteraza (BuChE - butirilholinesteraza konjskog seruma, EC 3.1.1.8, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Nemačka);
- acetiltioholin jodid (ATCI), (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Nemačka);
- butiriltioholin hlorid (BTCl), (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Nemačka);
- L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Nemačka);
- tirozinaza, (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Nemačka);
- α -amilaza (poreklom iz svinjskog pankreasa, EC 3.2.1.1), (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Nemačka);
- α -glukozidaza (poreklom iz *Saccharomices cerevisiae*, EC 3.2.1.20), (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Nemačka);
- 4-nitrofenil- α -D-glukopiranozid, (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Nemačka);
- amonijum molibdat, (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Nemačka);
- ferozin, (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Nemačka).

3.2. FARMACEUTSKI OBLICI SA BIOHANINOM A

3.2.1. Priprema inkluzionog kompleksa i fizičke smeše

Za pripremu inkluzionog kompleksa BHA sa HP- β -CD (BHA:HP- β -CD) primenjena je koprecipitaciona metoda sa molskim odnosom reaktanata 1:1. HP- β -CD (422,1 mg) se rastvori u destilovanoj vodi (12,5 cm³) i ovom rastvoru dodaje u kapima rastvor BHA, pripremljen rastvaranjem BHA (77,9 mg) u 96% (v/v) etanolu (12,5 cm³) uz neprekidno mešanje. Ukupna zapremina se dalje homogenizuje na magnetnoj mešalici HANNA HI300 (HANNA instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA) sa brzinom rotacije 600 rpm, na sobnoj temperaturi u toku 48 h. Nakon uravnotežavanja rastvor se uparava pod sniženim pritiskom na rotacionom vakuum uparivaču na 40 °C do minimalne zapremine i suši u eksikatoru iznad do konstantne mase.

Fizička smeša BHA i HP- β -CD je izrađena u molskom odnosu 1:1 mešanjem komponenata u porcelanskoj zdeli do potpune homogenizacije.

3.2.2. Sinteza pH- i termoosetljivog kopolimera poli(*N*-izopropilakrilamid-ko-akrilna kiselina)

Kopolimer poli(*N*-izopropilakrilamid-ko-akrilna kiselina), p(NiPAm-ko-AA), sintetisan je radikalnom polimerizacijom monomera NiPAm-a (600 mg), sa 5 mol% AA i 1,5 mol% umreživača EGDM-a. Dodato je 20 mg AZDN-a za iniciranje reakcije polimerizacije. Kao rastvarač korišćen je aceton. Homogenizovana reakciona smeša nakon rastvaranja reaktanata je ubrizgana u staklene ampule, koje su nakon toga zatopljene. Reakcija polimerizacije izvedena je u sledećem temperaturnom režimu: 0,5 h na 75 °C, 2 h na 80 °C i 0,5 h na 85 °C. Nakon hlađenja, kopolimer p(NiPAm-ko-AA) je izdvojen iz staklenih ampula u vidu dugih cilindara i isečen na diskove ($d \times l = 5 \times 2$, gde je d prečnik u mm, a l je debljina nakon sušenja u mm). Sintetisani kopolimer tretiran je u toku 72 h metanolom (60 cm³ metanola na 1 g kopolimera) da bi se uklonili neproreagovali reaktanti. Nakon tretiranja sa metanolom kopolimer p(NiPAm-ko-AA) je prelivan rastvorom metanol/destilovana voda u odnosu 75/25%, 50/50%, 25/75% i 0/100%, v/v, tokom 24 h radi ispiranja od metanola, a potom osušen na 40 °C do konstantne mase. Dekantovani metanolni rastvori su objedinjeni i analizirani na sadržaj rezidualnih reaktanata primenom HPLC metode (Odeljak 3.3.8.) a dobijeni kopolimer je korišćen za inkorporiranje BHA.

3.2.2.1. Liofilizacija sintetisanog kopolimera p(NiPAm-ko-AA)

Liofilizacija kopolimera p(NiPAm-ko-AA) nabubrelog do stanja ravnoteže (hidrogela) je izvršena na uređaju LH Leybold, Lyovac GT2, Frenkendorf, Switzerland. Hidrogel je najpre zamrznut na temperaturi od -40 °C tokom 24 h. U fazi primarnog sušenja, količina rastvora smanjuje se postupkom sublimacije na temperaturi od -30 °C i pritisku od 5 Pa tokom 12 h. U fazi sekundarnog sušenja, tj. izotermne desorpcije, gel se izlaže temperaturi od -20 °C i pritisku od 5 Pa. Liofilizirani kserogel p(NiPAm-ko-AA) je čuvan na 4-8 °C i korišćen za inkorporiranje BHA.

3.2.2.2. Inkorporiranje biohanina A u kopolimer p(NiPAm-ko-AA)

Pripremljen je rastvor BHA u 96% (v/v) etanolu, koncentracije 2 mg/cm³. Potom je odmereno po 0,02 g uzoraka sintetisanog neliofiliziranog i liofiliziranog kserogela p(NiPAm-ko-AA). Uzorci su preliveni sa po 0,6 cm³ rastvora BHA i ostavljeni da bubre tokom 4 h, tako da je raspoloživa količina BHA za inkorporiranje u kopolimer bila 60 mg/g kserogela. Nakon postizanja ravnoteže, nabubrela hidrogelovi p(NiPAm-ko-AA) su dekantovanjem odvojeni od rastvora. Hidrogelovi su isprani destilovanom vodom radi uklanjanja neinkorporirane količine BHA sa površine, a potom je uklonjen višak vode. Sadržaj inkorporiranog BHA u sintetisanom kopolimeru (liofiliziranom i neliofiliziranom) je određen merenjem mase uzoraka pre i posle bubrenja u rastvoru BHA. Efikasnost inkorporiranja BHA u hidrogelove, η , izračunavana je primenom jednačine 4.

$$\eta(\%) = \frac{L_g}{L_u} \cdot 100 \quad (4)$$

gde je L_g masa inkorporiranog BHA u p(NiPAm-ko-AA) hidrogelu, mg/g_{kserogela}, a L_u početna masa BHA uneta rastvorom za bubrenje, mg/g_{kserogela}.

3.2.2.3. Oslobođanje biohanina A iz kopolimera p(NiPAm-ko-AA)

Nabubrela neliofilizirani i liofilizirani hidrogelovi p(NiPAm-ko-AA) sa inkorporiranim BHA preliveni su sa po 2 cm³ adekvatnog medijuma. Jedna polovina uzoraka prelivena je rastvorom hlorovodonične kiseline pH vrednosti 4,5, a druga polovina rastvorom

natrijum-hidroksida pH vrednosti 7,9. Uzorci su termostatirani na vodenom kupatilu na 37 °C uz mešanje tokom 12 h. Oslobođena količina BHA praćena je uzorkovanjem po 100 µl rastvora tokom vremena (0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 i 12 sati), koji su zatim razblaženi etanolom 96% (v/v) do 2 cm³. Apsorbanca uzoraka BHA je praćena na talasnoj dužini od 261 nm primenom UV/Vis spektrofotometrije (Odeljak 3.3.1).

3.2.3. Izrada polimernih vlakana elektrospining metodom

U svrhu elektrospinoivanja (elektropredenja), rastvori na bazi PLA pripremani su rastvaranjem odgovarajuće kolićine PLA u smeši hloroforma i dimetilformamida u zapreminskom odnosu 6:4 (v/v), tako da je konaćna koncentracija polimera 9% mas., dok je rastvor PVP pripreman u etanolu koncentracije 12% (Miletić i sar., 2019; Radusin i sar., 2019; Ristić i sar., 2021). Uzorci su pripremljeni dodavanjem 2% i 5% BHA osnovnim rastvorima polimera (raćunato na masu polimera). Svi rastvori su mešani 24 sata pre elektrospinoivanja na magnetnoj mešalici pri sobnoj temperaturi. Viskoznost je merena na MYR viskozimetru V0 model 3000, u skladu sa ISO 2555/ASTM metodom. Produkcija nanovlakana raćena je na elektrospining uređaju Fluidnatek LE-10 (proizvođać Bioinicia, Paterna, Španija) i parametri procesa su prilagođeni za svaki pripremljeni rastvor. Uzorci sa parametrima procesa elektrospinoivanja dati su u tabeli 6.

Tabela 6. Uzorci i procesni parametri elektrospinoivanja

Oznaka uzorka	Procesni parametri elektrospinoivanja		
	Brzina protoka (cm ³ /h)	Rastojanje igle od kolektora (cm)	Napon (kV)
PLA	2,5	10	14
PLA-BHA-2%	3	10	13
PLA-BHA-5%	3	10	14
PVP	2	10	13
PVP-BHA-2%	2	10	14
PVP-BHA-5%	2	10	14,5

3.2.3.1. Oslobođanje biohanina A iz elektrospinoivanih polimernih vlakana

Oslobođanje BHA iz izraćdenih elektrospinoivanih polimernih vlakana praćeno je u *in vitro* uslovima. Uzorci elektrospinoivanih PLA vlakana (oko 9 mg) ili PVP vlakana (oko 3

mg) sa 2% ili 5% BHA natopljeni su sa 10 cm³ Hankovog pufera (pH=7,4). Uzorci su mešani na magnetnoj mešalici (120 rpm) i termostatirani u vodenom kupatilu na 37 °C. Oslobođanje BHA je praćeno uzorkovanjem 200 µl rastvora u određenim vremenskim intervalima i razblaživanjem sa 800 µl metanola. Svi uzorci su filtrirani na Econofilteru (0,45 µm) i analizirani korišćenjem HPLC metode. Istovremeno je praćeno rastvaranje BHA u Hankovom puferu pod istim uslovima suspendovanjem 0,46 mg BHA u 10 cm³ Hankovog pufera. Na osnovu kalibracione krive (Odeljak 3.3.8.) i površine pika, P, koja je izražena u internim jedinicama mAU*s u HPLC hromatogramu, određivana je koncentracija otpuštenog BHA.

3.2.4. Priprema liposoma sa biohaninom A

3.2.4.1. Priprema multilamelarnih vezikula (MLV) sa biohaninom A

Liposomi sa BHA su izrađeni metodom tankog filma. Najpre se odmere BHA (0,46 mg) i fosfolipid (0,11 mg) i rastvore u hloroformu, u balonu okruglog dna zapremine 50 cm³. Nakon toga, balon se stavlja na rotacioni vakuum uparivač 30 minuta da bi se uklonio hloroform. Za to vreme se na zidovima balona stvara tanak film lipida. Hidratacija lipida se vrši dodatkom 30 cm³ Hankovog pufera (pH=7,4) i proces nastavlja na vakuum uparivaču tokom 60 minuta uz konstantno mešanje iznad temperature faznog prelaza lipida (41 °C). Na ovaj način se dobija bela, mlečna disperzija koja se sastoji od MLV liposoma.

3.2.4.2. Priprema malih unilamelarnih vezikula (SUV) sa biohaninom A

Da bi se izradili SUV liposomi, dobijena disperzija MLV liposoma se uravnotežava na magnetnoj mešalici 90 minuta, a potom se koristi postupak ekstrudiranja. Za ekstrudiranje liposoma korišćen je „Avestin“ ekstruder (LiposoFast-Basic Extruder, Avestin, Inc., Kanada) sa membranama prećnika pora 100 nm. Metoda se zasniva na presovanju heterogene disperzije liposoma kroz membrane definisane velićine pora (0,1 do 0,8 µm) pod niskim pritiskom, pri ćemu nastaju male unilamelarne vezikule. U toku ekstrudiranja vrši se razmena sadržaja između vezikula i suspendujućeg medijuma. Proces ekstrudiranja se zasniva na ujednaćavanju velikih, multilamelarnih liposoma kroz membranski filter u cilju dobijanja malih unilamelarnih liposoma. Pasterovom pipetom prenese se 1 cm³ liposoma sa BHA u

jedan injektor, dok drugi ostaje prazan. Laganim pritiskom se iz jednog injektora smeša prebacuje u drugi injektor kroz polikarbonatni filter promera pora 100 nm. Postupak se ponavlja 17 puta. Na taj način se dobijaju SUV liposomi sa BHA, koji se čuvaju na +4 °C do daljih analiza.

3.2.4.3. Oslobođanje biohanina A iz liposoma

In vitro ispitivanje oslobođanja BHA iz pripremljenih MLV i SUV liposomnih disperzija izvršeno je tehnikom sa dijaliznim vrećicama. Dijalizna vrećica je pre upotrebe potopljena u rastvor pufera (Hankov puferizovani rastvor) na sobnoj temperaturi tokom 24 h, a zatim isprana destilovanom vodom. Dijalizna vrećica (110 × 43 mm) se napuni sa 10 cm³ liposomne disperzije sa BHA, zatvori sa obe strane plastičnim štipaljka, postavi horizontalno u staklenu čašu sa 20 cm³ Hankovog pufera pH=7,4, tako da bude potpuno uronjena u pufer. Dijalizna vrećica sa liposomskom disperzijom predstavlja donorsku fazu, dok puferski medijum predstavlja akceptorsku fazu. Oslobođanje BHA praćeno je na sobnoj temperaturi, uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici, pri brzini od 100 rpm. Vrećica sa kontrolnim uzorkom sadržala je puferski rastvor BHA iste koncentracije, a ispitivana je pod istim uslovima kao i liposomske disperzije.

U definisanim vremenskim intervalima od 0 do 1490 min vršeno je uzorkovanje 200 µl akceptorske faze, koja je dopunjena metanolom do 1 cm³. Koncentracija oslobođenog BHA određivana je HPLC metodom na talasnoj dužini $\lambda=261$ nm korišćenjem kalibracione krive (Odeljak 3.3.8.).

3.3. METODE KARAKTERIZACIJE

3.3.1. Ultraljubičasta/vidljiva spektrofotometrija (UV/Vis)

Metoda UV/Vis spektrofotometrije primenjena je za određivanje koncentracije BHA u studiji rastvorljivosti u prisustvu HP- β -CD i za praćenje količine otpuštenog BHA iz neliofiliziranih i liofiliziranih hidrogelova p(NIPAM-ko-AA). Za potrebe ispitivanja rastvorljivosti BHA pripremljen je osnovni rastvor BHA (100 µg/cm³) rastvaranjem BHA (10 mg) u 42% v/v vodenom rastvoru etanola (100 cm³), a zatim je razblaživanjem napravljena serija rastvora BHA koncentracije 1 do 10 µg/cm³. Apsorbanca je merena u odnosu na 42%

v/v vodeni rastvor etanola pri talasnoj dužini $\lambda=261$ nm. Linearna zavisnost sa koeficijentom determinacije $R^2=0,999$ predstavljena je jednačinom 5:

$$A_{261} = 0,090 \cdot c + 0,125 \quad (5)$$

gde je: A_{261} - apsorbanca na 261 nm, c - koncentracija biohanina A, $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Za potrebe praćenja otpuštanja BHA iz neliofiliziranih i liofiliziranih hidrogelova p(NIPAM-ko-AA), konstruisana je kalibraciona kriva kao zavisnost apsorbance na 261 nm od poznate koncentracije BHA. Osnovni rastvor BHA ($2 \text{ mg}/\text{cm}^3$) pripremljen je rastvaranjem BHA u etanolu 96% (v/v), a zatim je napravljena serija razblaženih rastvora u etanolu u opsegu koncentracije od 2 do $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Za pravolinijski deo kalibracione krive za BHA u opsegu $2-10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ važi jednačina 6 sa koeficijentom determinacije $R^2=0,999$. Kao slepa proba korišćen je etanol 96% (v/v).

$$A = 0,1184 \cdot c + 0,0202 \quad (6)$$

Svi uzorci su snimani u kvarcnoj kivetu ($1 \times 1 \times 4,5$ cm) na Varian Cary-100 spektrofotometru (Mulgrave, Vic., Australia) pri sobnoj temperaturi. Spektri su obrađeni primenom softvera Cary WinUV.

3.3.2. Studija fazne rastvorljivosti

Rastvorljivost BHA u rastvoru etanola (42%, v/v) je proučavana prema metodi fazne rastvorljivosti koju su opisali Higuchi i Connors (Higuchi i sar., 1965). Metoda se zasniva na dodavanju BHA u višku u seriju rastvora HP- β -CD u 42% (v/v) rastvoru etanola, u kojima se povećava koncentracija HP- β -CD (od 1 do $10 \text{ mmol}/\text{dm}^3$). Uzorci se mešaju na magnetnoj mešalici 48 h na sobnoj temperaturi do postizanja ravnoteže, filtriraju kroz membranski filter veličine pora $0,45 \mu\text{m}$ (Econofilters; Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Koncentracija BHA je određivana pomoću UV/Vis metode (Odeljak 3.3.1.) merenjem apsorbance na 261 nm na Varian Cary-100 spektrofotometru u odnosu na 42% (v/v) etanol. Prividna konstanta stabilnosti ($K_{1:1}$) inkluzionog kompleksa je izračunata primenom jednačine 7:

$$K_{1:1} = \frac{Nagib}{S_0 \cdot (1 - Nagib)} \quad (7)$$

gde je: S_0 - rastvorljivost BHA u 42% etanolu na $25 \text{ }^\circ\text{C}$, Nagib - je nagib prave linije u dijagramu fazne rastvorljivosti.

3.3.3. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

FTIR spektri BHA, HP- β -CD, inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD, fizičke smeše BHA i HP- β -CD, kserogelova p(NIPAM-ko-AA) bez i sa inkorporiranim BHA, monomera NiPAm i elektrospinovanih polimernih vlakana PLA i PVP sa i bez BHA snimani su tehnikom tankih transparentnih KBr-tableta, vakuumiranjem i presovanjem pod pritiskom od oko 200 MPa. Za pripremu tableta mereno je po 150 mg KBr i po 1 mg uzoraka, osim za elektrospinovana polimerna nanovlakna gde je mereno po 0,7 mg uzorka. Svi uzorci su usitnjeni do stanja praha na amalgamatoru (VIG-L-BVG, 31210-3A, Dentspli RINN, Division of Dentspli International Inc., Iork, PA, SAD).

Komonomer AA je sniman u obliku tankog filma između dve Zn-Se pločice. Snimanja za sve uzorke su vršena u oblasti talasnih brojeva od 4000 do 400 cm^{-1} na FTIR spektroskopu Bomem Hartmann & Braun MB-series. Spektri su obrađeni primenom softvera Win-Bomem Easy.

3.3.4. Protonska nuklearna magnetna rezonantna spektroskopija (^1H -NMR)

^1H -NMR spektroskopija je primenjena u cilju strukturne karakterizacije inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD, BHA i HP- β -CD. ^1H -NMR spektri BHA, HP- β -CD, inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD i odgovarajuće fizičke smeše snimani su u staklenoj kiveti prečnika 5 mm na Bruker AC 250E NMR spektrometru (Billerica, MA, USA) na sobnoj temperaturi metodom višestepenog pulsnog ponavljanja. Deuterisani aceton je korišćen za rastvaranje BHA, a deuterisana voda za rastvaranje ostalih uzoraka.

3.3.5. Difrakcija rendgenskih zraka (XRD)

Difrakcija X-zraka uzoraka u prahu BHA, HP- β -CD, inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD i fizičke smeše BHA i HP- β -CD je urađena na Seifert V-14 powder diffractometer (Seifert & Co, Ahrensburg, Germany). Na standardni nosač uzoraka prečnika 22 mm pažljivo se nanese uzorak u prahu. Uzorak se ozrači monohromatskim Cu-K α

zračenjem ($\lambda = 0,1542 \text{ nm}$) pri sledećim uslovima snimanja: napon u cevi 40 kV, struja u cevi 15 mA, inkrement snimanja je $0,05^\circ$ i vreme zapisa 2 s.

3.3.6. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Za ispitivanje termičkih svojstava BHA, HP- β -CD, inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD, fizičke smeše BHA i HP- β -CD i elektrospinovanih polimernih nanovlakana PLA i PVP sa BHA, detekciju temperature i entalpije njihovih faznih promena korišćena je diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC). Odmerena količina uzorka (oko 5 mg) je stavljena u aluminijsku zatvorenu posudu i zagrevana u jednom ciklusu od 20 do 250 °C brzinom od 10 °C/min u atmosferi azota pri protoku 50 cm³/min. Za ova ispitivanja korišćen je diferencijalni skenirajući kalorimetar TA Instruments Q20 (TA Instruments, New Castle, DE, USA).

3.3.7. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) je korišćena za analizu morfologije BHA, HP- β -CD, inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD, fizičke smeše BHA i HP- β -CD, sintetizovanog kopolimera p(NIPAM-ko-AA) bez i sa inkorporiranim BHA i elektrospinovanih PLA i PVP nanovlakana sa BHA. Gelovi su u ravnotežnom stanju bubrenja liofilizirani na Edwards, Mini Fast 680 laboratorijskom liofilizatoru (Edwards Ltd, UK) i potopljeni u azot pre sečenja kako bi se sprečilo lomljenje i deformacija. Nakon toga, svim uzorcima je nanešen sloj legure zlata i paladijuma (85/15) pod vakuumom u Fine Coat JEOL JFC-1100 jonskom raspršivaču (JEOL Co., Japan). Metalizirani uzorci su analizirani JEOL skenirajućim elektronskim mikroskopom JSM-5300 (JEOL Co., Japan) sa naponom 20 kV i pod vakuumom $1,33 \cdot 10^{-5} \text{ Pa}$.

3.3.8. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC)

RP-HPLC metoda primenjena je za kvalitativnu i kvantitativnu analizu određivanja sadržaja rezidualnih reaktanata u sintetisanom kopolimeru p(NiPAm-ko-AA) i oslobođenog

BHA iz liposoma i elektrospirovanih polimernih PLA i PVP vlakana. Hromatografska analiza je vršena na HPLC uređaju Agilent 1100 serije (Waldborn, Germany) sa nepolarnom kolonom Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6×250 mm, 5µm) na 25 °C. Metanol je korišćen kao polarna mobilna faza, sa brzinom protoka od 1 cm³/min, a injektirano je po 10 µl uzoraka. Detekcija je izvršena na detektoru DAD Agilent 1200 serije na talasnim dužinama od 205 nm za AA i EGDM, a 220 nm za NiPAm. Za konstruisanje kalibracionih kriva pripremljene su serije odgovarajućih standardnih rastvora poznatih koncentracija. Svi uzorci su filtrirani na Ekonofilteru prečnika pora 0,45 µm i korišćeni za HPLC analizu. Dobijeni spektri su obrađeni primenom softvera Agilent ChemStation. Na osnovu konstruisanih kalibracionih kriva u opsegu linearne zavisnosti izvedene su jednačine za određivanje sadržaja NiPAm-a, AA i EGDM-a u objedinjenim metanolnim ekstraktima, dobijenim obradom sintetisanog kopolimera p(NiPAm-ko-AA). Linearna zavisnost površine pika (P) od koncentracije NiPAm-a (c) je utvrđena u opsegu 0,005-0,506 mg/cm³ sa koeficijentom determinacije R²=0,997 (jednačina 8).

$$P = 25985,512 \cdot c + 266,829 \quad (8)$$

Linearna zavisnost površine pika od koncentracije AA je utvrđena u opsegu 0,010-0,300 mg/cm³, sa koeficijentom determinacije R²=0,989 (jednačina 9).

$$P = 31560,568 \cdot c - 75,877 \quad (9)$$

Linearna zavisnost površine pika od koncentracije EGDM je utvrđena u opsegu 0,005-0,264 mg/cm³, sa koeficijentom determinacije R²=0,989 (jednačina 10).

$$P = 48598,866 \cdot c + 673,254 \quad (10)$$

U jednačinama 8, 9 i 10, P je površina pika (mAU·s), a c je koncentracija reaktanta (mg/cm³) NiPAm-a, AA i EGDM-a, respektivno.

Metoda HPLC primenjena je za kvantitativnu analizu BHA oslobođenog iz elektrospirovanih PLA i PVP vlakana, za ispitivanje rastvorljivosti BHA u Hankovom puferu i za praćenje otpuštenog BHA iz liposomnih formulacija. Svakom uzorku (200 µl) uzetom u određenom vremenskom intervalu iz akceptorske faze dodata je mobilna faza (800 µl). Svi uzorci su filtrirani na Ekonofilteru (0,45 µm) i analizirani na navedenom HPLC uređaju. Talasna dužina detekcije je bila λ=261 nm, temperatura kolone 30 °C i zapremina injektiranog uzorka 20 µl. Ostali uslovi (kolona, mobilna faza, protok mobilne faze) su bili isti kao kod analize rezidualnih reaktanata.

Za praćenje otpuštene količine BHA iz navedenih formulacija konstruisana je kalibraciona kriva. Za konstrukciju kalibracione krive pripremljena je serija standardnih

rastvora BHA u metanolu ($1-100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$). Linearna zavisnost površine pika od koncentracije BHA, sa koeficijentom determinacije e $R^2 = 0,999$ predstavljena je jednačinom 11:

$$A = 129,53 \cdot c + 30,06 \quad (11)$$

gde je: c ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) - koncentracija BHA, A -apsorbanca na $\lambda=261 \text{ nm}$

3.3.9. Analiza bubrenja gelova

Bubrenje neliofiliziranog i liofiliziranog kserogela p(NIPAM-ko-AA) u rastvorima pH 3,5 i 8,5 praćeno je gravimetrijski na $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Rastvori određenih pH vrednosti su pripremljeni dodatkom HCl i NaOH uz merenje kiselosti, odnosno baznosti, digitalnim pH-metrom (HI9318-HI9219, HANNA, Portugal). Nakon izdvajanja uzoraka iz rastvora i uklanjanja viška rastvora sa njihove površine merena je masa uzoraka u određenim vremenskim intervalima do postizanja ravnoteže, tj. konstantne mase hidrogelova. Stepem bubrenja (α) je računat prema jednačini 12.

$$\alpha = \frac{m - m_0}{m_0} \quad (12)$$

gde je: m_0 - masa suvog gela, m - masa nabubrelog gela u vremenu t .

Priroda procesa difuzije, odnosno apsorpcije rastvarača unutar matriksa hidrogelova, analizirana je jednačinom 13. Ova jednačina važi za početnu fazu bubrenja ($M_t/M_e \leq 0,6$) (Bajpai, 2001; Ritger i sar. 1987):

$$F = \frac{M_t}{M_e} = kt^n \quad (13)$$

gde je: F - frakciona sorpcija, M_t - masa apsorbovanog rastvarača u vremenu t , M_e - masa apsorbovanog rastvarača u stanju ravnoteže, k - konstanta karakteristična za određenu vrstu polimerne mreže ($\text{min}^{1/n}$) i n - difuzioni eksponent.

Logaritmovanjem jednačine 13 dobija se jednačina 14:

$$\ln F = \ln \frac{M_t}{M_e} = \ln k + n \cdot \ln t \quad (14)$$

Difuzioni eksponent n izračunava se iz nagiba pravolinijske zavisnosti između $\ln F$ i $\ln t$, a konstanta k iz odsečka ove linearne zavisnosti.

Mehanizam difuzije fluida je određen vrednošću difuzionog eksponenta n . Za hidrogelove koji imaju planarnu geometriju pri vrednosti $n \leq 0,5$ mehanizam difuzije fluida odgovara Fick-ovom mehanizmu difuzije. Bubrenje hidrogelova može biti pod kontrolom difuzije rastvarača u matriks i relaksacije polimernih lanaca ($0,5 < n < 1$), što predstavlja tzv. ne-Fick-ovu difuziju odnosno anomalni mehanizam difuzije rastvarača. Pri vrednosti difuzionog eksponenta 1, proces difuzije rastvarača je mnogo brži od relaksacije lanaca polimernog sistema (Tip II). Postoji poseban tip apsorpcije rastvarača u polimerni matriks gde takođe relaksacija polimernih lanaca kontroliše bubrenje ($n > 1$), a to je tip III (Bajpai, 2001; Crank, 1975; Hansen, 2010; Khare i sar., 1995; Ritger i sar., 1987; Wang i sar., 2008).

Pored mehanizma apsorpcije rastvarača, potrebno je odrediti i koeficijent difuzije molekula rastvarača u hidrogel (D). Najkorišćenija metoda za određivanje stepena penetracije fluida je prezentovana jednačinom 15, koja se odnosi na početnu fazu bubrenja, tokom koje debljina polimera u osnovi ostaje konstantna (Wang i sar., 2008):

$$\frac{M_t}{M_e} = 4 \left(\frac{Dt}{\pi l^2} \right)^{1/2} \quad (15)$$

D predstavlja koeficijent difuzije (cm^2/min), a l debljinu suvog hidrogela (cm). Logaritmovanjem jednačine 15 dobija se pravolinijska zavisnost između $\ln(M_t/M_e)$ i $\ln t$ (jednačina 16).

$$\ln \left(\frac{M_t}{M_e} \right) = \ln \left(\frac{4D^{1/2}}{\pi^{1/2}l} \right) + \frac{1}{2} \ln t \quad (16)$$

Koeficijent difuzije D se izračunava iz odsečka linearne zavisnosti između $\ln(M_t/M_e)$ i $\ln t$.

3.3.10. Modelovanje procesa bubrenja kopolimera p(NiPAm-ko-AA)

Eksperimentalni dizajn je strukturiran i organizovan način vođenja i analize kontrolisanih eksperimenata u cilju procene faktora (nezavisne promenljive, X) koji utiču na

odgovor sistema (zavisna promenljiva, Y) (Telford, 2007). Puni faktorijalni dizajn na tri nivoa je primenjen za modelovanje procesa bubrenja sintetisanog kopolimera p(NiPAm-ko-AA) u zavisnosti od pH vrednosti i temperature okolnog medijuma. Kod punog faktorijalnog dizajna se istražuje efekat svih eksperimentalnih faktora i interakcionih efekata na odgovor sistema (Lundstedt i sar., 1998). Odzivna veličina, odnosno odgovor sistema, je ravnotežni stepen bubrenja (α_e) kopolimera p(NiPAm-ko-AA). Faktori i nivoi za puni faktorijalni dizajn na tri nivoa dati su u Tabeli 7.

Tabela 7. Faktori i nivoi za puni faktorijalni dizajn na tri nivoa za proces bubrenja hidrogelova p(NiPAm-ko-AA)

Faktori	Kod.	Nekod.	Vrednosti nivoa	
			Kodirana	Nekodirana
Temperatura (°C)	X_1	t	-1	25
			0	31
			1	37
pH	X_2	pH	-1	3,5
			0	6,0
			1	8,5

ANOVA test je korišćen za izbor i procenu adekvatnosti modela i statistički značajnih faktora u modelu. Statistički značajni članovi modela, faktori i interakcije, imaju vrednosti verovatnoće pojavljivanja greške (p) manje od 0,05. Optimizovanje procesa bubrenja hidrogela p(NiPAm-ko-AA) eksperimentalnim dizajnom je izvršeno softverom Design-Expert, version 7.0.0 (Stat-Ease Inc., Minnesota, USA).

3.3.11. Istezanje materijala

Mehanička svojstva elektrospinovanih PLA i PVP vlakana ispitivana su pomoću uređaja za ispitivanje zatezanja EZ-LX Test (Shimadzu, Kjoto, JPN). Dobijeni materijali su sečeni u trake pravougaonog oblika, merene su debljina i širina, a uzorci su istezani brzinom od 1 mm/min. Naprezanje (N/mm^2) i deformacija (%) su praćeni u maksimumu i tački prekida.

3.3.12. Određivanje ugla kvašenja

Svojstva površine elektrospinovanih PLA i PVP vlakana su određena korišćenjem goniometra kontaktnog ugla (Ossila, Sheffield, UK), sa vodom kao sredstvom za vlaženje. Kap (5 μ l) je stavljena na površinu materijala i meren je kontaktni ugao.

3.3.13. Karakterizacija liposoma sa biohaninom A

Prosečna veličina kapi i raspodela veličine kapi liposomskih disperzija (MLV i SUV) određivani su tehnikom dinamičkog rasipanja svetlosti primenom uređaja Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Velika Britanija). U cilju smanjenja uticaja gustine i viskoziteta liposomske disperzije na rezultate merenja, uzorci su pre merenja razblaživani redestilovanom vodom (1:10, v/v). Merenja su vršena u polistirenskim kivetama za jednokratnu upotrebu, na temperaturi od 25 °C, pod uglom rasipanja svetlosti od 90°, primenom He-Ne lasera na 633 nm.

Zeta potencijal izrađenih liposomskih disperzija (MLV i SUV) određen je primenom uređaja Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Velika Britanija). Merenja su vršena na 25 °C u savijenoj kapilarnoj cevi za jednokratnu upotrebu, nakon razblaživanja uzoraka visokoprečišćenom vodom.

3.4. ODREĐIVANJE BIOLOŠKIH AKTIVNOSTI

3.4.1. Antimikrobna aktivnost

3.4.1.1. Mikrobni sojevi

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti uzoraka BHA i inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD je vršeno protiv patogenih sojeva, najčešćih izazivača humanih infektivnih bolesti kod ljudi, iz referentne ATTC kolekcije (American Type Culture Collection): Gram (-) bakterija (*Escherichia coli* 8739, *Pseudomonas aeruginosa* 9027, *Klebsiella pneumoniae* 10031, *Salmonella enteritidis* 13076), Gram (+) bakterije (*Staphylococcus aureus* 25923), kvasca (*Candida albicans* 10231) i filamentozne gljive (*Aspergillus niger* 16404). Posebna pažnja je posvećena ispitivanju uzoraka protiv Gram (-) bakterije *Helicobacter pylori* (iz kolekcije Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen - DSMZ 10242) koja nastanjuje

donji deo želuca čoveka (pilorus) i dovodi do zapaljenja sluzokože želuca (gastritisa) i čira na dvanaestopalačnom crevu i želucu.

3.4.1.2. Antimikrobni esej

In vitro antimikrobna aktivnost uzoraka BHA i inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD je ispitivana upotrebom *mikro-dilucione metode* sa izvesnim modifikacijama (CLSI, 2012), osim u slučaju bakterije *H. pylori* kod koje je najpre izvršen preliminarni skrining antimikrobnog delovanja uzoraka *disk-difuzionom metodom*, a potom je preciznije određen mikro-dilucionom metodom.

Disk difuziona metoda

Antimikrobni skrining je izvršen pomoću disk difuzione metode sa izvesnim modifikacijama (CLSI, 2012). Od prekončne kulture *H. pylori* (gajene pod standarnim uslovima za taj soj - BHI (Brain Heart Infusion) koji sadrži 10% konjskog seruma i 0,25% ekstrakta kvasca na 37 °C u mikroaerofilnim uslovima u vlažnoj atmosferi (Hachem i sar., 1996) je, u sterilnom fiziološkom rastvoru (0,9 % NaCl), pripremljena suspenzija turbiditeta 0,5 McFarlanda što odgovara gustini ćelija od 10^8 CFU/cm³. Zatim je, na sterilne Petri ploče sa krvnim agarom (BA, Torlak), zasejano po 100 μ l suspenzije i postavljani su sterilni diskovi prečnika 6 mm (HiMedia Laboratories Pvt. Limited). Na svaki disk je nanešeno po 20 μ l rastvora BHA ili kompleksa BHA:HP- β -CD pripremljenih u 100 % DMSO-u kao rastvaraču. Kao negativna kontrola je korišćen disk na koji je nanešeno 20 μ l čistog rastvarača, a kao pozitivna kontrola je korišćen disk sa antibiotikom Metronidazolom (30 μ g/disk). Tako pripremljene Petri kutije su zatim inkubirane na 37 °C u mikroaerofilnim uslovima u vlažnoj atmosferi. Antimikrobna aktivnost uzoraka je procenjena merenjem zone inhibicije rasta *H. pylori* (u mm) oko postavljenih diskova. Svi eksperimenti su izvedeni u pet ponavljanja i računata je srednja vrednost.

Mikro-diluciona metoda

Antimikrobni potencijal uzoraka BHA i kompleksa BHA:HP- β -CD, protiv svih ispitivanih mikrobnih sojeva, je preciznije određen sofisticiranijom mikro-dilucionom metodom sa izvesnim modifikacijama (CLSI, 2012).

Prekončne kulture mikrobnih sojeva su kultivisane u odgovarajućim uslovima - bakterije na 37 °C na Miler-Hinton agaru (MHA), bakterija *H. pylori* na Brain Heart Infusion

agaru (BHI), a kvasac na 30 °C na saburo-dekstroznom agaru (SDA). Filamentozna gljiva je gajena na 28 °C na SDA podlozi do sporulacije.

Od prekonocnih kultura bakterija i kvasca su, u sterilnom fiziološkom rastvoru (0,9 % NaCl), pripremljene suspenzije turbiditeta 0,5 McFarlanda (što odgovara 10^8 CFU/cm³). Gustina suspenzije spora filamentozne gljive je određena metodom brojanja vijabilnih ćelija u Tominoj komori. Tako dobijenim suspenzijama su zasejane odgovarajuće hranljive podloge – Miler-Hinton bujon za bakterijske sojeve, Brain Heart Infusion bujon za *H. pylori* i saburo-dekstrozni bujon za fungalne sojeve u mikrotitar pločama sa 96 udubljenja. Od početnih rastvora uzoraka BHA i kompleksa BHA:HP- β -CD (u DMSO) su u mikrotitar pločama napravljene serije razblaženja u koncentracijama od 0,007 – 27,0 mg/cm³ (za *H. pylori* od 0,01-30,0 mg/cm³). U svakom bunariću mikrotitar ploče je bila ukupna zapremina 100 μ L, a finalna koncentracija mikrobnih ćelija je iznosila 10^6 CFU/cm³. Mikrotitar ploče su kultivisane na 37 °C tokom 24 h (za bakterije) ili na 30 °C (za *Candida albicans*) i 28 °C (za *Aspergillus niger*) u toku 48 h. Bakterija *H. pylori* je kultivisana na 37 °C pod mikroaerofilnim uslovima (5% O₂, 10% CO₂ i 85% N₂ sa 95% vlažnosti) u vlažnoj atmosferi tokom 3 dana. Kao negativna kontrola je korišćena serija razblaženja čistog rastvarača (DMSO), a kao pozitivne kontrole su korišćene serije razblaženja antibiotika (0,02-10 μ g/cm³) - tetraciklina (za bakterije), metronidazola (za *H. pylori*) i nistatina (za fungalne sojeve). Inhibitorna aktivnost uzoraka je određena metodom vidljivog rasta tj. dodavanjem 20 μ l 0,5% vodenog rastvora trifenil tetrazolijum hlorida (TTC) u svaki bunarić na mikrotitar ploči. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je definisana kao najniža koncentracija uzoraka koja je inhibirala vidljivi rast mikroorganizama (pojava crvene boje nakon dodavanja TTC). Da bi se odredile minimalne baktericidne/fungicidne koncentracije (MBC/MFC), iz svakog bunarića je sadržaj prenešen na Petri ploče sa odgovarajućim podlogama i inkubiran pod opisanim specifičnim uslovima za testirane mikrobne sojeve. MBC/MFC se definiše kao najniža koncentracija ispitivanih uzoraka pri kojoj su inokulisani mikroorganizmi ubijeni 99,9%. Svi eksperimenti su izvedeni u tri ponavljanja.

Statistička obrada podataka

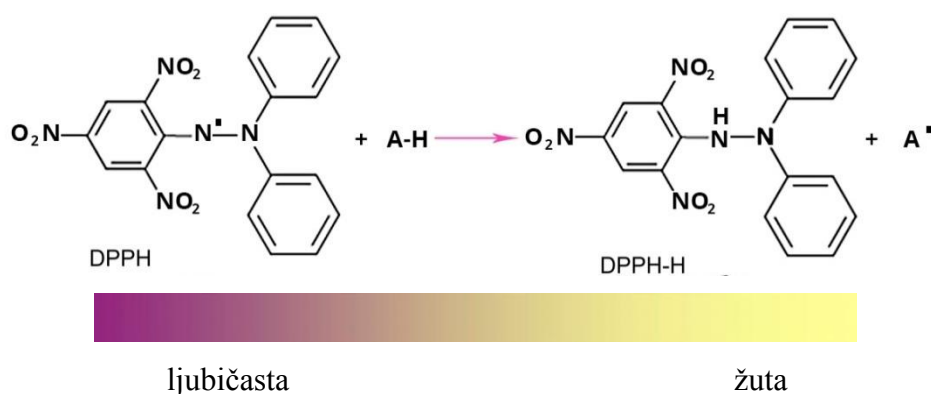
Za ove analize primenjena je statistička analiza korišćenjem analize varijanse (ANOVA) za određivanje značajnosti ($p \leq 0,05$) podataka dobijenih u svim eksperimentima. Utvrđeno je da su svi rezultati unutar nivoa pouzdanosti od 95% za reproduktivnost eksperimenta.

3.4.2. Antioksidativna aktivnost

Za određivanje antioksidativnog potencijala BHA i inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD primenjene su različite metode: DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, fosfomolibdenska metoda i metoda heliranja metala.

3.4.2.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti primenom DPPH metode

DPPH test je sproveden prema metodi koju su opisali Stanojević i saradnici (Stanojević i sar., 2009). Metoda je spektrofotometrijska i zasniva se na praćenju promene boje rastvora iz ljubičaste u žutu kao rezultat redukovanja 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala do 1,1-difenil-2-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazina (DPPH-H) pod uticajem antioksidansa kao donora vodonikovog atoma. Neutralisanje DPPH radikala antioksidansom do DPPH-H mehanizmom transfera vodonika, HAT (eng. *hydrogen atom transfer*) prikazano je na slici 17.



Slika 17. Neutralisanje DPPH radikala antioksidansom do DPPH-H

Napravljena je serija rastvora BHA (0,078-2,5 mg/cm³) i kompleksa BHA:HP β CD (1,03-33 mg/cm³) u metanolu. Metanolni rastvor DPPH radikala (1 cm³, 3 \times 10⁻⁴ mol/dm³) dodat je u 2,5 cm³ uzorka (BHA ili kompleksa BHA:HP β CD) različitih koncentracija. Pripremljene reakcione smeše su inkubirane 20, 30, 60 i 120 min na sobnoj temperaturi u mraku i merena je absorbanca na $\lambda=517$ nm na spektrofotometru (UV-VIS VARIAN-Cary 100 Conc). Za navedene reakcione smeše ista merenja izvršena su odmah nakon pripremanja, bez inkubacije. Takođe je merena absorbanca na istoj talasnoj dužini za čist metanolni rastvor DPPH radikala (1 cm³ DPPH radikala date koncentracije kome je dodato 2,5 cm³ metanola), i

za uzorke BHA i inkluzioni kompleks BHA:HP- β -CD bez prisustva DPPH radikala (2,5 cm³ uzorka kome je dodat 1 cm³ metanola). Za slepu probu je korišćen metanol.

Stepen neutralisanja DPPH radikala se izračunava prema jednačini 17 (Stanojević i sar., 2008):

$$\text{Stepen neutralisanja DPPH radikala (\%)} = 100 - \left[(A_U - A_B) \times \frac{100}{A_K} \right] \quad (17)$$

A_U - apsorbanca „uzorka“ na 517 nm. „Uzorak“ metanolni rastvor BHA/inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD tretiran rastvorom DPPH radikala.

A_B = apsorbanca „blank-a“ na 517 nm. „Blank“ – metanolni rastvor BHA/inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD koji ne sadrži DPPH radikal.

A_K = apsorbanca „kontrole“ na 517 nm. „Kontrola“ – metanolni rastvor DPPH radikala (1 cm³ DPPH radikala koncentracije 3×10^{-4} mol/dm³ kome je dodato 2,5 cm³ metanola).

3.4.2.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti primenom ABTS metode

ABTS test je izveden prema metodi koju su razvili Re i saradnici (Re i sar., 1999) i predstavlja merenje procenta inhibicije ABTS radikal katjona. Ovaj test je osetljiviji i traje kraće od DPPH testa, primenjuje se pri različitim pH vrednostima i u organskim i neorganskim rastvaračima što ga čini pogodnim za primenu kod različitih uzoraka.

ABTS radikal katjon (ABTS^{•+}) nastaje u reakciji 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-sulfonska kiselina (ABTS) rastvora (7×10^{-3} mol/dm³) sa 2,4 mM kalijum persulfatom, K₂S₂O₈ (1:1 v/v), u toku 12-18 h, na +4 °C, u mraku („stock“ rastvor). Nakon formiranja radikala, napravljen je radni rastvor ABTS tako što je „stock“ rastvor razblažen etanolom do postizanja vrednosti apsorbance od 0,7 na $\lambda=734$ nm.

Napravljena je serija metanolnih rastvora BHA (0,156-5 mg/cm³) i inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD (1,03-33 mg/cm³) u metanolu. U 0,1 cm³ rastvora BHA/inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD različitih koncentracija dodato je 1,8 cm³ ABTS radnog rastvora i 2,1 cm³ metanola i merena apsorbanca reakcione smeše (A_U) na 734 nm nakon 12 i 24 minuta inkubacije u mraku, na sobnoj temperaturi. Apсорbanca na 734 nm je određena za čist radni rastvor ABTS razblažen u navedenom odnosu (1,8 cm³ ABTS radikala date koncentracije kome je dodato 2,2 cm³ etanola) (A_K), za BHA i inkluzioni

kompleks BHA:HP- β -CD pre tretiranja ABTS radikalom (0,1 cm³ ispitivanih uzoraka kojima je dodato 3,9 cm³ etanola) (A_B). Metanol je korišćen kao slepa proba.

Procenat inhibicije ABTS radikala, tj. ABTS „scavenging“ aktivnost izražava se kao procenat neutralisanja ABTS radikala i izračunava prema jednačini 18, identičnoj onoj koja se koristi za izračunavanje kapaciteta hvatanja slobodnih DPPH radikala (Dimitrijević i sar., 2015; Dudonne i sar., 2009).

$$\text{Kapacitetneutralisanja ABTS radikala (\%)} = 100 - \left[(A_U - A_B) \times \frac{100}{A_K} \right] \quad (18)$$

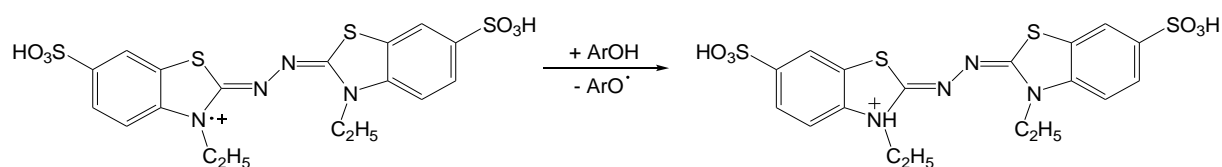
A_U = Apsorbanca „uzorka“ na 734 nm. „Uzorak“ – metanolni rastvor BHA/inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD tretiran rastvorom ABTS radikala.

A_B = Apsorbanca „blank-a“ na 734 nm. „Blank“ – metanolni rastvor BHA/inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD koji nije tretiran rastvorom ABTS radikala.

A_K = Apsorbanca „kontrole“ na 734 nm. „Kontrola“ – rastvor ABTS radikala (razblažen u odnosu: 1,8 cm³ radnog rastvora ABTS radikala + 2,2 cm³ metanola).

Za određivanje antioksidativne aktivnosti uzoraka primenjena je UV/VIS spektroskopija (Cole Parmer Spectrophotometer).

Na slici 18 je prikazana inhibicija ABTS^{•+} katjon radikala antioksidansom mehanizmom transfera protona, HAT. Pri tom se zeleno obojeni katjon radikal obezbojava (Sadeer i sar., 2020).



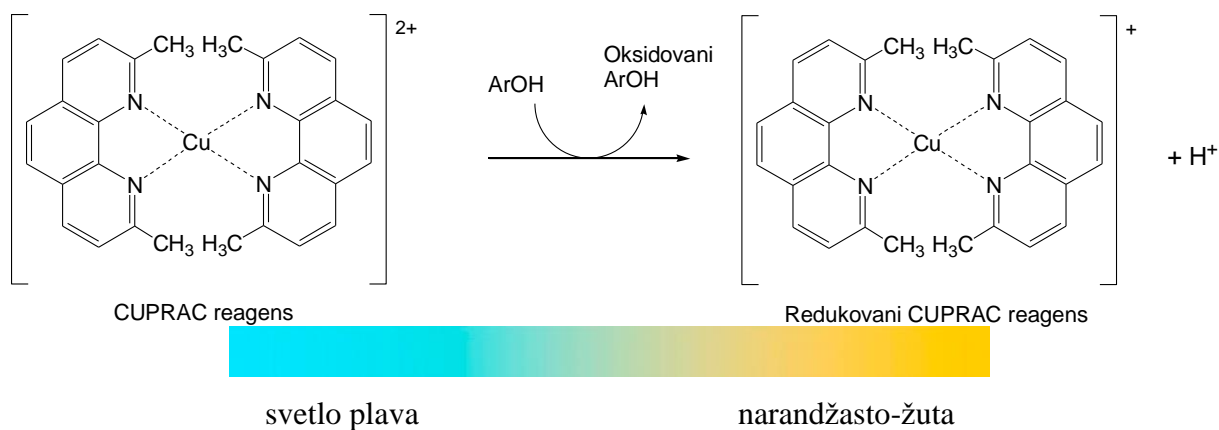
plavo-zelena

bledo plava

Slika 18. Inhibicija ABTS^{•+} katjon radikala antioksidansom

3.4.2.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti primenom CUPRAC metode

CUPRAC metoda se zasniva na sposobnosti antioksidansa da redukuje helatni kompleks bis(neocuproin) bakar(II) katjon (CUPRAC) (plave boje) do redukovanog bis(neocuproin) bakar(I) katjona (narandžasto-žute boje) kao što je prikazano na slici 19 (Sadeer i sar., 2020).

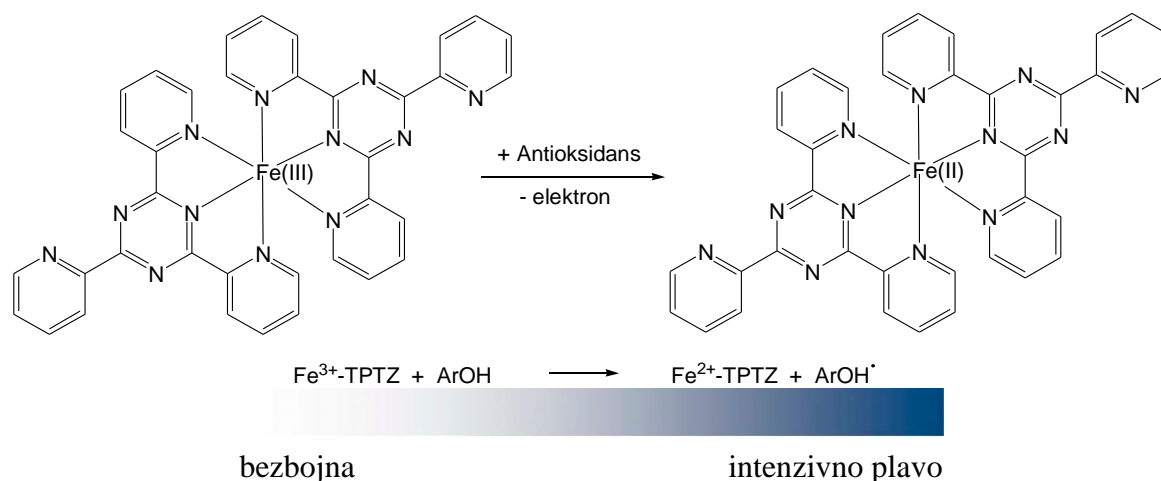


Slika 19. Redukcija bis(neocuproin) bakar(II) katjona do bis(neocuproin) bakar(I) katjona antioksidansom

Za određivanje antioksidativne aktivnosti primenom CUPRAC metode rastvor uzorka ($0,5 \text{ cm}^3$ BHA ili inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD, koncentracije 1 mg/cm^3) je dodat u prethodno napravljenu reakcionu smešu koja sadrži bakar(II) hlorid, CuCl_2 (1 cm^3 , 10 mM), neocuproin (1 cm^3 , $7,5 \text{ mM}$) i amonijum-acetatni pufer (1 cm^3 , 1 M , pH 7,0). Takođe je pripremljena slepa proba dodavanjem rastvora uzorka ($0,5 \text{ cm}^3$) u reakcionu smešu (3 cm^3) bez CuCl_2 . Zatim su očitane apsorbance uzoraka i slepe probe na 450 nm nakon 30 min inkubacije na sobnoj temperaturi. Apsorbanca slepe probe je oduzeta od apsorbance uzorka. Aktivnost CUPRAC-a je izražena u miligramima ekvivalenta troloksa (mg TE/g uzorka).

