

Histokemija liposoma i njihova povezanost s krvno-moždanom barijerom

Tompoš, Tea

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:346437>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

HISTOKEMIJA LIPOSOMA I NJIHOVA POVEZANOST S KRVNO-MOŽDANOM BARIJEROM

Histochemistry of liposomes and their association with the
blood-brain barrier

ZAVRŠNI SEMINARSKI RAD

Tea Tompoš
Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate Study of Biology)
Mentor: prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin

Zagreb, 2017.

Sadržaj

1	Uvod	1
2	Liposomi i njihove karakteristike	2
2.1	Histokemija liposoma	2
2.2	Metode pripreme liposoma	6
3	Krvno–moždana barijera	9
3.1	Anatomija krvno–moždane barijere	9
3.2	Histokemija krvno–moždane barijere	10
4	Povezanost liposoma s krvno–moždanom barijerom	13
4.1	Terapeutska svrha	13
4.2	Dijagnostička svrha	14
5	Sažetak	15
6	Summary	16
7	Reference	17

1 Uvod

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) procijenjeno je da se oko 35% bolesti, koje pogađaju Europljane, odnosi na neurodegenerativne bolesti središnjeg živčanog sustava (*Brain Disorders: By the Numbers 2014*). Mnoge se od tih bolesti manifestiraju u obliku kroničnih i neizlječivih stanja te rezultiraju godinama izgubljenog mentalno zdravog života, a na kraju i smrću. Povezano s navedenom statistikom, javlja se i trend produljenog životnog vijeka, kako u razvijenim, tako i u slabije razvijenim državama (*Haub, 2011*), što znatno pridonosi problemu povećanja populacije zahvaćene neurodegenerativnim bolestima. Zahvaljujući modernoj tehnologiji, preciznije nanotehnologiji, čiji je razvoj počeo krajem šezdesetih godina prošlog stoljeća idejom američkog fizičara Richarda P. Feynmana da se perspektiva manipulacije objektima usredotoči na atome i molekule (*Feynman, 1960*), počeo je razvoj jedne od dominantnijih grana moderne znanosti – nanomedicine. Temelj ove interdisciplinarnе grane znanosti jest razvoj širokog spektra uređaja mikroskopskih veličina te primjena istih na razini tkiva, stanica, pa čak ih staničnih organela (*Krukemeyer i dr., 2015*), a sve to s ciljem postizanja maksimalne učinkovitosti lijeka s minimalnim nuspojavama.

Još na početku dvadesetog stoljeća, čak i prije razvoja nanotehnologije, njemački znanstvenik Paul Ehrlich prezentirao je tzv. *"magic bullet"* koncept iza kojeg stoji ideja o molekuli koja je dizajnirana da specifično donosi lijek do tkiva ili stanica koje su oštećene ili odgovorne za manifestaciju tretirane bolesti (*Zhu, Mei i Tan, 2014*). Prilikom liječenja bolesti koje zahvaćaju središnji živčani sustav (CNS), najveći problem predstavlja krvno-moždana barijera. Ta je kompleksna struktura zapreka koju terapeutici moraju premostiti da bi stigli na mjesto djelovanja te se sistem nosača molekula pokazao izrazito bitnim u njenom premošćivanju.

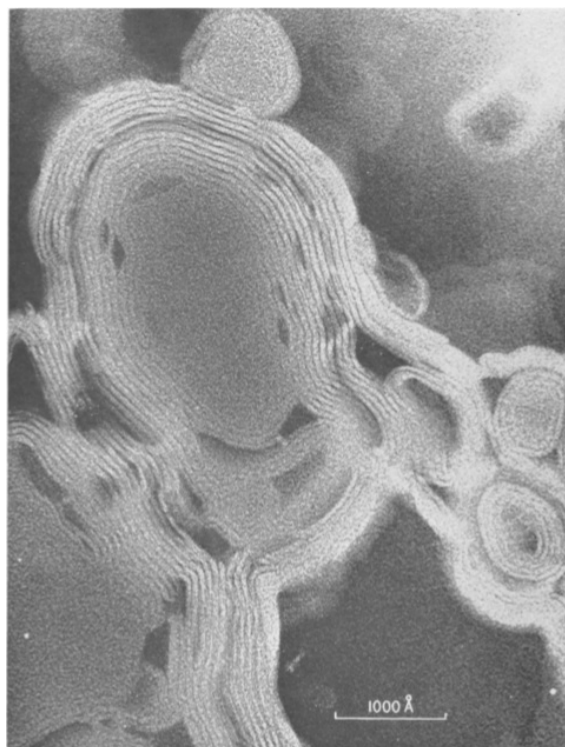
Danas, nanomedicina raspolaže tehnikama koje su omogućile preciznu sintezu takvih specifičnih nosača, a tri najviše korištena su biokompatibilni polimeri ¹, micele i liposomi (*Krukemeyer i dr., 2015*). Liposomi pokazuju najveću mogućnost manipulacije kada je riječ o specifičnom usmjeravanju lijeka te su zato najistraženiji među korištenim nanonosacima. Utvrđeno je da mogu biti programirani na način da odgovaraju na vanjski podražaj (*Vieira i Gamarra, 2016*), mogu nositi više od jednog lijeka do ciljanog mjesta (*Zhu, Mei i Tan, 2014*), u njih je moguće inkorporirati molekule različite prirode (antitijela, drugi proteini, ugljikohidrati, nukleinske kiseline...) itd. Neke se bolesti već tretiraju lijekovima koji su u kompleksu s liposomima (*Chang i Yeh, 2011*), dok ubrzani razvoj znanosti djeluje obećavajuće i za one ostale. Velika prednost liposoma ispred drugih nanonosaca je ta da imaju sposobnost prijenosa tvari topivih u vodi, ali i hidrofobnih tvari također (*Huang, McPherson i MacDonald, 2013*). Moguće je da upravo liposomi revolucionariziraju način administracije lijekova za neka od najzastupljenijih patoloških stanja CNS, poput Parkinsonove i Alzheimerove bolesti, moždanog udara te tumora.