3.4.2.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti primenom FRAP metode

FRAP je metoda kojom se određuje antioksidativna moć uzorka na osnovu njegove sposobnosti da redukuje Fe^{3+} jon do Fe^{2+} jona. Mehanizam kojim se ostvaruje antioksidativna aktivnost je transfer elektrona, SET (eng. *single electron transfer*). U reakciji antioksidans je donor elektrona i redukuje oksidans, kompleks gvožđe(III)-2,4,6-tripiridil-S-triazin [Fe^{3+} -TPTZ] do intenzivno plavog kompleksa gvožđe(II)-2,4,6-tripiridil-S-triazina [Fe^{2+} -TPTZ] (Slika 20) (Sadeer i sar., 2020).



Slika 20. Redukcija kompleksa $[\text{Fe}^{3+}\text{-TPTZ}]$ do $[\text{Fe}^{2+}\text{-TPTZ}]$ antioksidansom

Antioksidativna aktivnost BHA i inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD primenom FRAP metode određena je po metodi Benzie-a i Strain-a (Benzie i sar., 1996), sa izvesnim modifikacijama (Stanojević i sar., 2013).

Za potrebe konstruisanja standardne prave pripremljen je FRAP reagens od acetatnog pufera (300 mmol/dm^3 , $\text{pH} = 3,6$), TPTZ reagensa (10 mmol/dm^3 u 40 mmol/dm^3 HCl) i $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ (20 mmol/dm^3) u odnosu 10:1:1. Odmeri se 3 cm^3 FRAP reagensa u pet epruveta i doda po $0,1 \text{ cm}^3$ standardnog rastvora $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,2\text{-}1 \text{ mmol/dm}^3$). Apsorbanca se meri na 593 nm u odnosu na slepu probu (3 cm^3 FRAP reagensa + $0,1 \text{ cm}^3$ vode). Na osnovu poznatih koncentracija i izmerenih vrednosti apsorbance konstruiše se kalibraciona kriva (Stanojević i sar., 2015).

Za određivanje antioksidativne aktivnosti BHA i inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD u svaku epruvetu se doda po $0,1 \text{ cm}^3$ navedenih uzoraka i 3 cm^3 FRAP reagensa i nakon 30 minuta inkubacije na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ na vodenom kupatilu meri se apsorbanca na 593 nm , u odnosu na slepu probu. Iz jednačine kalibracione krive se određuje koncentracija (mmol/dm^3) Fe^{2+} u uzorku. Ova vrednost se preračunava na masu BHA ili inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD ($\text{mg Fe}^{2+}/\text{g}$ uzorka) i naziva se FRAP vrednost.

Koncentracija Fe^{2+} ekvivalenata (FRAP vrednost) u svakom uzorku očitana je direktno sa kalibracione krive (jednačina 19) na osnovu koje se određuje koncentracija Fe^{2+} u uzorcima i preračunava na masu uzorka.

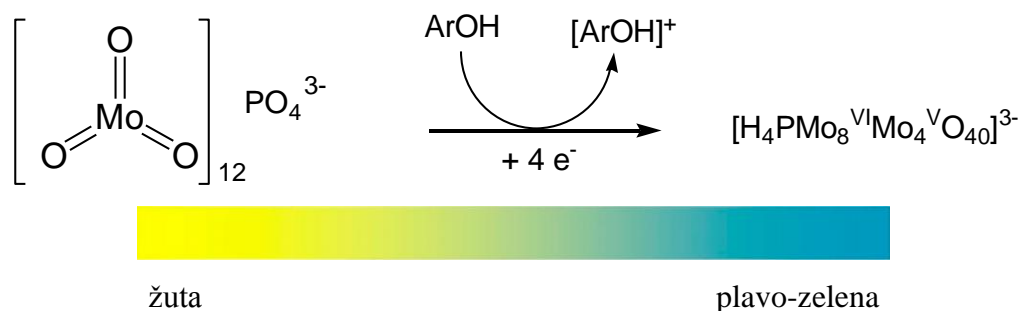
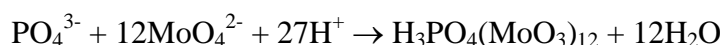
$$A = 0,00495 + 0,65743 \times c \quad (19)$$

gde je: A – apsorbanca na 593 nm , c - koncentracija $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ u mmol/dm^3 , $R^2=0,999$.

3.4.2.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti primenom fosfomolibdenske metode

Fosfomolibdenska metoda se bazira na redukciji Mo(VI) do Mo(V) tj. stvaranjem zelenog fosfata/Mo(V) kompleksa koji pokazuje maksimum apsorbanije na 695 nm (Prieto i sar., 1999).

Za određivanje antioksidativne aktivnosti primenom ove metode korišćen je rastvor BHA ili inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD, koncentracije 1 mg/cm³ koji se pomeša sa 3 cm³ rastvora reagensa (0,6 M sumporna kiselina, 28 mM natrijum fosfat i 4 mM amonijum molibdat). Apsorbanca uzorka je merena na 695 nm nakon 90 min inkubacije uzoraka na 95 °C. Ukupni antioksidativni kapacitet je izražen kao broj milimola troloks ekvivalenata po gramu uzorka (mmol TE/g uzorka). Metoda je zasnovana na sledećim hemijskim reakcijama (Sadeer i sar., 2020) i šematski prikazana na slici 21:

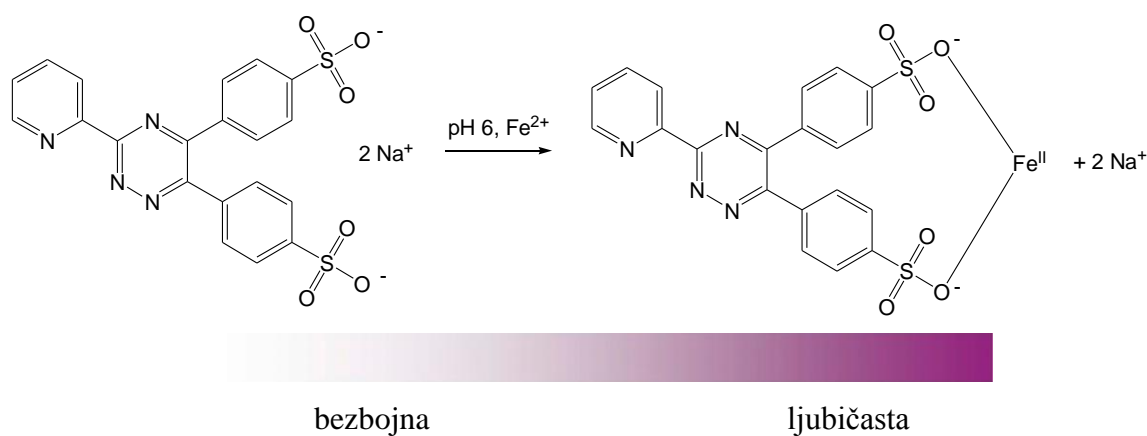


Slika 21. Reakcioni mehanizam fosfomolibdenske metode za određivanje antioksidativne aktivnosti

3.4.2.6. Određivanje antioksidativne aktivnosti heliranjem metala

Za ispitivanje aktivnosti heliranja metala rastvor uzorka (BHA ili inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD koncentracije 1 mg/cm³) se dodaje u rastvor FeCl₂ (0,05 cm³, 2 mM). Reakcija je inicirana dodavanjem 5 mM ferozina (0,2 cm³). Uporedo je pripremljena i slepa proba dodavanjem rastvora uzorka (2 cm³) u rastvor FeCl₂ (0,05 cm³, 2 mM) i vode (0,2 cm³) bez ferozina. Zatim su očitane apsorbance uzorka i slepe probe na 562 nm nakon 10 min inkubacije na sobnoj temperaturi. Apsorbanca slepe probe je oduzeta od apsorbance uzorka. Aktivnost heliranja metala izražena je u miligramima ekvivalenata soli dinatrijum

etilendiamin tetraacetata EDTA po gramu uzorka (mg EDTAE/g uzorka). Na slici 22 je prikazana šema heliranja ferozina pomoću fero jona (Sadeer i sar., 2020).



Slika 22. Reakcioni mehanizam heliranja metala

3.4.3. Uticaj biohanina A i inkluzionog kompleksa na aktivnost enzima

Inhibitorne aktivnosti BHA i inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD ispitane su na enzime holinesteraze (ChE): acetilholinesterazu (AChE) i butirilholinesterazu (BuChE) Elmanov-om metodom, tirozinazu metodom dopahrom-a, α -amilazu primenom metode jod/kalijum jodida i α -glukozidazu primenom *p*-nitrofenil- α -glukopiranozida (pNPG) takozvane pNPG metode (Uysal i sar., 2017).

3.4.3.1. Uticaj na aktivnost holinesteraza (ChE)

Za test inhibitorne aktivnosti BHA i BHA:HP- β -CD na ChE rastvor uzorka (BHA ili inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD koncentracije 1 mg/cm³) pomešan je sa 125 μ l 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoeve kiseline) (DTNB) i 25 μ l acetilholinesterazom (AChE) ili butirilholinesterazom (BuChE) u Tris-HCl puferu pH 8 u mikroploči sa 96 bunarića i inkubirana 15 minuta na 25 °C. Reakcija je zatim započeta dodavanjem 25 μ l acetiltioholin jodida (ATCI) ili butiriltioholin hlorida (BTCI). Slepa proba je pripremljena dodavanjem rastvora uzorka u sve reagense bez rastvora enzima (AChE ili BuChE). Uzorak i apsorbancia slepe probe su očitani na 405 nm posle 10 min inkubacije na 25 °C. Apsorbancia slepe probe je oduzeta od apsorbanci uzoraka. Inhibitorna aktivnost na holinesteraze je izražena kao ekvivalent galantamina po gramu uzorka (mg_{GALAE}/g uzorka).

3.4.3.2. Uticaj na aktivnost tirozinaze

Za određivanje inhibitorne aktivnosti BHA i BHA:HP- β -CD na tirozinazu pripremljeni su rastvori uzoraka (BHA ili inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD koncentracije 1mg/cm³), pomešani sa rastvorom tirozinaze (40 μ l, Sigma) i fosfatnim puferom (100 μ l, pH 6,8) u mikroploči sa 96 bunarića i inkubirani 15 minuta na 25 °C. Reakcija je zatim započeta dodatkom 40 μ l L-3,4-dihidroksifenilalanina (L-DOPA). Slepa proba je pripremljena dodavanjem rastvora uzorka u sve reagense bez rastvora enzima tirozinaze. Apsorbance uzoraka i slepe probe očitane su na 492 nm nakon 10 min inkubacije na 25 °C. Apsorbanca slepe probe je oduzeta od apsorbance uzorka i inhibitorna aktivnost na tirozinazu je izražena kao ekvivalenti kojične kiseline po gramu uzorka (mgKAE/g uzorka).

3.4.3.3. Uticaj na aktivnost α -amilaze

Za određivanje inhibitorne aktivnosti BHA i BHA:HP- β -CD na α -amilazu pripremljeni rastvori uzoraka (BHA ili inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD koncentracije 1mg/cm³) pomešani su sa 50 μ l rastvora α -amilaze u fosfatnom puferu (pH 6,9 sa 6 mM natrijum hlorida) na mikroploči sa 96 bunarića i inkubirani 10 min na 37 °C. Posle predinkubacije, reakcija je započeta dodatkom 50 μ l 0,05% rastvora skroba. Na isti način pripremljena je slepa proba dodavanjem rastvora uzoraka svim reagensima bez enzima α -amilaze. Reakciona smeša je inkubirana 10 minuta na 37 °C. Reakcija je zatim zaustavljena dodatkom 25 μ l 1 M HCl. Zatim je usledilo dodavanje 100 μ l rastvora jod/kalijum jodida. Apsorbance uzoraka i slepe probe su očitane na $\lambda=630$ nm. Apsorbanca slepe probe je oduzeta od apsorbance odgovarajućih uzoraka i inhibitorna aktivnost na α -amilazu izražena kao ekvivalent akarboze po gramu uzorka (mmol ACE/g uzorka).

3.4.3.4. Uticaj na aktivnost α -glukozidaze

Za određivanje inhibitorne aktivnosti BHA i BHA:HP- β -CD na α -glukozidazu pripremljeni rastvori uzoraka (BHA ili inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD koncentracije 1mg/cm³) pomešani su sa 50 μ l glutaciona, 50 μ l rastvora α -glukozidaze u fosfatnom puferu (pH 6) i 50 μ l 4-nitrofenil- α -D-glukopiranozida u mikroploči sa 96 bunarića i inkubirani 15

minuta na 37 °C. Na isti način pripremljena je slepa proba dodavanjem rastvora uzoraka svim reagensima bez enzima α -glukozidaze. Reakcija je zatim zaustavljena dodatkom 50 μ l 0,2 M natrijum karbonata. Apsorbance uzoraka i slepe probe su očitane na talasnoj dužini $\lambda=400$ nm. Apsorbanca slepe probe je oduzeta od apsorbance uzorka i inhibitorna aktivnost na α -glukozidazu je izražena kao ekvivalenti akarboze po gramu uzorka (mmol ACE/g uzorka).

3.4.3.5. Inhibicija enzima određena molekulskim modelovanjem

Baza podataka o proteinima (PDB) je korišćena za humanu AChE (PDB ID: 6O52) (Gerlits i sar., 2019), BuChE (PDB ID: 6EKP) (Rosenberry i sar., 2017) i α -amilazu (PDB ID: 1B2I) (Maurus i sar., 2008). *Priestia megaterium* tirozinaza (6KKSD) (Ielo i sar., 2019) i *Mus musculus* α -glukozidaza (7KBJ) (Karade i sar., 2021) su korišćeni kao šabloni za izgradnju njihovih ljudskih modela koristeći njihove UniProt sekvence P14679, odnosno P0DUB6 (Eltayeb i sar., 2023; Fahmy i sar., 2023). 3D strukture BHA i HP- β -CD su preuzete iz PubChem baze podataka (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) i optimizovane korišćenjem UCSF Chimera (Pettersen i sar., 2004). Orijentacija BHA u hidrofobnoj šupljini HP- β -CD u inkluzionom kompleksu BHA:HP- β -CD određena je korišćenjem sličnog protokola za molekulsko modelovanje koji su primenili Al-Abboodi i sar. (Al-Abboodi i sar., 2021). Napolarni atomi vodonika su spojeni i gasštajgerova naelektrisanja su dodata svim atomima koristeći softver MGLTools 1.5.6. Modelovanje je izvršeno pomoću AutoDock-a 4.2.6, programa koji se najviše primenjuje u simulaciji povezivanja malih molekula sa receptorima na velikim proteinskim molekulima (<https://autodock.scripts.edu>; Morris i sar., 2009) prema protokolu Llorent-Martíneza (Llorent-Martínez i sar., 2022), a interakcija protein-ligand je vizuelizovana korišćenjem Biovia DS Visualizer v4.5 programa.

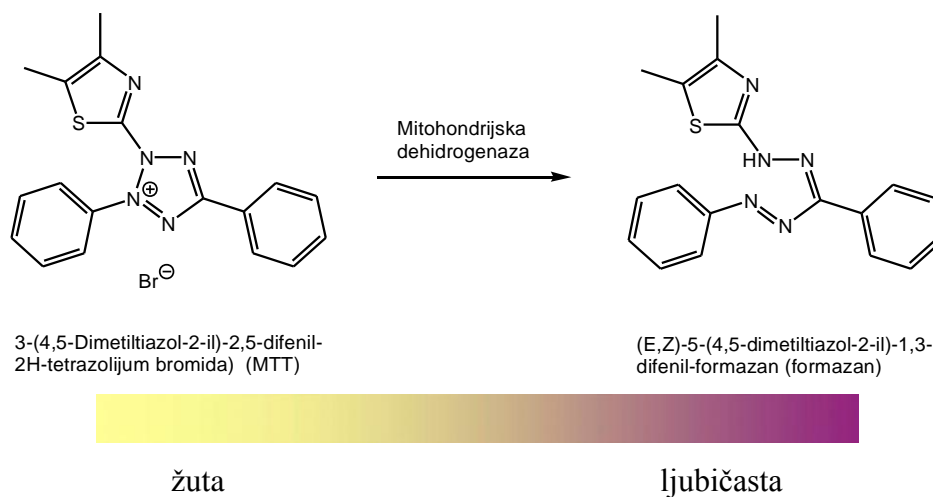
3.4.4. Test proliferacije ćelija

Za test ćelijske proliferacije, korišćene su ćelije fibroblasta L929 koje su zasađene u sterilne ploče sa 24 bunariča ravnog dna (Greiner Bio-One, Nemačka) pri gustini od 1×10^4 ćelije po bunariću. Dvadeset četiri sata nakon postavljanja ćelijske kulture, kulturama su dodati uzorci elektrospिनovanih vlakana PLA i PVP bez i sa 2 i 5% BHA (test direktnog kontakta). Dimenzije ispitivanih uzoraka bile su 1×1 cm. Ćelije inkubirane samo sa

medijumom bez uzoraka (kompletan DMEM-Dulbecco modifikovani Iglov medijum (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)) korišćene su kao kontrolna ćelijska kultura (netretirane ćelije). Svaki testirani uzorak je ispitan u tri ponavljanja, kao i kontrolna kultura. Ćelije su inkubirane sa testiranim uzorcima ili kontrolnim medijumom naredna 72 sata. Nakon završetka inkubacionog perioda, urađen je MTT test prema ranije utvrđenom protokolu (Savić i sar., 2015).

MTT test se široko koristi za procenu proliferacije ćelija i zasniva se na redukciji 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolijum bromida (tetrazolijumove soli MTT) mitohondrijalnim dehidrogenazama živih ćelija, što rezultira formiranjem kristala formazana koji odgovara broju ćelija (slika 23). Ćelije su isprane fiziološkim rastvorom fosfatnog pufera, a zatim je ćelijama dodato 300 μ l MTT rastvora po bunariću (koncentracije 1 mg/cm³). Ćelije su inkubirane sa MTT rastvorom naredna tri sata, nakon čega je usledilo rastvaranje kristala formazana sa 2-propanolom. Apsorbanca rastvorenog formazana je merena na Multiskan Ascent fotometrijskom čitaču ploča (Thermo Labsystems, Helsinki, Finska) na talasnoj dužini od 540 nm sa talasnom dužinom korekcije od 650 nm. Srednje vrednosti apsorbance su izračunate za svaki ispitivani uzorak, kao i za kontrolnu ćelijsku kulturu. Stopa proliferacije ćelija izračunata je prema jednačini 20:

$$\% \text{ proliferacije } \text{ćelija} = (\text{vrednost apsorbance } \text{ćelija tretiranih elektrosponovanim vlaknima} / \text{vrednost apsorbance neobrađenih } \text{ćelija}) \times 100 \quad (20)$$



Slika 23. Redukcija MTT do formazana mitohondrijskim dehidrogenazama

3.4.5. *In vitro* test zarastanja rana

U cilju ispitivanja efekta elektrospinovanih PLA i PVP vlakana bez i sa 2 i 5% BHA na zarastanje rana *in vitro*, izvršen je test „ogrebotine“ prema objavljenom protokolu (Stojanović i Najman, 2019; Tasić-Kostov i sar., 2019). Prema ovom protokolu L929 fibroblasti su zasejani u sterilne ploče sa 48 bunarića i inkubirani u standardnim uslovima ćelijske kulture (37 °C, 5% CO₂ i u vlažnoj sredini). Nakon dostizanja 100% konfluencije, stvorena je rana („ogrebotina“) u ćelijskom monosloju, u sredini svakog bunarića. Ćelije su zatim isprane puferom i dodati su uzorci elektrospinovanih vlakana bez i sa 2 i 5% BHA, ili kompletni DMEM koji sadrži 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS), 2 mM stabilnog glutamina i antibiotičko-antimikotičkog rastvora. Svaki uzorak, kao i kontrolni, testiran je u tri ponavljanja i eksperiment je izveden dva puta pod istim uslovima. Fibroblasti su inkubirani sa uzorcima elektrospinovanih vlakana bez i sa 2 i 5% biohanina A, a efekat na zatvaranje rana praćen je nakon tri dana inkubacije. Mikroskopska analiza zatvaranja rane urađena je na invertnom svetlosnom mikroskopu, Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Nemačka), a morfometrijska merenja su obavljena u softveru ZEN 2 (plavo izdanje) (Carl Zeiss, Oberkochen, Nemačka) nakon snimanja. Stepem zatvaranja rane određivan je merenjem širine površine rane pre inkubacije elektrospinovanim vlaknima PLA i PVP sa i bez BHA i tri dana nakon inkubacije sa uzorcima kao i sa samim medijumom (kontrola), i izražen je kao procenat zatvaranja rane.

3.4.6. Statistička analiza

Rezultati testa proliferacije MTT, kao i *in vitro* testa zarastanja rana u najmanje dva nezavisna eksperimenta, analizirani su primenom jednosmerne analize varijanse (ANOVA). Rezultati MTT testa su izraženi kao procenat proliferacije ćelije sa relativnom standardnom devijacijom izračunatom prema kontrolnoj kulturi ćelija za koje se smatralo da je stopa proliferacije ćelija 100%. Kao statistički značajne razlike smatrane su one za koje je $p < 0,05$. Analiza podataka je izvršena korišćenjem softverskog paketa SPSS Statistics verzija 20.0 (IBM, Čikago, Illinois, SAD).

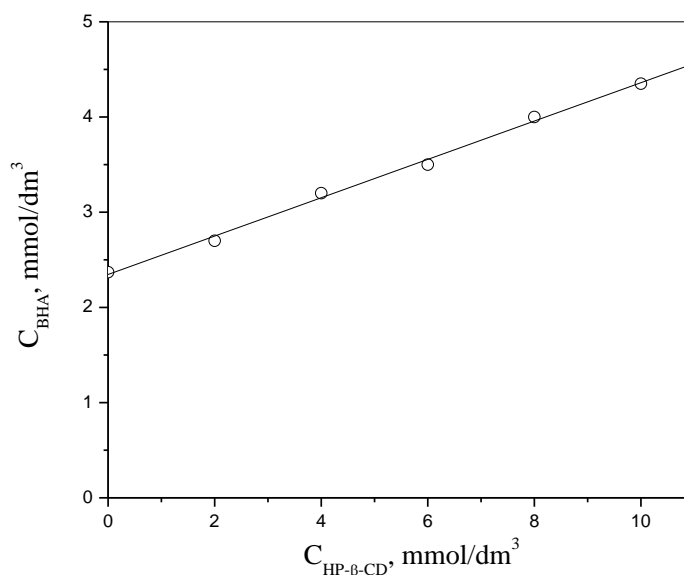
4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. INKLUZIONI KOMPLEKS BIOHANINA A SA CIKLODEKSTRINOM

4.1.1. Studija fazne rastvorljivosti

Na slici 24 prikazan je dijagram fazne rastvorljivosti BHA u prisustvu različitih koncentracija HP- β -CD u 42%-tnom (v/v) etanolu na 25 °C. Dijagram fazne rastvorljivosti odgovara tipu A_L krive, i pokazuje da se rastvorljivost BHA linearno povećava sa povećanjem koncentracije HP- β -CD. Ova činjenica ukazuje na formiranje inkluzionog kompleksa BHA i HP- β -CD u molском odnosu 1:1.

U tabeli 8 prikazane su vrednosti odsečka i nagiba očitane sa faznog dijagrama rastvorljivosti i konstanta stabilnosti izračunata sa tim vrednostima, za inkluzioni kompleks BHA:HP- β -CD na 25 °C. Vrednost konstante stabilnosti je 104,6 dm³/mol i ukazuje da je kompleks relativno stabilan. Rastvorljivost BHA u 42%-tnom (v/v) etanolu na 25 °C je $S_0 = 2,39$ mmol/dm³, dok se rastvorljivost BHA koji je kompleksiran sa HP- β -CD (10 mmol/dm³) uvećava 1,82 puta.



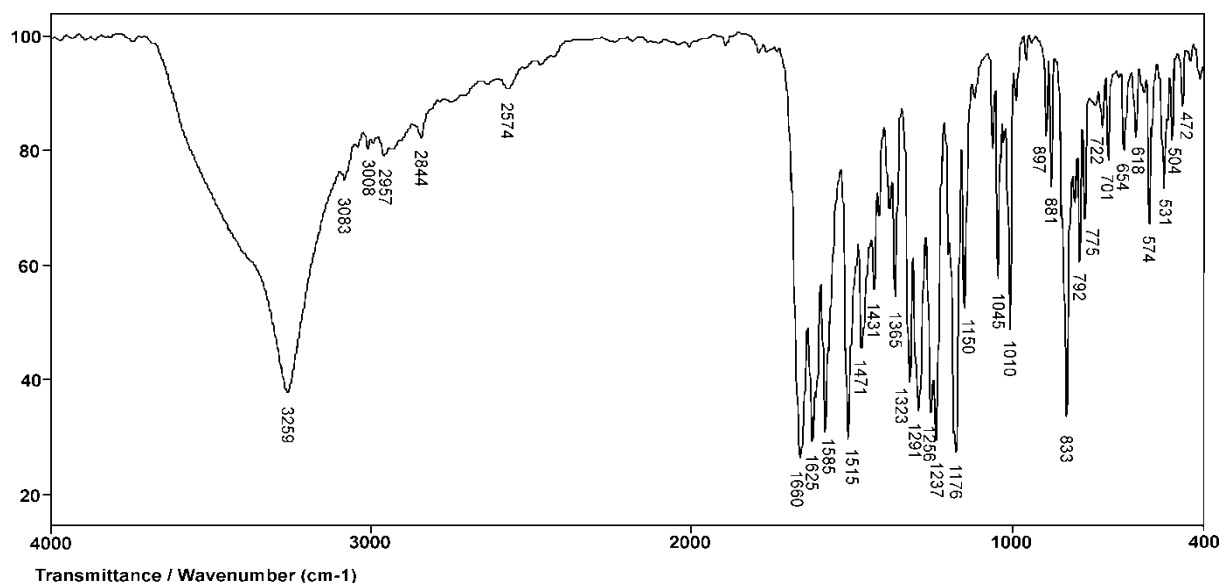
Slika 24. Dijagram fazne rastvorljivosti BHA u prisustvu različitih koncentracija HP- β -CD u 42% (v/v) etanolu na 25 °C

Tabela 8. Vrednosti odsečka, nagiba i konstante stabilnosti dobijene iz dijagrama fazne rastvorljivosti za inkluzioni kompleks BHA:HP- β -CD na 25 °C.

Kompleks	Odsečak (mmol/dm ³)	Nagib	R ²	Konstanta stabilnosti, K _S (dm ³ /mol)
BHA:HP- β -CD	2,370	0,200	0,998	104,6

4.1.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

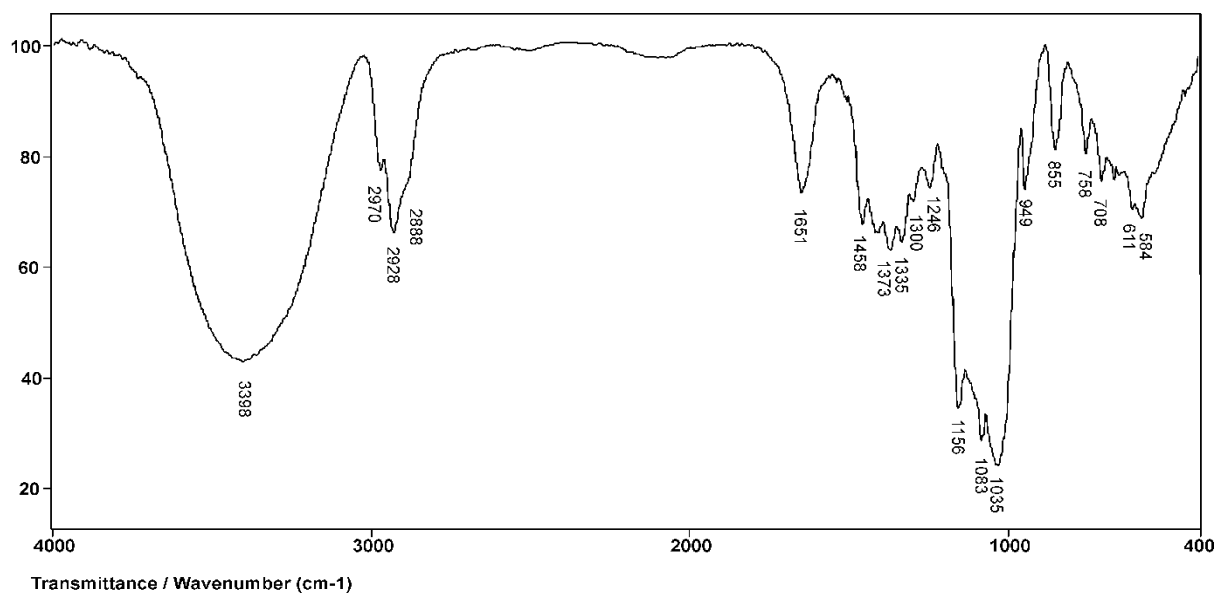
Na slikama 25-28 prikazani su FTIR spektri BHA, HP- β -CD, inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD i fizičke smeše BHA i HP- β -CD. FTIR spektar BHA pokazuje karakterističnu jaku i široku apsorpcionu traku na 3259 cm⁻¹ koja potiče od O-H valencione vibracije (Slika 25). Apsorpciona traka na 2844 cm⁻¹ je rezultat simetričnih valencionih vibracija C-H iz metoksi grupe. Oštra apsorpciona traka na 1660 cm⁻¹ potiče od valencionih vibracija karbnilne grupe (C=O). Apsorpcione trake na 1625, 1585 i 1515 cm⁻¹ potiču od C=C valencionih vibracija aromatičnog prstena. Valencione vibracije C–O grupe zapažaju se u opsegu 1237-1256 cm⁻¹ (Sachdeva, 2016).



Slika 25. FTIR spektar biohanina A

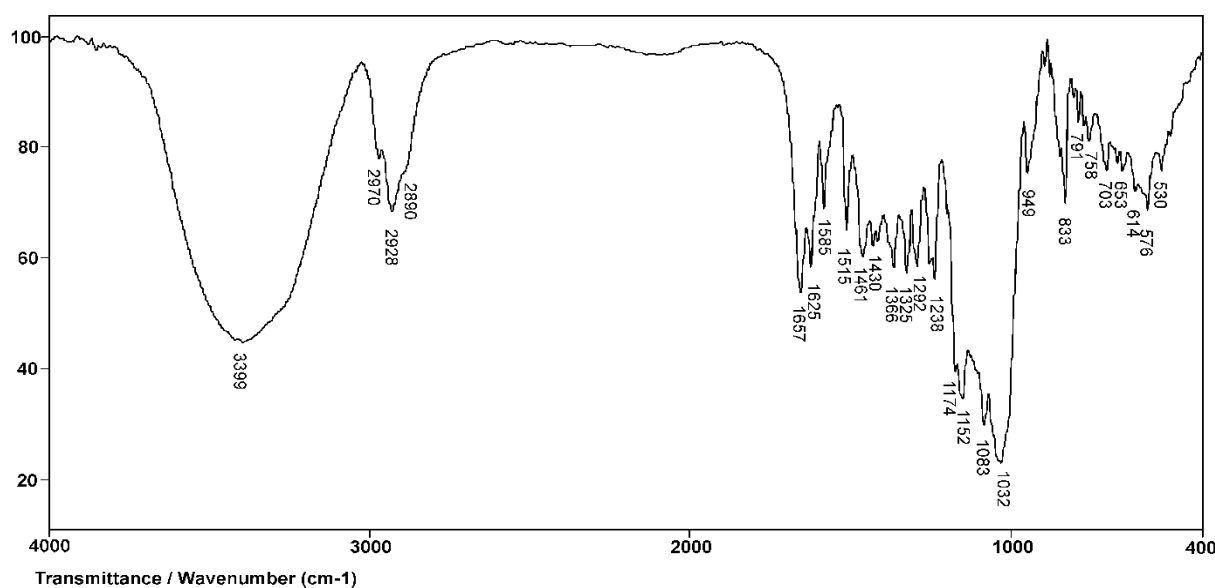
Na FTIR spektru HP- β -CD zapaža se nekoliko karakterističnih traka, uključujući jaku i široku traku na 3398 cm⁻¹ od O-H valencionih vibracija kao i trake na 2970 i 2928 cm⁻¹ koje potiču od C-H valencionih vibracija CH₃ grupe (Slika 26). Apsorpciona traka na 1651

cm^{-1} je rezultat H-O-H deformacionih vibracija (savijanje), a trake na 1156 i 1035 cm^{-1} potiču od C-O i C-O-C valencijonih vibracija, redom.



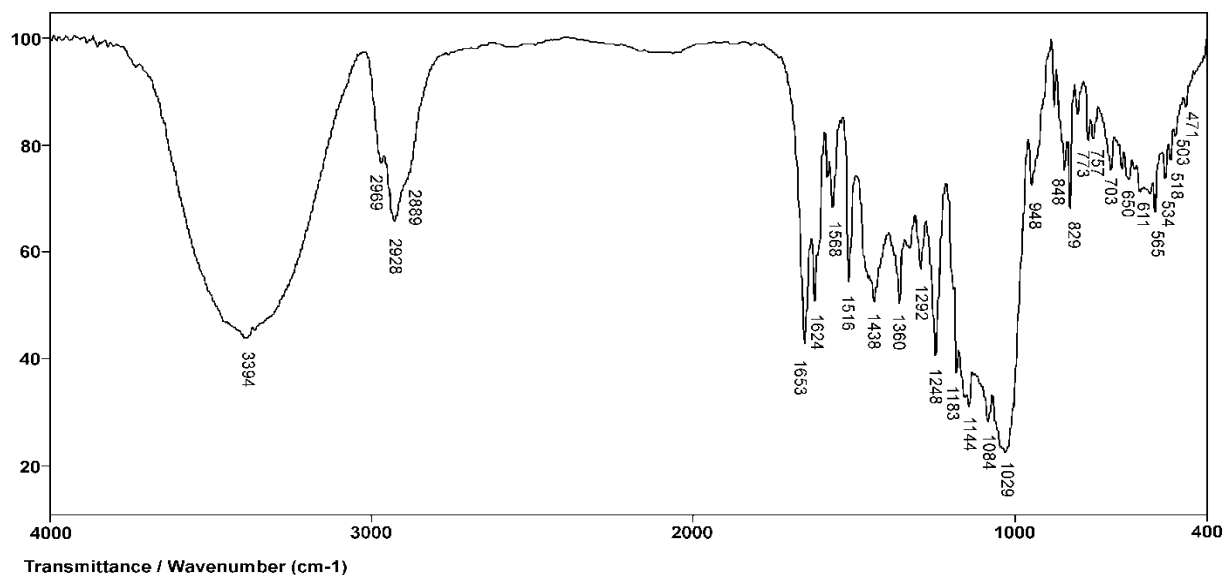
Slika 26. FTIR spektar 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina

U spektru inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD (Slika 27), neke karakteristične trake koje su inače prisutne u spektru BHA su pomerene ili ih nema. Valencione vibracije O-H i C=O veza BHA nisu jasno vidljive u spektru inkluzionog kompleksa. Ove promene u FTIR spektru inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD ukazuju na prisustvo interakcija između BHA i CD.



Slika 27. FTIR spektar inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD

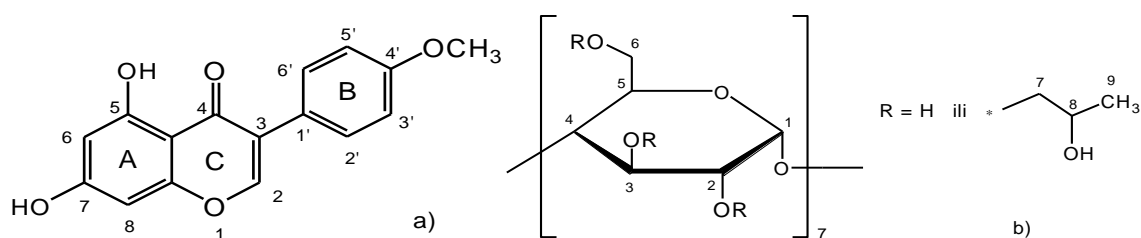
Za razliku od FTIR spektra inkluzionog kompleksa, FTIR spektar fizičke smeše BHA i HP- β -CD (Slika 28) predstavlja superpoziciju spektara BHA i HP- β -CD. Spektar je veoma sličan spektru čistog HP- β -CD, zato što se apsorpcione trake od oba molekula preklapaju u većem delu spektralnih regiona. Ovo ukazuje da nema jakih asocijacija između molekula tipa gost-domaćin u fizičkoj smeši, što je i očekivano.



Slika 28. FTIR spektar fizičke smeše BHA i HP- β -CD

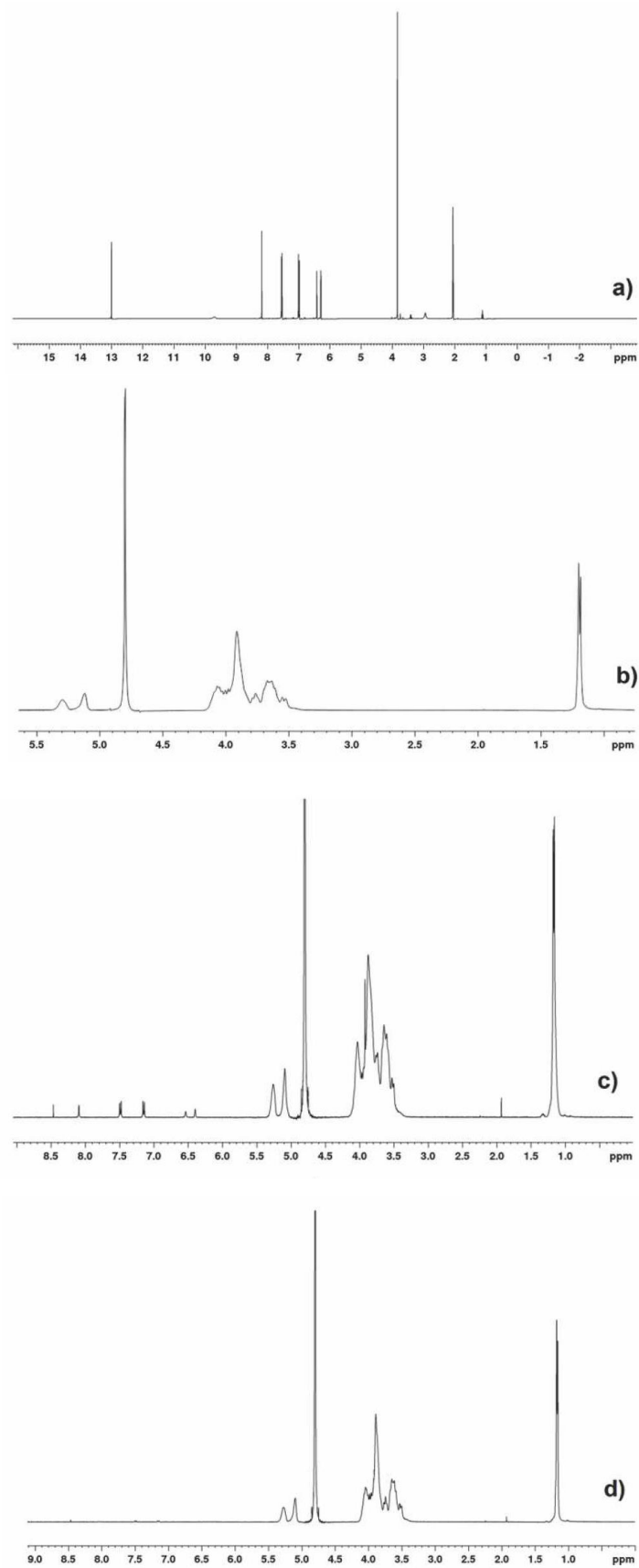
4.1.3. Spektroskopija protonske nuklearne magnetne rezonance ($^1\text{H-NMR}$)

Strukture BHA i HP- β -CD sa jasno označenim pozicijama atoma su prikazane na slikama 29a i 29b, redom.



Slika 29. Strukture BHA (a) i HP- β -CD sa pozicijama atoma (b)

$^1\text{H-NMR}$ spektri BHA, HP- β -CD i BHA:HP- β -CD inkluzionog kompleksa prikazani su na slici 30. Zbog niske rastvorljivosti BHA, $^1\text{H-NMR}$ spektar BHA nije sniman u D_2O . $^1\text{H-NMR}$ spektar BHA:HP- β -CD, rastvoren u D_2O , potvrđuje zadovoljavajuću rastvorljivost BHA posle kompleksiranja što je u skladu sa rezultatima opisanim u Odeljku 4.4.1.



Slika 30. $^1\text{H-NMR}$ spektar BHA (a), HP- β -CD (b), inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD (c) i fizičke smeše BHA i HP- β -CD (d)

Hemijska pomeranja (δ) protona HP- β -CD u inkluzionom kompleksu i bez BHA su prikazana u tabeli 9. Promene u hemijskim pomeranjima su izračunate na sledeći način: $\Delta\delta = \delta_{\text{kompleks}} - \delta_{\text{nekompleksiran}}$. Značajne promene u hemijskim pomeranjima su zapažene za H-5 i H-3 protone (-0,028 ppm i -0,026 ppm, redom), dok su H-2 i H-4 protoni pokazivali vrlo mala pomeranja ($\Delta\delta < 0,015$ ppm) posle kompleksacije. Poznato je da su H-3 i H-5 protoni orijentisani ka unutrašnjosti šupljine HP- β -CD, dok su H-2 i H-4 orijentisani ka spoljašnjoj površini. Pošto su H-5 i H-3 protoni HP- β -CD pokazali značajne promene u hemijskim pomeranjima, može se pretpostaviti da su učestvovali u interakcijama sa BHA, tj. da su interakcije uspostavljene sa unutrašnje strane HP- β -CD.

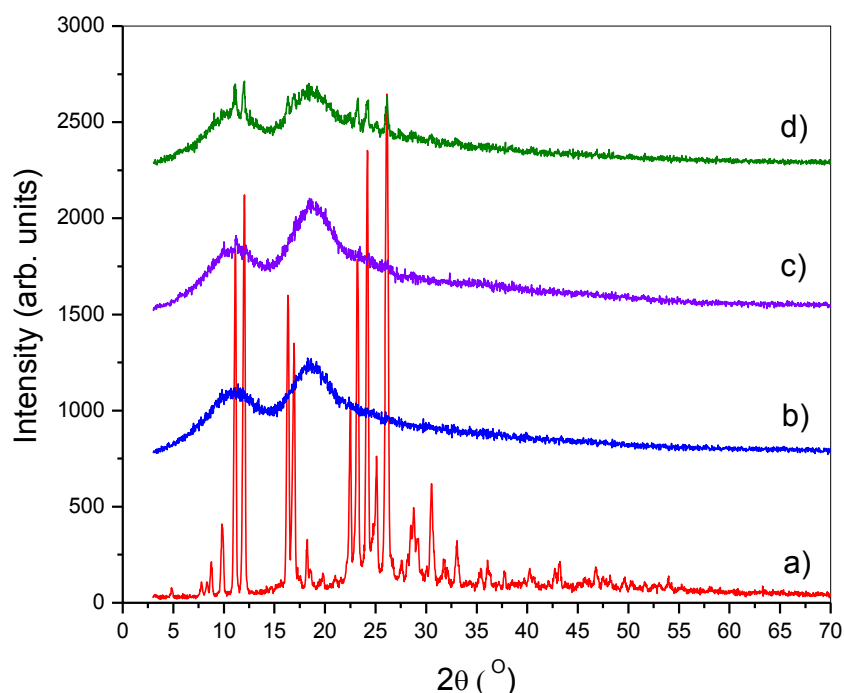
Tabela 9. Hemijska pomeranja (δ , ppm) signala HP- β -CD i BHA u slobodnom i kompleksiranom stanju i promene hemijskih pomeranja ($\Delta\delta$)

Protoni	Nekompleksiran	BHA:HP- β -CD kompleks	$\Delta\delta$
HP- β -CD			
H-1	5,274	5,259	-0,015
H-2	4,045	4,032	-0,013
H-3	3,554	3,528	-0,026
H-4	3,767	3,760	-0,007
H-5	3,672	3,644	-0,028
H-6	3,615	3,605	-0,010
Me	1,171	1,167	-0,004
BHA			
H-2	8,225	8,466	0,241
H-2', H-6'	7,556	7,500	-0,056
H-3', H-5'	7,049	7,160	0,111
H-8	6,437	6,593	0,156
H-6	6,298	6,398	0,100
-OMe	3,900	3,921	0,021

Efekat HP- β -CD na hemijska pomeranja protona BHA je, takođe, prikazan u tabeli 9. Protoni iz BHA pokazuju značajne promene u hemijskim pomeranjima (0,056 – 0,241 ppm). Promene u hemijskim pomeranjima protona H-2 (0,241 ppm) i H-8 (0,156 ppm) su veće od promena u pomeranjima za druge protone, zato što su ovi vodonikovi atomi jako hidrofobni. Na osnovu ovih promena u hemijskim pomeranjima i FTIR analize, može se zaključiti da su prstenovi A i C iz molekula BHA najverovatnije stupili u interakciju sa HP- β -CD preko unutrašnje strane šupljine.

4.1.4. Difrakcija rendgenskih zraka (XRD)

U cilju određivanja fizičkog stanja BHA posle kompleksiranja sa HP- β -CD, korišćena je metoda difrakcije X-zraka na uzorcima BHA, HP- β -CD, BHA:HP- β -CD inkluzionom kompleksu i fizičkoj smeši BHA i HP- β -CD što je prikazano na slici 31.

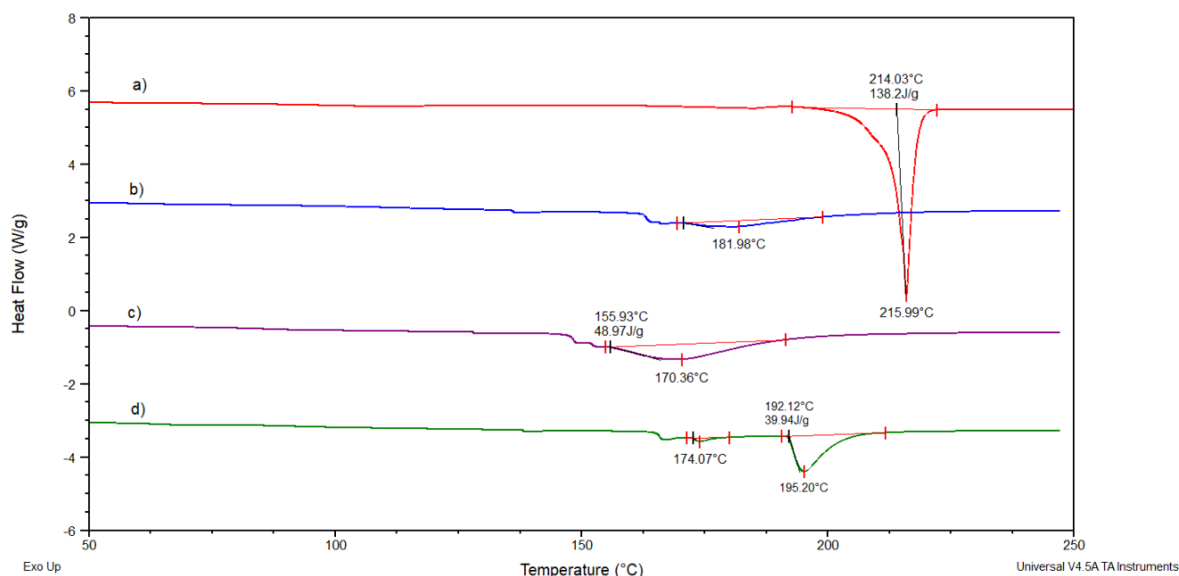


Slika 31. XRD difraktogrami BHA(a), HP- β -CD (b), BHA:HP- β -CD inkluzionog kompleksa (c) i fizičke smeše BHA i HP- β -CD (d)

Na difraktogramu BHA (Slika 31a), zapaža se više oštih pikova na uglovima (2θ) od $9,8^\circ$; $12,0^\circ$; $16,3^\circ$; $24,2^\circ$ i $26,1^\circ$ koji ukazuju da BHA ima visoko kristalnu strukturu. Prisustvo oštih pikova nije potvrđeno na difraktogramu HP- β -CD, što ukazuje da ima amorfnu strukturu (Slika 31b). Odsustvo pikova koji bi ukazivali na kristalnu strukturu BHA u difraktogramu inkluzionog kompleksa (Slika 31c) potvrđuje da je BHA uključen u šupljinu ciklodekstrina, tj. da je formirana supramolekulska struktura svojstvenih kristalografskih karakteristika. Difraktogram fizičke smeše ima slabe pikove koji potiču od oba jedinjenja BHA i HP- β -CD i ukazuje da nije ostvarena interakcija bilo kog tipa između komponenata (Slika 31d), što je u skladu sa rezultatima FTIR analize.

4.1.5. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

DSC termogrami BHA, HP- β -CD, BHA:HP- β -CD inkluzionog kompleksa i fizičke smeše BHA i HP- β -CD su prikazani na slici 32.



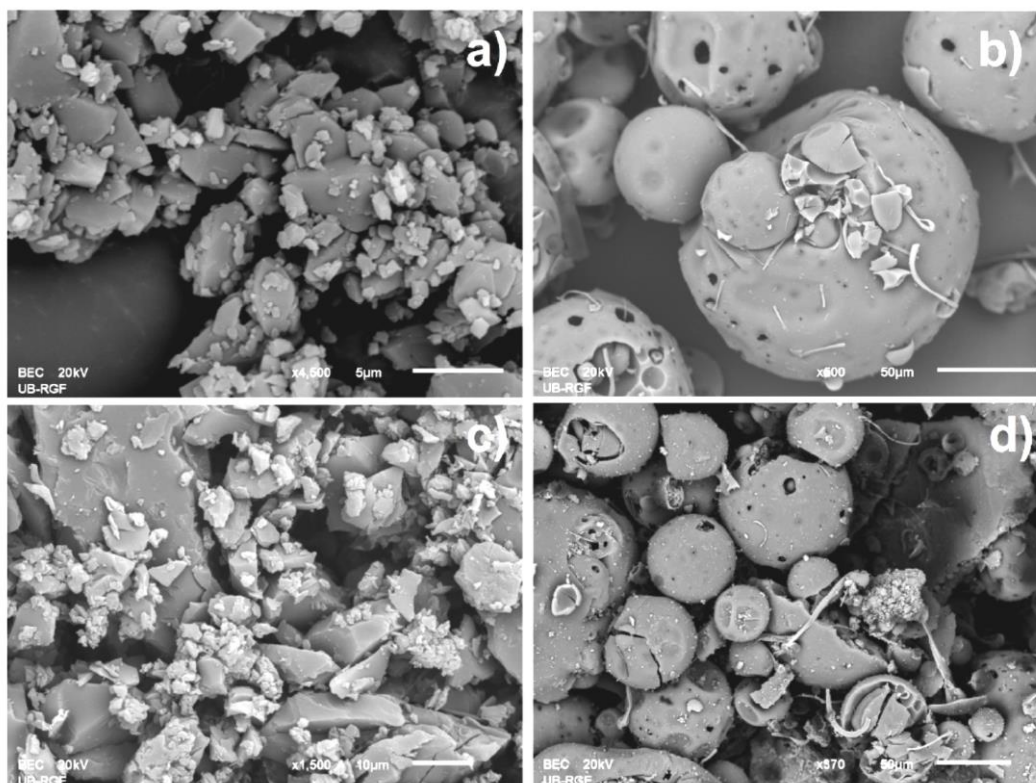
Slika 32. DSC termogrami BHA (a), HP- β -CD (b), BHA:HP- β -CD inkluzionog kompleksa (c) i fizičke smeše BHA i HP- β -CD (d)

Kao što je i očekivano, DSC kriva inkluzionog kompleksa pokazuje temperature prelaza različite od onih koje pokazuju molekuli gosta (BHA) ili domaćina (HP- β -CD). DSC kriva BHA ima veoma intenzivan pik na 216 °C sa entalpijom topljenja od 138,2 J g⁻¹, što takođe potvrđuje kristalnu strukturu BHA, kao što su pokazali rezultati XRD analize. Ovaj pik je pomeren ka nižim temperaturama u fizičkoj smeši i jedva je primetan u inkluzionom kompleksu. Iz termograma se može takođe videti da dolazi do redukcije entalpije topljenja BHA posle inkluzije u šupljinu ciklodekstrina. Naime, entalpija topljenja BHA pre inkluzije u šupljinu HP- β -CD je 138,2 J g⁻¹, dok je ova vrednost posle inkluzije 48,97 J g⁻¹. Sve ove promene ukazuju na formiranje inkluzionog kompleksa, nove supramolekulske strukture, koja ima različit režim temperaturnih promena od kompleksirajućih agenasa.

4.1.6. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

SEM metodom ispitivana je morfologija kompleksirajućih agenasa BHA i HP- β -CD i formiranog inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD.

Rezultati SEM mikrografije BHA, HP- β -CD, BHA:HP- β -CD inkluzionog kompleksa i fizičke smeše BHA i HP- β -CD su prikazani na slici 33.



Slika 33. SEM mikrografija BHA(a), HP- β -CD (b), BHA:HP- β -CD inkluzionog kompleksa (c) i fizičke smeše BHA i HP- β -CD (d)

Morfologija površine pokazuje da čestice BHA imaju oblik prizmi (Slika 33a), dok čestice HP- β -CD imaju oblik nepravilnih sfera sa šupljikavom strukturom (Slika 33b). SEM mikrografije inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD pokazuju da postoji agregacija čestica nepravilnih oblika u kojima je nestala početna morfologija oba jedinjenja (Slika 33c). U fizičkoj smeši, vide se karakteristični prizmatični oblici BHA po površini čestica HP- β -CD (Slika 33d). Navedene razlike u morfologiji analiziranih uzoraka takođe ukazuju na formiranje inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD što je u saglasnosti sa prethodnim ispitivanjima u ovom radu.

4.1.7. Antimikrobna aktivnost biohanina A i inkluzionog kompleksa

Antimikrobni potencijal uzoraka BHA i inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD je ispitan protiv sojeva Gram-pozitivnih, Gram-negativnih bakterija i dva fungalna soja. Kao negativna kontrola korišćen je rastvarač DMSO, a kao pozitivna kontrola antibiotici Tetraciklin i Metronidazol i antimikotik Nistatin. Osetljivost ispitivanih mikroorganizama procenjena je na osnovu minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) ispitivanih uzoraka. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 10.

Tabela 10. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) BHA, BHA:HP- β -CD inkluzionog kompleksa (mg/cm^3), tetraciklina i nistatina ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) i DMSO (%)

Mikroorganizam	BHA	BHA:HP- β -CD *	BHA u ko-mpleksu**	Tetra-ciklin	Nista-tin	DMSO (%)
<i>Escherichia coli</i> 8739	0,84	1,69	0,263	0,016	nt	22,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027	0,84	0,84	0,131	0,008	nt	22,5
<i>Salmonella enteritidis</i> 13076	0,84	1,69	0,263	0,008	nt	22,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 10031	1,69	1,69	0,263	0,016	nt	22,5
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	0,84	0,84	0,131	0,008	nt	22,5
<i>Candida albicans</i> 10231	1,69	0,84	0,131	nt	4,00	22,5
<i>Aspergillus niger</i> 16404	3,38	3,38	0,527	nt	8,00	22,5

nt – nije testirano; * - MIC ukupnog kompleksa; ** - MIC biohanina A iz kompleksa

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) za BHA se kreće u opsegu od 0,84-1,69 mg/cm^3 , izuzev u slučaju *A. niger* 16404. Najosetljivije od Gram-negativnih bakterija su *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. enteritidis* (MIC je 0,84 mg/cm^3), a od Gram-pozitivnih *S. aureus*, čiji je rast inhibiran pri istoj MIC. Manju i istu osetljivost na BHA pokazale su Gram-negativna bakterija *K. pneumoniae* i kvasac *C. albicans*. Minimalne koncentracije BHA pri kojima je zaustavljen rast ovih mikroorganizama je 1,69 mg/cm^3 . U ovom slučaju razblaženi rastvarač (5,6–11,5% DMSO) nije uticao na antimikrobnu aktivnost uzoraka. Najmanju osetljivost na BHA ispoljila je gljiva *A. niger*. Dejstvo na *A. niger* bilo je samo inhibitorno i moglo bi se pripisati rastvaraču. Što se tiče delovanja kompleksa BHA:HP- β -CD rezultati pokazuju (Tabela 10) da je MIC za kompleks BHA:HP- β -CD sličan kao i kod BHA za ispitivane mikroorganizme. Međutim, kada se uzme u obzir sadržaj BHA u kompleksu, dolazi se do zaključka da se približno isti efekat na ispitivane mikroorgnizme

postiže sa oko 3 puta manjom koncentracijom BHA u kompleksu u odnosu na nekompleksirani BHA. Ovakav rezultat se može objasniti činjenicom da je rastvorljivost BHA u kompleksu oko dva puta veća u odnosu na nekompleksirani BHA (Odeljak 4.4.1). U odnosu na BHA kompleks je ispoljio bolju aktivnost na kvasac *C. albicans*.

U tabeli 11 prikazani su rezultati antimikrobne aktivnosti BHA i inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD protiv Gram-negativne bakterije *H. pylori* određene disk difuzionom i mikrodilucionom metodom. U okviru ovih ispitivanja kao pozitivna kontrola korišćen je Metronidazol, a DMSO kao negativna kontrola.

Tabela 11. Antimikrobna aktivnost BHA i kompleksa BHA:HP- β -CD protiv *Helicobacter pylori* određena disk difuzionom i mikrodilucionom metodom

Testirani uzorci	Zone inhibicije	MIC
BHA	25 mm	7,50 mg/cm ³
BHA:HP- β -CD	52 mm	1,90 mg/cm ³
Metronidazol	34 mm	0,06 μ g/cm ³
DMSO	9 mm	12.5%

Rezultati disk difuzione metode pokazali su zone inhibicije rasta mikroorganizma od 25 i 52 mm za BHA i kompleks BHA:HP- β -CD, redom. Vrednosti zona inhibicije pokazuju mnogo veću aktivnost kompleksa BHA:HP- β -CD, koji ispoljava veoma visok potencijal protiv ovog bakterijskog soja u koncentraciji od 0,6 mg/disk. Iako je mnogo manja zona inhibicije za BHA (25 mm) u poređenju sa kompleksom BHA:HP- β -CD (52 mm), BHA je takođe pokazao značajnu aktivnost, pošto je sam DMSO pokazao zanemarljivo dejstvo. S druge strane, rezultati antimikrobnog delovanja dobijeni mikrodilucionom metodom nisu pokazali pouzdani antimikrobni potencijal BHA, jer je inhibiciono dejstvo primećeno tek u koncentraciji u kojoj je DMSO pokazao da sam inhibira ovu bakteriju (Tabela 11, negativna kontrola, 12,5% DMSO). U kontekstu ove činjenice, nije moguće pouzdano zaključiti da BHA poseduje antimikrobnu moć protiv *H. pylori*, jer se ovo dejstvo može pripisati i rastvaraču. Mikrodilucioni test je pokazao relativno visok potencijal kompleksa BHA:HP- β -CD, koji je bio aktivan u koncentraciji od 1,90 mg/cm³, i pokazao znatno jače delovanje od čistog BHA.

Druga važna činjenica uočena u ovoj studiji je odsustvo mikrobicidnog dejstva za oba uzorka, BHA i kompleks BHA:HP- β -CD, jer MBC nije primećen u svim ispitivanim koncentracijama za oba uzorka.

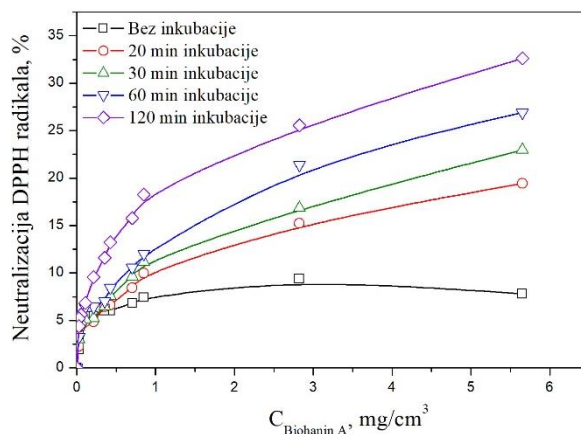
H. pylori je jedan od najotpornijih ljudskih patogena i prevalencija infekcije je skoro 60%. Kolonizacija želuca bakterijom *H. pylori* povećava rizik od razvoja različitih gastrointestinalnih poremećaja i bolesti, uključujući gastritis, čir i kancer (Dinat i sar., 2023). Glavni nedostatak terapije koja se koristi za lečenje *H. pylori*, a koja uključuje primenu inhibitora protonske pumpe i 2 antibiotika, je povećana rezistencija na antibiotike, zbog čega se sve više ispituju prirodne aktivne supstance. De Mendonca i saradnici testirali su gastroprotektivne efekte vodenootanolnih ekstrakata crvenog propolisa (HERP) i njegovog glavnog sastojka izoflavona formononetina u modelima akutnog ulkusa (De Mendonca i sar., 2020). HERP je pokazao dozno-zavisni gastroprotektivni efekat u svim ispitivanim koncentracijama (50, 250 i 500 mg/kg). Osim toga, i HERP i formononetin (10 mg/kg) značajno povećavaju lučenje želudačne sluzi dok smanjuju proizvodnju želudačnog soka. Štaviše, HERP je pokazao određenu antimikrobnu aktivnost protiv *H. pylori* (zona inhibicije od 13 ± 2 mm) u količini od 8 mg/disk. Rubab i saradnici su ispitivali gastroprotektivne efekte različitih ekstrakata *Caragana ambigua* (Rubab i sar., 2022). Najbolju antiulkusnu aktivnost, uporedivu sa omeprazolom, pokazao je hloroformski ekstrakt, u kojem su najzastupljenija jedinjenja izoflavoni formononetin i BHA. Gastroprotektivni efekat BHA može se pripisati aktivaciji antiapoptičkih puteva (Hajrezaie i sar., 2015).

Iako postoje literaturni podaci o antimikrobnom dejstvu različitih flavonoida protiv *H. pylori* (Fukai i sar., 2002), u ovim ispitivanjima je prvi put rađena i dokazana uporedna aktivnost inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD i BHA na *H. pylori*.

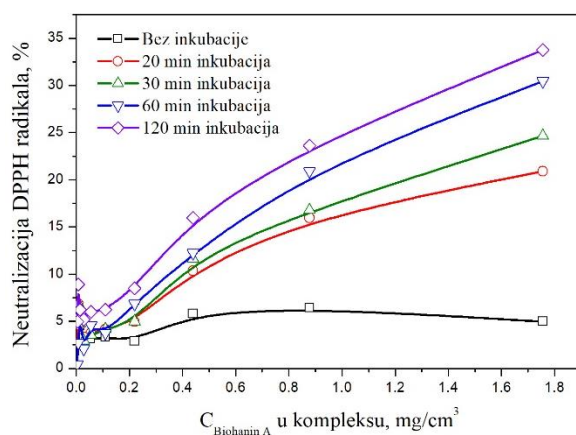
4.1.8. Antioksidativna aktivnost biohanina A i inkluzionog kompleksa

Antioksidativna aktivnost BHA i inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD određena je primenom spektrofotometrijskih metoda: DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC, heliranje metala i fosfomolibdenska metoda.

Na slikama 34 i 35 prikazani su rezultati dobijeni primenom DPPH testa koji su izraženi kao procenat neutralizacije DPPH radikala od strane ispitivanih uzoraka BHA i inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD. Za potrebe ovih ispitivanja korišćeni su neinkubirani i inkubirani uzorci u različitim vremenskim intervalima.



Slika 34. Antioksidativna aktivnost BHA određena neutralizacijom DPPH radikala

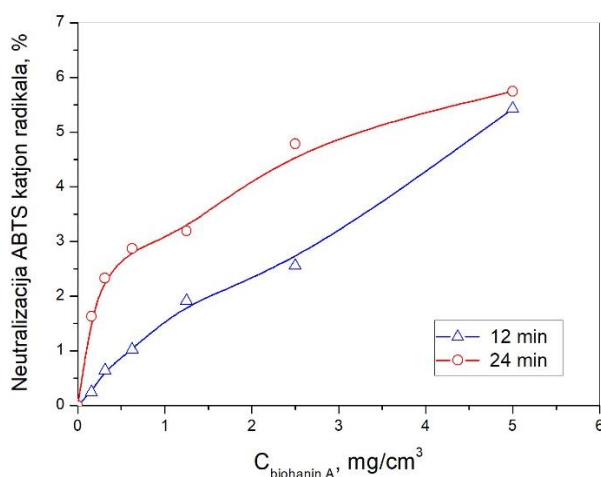


Slika 35. Antioksidativna aktivnost BHA u inkluzionom kompleksu BHA:HP-β-CD određena neutralizacijom DPPH radikala

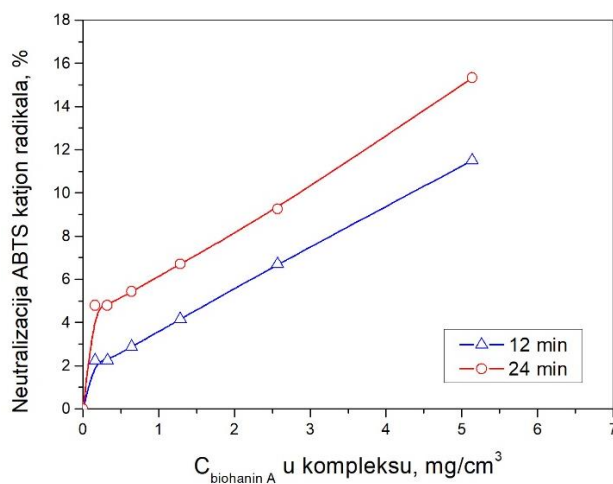
Iz prikazanih rezultata (Slike 34 i 35) se može uočiti da i BHA i inkluzioni kompleks BHA:HP-β-CD pokazuju slabu, koncentracijski zavisnu antioksidativnu aktivnost, naročito neinkubirani uzorci. Procenat neutralizacije DPPH radikala raste sa porastom vremena inkubacije zavisno od koncentracije uzoraka i postiže maksimum za BHA pri koncentraciji od 5,5 mg/cm³ (% neutralizacije DPPH 32,5 %), dok za inkluzioni kompleks BHA:HP-β-CD stepen neutralizacije DPPH radikala je nešto veći, 35%, pri koncentraciji BHA u kompleksu od 1,8 mg/cm³. Ovo ukazuje da je antioksidativna aktivnost kompleksa BHA:HP-β-CD bolja jer je ostvaren približan stepen neutralizacije DPPH radikala sa tri puta manjom koncentracijom BHA u kompleksu u odnosu na nekompleksirani BHA. Ovakvi rezultati jasno pokazuju da BHA kompleksiranjem po tipu inkluzije nije izgubio antioksidativnu aktivost već je došlo do poboljšanja. U skladu sa našim rezultatima ispitivanja antioksidativne aktivnosti BHA, su i istraživanja Magiera i saradnika koji su testirali

određene flavonoide na sposobnost uklanjanja DPPH radikala. Utvrđeno je da je BHA najslabiji antioksidans među testiranim flavonoidima (Magiera i sar., 2015). Takođe, Hamza Sherif i Gebreyohannes (2018) su objavili da BHA nije pokazao značajnu sposobnost uklanjanja DPPH radikala pri koncentraciji $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ (Hamza Sherif i Gebreyohannes, 2018). U ranijim istraživanjima je utvrđeno da broj i položaj hidroksilnih grupa u strukturi flavonoida igra veliku ulogu u njihovom antioksidativnom delovanju (Sarian i sar., 2017).

ABTS metoda je osetljivija od DPPH metode i bazira na reakciji antioksidansa sa ABTS^{++} koja se odvija SET ili HAT mehanizmom (Sadeer i sar., 2020). Rezultati ispitivanja ABTS metodom antioksidativne aktivnosti BHA i inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD prikazani su na slikama 36 i 37, redom.



Slika 36. Antioksidativna aktivnost BHA određena neutralizacijom ABTS⁺⁺



Slika 37. Antioksidativna aktivnost BHA u inkluzionom kompleksu BHA:HP- β -CD određena neutralizacijom ABTS⁺⁺

Na osnovu prikazanih rezultata može se videti da procenat neutralizacije ABTS^{•+} raste sa porastom koncentracije BHA za različita vremena inkubacije kako kod inkluzionog kompleksa BHA:HP-β-CD, tako i kod nekompleksiranog BHA. Inkluzioni kompleks BHA:HP-β-CD, kao i u slučaju DPPH testa ispoljava bolju antioksidativnu aktivnost. Procenat neutralizacije ABTS^{•+} je oko tri puta veći za vreme inkubacije od 24 min pri koncentraciji BHA u kompleksu 5 mg/cm³ od nekompleksiranog BHA pri istim uslovima koncentracije i vremena inkubacije.

U tabeli 12 dati su rezultati antioksidativne aktivnosti BHA i inkluzionog kompleksa BHA:HP-β-CD dobijeni primenom ostalih metoda korišćenih za određivanje antioksidativnog potencijala.

Tabela 12. Antioksidativna aktivnost BHA i inkluzionog kompleksa BHA:HP-β-CD

Uzorak	CUPRAC (mgTE/g)	FRAP (mg Fe ²⁺ /g)	Heliranje (mgEDTAE/g)	Fosfomolibdenski test (mmolTE/g)
BHA	37,89±2,62	6,03±0,02	7,36±0,02	1,17±0,16
BHA:HP-β-CD	26,55±0,95	7,2±0,3	3,13±0,06	0,12±0,03

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± S.D. tri eksperimenta. TE - Troloks ekvivalent; EDTAE - ekvivalent etilendiamino tetrasirćetne kiseline u obliku dinatrijumove soli.

Prema CUPRAC metodi bolju antioksidativnu sposobnost redukcije Cu(II) u Cu(I), izraženu preko ekvivalenta troloksa, ispoljio je BHA (37,89 mgTE/g BHA). Inkluzioni kompleks BHA:HP-β-CD ispoljio je nešto slabiju aktivnost (26,55 mgTE/g BHA u kompleksu). Ovakvo ponašanje kompleksa bi se moglo pripisati činjenici da su neke od hidrosilnih grupa u strukturi BHA već uključene u formiranje inkluzionog kompleksa pa nisu raspoložive za proces redukcije, što je donekle u saglasnosti sa drugim istraživačima koji ukazuju da bi formiranje kompleksa sa CD moglo uticati negativno na njihovu redukcionu moć (Athanasiadis i sar., 2022; Siqueira-Lima i sar., 2017). Rezultati dobijeni prema FRAP metodi, koja antioksidativnu sposobnost kvantifikuje na osnovu sposobnosti redukcije Fe(III) u Fe(II) BHA i inkluzionog kompleksa BHA:HP-β-CD, pokazuju sličnu aktivnost s tim što kompleks (7,2 mgFe²⁺/g BHA u kompleksu) ima nešto bolju aktivnost od BHA (6,03 mgFe²⁺/g BHA).

Fosfomolibdenska metoda, koji se bazira na redukciji Mo(VI) u Mo(V) i koja se smatra jednim od testova za ukupni antioksidativni potencijal primenjena je takođe kod BHA i inkluzionog kompleksa BHA:HP-β-CD. Rezultati pokazuju (tabela 12) da inkluzioni

kompleks BHA (0,12 mmol TE/g) ima slabiju aktivnost od slobodnog BHA (1,17 mmol TE/g).

Sposobnost jedinjenja da helira metale odražava njegovu sposobnost da inhibira formiranje hidroksilnih radikala u Fentonovoj reakciji. Helatna sposobnost BHA (7,36 mg EDTAE/g) bila je 2,5 puta veća od sposobnosti njegovog inkluzionog kompleksa (3,13 mg EDTAE/g). Razlog ovome može biti zaklonjenost funkcionalnih grupa BHA u šupljinu HP- β -CD koje ne mogu učestvovati u heliranju metala.

Uporednom analizom rezultata antioksidativne aktivnosti BHA i njegovog inkluzionog kompleksa, dobijenim različitim metodama, može se zaključiti da formiranje inkluzionog kompleksa BHA nije smanjilo njegova antioksidativna svojstva u poređenju sa slobodnim oblikom, čak je u nekim slučajevima i povećana. Stoga se za ispitivanje antioksidativne aktivnosti inkluzionog kompleksa BHA od primenjenih *in vitro* metoda kao pogodne u budućim istraživanjima mogu koristiti FRAP, ABTS i DPPH.

4.1.9. Inhibicija enzimske aktivnosti

U farmaceutskoj industriji enzimi su od fundamentalnog značaja za razvoj efikasnih lekova. Konkretno, inhibitori enzima su jedni od najčešćih lekova koji igraju ključnu ulogu u ublažavanju simptoma globalnih zdravstvenih problema kao što su gojaznost, *diabetes mellitus* i Alchajmerova bolest (Rauf i sar., 2017). U tom smislu, obezbeđivanje novih i moćnih inhibitora enzima postaje sve veći interes u farmaciji. Imajući u vidu ove činjenice, testirana je aktivnost BHA i inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD na holinesteraze (AChE, BuChE), α -amilazu, α -glukozidazu i tirozinazu. Rezultati su prikazani u tabeli 13.

Tabela 13. Inhibitorna aktivnost BHA i inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD na enzime

Uzorak	Inhibicija AChE (mgGALAE/g)	Inhibicija BuChE (mgGALAE/g)	Inhibicija tirozinaze (mgKAE/g)	Inhibicija α -amilaze (mmolACAE/g)	Inhibicija α -glukozidaze (mmolACAE/g)
BHA	ni	ni	88,41 \pm 3,44	1,16 \pm 0,31	38,06 \pm 1,16
BHA:HP- β -CD	5,82 \pm 0,06	6,96 \pm 0,35	90,65 \pm 0,47	0,62 \pm 0,02	32,01 \pm 2,24

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm S.D. tri eksperimenta. GALAE - Galantamin ekvivalent. KAE - ekvivalent kojične kiseline; ACAE - ekvivalenti akarboze; ni - nema inhibicije.

Rezultati inhibitorne aktivnosti BHA i inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD na AChE i BuChE pokazali su da kompleks inhibira aktivnost oba enzima (AChE: 5,82 mg GALAE/g; BuChE: 6,96 mg GALAE/g). BHA na ove enzime nije pokazao aktivnost što je u skladu sa ispitivanjima Orhana i saradnika koji su takođe pokazali da BHA ne ispoljava inhibitorni efekat na AChE i BuChE u koncentraciji od 1 mg/cm³ (Orhan i sar., 2007).

Dobijeni rezultati pokazuju da BHA u inkluzionom kompleksu modifikuje farmakološki profil, tako da bi ovakva formulacija BHA mogla biti potencijalno efikasan inhibitor AChE i BuChE za primenu u lečenju Alchajmerove bolesti.

Tirozinaza je ključni enzim u sintezi melanina i glavna je meta za kontrolu problema hiperpigmentacije. Kao što se može videti iz tabele 13, inhibicija tirozinaze BHA nije bitno promenjena formiranjem kompleksa. Dobijene vrednosti su 88,41 i 90,65 mgKAE/g za BHA i inkluzioni kompleks, redom. U prethodnoj studiji Lin i saradnici, ispitali su uticaj BHA na proces melanogeneze korišćenjem ćelijske linije melanoma B16. U ovoj studiji BHA je pokazao moćnu sposobnost antimelanogeneze zavisnu od doze (Lin i sar., 2011), što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju. Uticaj inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD na aktivnost tirozinaze ispitana je po prvi put u okviru ovih istraživanja i prema dobijenim rezultatima može biti potencijalna formulacija u rešavanju problema hiperpigmentacije kože, tim pre što je rastvorljivost BHA iz kompleksa znatno bolja u odnosu na nekompleksirani oblik.

α -Glukozidaza i α -amilaza su intestinalni enzimi koji hidrolizuju složene ugljene hidrate u tankom crevu čime se oslobađa α -D-glukoza koja se zatim apsorbuje u krv. Iz ovih razloga oni mogu imati značaj u regulaciji bolesti različitih etiologija kao što su Pompeova bolest i dijabetes melitus tip 2. Brojni su sintetički i prirodni molekuli koji mogu inhibirati ove enzime, pa se koriste kao antidijabetici. Rezultati ispitivanja (Tabela 13) pokazuju da je BHA (α -amilaza: 1,16 mmol ACAE/g; α -glukozidaza: 38,06 mmol ACAE/g) efikasniji od inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD (α -amilaza: 0,62 mmol ACAE/g; α -glukozidaza: 32,01 mmol ACAE/g) kod oba ispitivana enzima. Slično našim rezultatima, Park i sar. su publikovali antidijabetičke efekte nekih jedinjenja iz *Pueraria thunbergiana*, a jedno od njih je BHA (Park i sar., 2009). U njihovoj studiji je utvrđeno da je od ispitivanih jedinjenja BHA najefikasniji inhibitor α -amilaze i α -glukozidaze. U drugoj studiji Mehrabadija i saradnika pokazano je da je BHA odigrao važnu ulogu u poboljšanju dijabetičke retinopatije snižavanjem nivoa šećera u krvi (Mehrabadi i sar., 2018). Osim toga, mehanizam antidijabetičke aktivnosti BHA može uključiti smanjenje insulinske rezistencije i

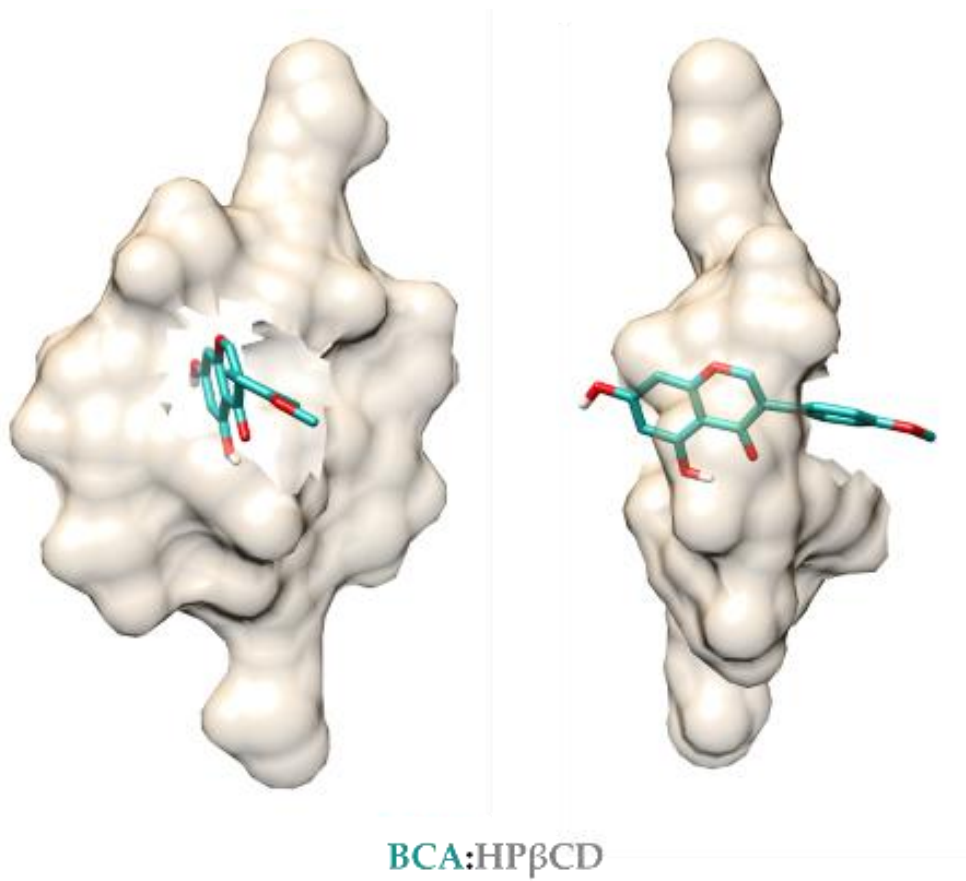
koncentraciju glikozilovanog hemoglobina, uz istovremeno poboljšanje insulinske osetljivosti, lipidnog profila i skladištenja glikogena u jetri (Oza i sar., 2018).

Uparedna analiza inhibitorne aktivnosti na ispitivane enzime BHA i inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD pokazuje da BHA može biti koristan kod dijabetes melitus tip II, a inkluzioni kompleks u rešavanju problema Alchajmerove bolesti i u kontroli hiperpigmentacije.

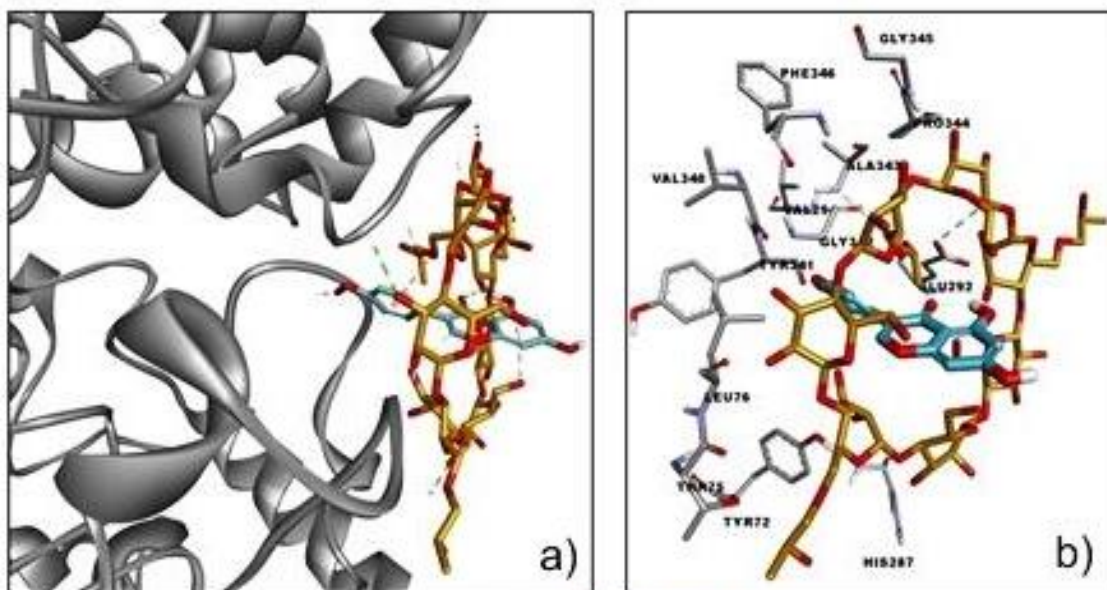
4.1.10. Molekulsko modelovanje inhibicije enzima

U cilju razjašnjenja interakcija BHA i inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD sa aktivnim centrima enzima čija je inhibitorna aktivnost određena u Odeljku 4.1.9. , kao i u samom inkluzionom kompleksu primenjeni su odgovarajući aktuelni programi UCSF Chimera, AutoDock-a 4.2.6 i Biovia DS Visualizer v4.5.

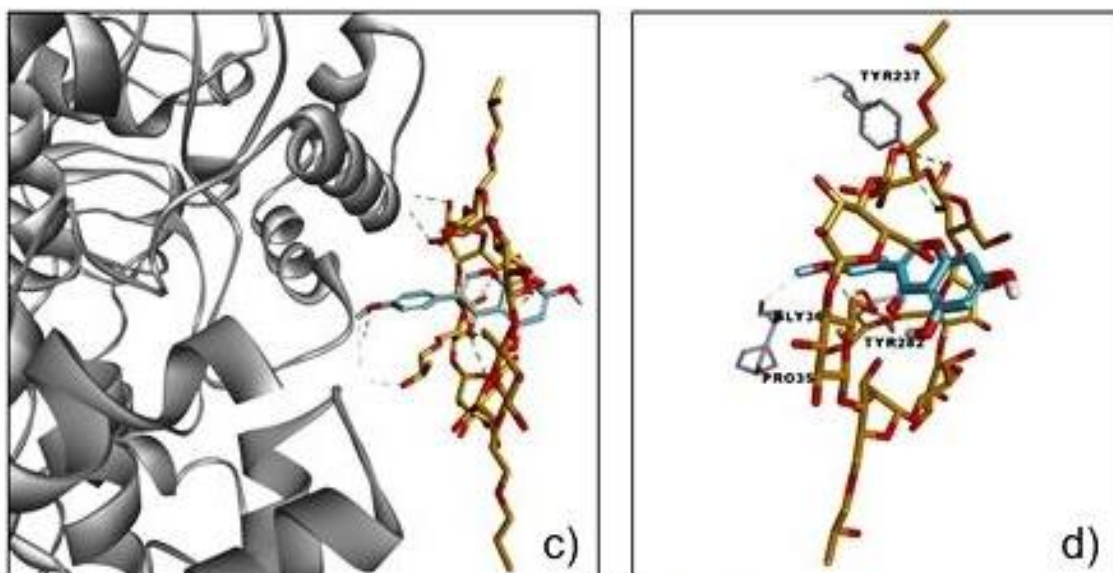
Inkluzioni kompleks BHA:HP- β -CD je modelovan prema proceduri Al-Abboodi i sar. (Al-Abboodi i sar., 2021). BHA je zaronjen u hidrofobnu šupljinu HP- β -CD preko H-veza dok su hidroksifenil i metoksifenil grupe virile van šupljine sa obe strane (Slika 38). Kompleks BHA:HP- β -CD i BHA su zatim povezani na aktivna mesta enzima AChE, BuChE, tirozinaze, α -amilaze i α -glukozidaze. Dobijeni kompleksi su optimizovani korišćenjem UCSF Chimera programa (Pettersen i sar., 2004) da bi se minimizirale sterne smetnje zbog glomaznosti HP- β -CD. U svim kompleksima enzim-kompleks (supstrat), BHA:HP- β -CD se orijentisao ka ulazu u aktivne centre enzima, verovatno omogućivši BHA da se veže preko slobodnog metoksifenilnog kraja (Slike 39 do 42). Za komplekse AChE (Slike 39a i 39b) i BuChE (Slike 39c i 39d), modelovana je samo interakcija sa inkluzionim kompleksom pošto su podaci o inhibiciji enzima (Odeljak 4.1.9) pokazali da samo inkluzioni kompleks BHA:HP- β -CD pokazuje inhibitorna svojstva. S druge strane, modelovan je način vezivanja inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD i samog BHA za tirozinazu (Slika 40), α -amilazu (Slika 41) i α -glukozidazu (Slika 42). U svim modelima BHA sa ovim enzimima, BHA je orijentisan tako da interaguje sa ostacima aminokiselina u aktivnim centrima, čime je moguće inhibirati aktivnost enzima. Takođe, inkluzioni kompleks BHA:HP- β -CD verovatno blokira aktivnosti enzima AChE, BuChE, tirozinaze, α -amilaze i α -glukozidaze putem dvostrukih interakcija sa BHA i HP- β -CD.



Slika 38. Molekulsko modelovanje inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD



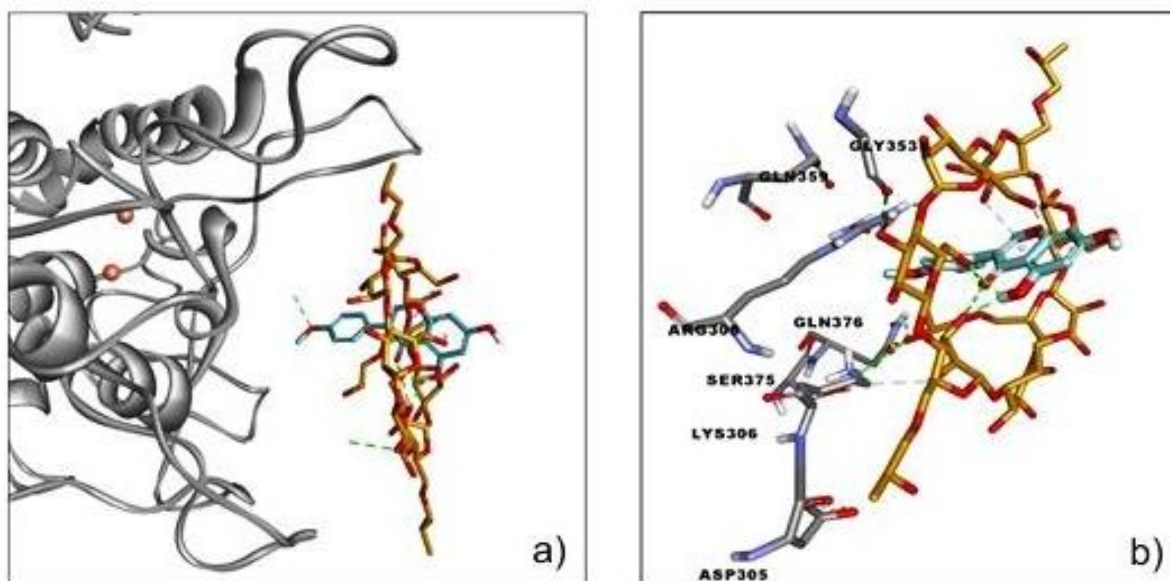
AChE:BCA:HPβCD



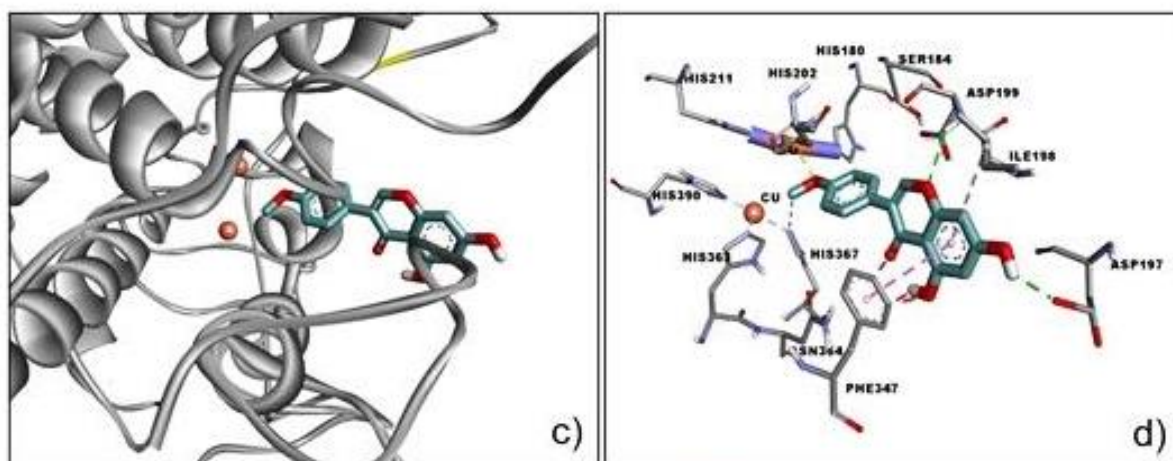
BChE:BCA:HPβCD

H-bond | salt bridge | π - π interaction | Hydrophobic | van der Waals interactions

Slika 39. Moguće povezivanje inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD sa AChE (a) i njihove međusobne interakcije (b); moguće povezivanje inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD sa BuChE (c) i njihove međusobne interakcije (d)



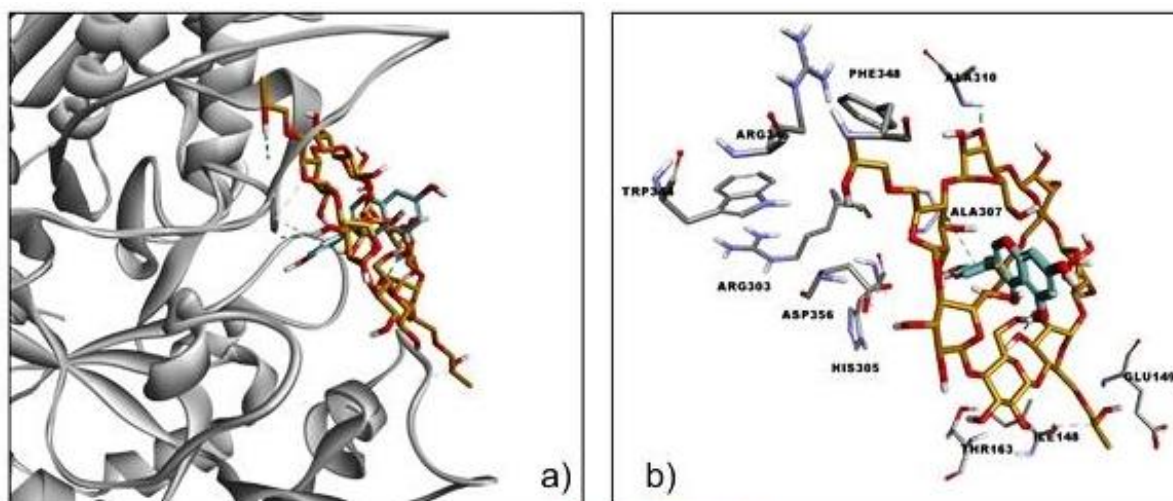
Tyrosinase:BCA:HPβCD



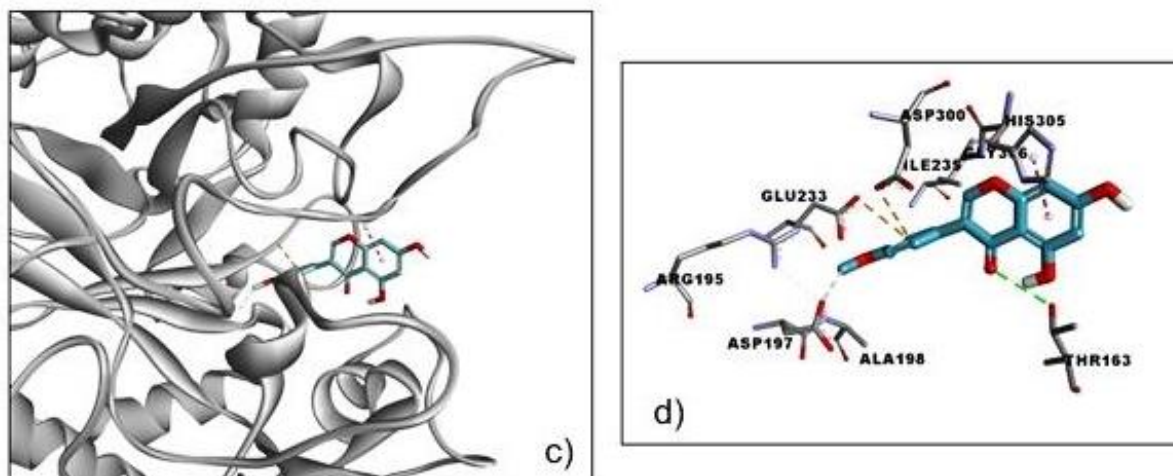
Tyrosinase:BCA

H-bond | salt bridge | π - π interaction | Hydrophobic | van der Waals interactions

Slika 40. Moguće povezivanje inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD sa tirozinazom (a) i njihove međusobne interakcije (b); moguće povezivanje BHA sa tirozinazom (c) i njihove međusobne interakcije (d)



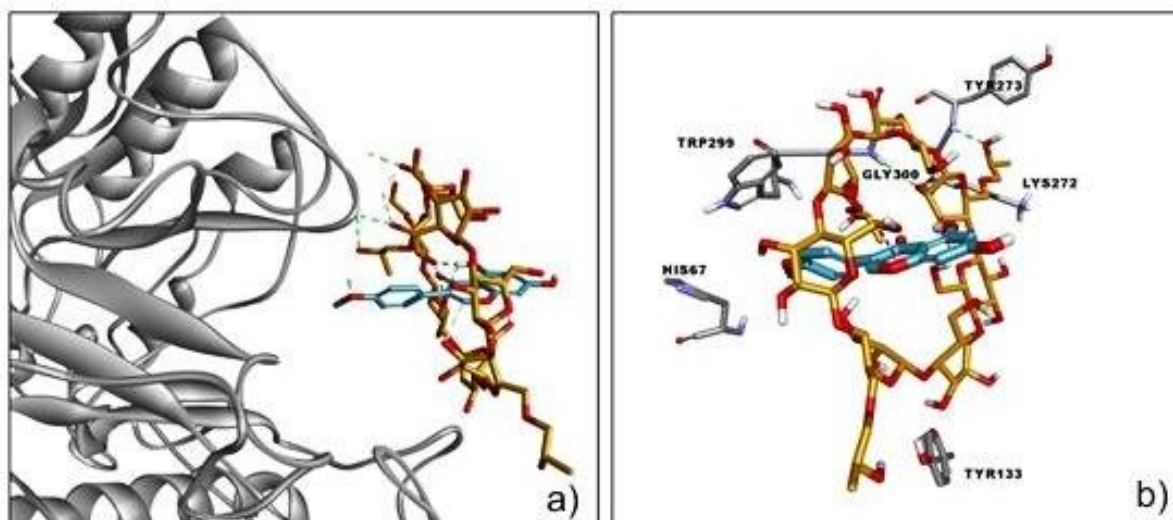
Amylase:BCA:HPβCD



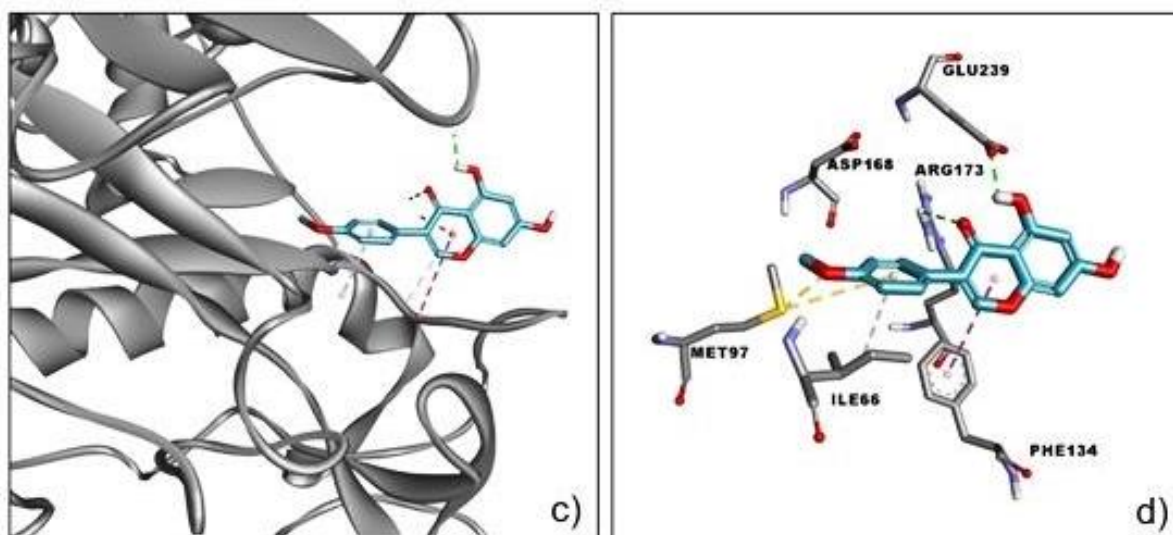
Amylase:BCA

H-bond | salt bridge | π - π interaction | Hydrophobic | van der Waals interactions

Slika 41. Moguće povezivanje inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD sa α -amilazom (a) i njihove međusobne interakcije (b); moguće povezivanje BHA sa α -amilazom (c) i njihove međusobne interakcije (d)



Glucosidase:BCA:HPβCD



Glucosidase:BCA

H-bond | salt bridge | π - π interaction | Hydrophobic | van der Waals interactions

Slika 42. Moguće povezivanje inkluzionog kompleksa BHA:HP- β -CD sa α -glukozidazom (a) i njihove međusobne interakcije (b); moguće povezivanje BHA sa α -glukozidazom (c) i njihove međusobne interakcije (d)

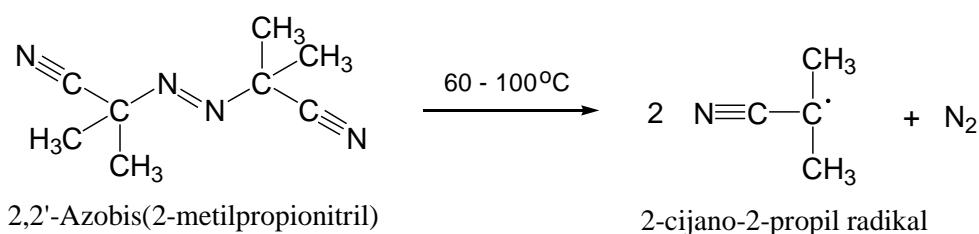
Rezultati su pokazali inhibitorne efekte inkluzionog kompleksa na enzime AChE i BuChE ali ne i inhibitorni efekat BHA što je u skladu sa literaturom. Naime, rezultati koje su objavili Orhan i saradnici takođe pokazuju odsustvo inhibitornog efekta BHA na AChE i BuChE. Ova činjenica bi se mogla objasniti pomoću dva moguća mehanizma (Orhan i sar., 2007). U prvom mehanizmu, AChE (PDB kod: 1EEA) i BuChE (PDB kod: 6ekp) imaju hidrofilna aktivna mesta. S obzirom da je u formiranom inkluzionom kompleksu povećana

rastvorljivost BHA, to bi omogućilo formiranje jače veze (posebno H-veze) sa aktivnim centrom enzima i enzim bi mogao na taj način biti inhibiran. Drugo, inkluzioni kompleks ima veći prečnik od molekula BHA. Ova veća struktura bi mogla stvarati dodatne sterne smetnje oko aktivnih centara ovih enzima, što bi takođe doprinelo boljem inhibitornom dejstvu kompleksa na ispitivane enzime.