¹Biokompatibilni polimeri su tvari koje ne izazivaju aktivaciju trombocita kada se nalaze u krvi te time ne potiču stvaranje ugrušaka kada cirkuliraju krvotokom i prenose molekule na specifična mjesta (*Prasad, 1994*).

2 Liposomi i njihove karakteristike

Pionirska istraživanja i otkriće liposoma odvijali su se u drugoj polovici prošlog stoljeća. Za prvu definiciju liposoma, 1964. godine, zaslužni su britanski biofizičar Alec D. Bangham i njegov tim sa Sveučilišta u Cambridgeu, opisavši nabreknute fosfolipidne sustave, koji sličje staničnoj membrani, te ih nazvavši *multilamelarnim smektičkim mezosomima* ili, u neformalnom referiranju, *bangosomima*, prema voditelju tima (Deamer, 2010). Tek je kasnije, 1968. godine, Gerald Weissmann predložio naziv *liposomi*, koji je uspješno usvojen i nadalje korišten, a nastao je kao analogija izrazu za lizosome (Madni i dr., 2014).

Liposomi su definirani kao umjetne vezikule sastavljene od jednog ili više koncentričnih slojeva fosfolipidnog dvosloja koji okružuje vodeni medij (Merriam-Webster, 2017c). Banghamov eksperiment, koji je doveo do otkrića liposoma, temeljio se na metodi negativnog bojanja različitih lecitina dispergiranih u kloroformu, osušenih, a zatim resuspendiranih u vodi te promatranih pod elektronskim mikroskopom uz povećanje od 40 000 i 80 000 puta (A. Bangham i Horne, 1964). Za negativno bojanje korišten je kalijev fosfotungstat, a kao rezultat su dobivene obojane koncentrične lamele fosfolipidnih dvosloja (Slika 1.) koje su u kasnijim istraživanjima služile kao model proučavanja prirode staničnih membrana u različitim uvjetima. Upravo je na proučavanju liposoma utvrđeno da fosfolipidni dvosloj staničnih membrana ima svojstvo permeabilnosti i održavanja koncentracijskog gradijenta (A. D. Bangham, Standish i C., 1965). Prema stajalištima nekih znanstvenika (Deamer, 2010), ovo je otkriće membranski ekvivalent otkriću strukture dvostruke uzvojnice molekule DNA.



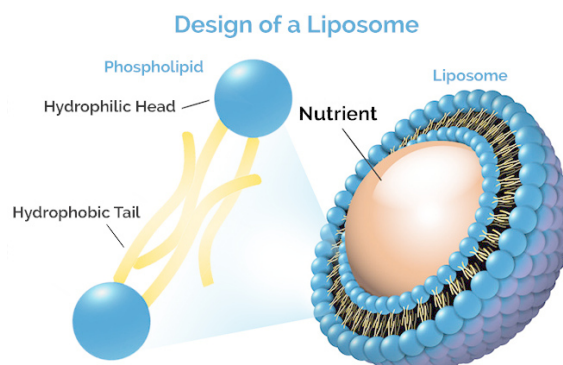
Slika 1: Elektronsko mikroskopska fotografija dispergiranih čestica ovolecitina koje su formirale liposome. Jasno se vide negativno obojane lamele fosfolipidnih dvosloja koje su prikazane kao svijetliji slojevi odijeljeni tamnijim linijama (A. Bangham i Horne, 1964).

2.1 Histokemija liposoma

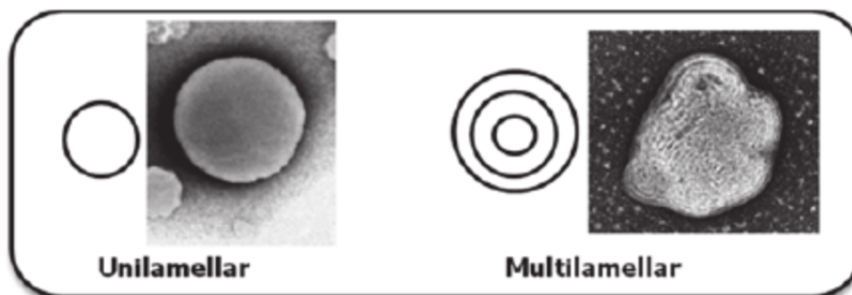
Svakom je tipu liposoma zajednička osnovna struktura koju čini fosfolipidni dvosloj koji odvaja vanjsku tekuću fazu od unutarnje tekuće faze. Molekule fosfolipida orijentirane su na način da hidrofilne "glave" molekula graniče s vodenom otopinom u kojoj se nalaze, te s vodenom otopinom koju sadrže, dok su hidrofobni "repi" molekula orijentirani prema drugima (Slika 2.). Razlike se mogu očitovati u kompoziciji dvosloja, površinskom naboju dvosloja, veličini liposoma, načinu sinteze itd. Primjerice, kompozicija dvosloja može utjecati na rigidnost, odnosno fluidnost liposomalne čestice. Ako je čestica liposoma formirana korištenjem lipida iz prirodnih izvora poput jaja ili soje, koji sadrže više nezasićenih fosfatidilkolina, rezultat će biti veća permeabilnost membrane, ali i manja stabilnost liposoma. Kontrastno, korištenjem zasićenih fosfolipida