4.2. HIDROGELOVI KAO NOSAČI BIOAKTIVNIH SUPSTANCI

4.2.1 Sinteza kopolimera p(NiPAm-ko-AA)

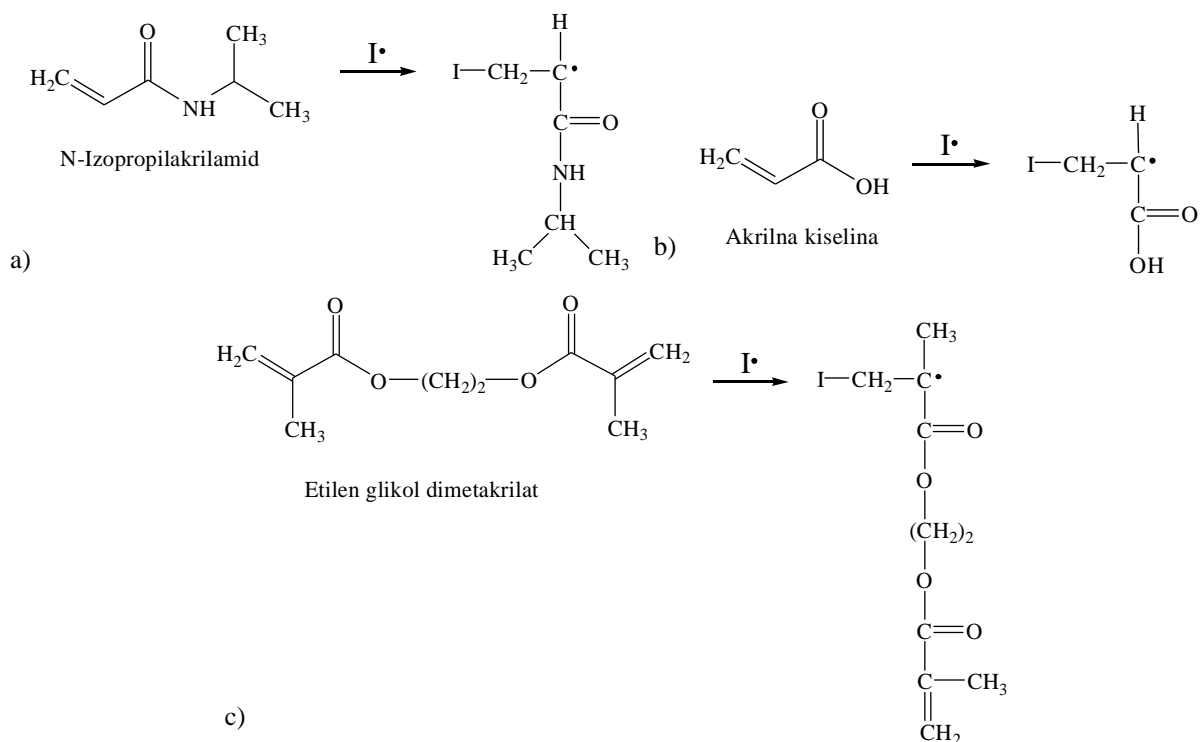
Sa aspekta primene hidrogelova, pre svega kao nosača lekova, važno je da mogu istovremeno reagovati na različite spoljne stimulanse, a pre svega na temperaturu i pH okolnog medijuma. U cilju dobijanja hidrogela p(NiPAm-ko-AA) koji je osetljiv na temperaturu i pH izvršena je kopolimerizacija NiPAm sa jonskim monomerom AA uz korišćenje EGDM-a kao umreživača. Reakcija se odvija radikalnom polimerizacijom koja je inicirana 2-cijano-2-propil radikalom koji nastaje u uslovima izvođenja reakcije na povišenoj temperaturi razgradnjom inicijatora 2,2'-azobis(2-metilpropionitrila), (Slika 43).



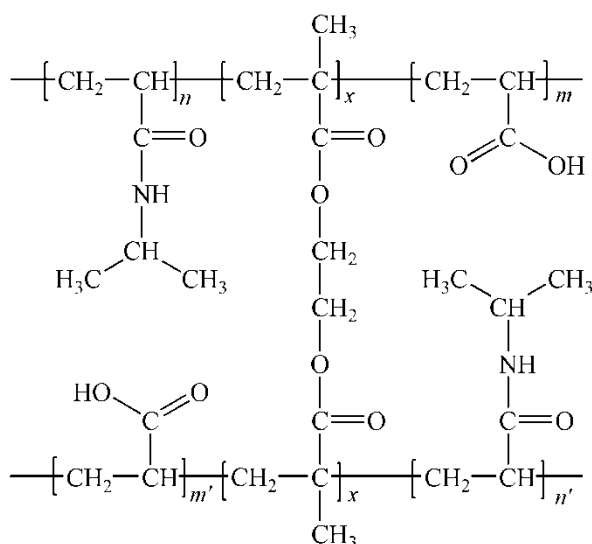
Slika 43. Nastajenje 2-cijano-2-propil radikala razgradnjom 2,2'-azobis(2-metilpropionitrila)

Nastali primarni radikali u fazi iniciranja reaguju sa molekulima monomera i umreživača i stvaraju radikalske vrste čije su strukture prikazane na slici 44.

U fazi propagacije i terminacije reakcije polimerizacije nastaje kopolimer p(NiPAm-ko-AA) umrežene strukture. Na slici 45 je prikazana moguća struktura dela mreže kopolimernog hidrogela.



Slika 44. Nastajanje radikalskih vrsta od monomera i umreživača reakcijom sa primarnim 2-cijano-2-propil radikalom (I•): N-izopropilakrilamida (NiPAm) (a), akrilne kiseline (AA) (b) i etilen glikol dimetakrilata (EGDM) (c)



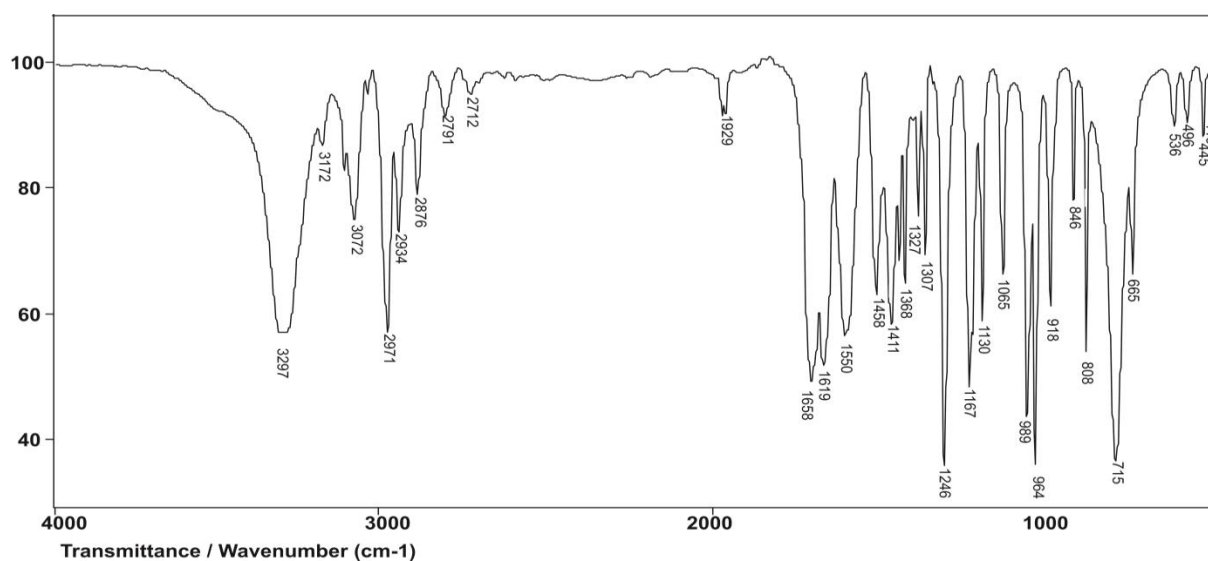
Slika 45. Moguća struktura sintetisanog kopolimera p(NiPAm-ko-AA)

Sintetisani hidrogel p(NIPAM-ko-AA) okarakterisan je u pogledu hemijske strukture FTIR metodom, analiziran je sadržaj neproreagovanih reaktanata u postupku sinteze i ispitan stepen bubrenja u zavisnosti od pH i temperature.

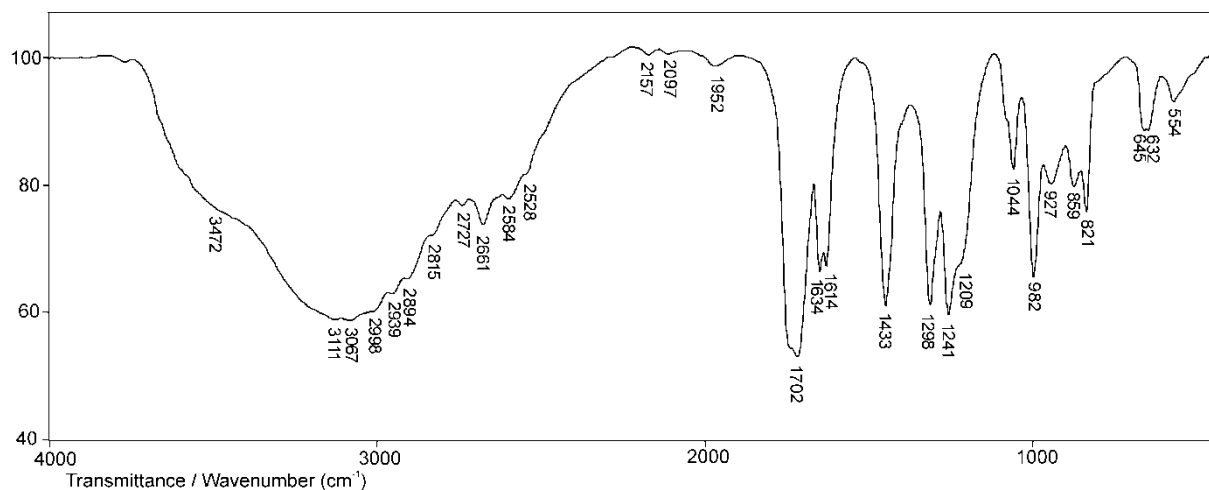
4.2.2. Strukturna karakterizacija kopolimera p(NiPAm-ko-AA)

4.2.2.1. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

FTIR spektar monomera NiPAm-a prikazan je na slici 46, a FTIR spektar komonomera akrilne kiseline na slici 47. Položaj amidne trake I (Slika 46), koja potiče od valencioni C=O vibracija sekundarnih amida, treba očekivati na oko 1680 cm^{-1} . U FTIR spektru NiPAm-a ova traka se pojavljuje pri nižoj frekvenciji za oko 20 jedinica (na 1658 cm^{-1}) zbog konjugacije i izraženog negativnog induktivnog efekta (-I) dvogube veze C=C vinilne grupe na karbonilnu grupu. N-H valencione vibracije sekundarnih amida daju jednu traku u oblasti $3500\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$, koja se u spektru NiPAm javlja kao traka jakog intenziteta na 3297 cm^{-1} . Amidna traka II većim delom potiče od N-H deformacionih vibracija u ravni i pada u oblast amidne trake I pa se teško uočava (nije vidljiva u spektru NiPAm-a). Amidna traka III, koja potiče od C-N valencioni vibracija kuplovanih sa N-H deformacionim vibracijama, daje jednu traku na 1246 cm^{-1} (inače očekivanu u oblasti oko 1300 cm^{-1}). Izolovani vinilni vodonik (=C-H) daje samo jednu traku koja se u spektru javlja na 3072 cm^{-1} i rezultat je valencioni vibracija $\nu_{\text{as}}(\text{=C-H})$. C-H deformacione vibracije van ravni $\gamma(\text{=C-H})$ karakteristične su po broju i položaju traka u FTIR spektru što zavisi od stepena supstitucije dvostruke veze. U spektru NiPAm postoje dve trake od deformacionih vibracija van ravni $\gamma(\text{=C-H})$ na 989 i 918 cm^{-1} i ukazuju na monosupstituisanu dvostruku vezu. Konjugacija vinil grupe sa karbonilnom grupom sekundarnog amida pomera frekvenciju vibracije C=C veze, tj. $\nu(\text{C=C})$ ka nižim vrednostima, a polarizacija povećava jačinu C=C apsorpcije što u spektru daje intenzivnu traku na 1619 cm^{-1} .



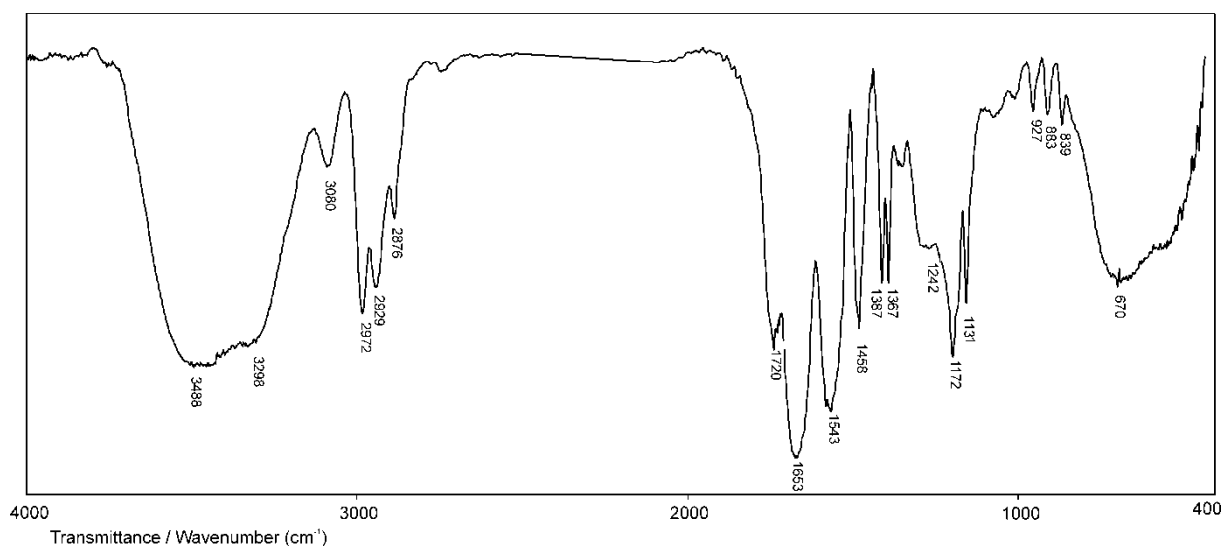
Slika 46. FTIR spektar monomera NiPAm-a



Slika 47. FTIR spektar komonomera AA

U FTIR spektru AA (Slika 47) uočava se široka apsorpciona traka od O-H valencionih vibracija, $\nu(\text{OH})$ iz karboksilne grupe u oblasti talasnih brojeva $3500\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$, što je u saglasnosti sa literaturom (Umemura i sar., 1975). U ovoj oblasti se očekuje i traka od izolovanog vinilnog vodonika ($=\text{CH}$) vinil grupe, koja se teško uočava zbog preklapanja sa trakom od O-H valencionih vibracija. Ova traka pokazuje slab maksimum na 3067 cm^{-1} . Apсорpciona traka u oblasti talasnih brojeva $1710\text{--}1690\text{ cm}^{-1}$ kod alifatičnih karboksilnih kiselina pripisuje se valencionim vibracijama C=O grupe, $\nu(\text{C}=\text{O})$ u spektru AA se javlja kao intenzivna traka sa maksimumom na 1702 cm^{-1} . Zbog konjugacije sa vinil grupom, ova traka je pomerena ka nižoj frekvenciji za par jedinica. Iz istih razloga, $\nu(\text{C}=\text{C})$ traka od valencionih vibracija C=C veze vinil grupe pomerena je ka nižim vrednostima frekvencije i u spektru se javlja kao traka jakog intenziteta na 1614 cm^{-1} . C-O valencione vibracije, koje se kupluju sa deformacionim vibracijama u ravni $\delta(\text{OH})$ daju dve trake. U spektru AA se ove trake javljaju na 1433 cm^{-1} i 1241 cm^{-1} i potvrđuju prisustvo COOH grupe. Karakteristične trake u FTIR spektru AA su trake od C-H deformacionih vibracija van ravni C=C veze i one se javljaju na 1044 cm^{-1} i 982 cm^{-1} . Prisustvo ovih traka u FTIR spektru AA pokazuje da je dvostruka veza monosupstituisana.

FTIR spektar sintetisanog kopolimera p(NIPAM-ko-AA) sa 5 mol% akrilne kiseline i 1,5 mol% umreživača EGDM-a prikazan je na slici 48.



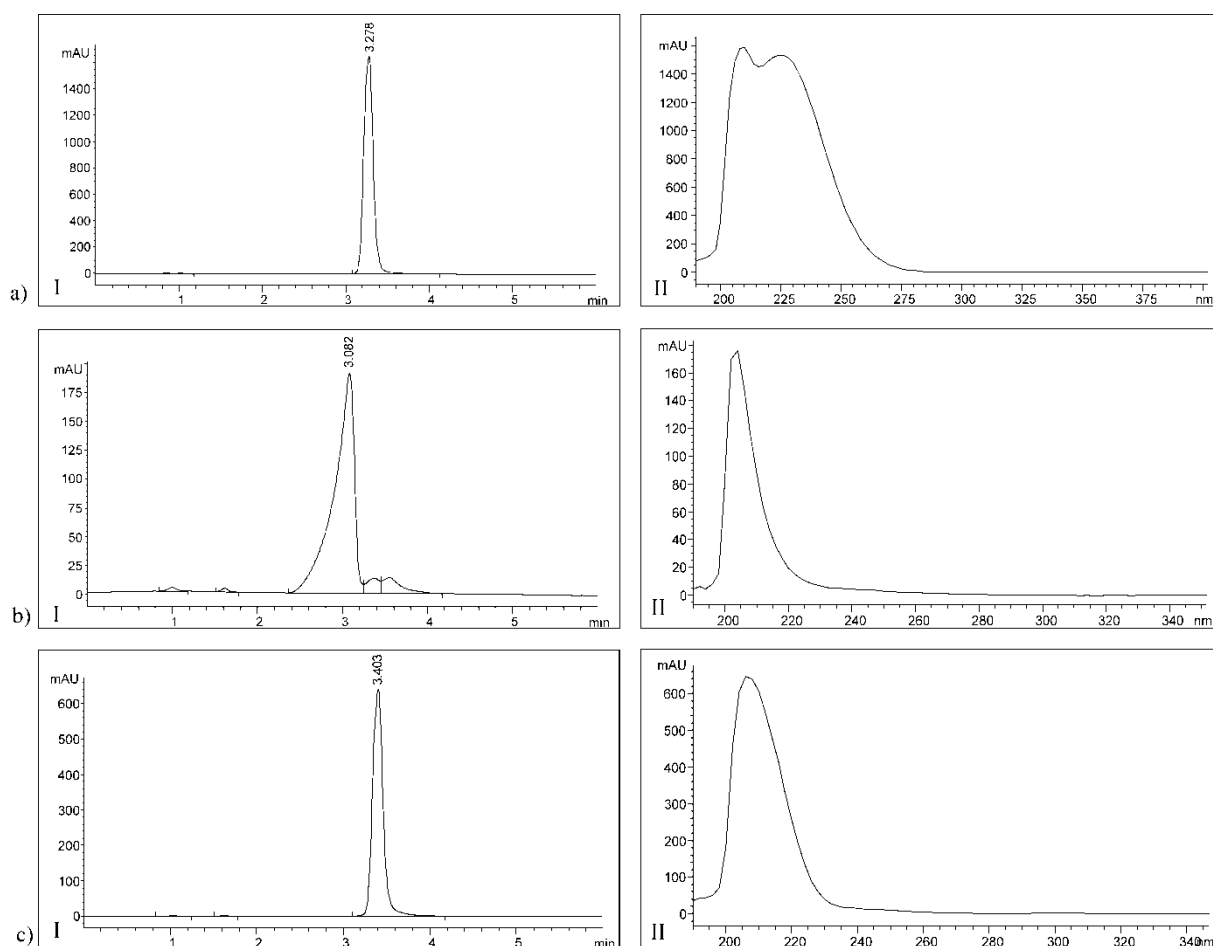
Slika 48. FTIR spektar sintetisanog kopolimera p(NiPAm-ko-AA)

U FTIR spektru sintetisanog kopolimera p(NiPAm-ko-AA) (Slika 48) uočava se odsustvo i pomeranje pojedinih apsorpcionih traka u poređenju sa FTIR spektrima monomera NiPAm i komonomera AA. Da je došlo do polimerizacije monomera u kopolimer ukazuje odsustvo apsorpcionih traka u FTIR spektru kopolimera od $\nu(\text{C}=\text{C})$ vibracija iz vinil grupa monomera i umreživača u oblasti $1620\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ i deformacionih $\delta(\text{C-H})$ vibracija u oblasti $1450\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$. Takođe, odsustvo traka od C-H deformacionih vibracija van ravni $\gamma(\text{C-H})$, a koje se javljaju u spektrima NiPAm-a i AA na 989 i 918 i 1044 i 982 cm^{-1} , redom, jasno ukazuju da su u proces polimerizacije učestvovalе vinilne grupe monomera. U strukturi kopolimera su očuvane karboksilna i alkilovana amidna grupa iz AA i NiPAm-a, redom, na šta ukazuje prisustvo odgovarajućih traka u FTIR spektru kopolimera. Široka apsorpciona traka izmenjenog oblika u odnosu na trake u istoj oblasti monomera u FTIR spektru kopolimera ima dva prevoja, jedan na 3488 cm^{-1} (koji potiče od $\nu(\text{OH})$ vibracija iz karboksilne grupe monomera AA), a drugi na 3298 cm^{-1} (koji odgovara $\nu(\text{N-H})$ vibracijama iz monomera NiPAm-a) (Farooqi i sar., 2015). Apсорciona traka na 1720 cm^{-1} u spektru kopolimera je rezultat valencionih vibracija C=O grupe komonomera AA. Maksimum ove trake pomeren je ka višim talasnim brojevima za 18 jedinica u odnosu na istu traku u FTIR spektru komonomera AA (Slika 47). U FTIR spektru kopolimera apсорciona traka na 1653 cm^{-1} odgovara amidnoj traci I, koja potiče od $\nu(\text{C}=\text{O})$ vibracija i pomerenа je za 5 jedinica ka nižim talasnim brojevima u odnosu na istu traku u FTIR spektru NiPAm-a (Slika 46). Analiza FTIR spektara monomera i kopolimera ukazuje da je polimerizacija ostvarena, a da je pretpostavljena struktura kopolimera p(NiPAm-ko-AA) (Slika 45) realna.

4.2.2.2. Analiza sadržaja rezidualnih monomera

U metanolnim rastvorima koji su dekantovanjem izdvojeni nakon potapanja kopolimera p(NiPAm-ko-AA), primenom HPLC hromatografije analiziran je sadržaj monomera i umreživača koji nisu izreagovali u reakciji polimerizacije. Pri odabranim uslovima hromatografske analize retenciono vreme (t_R) monomera NiPAm je 3,278 min, AA 3,082 min i umreživača EGDM 3,403 min. HPLC hromatogrami i UV spektri monomera i umreživača prikazani su na slici 49a(I i II), 49b(I i II) i 49c(I i II), redom.

Neporeagovale količine rezidualnih monomera i umreživača EGDM-a u toku sinteze kopolimera p(NiPAm-ko-AA) u odnosu na ukupnu masu sintetisanog kserogela, kao i procentualni udeo u odnosu na njihovu početnu masu u reakcionoj smeši prikazane su u tabeli 14.



Slika 49. HPLC hromatogrami (I) i UV spektri (II) standardnih rastvora: NiPAm, $c = 0,253 \text{ mg/cm}^3$ (a); AA, $c = 0,150 \text{ mg/cm}^3$ (b); EGDM, $c = 0,132 \text{ mg/cm}^3$ (c)

Tabela 14. Sadržaj rezidualnih reaktanata u sintetisanom kopolimeru p(NiPAm-ko-AA)

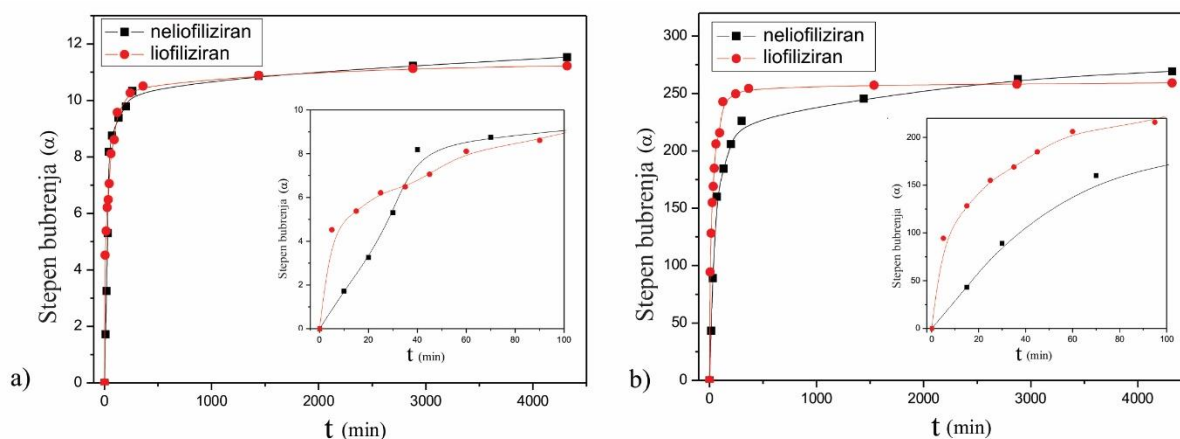
Sadržaj rezidualnih reaktanata u uzorku	NiPAm		AA		EGDM	
	mg/g	%	mg/g	%	mg/g	%
p(NIPAM-ko-AA) 95/5/1,5	1,937	0,212	0,103	0,175	0,101	0,382

Određeni sadržaji rezidualnih reaktanata su u prihvatljivim granicama i ukazuju na skoro potpunu konverziju polaznih učesnika u reakciji stvaranja kopolimera p(NiPAm-ko-AA). S obzirom da je toksičnost rezidualnih reaktanata limitirana njihovim sadržajem u kopolimeru i da je ukupan sadržaj rezidualnih reaktanata manji od 1%, što je u saglasnosti sa dozvoljenim granicama i u srodnim materijalima (Kostić i sar., 2017), sintetisani kopolimer p(NiPAm-ko-AA) se može smatrati bezbednim za primenu kao nosač aktivnih supstanci.

4.2.2.3. Analiza bubrenja gelova

Imajući u vidu saznanja o stabilnosti p(NiPAm-ko-AA) mikrogelova i istraživanja serije hidrogelova p(NiPAm-ko-AA) (Farooqi i sar., 2017; Zdravković i sar., 2017) studija bubrenja sintetisanog p(NiPAm-ko-AA) hidrogela, kao potencijalnog nosača za alternativne puteve primene, ispitana je u opsegu temperature 25-37 °C i pH 3,5-8,5 koji odgovaraju telesnoj temperaturi i pH vrednostima vaginalnog prostora i rektuma.

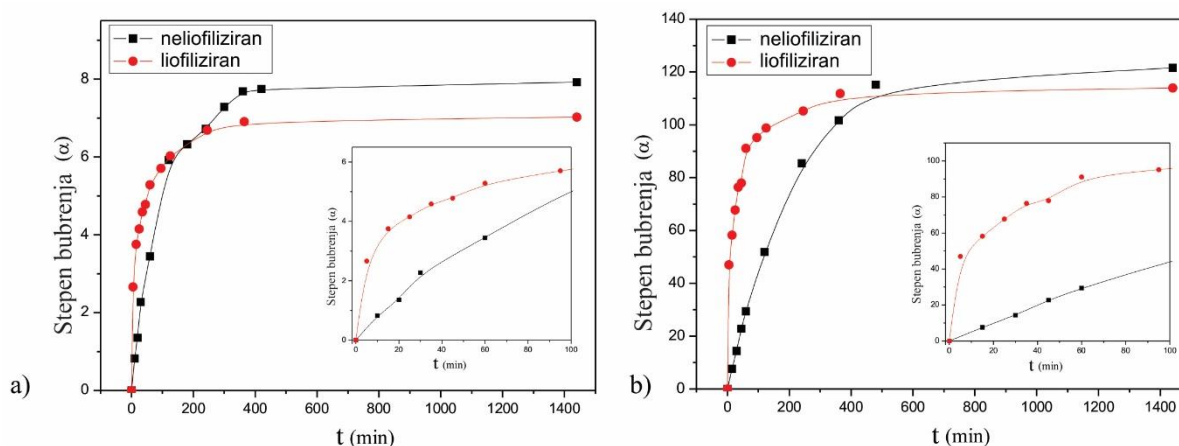
Na slikama 50 i 51 prikazane su promene stepena bubrenja neliofiliziranog i liofiliziranog uzorka hidrogela p(NiPAm-ko-AA) od vremena na različitim pH vrednostima sredine (3,5 i 8,5) i različitim temperaturama (25 i 37 °C).

**Slika 50.** Zavisnost procesa bubrenja hidrogela p(NiPAm-ko-AA) od vremena (pre i posle liofilizacije) u rastvoru temperature 25 °C i pH vrednosti: 3,5 (a) i 8,5 (b)

Uzorak hidrogela p(NiPAM-ko-AA) nabubreo u destilovanoj vodi do ravnotežnog stanja podvrgnut je postupku liofilizacije, pri čemu je dobijen polimer velikih pora. Zato liofilizirani hidrogel p(NiPAM-ko-AA) brže apsorbuje rastvor, samim tim ima veći stepen penetriranja rastvora unutar polimernog matriksa u početnoj fazi bubrenja (Slika 50). Mnogo veći ravnotežni stepen bubrenja neliofiliziranog i liofiliziranog hidrogela dobijen je u baznoj sredini, pH=8,5 (269,323 i 259,218) u poređenju sa kiselom sredinom pH=3,5 (11,531 i 11,226). Sa povećanjem pH vrednosti dolazi do širenja polimerne mreže usled elektrostatičkog odbijanja između većeg broja jonizovanih karboksilnih grupa (COO^-) polimernih lanaca (Zhang i sar., 2002).

Uporednom analizom procesa bubrenja hidrogela p(NiPAM-ko-AA) pre i posle liofilizacije (Slika 51) na 37 °C se uočava isto ponašanje polimera po pitanju ravnotežnog bubrenja kao na 25 °C. Liofilizirani hidrogel p(NiPAM-ko-AA) na 37 °C znatno brže apsorbuje rastvor u prvih 100 min procesa bubrenja usled većih veličina pora dobijenih postupkom liofilizacije.

Povećanje temperature sa 25 na 37 °C uzrokuje kontrahovanje neliofiliziranog i liofiliziranog uzorka hidrogela p(NiPAM-ko-AA) i smanjenje ravnotežnog stepena bubrenja polimera (Slike 50 i 51), tako da se ova vrsta hidrogelova može klasifikovati u grupu negativno temperaturno-osetljivih.



Slika 51. Zavisnosti procesa bubrenja uzorka hidrogela p(NiPAM-ko-AA) od vremena (pre i posle liofilizacije) u rastvoru temperature 37 °C i pH vrednosti: 3,5 (a) i 8,5 (b)

U tabeli 15 prikazane su vrednosti kinetičkih parametara bubrenja hidrogela p(NIPAM-ko-AA), difuzioni eksponent (n), konstanta bubrenja (k) i koeficijent difuzije (D), pre i posle liofilizacije gela na 25 i 37 °C i pH vrednostima 3,5 i 8,5.

Difuzioni eksponent n , čija vrednost ukazuje koji faktor (difuzija molekula fluida i/ili relaksacija polimernih lanaca) kontroliše bubrenje, za uzorak hidrogela p(NiPAm-ko-AA), pre liofilizacije ima vrednost od 0,822 do 1,014 (Tabela 15). Bubrenje neliofiliziranog hidrogela p(NiPAm-ko-AA) generalno karakteriše anomalni mehanizam difuzije, tj. bubrenje zavisi od difuzije rastvora u matriks i relaksacije polimernih lanaca. Izuzetak je proces bubrenja neliofiliziranog hidrogela u rastvoru temperature 25 °C i pH vrednosti 3,5, koji je pod kontrolom relaksacije polimernih lanaca (Super Slučaj, Tip III) gde difuzioni eksponent ima vrednost veću od 1, tj. $n=1,014$. Nakon liofilizacije kod hidrogela p(NiPAm-ko-AA) na obe ispitivane temperature i pH vrednostima je zastupljen mehanizam apsorpcije rastvora koji odgovara Fick-ovoj difuziji (difuzioni eksponent je $n<0,5$; Tabela 15), bubrenje kontroliše difuzija vodenog rastvora unutar matriksa polimera.

Kod liofiliziranog hidrogela p(NiPAm-ko-AA) u ispitivanim procesnim uslovima zastupljene su veće vrednosti koeficijenta difuzije D i konstante k (Tabela 15), koji ukazuju na veći stepen penetriranja rastvora unutar hidrogela. Ovakav rezultat se objašnjava činjenicom da uzorak hidrogela p(NiPAm-ko-AA) podvrgnut liofilizaciji ima veću površinu na granici faza dostupnu kontaktu sa rastvorom, što omogućava bržu difuziju rastvora u prostor gela.

Tabela 15. Kinetički parametri bubrenja hidrogela p(NiPAm-ko-AA) pre i posle liofilizacije na različitim pH vrednostima (3,5 i 8,5) i temperaturama (25 i 37 °C)

Temperatura (°C)	pH	Pre liofilizacije				Posle liofilizacije			
		n	$k \times 10^2$ (min ^{1/n})	R^2	$D \times 10^7$ (cm ² /min)	n	k (min ^{1/n})	R^2	$D \times 10^4$ (cm ² /min)
25	3,5	1,014	1,420	0,989	3,960	0,190	0,295	0,977	1,700
25	8,5	0,844	1,716	0,972	5,778	0,303	0,222	0,990	0,972
37	3,5	0,822	1,567	0,975	4,820	0,282	0,243	0,981	1,160
37	8,5	0,936	0,503	0,995	0,496	0,222	0,286	0,976	1,610

n - difuzioni eksponent, k - konstanta bubrenja, D - koeficijent difuzije

Za ispitivanje uticaja procesnih faktora (pH vrednosti i temperature) na odzivnu veličinu, ravnotežni stepen bubrenja (α_e), kopolimera p(NiPAm-ko-AA) sintetisanog sa 5 mol% AA i 1,5 mol% EGDM-a urađeno je 9 eksperimenata. Matrica punog faktorijalnog dizajna (3^2) sa eksperimentalnim vrednostima odgovora prikazana je u tabeli 16.

Tabela 16. Matrica punog faktorijalnog dizajna sa eksperimentalnim vrednostima odgovora

Broj eksperimenta	X_1 t (°C)	X_2 pH	$Y_{\text{eksp.}}$ α_e
9	37	8,5	121,586
7	25	8,5	269,323
3	37	3,5	7,921
5	31	6,0	206,836
4	25	6,0	216,36
6	37	6,0	94,872
1	25	3,5	11,531
8	31	8,5	239,891
2	31	3,5	10,057

Konačna statistika modela pokazuje da je kvadratni model prihvatljiviji i pogodniji za opisivanje procesa bubrenja sintetisanog hidrogela p(NiPAm-ko-AA) u funkciji pH i temperature u poređenju sa linearnim i dvo-faktorsko interakcionim (2FI) modelom. Kvadratni model karakteriše najveća vrednost koeficijenta determinacije ($R^2=0,98$) i prilagođenog koeficijenta determinacije (adj. $R^2=0,95$) i najmanja vrednost standardne devijacije. Rezultati analize varijanse (ANOVA) kvadratnog modela za proces ravnotežnog bubrenja hidrogela p(NiPAm-ko-AA) prikazani su u tabeli 17.

Tabela 17. ANOVA test kvadratnog modela za ravnotežno bubrenje hidrogela p(NiPAm-ko-AA)

	SS	df	MS	F	p	
Model	87752,58	5	17550,52	30,65	0,0089	significant
X_1	12406,49	1	12406,49	21,67	0,0187	
X_2	60258,48	1	60258,48	105,25	0,0020	
X_1X_2	5193,15	1	5193,15	9,07	0,0571	
X_1^2	2047,47	1	2047,47	3,58	0,1550	
X_2^2	7847,00	1	7847,00	13,71	0,0342	
Residual	1717,66	3	572,55			
Cor Total	89470,23	8				

SS – Zbir kvadrata, df – stepeni slobode, MS – srednja kvadratna vrednost, F - Fišerova raspodela, p – verovatnoća greške.

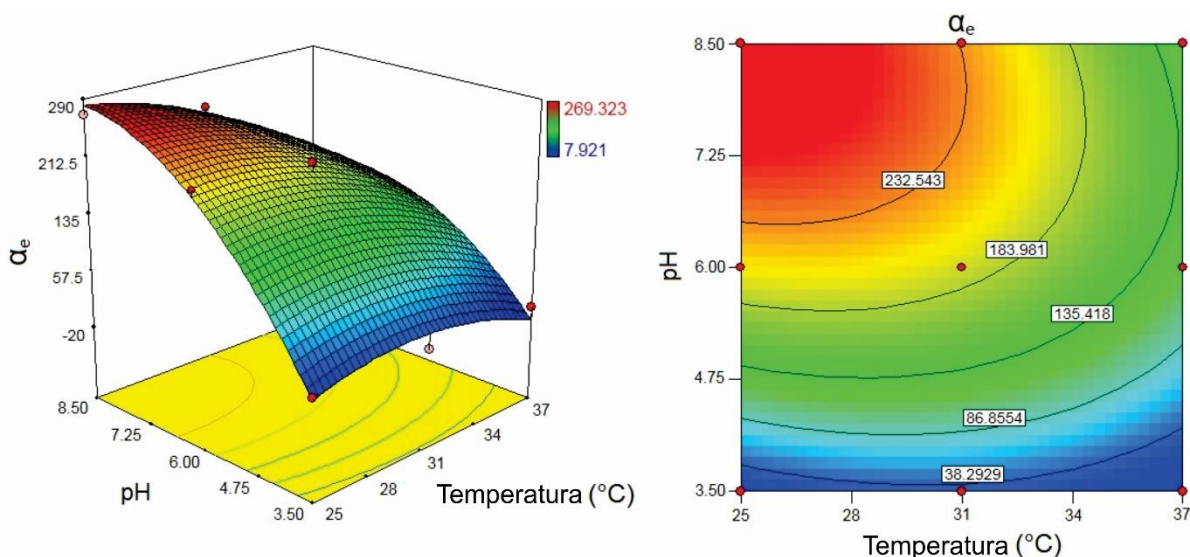
Kvadratni model je statistički značajan, jer ima vrednost pojavljivanja greške manju od 0,05 (Tabela 17, $p=0,0089$). Nezavisne promenljive, temperatura (X_1) i pH (X_2), se smatraju statistički značajnim članovima modela. Značajan je i kvadratni efekat promenljive pH (X_2^2), $p=0,0342$. Dobijena konačna jednačina (20) sa kodiranim vrednostima kvadratnog modela za ravnotežno bubrenje hidrogela p(NiPAm-ko-AA) glasi:

$$Y = 194,2 - 45,47X_1 + 100,22X_2 - 36,03X_1X_2 - 32,00X_1^2 - 62,64X_2^2 \quad (20)$$

Kada se kodirane vrednosti zamene stvarnim vrednostima dobija se polinomna jednačina (21) drugog reda:

$$\alpha_e = 194,2 - 45,47t + 100,22\text{pH} - 36,03t \text{pH} - 32,00t^2 - 62,64\text{pH}^2 \quad (21)$$

Jednačina sa kodiranim vrednostima se koristi za određivanje uticaja faktora na odgovor sistema. Veća apsolutna vrednost regresionog koeficijenta ukazuje na veći uticaj odgovarajućeg faktora na odgovor sistema. Znak ispred regresionog koeficijenta određuje vrstu uticaja faktora na odzivnu veličinu, pozitivan znak označava pozitivan efekat faktora na odgovor sistema, dok negativan znak ispred koeficijenta određuje negativan efekat na odgovor sistema (Garba i sar., 2014; Zabeti i sar., 2010). pH vrednost (X_2) ima najveći regresioni koeficijent (100,22; jednačina 21) i samim tim najveći uticaj na stepen ravnotežnog bubrenja hidrogela p(NIPAM-ko-AA). Prema kodiranoj jednačini modela temperatura (X_1) ima manji uticaj na odzivnu veličinu. Na osnovu znaka ispred regresionih koeficijenata zaključuje se da povećanje pH vrednosti izaziva povećanje ravnotežnog stepena bubrenja hidrogela p(NiPAm-ko-AA), dok temperatura ima suprotni efekat. Ove funkcionalne zavisnosti faktora i odzivne veličine prikazane su na slici 52.



Slika 52. Dijagram površine odgovora i konturni dijagram za ravnotežno bubrenje, α_e , hidrogela p(NiPAm-ko-AA) u funkciji temperature i pH vrednosti

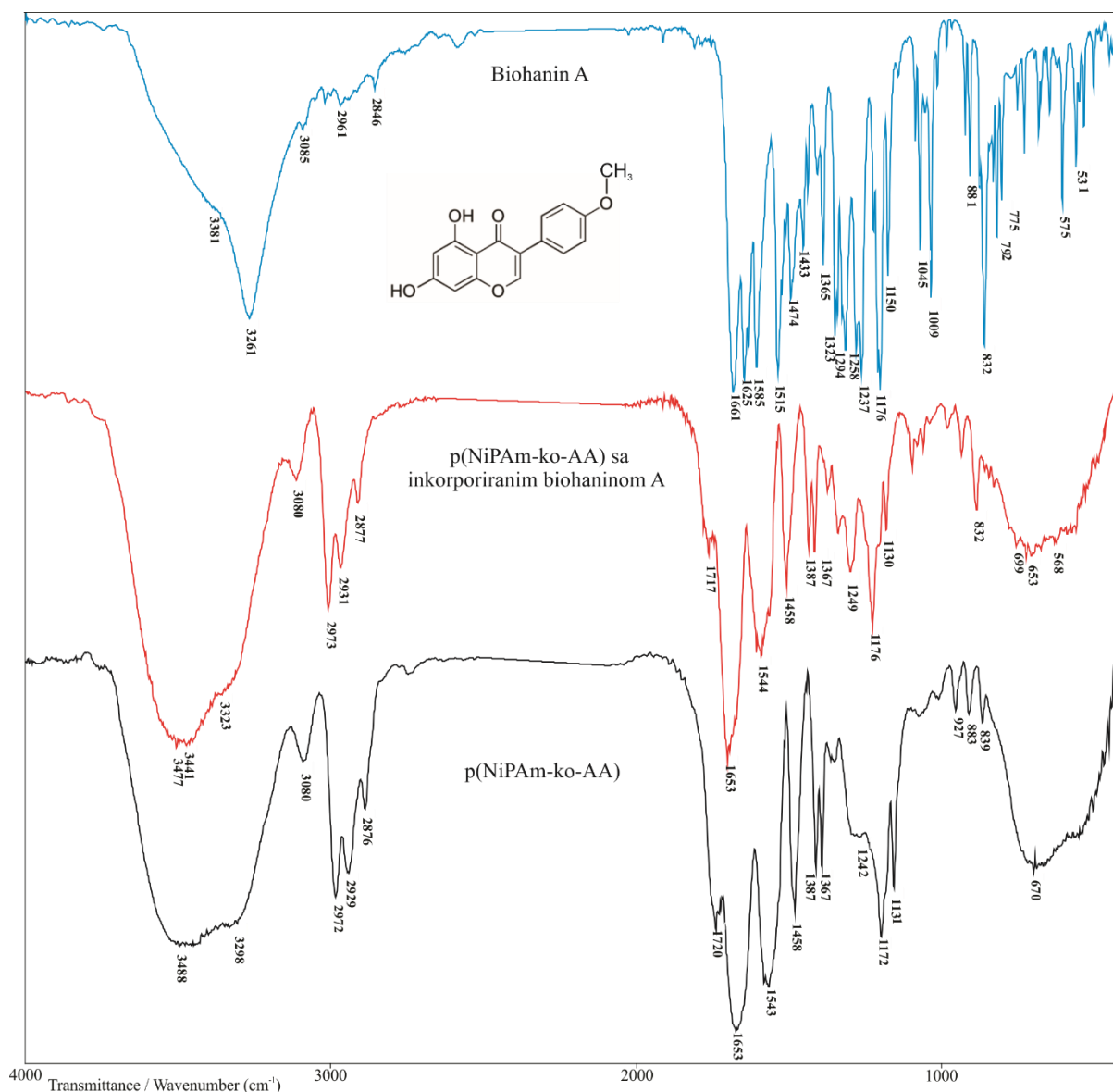
Sa slike 52 se zapaža da sa povećanjem pH vrednosti medijuma raste stepen ravnotežnog bubrenja hidrogela p(NiPAm-ko-AA). Maksimalna vrednost stepena bubrenja hidrogela p(NiPAm-ko-AA) je prema modelu dobijena u rastvoru pH vrednosti 8,50 i temperature 25 °C, $\alpha_e=281,11$, dok pri istim procesnim uslovima eksperimentalna vrednost iznosi $\alpha_e=269,32$.

4.2.3. Ispitivanje kopolimera p(NiPAm-ko-AA) kao matrice za modifikovano oslobađanje biohanina A

4.2.3.1. Strukturna analiza kopolimera p(NiPAm-ko-AA) sa biohaninom A

Kopolimer sa inkorporiranim BHA koji je preveden u stanje kserogela analiziran je FTIR metodom uporedo sa BHA i sintetisanim kopolimerom p(NiPAm-ko-AA) (Slika 53).

U FTIR spektru BHA, jaka i široka apsorpciona traka u oblasti talasnih brojeva 3400-3200 cm^{-1} sa centroidom na 3261 cm^{-1} se pripisuje valencionim vibracijama fenolnih OH grupa, $\nu(\text{OH})$. Karakteristična C-O valencionna vibracija fenola, $\nu(\text{C-O})_{\text{Ar}}$, daje jaku traku u oblasti 1260-1000 cm^{-1} i u FTIR spektru BHA se nalazi na 1176 cm^{-1} (Chrzanowska i sar., 2015; Dowling i sar., 2010; Sachdeva i sar., 2016). Deformacione vibracije hidroksilne grupe u ravni, $\delta(\text{OH})$, javljaju se u oblasti 1500-1300 cm^{-1} i daju traku slabog intenziteta u FTIR spektru BHA na 1323 cm^{-1} . Jaka apsorpciona traka sa maksimumom na 1661 cm^{-1} može se pripisati valencionim vibracijama karbonilne keto grupe $\nu(\text{C=O})$ koja je prisutna u strukturi BHA. Karakteristične apsorpcione trake u spektru BHA na 1625, 1585 i 1515 cm^{-1} potiču od valencionih C=C vibracija u aromatičnom prstenu, $\nu(\text{C=C})_{\text{Ar}}$, što je u saglasnosti sa literaturom (Chrzanowska i sar., 2015). Valencione C-O-C vibracije etarske grupe $\nu_{\text{as}}(\text{C-O})$ javljaju se kao intenzivne trake u oblasti talasnih brojeva 1275-1200 cm^{-1} , a u FTIR spektru BHA se nalaze na 1237 i 1258 cm^{-1} .



Slika 53. FTIR spektri BHA, kopolimera p(NiPAm-ko-AA) sa inkorporiranim BHA i kopolimera p(NiPAm-ko-AA)

Inkorporiranjem BHA u kopolimer p(NiPAm-ko-AA) očekuje se uspostavljanje intermolekulskih interakcija po tipu vodonične veze između fenolnih OH grupa BHA kao proton-donora, sa kiseonikom iz C=O i C-O grupa proton akceptora, bočnih lanaca kopolimera p(NiPAm-ko-AA). Takođe, C=O grupa iz BHA može formirati vodonične veze sa NH i OH grupama donorima protona bočnih lanaca hidrogela p(NiPAm-ko-AA).

U FTIR spektru kopolimera p(NiPAm-ko-AA) sa BHA postoji pomeranje trake od valencionih vibracija OH grupe (koja potiče iz karboksilne grupe komonomera AA) za 11 jedinica ka nižim talasnim brojevima (3477 cm^{-1}) u odnosu na traku u FTIR spektru kopolimera p(NiPAm-ko-AA). Smanjenje frekvencije navedenih valencionih vibracija

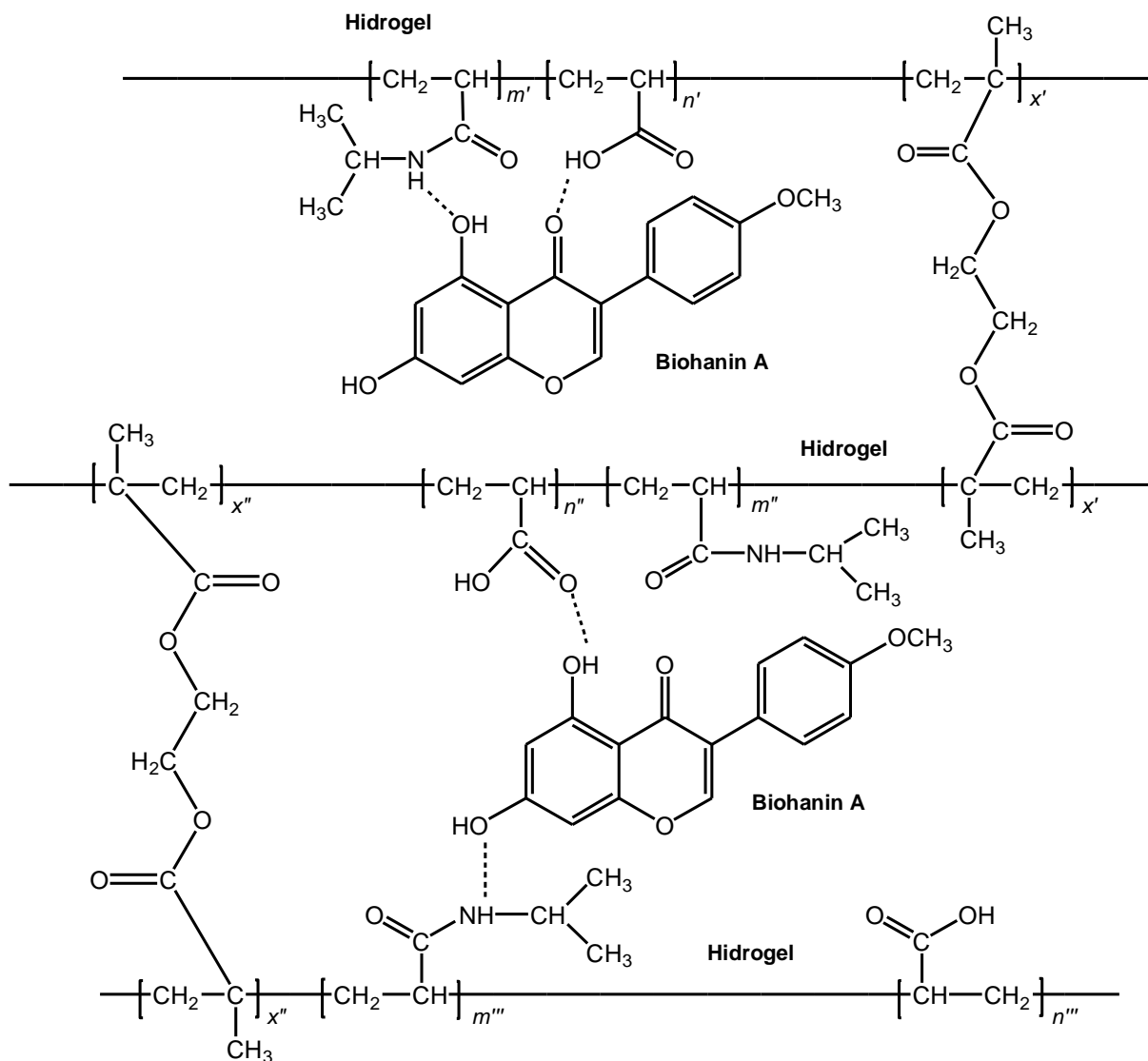
ukazuje da su učestvovala u formiranju vodonične veze, a veličina ovog pomeranja je proporcionalna jačini nastale vodonične veze. Centroid trake na 3323 cm^{-1} u spektru kopolimera sa BHA, koja odgovara valencionim N-H vibracijama iz kopolimera p(NiPAm-ko-AA), $\nu(\text{N-H})$, pomeren je za 25 jedinica ka višim talasnim brojevima u odnosu na položaj iste trake u spektru kopolimera p(NiPAm-ko-AA). U FTIR spektru kopolimera sa BHA zapaženo je izvesno pomeranje centroida trake od deformacionih vibracija N-H grupe u bočnom lancu kopolimera, $\delta(\text{N-H})$, ka višim talasnim brojevima (na 1544 cm^{-1}) što ukazuje da je NH grupa učestvovala u formiranju vodonične veze.