s dugim acilnim lancima daje rezultat u obliku rigidnih, nepropusnih, ali dulje stabilnih liposoma (Akbarzadeh i dr., 2013).

Prema Bozzuto i Molinari, 2015, osnovna podjela liposoma može se bazirati na temelju tri kriterija: veličina, lamelnost i način pripreme. Veličina liposoma može varirati od nekoliko nanometara do nekoliko mikrometara, ali u medicinske svrhe koriste se čestice veličine 50-450 nm te se unutar ove ljestvice mogu podijeliti na **male, srednje i velike liposome**. Nadalje, lamelnost kao kriterij odnosi se na broj dvosloja unutar jedne čestice liposoma, a dijeli se na **unilamelarne čestice (ULVs) i multilamelarne čestice (MLVs)**. ULVs se sastoje samo od jednog dvosloja fosfolipida, dok MLVs imaju strukturu poput luka, tj. sadrže više koncentričnih fosfolipidnih dvosloja (Slika 3.). Posljednji kriterij podjele je način pripreme koji se u grubo može odijeliti na dvije metode: direktna hidratacija lipida u organskom otapalu te metoda prethodnog stvaranja lipidnog filma koji se kasnije hidratizira (Više o metodama u odjeljku: Metode pripreme liposoma.).



Slika 2: Prikaz građe sferičnog liposoma i orijentacije fosfolipida u dvosloju (integratedhealth.com, 2017).

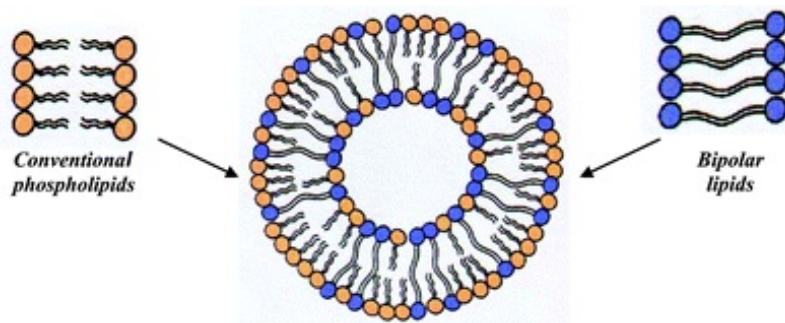


Slika 3: Shematski prikaz i mikroskopska fotografija unilamelarnog (lijevo) te multilamelarnog (desno) liposoma. (Trevisan i dr., 2011).

S druge strane, prema Madni i dr., 2014, liposome se može podijeliti u vrlo specifične podvrste, a kriterij podjele je razlika u sastavu fosfolipidnog dvosloja s obzirom na inkorporirane tvari. Tako postoje: *arheosomi*, *kohelati*, *etosomi*, *egzosomi*, *imunoliposomi*, *magnetski liposomi*, *pH osjetljivi liposomi*, *temperaturno osjetljivi liposomi*, *liposomi koji sadrže plin* itd.

Arheosomi su liposomi čija membrana sadrži lipide arheja. Budući da su arheje ekstremofili, njihovi lipidi se razlikuju od lipida prokariota i eukariota (Madni i dr., 2014). Njihovi lipidi su eter-lipidi, a to su molekule kod kojih jedan ili više ugljikovih atoma u molekuli glicerola veže alkilni lanac eterskom, a ne uobičajenom esterskom vezom (Wikipedia, 2017). Takvi su liposomi bipolarni (lanci masnih kiselina nasuprotnih fosfolipida su spojene - Slika 4), te su otporni na ekstremne vrijednosti pH i temperature te na oksidativni stres². Arheosomi se koriste u slučaju potrebe za

²Oksidativni stres je poremećaj ravnoteže prooksidansa (npr. slobodnih radikala, reaktivnih kisikovih spojeva) i antioksidansa (vitamini C, E i antioksidacijski enzimi) u korist prooksidansa (Žarković, 2017)



Slika 4: Shematski prikaz strukture membrane arheosoma s bipolarnim fosfolipidima čiji su nasuprotni alkilni lanci spojeni.