Centroid amidne trake I, $\nu(\text{C=O})$, na 1653 cm^{-1} nije pomeren u odnosu na položaj iste trake u spektru čistog p(NiPAm-ko-AA) nakon inkorporiranja BHA, što ukazuje da ova grupa nije učestvovala u intermolekulskim interakcijama.

Centroidi traka od valencionih vibracija C-O grupe u FTIR spektru kopolimera sa BHA zapažaju se na 1249 cm^{-1} od $\nu_{\text{as}}(\text{C-O})$ i na 1176 cm^{-1} od $\nu_{\text{s}}(\text{C-O})$ i pomereni su za 7 i 4 jedinica, redom, ka višim talasnim brojevima u odnosu na položaj istih traka u spektru kopolimera p(NiPAm-ko-AA). Centroid trake C=O karbonilne grupe na 1717 cm^{-1} , $\nu(\text{C=O})$, pomeren je za 3 jedinice ka nižim talasnim brojevima u spektru kopolimera sa inkorporiranim BHA u odnosu na njen položaj u FTIR spektru kopolimera p(NiPAm-ko-AA). Ova pomeranja takođe ukazuju na učešće C=O grupa u građenju intermolekulskih vodoničnih veza.

Deformacione vibracije u ravni, $\delta(\text{OH})$, javljaju se na 1387 cm^{-1} u spektru kopolimera sa BHA i pokazuju pomeranje trake za 64 jedinica ka višim talasnim brojevima u odnosu na položaj iste trake u spektru BHA, što ukazuje da učestvuju u građenju jakih intermolekulskih vodoničnih veza, što je saglasno sa literaturnim podacima (Chrzanowska i sar., 2015).

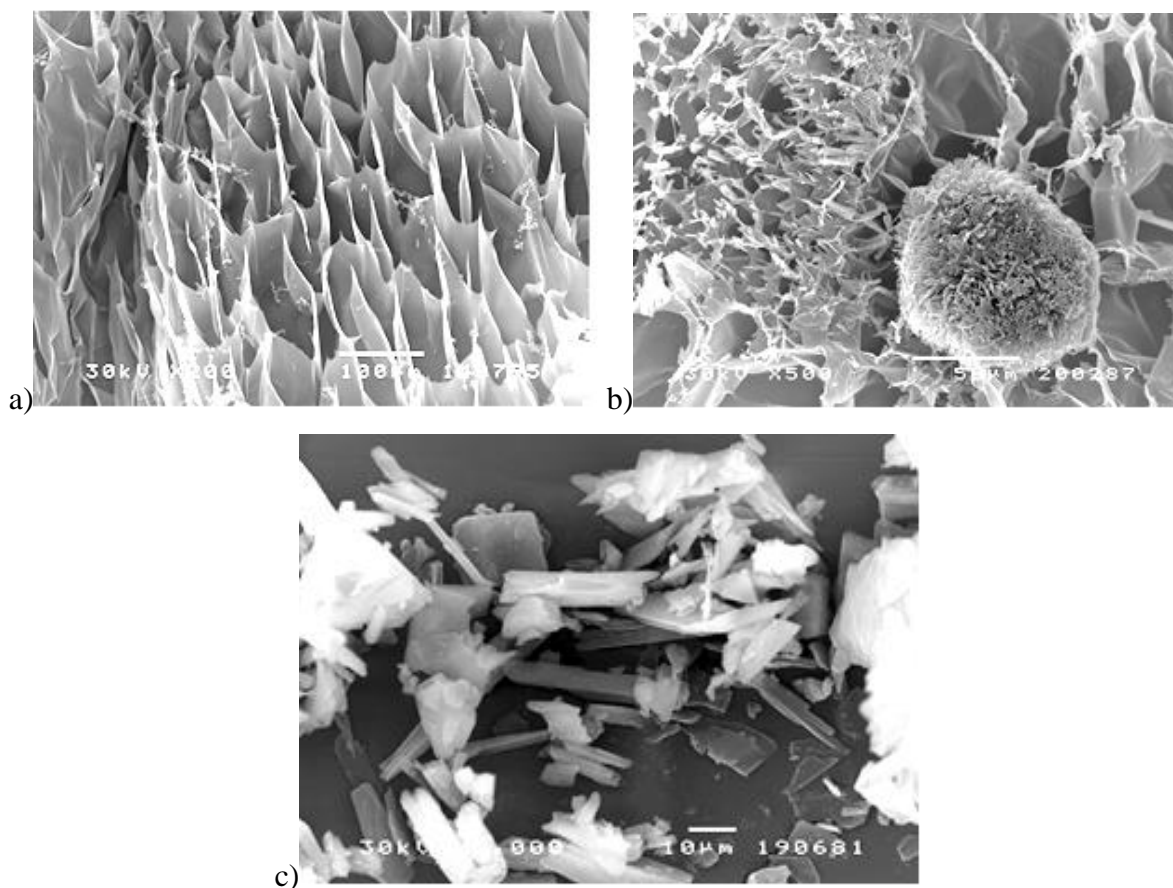
Na osnovu FTIR analize predložena je struktura kopolimera p(NiPAm-ko-AA) sa inkorporiranim BHA i ostvarenim intermolekulskim vodoničnim vezama između kopolimera i BHA (Slika 54).



Slika 54. Struktura kopolimera p(NiPAm-ko-AA) sa inkorporiranim BHA i uspostavljenim intermolekulskim H-vezama

4.2.3.2. Morfološka analiza primenom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM)

Morfologija sintetisanog p(NiPAm-ko-AA) hidrogela, BHA, i uticaj inkorporiranog BHA na morfologiju hidrogela ispitana je skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Uzorci hidrogelova nabubrela do ravnotežnog stanja liofilizirani su u cilju dobijanja jasnije slike o morfologiji. Dobijene SEM mikrografije prikazane su na slici 55.



Slika 55. SEM mikrografije uzorka p(NiPAm-ko-AA) hidrogela sa 5% AA i 1,5 mol% EGDM sa uvećanjem 200× (bar 100 μm) (a), p(NiPAm-ko-AA) hidrogel sa ugrađenim BHA sa uvećanjem 500× (bar 50 μm) (b) i BHA 1000× (bar 10 μm) (c)

Veličina pora sintetisanog kopolimera p(NiPAm-ko-AA) u nabubrelom stanju kreće se do 100 μm. Pore su prilično ujednačene i ovakva strukturna organizacija polimerne mreže odgovara makroporoznim polimerima što obezbeđuje dovoljno slobodnog prostora u kome se mogu uklopiti drugi molekuli (Slika 55a). Ugradnja BHA koji ima kristalnu strukturu (Slika 55c) u p(NiPAm-ko-AA) hidrogel utiče na morfologiju poprečnog preseka hidrogela čineći je manje poroznom, jer su pore popunjene molekulima BHA (Slika 55b). Dobijeni rezultati SEM analize ukazuju da je BHA inkorporiran u kopolimer p(NiPAm-ko-AA) i u saglasnosti su sa rezultatima FTIR analize.

4.2.4. Efikasnost inkorporiranja biohanina A u p(NiPAm-ko-AA) hidrogel

Određena je efikasnost inkorporiranja BHA u odnosu na ukupno raspoloživu početnu masu ($L_u=60 \text{ mg/g}_{\text{kserogela}}$) u polimernu mrežu neliofiliziranih i liofiliziranih hidrogelova

p(NiPAm-ko-AA). Vrednosti masa liofiliziranih i neliofiliziranih kserogelova p(NiPAm-ko-AA), mase inkorporiranog BHA, L_g , i efikasnost inkorporiranja, η , prikazane su u tabeli 18.

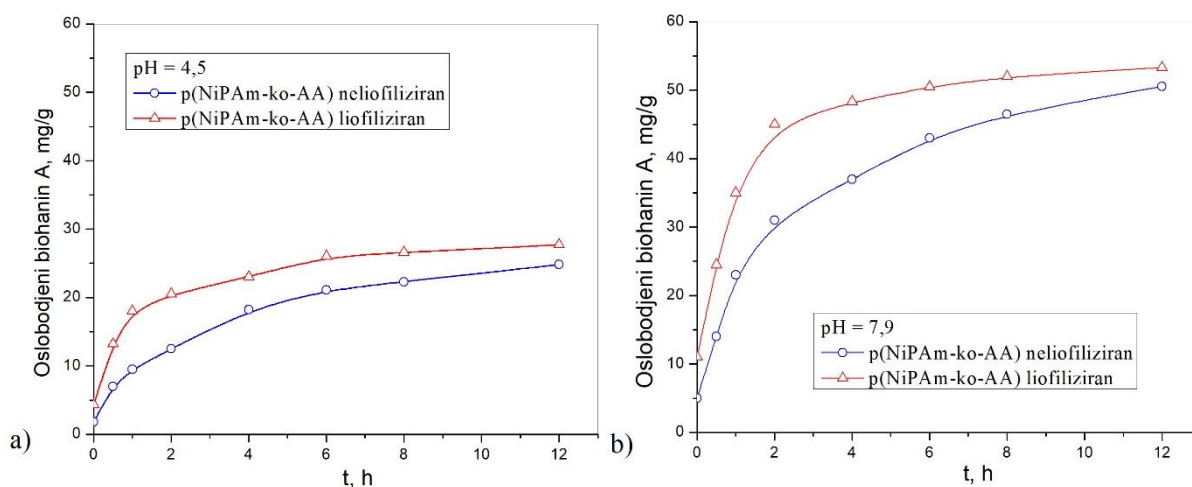
Tabela 18. Mase kserogelova, mase inkorporiranog BHA (L_g) i efikasnost inkorporiranja (η)

p(NiPAm-ko-AA)	Masa kserogela (g)	L_g (mg/g _{kserogela})	η biohanin A (%)
neliofilizirani	0,0206	55,660	92,767
lioofilizirani	0,0196	58,323	97,205

Rezultati pokazuju zadovoljavajuće inkorporiranje BHA u polimernu mrežu neliofiliziranih i liofiliziranih hidrogelova p(NiPAm-ko-AA). Efikasnost inkorporiranja u polimernu mrežu liofiliziranih hidrogelova p(NiPAm-ko-AA) je veća (97,205%) u poređenju sa neliofiliziranim hidrogelovima (92,767%) što je u saglasnosti sa rezultatima studije bubrenja.

4.2.5. *In vitro* otpuštanje biohanina A iz kopolimera p(NiPAm-ko-AA)

Oslobađanje BHA iz neliofiliziranih i liofiliziranih kopolimera p(NiPAm-ko-AA) praćeno je u *in vitro* uslovima na 37 °C i pH 4,5 i 7,9, koji simuliraju telesnu temperaturu i pH sredinu vaginalnog prostora i rektuma (Bitterman i sar., 1969; O’Hanlon i sar., 2011), primenom UV/Vis spektrofotometrije. Rezultati ovih istraživanja prikazani su na slikama 56a i 56b, redom.



Slika 56. Količina oslobođenog BHA na 37 °C iz neliofiliziranog i liofiliziranog kopolimera p(NiPAm-ko-AA) na pH=4,5 (a) i pH=7,9 (b)

Rezultati oslobađanja BHA u rastvoru pH vrednosti 4,5 na 37 °C tokom 12 h pokazuju da oslobođena količina iz neliofiliziranog p(NiPAm-ko-AA) kopolimera iznosi 24,82 mg/g_{kserogela} (41,37%), a iz liofiliziranog 27,71 mg/g_{kserogela} (46,18%) od ukupno raspoložive količine (Slika 55a). U oba kopolimera nakon 12 h preostalo je više od 50% BHA u porama što pruža mogućnost za produženo oslobađanje u sredini koja simulira vaginalni prostor.

Sadržaj BHA oslobođenog iz neliofiliziranog kopolimera p(NiPAm-ko-AA) u rastvoru pH vrednosti 7,9 na 37 °C tokom 12 sati iznosi 50,57 mg/g_{kserogela}, (84,28%), a iz liofiliziranog 53,29 mg/g_{kserogela} (88,83%) u odnosu na raspoloživu količinu, u uslovima pH sredine koja odgovara rektumu.

Istraživanja pokazuju da pH vrednost okolnog medijuma i liofilizacija imaju uticaj na oslobađanje BHA iz kopolimera p(NiPAm-ko-AA). Iz oba kopolimera p(NiPAm-ko-AA), neliofiliziranog i liofiliziranog, pri pH 7,9 oslobodi se veća količina BHA (84,28-88,83%) nego pri pH 4,5 (41,37-46,18%), redom. Na fiziološkoj temperaturi tela (37 °C) koja je viša od temperature zapreminskog faznog prelaza LCST kopolimera p(NiPAm-ko-AA), intermolekularne interakcije između BHA i bočnih grupa polimerne matrice se raskidaju, dolazi do kontrakcije polimernog matriksa i oslobađanja BHA.

Kinetički parametri oslobađanja BHA iz matrice kopolimera p(NiPAm-ko-AA) izračunati su primenom jednačina 13-16, a rezultati prikazani u tabeli 19 ukazuju da se proces odvija po Fick-ovom zakonu difuzije fluida. Transport leka je sporiji od procesa relaksacije polimernih lanaca i kontrolisan je procesom difuzije.

Tabela 19. Kinetički parametri oslobađanja BHA iz neliofiliziranih i liofiliziranih hidrogelova p(NiPAm-ko-AA), na pH vrednostima 4,5 i 7,9 i temperaturi od 37 °C

Temperatura (°C)	pH	Neliofiliziran gel				Liofiliziran gel			
		<i>n</i>	<i>k</i> (min ^{1/n})	<i>R</i> ²	<i>D</i> ×10 ⁵ (cm ² /min)	<i>n</i>	<i>k</i> (min ^{1/n})	<i>R</i> ²	<i>D</i> ×10 ⁴ (cm ² /min)
37	4,5	0,274	0,197	0,984	3,577	0,257	0,217	0,997	4,252
37	7,9	0,439	0,106	0,966	1,807	0,292	0,185	0,976	2,695

Veće vrednosti koeficijenta difuzije *D* iz liofiliziranog hidrogela p(NiPAm-ko-AA) ukazuju na veću brzinu oslobađanja BHA, što je i očekivano usled većih pora gela.

Na osnovu dobijenih rezultata, pokazano je da kopolimer p(NiPAm-ko-AA) neliofiliziran i liofiliziran može biti pogodan kao nosač za modifikovano oslobađanje BHA za

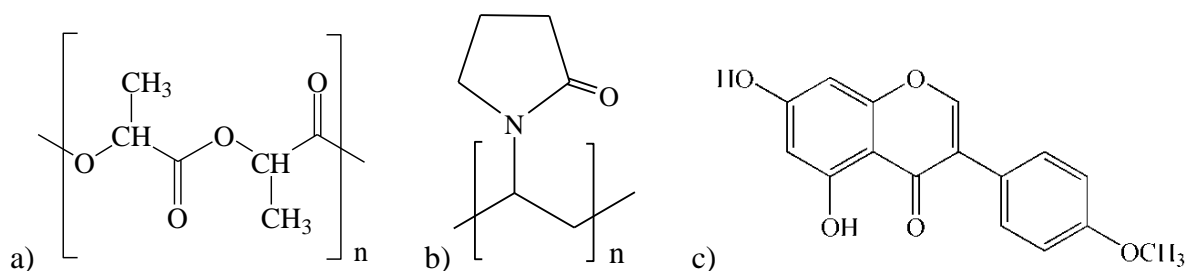
rektalnu i vaginalnu primenu. Formulacije BHA sa pH- i termo- osetljivim kopolimerom p(NiPAm-ko-AA), neliofiliziranim i liofiliziranim, mogu biti interesantne za dalja istraživanja.

4.3. ELEKTROSPINOVANA POLIMERNA VLAKNA KAO NOSAČI BIOHANINA A

4.3.1. Priprema i karakterizacija elektrospिनovanih polimernih vlakana sa i bez biohanina A

Elektrospिनovana PLA vlakna su pripremljena korišćenjem 9% rastvora PLA u smeši hloroforma i dimetilformamida (6:4, v/v), a elektrospिनovana vlakna od PVP su pripremljena u etanolu koncentracije 12%. Strukturna formula PLA je prikazana na slici 57a, a PVP na slici 57b. Odabrana kombinacija rastvarača i koncentracija polimera omogućile su zadovoljavajuću isparljivost rastvarača iz rastvora polimera tokom procesa elektrospिनovanja. Pored toga, pripremljeni rastvori moraju imati odgovarajući viskozitet, što je veoma važan parametar za morfologiju dobijenih vlakana. Viskozitet polimernih rastvora iz kojih su izrađena polimerna vlakna iznosio je 400 mPa·s.

Vlakna sa BHA pripremljena su elektrospिनovanjem rastvora PLA ili PVP polimera sa 2% ili 5% BHA u odnosu na masu polimera. Struktura BHA prikazana je na slici 57c.



Slika 57. Hemijska struktura: PLA (a); PVP (b) i BHA (c)

Proces elektrospिनovanja se izvodi na sobnoj temperaturi što je veoma važno za termoosetljive aktivne supstance, kakav je BHA, čime se sprečava njegoa termička degradacija i obezbeđuje stabilnost.

4.3.2. Mehanička svojstva elektrospिनovanih vlakana

Mehanička svojstva polimernih elektrospिनovanih PLA i PVP vlakana prikazana su u tabeli 20. Merenje je obavljeno na pet uzoraka i uzeta srednja vrednost. Kada se uporede mehanička svojstva uzoraka u okviru serije materijala baziranih na PLA, može se zaključiti da je prisustvo BHA izazvalo blagi porast maksimalnog naprezanja, dok je elongacija bila značajno veća za uzorke sa 5% BHA. Izduženje materijala u tački maksimalnog naprezanja bilo je manje za uzorke sa većim sadržajem BHA tj. 4,69% za čisti PLA i 4% za PLA-BHA-5%, što i nije značajnije smanjenje.

Kada se uporede mehaničke osobine uzoraka u okviru serije materijala na bazi PVP, može se zaključiti da je prisustvo BHA izazvalo smanjenje maksimalnog naprezanja, sa 6,87 N/mm² za PVP na 5,38 N/mm² za uzorke sa 5% BHA. Takođe, elongacija je smanjena i na tački maksimalnog naprezanja iznosila je 20,54% za čisti PVP i 11,07% za PVP-BHA-5%, što je skoro duplo manja vrednost.

Tabela 20. Mehanička svojstva elektrospिनovanih polimernih vlakana sa i bez BHA

Oznaka uzoraka	Max. napon (N/mm ²)	Deformacija pri Max. naponu (%)	Napon pri prekidu (N/mm ²)	Deformacija pri prekidu (%)
PLA	0,44	4,69	0,53	5,47
PLA-BHA-2%	0,566	4,42	0,22	6,78
PLA-BHA-5%	2,083	4,00	0,35	37,60
PVP	6,87	20,54	6,36	25,80
PVP-BHA-2%	6,047	17,38	5,86	18,72
PVP-BHA-5%	5,38	11,07	1,48	14,19

Prikazani rezultati pokazuju da se mehanička svojstva PLA nisu značajno promenila u prisustvu BHA u ispitivanim koncentracijama i da se elektrospिनovana PLA vlakna mogu koristiti kao nosač u formulacijama za kontrolisanu isporuku BHA.

S obzirom da je slabo rastvorljiv u vodi, mešljivost BHA i PVP bi mogla biti lošija u odnosu na njegovu mešljivost sa PLA (Gajić i sar., 2022), što bi mogao biti razlog za smanjenje vrednosti svih praćenih mehaničkih parametara pri povećanju koncentracije BHA. Prisustvo BHA imalo je veći uticaj na izduženje materijala, smanjujući elastičnost sa povećanjem koncentracije. I pored toga, elektrospिनovana PVP vlakna se mogu koristiti kao nosač u formulacijama za kontrolisanu i brzu isporuku BHA.

4.3.3. Svojstva površine elektrospिनovanih vlakana

U tabeli 21 prikazane su vrednosti kontaktnog ugla uzoraka elektrospिनovanih vlakana sa i bez BHA. Hidrofobna svojstva BHA uticala su na površinska svojstva dobijenih formulacija u poređenju sa čistim polimernim materijalima. Elektrospिनovana PLA vlakna bez BHA već imaju hidrofobna svojstva, a dodavanje 2% BHA povećalo je kontaktni ugao za 17°, dok je 5% BHA povećalo kontaktni ugao za oko 25°. Ovo može ukazivati na to da su PLA vlakna zasićena molekulima BHA na površini, tako da svako dalje povećanje koncentracije BHA u PLA ima manji uticaj na hidrofobnost i kontaktni ugao.

Sadržaj 2% BHA u elektrospिनovanim vlaknima na bazi PVP povećava kontaktni ugao sa 28,12 na 57,61°, što je povećanje od skoro 30°, dok je kontaktni ugao za PVP-BHA-5% 69,71° i u poređenju sa PVP povećan je za više od 40°. Ovo pokazuje da BHA ima veći uticaj na promenu kontaktnog ugla u elektrospिनovanim vlaknima na bazi PVP nego na bazi PLA (Gajić i sar., 2022).

Tabela 21. Kontaktni ugao elektrospिनovanih vlakana sa i bez BHA

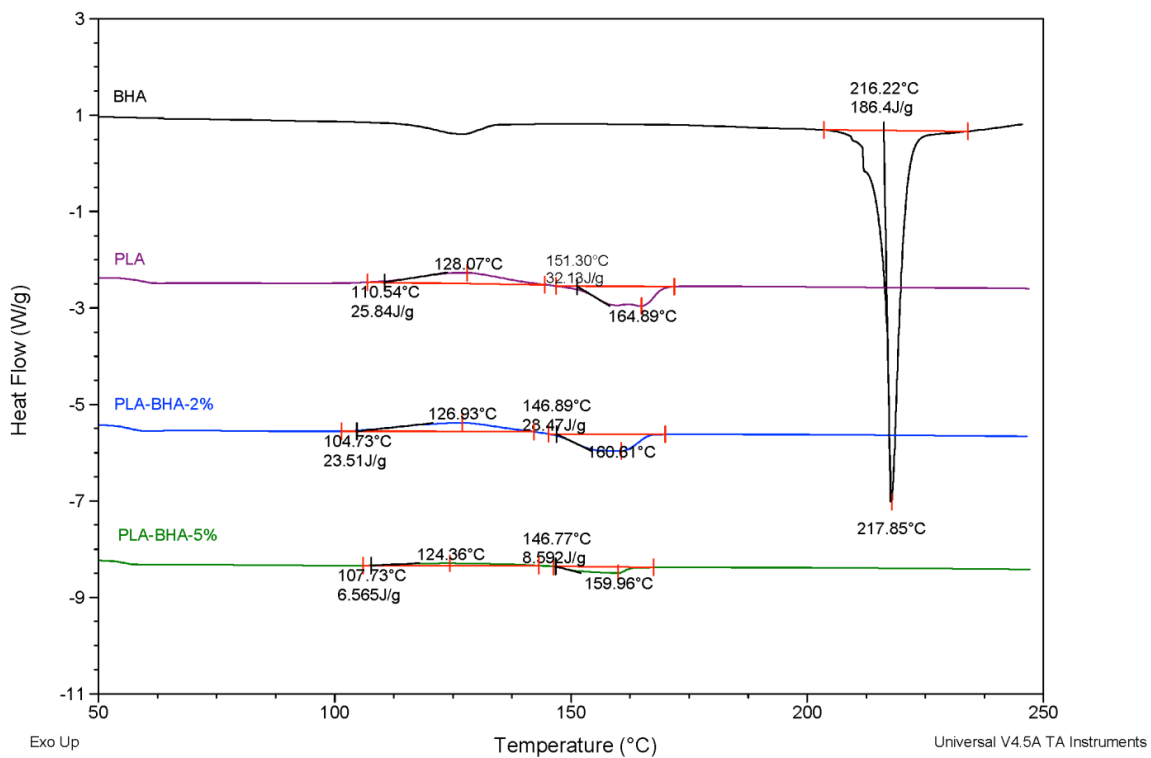
Oznaka uzoraka	Kontaktni ugao (°)
PLA	101,53
PLA-BHA-2%	118,13
PLA-BHA-5%	126,63
PVP	28,12
PVP-BHA-2%	57,61
PVP-BHA-5%	69,71

4.3.4. Termička svojstva elektrospिनovanih vlakana

Rezultati DSC analize BHA, PLA, PLA-BHA-2% i PLA-BHA-5% su prikazani na slici 58. Zbog dobre kompatibilnosti PLA matrice i BHA, što je potvrđeno rezultatima analize površinskih i mehaničkih svojstava, očekuje se zadovoljavajuća inkorporacija BHA u elektrospिनovana PLA vlakna. Zbog potpune inkorporacije BHA u vlakna, DSC krive elektrospिनovanih vlakana sa BHA ne sadrže pikove koji odgovaraju temperaturi topljenja BHA na 216 °C. Ova pojava je slična sa pojavama publikovanim u naučnoj literaturi, npr. odsustvo pika topljenja hlorheksidina u membrani vlakana celuloznog acetat ftalata (Vidal-Romero i sar., 2021).

DSC krive PLA-BHA-2% i PLA-BHA-5% pokazale su termičke prelaze karakteristične za PLA, kao što je vrednost Tg od oko 60 °C, hladnu kristalizaciju i topljenje. Maksimalna temperatura kristalizacije je smanjena sa 128,07 °C za PLA, na 126,93 °C za PLA-BHA-2% i 124,36 °C za PLA-BHA-5%. Entalpija kristalizacije je takođe smanjena sa 25,84 J/g za PLA, na 23,51 J/g za PLA-BHA-2% i 6,56 J/g za PLA-BHA-5%. Temperatura topljenja PLA je smanjena sa 164,89 °C na 160,61 °C za PLA-BHA-2% i 159,96 °C za PLA-BHA-5%. Entalpija topljenja je takođe smanjena sa 32,13 J/g za PLA, na 28,47 J/g za PLA-BHA-2% i 8,59 J/g za PLA-BHA-5%. Niža temperatura hladne kristalizacije i entalpija za veću koncentraciju BHA su rezultat nukleacijskih efekata ili ubrzanja kristalizacije BHA, pri čemu niža temperatura hladne kristalizacije uslovljava nižu temperaturu topljenja.

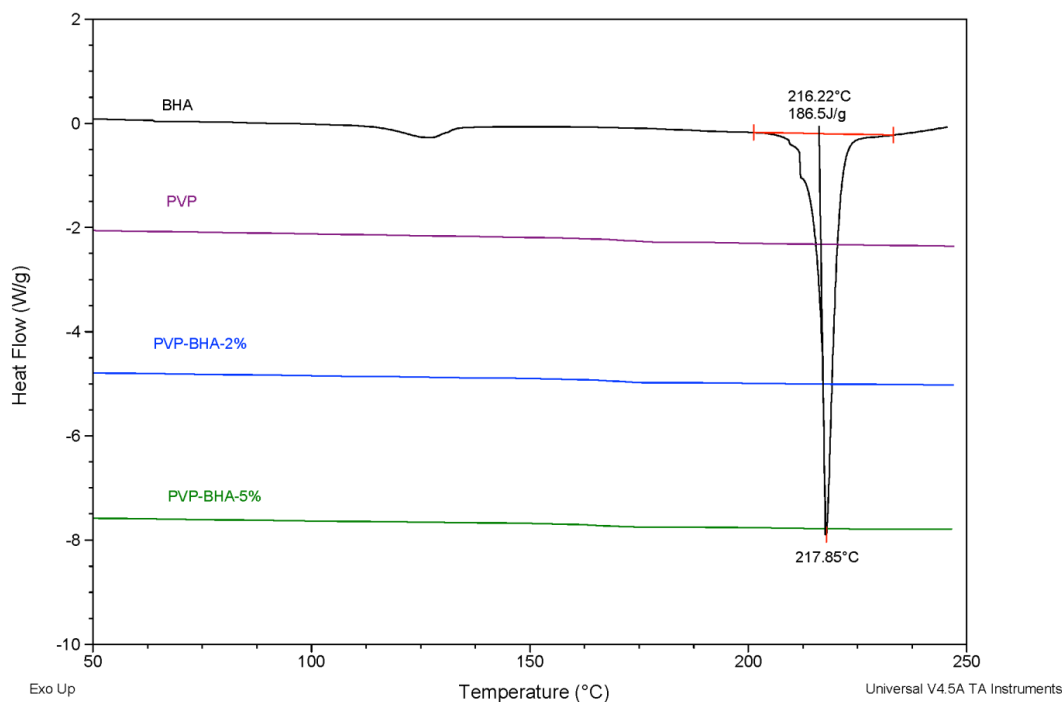
Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti da ugradnja BHA u PLA matricu umereno utiče na njena termička svojstva, sa izraženijim uticajem na entalpiju.



Slika 58. DSC krive BHA, elektrospinovanih PLA vlakana, PLA-BHA-2% i PLA-BHA-5%

Rezultati DSC analize BHA, PVP, PVP-BHA-2% i PVP-BHA-5% su prikazani na slici 59. Zbog dobrog ugrađivanja BHA u elektrospinovana PVP vlakna, DSC krive PVP-BHA-2% i PVP-BHA-5% nemaju pik koji odgovara temperaturi topljenja BHA na oko

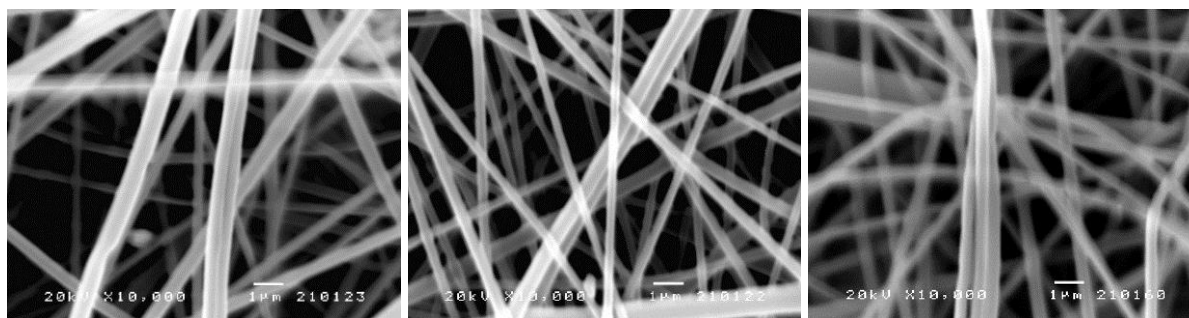
216°C. Takođe, na DSC krivama koje potiču od PVP, PVP-BHA-2% i PVP-BHA-5% nema termičkih promena u temperaturnom opsegu od 50 do 250°C. Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti da ugradnja BHA u PVP matricu ne utiče značajno na njena termička svojstva.



Slika 59. DSC krive BHA, elektrospinovanih PVP vlakana, PVP-BHA-2% i PVP-BHA-5%

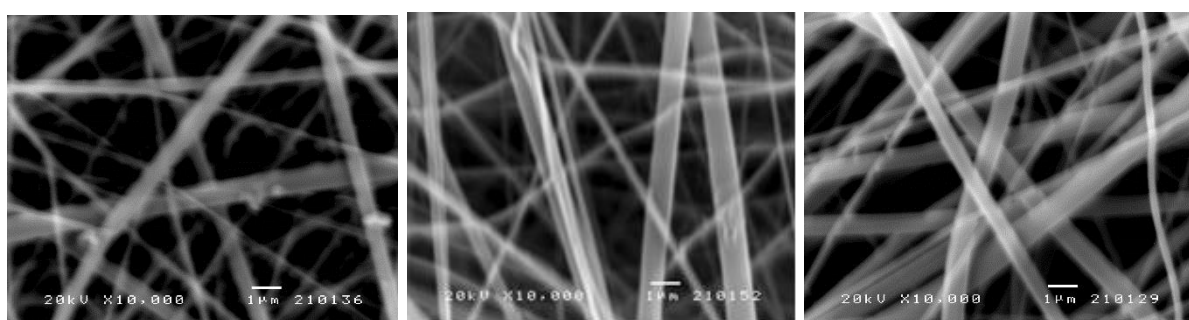
4.3.5. Morfologija elektrospinovanih polimernih vlakana

Morfologija elektrospinovanih polimernih vlakana je ispitivana korišćenjem skenirajuće elektronske mikroskopije. SEM mikrofografije PLA vlakana sa i bez BHA prikazane su na slici 60, a za vlakna na bazi PVP na slici 61. Elektrospinovana vlakna od PLA i PVP bez BHA su bila okrugla i glatka bez ikakvih vidljivih deformacija, debljine oko 1 μm (Slike 60a i 61a). Dodatak BHA nije uticao na izgled PLA i PVP vlakana (Slike 60b, 60c, 61b i 61c). Na površini vlakana nisu vidljivi kristali kao ni agregati BHA. To znači da je BHA potpuno ugrađen u polimerna vlakna i da su parametri procesa elektrospinovanja dobro definisani. Mali prečnik dobijenih vlakana na bazi PLA i PVP daje im veliku specifičnu površinu i kraći put difuzije aktivne supstance iz vlakana, što je veoma važno za isporuku slabo rastvorljivih aktivnih supstanci kao što je BHA. Osim toga, velika specifična površina može olakšati prenos mase i omogućiti efikasno oslobađanje BHA.



a) b) c)

Slika 60. SEM mikrografije vlakana dobijenih elektrospinoivanjem PLA (a), PLA-BHA-2% (b) i PLA-BHA-5% (c) (bar 1 µm; uvećanje 10,000×)



a) b) c)

Slika 61. SEM mikrografije vlakana dobijenih elektrospinoivanjem PVP (a), PVP-BHA-2% (b) i PVP-BHA-5% (c) (bar 1 µm; uvećanje 10,000×)

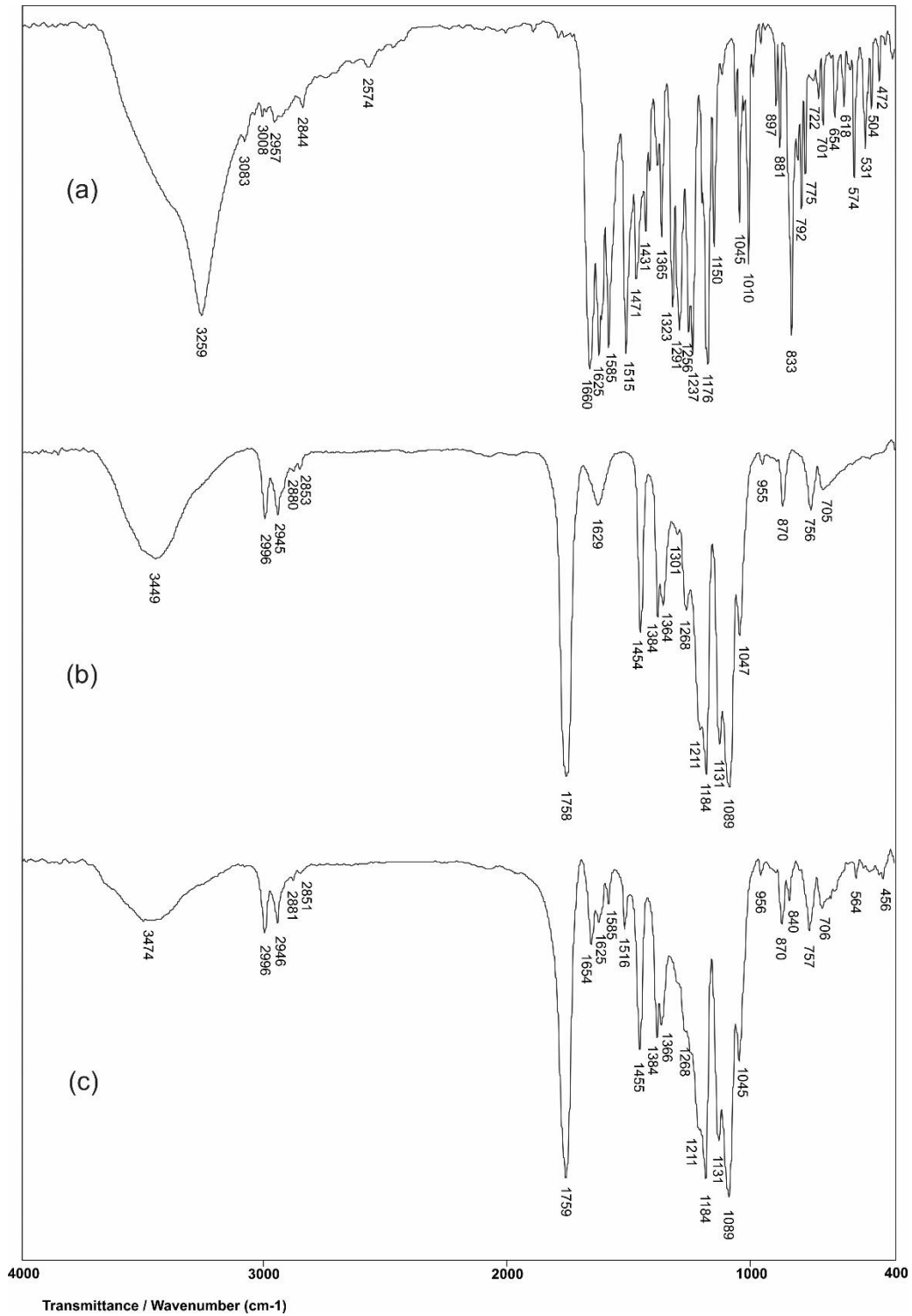
4.3.6. FTIR analiza elektrospinoivanih vlakana

Strukturalna karakterizacija elektrospinoivanih vlakana izvršena je primenom FTIR metode. Na slici 62 prikazani su FTIR spektri BHA, PLA i PLA-BHA-5%.

U FTIR spektru PLA (Slika 62b), prisutne su dve trake, na 2853 i 2945 cm^{-1} , redom, koje potiču od simetričnih i asimetričnih valentnih vibracija prisutnih C-H veza. Simetrične i asimetrične valentne vibracije C-H veza iz CH_3 grupe daju dve trake na 2880 i 2996 cm^{-1} . Široka apsorpciona traka koja potiče od valentnih vibracija hidroksilne grupe prisutna je u opsegu od 3200–3600 cm^{-1} , a ova traka ima maksimum na 3449 cm^{-1} u spektru PLA. Simetrične i asimetrične valentne vibracije C–O–C grupe daju dve trake sa centroidima na 1089 i 1184 cm^{-1} , redom. Traka na 1758 cm^{-1} potiče od valentnih vibracija alifatične estarske C=O grupe. Trake na 1454 i 1394 cm^{-1} se obično pripisuju deformacionim vibracijama C-H

veza u metil grupama. Takođe, preklapanje vibracija savijanja C-H veza sa vibracijama istezanja C-O-C veza daje traku na 1268 cm^{-1} u spektru PLA.

Da bi se ispitale interakcije između BHA i PLA, analizirani su FTIR spektri PLA sa i bez BHA (Slika 62), dok su frekvencije vibracija značajnih grupa prikazane u tabeli 22.



Slika 62. FTIR spektri BHA (a); PLA (b) i elektrospinovanih PLA-BHA-5% vlakana (c)

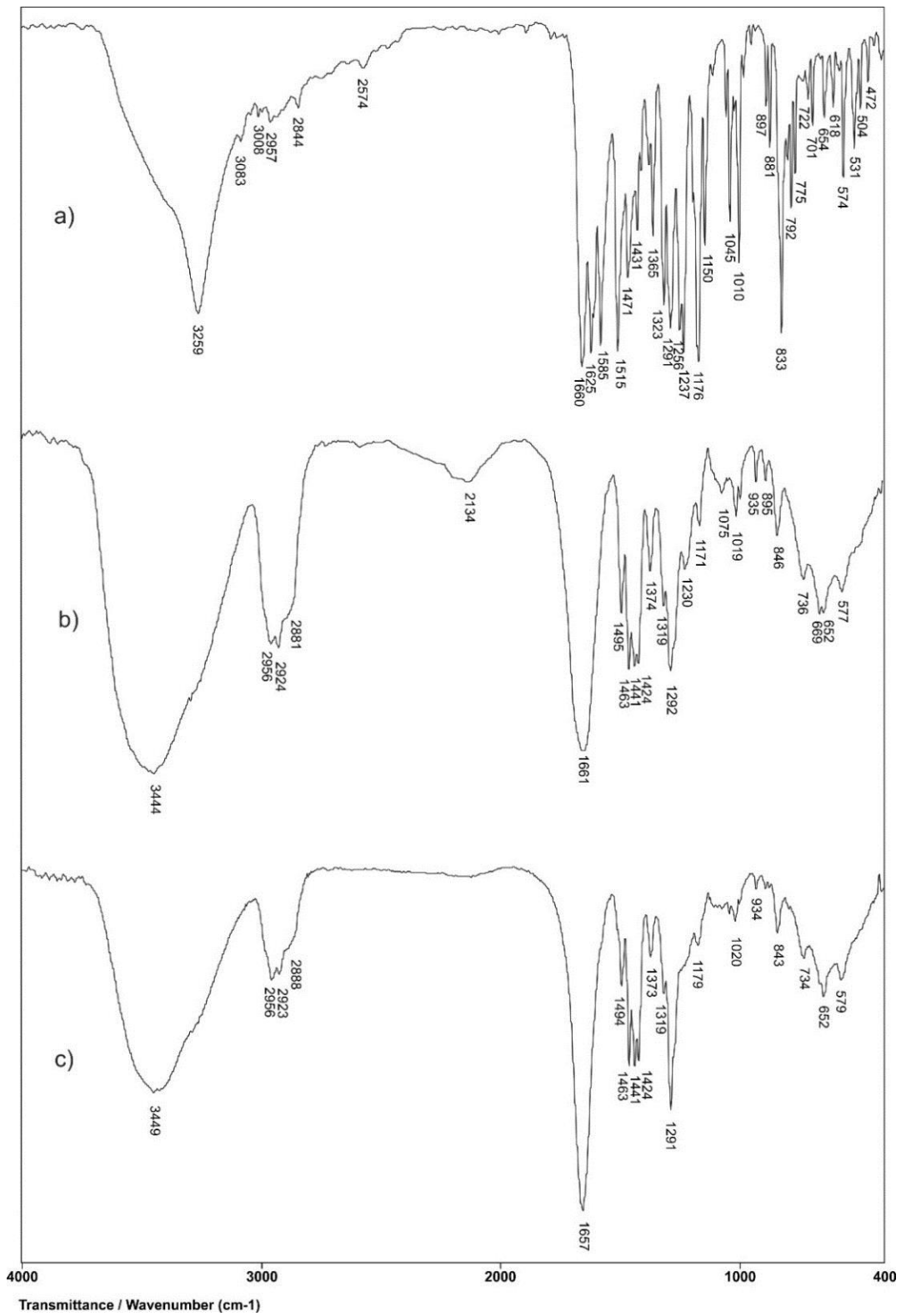
Tabela 22. Usporedne vrednosti frekvencija vibracija u FTIR spektrima PLA i PLA-BHA-5%

Vibracija	Traka u spektru PLA, cm^{-1}	Traka u spektru PLA-BHA-5%, cm^{-1}
$\nu_s(\text{C-H})$	2853	2851
$\nu_{as}(\text{C-H})$	2945	2946
$\nu_s(\text{C-H})$ iz CH_3	2880	2881
$\nu_{as}(\text{C-H})$ iz CH_3	2996	2996
$\nu_s(\text{C-O-C})$	1089	1089
$\nu_{as}(\text{C-O-C})$	1184	1184
$\nu(\text{C=O})$	1758	1759

Poređenjem vrednosti frekvencija vibracija u FTIR spektrima PLA i PLA-BHA-5%, može se primetiti da nema značajnih razlika ($0\text{--}2 \text{ cm}^{-1}$). Rezultati ove analize su pokazali da pomenute grupe iz PLA ne učestvuju u formiranju bilo kakve intermolekulske veze sa BHA. Takođe, valentne vibracije aromatičnih dvostrukih veza, $\nu(\text{C-O})_{\text{Ar}}$, na 1625 , 1585 i 1515 cm^{-1} u spektru BHA (Slika 62a) ne menjaju svoje pozicije u spektru PLA-BHA-5% (Slika 62c), što ukazuje da je BHA prisutan u polimeru, ali ne učestvuje u formiranju intermolekulske veze. Ovo je veoma povoljno, jer omogućava oslobađanje BHA iz elektrospinovanih PLA vlakana difuzijom bez usporavanja koja bi bila izazvana međumolekulskim vezama.

Na slici 63 prikazani su FTIR spektri BHA, PVP i PVP-BHA-5%. U radu Mireles i saradnika analizirana su fizičko-hemijska svojstva sintetisanih PVP-a (Mireles i sar., 2020). Konstatovano je da, zavisno od proizvodnih uslova, PVP polimerni lanac na jednom svom kraju molekula ima OH-grupu, dok se drugi kraj molekula hidrolizuje tako da se odvaja molekul pirolidona i nastaje aldehidna grupa. Valencionna vibracija koja potiče od OH grupe se uočava u FTIR spektru PVP-a na 3444 cm^{-1} (Slika 63b). Kod PVP traka koja potiče od valencionih vibracija C=O javlja se na 1661 cm^{-1} . Valencione $-\text{CH}$ vibracije javljaju se na 2956 cm^{-1} i 2924 cm^{-1} . Traka srednjeg intenziteta na 1292 cm^{-1} potiče od valencionih C-N vibracija. Na slici 63c prikazan je FTIR spektar PVP-a sa 5% BHA. U tabeli 23 prikazane su sve vrednosti frekvencija vibracija veza u molekulima PVP bez i sa 5% BHA. Poređenjem vrednosti frekvencija vibracija u FTIR spektru PVP-a i PVP-a sa 5% BHA može se primetiti da se ne javljaju bitne razlike u frekvencijama (razlike nema ili su do 5 cm^{-1}). Na osnovu ovoga se može zaključiti da pomenute grupe iz PVP-a ne učestvuju u stvaranju jakih međumolekulskih veza sa BHA i da će oslobađanje iz PVP-a moći da se odvija difuzijom. Ako PVP sa BHA dođe u kontakt sa polarnim rastvaračem (voda, fiziološki medijumi i sl.)

PVP će se rastvarati i time osloboditi celokupni sadržaj BHA u kratkom vremenskom periodu.



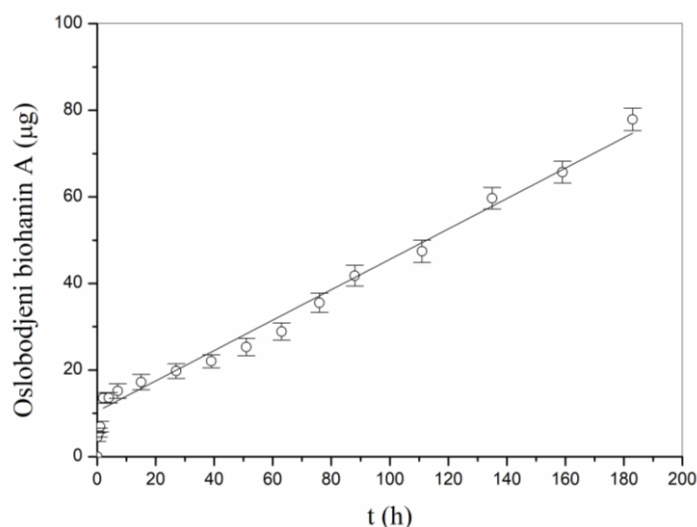
Slika 63. FTIR spektri: BHA (a), PVP (b) i elektrospinovanih vlakana PVP-BHA-5% (c)

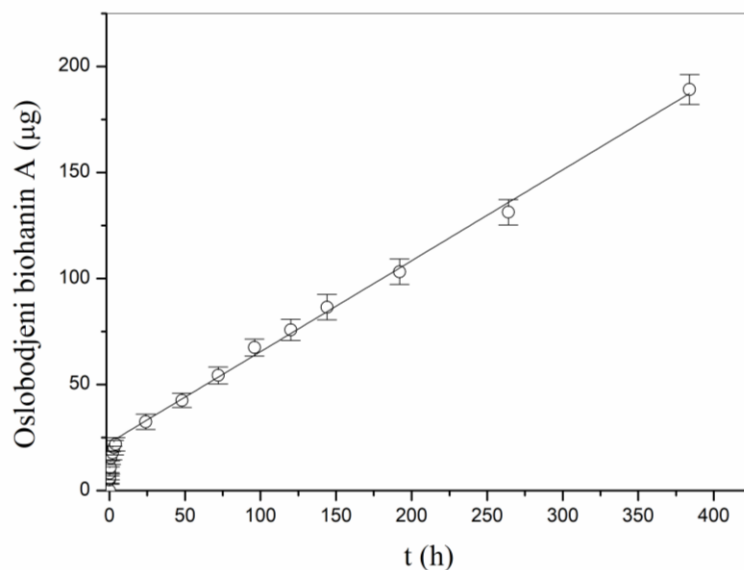
Tabela 23. Vrednosti frekvencija vibracija u FTIR spektru PVP i PVP sa 5% BHA

Oznaka vibracije	Traka u FTIR spektru PVP, cm^{-1}	Traka u FTIR spektru PVP sa 5% BHA, cm^{-1}
v(O-H)	3444	3449
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ iz pirolskog prstena	2956	2956
$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ iz polimernog lanca	2924	2923
v(C=O)	1661	1657
v(C-N-C)	1441	1441
$\delta(\text{C-H})$	1374	1373
v(C-N)	1292	1291
$\delta(\text{CH}_2)$	1019	1020
v(C-C)	935	934
$\delta(\text{CH}_2)$	846	843
$\delta(\text{N-C=O})$	577	579
$\delta(\text{C-N-C})$	652	652

4.3.7. Modifikovano oslobađanje biohanina A iz elektrospinovanih polimernih vlakna

Količina BHA oslobođenog tokom vremena iz PLA-BHA-2% i PLA-BHA-5% u Hankovom puferu pH 7,4 tokom vremena prikazana je na slikama 64 i 65, redom. Rezultati pokazuju da se količina oslobođenog BHA povećava tokom vremena sa konstantnom brzinom oslobađanja. Brzine oslobađanja BHA iz PLA-BHA-2% i PLA-BHA-5% mogu se izračunati kao nagib prave linije i njihove vrednosti su 0,3511 $\mu\text{g/h}$ i 0,4287 $\mu\text{g/h}$, redom. Ukupno vreme oslobađanja BHA je 23 dana za PLA-BHA-2% i 42 dana za PLA-BHA-5%.

**Slika 64.** Dijagram oslobađanja BHA iz elektrospinovanih vlakana PLA-BHA-2% u puferu na pH 7,4 i temperaturi 37 °C



Slika 65. Dijagram oslobađanja BHA iz elektrospinovanih vlakana PLA-BHA-5% u puferu na pH 7,4 i temperaturi 37 °C

Da bi se dobio bolji uvid u kinetiku oslobađanja BHA, dobijeni eksperimentalni podaci su fitovani odgovarajućim matematičkim modelima (nulti red, prvi red, Korsmeier-Peppas, Baker-Lonsdale, Higuchi i Makoid-Banakar) koristeći program DDSolver, a izračunati parametri su prikazani u tabeli 24.

Matematički modeli koji se koriste za fitovanje podataka o oslobađanju aktivne supstance olakšavaju analizu i interpretaciju dobijenih rezultata na osnovu nekoliko parametara koji se mogu statistički porediti. Odgovarajući model se bira na osnovu vrednosti sledećih parametara: prilagođenog koeficijenta determinacije (R^2_{adj}), Akaike informacionog kriterijuma (AIC) i kriterijuma izbora modela (MSC). Adekvatan model treba imati visoke R^2_{adj} i MSC vrednosti i nisku AIC vrednost. Model koji najbolje opisuje *in vitro* oslobađanje BHA iz elektrospinovanih PLA vlakana je Makoid-Banakar model (R^2_{adj} = 0,9912 za PLA-BHA-2% i 0,9976 za PLA-BHA-5%). Pored toga, ovaj model ima najniže vrednosti AIC (60,45 za PLA-BHA-2% i 33,88 za PLA-BHA-5%) i najveće vrednosti MSC (4,44 za PLA-BHA-2% i 5,77 za PLA-BHA-5%), u poređenju sa drugim primenjenim modelima. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima autora koji su pratili oslobađanje drugih bioaktivnih supstanci iz elektrospinovanih polimernih vlakana (Mishra i sar., 2021).

Tabela 24. Primenjeni kinetički modeli i dobijeni parametri

Kinetički model	Parametar	PLA-BHA-2%	PLA-BHA-5%
Nulti red $F = k_0 \cdot t$	k_0	0,245	0,118
	$R^2_{adj.}$	0,9089	0,9282
	AIC	100,85	93,35
	MSC	2,19	2,47
Prvi red $F = 100 \cdot [1 - e^{-k_1 \cdot t}]$	k_1	0,003	0,001
	$R^2_{adj.}$	0,9237	0,9499
	AIC	97,66	86,87
	MSC	2,37	2,83
Korsmeyer-Peppas $F = k_{KP} \cdot t^n$	k_{KP}	1,157	0,696
	n	0,679	0,678
	$R^2_{adj.}$	0,9456	0,9718
	AIC	92,48	77,44
Baker-Lonsdale $\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{F}{100} \right)^{2/3} \right] - \frac{F}{100} = k_{BL} \cdot t$	MSC	2,66	3,35
	k_{BL}	0	0
	$R^2_{adj.}$	0,9170	0,9436
	AIC	99,17	88,99
Higuchi $F = k_H \cdot t^{1/2}$	MSC	2,28	2,71
	k_H	2,654	1,779
	$R^2_{adj.}$	0,9285	0,9534
	AIC	96,50	85,54
Makoid-Banakar $F = k_{MB} \cdot t^n \cdot e^{-ct}$	MSC	2,43	2,90
	k_{MB}	4,836	2,905
	n	0,220	0,310
	c	-0,006	-0,002
	$R^2_{adj.}$	0,9912	0,9976
	AIC	60,45	33,88
	MSC	4,44	5,77

$R^2_{adj.}$ - prilagođeni koeficijent determinacije; AIC - Akaike informacijski kriterijum; MSC - kriterijum izbora modela; F - frakcija leka oslobođena u vreme t; k_0 - konstanta oslobađanja nultog reda; k_1 - konstanta oslobađanja prvog reda; k_{KP} - konstanta oslobađanja u modelu Korsmeier-Peppas koji uključuje strukturne i geometrijske karakteristike doziranog oblika; n - eksponent Korsmejer-Pepasovog otpuštanja (difuzije) ($n \leq 0,43$ – Fikova difuzija; $0,43 < n < 0,85$ – anomalno ponašanje, ne-Fikova difuzija; $n \geq 0,85$ – oslobađanje nultog reda); k_{BL} - kombinovana konstanta otpuštanja u modelu Baker-Lonsdale; k_H - Higučijeva konstanta oslobađanja; k_{MB} - Makoid-Banakarova konstanta oslobađanja; n i c - empirijski parametri u Makoid-Banakar modelu (Costa i sar., 2001; Đorđević i sar., 2016; Zhang i sar., 2010).

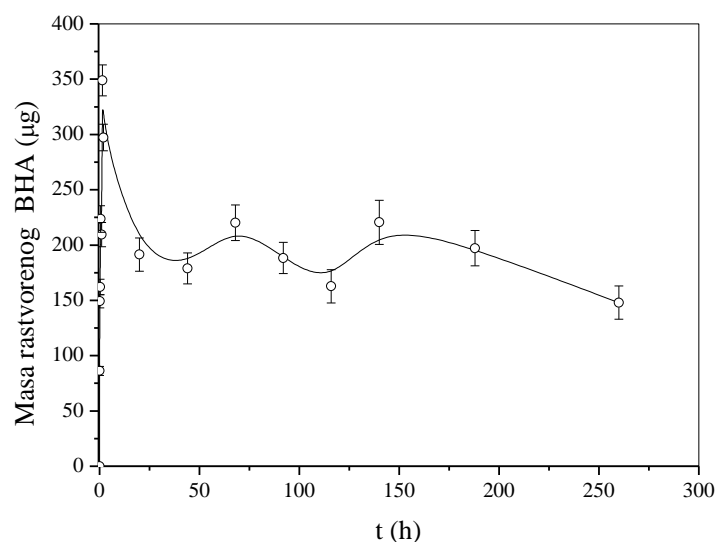
Efekat inicijalnog oslobađanja BHA iz PLA-BHA-2% i PLA-BHA-5% vlakana je skoro potpuno izbegnut, dok je to česta nepoželjna pojava kod nekih drugih nosača, kao što su liposomi, mikrosfere i mikrokapsule. Oslobađanje BHA je konstantno i stabilno i prati kinetiku nultog reda (Tabela 25), što ukazuje na to da je BHA ravnomerno raspoređen u elektrospinoanim vlaknima.

Tabela 25. Vrednosti parametara dobijene za nulti red sa F_0 kinetičkim modelom.

Kinetički model	Parametar	PLA-BHA-2%	PLA-BHA-5%
Nulti red sa F_0 $F = F_0 k_0 \cdot t$	k_0	0,195	0,097
	F_0	5,814	4,694
	$R^2_{adj.}$	0,988	0,997
	AIC	45,66	21,61
	MSC	4,22	5,48

$R^2_{adj.}$ - prilagođeni koeficijent determinacije; AIC - Akaike informacijski kriterijum; MSC - kriterijum izbora modela; F - frakcija leka oslobođena u vreme t; F_0 - početno oslobođena frakcija leka; k_0 - konstanta otpuštanja nultog reda.

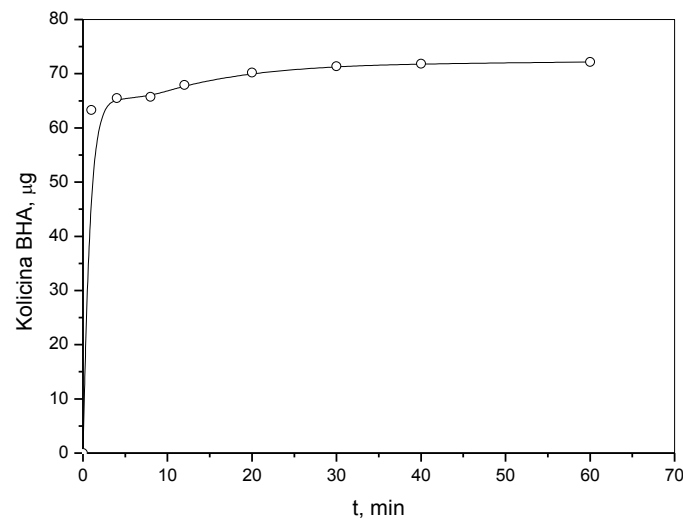
Sa druge strane, profil oslobađanja aktivne supstance zavisi od pravilnog izbora polimera, koji treba biti u skladu sa prirodom aktivnog sastojka. Za lipofilne lekove treba koristiti lipofilne polimere, a za hidrofilne lekove treba koristiti hidrofilne polimere da bi se postigao adekvatan profil oslobađanja leka. Lipofilna priroda BHA je u skladu sa karakteristikama PLA kao izabranog nosača za pripremu elektrospinovanih vlakana, što je dovelo do kontrolisanog oslobađanja BHA konstantnom brzinom za duži vremenski period. Ponašanje čistog BHA u puferskom rastvoru na pH 7,4 je veoma nestabilno (Slika 66), što potvrđuje značaj pripremljene formulacije, jer obezbeđuje kontrolisano i produženo oslobađanje BHA i to doprinosi njegovoj bezbednoj i efikasnoj primeni.



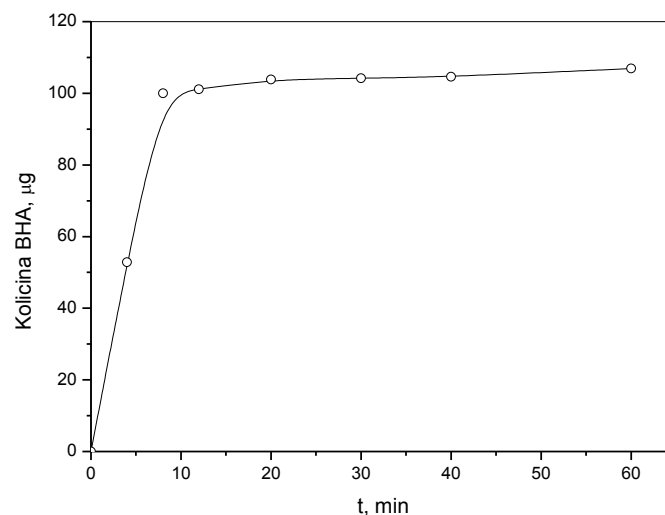
Slika 66. Rastvaranje BHA tokom vremena u puferskom rastvoru pH 7,4 na 37 °C

Na slici 67 prikazana je količina oslobođenog BHA iz elektrospinovanih vlakana PVP sa 2% biohanina A, dok je na slici 68 prikazana količina oslobođenog BHA iz

elektrospinovalih vlakana iz PVP sa 5% BHA u puferu pH 7,4. Sa slika se može videti da se u kratkom početnom periodu (do 7 min) oslobodi značajna količina BHA (92 do 98%). Nakon toga sledi period u kome se oslobađanje BHA dešava znatno sporije, može se reći da nastaje period slabog povećanja koncentracije. Razlog ovome je što se PVP rastvara u vodenim medijima i, praktično, brzina rastvaranja PVP-a diktira brzinu oslobađanja BHA. Međutim, to može imati i praktičnu primenu. Tako se, na primer, mogu izraditi maske za tretman kože lica na bazi elektrospinovalih vlakana PVP, čiji se efekat može ispoljiti u kratkom vremenskom periodu.



Slika 67. Količina oslobođenog BHA iz elektrospinovalih vlakana PVP sa 2% BHA u puferu pH 7,4

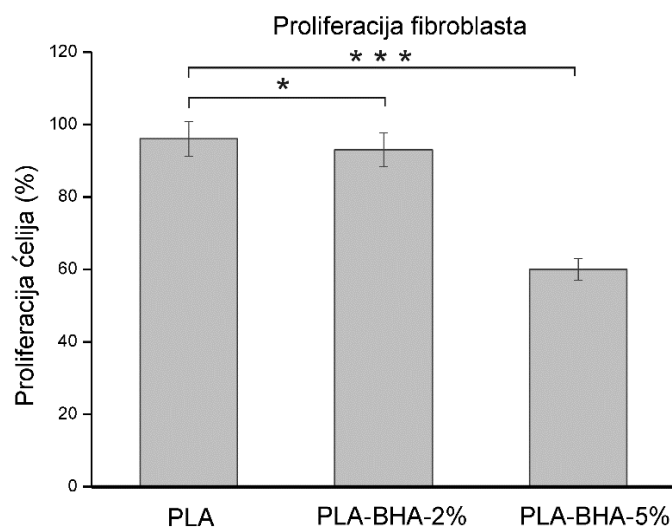


Slika 68. Količina oslobođenog BHA iz elektrospinovalih vlakana PVP sa 5% BHA u puferu pH 7,4

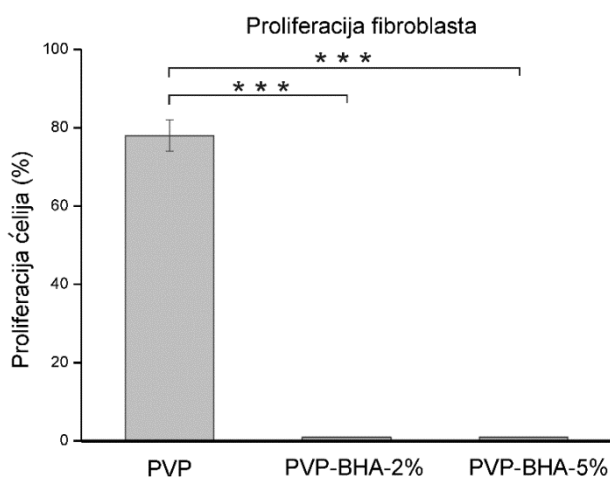
4.3.8. Biološke aktivnosti

4.3.8.1. Proliferacija ćelija

Efekti elektrospinovanih PLA vlakana sa 2% BHA i 5% BHA i bez BHA na proliferaciju ćelija L929 fibroblasta prikazani su na slici 69, dok su efekti elektrospinovanih PVP vlakana sa 2% BHA, 5% BHA i bez BHA prikazani na slici 70.



Slika 69. Rezultati MTT testa koji pokazuju efekat ispitivanih elektrospinovanih PLA vlakana bez BHA, sa 2% i 5% BHA na proliferaciju L929 fibroblasta; (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0,001$



Slika 70. Rezultati MTT testa koji pokazuju uticaj ispitivanih PVP elektrospinovanih nanovlakana bez BHA, sa 2% i 5% BHA na proliferaciju L929 fibroblasta; (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0,001$

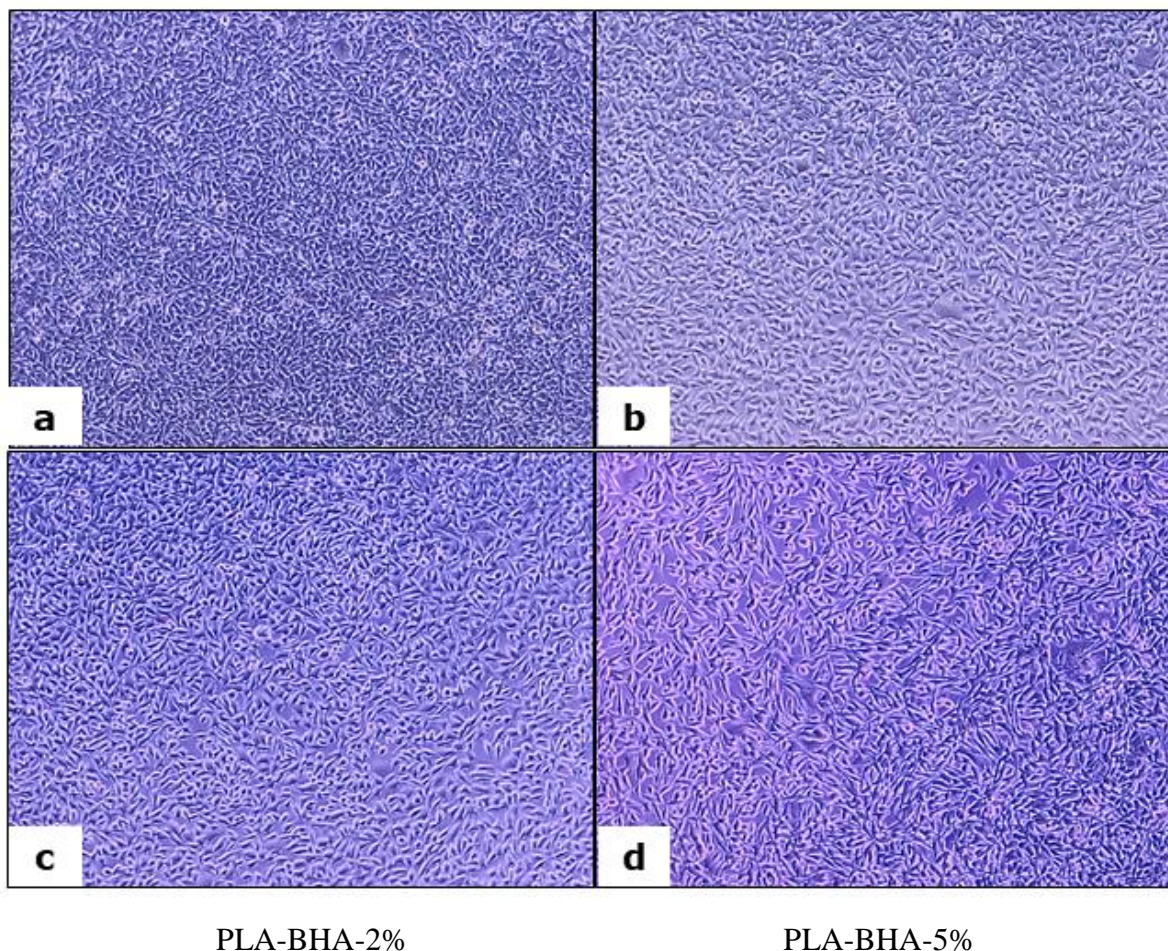
U korišćenom sistemu direktne kulture primećen je uticaj BHA oslobođenog iz PLA vlakana na proliferaciju L929 fibroblasta, koji je zavistan od koncentracije oslobođenog BHA. Proliferacija ćelija je bila neznatno umanjena sa PLA-BHA-2% (92%) i umereno smanjena sa PLA-BHA-5% (59%) i obe su statistički značajno različite od kontrolne (netretirane ćelije) i čistog PLA (Slika 69).

Na slici 70 uočava se neznatna antiproliferativna aktivnost PVP elektrospinovanih nanovlakana koja ne sadrže BHA, dok su elektrospinovana PVP nanovlakna sa BHA, PVP-BHA-2% i PVP-BHA-5%, delovala izuzetno antiproliferativno na L929 fibroblaste. Intenzivan antiproliferativni efekat je verovatno posledica trenutnog oslobađanja skoro celokupne količine BHA usled visoke rastvorljivosti elektrospinovanih PVP vlakana u medijumu za ćelijske kulture. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da na proliferaciju L929 fibroblasta, osim vrste polimernih nanovlakana i njihovih fizičko-hemijskih karakteristika, izuzetan značaj ima i brzina oslobađanja i koncentracija oslobođenog BHA.

Promene u broju i morfologiji ćelija L929 pod uticajem ispitivanih uzoraka elektrospinovanih PLA vlakana koje se mogu uočiti na slici 71 u saglasnosti su sa rezultatima MTT testa. Posebno, ćelije inkubirane sa PLA-BHA-5% (Slika 71d) bile su veće veličine, izdužene i sa uočljivim produžecima. Promene u morfologiji su u skladu sa oslobođenom količinom BHA i bile su izraženije kod PLA-BHA-5% u poređenju sa ostalim analizama. Zbog slabe rastvorljivosti PLA u medijumu ćelijske kulture, BHA se postepeno oslobađa iz elektrospinovanih PLA-BHA-2% i PLA-BHA-5% vlakana, a efekat na ćelije zavisi od koncentracije oslobođenog BHA.

Netretirane ćelije

PLA



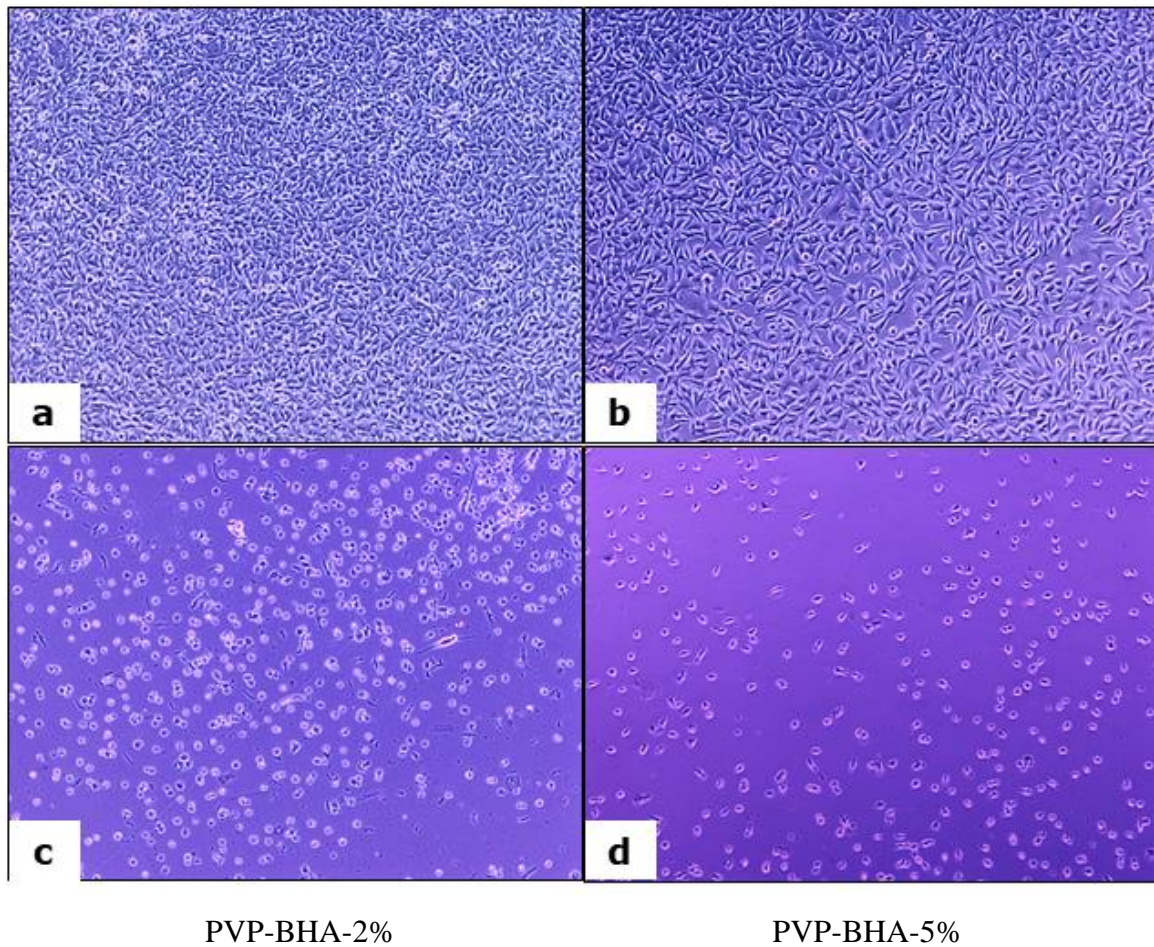
Slika 71. L929 ćelije posle tri dana inkubacije sa standardnim medijumom za ćelijsku kulturu: netretirane ćelije (a), ćelije tretirane sa PLA (b), ćelije tretirane sa (PLA-BHA-2% (c) i ćelije tretirane sa PLA-BHA-5% (d)

Na slici 72 su prikazani izgled i morfologija ćelija L929 koji su u skladu sa rezultatima MTT testa i pokazuju promene u morfologiji pod uticajem PVP elektrospinovanih nanovlakna. Sve ćelije su postale apoptotične nakon trodnevne inkubacije sa PVP-BHA elektrospinovanim nanovlaknima sa 2% i 5% BHA, redom (Slike 72c i 72d).

Nanovlakna PVP-BHA-5% ispoljavaju najveću citotoksičnost za vreme izlaganja ispitivanih ćelija od 72h što je posledica veće koncentracije oslobođenog BHA.

Netretirane ćelije

PVP



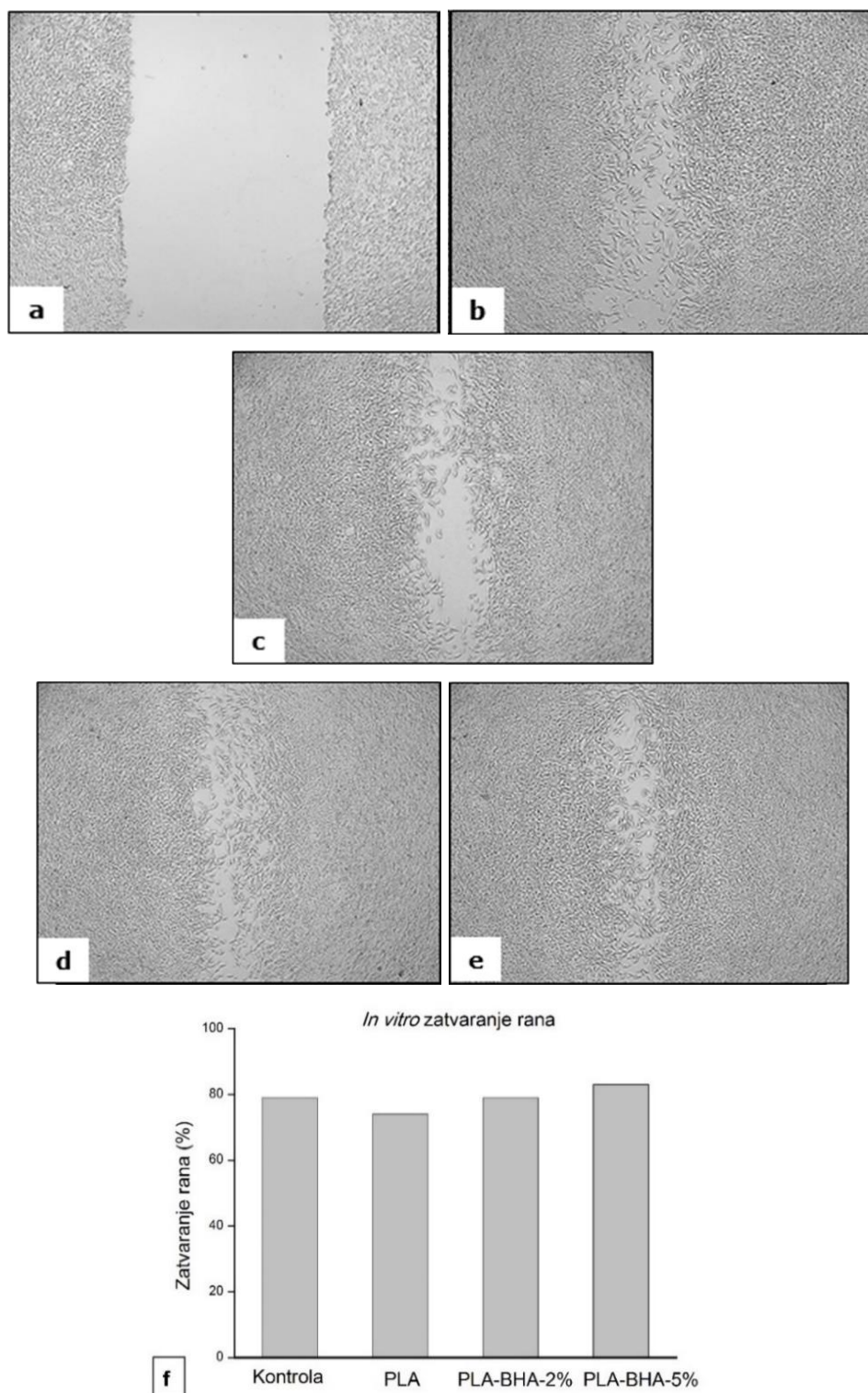
Slika 72. L929 ćelije nakon tri dana inkubacije sa standardnim medijumom za ćelijske kulture: netretirane ćelije (a), ćelije tretirane sa PVP (b), ćelije tretirane sa PVP-BHA-2% (c) i ćelije tretirane sa PVP-BHA-5% (d)

4.3.8.2. *In vitro* zarastanje rana

L929 fibroblasti se najčešće koriste kao *in vitro* ćelijski model za ispitivanje preparata namenjenih za primenu na koži i biomaterijala namenjenih za tretman rana. Efekat na zarastanje rana *in vitro* ispitan je korišćenjem *in vitro* „scratch“ testa tj. testa „ogrebotine“. Rana (ogrebotina) je napravljena u monosloju ćelijske kulture i zarastanje rane, tj. zatvaranje „ogrebotine“ pod uticajem elektrospinovanih vlakana bez i sa 2 i 5% BHA kao i kod kontrolnog medijuma praćeno je u trajanju od tri dana.

Rezultati *in vitro* ispitivanja elektrospinovanih PLA vlakana na zarastanja rana, kao i izgled „rana“ nakon tri dana inkubacije prikazani su na slici 73. Najveći stepen zatvaranja

„rana“ postignut je sa PLA-BHA-5% elektrospinoanim vlaknima, a najniži je sa elektrospinoanim PLA vlaknima bez BHA; oba se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,01$).

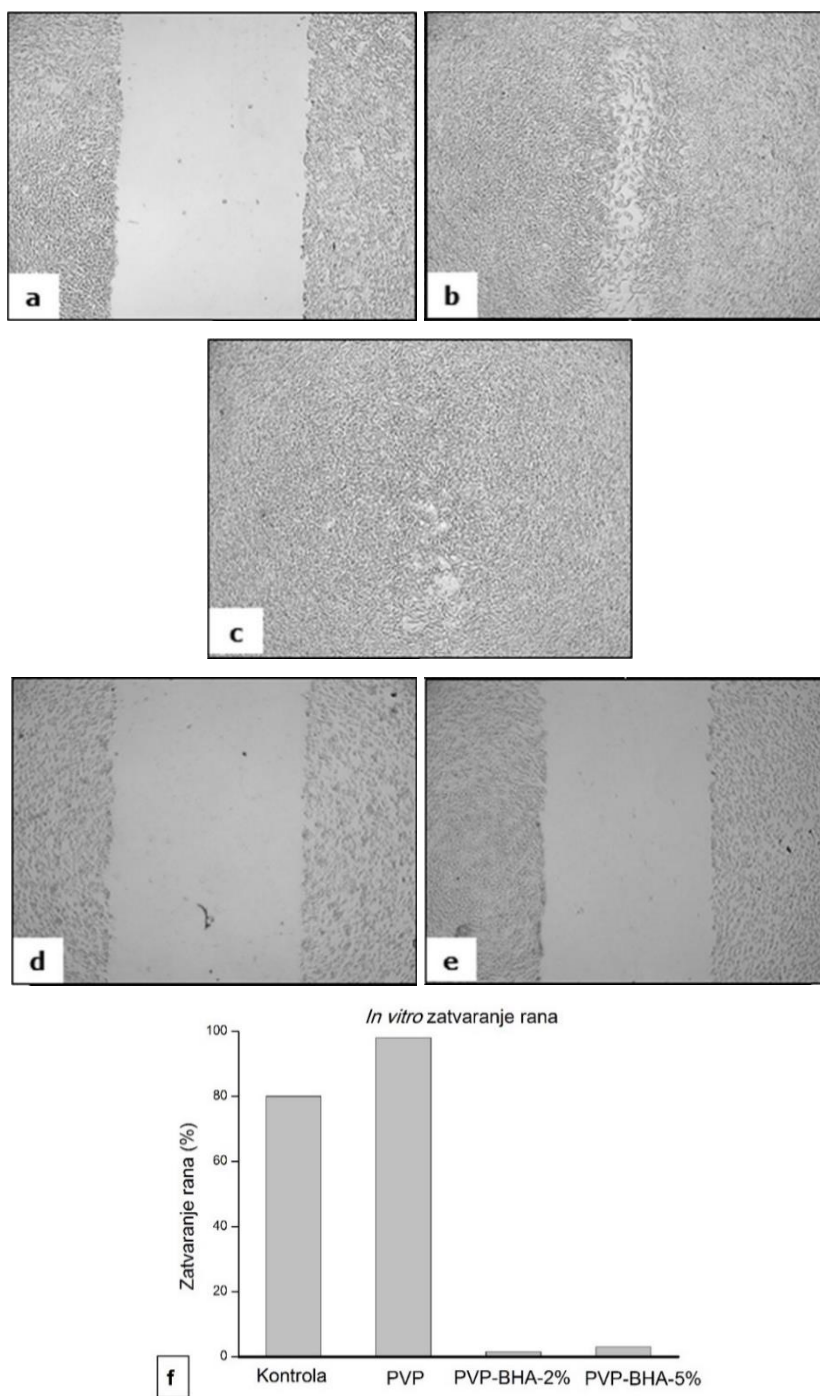


Slika 73. *In vitro* stvorena „rana“: pre inkubacije (a), tri dana nakon inkubacije sa standardnim medijumom (kontrola) (b), nakon inkubacije sa PLA (c), nakon inkubacije sa PLA-BHA-2% (d), nakon inkubacije sa PLA-BHA-5% (e) i procenat zatvaranja rane (f)

Elektrospirovana PLA vlakna nisu rastvorljiva u vodi i predstavljaju stabilne nosače za kontrolisano oslobađanje BHA. Uočeni efekti BHA na proliferaciju ćelija i *in vitro* zarastanje rana zavise od koncentracije BHA. Elektrospirovana PLA-BHA-5% vlakna imaju umeren antiproliferativni efekat, ali stimulaturniji efekat na migraciju ćelija i zatvaranje rane od PLA-BHA-2% i kompletnog medijuma bez vlakana. Prikazani rezultati pokazuju da elektrospirovana PLA vlakna sa 5% BHA mogu biti potencijalna formulacija za primenu u zarastanju rana. Međutim, da bi se dalje razvila potencijalna formulacija, neophodne su neke *in vivo* analize na modelima oglednih životinja.

Rezultati ispitivanja *in vitro* efekata na zarastanje rana elektrospirovanim vlaknima na bazi PVP bez i sa 2 i 5% BHA, kao i izgled rana nakon tri dana inkubacije predstavljeni su na slici 74. Potpuno zatvaranje rane postignuto je PVP elektrospirovanim vlaknima bez BHA. Međutim, u slučaju elektrospirovanih vlakana sa dodatim BHA ćelije su bile apoptotične, kao što je primećeno i u testu proliferacije. Takođe nije primećeno zarastanje rana kada su ćelije tretirane PVP-BHA elektrospirovanim vlaknima zbog citotoksične aktivnosti trenutno oslobođene celokupne količine BHA iz PVP nanovlakana.

Rezultati dobijeni tokom *in vitro* ispitivanja elektrospirovanih vlakana PVP sa BHA, kao lokalnih preparata za zarastanje rana ispitani na ćelijama L929 fibroblasta, sugerišu da PVP elektrospirovana vlakna, budući da su rastvorljiva u vodi i vodenim medijumima, nisu najpogodniji sistem nosača za BHA jer se sva količina BHA oslobađa u kratkom vremenskom periodu i deluje citotoksično na ćelije u upotrebljenim koncentracijama (2% i 5%). PVP elektrospirovana vlakna su blago smanjila proliferaciju ćelija, ali su stimulisala migraciju ćelija i zarastanje rana. Iako su se PVP-BHA elektrospirovana vlakna pokazala kao neadekvatan sistem za oslobađanje BHA u korišćenom *in vitro* modelu, ne bi ih trebalo odbaciti kao potencijalno neprimenljive. U nekim slučajevima, kada u kliničkoj praksi postoje komplikovane rane, gde je tkivo oštećeno, u prvoj fazi lečenja rane potrebni su agensi, koji će ukloniti oštećeno tkivo i istovremeno vršiti antimikrobnu aktivnost, poput BHA. Međutim, trebalo bi izvršiti dalja ispitivanja, posebno *in vivo* na eksperimentalnim životinjama, kako bi se analizirala potencijalna primena PVP-BHA elektrospirovanih vlakana u tretmanu rana u cilju boljeg zarastanja.



Slika 74. *In vitro* stvorena „rana“: pre inkubacije (a), tri dana nakon inkubacije sa standardnim medijumom (kontrola) (b), nakon inkubacije sa PVP (c), nakon inkubacije sa PVP-BHA-2% (d), nakon inkubacije sa PVP-BHA-5% (e) i procenat zatvaranja rane (f)

4.4. LIPOSOMI KAO NOSAČI BIOAKTIVNIH SUPSTANCI

4.4.1. Karakterizacija liposoma sa biohaninom A

Karakterizacija pripremljenih liposomskih disperzija je izuzetno važna, naročito sa aspekta njihove primene u terapiji. Da bi se osigurala reproduktivna izrada liposoma i da bi pripremljeni liposomi mogli obavljati željenu funkciju kao nosači bioaktivnih supstanci, potrebno je odrediti nekoliko fizičkih i hemijskih parametara pripremljenih liposoma. Najčešće određivane karakteristike liposoma su prosečna veličina i raspodela veličine liposoma, njihov oblik i polidisperznost, površinsko naelektrisanje, efikasnost inkapsulacije, koncentracija pojedinačnih komponenti (hemijski sastav), lamelarnost i stabilnost liposoma. Posebno je važno odrediti tačnu raspodelu veličina liposoma, jer to može značajno uticati na ponašanje liposoma u organizmu, pre svega na reakcije liposoma sa imunskim sistemom (Kanásová i sar., 2017).

Veličina liposoma, raspodela veličina liposoma i zeta potencijal su osnovne karakteristike liposomskih disperzija koje utiču na njihov kvalitet, stabilnost i bezbednost primene u terapiji. Zbog toga su ovi parametri određeni za izrađene MLV i SUV liposomske disperzije sa BHA, a rezultati analize su prikazani u tabeli 26.

Tabela 26. Karakteristike pripremljenih MLV i SUV liposomskih disperzija sa BHA

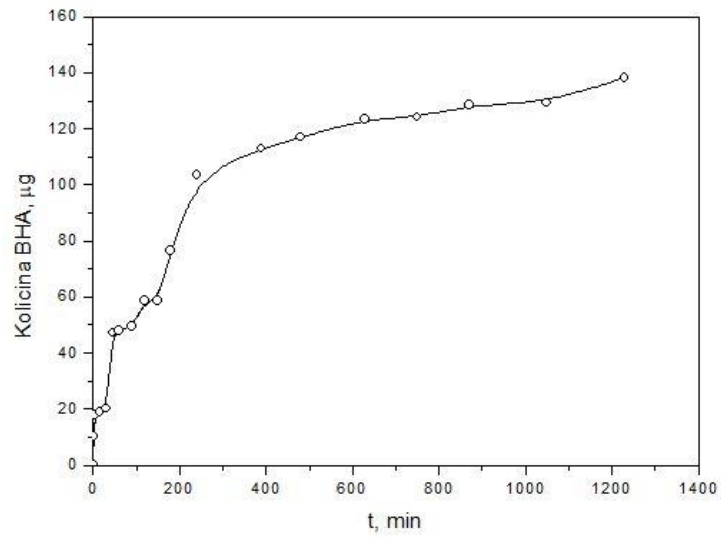
Parametar	Uzorak	
	MLV liposomi sa BHA	SUV liposomi sa BHA
Srednji prečnik liposoma, nm	960,7 ± 4,80	148,1 ± 1,36
Zeta potencijal, mV	-19,2 ± 1,29	-19,4 ± 1,86
Indeks polidisperznosti	0,644 ± 0,06	0,096 ± 0,01

Izrađena MLV liposomna disperzija predstavlja smešu liposoma različite veličine i lamelarnosti. Srednji prečnik izrađenih MLV liposoma sa BHA iznosi 960,7 ± 4,80 nm. Indeks polidisperznosti MLV liposomske disperzije je visok (PDI = 0,644 ± 0,06), što ukazuje na izraženu neuniformnost veličine čestica i posledičnu težnju ka aglomeraciji, a samim tim i na manju stabilnost izrađenih liposoma. Sa druge strane, srednji prečnik SUV liposoma sa BHA iznosi 148,1 ± 1,36 nm, sa vrlo uskom raspodelom veličina čestica (PDI = 0,096 ± 0,01). Dakle, ekstrudiranjem liposoma kroz polikarbonatne membrane odgovarajućih prečnika postignuto je da se iz velikih, multilamelarnih vezikula dobiju male, unilamelarne vezikule sa uniformnom raspodelom veličina čestica.

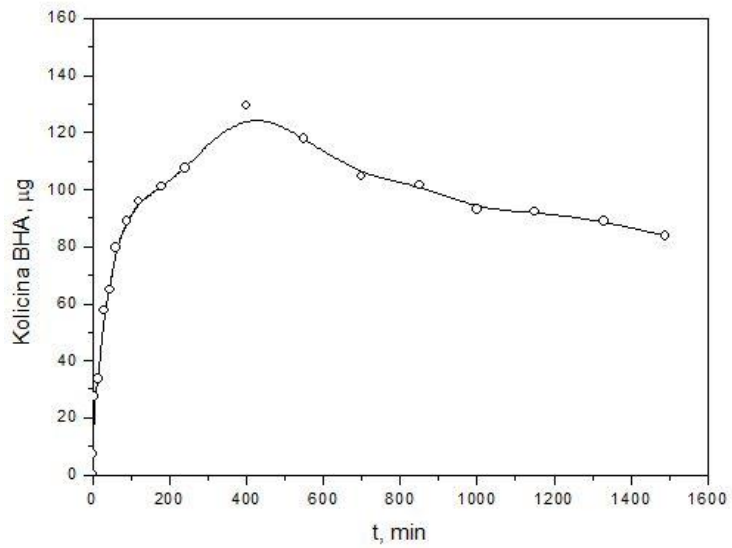
Zeta potencijal je još jedan parametar koji se koristi za opisivanje stabilnosti liposomske disperzije, a odnosi se na naelektrisanje liposoma. Liposomske disperzije su stabilne kada se čestice međusobno odbijaju, jer je tada sprečena njihova aglomeracija. Vrednost zeta potencijala može biti pozitivna ili negativna, a zavisi od sastava liposoma. Liposomske disperzije koje imaju zeta potencijal veći od 30 mV ili manji od -30 mV se smatraju stabilnim (Kanásová i sar., 2017). Izmerene vrednosti zeta potencijala pripremljenih MLV i SUV liposoma sa BHA iznose $-19,2 \pm 1,29$ mV i $-19,4 \pm 1,86$ mV, redom, što je u skladu sa rezultatima drugih autora. Naime, Dash i Konkimalla su pripremali kombinovane liposome sa BHA i doksorubicinom sa ciljem da smanje rezistenciju COLO205 kancerskih ćelija na doksorubicin. Optimizovana formulacija sadržala je liposome čiji je srednji prečnik iznosio 125 nm, a zeta potencijal -19,5 mV. Autori su pokazali da se primenom optimizovane formulacije kombinovanih liposoma postiže bolje preuzimanje doksorubicina od strane kancerskih ćelija, uz istovremeno smanjenje rezistencije na doksorubicin (Dash i Konkimalla, 2017).

4.4.2. Oslobađanje biohanina A iz MLV i SUV liposoma

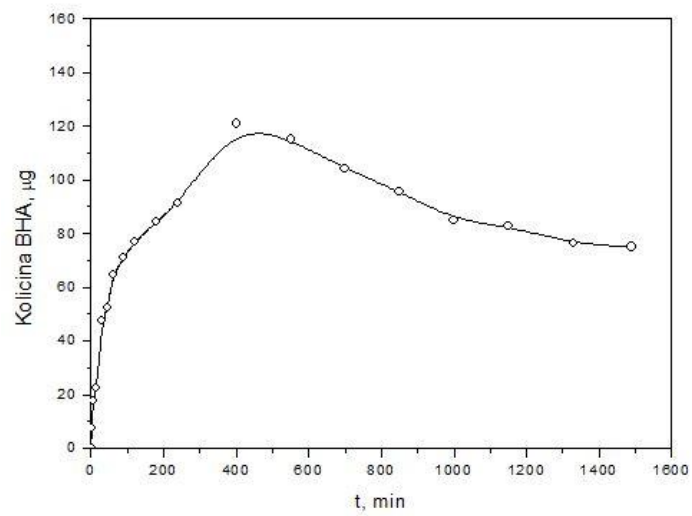
Oslobađanje BHA iz liposoma različite veličine i lamelarnosti, kao i iz puferskog rastvora, praćeno je *in vitro*, primenom tehnike sa dijaliznim vrećicama. Ova tehnika se zasniva na razmeni bioaktivne supstance između liposomske formulacije koja se nalazi u dijaliznoj vrećici i medijuma za oslobađanje koji je okružuje, kroz polupropustljivu membranu dijalizne vrećice (D'Souza, 2014). Pritom, pripremljene MLV i SUV liposomske disperzije sa BHA, kao i puferski rastvor BHA u dijaliznim vrećicama predstavljaju donatorsku fazu, dok je čist pufer oko dijalizne vrećice akceptorska faza. U određenim vremenskim intervalima se vrši uzorkovanje akceptorske faze i količina oslobođenog BHA određuje primenom HPLC metode. Profil oslobađanja BHA iz puferskog rastvora je prikazan na slici 75, dok su profili oslobađanja BHA iz MLV i SUV liposoma prikazani na slikama 76 i 77, redom.



Slika 75. Oslobađanje BHA iz puferskog rastvora



Slika 76. Oslobađanje BHA iz MLV liposoma



Slika 77. Oslobađanje BHA iz SUV liposoma

Da bi se dobile detaljnije informacije o kinetici oslobađanja BHA iz liposoma različite veličine i lamelarnosti, dobijeni eksperimentalni podaci fitovani su u matematičke modele nultog reda, prvog reda, Higuchi, Korsmeyer–Peppas i Baker–Lonsdale (Costa i sar., 2001) pomoću DDSolver programa. Najznačajniji izračunati parametri prikazani su u tabeli 27.

Koeficijent determinacije (R^2) se smatra najpogodnijim parametrom za upoređivanje različitih disolucionih modela, pri čemu najbolji model ima najveću vrednosti koeficijenta determinacije (Rasool i sar., 2021). Pored toga, vrednost Akaikovog informacionog kriterijuma (AIC) takođe se uzima u obzir prilikom odabira najadekvatnijeg modela, i potrebno je da ova vrednost bude što manja. Dakle, na osnovu vrednosti R^2 i AIC, može se zaključiti da je model koji najbolje opisuje oslobađanje BHA iz liposoma Korsmeyer-Peppas-ov model. Kod ovog modela, eksponent difuzije (n) daje informacije o mehanizmu oslobađanja lekovite supstance (Costa i sar., 2001). Ukoliko je vrednost ovog esponenta $n \leq 0,43$, dominantan mehanizam oslobađanja supstance je Fick-ova difuzija; ukoliko je vrednost $0,43 < n < 0,85$, reč je o anomalnoj ne-Fick-ovoj difuziji; a ako je vrednost $n \geq 0,85$, oslobađanje prati kinetiku nultog reda.

Vrednost eksponenta difuzije iznosi $n = 0,357$ u slučaju MLV liposoma, odnosno $n = 0,390$ u slučaju SUV liposoma, što je manje od 0,43, pa se može zaključiti da je dominantan mehanizam oslobađanja BHA iz liposoma Fick-ova difuzija, bez obzira na njihovu veličinu i lamelarnost.

Tabela 27. Kinetika oslobađanja BHA iz puferskog rastvora i liposoma različite veličine i lamelarnosti

Kinetički model	Parametar	Uzorak		
		Puferski rastvor	MLV liposomi	SUV liposomi
Nultog reda $F = k_o \cdot t$	k_0	0,314	0,411	0,340
	R^2	0,8167	0,3633	0,4770
	AIC	75,44	93,58	87,70
Prvog reda $F = 100 \cdot [1 - e^{-k_1 \cdot t}]$	k_1	0,005	0,010	0,006
	R^2	0,9006	0,8155	0,7807
	AIC	68,70	79,96	78,13
Korsmeyer-Peppas $F = k_{KP} \cdot t^n$	k_{KP}	2,854	10,912	7,647
	n	0,567	0,357	0,390
	R^2	0,9540	0,9710	0,9711
	AIC	62,24	61,61	57,84
Baker-Lonsdale $\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{F}{100} \right)^{2/3} \right] - \frac{F}{100} = k_{BL} \cdot t$	k_{BL}	0	0,001	0
	R^2	0,9309	0,9693	0,9710
	AIC	64,70	60,22	55,86
Higuchi $F = k_H \cdot t^{1/2}$	k_H	3,957	5,496	4,503
	R^2	0,9484	0,9160	0,9421
	AIC	61,50	71,30	63,49

R^2 - koeficijent determinacije; AIC - Akaiikov informacijski kriterijum; MSC - kriterijum odabira modela; F - frakcija oslobođenog leka u vremenu t ; k_0 - konstanta oslobađanja nultog reda; k_1 - konstanta oslobađanja prvog reda; k_{KP} - konstanta oslobađanja u Korsmeyer-Peppes modelu koja uzima u obzir strukturne i geometrijske karakteristike doziranog oblika; n - eksponent oslobađanja/difuzije; k_{BL} - kombinovana konstanta oslobađanja u Baker-Lonsdale modelu; k_H - konstanta oslobađanja u Higuchi modelu (Costa i sar., 2001; Zhang i sar., 2010).