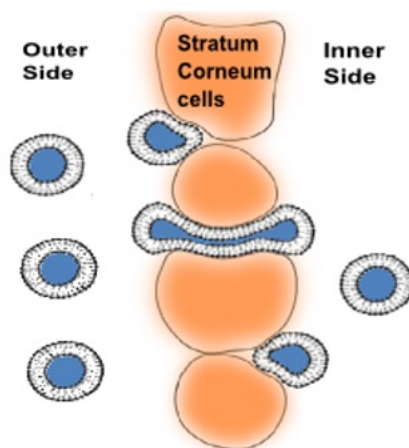
produljenjem cirkulacije liposoma u organizmu.

Kohelati (eng. *cochelates*) su liposomi u čiji su dvosloj inkorporirani anorganski kationi poput cinka i kalcija ili neki organski kationi (Madni i dr., 2014). Kationi su viševalentni, a svojim nabojem osiguravaju pojačane kemijske interakcije između fosfolipida u dvosloju te rezultiraju smanjenjem vodene jezgre unutar liposoma zbog međusobnog približavanja molekula fosfolipida. Čestica pokazuje izuzetnu mehaničku izdržljivost i sposobnost pohranjivanja tvari koje bi inače izazvale jaku imunološku reakciju, primjerice - dostavljanje virusnih antigena (Madni i dr., 2014).

Etosomi služe za transdermalni prijenos tvari (Slika 5.), a to su liposomi koji sadrže velike količine etanola u tekućem mediju kojeg okružuju. Svojstva etanola u ovom slučaju omogućuju veću fleksibilnost dvosloja, dok je stabilnost i dalje postojana, što pomaže boljoj penetraciji takvih liposoma kroz slojeve kože – posebice kroz *stratum corneum* (Akhtar, 2016).

Egzosomi su liposomi koji su uobičajena pojava u organizmu, a luče ih zdrave stanice u svrhu međusobne komunikacije, te tumorske stanice u svrhu manipulacije mikrookolišem u kojem se nalaze – primjerice, poticanje angiogeneze³ i apoptoze limfocita (Madni i dr., 2014). Budući da su takvi egzosomi proizvod specifičnog organizma, oni na svojoj površini već sadrže receptore koji im omogućuju precizno detektiranje tumorskog tkiva (Slika 8.), a iz tog su razloga privlačna opcija za daljnju molekularnu obradu. Naime, uspješno su izolirani egzosomi pacijenata koji boluju od neke vrste tumora, te su u njih umetnuti protutumorski lijekovi, a tada su takvi liposomi, koji su zapravo imitacija egzosoma tih pacijenata, korišteni kao precizan način dostave terapeutika do samih tumora (Kooijmans i dr., 2012).

Imunoliposomi su liposomi na čijoj se površini nalaze receptori poput monoklonalnih antitijela⁴, a ona selektivno vežu receptore (Slika 6.) na točno određenim stanicama/tkivima koja tada internaliziraju liposome. Imunoliposomi su posebno važni

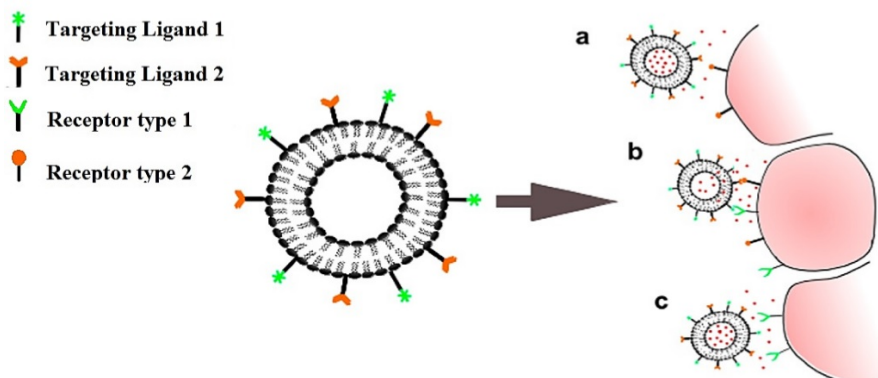


Slika 5: Shematski prikaz penetracije etosoma sa alkoholnom jezgrom (plavo) kroz *stratum corneum* kože (Madni i dr., 2014).

³Angiogeneza je proces stvaranja novih krvnih žila (Merriam-Webster, 2017a).

⁴Monoklonalna antitijela su proteini koje proizvodi jedna linija klonova limfocita B, a specijalizirani su za vezanje samo jedne tvari (Institute, 2017).

za prienos tvari koje su potencijalno toksične ukoliko slobodno cirkuliraju i tako budu izložene bilo kojem tkivu (Kooijmans i dr., 2012).



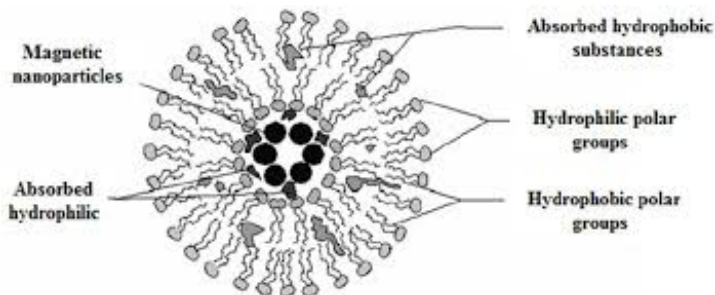
Slika 6: Shematski prikaz imunoliposoma s dva tipa monoklonalnih antitijela na površini – ligand 1 (zeleno) i ligand 2 (crveno), koji usmjeravaju liposome na tkiva koja sadrže samo receptor za ligand 1 (a), samo receptor za ligand 2 (c) ili receptore za oba liganda (b) (Madni i dr., 2014).

Magnetski liposomi (Slika 7.) sadrže tvari poput gadolinija (Gd^{3+}) i željeza (Fe^{3+}/Fe^{2+}) čija magnetska i paramagnetska svojstva omogućuju ciljano dostavljanje terapeutika ili djeluju kao kontrastni agensi pri magnetskoj rezonanciji (Madni i dr., 2014). Također, primjenom izmjenjivog magnetskog polja moguće je inducirati otpuštanje terapeutika u točno određenom trenutku.

pH osjetljivi liposomi osmišljeni su kao odgovor na otkriće da je virusima potreban blago kiseli okoliš kako bi se njihov proteinski omotač fuzionirao sa staničnom membranom i u stanicu otpustio virusnu DNA. Iz tog su razloga dizajnirani liposomi koji otpuštaju terapeutike upravo u kiselim uvjetima kako bi se virusna invazija efektivnije spriječila (Madni i dr., 2014).

Temperaturno osjetljivi liposomi imaju stabilni fosfolipidni dvosloj sve dok cirkuliraju krvotokom pri tjelesnoj temperaturi od $37^{\circ}C$. Kada se nađu u području zahvaćenom hipertermijom ($39-42^{\circ}C$), a takav je slučaj najčešće u mikrookolišu koji okružuje tumor, zbog povećane fluidnosti dvosloja otpuštaju terapeutike (Kono i dr., 2010).

Liposomi koji sadrže plin modificirani su na način da čak do 80% unutarnjeg volumena čine čestice u plinovitom stanju, dok preostali volumen sačinjava tekuća faza sa otopljenim agensima (Madni i dr., 2014). Uočeno je da takvi liposomi osciliraju pod niskim frekvencijama ultrazvuka te ih se može razlikovati od oscilacija koje producira okolno tkivo. Na taj način mogu poslužiti kao sredstvo detekcije tumora te je moguće izazvati otpuštanje terapeutika vanjskim podražajem – ultrazvučnim valovima (Huang, McPherson i MacDonald, 2013).

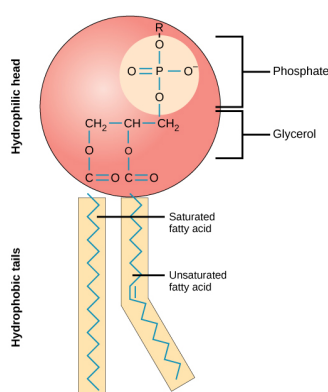


Slika 7: Hipotetski model magnetskog liposoma koji nosi hidrofobne agense inkorporirane u fosfolipidni dvosloj, te hidrofilne terapeutike i magnetske čestice smještene u vodenoj okolini u središtu (Ahmad i dr., 2013).

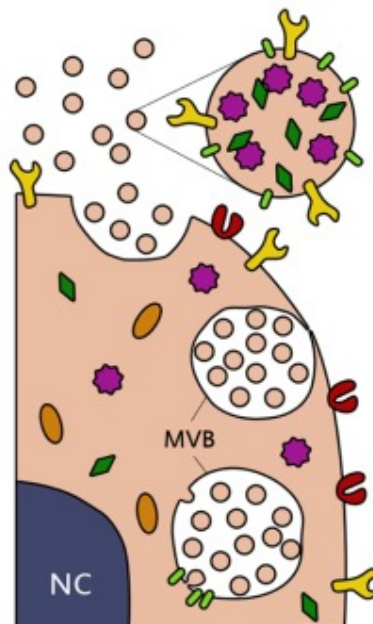
2.2 Metode pripreme liposoma

Kada se molekule fosfolipida izloži vodenom okruženju, dolazi do spontane formacije sferičnih čestica, a razlog tome je amfipatska građa molekule fosfolipida. Fosfolipidi imaju hidrofilni i hidrofobni dio (Slika 9.) što ih čini slabo topljivim tvarima u vodi, ukoliko ne formiraju dvosloj. Na rubovima dvosloja, koji leži u ravnini, nalaze se fosfolipidi čiji hidrofobni dijelovi sadrže visoku vrijednost slobodne energije, budući da graniče s vodom. Ta se energija na krajevima ravnine dvosloja može smanjiti ugradnjom novih fosfolipida i formiranjem sferičnog oblika (Slika 2). Kako se fosfolipidi planarno postavljenog dvosloja regrupiraju tvoreći zaobljeni oblik, ukupna energija procesa najprije raste zbog savijanja dvosloja, a zatim se smanjuje i otpušta kako se krajevi dvosloja spajaju i čine sferu (Patil i Jadhav, 2013).