5. ZAKLJUČAK

- Rezultati FTIR, ¹H-NMR, XRD, DSC i SEM analize pokazali su uspešno kompleksiranje BHA sa HP-β-CD po tipu inkluzionog kompleksa metodom koprecipitacije. Na osnovu dijagrama fazne rastvorljivosti ustanovljeno je da se rastvorljivost BHA linearno povećava sa povećanjem koncentracije HP-β-CD. Ova linearna zavisnost odgovara tipu A_L krive, što ukazuje na interakciju BHA i HP-β-CD u molskom odnosu 1:1. Adekvatna stabilnost pripremljenog inkluzionog kompleksa potvrđena je na osnovu izračunate konstante stabilnosti ($K_S = 104,6 \text{ dm}^3/\text{mol}$).
- Ispitivanje antimikrobne aktivnosti inkluzionog kompleksa BHA:HP-β-CD pokazalo je da kompleks ima bolju aktivnost na *Candida albicans* 10231 u poređenju sa nekompleksiranim BHA. Na ostale ispitivane bakterije BHA i inkluzioni kompleks BHA:HP-β-CD su ispoljili antimikrobnu aktivnost (vrednosti MIC bile su u rasponu od 0,84–1,69 mg/cm³). S obzirom da je sadržaj BHA u kompleksu oko tri puta manji od nekompleksiranog BHA, kompleks ispoljava bolji antimikrobni potencijal na ispitivane bakterije. Najmanju aktivnost BHA i inkluzioni kompleks BHA:HP-β-CD pokazali su na gljivu *Aspergillus niger* 16404. Antimikrobna aktivnost BHA na *Helicobacter pylori* značajno je pojačana ugradnjom BHA u šupljinu HP-β-CD tj. formiranjem inkluzionog kompleksa. Zona inhibicije rasta kod kompleksa BHA:HP-β-CD je (52 mm) veća nego kod BHA (25 mm), dok je MIC za kompleks manja (1,90 mg/cm³) nego za BHA (7,50 mg/cm³). Povećanje aktivnosti BHA kroz kompleksiranje sa HP-β-CD na *H. pylori* je stoga veoma značajno, jer je poznato da je ova bakterija izuzetno otporna i osetljiva na samo mali broj antibiotika.
- Za procenu antioksidativne aktivnosti BHA i inkluzionog kompleksa BHA:HP-β-CD u *in vitro* uslovima primenjene su različite metode. Oba uzorka pokazala su slabu, koncentracijski zavisnu aktivnost uklanjanja radikala (DPPH i ABTS), koja je značajno poboljšana nakon inkubacije sa radikalima. DPPH metodom je pokazano da BHA u inkluzionom kompleksu ispoljava istu antioksidativnu aktivnost u koncentraciji BHA od oko dva puta manjoj nego nekompleksirani BHA. ABTS metodom je takođe pokazana bolja aktivnost kompleksa BHA:HP-β-CD (16% neutralisanog ABTS^{•+}) u odnosu na nekompleksirani BHA (6% neutralisanog ABTS^{•+}) pri istim uslovima (koncentraciji BHA 5 mg/cm³ i vremenu inkubacije 24 min). Prema rezultatima FRAP metode inkluzioni kompleks BHA:HP-β-CD (7,2 mgFe²⁺/g BHA u kompleksu) je ispoljio nešto

bolju aktivnost od BHA (6,03 mgFe²⁺/g BHA). Redukcija Cu(II) u Cu(I) pomoću BHA i inkluzionog kompleksa BHA:HP-β-CD ispitivana je CUPRAC metodom. Redukcioni efekat BHA (37,89 mgTE/g BHA) bio je veći od efekta inkluzionog kompleksa BHA:HP-β-CD (26,55 mgTE/g BHA u kompleksu). Fosfomolibdenski test pokazuje da inkluzioni kompleks BHA:HP-β-CD (0,12 mmol TE/g) ispoljava slabiju aktivnost od slobodnog BHA (1,17 mmol TE/g). Helatna sposobnost BHA (7,36 mg EDTAE/g) bila je 2,5 puta veća od sposobnosti njegovog inkluzionog kompleksa (3,13 mg EDTAE/g). Za *in vitro* antioksidativni potencijal BHA pogodne su sve primenjene metode. Za inkluzioni kompleks BHA:HP-β-CD pogodne metode su DPPH, ABTS i FRAP, dok su redukcione metode i metoda heliranja metala manje povoljne.

- Primenom odgovarajućih metoda ispitan je uticaj (inhibitorni efekat) BHA i inkluzionog kompleksa BHA:HP-β-CD na aktivnost enzima holinesteraza (AChE i BuChE), tirozinaze, α-glukozidaze i α-amilaze. Inkluzioni kompleks BHA:HP-β-CD je ispoljio inhibitornu aktivnost na holinesteraze (AChE: 5,82 mg GALAE/g; BuChE: 6,96 mg GALAE/g) za razliku od BHA koji nije ispoljio ovu aktivnost. Kompleksiranje BHA po tipu inkluzije menja farmakološki profil BHA, tako da se inkluzioni kompleks BHA:HP-β-CD može dalje razmatrati kao potencijalni inhibitor holinesteraza odgovornih u lečenju određenih bolesti. BHA i inkluzioni kompleks BHA:HP-β-CD ispoljili su inhibitornu aktivnost na tirozinazu. Uticaj inkluzionog kompleksa BHA:HP-β-CD (90,65 mgKAE/g) na tirozinazu je zanemarljivo veći u odnosu na BHA (88,41 mgKAE/g). Nasuprot tome, BHA je pokazao bolji inhibitorni efekat na α-amilazu i α-glukozidazu (α-amilaza: 1,16 mmol ACAE/g; α-glukozidaza: 38,06 mmol ACAE/g) od inkluzionog kompleksa BHA:HP-β-CD (α-amilaza: 0,62 mmol ACAE/g; α-glukozidaza: 32,01 mmol ACAE/g), čime je pokazano da nekompleksirani oblik BHA može biti razmatran kao pogodniji u kontroli simptoma dijabetes melitus tip 2.
- U cilju pojašnjenja inhibitorne aktivnosti BHA i inkluzionog kompleksa BHA:HP-β-CD na ispitivane enzime izvršeno je molekulsko modelovanje primenom UCSF Chimera, AutoDock-a 4.2.6 i Biovia DS Visualizer v4.5 programa. Inhibitorna aktivnost inkluzionog kompleksa BHA:HP-β-CD kod svih ispitivanih enzima može se objasniti na dva načina: prvo, kod enzima koji imaju hidrofilna aktivna mesta mogu se formirati jače veze (posebno H-veze) sa BHA iz kompleksa, kome je rastvorljivost znatno povećana, pa kompleks pokazuje bolju inhibitornu aktivnost (pogotovo kod holinesteraza) i drugo, inkluzioni kompleks, kao supramolekulska struktura ima veći prečnik od molekula BHA

i stvara dodatne sterne smetnje oko aktivnih centara enzima, što takođe doprinosi inhibiciji enzima.

- Kopolimer p(NiPAm-ko-AA) je sintetisan radikalskom polimerizacijom monomera NiPAm sa 5 mol% AA korišćenjem 1,5 mol% EGDM-a kao umreživača. Povećanje temperature izaziva kontrakciju neliofiliziranog i liofiliziranog p(NiPAm-ko-AA) nabubrelog hidrogela i smanjenje ravnotežnog stepena bubrenja, pa je ovaj kopolimerni hidrogel klasifikovan kao negativno temperturno-osetljiv. Na osnovu znaka ispred koeficijenata regresije u jednačini dobijenoj trostepenim faktorijalnim dizajnom, može se zaključiti da povećanje pH vrednosti izaziva povećanje ravnotežnog stepena bubrenja p(NiPAm-ko-AA) hidrogela, dok temperatura ima suprotan efekat. Mehanizam transporta tečnosti u neliofilizirani gel je anomalan tj. bubrenje zavisi od difuzije rastvora u matriks i relaksacije polimernih lanaca. Izuzetak je proces bubrenja neliofiliziranog gela u rastvoru temperature 25 °C i pH vrednosti 3,5, gde je difuzija tečnosti pod kontrolom relaksacije polimernih lanaca (Super slučaj Tip III). Kod liofiliziranog gela zastupljen je mehanizam apsorpcije rastvora koji odgovara Fick-ovoj difuziji (difuzioni eksponent je $n < 0,5$) gde bubrenje kontroliše difuzija vodenog rastvora unutar matriksa polimera.
- Sintetisani kopolimer p(NiPAm-ko-AA) sa i bez BHA je okarakterisan primenom FTIR i SEM metoda. Ovim analizama je pokazano da je gel makroporozan i da je BHA prisutan u strukturi gela. HPLC metodom određen je sadržaj rezidualnih reaktanata u hidrogelu koji je manji od 1%, što je u granicama tolerancije i čini ga bezbednim za upotrebu kao nosača biološki aktivnih supstanci.
- Postignuta je veoma zadovoljavajuća efikasnost inkorporiranja BHA u polimernu mrežu liofiliziranih i neliofiliziranih hidrogelova p(NiPAm-ko-AA) 97,205% i 92,767%, redom, što je u saglasnosti sa rezultatima bubrenja. pH vrednost okolnog medijuma i liofilizacija hidrogela imaju uticaja na oslobađanje BHA iz kopolimera p(NiPAm-ko-AA). Iz oba kopolimera p(NiPAm-ko-AA), neliofiliziranog i liofiliziranog, pri pH 7,9 oslobodi se veća količina BHA (84,28 i 88,83%) nego pri pH 4,5 (41,37 i 46,18%), redom. Veće vrednosti koeficijenta difuzije D za liofilizirani hidrogel p(NiPAm-ko-AA) ukazuju na veću brzinu oslobađanja BHA, što je i očekivano usled većih pora gela nego kod neliofiliziranog gela. Dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost upotrebe pH- i termo-osetljivog p(NiPAm-ko-AA) kopolimera kao nosača za modifikovano oslobađanje BHA u kiseloj i slabo alkalnoj sredini.

- Primenom tehnike elektrospininga odabirom pogodnih rastvarača i procesnih parametara izrađena su polimerna vlakna od PLA i PVP sa 2% i 5% BHA.
- Mehanička svojstva PLA vlakana sa dodatkom BHA se nisu značajno promenila. Dodatak BHA je više uticao na mehanička svojstva PVP vlakana, povećanje koncentracije BHA imalo je veći uticaj na izduženje materijala i smanjenje elastičnosti. Svojstva površine PLA vlakana nisu u velikoj meri zavisila od prisutnog BHA, dok je taj uticaj znatno izraženiji kod PVP vlakana, zapažen je znatni porast kontaktnog ugla sa porastom sadržaja BHA.
- DSC metodom ispitana su termička svojstva polimernih PLA i PVP vlakana i pokazano je da prisustvo BHA ima umeren uticaj na termička svojstva, a izražen uticaj na promenu entalpije. Sa povećanjem sadržaja BHA dolazi do smanjenja entalpije.
- Morfologija elektrospinovanih polimernih vlakana bez i sa BHA je ispitana metodom SEM. Pokazano je da su PLA i PVP vlakana okrugla i glatka bez vidljivih deformacija, ujednačene debljine. Dodatak BHA u obe koncentracije nije promenio izgled polimernih vlakana. Odsustvo kristala i agregata BHA na površini vlakana ukazuje na potpunu ugradnju BHA u polimerne matrice i dobro definisane procesne parametre elektrospinovanja, što su važni preduslovi za efikasno oslobađanje BHA.
- FTIR analiza elektrospinovanih vlakana PLA i PVP ukazuje da ne postoje jake hemijske interakcije između polimernih matrica i BHA, što je takođe važno za efikasno oslobađanje BHA.
- Brzina i vreme oslobađanja BHA iz PLA elektrospinovanih vlakana zavise od koncentracije BHA u matrici polimernih vlakana. Kinetika oslobađanja, nezavisno od koncentracije BHA u vlaknima, odgovara matematičkom modelu nultog reda i pokazuje produženo oslobađanje. Matematički model koji najbolje opisuje *in vitro* oslobađanje BHA iz elektrospinovanih PLA vlakana je Makoid-Banakar model (ima najveće vrednosti $R^2_{adj.} = 0,9912$ i $0,9976$ i MSC, 4,44 i 5,77 i najniže vrednosti AIC, 60,45 i 33,88 za PLA-BHA-2% i PLA-BHA-5%, redom).
- Elektrospinovana PVP vlakna sa 2% i 5% BHA predstavljaju formulaciju za brzu isporuku BHA u kojoj je oslobađanje BHA određeno brzinom rastvaranja polimerne matrice. Najveća količina BHA (92 do 98%) oslobodi se u početnom periodu.
- PLA elektrospinovana vlakna sa BHA pokazuju aktivnost zavisnu od koncentracije BHA na proliferaciju i migraciju ćelija L929 fibroblasta u sistemu direktne kulture *in vitro*, i pokazala su se kao pogodna za potencijalnu upotrebu u zarastanju rana.

- PVP elektrospinovana vlakna sa BHA, budući da su rastvorljiva u vodi i vodenim medijumima gde se sva količina BHA oslobađa u kratkom vremenskom periodu, deluju citotoksično na ćelije L929 fibroblasta u upotrebljenim koncentracijama (2% i 5%). PVP elektrospinovana vlakna su blago smanjila proliferaciju ćelija L929 fibroblasta i stimulisala migraciju ćelija i *in vitro* zarastanje rana. Ova formulacija se može primeniti u predtretmanu komplikovanih rana za uklanjanje oštećenog tkiva i očuvanje mikrobiološke stabilnosti oštećene regije imajući u vidu antimikrobni potencijal BHA.
- Metodom tankog filma izrađeni su multilamelarni liposomi sa BHA, a njihovim ekstrudiranjem kroz polikarbonatne filtere promera pora 100 nm dobijeni su mali unilamelarni liposomi odgovarajuće veličine (srednji prečnik $148,1 \pm 1,36$ nm) sa vrlo uskom raspodelom veličina čestica ($PDI = 0,096 \pm 0,01$) i zadovoljavajuće stabilnosti.
- Oslobađanje BHA iz liposoma različite veličine i lamelarnosti ispitano je *in vitro* tehnikom sa dijaliznim vrećicama u puferskom rastvoru i utvrđeno da postoji brzi i spori period oslobađanja.
- Kinetiku oslobađanja BHA iz liposoma najbolje opisuje Korsmeyer–Peppas-ov matematički model. Dominantan mehanizam oslobađanja BHA iz liposomskih disperzija je Fick-ova difuzija bez obzira na njihovu veličinu i lamelarnost (vrednosti eksponenta difuzije $n \leq 0,43$).

6. LITERATURA

- Al-Abboodi, A. S.; Al-Sheikh, W. M.; Eid, E. E. M.; Azam, F.; Al-Qubaisi, M. S. (2021). Inclusion complex of clausenidin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Improved physicochemical properties and anti-colon cancer activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 29(3), 223-235.
- Alberti, K. G.; Zimmet, P. Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of *diabetes mellitus* and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine*, 15(7), 539-553.
- Aoki, T.; Kawashima, M.; Katono, H.; Sanui, K.; Ogata, N.; Okano, T.; Sakurai, Y. (1994). Temperature-Responsive Interpenetrating Polymer Networks Constructed with Poly(acrylic acid) and Poly(N,N-dimethylacrylamide). *Macromolecules*, 27(4), 947-952.
- Asawahame, C.; Sutjarittangtham, K.; Eitssayeam, S.; Tragoolpua, Y.; Sirithunyalug, B.; Sirithunyalug, J. (2015), Antibacterial activity and inhibition of adherence of *Streptococcus mutans* by propolis electrospun fibers. *AAPS Pharmscitech*, 16(1), 182-191.
- Assali, M.; Shawahna, R.; Shareef, M.; Alhimony, I. A. (2018). Dexamethasone-diclofenac loaded polylactide nanoparticles: Preparation, release and anti-inflammatory activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 122, 179-184.
- Aswathy, S.H.; Narendrakumar, U.; Manjubala, I. (2020). Commercial hydrogels for biomedical applications. *Heliyon*, 6(4), e03719.
- Athanasiadis, V.; Palaiogiannis, D.; Bozinou, E.; Lalas, S. I.; Makris, D. P. (2022). β -Cyclodextrin-aided aqueous extraction of antioxidant polyphenols from peppermint (*Mentha piperita* L.). *Oxygen*, 2(4), 424-436.
- Atkinson, C.; Compston, J.; Day, N.; Dowsett, M.; Bingham, S. (2004). The effects of phytoestrogen isoflavones on bone density in women: A double-blind, randomized, placebo controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(2), 326-333.
- Baber, R. (2010). Phytoestrogens in post reproductive health. *Maturitas*, 66(4), 344-349.
- Bajpai, S.K. (2001). Swelling-deswelling behavior of poly(acrylamide-co-maleic acid) hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science*, 80(14), 2782-2789.
- Balusamy, B.; Celebioglu, A.; Senthamizhan, A.; Uyar, T. (2020). Progress in the design and development of “fast-dissolving” electrospun nanofibers based drug delivery systems - A systematic review. *Journal of controlled release*, 326, 482-509.

- Bami, M. S.; Estabragh, M. A. R.; Khazaeli, P.; Ohadi, M.; Dehghannoudeh, G. (2022). pH-responsive drug delivery systems as intelligent carriers for targeted drug therapy: Brief history, properties, synthesis, mechanism and application. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 70(4) 102987.
- Banchero, M. (2021). Supercritical Carbon Dioxide as a Green Alternative to Achieve Drug Complexation with Cyclodextrins. *Pharmaceuticals*, 14(6), 562.
- Beck, V.; Rohr, U.; Jungbauer, A. (2005). Phytoestrogens derived from red clover: An alternative to estrogen replacement therapy? *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 94(5), 499-518.
- Benzie, I. F.; Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Bhardwaj, N.; Kundu, S.C. (2010), Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28(3), 325-347.
- Bitterman, W.; Spencer, R. J.; Huizenga, K. A.; Shorter, R. G. (1969). Contact pH of rectal mucosa in humans and dogs. *Diseases of the Colon and Rectum*, 12(2), 96-98.
- Braga, S. S.; Lysenko, K.; El-Saleh, F.; Paz, F. A. A. (2021). Cyclodextrin-Efavirenz Complexes Investigated by Solid State and Solubility Studies. *Proceedings*, 78(1), 15.
- Brzeziński, M.; Wedepohl, S.; Kost, B.; Calderón, M. (2018). Nanoparticles from supramolecular polylactides overcome drug resistance of cancer cells. *European Polymer Journal*, 109, 117-123.
- Buwalda, S. J.; Vermonden, T.; Hennink, W. E. (2017). Hydrogels for Therapeutic Delivery: Current Developments and Future Directions. *Biomacromolecules*, 18(2), 316-330.
- Carneiro, S. B.; Duarte, F. I. C.; Heimfarth, L.; Quintans, J. D. S. S.; Quintans-Júnior, L. J.; Júnior, V. F. D. V.; De Lima, A. A. N. (2019). Cyclodextrin-drug inclusion complexes: In vivo and in vitro approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 1-23.
- Chrzanowska, A. M.; Poliwoda, A.; Wieczorek, P. P. (2015). Characterization of particle morphology of biochanin A molecularly imprinted polymers and their properties as a potential sorbent for solid-phase extraction. *Materials Science and Engineering: C*, 49, 793-798.
- Chuangchote, S.; Sagawa, T.; Yoshikawa, S. (2009). Electrospinning of poly (vinyl pyrrolidone): Effects of solvents on electrospinnability for the fabrication of poly (p-phenylene vinylene) and TiO₂ nanofibers. *Journal of applied polymer science*, 114(5), 2777-2791.

- Chung, M. J.; Sohng, J. K.; Choi, D. J.; Park, Y. I. (2013). Inhibitory effect of phloretin and biochanin A on IgE-mediated allergic responses in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells. *Life Sciences*, 93(9-11), 401-408.
- Cid-Samamed, A.; Rakmai, J.; Mejuto, J. C.; Simal-Gandara, J.; Astray, G. (2022). Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications. *Food Chemistry*, 384, 132467
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2007). M100-S17. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Seventeenth Information Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2012). M07-A9. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. 32(2), 1-63.
- Coon, J. T.; Pittler, M. H.; Ernst, E. (2007). *Trifolium pratense* isoflavones in the treatment of menopausal hot flashes: A systematic review and meta-analysis. *Phytomedicine*, 14(2-3), 153-159.
- Cos, P.; De Bruyne, T.; Apers, S.; Berghe, D. V.; Pieters, L.; Vlietinck, A. J. (2003). Phytoestrogens: Recent developments. *Planta Medica*, 69(7), 589-599.
- Costa, P.; Lobo, J. M. S. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European journal of pharmaceutical sciences*, 13(2), 123-133.
- Crank, J. (1975). *The Mathematics of Diffusion*. Oxford: Clarendon Press, New York.
- Crommelin, D.; , de Vlieger, J. S. B.; Mühlebach, S. (2015). Introduction: Defining the Position of Non-Biological Complex Drugs. In: Crommelin, D.; de Vlieger, J. S. B.; editors. *Non-Biological Complex Drugs: The Science and the Regulatory Landscape*. Heidelberg, Springer, 1-8.
- Crozier, A.; Clifford, M. N.; Ashihara, H. (2006). *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Cui, S.; Sun, X.; Li, K.; Gou, D.; Zhou, Y.; Hu, J.; Liu, Y. (2019). Polylactide nanofibers delivering doxycycline for chronic wound treatment. *Materials Science and Engineering: C*, 104, 109745.
- Cui, W.; Li, X.; Zhu, X.; Yu, G.; Zhou, S.; Weng, J. (2006). Investigation of drug release and matrix degradation of electrospun poly (DL-lactide) fibers with paracetamol inoculation. *Biomacromolecules*, 7(5), 1623-1629.
- D'Souza, S. (2014). A review of in vitro drug release test methods for nano-sized dosage forms. *Advances in Pharmaceutics*, 2014, ID 304757.

- Dash, T. K.; Konkimalla, V. B. (2017). Formulation and optimization of doxorubicin and biochanin a combinational liposomes for reversal of chemoresistance. *AAPS PharmSciTech*, 18(4), 1116-1124.
- Dimitrijević, M.; Stankov Jovanović, V.; Cvetković, J.; Mihajilov-Krstev, T.; Stojanović, G.; Mitić, V. (2015). Screening of antioxidant, antimicrobial and antiradical activities of twelve selected Serbian wild mushrooms. *Analytical Methods*, 7(10), 4181-4191.
- Dinat, S.; Orchard, A.; Van Vuuren, S. (2023). A systematic review of African natural products against gastric ulcers and *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopharmacology*, 301, 115698.
- Dissemond, J.; Witthoff, M.; Brauns, T.C.; Harberer, D.; Gros, M. (2003). pH values on chronic wounds: evaluation during modern wound therapy, *Hautarzt* 54(10) 959-965.
- Dixon, R. A. (2004). Phytoestrogens. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 225-261.
- Dong, L.-C.; Hoffman, A.S. (1991). A novel approach for preparation of pH-sensitive hydrogels for enteric drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 15(2), 141-152.
- Dowling, S.; Regan, F.; Hughes, H. (2010). The characterisation of structural and antioxidant properties of isoflavone metal chelates. *Journal of inorganic biochemistry*, 104(10), 1091-1098.
- Dudonne, S.; Vitrac, X.; Coutiere, P.; Woillez, M.; Mérillon J.cM. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1768-1774.
- Duncan, A. M.; Phipps, W. R.; Kurzer, M. S. (2003). Phyto-oestrogens. *Best Practice and Research in Clinical Endocrinology and Metabolism*, 17(2), 253-271.
- Đorđević, S.; Isailović, T.; Cekić, N.; Vuleta, G.; Savić, S. (2016). Diazepam-loaded parenteral nanoemulsions: Physicochemical characterization and in vitro release study. *Arhiv za Farmaciju*, 66(1), 24-41.
- El-Nesr, O. H.; Yahija, S.A.; El-Gazayerly O. N. (2010). Effect of formulation design and freeze-drying on properties of fluconazole multilamellar liposomes. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18(4), 217-224.
- Eltayeb, L. M. H.; Yagi, S.; Mohamed, H. M. M.; Zengin, G.; Shariati, M. A.; Rebezov, M.; Uba, A. I.; Lorenzo, J. M. (2023). Essential Oils Composition and Biological Activity of *Chamaecyparis obtusa*, *Chrysopogon nigritanus* and *Lavandula coronopifolia* Grown Wild in Sudan. *Molecules*, 28(3), 1005.

- Fahmy, N. M.; Fayez, S.; Uba, A. I.; Shariati, M. A.; Aljohani, A. S. M.; El-Ashmawy, I. M.; Batiha, G. E.-S.; Eldahshan, O. A.; Singab, A. N.; Zengin, G. (2023). Comparative GC-MS Analysis of Fresh and Dried Curcuma Essential Oils with Insights into Their Antioxidant and Enzyme Inhibitory Activities. *Plants*, 12(9), 1785.
- Farah, S.; Anderson, D. G.; Langer, R. (2016). Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications-A comprehensive review. *Advanced drug delivery reviews*, 107, 367-392.
- Farooqi, Z. H.; Khan, H. U.; Shah, S. M.; Siddiq, M. (2017). Stability of poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) polymer microgels under various conditions of temperature, pH and salt concentration. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(3), 329-335.
- Farooqi, Z.; Sakhawat, T.; Khan, S.; Kanwal, F.; Usman, M.; Begum, R. (2015). Synthesis, characterization and fabrication of copper nanoparticles in N-isopropylacrylamide based co-polymer microgels for degradation of p-nitrophenol. *Materials Science-Poland*, 33(1), 185-192.
- Fawwaz, M. (2022). Chromatogram Profile of *Vigna radiata* and *Phaseolus vulgaris* Related to Chemical Hydrolysis. *Pharmaceutical Reports*, 1(1), 7-11.
- Florence, A.T.; Attwood, D. (1998). *Physicochemical Principles of Pharmacy*, 3rd ed., Macmillan Press, London, p. 380.
- Fukai, T.; Marumo, A.; Kaitou, K.; Kanda, T.; Terada, S.; Nomura, T. (2002). Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. *Life Sciences*, 71(12), 1449-1463.
- Gajić, I.; Stojanović, S.; Ristić, I.; Ilić-Stojanović, S.; Pilić, B.; Nešić, A.; Najman, S.; Dinić, A.; Stanojević, Lj.; Urošević, M.; Nikolić, V.; Nikolić, Lj. (2022). Electrospun Poly(lactide) Fibers as Carriers for Controlled Release of Biochanin A. *Pharmaceutics*, 14(3), 528.
- Gandhari, M. K.; Frazier, C. R.; Hartenstein, J. S.; Cloix, J. F.; Bernier, M.; Wainer, I. W. (2010). Identification and characterization of estrogen receptor-related receptor alpha and gamma in human glioma and astrocytoma cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 315(1-2), 314-318.
- Garba, Z. N.; Rahim, A. A.; Hamza, S. A. (2014). Potential of *Borassus aethiopum* shells as precursor for activated carbon preparation by physico-chemical activation; optimization, equilibrium and kinetic studies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(3), 1423-1433.
- Gartoulla, P.; Han, M. M. (2014). Red clover extract for alleviating hot flushes in postmenopausal women: A meta-analysis. *Maturitas*, 79(1), 58-64.

- Gašparević-Ivanek, V. (2003). Fitoestrogeni. *Medix*, 9(50), 90-94.
- Gerlits, O.; Ho, K.-Y.; Cheng, X.; Blumenthal, D.; Taylor, P.; Kovalevsky, A.; Radić, Z. (2019). A new crystal form of human acetylcholinesterase for exploratory room-temperature crystallography studies. *Chemico-Biological Interactions*, 309, 108698.
- Ghadimi, D.; Goodarzi, M. T.; Ziamajidi N.; Moradkhani S. (2016). The effect of Biochanin A on the expression of Adiponectin in adipose tissue of Streptozotocin-Nicotinamide induced diabetic rats. *International Journal of Medical Research and Health Sciences*, 5(7S), 223-230.
- Ghazanfarpour, M.; Sadeghi, R.; Roudsari, R. L.; Khorsand, I.; Khadivzadeh, T.; Muoio, B. (2016). Red clover for treatment of hot flashes and menopausal symptoms: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 36(3), 301-311.
- Grabe, M.; Oster, G.; (2001). Regulation of organelle acidity. *Journal of General Physiology*, 117(4), 329-344.
- Hachem, C. Y.; Clarridge, J. E.; Reddy, R.; Flamm, R.; Evans, D. G.; Tanaka, S. K.; Graham, D. Y. (1996). Antimicrobial Susceptibility Testing of *Helicobacter pylori* Comparison of E-Test, Broth Microdilution, and Disk Diffusion for Ampicillin, Clarithromycin, and Metronidazole. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 24(1), 37-41.
- Heinonen, S. M.; Wahala, K.; Adlercreutz, H. (2004). Identification of Urinary Metabolites of the Red Clover Isoflavones Formononetin and Biochanin A in Human Subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(22), 6802-6809.
- Hajrezaie, M.; Salehen, N.; Karimian, H.; Zahedifard, M.; Shams, K.; Batran, R. A.; Majid, N. A.; Khalifa, S. A. M.; Ali, H. M.; El-Seedi, H.; Abdulla, M.A. (2015). Biochanin A gastroprotective effects in ethanol-induced gastric mucosal ulceration in rats. *PloS One*, 10(3), e0121529.
- Hamza Sherif, S.; Gebreyohannes, B. (2018). Synthesis, characterization, and antioxidant activities of genistein, biochanin A, and their analogues. *Journal of Chemistry*, 2018, ID 4032105.
- Hansen, C. M. (2010). The significance of the surface condition in solutions to the diffusion equation: explaining "anomalous" sigmoidal, Case II, and Super Case II absorption behavior. *European Polymer Journal*, 46(4), 651-662.
- Harini, R.; Sundaresan, A.; Pugalendi, K. V. (2012). Antihyperlipidemic effect of biochanin A on streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Pharmacy Research*, 5(1), 707-710.
- Hertzog, D.I.; Tica, O. S. (2012). Molecular mechanisms underlying the anticancerous action of flavonoids. *Current Health Sciences Journal*, 38(4), 145-149.

- Higuchi, T.; Connors, K.A. (1965). *Advances in analytical chemistry and instrumentation*, Interscience, New York 117-212.
- Hirayama, F.; Uekama, K. (1999). Cyclodextrin based controlled drug release system, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 36, 125-141.
- Hodnick, W. F.; Kung, F. S.; Roettger, W. J.; Bohmont, C. W.; Pardini, R. S. (1986). Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids: A structure-activity study. *Biochemical Pharmacology*, 35(14), 2345-2357.
- Horne, R.; Almeida, J.P.; Day, A.F.; Yu, N. (1971). Macromolecule hydration and the effect of solutes on the cloud point of aqueous solutions of polyvinyl methyl ether: A possible model for protein denaturation and temperature control in homeothermic animals. *Journal of Colloid and Interface Science*, 35(1), 77-84.
- Hsu, Y. N.; Shyu, H. W.; Hu, T. W.; Yeh, J. P.; Lin, Y. W.; Lee, L. Y.; Yeh, Y. T.; Dai, H. Y.; Perng, D. S.; Su, S. H.; Huang, Y. H.; Su, S. J. (2018). Anti-proliferative activity of biochanin A in human osteosarcoma cells via mitochondrial-involved apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 194-204.
- Idziak, I.; Avoce, D.; Lessard, D.; Gravel, D.; Zhu, X.X. (1999). Thermosensitivity of Aqueous Solutions of Poly(N,N-diethylacrylamide). *Macromolecules*, 32(4), 1260-1263.
- Ielo, L.; Deri, B.; Germanò, M. P.; Vittorio, S.; Mirabile, S.; Gitto, R.; Rapisarda, A.; Ronsisvalle, S.; Floris, S.; Pazy, Y.; Fais, A.; Fishman, A.; De Luca, L. (2019). Exploiting the 1-(4-fluorobenzyl)piperazine fragment for the development of novel tyrosinase inhibitors as anti-melanogenic agents: Design, synthesis, structural insights and biological profile. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 178, 380-389.
- Jacquot, Y.; Rojas, C.; Refouvelet, B.; Robert, J. F.; Leclercq, G.; Xicluna, A. (2003). Recent advances in the development of phytoestrogens and derivatives: An update of the promising perspectives in the prevention of postmenopausal diseases. *Mini-Review in Medicinal Chemistry*, 3(5), 387-400.
- Jalaludeen, A. M.; Lee, W. Y.; Kim, J. H.; Jeong, H. Y.; Ki, K. S.; Kwon, E. G.; Song, H. (2015). Therapeutic efficacy of biochanin A against arsenic-induced renal and cardiac damage in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(3), 1221-1231.
- Jansook, P.; Ogawa, N.; Loftsson, T. (2018). Cyclodextrins: Structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 535(1-2), 272-284.
- Kanásová, M.; Nesmerak, K. (2017). Systematic review of liposomes' characterization methods. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, 148(9), 1581-1593.

- Karade, S. S.; Hill, M. L.; Kiappes, J. L.; Manne, R.; Aakula, B.; Zitzmann, N.; Warfield, K. L.; Treston, A. M.; Mariuzza, R. A. (2021). N-Substituted Valiolamine Derivatives as Potent Inhibitors of Endoplasmic Reticulum α -Glucosidases I and II with Antiviral Activity. *Journal of medicinal chemistry*, 64(24), 18010-18024.
- Kaufman, K. (2002). Androgens and alopecia. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 198(1-2), 89-95.
- Kawakita, S.; Marotta, F.; Naito, Y.; Gumaste, U.; Jain, S.; Tsuchiya, J.; Minelli, E. (2009). Effect of an isoflavones containing red clover preparation and alkaline supplementation on bone metabolism in ovariectomized rats. *Clinical Interventions in Aging*, 2009(4), 91-100.
- Khare, A.R.; Peppas, N.A. (1995). Swelling/deswelling of anionic copolymer gels. *Biomaterials*, 16(7), 559-567.
- Khushbu; Jindal, R. (2022). Cyclodextrin mediated controlled release of edaravone from pH-responsive sodium alginate and chitosan based nanocomposites. *International Journal of Biological Macromolecules*, 202, 11-25.
- Kim, Y.-H.; Bae, Y.H.; Kim, S.W. (1994). pH/temperature-sensitive polymers for macromolecular drug loading and release. *Journal of Controlled Release*, 28(1-3), 143-152.
- Kishan, A. P.; Cosgriff- Hernandez, E. M. (2017). Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications: A review. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105(10), 2892-2905.
- Kole, L.; Giri, B.; Manna, S. K.; Pal, B.; Ghosh, S. (2011). Biochanin-A, an isoflavon, showed anti-proliferative and anti-inflammatory activities through the inhibition of iNOS expression, p38-MAPK and ATF-2 phosphorylation and blocking NF κ B nuclear translocation. *European Journal of Pharmacology*, 653(1-3), 8-15.
- Kostić, M.; Pejčić, A.; Igić, M.; Gligorijević, N. (2017). Adverse reactions to denture resin materials. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 21(23), 5298-5305.
- Krajišnik, D.; Milić, J.; Savić, S. (2019). Izazovi in vitro karakterizacije nebioloških kompleksnih lekova - primer parenteralnih preparata sa liposomskim nosačima lekovitih supstanci. *Arhiv za Farmaciju*, 69, 176-198.
- Krajišnik, D.; Milić, J.; Savić, S. (2019). Izazovi in vitro karakterizacije nebioloških kompleksnih lekova - primer parenteralnih preparata sa liposomskim nosačima lekovitih supstanci. *Arhiv za farmaciju*, 69(3), 176-198.

- Kumar, S.; Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, ID 162750.
- Kurakula, M; Koteswara Rao, G.S.N. (2020). Moving polyvinyl pyrrolidone electrospun nanofibers and bioprinted scaffolds toward multidisciplinary biomedical applications. *European polymer journal*, 136, 109919,
- Kwon, Y.M.; Kim, S.W. (2005). Thermosensitive biodegradable hydrogels for the delivery of therapeutic agents, in: G.S. Kwon (Ed.), *Polymeric Drug Delivery Systems*, Taylor & Francis, Boca Raton, pp. 251-274.
- Lasprilla, A. J.; Martinez, G. A.; Lunelli, B. H.; Jardini, A. L.; Maciel Filho, R. (2012). Polylactic acid synthesis for application in biomedical devices — A review. *Biotechnology advances*, 30(1), 321-328.
- Lee, Y; Thompson, D. H. (2017). Stimuli-responsive liposomes for drug delivery. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 9(5), e1450.
- Li, J.; Pan, H.; Ye, Q.; Shi, C.; Zhang, X; Pan, W. (2020). Carvedilol-loaded polyvinylpyrrolidone electrospun nanofiber film for sublingual delivery. *Journal of drug delivery science and technology*, 58, 101726.
- Li, X.; Lin, L.; Zhu, Y.; Liu, W.; Yu, T.; Ge, M. (2013). Preparation of ultrafine fast-dissolving cholecalciferol- loaded poly (vinyl pyrrolidone) fiber mats via electrospinning. *Polymer composites*, 34(2), 282-287.
- Li, Y.; Zhu, J.; Cheng, H.; Li, G.; Cho, H.; Jiang, M.; Gao, Q.; Zhang, X. (2021). Developments of Advanced Electrospinning Techniques: A Critical Review. *Advanced Materials Technologies*, 6(11), 2100410.
- Lima, P. S. S.; Lucchese, A. M.; Araújo-Filho, H. G.; Menezes, P. P.; Araújo, A. A. S.; Quintans-Júnior, L. J.; Quintans, J. S. S. (2016). Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches. *Carbohydrate Polymers*, 151, 965-987.
- Lin, V.; Ding, H. Y.; Tsai, P. C.; Wu, J. Y.; Lu, Y. H.; Chang, T. S. (2011). *In vitro* and *in vivo* melanogenesis inhibition by biochanin A from *Trifolium pratense*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(5), 914-918.
- Lin, Y.C.; Hu, S.C.S.; Huang, P.H.; Lin, T.C.; Yen, F.L. (2020). Electrospun resveratrol-loaded polyvinylpyrrolidone/cyclodextrin nanofibers and their biomedical applications. *Pharmaceutics*, 12(6), 552.
- Liu, S.; Wang, X.; Zhang, Z.; Zhang, Y.; Zhou, G.; Huang, Y.; Xie, Z.; Jing, X. (2015). Use of asymmetric multilayer polylactide nanofiber mats in controlled release of drugs and

- prevention of liver cancer recurrence after surgery in mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(5), 1047-1056.
- Liu, X.; Wang, T.; Liu, X.; Cai, L.; Qi, J.; Zhang, P.; Li, Y. (2016). Biochanin A protects lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury in mice by activating the Nrf2 pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *International Immunopharmacology*, 38, 324-331.
- Liu, Y.; Chen, Y.; Gao, X.; Fu, J.; Hu, L. (2022). Application of cyclodextrin in food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(10), 2627-2640.
- Llorent-Martínez, E. J.; Ruiz-Medina, A.; Zengin, G.; Ak, G.; Jugreet, S.; Mahomoodally, M. F.; Emre, G.; Orlando, G.; Libero, M. L.; Nilofar; Acquaviva, A.; Di Simone, S. C.; Menghini, L.; Ferrante, C.; Brunetti, L.; Recinella, L.; Leone, S.; Shariati, M. A.; Uba, A. I.; Chiavaroli, A. (2022). New Biological and Chemical Evidences of Two Lamiaceae Species (*Thymbra capitata* and *Thymus sipyleus* subsp. *rosulans*): *In Vitro*, *In Silico* and *Ex Vivo* Approaches. *Molecules*, 27(24), 9029.
- Loftsson, T.; Brewster, M. E. (2010). Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62(11), 1607-1621.
- Loftsson, T.; Brewster, M. E. (2012). Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(9), 3019-3032.
- Loing, E.; Lachance, R.; Ollier, V.; Hocquaux, M. (2013). A new strategy to modulate alopecia using a combination of two specific and unique ingredients. *Journal of cosmetic science*, 64(1), 45-58.
- Lundstedt, T.; Seifert, E.; Abramo, L.; Thelin, B.; Nyström, A.; Pettersen, J.; Bergman, R. (1998). Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 42(1-2), 3-40.
- Ma, X.; Liu, Q. (2017). Preparation of poly(N-isopropylacrylamide)-block-(acrylic acid)-encapsulated proteinaceous microbubbles for delivery of doxorubicin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 154, 115-122.
- Magiera, S.; Baranowska, I.; Lautenszleger, A. (2015). UHPLC–UV method for the determination of flavonoids in dietary supplements and for evaluation of their antioxidant activities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 102, 468-475.
- Makhaeva, E.E.; Tenhu, H.; Khokhlov, A.R. (1998). Conformational Changes of Poly(vinylcaprolactam) Macromolecules and Their Complexes with Ionic Surfactants in Aqueous Solution. *Macromolecules* 31(18), 6112-6118.

- Matencio, A.; Navarro-Orcajada, S.; García-Carmona, F.; L'opez-Nicol'as, J. M. (2020). Applications of cyclodextrins in food science. A review. *Trends in Food Science &Technology*, 104, 132-143.
- Maurus, R.; Begum, A.; Williams, L. K.; Fredriksen, J. R.; Zhang, R.; Withers, S. G.; Brayer, G. D. (2008). Alternative Catalytic Anions Differentially Modulate Human α -Amylase Activity and Specificity. *Biochemistry*, 47(11), 3332-3344.
- Mehrabadi, M. E.; Salemi, Z.; Babaie, S.; Panahi, M. (2018). Effect of biochanin A on retina levels of vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Canadian journal of diabetes*, 42(6), 639-644.
- Mei, L.; Wang, Y.; Tong, A.; Guo, G. (2016). Facile electrospinning of an efficient drug delivery system. *Expert opinion on drug delivery*, 13(5), 741-753.
- Mendonça, M. A. D.; Ribeiro, A. R.; Lima, A. K. D.; Bezerra, G. B.; Pinheiro, M. S.; Albuquerque-Júnior, R. L. C.; Gomes, M. Z.; Padilha, F. F.; Thomazzi, S. M.; Novellino, E.; Santini, A.; Severino, P.; Souto, E. B.; Cardoso, J. C. (2020). Red propolis and its dyslipidemic regulator formononetin: evaluation of antioxidant activity and gastroprotective effects in rat model of gastric ulcer. *Nutrients*, 12(10), 2951.
- Messina, M.; Nagata, C.; Wu, A. H. (2006). Estimated Asian adult soy protein and isoflavone intakes. *Nutrition and Cancer*, 55(1), 1-12.
- Mhlanga, N.; Ray, S. S. (2015). Kinetic models for the release of the anticancer drug doxorubicin from biodegradable polylactide/metal oxide-based hybrids. *International journal of biological macromolecules*, 72, 1301-1307.
- Mikheeva, L.M.; Grinberg, N.V.; Mashkevich, A.Y.; Grinberg, V.Y.; Thanh, L.T.M.; Makhaeva, E.E.; Khokhlov, A.R. (1997). Microcalorimetric Study of Thermal Cooperative Transitions in Poly(N-vinylcaprolactam) Hydrogels. *Macromolecules*, 30(9), 2693-2699.
- Miksicek, R.J. (1995). Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 208(1), 44-50.
- Miletić, A.; Pavlić, B.; Ristić, I.; Zeković, Z.; Pilić, B. (2019). Encapsulation of Fatty Oils into Electrospun Nanofibers for Cosmetic Products with Antioxidant Activity. *Applied Sciences*, 9, 2955.
- Milić, J.; Petrović, S. (2003). Karakteristike savremenih farmaceutskih oblika. *Hemijaska industrija*, 57(10), 424-436.

- Mireles, L. K.; Wu, M. R.; Saadeh, N.; Yahia, L.; Sacher, E. (2020). Physicochemical Characterization of Polyvinyl Pyrrolidone: A Tale of Two Polyvinyl Pyrrolidones, *ACS Omega*, 5(47), 30461-30467.
- Moon, Y. J.; Sagawa, K.; Frederick, K.; Zhang, S.; Morris, M. E. (2006). Pharmacokinetics and bioavailability of the isoflavone biochanin A in rats. *The AAPS Journal*, 8(3), E433-E442.
- Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*, 30(16), 2785-2791.
- Murariu, M.; Dubois, P. (2016). PLA composites: From production to properties. *Advanced drug delivery reviews*, 107, 17-46.
- Nelson, H.D. (2008). Menopause. *The Lancet*, 371(9614), 760-770.
- Nijveldt, R. J.; van Nood E.; van Hoorn, D. E. C.; Boelens, P. G.; van Norren, K.; van Leeuwen, P.A.M. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74(4), 418–425.
- O’Hanlon, D.; Moench, T.; Cone, R. (2011). In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. *BMC Infectious Diseases*, 11, 200.
- Ogunbadejo, B.; Al-Zuhair, S. (2021) MOFs as Potential Matrices in Cyclodextrin Glycosyltransferase Immobilization. *Molecules*, 26(3), 680.
- Oh, J. S.; Cho, I. A.; Kang, K. R.; You, J. S.; Yu, S. J.; Lee, G. J.; Seo, Y. S.; Kim, C. S.; Kim, D. K.; Kim, S. G.; Seo, Y. W.; Im, H. J.; Kim, J. S. (2016). Biochanin-A antagonizes the interleukin-1 β -induced catabolic inflammation through the modulation of NF κ B cellular signaling in primary rat chondrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 477(4), 723-730.
- Orhan, I.; Kartal, M.; Tosun, F.; Sener, B. (2007). Screening of various phenolic acids and flavonoid derivatives for their anticholinesterase potential. *Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 62(11-12), 829-832.
- Oza, M. J.; Kulkarni, Y. A. (2018). Biochanin A improves insulin sensitivity and controls hyperglycemia in type 2 diabetes. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 107, 1119-1127.
- Pandit, N. T.; Patravale, V. B. (2011). Design and Optimization of a Novel Method for Extraction of Genistein. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(2), 184-192.

- Park, J. H.; Baek, M. R.; Lee, B. H.; Yon, G. H.; Ryu, S. Y.; Kim, Y. S.; Park, S.U.; Hong, K. S. (2009). α -Glucosidase and α -Amylase Inhibitory Activity of Compounds from Roots Extract of *Pueraria thunbergiana*. Korean Journal of Medicinal Crop Science, 17(5), 357-362.
- Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. Journal of computational chemistry, 25(13), 1605-1612.
- Piskula, M. (2000). Soy isoflavone conjugation differs in fed and fooddeprived rats. The Journal of Nutrition, 130(7), 1766-1771.
- Prieto, P.; Pineda, M.; Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of Vitamin E. Anal. Biochem. 269, 337-341.
- Qi, Z. H.; Sikorski, C. T. (2001). Controlled delivery using cyclodextrin technology. Pharmaceutical technology Europe, 13 (11), 17-27.
- Qiu, L.; Lin, B.; Lin, Z.; Lin, Y.; Lin, M.; Yang, X. (2012). Biochanin A ameliorates the cytokine secretion profile of lipopolysaccharide-stimulated macrophages by a PPAR γ -dependent pathway. Molecular Medicine Reports, 5(1), 217-222.
- Quan, J.; Yu, Y.; Branford-White, C.; Williams, G.R.; Yu, D.G.; Nie, W.; Zhu, L.M. (2011). Preparation of ultrafine fast-dissolving feruloyl-oleyl-glycerol-loaded polyvinylpyrrolidone fiber mats via electrospinning. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 88(1), 304-309.
- Radusin, T.; Torres-Giner, S.; Stupar, A.; Ristić, I.; Miletić, A.; Novaković, A.; Lagaron, J.M. (2019). Preparation, characterization and antimicrobial properties of electrospun polylactide films containing *Allium ursinum* L. extract. Food Packaging and Shelf Life, 21, 100357.
- Raheja, S.; Girdhar, A.; Lather, V.; Pandita, D. (2018). Biochanin A: A phytoestrogen with therapeutic potential. Trends in Food Science and Technology, 79, 55-66.
- Ramkisson-Ganorkar, C.; Liu, F.; Baudys, M.; Kim, S.W. (1999). Effect of molecular weight and polydispersity on kinetics of dissolution and release from pH/temperature-sensitive polymers. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 10(10), 1149-1161.
- Ramos, M. P.; Miot, A. H. (2015). Female Pattern Hair Loss: a clinical and pathophysiological review. Anais Brasileiros de Dermatologia, 90(4), 529-543.
- Raquez, J. M.; Habibi, Y.; Murariu, M.; Dubois, P. (2013). Polylactide (PLA)-based nanocomposites. Progress in Polymer Science, 38(10-11), 1504-1542.

- Rasool, A. B. K.; Mohammed, A. A.; Salem, Y. Y. (2021). The Optimization of a Dimenhydrinate Transdermal Patch Formulation Based on the Quantitative Analysis of *In Vitro* Release Data by DDSolver through Skin Penetration Studies. *Scientia Pharmaceutica*, 89(3), 33.
- Rauf, A.; Jehan, N. (2017). Natural products as a potential enzyme inhibitors from medicinal plants. In *Enzyme Inhibitors and Activators*, ed. Senturk, M.; Intech Open, London, United Kingdom, 165-177.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rigano, D.; Sirignano, C.; Tagliatela-Scafati, O. (2017). The potential of natural products for targeting PPAR α . *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(4), 427-438.
- Ristić, I.; Miletić, A.; Vukić, N.; Marinović-Cincović, M.; Smits, K.; Cakić, S.; Pilić, B. (2021). Characterization of electrospun poly(lactide) composites containing multiwalled carbon nanotubes. *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, 34(5), 695-706.
- Ritger, P.L.; Peppas, N.A. (1987). A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release*, 5(1), 37-42.
- Rofstad, E.K.; Mathiesen, B.; Kindem, K.; Galappathi, K. (2006). Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice, *Cancer research*, 66(13), 6699-6707.
- Roman-Blas, J. A.; Jimenez, S. A. (2006). NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(9), 839-848.
- Rosenberry, T.; Brazzolotto, X.; Macdonald, I.; Wandhammer, M.; Trovaslet-Leroy, M.; Darvesh, S.; Nachon, F. (2017). Comparison of the Binding of Reversible Inhibitors to Human Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase: A Crystallographic, Kinetic and Calorimetric Study. *Molecules*, 22(12), 2098.
- Rostagno, M. A.; Palma, M.; Barroso, C. G. (2007). Ultrasound-assisted extraction of isoflavones from soy beverages blended with fruit juices. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 265-272.
- Rostagno, M.A.; Villares, A.; Guillamon, E.; Garcia-Lafuente, A.; Martinez, J.A. (2009). Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *Journal of Chromatography A*, 1216(1) 2-29.

- Rubab, F.; Ijaz, H.; Hussain, S.; Munir, A.; Stuppner, S.; Jakschitz, T.; Bonn, G.; Ishtiaq, S. (2022). Gastroprotective effects of *Caragana ambigua* stocks on ethanol- induced gastric ulcer in rats supported by LC–MS/MS characterization of formononetin and biochanin A. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(15), 7030-7038.
- Rüfer, C. E.; Kulling, S. E. (2006). Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different *in vitro* assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), 2926-2931.
- Sachdeva, C.; Mishra, N.; Sharma, S. (2016). Development and characterization of enteric-coated microparticles of biochanin A for their beneficial pharmacological potential in estrogen deficient-hypertension. *Drug Delivery*, 23(6), 2044-2057.
- Sadeer, N. B.; Montesano, D.; Albrizio, S.; Zengin, G.; Mahomoodally, M. F. (2020). The versatility of antioxidant assays in food science and safety - Chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709.
- Sadri, H.; Goodarzi, M. T.; Salemi, Z.; Seifi, M. (2017). Antioxidant Effects of Biochanin A in streptozotocin induced diabetic rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60, e17160741.
- Sarian, M. N.; Ahmed, Q. U.; Mat So'ad, S. Z.; Alhassan, A. M.; Murugesu, S.; Perumal, V.; Mohamad, S. N. A. S.; Khatib, A.; Latip, J. (2017). Antioxidant and antidiabetic effects of flavonoids: A structure-activity relationship based study. *BioMed research international*, 2017, ID8386065.
- Savić, S.; Gluščević, I.; Milić, J.; Vuleta, G. (2005). Nanodisperzni sistemi kao nosači lekovitih supstanci. *Arhiv za Farmaciju*, 55, 237-254.
- Savić, V.; Nikolić, V.; Arsić, I.; Stanojević, Lj.; Najman, S.; Stojanović, S.; Mladenović-Ranisavljević, I. (2015). Comparative Study of the Biological Activity of Allantoin and Aqueous Extract of the Comfrey Root. *Phytotherapy Research*, 29(8), 1117-1122.
- Schild, H.G. (1992). Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. *Progress in Polymer Science*, 17(2), 163-249.
- Schmaljohann, D. (2006). Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15), 1655-1670.
- Schmid, D.; Belser, E.; Meister, S. (2009). Slimming and Tissue Strengthening: Soy Isoflavone for a Perfect Body, Mibelle Biochemistry, Switzerland.
- Schmid, D.; Hanay, Ch.; Muggli, R.; Züllli, F. (2001). Genistein a new cosmetic ingredient derived from soy. *Sofw Journal*, 127, 22-27.