U posljednjih 40-ak godina, koncept kliničke upotrebe liposoma kao sredstva dopremanja terapeutika postao je uobičajena pojava u znanstvenim istraživanjima, te je doprinio razvoju mnoštva metoda za njihovu sintezu *in vitro* (Allen i Cullis, 2012). Osnovne metode sinteze liposoma su efikasne, reproducibilne i jednostavne za izvođenje, što omogućuje subjektivno prilagođavanje parametara ovisno o potrebi i cilju istraživanja, a to je rezultiralo velikim brojem njihovih varijanti (Nogueira i dr., 2015). Odabir ispravne metode ovisi o faktorima kao što su kemijske komponente liposoma i/ili priroda tvari koja će biti inkorporirana, toksičnosti i koncentraciji tvari za unos u liposom, vrsta medija u kojem su liposomi dispergirani, veličina i željeno trajanje "života" liposoma itd. (Bozzuto i Molinari, 2015).



Slika 9: Prikaz građe jedne molekule fosfolipida. Fosfat i glicerol čine hidrofilni dio, dok dugi ugljikovodični lanci mogu biti zasićeni ili nezasićeni, a čine hidrofobni dio molekule (Boundless.com, 2017).



Slika 8: Shematski prikaz dijela stanice koji izlučuje egzosome (rozi kružići) te njihovo uvećanje koje prikazuje različite receptore na površini egzosoma (Kooijmans i dr., 2012). (NC = jezgra stanice; MVB = multivezikularna tijela)

Konvencionalne metode pripreme liposoma mogu se podijeliti u (Patil i Jadhav, 2013):

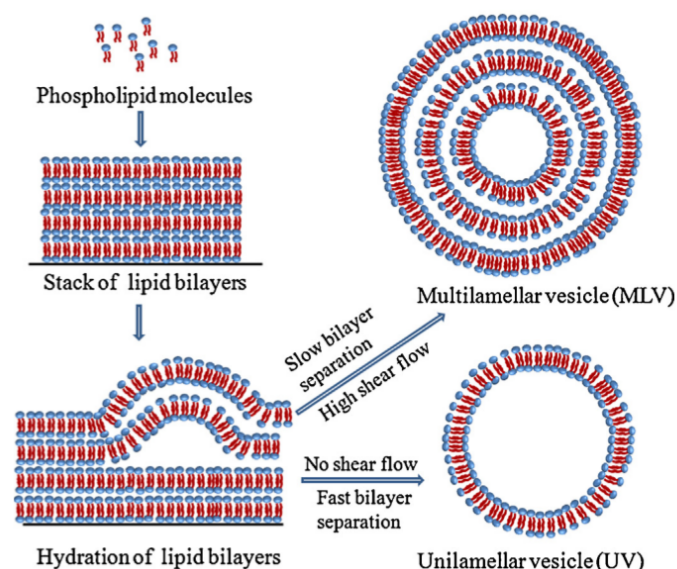
- metode za pripremu multilamelarnih vezikula (MLVs),
- metode za pripremu malih (SUVs) i velikih (LUVs) unilamelarnih vezikula.

S druge strane, neke od alternativnih metoda su (Patil i Jadhav, 2013):

- mikrofluidna metoda,
- metoda korištenja superkritičnih fluida,
- ostale moderne metode.

Metode za pripremu multilamelarnih vezikula (MLVs):

- (a) HIDRATACIJA FOSFOLIPIDNOG FILMA – metoda u kojoj suhi film paralelno postavljenih dvosloja jedan na drugi (Slika 10.) bude rehidriran. Rezultat je heterogena smjesa MLVs različite veličine i lamelarnosti.
- (b) METODA OTAPAJUĆIH SFERULA (eng. *solvent spherule method*) – snažno miješanje organskog otapala (etera/etanola), koje sadrži fosfolipide, i vodene faze u uvjetima slabog vakuuma rezultira emulzijom koja sadrži male lipidne sferule. Evaporacijom se miče organska faza, te ostaje vodena otopina lipidnih sferula koje se konvertiraju u MLVs različitih veličina.
- (c) HIDRATACIJA PROLIPOSOMA – stabilna, suha i granulirana smjesa proliposoma, koji imaju inkorporirane terapijske agense, izložena vodenoj okolini daje otopinu MLVs sa također inkorporiranim terapeutima.



Slika 10: Shematski prikaz sinteze multilamelarnih i unilamelarnih liposoma metodom hidratacije paralelnih slojeva fosfolipidnih dvosloja (Patil i Jadhav, 2013).

Metode za pripremu malih (SUVs) i velikih (LUVs) unilamelarnih vezikula:

- (a) EVAPORACIJA REVERZNE FAZE (eng. *reverse phase evaporation*) – slično kao kod metode otapajućih sferula, postupak uključuje hidrataciju fosfolipida otopljenih u organskom otapalu dodatkom vode i snažnim miješanjem. Razlika je u tome što se kod metode sferula javlja *oil-in-water* emulzija koja rezultira MLVs, dok u ovom slučaju nastaje *water-in-oil* emulzija te su rezultat velike unilamelarne vezikule (LUVs).
- (b) INJEKCIJA FOSFOLIPIDA (OTOPLJENIH U ORGANSKOM OTAPALU) U VODENI MEDIJ – u slučaju injektiranja fosfolipida otopljenih u etanolu u vodeni medij, dolazi do razrjeđivanja etanola do kritične koncentracije, što potiče spontano formiranje malih unilamelarnih vezikula (SUVs). Kada je na mjestu etanola eter, formiranje SUV liposoma događa se zbog hlapljenja etera iz otopine. Mijenjanjem parametara zaključeno je da povećanjem koncentracije fosfolipida u organskom otapalu dolazi do formiranja većih liposoma, ali se formiraju i MLVs.
- (c) DIJALIZA DETERGENTOM (eng. *detergent dialysis*) – u ovoj se metodi koristi detergent kako bi se formirale micelle koje zatim omogućuju otapanje fosfolipida u vodi. Kasnijim odstranjivanjem detergenta dijalizom⁵ micelle bogate fosfolipidima međusobno fuzioniraju te na taj način nastaju LUVs.
- (d) REDUKCIJA VELIČINE I LAMELARNOSTI MLVs – budući da je lakše postići spontanu sintezu multilamelarnih vezikula, razvijene su metode koje omogućavaju reformiranje MLVs u LUVs i SUVs. Neke od metoda su: tehnika francuskog potiskivanja (eng. *French press technique*; uključuje istiskivanje otopine, koja sadrži

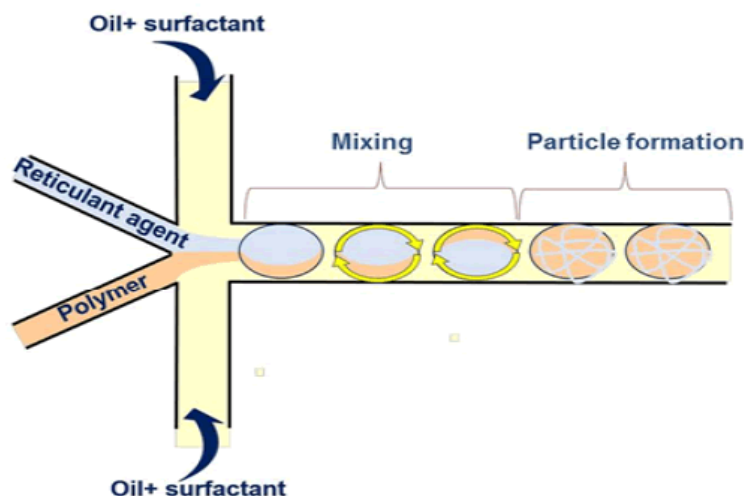
⁵Dijaliza je proces odvajanja tvari iz otopine na temelju njihove različite difuzije kroz polupropusnu membranu (Merriam-Webster, 2017b).

MLVs, kroz sitne otvore pri uvjetima visokog tlaka), sonifikacija (primjenom ultrazvučnih valova moguće je poremetiti strukturu MLVs te nastaju SUV liposomi veličine 30–50 nm, no posljedica primjene ove metode može biti degradacija fosfolipida ili terapijskog agensa), homogenizacija (otopina liposoma se kontinuirano pumpa kroz sitne otvore i sudara sa čeličnim zidom homogenizatora pri vrlo visokom tlaku), istiskivanje kroz polikarbonatne membrane koje sadrže pore...

Mikrofluidna metoda: koristi protok određenih tekućina kroz kanale čiji promjer može biti u rasponu 5-500 μm (Slika 11.). Prednosti ove metode kao tehnike sinteze liposoma je mogućnost preciznog baratanja volumenima polaznih otopina u nanolitrima, a to omogućuje stvaranje uvjeta savršenih omjera za sintezu željenog tipa liposoma.

Metoda korištenja superkričnih fluida: u kojoj oni obavljaju ulogu organskih otapala u konvencionalnim metodama. Superkrični fluidi (SCF) posjeduju karakteristike tekućina i plinova pa i najmanja promjena tlaka i/ili temperature može promijeniti gustoću SCF, a time i topljivost tvari u njima. Obavljajući ulogu organskih otapala, omogućuju efikasnije razdvajanje i pročišćavanje lipida iz otopine.

Ostale moderne metode sinteze: uključuju metode poput hladnog sušenja dvostrukih emulzija (eng. *freeze drying of double emulsions*; smrzavanje i sušenje organske otopine lipida koji formiraju liposome, te kasnije dodavanje vode prilikom čega se formira homogena smjesa MLVs koji se kasnije mogu tretirati u svrhu dobivanja SUVs i/ili LUVs), korištenje membranskog kontaktora za sintezu lipida (otopina fosfolipida u etanolu istiskuje se kroz membranski kontraktor u vodenu otopinu i pri tome se formiraju liposomi), hidrataciju fosfolipida nataloženih na nanomaterijale...



Slika 11: Shematski prikaz sinteze sferičnih čestica korištenjem mikrofluidne metode (Vitor, Casagrande Sipoli i Gaziola De La Torre, 2015).