- Schrepfer, S.; Deuse, T.; Münzel, T.; Schäfer, H.; Braendle, W.; Reichenspurner, H. (2006). The selective estrogen receptor-beta agonist biochanin A shows vasculoprotective effects without uterotrophic activity. *Menopause*, 13(3), 489-499.
- Seiberg, M.; Paine, C.; Sharlow, E.; Andrade-Gordon, P.; Costanzo, M.; Eisinger, M.; Shapiro, S. S. (2000a). The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interactions. *Experimental Cell Research*, 254(1), 25-32.
- Seiberg, M.; Paine, C.; Sharlow, E.; Andrade-Gordon, P.; Costanzo, M.; Eisinger, M.; Shapiro, S. S. (2000b). Inhibition of melanosome transfer results in skin lightening. *Journal of Investigative Dermatology*, 115(2), 162-167.
- Seo, Y. J.; Kim, B. S.; Chun, S. Y.; Park, Y. K.; Kang, K. S.; Kwon, T. G. (2011). Apoptotic effects of genistein, biochanin-A and apigenin on LNCaP and PC-3 cells by p21 through transcriptional inhibition of polo-like kinase-1. *Journal of Korean Medical Science*, 26(11), 1489-1494.
- Serres, A.; Baudys, M.; Kim, S.W. (1996). Temperature and pH-sensitive polymers for human calcitonin delivery, *Pharmaceutical research*, 13(2), 196-201.
- Shadamarshan, R.P.; Balaji, H.; Rao, H.S.; Balagangadharan, K.; Chandran, S.V.; Selvamurugan, N. (2018). Fabrication of PCL/PVP electrospun fibers loaded with trans-anethole for bone regeneration *in vitro*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 171, 698-706.
- Sharlow, E. R.; Paine, C.; Babiarz, L.; Eisinger, M.; Shapiro, S. S.; Seiberg, M. (2000). The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis. *Journal of cell science*, 113(17), 3093-3101.
- Shibayama, M.; Norisuye, T.; Nomura, S. (1996). Cross-link Density Dependence of Spatial Inhomogeneities and Dynamic Fluctuations of Poly(N-isopropylacrylamide) Gels. *Macromolecules*, 29(27), 8746-8750.
- Shinde, A. N.; Malpathak, N.; Fulzele, D. P. (2010). Determination of isoflavone content and antioxidant activity in *Psoralea corylifolia* L. callus cultures. *Food Chemistry*, 118(1), 128-132.
- Siddiqui, M. T.; Siddiqui, M. (1976). Hypolipidemic principles of *Cicer arietinum*: Biochanin A and formononetin. *Lipids*, 11(3), 243-246.
- Siqueira-Lima, P. S.; Brito, R. G.; Araújo-Filho, H. G.; Santos, P. L.; Lucchesi, A.; Araújo, A. A. S.; Menezes, P. P.; Scotti, L.; Scotti, M. T.; Menezes, I. R. A.; Coutinho, H. D. M.; Zengin, G.; Aktumsek, A.; Antonioli, A. R.; Quintans-Júnior, L. J.; Quintans, J. S. S. (2017). Anti-hyperalgesic effect of *Lippia grata* leaf essential oil complexed with β -

- cyclodextrin in a chronic musculoskeletal pain animal model: Complemented with a molecular docking and antioxidant screening. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 91, 739-747.
- Somjen, D.; Grafi-Cohen, M.; Katzburg, S.; Weisinger, G.; Izhakov, E.; Nevoc, N.; Sharon, O.; Kraiem, Z.; Kohen, F.; Stern, N. (2011). Anti-thyroid cancer properties of a novel isoflavone derivative, 7-(O)-carboxymethyl daidzein conjugated to N-t-Boc-hexylenediamine *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 126(3-5), 95-103.
- Srithep, Y.; Akkaprasa, T.; Pholharn, D.; Morris, J.; Liu, S. J.; Patrojanasophon, P.; Ngawhirunpat, T. (2021). Metronidazole-loaded polylactide stereocomplex electrospun nanofiber mats for treatment of periodontal disease. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 64, 102582.
- Stanojević, Lj.; Stanković, M.; Nikolić, V.; Nikolić, Lj.; Ristić, D.; Čanadanovic-Brunet, J.; Tumbas, V. (2009). Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Contents of *Hieracium pilosella* L. Extracts. *Sensors*, 9(7), 5702-5714.
- Stanojević, Lj.; Stanković, M.; Nikolić, V.; Nikolić, Lj. (2008). Antioxidative and antimicrobial activities of *Hieracium pilosella* L. extracts. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 73(5), 531-540.
- Stanojević, Lj.; Stanojević, J.; Cvetković, D.; Cakić, M.; Ilić, D. (2015). Antioksidativna aktivnost etanolnogekstraktalistagajene jagode (*Fragariae folium*). *Hemijska Industrija*, 69(5), 567–576.
- Stanojević, Lj.; Zdravković, A.; Stanković, M.; Cakić, M.; Nikolić, V.; Ilić, D. (2013). Antioksidativna aktivnost vodeno-etanolnih ekstrakata iz lista koprive (*Urtica dioica* L.). *Savremene tehnologije*, 2(1), 51-59.
- Stojanović, S.; Najman, S. (2019). The Effect of Conditioned Media of Stem Cells Derived from Lipoma and Adipose Tissue on Macrophages' Response and Wound Healing in Indirect Co-culture System *In Vitro*. *International journal of molecular sciences*, 20(7), 1671.
- Su, S. J.; Yeh, Y. T.; Su, S. H.; Chang, K. L.; Shyu, H. W.; Chen, K. M.; Yeh, H. (2013). Biochanin a promotes osteogenic but inhibits adipogenic differentiation: Evidence with primary adipose-derived stem cells. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 846039.
- Suliman, F. A.; Khodeer, D. M.; Ibrahiem, A.; Mehanna, E. T.; El-Kherbetawy, M. K.; Mohammad, H. M. F.; Zaitone, S. A.; Moustafa, Y. M. (2018). Renoprotective effect of

- the isoflavonoid biochanin A against cisplatin induced acute kidney injury in mice: Effect on inflammatory burden and p53 apoptosis. *International Immunopharmacology*, 61, 8-19.
- Sun, Y.; Cheng, S.; Lu, W.; Wang, Y.; Zhang, P.; Yao, Q. (2019). Electrospun fibers and their application in drug controlled release, biological dressings, tissue repair, and enzyme immobilization. *RSC advances*, 9(44), 25712-25729.
- Szliszka, E.; Czuba, Mertas, A.; Paradysz, A.; Krol, W. (2013). The dietary isoflavone biochanin-A sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 31(3), 331-342.
- Takahashi, M.; Muromoto, R.; Kojima, H.; Takeuchi, S.; Kitai, Y.; Kashiwakura, J. I.; Matsuda, T. (2017). Biochanin A enhances ROR γ activity through STAT3-mediated recruitment of NCOA1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 489(4), 503-508.
- Tan, J. (2011). Dietary Isoflavones: aglycones and glycosides. PhD thesis. University of Leeds.
- Tasić-Kostov, M.; Arsić, I.; Pavlović, D.; Stojanović, S.; Najman, S.; Naumović, S.; Tadić, V. (2019). Towards a modern approach to traditional use: *In vitro* and *in vivo* evaluation of *Alchemilla vulgaris* L. gel wound healing potential. *Journal of Ethnopharmacology*, 238, 111789.
- Telford, J.K. (2007). A Brief Introduction to Design of Experiments. *Johns Hopkins APL Technical Digest*, 27(3), 224-232.
- Tepavčević, V. (2013). Analiza fitoestrogena sojinog semena. Univerzitet u Novom Sadu. PhD thesis.
- Tolleson, W. H.; Doerge, D. R.; Churchwell, M. I.; Marques, M. M.; Roberts, D. W. (2002). Metabolism of biochanin A and formononetin by human liver microsomes *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4783-4790.
- Torres-Martínez, E. J.; Cornejo Bravo, J. M.; Serrano Medina, A.; Pérez González, G. L.; Villarreal Gómez, L. J. (2018). A summary of electrospun nanofibers as drug delivery system: Drugs loaded and biopolymers used as matrices. *Current drug delivery*, 15(10), 1360-1374.
- Tort, S.; Yıldız, A.; Tuğcu-Demiröz, F.; Akca, G.; Kuzukıran, Ö.; Acartürk, F. (2019). Development and characterization of rapid dissolving ornidazole loaded PVP electrospun fibers. *Pharmaceutical development and technology*, 24(7), 864-873.
- Turner, W. A.; Taylor, J. D.; Tchen, T. T. (1975). Melanosome formation in the gold fish: the role of multivesicular bodies. *Journal of Ultrastructure Research*, 51(1), 16-31.

- Tyler, B.; Gullotti, D.; Mangraviti, A.; Utsuki, T.; Brem, H. (2016). Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, 163-175.
- Uekama, K.; Hirayama, F.; Irie, T. (1998). Cyclodextrin drug carrier system, *Chemical reviews*, 98, 2045-2076.
- Umemura, J.; Hayashi, S. (1975). Infrared spectra and molecular configurations of liquid and crystalline acrylic acids. *Bulletin of the Institute for Chemical Research, Kyoto University*, 52(4), 585-595.
- Uysal, S.; Zengin, G.; Locatelli, M.; Bahadori, M. B.; Mocan, A.; Bellagamba, G.; De Luca, E.; Mollica, A.; Aktumsek, A. (2017). Cytotoxic and enzyme inhibitory potential of two *Potentilla* species (*P. speciosa* L. and *P. reptans* Willd.) and their chemical composition. *Frontiers in pharmacology*, 8, 290.
- Vacek, J.; Klejdus, B.; Lojkova, L.; Kuban, V. (2008) Current trends in isolation, separation, determination, and identification of isoflavones: a review. *Journal of Separation Science*, 31(11), 2054-2067.
- Valenti, S.; Del Valle, L.; Yousefzade, O.; Macovez, R.; Franco, L.; Puiggali, J. (2021). Chloramphenicol loaded polylactide melt electrospun scaffolds for biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 606, 120897.
- Valmarska, A.; Miljkovic, D.; Konitsiotis, S.; Gatsios, D.; Lavrač, N.; Robnik-Šikonja, M. (2018). Symptoms and medications change patterns for Parkinson's disease patients stratification. *Artificial Intelligence In Medicine*, 91, 82-95.
- Van Durme, K.; Verbrughe, S.; Du Prez, F.E.; Van Mele, B. (2004). Influence of Poly(ethylene oxide) Grafts on Kinetics of LCST Behavior in Aqueous Poly(N-vinylcaprolactam) Solutions and Networks Studied by Modulated Temperature DSC. *Macromolecules*, 37(3), 1054-1061.
- Vanić, Ž. (2012). Liposomi kao nosači lijekova: strukturna svojstva i klasifikacija. *Farmaceutski glasnik*, 68(6), 391-400.
- Vaupel, P.; Kallinowski, F.; Okunieff, P. (1989). Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review, *Cancer research*, 49(23), 6449-6465.
- Vidal-Romero, G.; Rocha-Pérez, V.; Zambrano-Zaragoza, M.; Del Real, A.; Martínez-Acevedo, L.; Galindo-Pérez, M.; Quintanar-Guerrero, D. (2021). Development and Characterization of pH-Dependent Cellulose Acetate Phthalate Nanofibers by Electrospinning Technique. *Nanomaterials*, 11(2), 3202.

- Virador, V.; Matsunaga, N.; Matsunaga, J.; Valencia, J.; Oldham, R. J.; Kameyama, K.; Peck, G.L.; Ferrans, V. J.; Vieira, W. D.; Abdel-Malek, Z. A.; Hearing, V. J. (2001). Production of melanocyte-specific antibodies to human melanosomal proteins: expression patterns in normal human skin and in cutaneous pigmented lesions. *Pigment Cell Research*, 14(4), 289-297.
- Vitale, D. C.; Piazza, C.; Melilli, B.; Drago, F.; Salomone, S. (2013). Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 38(1), 15-25.
- Wang, J.; He, C.; Wu, W. Y.; Chen, F.; Wu, Y. Y.; Li, W. Z.; Chen, H. Q.; Yin, Y. Y. (2015). Biochanin A protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced damage and oxidative stress in a rat model of Parkinson's disease. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 138, 96-103.
- Wang, J.; Wu, W.; Lin, Z. (2008). Kinetics and thermodynamics of the water sorption of 2-hydroxyethyl methacrylate/styrene copolymer hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science*, 109(5), 3018-3023.
- Wang, L.; Waltenberger, B.; Pferschy-Wenzig, E. M.; Blunder, M.; Liu, X.; Malainer, C.; Blazevic, T.; Schwaiger, S.; Rollinger, J. M.; Heiss, E. H.; Schuster, D.; Kopp, B.; Bauer, R.; Stuppner, H.; Dirsch, V. M.; Atanasov, A. G. (2014). Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): a review. *Biochemical Pharmacology*, 92(1), 73-89.
- Watson, M. A.; Lea, J. M.; Bett-Garber, K. L. (2017). Spray drying of pomegranate juice using maltodextrin/cyclodextrin blends as the wall material. *Food Science & Nutrition*, 5(3), 820-826.
- Watson, P.; Jones, A.T.; Stephens, D.J. (2005). Intracellular trafficking pathways and drug delivery: fluorescence imaging of living and fixed cells. *Advanced drug delivery reviews*, 57(1), 43-61.
- Wei, H.; Cheng, S. X.; Zhang, X. Z.; Zhuo, R. X. (2009). Thermo-sensitive polymeric micelles based on poly(N-isopropylacrylamide) as drug carriers. *Progress in Polymer Science*, 34(9), 893-910.
- Wu, W. Y.; Wu, Y. Y.; Huang, H.; He, C.; Li, W. Z.; Wang, H. L.; Chen, H. Q.; Yin, Y. Y. (2015). Biochanin A attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses and inhibits the activation of the MAPK pathway in BV2 microglial cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 35(2), 391-398.

- Wysowski, D. K.; Armstrong, G.; Governale, L. (2003). Rapid increase in the use of oral antidiabetic drugs in the United States, 1990-2001. *Diabetes Care*, 26(6), 1852-1855.
- Xiong, W.; Wang, W.; Wang, Y.; Zhao, Y.; Chen, H.; Xu, H.; Yang, X. (2011). Dual temperature/pH-sensitive drug delivery of poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) nanogels conjugated with doxorubicin for potential application in tumor hyperthermia therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84(2), 447-453.
- Xu, X.; Sun, J.; Bing, L.; Cui, X.; Jia, B.; Bai, S. (2022). Fractal features of dual temperature/pH-sensitive poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) hydrogels and resultant effects on the controlled drug delivery performances, *European Polymer Journal*, 171, 111203.
- Yang, Z.; Kulkarni, K.; Zhu, W.; Hu, M. (2012). Bioavailability and Pharmacokinetics of Genistein: Mechanistic Studies on its ADME. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 12(10), 1264-1280.
- Yildiz, F. (2005). *Phytoestrogens in Functional Foods*. Taylor & Francis Ltd. CRC Press, Boca Raton.
- Yin, J.; Zhang, X.; Zhang, Y.; Ma, Y.; Li, L.; Li, D.; Zhang, L.; Zhang, Z. (2019). Comprehensive Study of the *in vivo* and *in vitro* Metabolism of Dietary Isoflavone Biochanin A Based on UHPLC-Q-TOF-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(45), 12481-12495.
- Ying, C.; Hsu, J. T.; Hung, H. C.; Lin, D. H.; Chen, L. F. O.; Wang, L. K. (2002). Growth and cell cycle regulation by isoflavones in human breast carcinoma cells. *Reproduction Nutrition Development*, 42(1), 55-64.
- Yu, D.G.; Zhang, X.F.; Shen, X.X.; Brandford- White, C.; Zhu, L.M. (2009). Ultrafine ibuprofen- loaded polyvinylpyrrolidone fiber mats using electrospinning. *Polymer international*, 58(9), 1010-1013.
- Zabeti, M.; Daud, W. M. A. W.; Aroua, M. K. (2010). Biodiesel production using alumina-supported calcium oxide: an optimization study. *Fuel Processing Technology*, 91(2), 243-248.
- Zangabad, P. S.; Mirkiani, S.; Shahsavari, S.; Masoudi, B.; Masroor, M.; Hamed, H.; Jafari, Z.; Taghipour, Y. D.; Hashemi, H.; Karimi, M.; Hamblin, M. R. (2018). Stimulus-responsive liposomes as smart nanoplatfoms for drug delivery applications. *Nanotechnology Reviews*, 7(1), 95-122.

- Zarmouh, N.; Eyunni, S.; Soliman, K. (2017). The Benzopyrone Biochanin-A as a reversible, competitive, and selective monoamine oxidase B inhibitor. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 34.
- Zeng, M.; Sun, R.; Basu, S.; Ma, Y.; Ge, S.; Yin, T.; Gao, S.; Zhang, J.; Hu, M. (2016). Disposition of Flavonoids via Recycling: Direct Biliary Excretion of Enterically or Extrahepatically Derived Flavonoid Glucuronides. *Molecular Nutrition and Food Research*, 60(5), 1006-1019.
- Zdravković A.; Nikolić Lj.; Ilić-Stojanović, S.; Nikolić, V.; Savić S.; Kapor A. (2017). The evaluation of temperature and pH influences on equilibrium swelling of poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) hydrogels. *Hemijska Industrija*, 71(5), 395-405.
- Zhang, X. Z.; Yang, Y. Y.; Wang, F. J.; Chung, T.S. (2002). Thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) hydrogels with expanded network structures and improved oscillating swelling–deswelling properties, *Langmuir*, 18(6), 2013-2018.
- Zhang, Y.; Huo, M.; Zhou, J.; Zou, A.; Li, W.; Yao, C.; Xie, S. (2010). DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *The AAPS journal*, 12(3), 263-271.
- Zong, S.; Wang, X.; Yang, Y.; Wu, W.; Li, H.; Ma, Y.; Lin, W.; Sun, T.; Huang, Y.; Xie, Z.; You, Y.; Liu, S.; Jing, X. (2015). The use of cisplatin-loaded mucoadhesive nanofibers for local chemotherapy of cervical cancers in mice. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 93, 127-135.

BIOGRAFIJA

Ivana Nikolić je rođena 25. januara 1991. godine u Leskovcu. Osnovnu školu je završila u Turekovcu, a srednju medicinsku školu u Leskovcu, obrazovni profil Farmaceutski tehničar, obe sa odličnim uspehom. Farmaceutski fakultet u Beogradu, Univerzitet u Beogradu, upisala je školske 2010/2011. godine i diplomirala na integrisanom studijskom programu Farmacija 27.05.2016. godine sa prosečnom ocenom 8,78. Diplomski rad pod nazivom „Ispitivanje antioksidativne aktivnosti i bioaktivnih jedinjenja u semenu leblebije, *Cicer arietinum* L., Fabaceae“, odbranila je sa ocenom 10.

Po završetku fakulteta nastavlja naučno usavršavanje upisom doktorskih studija (šk. 2016/17 god.), na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu, Univerziteta u Nišu, na studijskom programu Tehnološko inženjerstvo. Stipendista je Ministarstva, prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (oblast Materijali i hemijske tehnologije) od 2017. godine (XVII Javni poziv za 2017. godinu). U istraživačko zvanje Istraživač pripravnik u oblasti Tehničko-tehnoloških nauka izabrana je 26.05.2017. godine na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu a u istraživačko zvanje Istraživač - saradnik 19.02.2020. godine.

Kandidat se aktivno bavi naučno-istraživačkim radom u oblasti farmaceutsko-tehnološkog inženjerstva i farmaceutskih tehnologija, na problemima: optimizacije procesa izolacije bioaktivnih supstanci, ispitivanja farmakološke aktivnosti dobijenih ekstrakata, razvoja savremenih farmaceutskih oblika, kontrole kvaliteta i stabilnosti farmaceutskih sirovina. Autor je i koautor 14 radova u međunarodnim naučnim časopisima, 7 radova u nacionalnim naučnim časopisima, 37 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima i 18 saopštenja na naučnim skupovima nacionalnog značaja. Učestvovala je u izradi jednog tehničkog rešenja i tri patentne prijave objavljene u Glasniku intelektualne svojine.

BIBLIOGRAFIJA

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu M21

1. Ivana Gajić, Snežana Ilić-Stojanović, Ana Dinić, Aleksandar Zdravković, Ljiljana Stanojević, Vesna Nikolić, Ljubiša Nikolić. (2021) Modified Biochanin A Release from Dual pH and Thermo-Responsive Copolymer Hydrogels. *Polymers*, 13(3), 426.
2. Vojkan Miljković, Ivana Gajić, Ljubiša Nikolić. (2021) Waste materials as a resource for production of CMC superabsorbent hydrogel for sustainable agriculture. *Polymers*, 13(23), 4115.
3. Maja Urošević, Ljubiša Nikolić, Ivana Gajić, Vesna Nikolić, Ana Dinić, Vojkan Miljković. (2022) Curcumin: Biological Activities and Modern Pharmaceutical Forms. *Antibiotics*, 11(2), 135.
4. Ivana Gajić, Sanja Stojanović, Ivan Ristić, Snežana Ilić-Stojanović, Branka Pilić, Aleksandra Nešić, Stevo Najman, Ana Dinić, Ljiljana Stanojević, Maja Urošević, Vesna Nikolić, Ljubiša Nikolić. (2022). Electrospun Poly(lactide) Fibers as Carriers for Controlled Re-lease of Biochanin A. *Pharmaceutics*, 14(3), 528.
5. Ljubiša Nikolić, Maja Urošević, Vesna Nikolić, Ivana Gajić, Ana Dinić, Vojkan Miljković, Srđan Rakić, Sanja Đokić, Jelena Kesić, Snežana Ilić-Stojanović, Goran Nikolić. (2023) The formulation of curcumin:2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex with smart hydrogel for prolonged release of curcumin. *Pharmaceutics*, 15(2), 382.
6. Ana Dinić, Vesna Nikolić, Ljubiša Nikolić, Snežana Ilić-Stojanović, Stevo Najman, Maja Urošević, Ivana Gajić. (2023) Modified Sulfanilamide Release from Intelligent Poly(N-isopropylacrylamide) Hydrogels. *Pharmaceutics*, 15(6), 1749.
7. Vojkan Miljković, Ljubiša Nikolić, Jelena Mrmošanin, Ivana Gajić, Tatjana Mihajilov-Krstev, Jelena Zvezdanović, Milena Miljković. (2024) Chemical Profile and Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Rosa canina* L. Dried Fruit Commercially Available in Serbia. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(5), 2518.

Rad u istaknutom međunarodnom časopisu M22

1. Ivana Nikolić, Ivan Savić, Mirjana Popsavin, Srđan Rakić, Tatjana Mihajilov-Krstev, Ivan Ristić, Suzana Erić, Ivana Savić-Gajić. (2018) Preparation, characterization and antimicrobial activity of inclusion complex of biochanin A with (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70, 1485 - 1493.
2. Vesna Nikolić, Ljubiša Nikolić, Ana Dinić, Ivana Gajić, Maja Urošević, Ljiljana Stanojević, Jelena Stanojević, Bojana Danilović. (2021) Chemical Composition, Antioxidant and

Antimicrobial Activity of Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) Seed Essential Oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 24(2), 218 - 227.

3. Ivana Gajić, Ana Dinić, Ljiljana Stanojević, Jelena Zvezdanović, Vesna Nikolić, Maja Urošević, Ljubiša Nikolić, Vesna Savić. (2023) Osage orange (*Maclura pomifera* (Raf.) Schneid) fruit extracts: UHPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis, antioxidant activity and in vivo skin tests. *Natural Product Research*, Published Online: 08 May 2023, 1-6.

Radovi objavljeni u časopisu međunarodnog značaja M23

1. Ivan Savić, Ivana Nikolić, Ivana Savić-Gajić, Tatjana Kundaković. (2019) Modeling and optimization of bioactive compounds from chickpea seeds (*Cicer arietinum* L). *Separation Science and Technology*, 54(5), 837–846.
2. Vesna Savić, Milica Stanković, Mirjana Antunović, Zorica Basić, Ivana Nikolić, Jelena Živković. (2019) The influence of excipients on stability of viscous eye drops with dexpanthenol in magistral practice, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 76(5), 845 - 853.
3. Vesna Savić, Ivana Nešić, Milica Martinović, Ana Marković, Ivana Gajić. (2021) The influence of different concentrations of surfactants on the dissolution profiles of extemporaneously compounded pessaries with clindamycin phosphate. *Dissolution Technologies*, 28(4), 24 - 29.
4. Vojkan Miljković, Milan Momčilović, Jelena Zvezdanović, Ivana Gajić, Jelena Mrmošanin, Tatjana Mihajlov-Krstev. (2022) Carotenoid and flavonoid levels, antioxidant activity and antimicrobial properties of tomato grown in Serbia. *Journal of Food and Nutrition Research*, 61(4), 402-414.

Rad u časopisu međunarodnog značaja verifikovan posebnom odlukom Matičnog naučnog odbora M24

1. Vesna Savić, Slavica Sunarić, Jelena Živković, Anastasija Stamenković, Ivana Nikolić, Ana Tačić, Vesna Nikolić. (2019) Determination of clindamycin phosphate in extemporaneously prepared pessaries with glycerol-gelatin basis. *Advanced Technologies*, 8(2), 66-71.
2. Ivana Gajić, Ljiljana Stanojević, Ana Dinić, Jelena Stanojević, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić, Vesna Savić. (2020) The chemical composition of the essential oil and volatile compounds from caraway fruit (*Carum carvi* L.) extracted by headspace-solid phase microextraction and the antioxidant activity. *Advanced Technologies*, 9(1), 37-43.
3. Ljubiša Nikolić, Tijana Stojanović, Vesna Nikolić, Maja Urošević, Snežana Ilić-Stojanović, Ana Tačić, Ivana Gajić, Vesna Savić, Aleksandar Zdravković. (2020) Synthesis and characterisation of hydrogels based on starch and citric acid. *Advanced Technologies*, 9(1), 50-57.
4. Vesna Savić, Milica Martinović, Ivana Nešić, Jelena Živković, Ivana Gajić. (2021) Influence of additives on suspension structure. *Advanced Technologies*, 10(1), 37-40.

Rad u vodećem časopisu nacionalnog značaja M51

1. Ivana Nikolić, Ivana Savić-Gajić, Ana Tačić, Ivan Savić. (2017) Classification and Biological Activity of Phytoestrogens: A Review. *Advanced Technologies*, 6(2), 96-106.

Rad u časopisu nacionalnog značaja M52

1. Vojkan Miljković, Milica Nešić, Ivana Gajić, Maja Urošević, Jelena Mrmošanin, Milena Miljković. (2021) Determination of Content and Antioxidant Capacity of Natural Food Colors E160a and E160d in Ketchup. *Facta Universitatis, Series: Physics, Chemistry and Technology*, 19(2), 91 - 98.
2. Vojkan Miljković, Milica Nešić, Jelena Mrmošanin, Ivana Gajić, Bojana Miladinović, Dušica Stojanović. (2022) Rosa canina L. fruit and jam made of it - natural food colors E160A and E160D content and antioxidant capacity. *Facta Universitatis Series: Physics, Chemistry and Technology*, 20(1), 79-86.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini M33

1. Ivan Savić, Ivana Savić-Gajić, Ivana Nikolić, Aleksandar Došić, Antioksidativna aktivnost etanolnog ekstrakta krtole divlje ciklama (*Cyclamen Purpurascens* Mill.), V International Congress "Engineering, Environment and Materials in Processing Industry", Proceedings, Jahorina, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina, 15.03. - 17.03.2017. p. 1380-1385.
2. Vojkan Miljković, Ivana Gajić, Ljubiša Nikolić, Global climate changes: greenhouse gasses, cities and plastics, 30th International Conference Ecological Truth and Environmental Research – EcoTER'23, Proceedings, 20-23 June 2023, Bor (Stara Planina), Serbia, p. 567-571.
3. Vojkan Miljković, Ivana Gajić, Ljubiša Nikolić, Agricultural Waste in Sustainable Agriculture, 30th International Conference Ecological Truth and Environmental Research – EcoTER'23, Proceedings, 20-23 June 2023, Bor (Stara Planina), Serbia, p. 589-592.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu M34

1. Ivana Nikolić, Tatjana Kundaković, Ana Tačić, Saša Savić, Ivan Savić, Sanja Milenković, The Content of Macro and Microelements in Seed and dry Extracts of Chickpea (*Cicer arietinum* L.), 13th Congress of Nutrition, Belgrade, 26 -28th October 2016, p. 210.
2. Ana Tačić, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić, Ljiljana Stanojević, Ivana Nikolić, Saša Savić, Sanja Milenković, The Macro and Microelements Content in the Nutmeg (*Myristica Fragrans* Houtt.) Seed and Antioxidant Activity of Nutmeg Seeds Essential Oil, 13th Congress of Nutrition, Belgrade, 26 -28th October 2016, p. 179-180.

3. Ivana Nikolić, Ivana Savić-Gajić, Ivan Savić, Photostability studies of biochanin A in the methanol solution, Sixth international conference on radiation and applications in various fields of research, RAD 2018, Book of abstracts, 18. 06. - 22. 06. 2018., Ohrid, Macedonia, p. 417.
4. Ana Tačić, Sanja Petrović, Vesna Nikolić, Saša Savić, Ljubiša Nikolić, Ivana Nikolić, Identification of sulfanilamide degradation products after UV irradiation, Sixth international conference on radiation and applications in various fields of research, RAD 2018, Book of abstracts, 18. 06. - 22. 06. 2018., Ohrid, Macedonia, p. 370.
5. Ana Dinić, Ivana Gajić, Ljiljana Stanojević, Vesna Nikolić, Jelena Stanojević, Maja Urošević, Ljubiša Nikolić, Chemical composition and antimicrobial activity of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.) essential oil, 2nd International UNIfood Conference, 24th-25th September 2021 University of Belgrade, Belgrade, p. 91.
6. Ivana Gajić, Ana Dinić, Ljubiša Nikolić, Maja Urošević, Dušica Ilić, Vesna Savić, Vesna Nikolić, Antimicrobial activity of allyl thiosulfinate (allicin), its inclusion complex with β -cyclodextrin and ajoenes and vinylidithiins derivatives, 2nd International UNIfood Conference, 24th-25th September 2021 University of Belgrade, Belgrade, p. 126.
7. Natalija Tošić, Vesna Nikolić, Jelena Stanojević, Ljubiša Nikolić, Ana Dinić, Ivana Gajić, Ljiljana Stanojević, Maja Urošević, Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) analysis of the frankincense essential oil of *Boswellia Serrata*, Book of abstracts, 14th Symposium „Novel technologies and economic development“, Leskovac, October, 22-23, 2021. BCHE - 15, p. 61.
8. Ivana Gajić, Sanja Stojanović, Stevo Najman, Ana Dinić, Aleksandra Miletić, Ivan Ristić, Ljiljana Stanojević, The effect of electrospun poly(lactide) nanofibers containing biochanin A on cell proliferation and *in vitro* wound healing, Book of abstracts, 14th Symposium „Novel technologies and economic development“, Leskovac, October, 22-23, 2021. PHCE - 1, p. 67.
9. Ivana Gajić, Sanja Stojanović, Stevo Najman, Ana Dinić, Aleksandra Miletić, Ivan Ristić, Ljiljana Stanojević, The effect of electrospun poly(vinyl pyrrolidone) nanofibers containing biochanin A on cell proliferation and *in vitro* wound healing, Book of abstracts, 14th Symposium „Novel technologies and economic development“, Leskovac, October, 22-23, 2021. PHCE - 2, p. 68.
10. Vesna Savić, Milica Martinović, Ivana Nešić, Jelena Živković, Ivana Gajić, Textural analysis of topical suspensions with zinc oxide, Book of abstracts, 14th Symposium „Novel technologies and economic development“, Leskovac, October, 22-23, 2021. PHCE - 11, p. 77.
11. Ana Dinić, Ivana Gajić, Sanja Stojanović, Maja Urošević, Aleksandar Zdravković, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić, Morphological characteristics and antimicrobial activity of cyclodextrin inclusion complexes with sulfanilamide and biochanin A, Book of abstracts, 14th Symposium „Novel technologies and economic development“, Leskovac, October, 22-23, 2021. PHCE - 12, p. 78.

12. Ljubiša Nikolić, Maja Urošević, Vesna Nikolić, Ivana Gajić, Ana Dinić, Snežana Ilić-Stojanović, Aleksandar Zdravković, Analysis of residual reactants of synthesized thermosensitive hydrogels, Book of abstracts, 14th Symposium „Novel technologies and economic development“, Leskovac, October, 22-23, 2021. PE - 3, p. 89.
13. Maja Urošević, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić, Ivana Gajić, Ana Dinić, Snežana Ilić-Stojanović, Vesna Savić, Influence of molar crosslinker ratio and ambient pH on swelling capacity of thermosensitive hydrogels, Book of abstracts, 14th Symposium „Novel technologies and economic development“, Leskovac, October, 22-23, 2021. PE - 4, p. 90.
14. Aleksandar Zdravković, Ljubiša Nikolić, Snežana Ilić-Stojanović, Vesna Nikolić, Maja Urošević, Ana Dinić, Ivana Gajić, Investigation of swelling reversibility and influence of lyophilization process on swelling of poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) hydrogels, Book of abstracts, 14th Symposium „Novel technologies and economic development“, Leskovac, October, 22-23, 2021. PE - 6, p. 92.
15. Ana Dinić, Ivana Gajić, Maja Urošević, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić, Goran Nikolić, Ljiljana Takić, Liposomes with biochanin A – preparation, characterization and in vitro drug release, 2nd International Conference on Advanced Production and Processing, 20th-22nd October 2022, Novi Sad, Serbia, Book of Abstracts, p. 150.
16. Ivana Gajić, Ana Dinić, Maja Urošević, Vesna Nikolić, Ljubiša Nikolić, Ivan Ristić, Branka Pilić, Aleksandra Nešić, Vesna Savić, In vitro release of biochanin A from electrospun (poly)lactide nanofibres, 2nd International Conference on Advanced Production and Processing, 20th-22nd October 2022, Novi Sad, Serbia, Book of Abstracts, p. 153.
17. Maja Urošević, Ljubiša Nikolić, Ana Dinić, Ivana Gajić, Marijana Vladimirov, Natalija Tošić, Vesna Nikolić, Vojkan Miljković, The release of curcumin from thermo-sensitive copolymer, 2nd International Conference on Advanced Production and Processing, 20th-22nd October 2022, Novi Sad, Serbia, Book of Abstracts, p. 174.
18. Marijana Vladimirov, Ana Dinić, Vesna Nikolić, Maja Urošević, Ivana Gajić, Ljubiša Nikolić, Vesna Savić, Inclusion complex of betulin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin: preparation, characterization and testing of phase solubility, 2nd International Conference on Advanced Production and Processing, 20th-22nd October 2022, Novi Sad, Serbia, Book of Abstracts, p. 178.
19. Marijana Vladimirov, Ana Dinić, Vesna Nikolić, Maja Urošević, Ivana Gajić, Ljubiša Nikolić, Vojkan Miljković, Preparation and characterization of betulinic acid inclusion complex with hydroxypropyl- β -cyclodextrin, 2nd International Conference on Advanced Production and Processing, 20th-22nd October 2022, Novi Sad, Serbia, Book of Abstracts, p. 179.
20. Maja Urošević, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić, Ivana Gajić, Ana Dinić, Snežana Ilić-Stojanović, Marijana Vladimirov, Natalija Tošić, Vojkan Miljković, The influence of cross-linker on the swelling process of poly(N-isopropylmethacrylamide-co-N-isopropylacrylamide), XIV

- Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, October 21-22, 2022, Banja Luka, Republic of Srpska, Book of Abstracts, p. 62.
21. Maja Urošević, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić, Ivana Gajić, Ana Dinić, Snežana Ilić-Stojanović, Marijana Vladimirov, Natalija Tošić, Vojkan Miljković, Characterization of synthesized thermosensitive hydrogels, XIV Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, October 21-22, 2022, Banja Luka, Republic of Srpska, Book of Abstracts, p. 63.
 22. Natalija Tošić, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić, Ljiljana Stanojević, Ivana Gajić, Maja Urošević, Ana Dinić, Marijana Vladimirov, Antioxidant activity of commercial and isolated essential oil of Indian frankincense (*Boswellia serrata*), XIV Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, October 21-22, 2022, Banja Luka, Republic of Srpska, Book of Abstracts, p. 64.
 23. Natalija Tošić, Vesna Nikolić, Ljubiša Nikolić, Jelena Stanojević, Ljiljana Stanojević, Maja Urošević, Ana Dinić, Ivana Gajić, Comparative GC/MS analysis of commercial and isolated essential oil of Indian frankincense (*Boswellia serrata*), XIV Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, October 21-22, 2022, Banja Luka, Republic of Srpska, Book of Abstracts, p. 65.
 24. Ivana Gajić, Ana Dinić, Maja Urošević, Vesna Nikolić, Ivan Ristić, Aleksandra Nešić, Branka Pilić, Stevo Najman, Characterisation of the electrospun poly(lactide) nanofibers with biochanin A, XIV Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, October 21-22, 2022, Banja Luka, Republic of Srpska, Book of Abstracts, p. 66.
 25. Ivana Gajić, Ana Dinić, Maja Urošević, Ljubiša Nikolić, Natalija Tošić, Marijana Vladimirov, Ivan Ristić, Ljiljana Stanojević, *In vitro* release of biochanin A from the electrospun poly(vinylpyrrolidone) nanofibers, XIV Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, October 21-22, 2022, Banja Luka, Republic of Srpska, Book of Abstracts, p. 67.
 26. Marijana Vladimirov, Vesna Nikolić, Ljiljana Stanojević, Ana Dinić, Maja Urošević, Ivana Gajić, Natalija Tošić, Ljubiša Nikolić, Antioxidant activity of betulin, betulinic acid and white birch bark extract (*Betula pendula*), XIV Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, October 21-22, 2022, Banja Luka, Republic of Srpska, Book of Abstracts, p. 68.
 27. Marijana Vladimirov, Vesna Nikolić, Jelena Stanojević, Ana Dinić, Maja Urošević, Ivana Gajić, Ljubiša Nikolić, GC-MS analysis of the white birch bark extract (*Betula pendula*), XIV Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, October 21-22, 2022, Banja Luka, Republic of Srpska, Book of Abstracts, p. 69.
 28. Ivana Gajić, Aleksandra Cvetanović Kljakić, Gökhan Zengin, Abdullahi Ibrahim Uba, Ana Dinić, Maja Urošević, Vesna Nikolić, Ljubiša Nikolić, Effect of the biochanin A complex with 2-

- hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the inhibition of enzymes by molecular modeling, 15th International Symposium with international participation "Novel Technologies and Sustainable Development", Leskovac, October, 20-21, 2023. Book of Abstracts, PHCE - 1, p. 59.
29. Ana Dinić, Ivana Gajić, Ljiljana Stanojević, Aleksandra Cvetanović Kljakić, Gökhan Zengin, Ljubiša Nikolić, Maja Urošević, Enzyme inhibitory activity of biochanin A and its inclusion complex with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, 15th International Symposium with international participation "Novel Technologies and Sustainable Development", Leskovac, October, 20-21, 2023. Book of Abstracts, PHCE - 3, p. 61.
 30. Vesna Nikolić, Ana Dinić, Jelena Stanojević, Ljiljana Stanojević, Ivana Gajić, Maja Urošević, Natalija Tošić, Comparative chemical composition of isolated and commercial laurel leaf essential oil (*Laurus nobilis* L.), 15th International Symposium with international participation "Novel Technologies and Sustainable Development", Leskovac, October, 20-21, 2023. Book of Abstracts, OCT - 7, p. 73.
 31. Natalija Tošić, Jelena Zvezdanović, Vesna Nikolić, Maja Urošević, Ana Dinić, Ivana Gajić, Ljubiša Nikolić, Vesna Savić, Ultrasonic extraction of boswellic acids from frankincense resin (*Boswellia serrata*), 15th International Symposium with international participation "Novel Technologies and Sustainable Development", Leskovac, October, 20-21, 2023. Book of Abstracts, OCT - 8, p. 74.
 32. Ivana Gajić, Ana Dinić, Aleksandra Cvetanović Kljakić, Gökhan Zengin, Ljiljana Stanojević, Maja Urošević, Vesna Nikolić, Antioxidant activity of biochanin A and its inclusion complex with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, 15th International Symposium with international participation "Novel Technologies and Sustainable Development", Leskovac, October, 20-21, 2023. Book of Abstracts, OCT - 12, p. 78.
 33. Maja Urošević, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić, Ana Dinić, Ivana Gajić, Vojkan Miljković, Aleksandar Zdravković, The influence of crosslinking agents, temperature and pH value of the medium on the swelling properties of poly(N-isopropylmethacrylamide-co-N-isopropylacrylamide) hydrogels, 15th International Symposium with international participation "Novel Technologies and Sustainable Development", Leskovac, October, 20-21, 2023. Book of Abstracts, PE - 5, p. 99.
 34. Ljubiša Nikolić, Maja Urošević, Vesna Nikolić, Ana Dinić, Ivana Gajić, Marijana Vladimirov, Ljiljana Takić, The synthesis and characterization of thermosensitive copolymer hydrogels poly(N-isopropylmethacrylamide-co-N-isopropylacrylamide), 15th International Symposium with international participation "Novel Technologies and Sustainable Development", Leskovac, October, 20-21, 2023. Book of Abstracts, PE - 6, p. 100.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu M64

1. Ivana Nikolić, Tatjana Kundaković, Ana Tačić, Ivan Savić, Ivana Savić-Gajić, Antioksidativna aktivnost ekstrakta semena leblebije (*Cicer arietinum* L.), Zbornik izvoda radova XI Simpozijum savremene tehnologije i privredni razvoj, Leskovac, 23. i 24. oktobar 2015., BPT-4, str. 42.
2. Ivana Nikolić, Tatjana Kundaković, Ana Tačić, Ivan Savić, Ivana Savić-Gajić, Optimizacija postupka ekstrakcije izoflavona iz leblebije (*Cicer arietinum* L.), Zbornik izvoda radova XI Simpozijum savremene tehnologije i privredni razvoj, Leskovac, 23. i 24. oktobar 2015., BPT-33, str. 71.
3. Ivan Savić, Ivana Nikolić, Tatjana Kundaković, Ivana Savić-Gajić, Ana Tačić, Modeling total flavonoids extraction from chickpea (*Cicer arietinum* L.), Book of Abstracts, XXIV Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, 11 - 14 September 2016, Ohrid, R. Macedonia, MPCE 002, p. 206.
4. Ivana Nikolić, Ivan Savić, Tatjana Kundaković, Ivana Savić-Gajić, Modeling the extraction of total polyphenols from chickpea (*Cicer arietinum* L.). Zbornik izvoda radova XII Simpozijum savremene tehnologije i privredni razvoj, Leskovac, 20. i 21. oktobar 2017., - BFT - 12, str. 46.
5. Ivana Nikolić, Ljiljana Stanojević, Ana Tačić, Vesna Nikolic, Vesna Savić, Jelena Zvezdanović, Antioxidant activity of Osage orange (*Maclura pomifera* (Raf.) Schneid.) fruit extracts, „25th Congress of Chemists and Technologists of Macedonia“, Book of abstract, 19-22.9.2018., Ohrid, Macedonia. OBPC P-5, p. 55.
6. Vesna Savić, Vesna Nikolic, Milica Stanković, Ivana Nikolić, Safety estimation of topical application of wild orange extract (*Maclura pomifera* (Raf.) Schneid.), „25th Congress of Chemists and Technologists of Macedonia“, Book of abstract, 19-22.9.2018., Ohrid, Macedonia. OBPC P-6, p. 56.
7. Ivana Nikolić, Snežana Ilić-Stojanović, Ljubiša Nikolić, Ivana Savić-Gajić, Ivan Savić, Formulation of Biochanin A with dual pH- and thermo-responsive hydrogels, XII Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, Book of abstracts, 02 and 03 November 2018, Teslić, Republic of Srpska, B&H, p. 63.
8. Ljubiša Nikolić, Snežana Ilić-Stojanović, Aleksandar Zdravković, Ivana Nikolić, Maja Urošević, Influence of lyophilization to swelling behavior of dual pH/thermo-responsive hydrogels, XII Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, Book of abstracts, 02 and 03 November 2018, Teslić, Republic of Srpska, B&H, p. 64.
9. Ljiljana Stanojević, Jelena Stanojević, Vesna Nikolić, Dušica Ilić, Ivana Nikolić, The effect of operational conditions on the hydrodistillation yield and composition of essential oil from rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) leaves, XII Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, Book of abstracts, 02 and 03 November 2018, Teslić, Republic of Srpska, B&H, p. 65.

10. Ivana Nikolić, Sanja Petrović, Ana Tačić, Tatjana Mihajilov-Krstev, Zorica Stojanović-Radić, antimicrobial activity of Biochanin A against *Helicobacter pylori*, XII Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, Book of abstracts, 02 and 03 November 2018, Teslić, Republic of Srpska, B&H, p. 66.
11. Ivana Nikolić, Ljiljana Stanojević, Sanja Petrović, Ana Tačić, Ljubiša Nikolić, Antioxidative activity of Biochanin A and its inclusion complex with hydroxypropyl- β -cyclodextrin, XII Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, Book of abstracts, 02 and 03 November 2018, Teslić, Republic of Srpska, B&H, p. 67.
12. Ana Tačić, Ljiljana Stanojević, Jelena Stanojević, Vesna Nikolić, Ivana Nikolić, The chemical composition and antioxidant activity of clove (*Syzygium aromaticum* L.) essential oil, XII Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, Book of abstracts, 02 and 03 November 2018, Teslić, Republic of Srpska, B&H, p. 68.
13. Ana Tačić, Ivana Nikolić, Maja Urošević, Marijana Vladimirov, Ljiljana Stanojević, Vesna Nikolić, Vesna Savić, Characterization and phase solubility study of benzocaine:2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex, Book of Abstracts, XIII Symposium (with international participation) "Novel Technologies and Economic Development" Leskovac, October, 18-19, 2019. - PHCE - 6, p. 70.
14. Vesna Savić, Ivana Nesić, Jelena Zivković, Vesna Nikolić, Ana Tačić, Ivana Nikolić, The irritational potential of benzocaine and inclusion complex with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, Book of Abstracts, XIII Symposium (with international participation) "Novel Technologies and Economic Development" Leskovac, October, 18-19, 2019. - PHCE - 16, p. 80.
15. Vesna Savić, Ivana Nesić, Maja Grigorov, Ivana Nikolić, Ljiljana Stanojević, Jelena Stanojević, Ana Tačić, Vesna Nikolić, The irritational potential of caraway fruit (*Carum carvi* L.) essential oil, Book of Abstracts, XIII Symposium (with international participation) "Novel Technologies and Economic Development" Leskovac, October, 18-19, 2019. - PHCE - 17, p. 81.
16. Ivana Nikolić, Ljiljana Stanojević, Vesna Nikolić, Jelena Stanojević, Ana Tačić, The chemical composition of essential oil and volatiles from caraway fruit (*Carum carvi* L.), Book of Abstracts, XIII Symposium (with international participation) "Novel Technologies and Economic Development" Leskovac, October, 18-19, 2019. - OCT - 10, p. 100.
17. Maja Urošević, Ljubiša Nikolić, Snežana Ilić-Stojanović, Marijana Vladimirov, Ivana Nikolić, Ana Tačić, Aleksandar Zdravković, Structural characterization of synthesized copolymer hydrogels of poly(N-isopropylmethacrylamide-co-N-isopropylacrylamide) and analysis of residual reactants, Book of Abstracts, XIII Symposium (with international participation) "Novel Technologies and Economic Development" Leskovac, October, 18-19, 2019. - PE - 8, p. 114.
18. Maja Urošević, Ljubiša Nikolić, Ivana Nikolić, Nebojša Krunić, Milena Kostić, Stevo Najman, The influence of pH environment and temperature on swelling properties of poly(N-isopropylmethacrylamide-co-N-isopropylacrylamide) copolymer hydrogels, Book of Abstracts,

XIII Symposium (with international participation) "Novel Technologies and Economic Development" Leskovac, October, 18-19, 2019. - PE - 9, p. 115.

Tehnička rešenja - Novi tehnološki postupak M83

1. Ivana Savić Gajić, Ivana Nikolić, Ivan Savić, Laboratorijski tehnološki postupak pripreme inkluzionog kompleksa biohanina A sa 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom, Ev. br. 04-2316/1, od 18.12.2017. NIO realizator: Tehnološki fakultet, Leskovac. (recenzije: 04 br. 2375/1 od 21.12.2017. i 04 br. 2376/1 od 21.12.2017. Tehnološki fakultet, Leskovac, 2017.) Participant-korisnik: Društvo za proizvodnju i trgovinu „DIAPHARM“ DOO, Niš.

Objavljen patent na nacionalnom nivou M94

1. Ivana Gajić, Snežana Ilić-Stojanović, Ana Dinić, Aleksandar Zdravković, Maja Urošević, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić, Slobodan D. Petrović, Dušica Ilić, Formulacije Biohanina A sa pH- i termo-osetljivim kopolimerima", **P-2021/0070**, datum podnošenja 20.01.2021., Zavod za intelektualnu svojinu Republike Srbije, objava patenta (A1) 10/2021 od 29. okt. 2021.
2. Ivana Gajić, Sanja Stojanović, Ivan Ristić, Snežana Ilić-Stojanović, Branka Pilić, Aleksandra Nešić, Stevo Najman, Ana Dinić, Ljiljana Stanojević, Maja Urošević, Vesna Nikolić, Ljubiša Nikolić, "Formulacije elektrospinovanih nanovlakana od polilaktida sa fitoestrogenima za produženo oslobađanje", **P-2022/0130**, priznati datum podnošenja prijave patenta 09.02.2022., Zavod za intelektualnu svojinu, Beograd, objava patenta (A2) 06/2022 od 30. juna 2022.
3. Maja Urošević, Ljubiša Nikolić, Ivana Gajić, Vesna Nikolić, Ana Dinić, Snežana Ilić-Stojanović, Vojkan Miljković, Goran Nikolić, Suzana Cakić, "Formulacija matriks sistema sa kurkuminom", **P-2022/0287**, priznati datum podnošenja prijave patenta 17.03.2022., Zavod za intelektualnu svojinu, Beograd, objava patenta (A1) 07/2022 od 29. jula 2022.



ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Развој и карактеризација савремених фармацеутских облика са биоханином А и биолошке активности

која је одбрањена на Технолошком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивала на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредила ауторска права, нити злоупотребила интелектуалну својину других лица

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 23.07.2024.

Потпис аутора дисертације:

Ивана Гајић

Ивана Љ. Гајић



**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ
ОБЛИКА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**Развој и карактеризација савремених фармацеутских облика са
биоханином А и биолошке активности**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предала за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику

У Нишу, 23.07.2024.

Потпис аутора дисертације:

Ивана Гајић

Ивана Љ. Гајић



ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Развој и карактеризација савремених фармацеутских облика са биоханином А и биолошке активности

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 23.07.2024.

Потпис аутора дисертације:

Ивана Гајић

Ивана Љ. Гајић