3 Krvno-moždana barijera

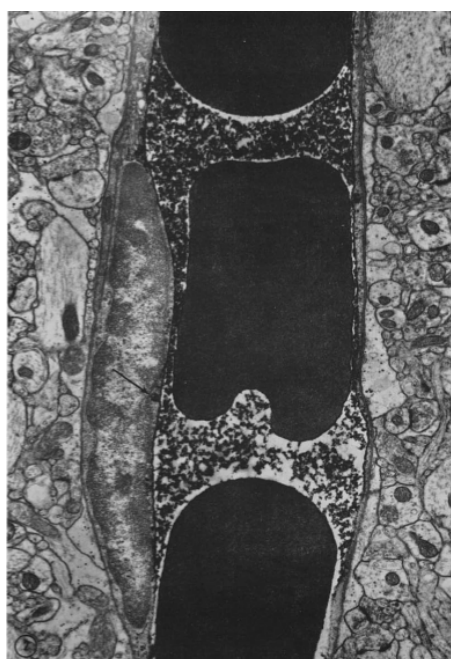
Krajem 19. stoljeća, njemački Nobelovac Paul Ehrlich proveo je istraživanje u kojem je modelnim organizmima intravenozno ubrizgao boju (tripansko modrilo) te je primijetio da je boja bila lokalizirana periferno, odnosno da moždano tkivo nema jednaki afinitet bojanja kao ostali organi periferije. Nešto kasnije, početkom 20. stoljeća, njegov je učenik, njemački kirurg Edwin Goldmann, proveo isti eksperiment, ali – recipročno. Goldmann je boju uštrcao direktno u cerebrospinalnu tekućinu (CSF) leđne moždine te je primijetio da u tom slučaju periferni organi nisu bili zahvaćeni bojom, već se ona zadržala samo u području mozga i leđne moždine, tj. središnjeg živčanog sustava (CNS) (Vieira i Gamarra, 2016). Nakon ovih prvotnih, te niza pokusa koji u slijedili, tek su 1960-ih godina znanstvenici Reese i Karnovsky uspjeli vizualizirati (Slika 12.) krvno-moždanu barijeru (BBB) na endotelu krvnih žila CNS (Reese i Karnovsky, 1967).

Neuroni mozga i leđne moždine koriste kompleksne mreže za međusobnu komunikaciju koristeći kemijske (neurotransmiteri, modulatori) i električne (sinaptički potencijal, akcijski potencijal) signale. Kako bi takva signalizacija bila precizna, reproducibilna i pouzdana, potrebni su mehanizmi za očuvanje homeostaze ionskog sastava intersticijske tekućine koja okružuje živčane stanice (Joan Abbott, 2013). Također, neuronima je potreban konstantan izvor kisika i nutrijenata, udaljen maksimalno 8–20 μm (Tajes i dr., 2014), a koji je omogućen brojnim kapilarama koje ulaze u tkivo CNS. Iz tog je razloga evolucijom došlo do modifikacije kritičnih područja CNS, koja predstavljaju snažne strukturne i biokemijske barijere, a nalaze se na tri glavna područja u CNS (Joan Abbott, 2013):

- epitel koroidnog pleksusa (modificirane ependimske stanice koje oblažu moždane klijetke te izlučuju CSF),
- epitel arahnoidne moždane ovojnice koja čini vanjski ovoj CNS,
- endotel moždanih kapilara koji se naziva krvno-moždana barijera.

3.1 Anatomija krvno-moždane barijere

Izraz krvno-moždana barijera (BBB) se koristi za opisivanje jedinstvenih svojstava stanica koje su zaslužne za formiranje krvnih žila mozga. Takve krvne žile su kontinuirane, nefenestrirane krvne žile sa još dodatnih svojstava koja im omogućuju striktnu regulaciju kretanja iona, molekula i stanica između krvi i CNS (Daneman i Prat, 2015). BBB je sastavljena od endotelnih stanica povezanih čvrstim čvorovima (eng. *tight junctions*) sa pripadajućom bazalanom membranom te stanicama (periciti, nožice astrocita) koje ih okružuju i tvore dodatni sloj oko kapilare.



Slika 12: Elektronsko mikroskopska slika (x 20 000) uzdužnog presjeka dijela moždane krvne žile miša u čiji je krvotok ubrizgana hrenova peroksidaza. Vide se tri eritrocita obojana u crno zbog endogene peroksidazne aktivnosti hemoglobina, te lumen kapilare koji sadrži crno obojene produkte egzogenih peroksidaza. S druge strane endotelnih stanica krvne žile nema crnog obojenja (Reese i Karnovsky, 1967).

Prema [Daneman i Prat, 2015](#), stanice koje tvore krvno-moždanu barijeru su:

Endotelne stanice (ECs) su jednostavne pločaste epitelne stanice nastale iz mezoderma, a čine stijenku krvnih žila. Promjer većih žila, poput velikih arterija i vena, mogu činiti desetci endotelnih stanica, dok promjer stijenke najmanje kapilare čini samo jedna EC (Slika 13.) koja spaja svoje krakove i čini lumen kapilare ([Daneman i Prat, 2015](#)). BBB ECs imaju specifične karakteristike koje ih razlikuju od ECs perifernih krvnih žila. Neke od karakteristika BBB ECs su: nemaju fenestracija (otvora), imaju manji broj endocitoznih vezikula (što ograničava transcelularni put tvari), čvrsti čvorovi kojima su povezane susjedne ECs onemogućavaju paracelularni put tvari, imaju veći broj mitohondrija (metabolički su aktivnije, tj. produciraju više ATP-a koji je potreban za aktivni prijenos tvari kroz membranu) te imaju specijalizirane transportne sisteme ([Tajes i dr., 2014](#)). Transport tvari preko membrane ECs odvija se pomoću dva tipa transportnih molekula, a to su *efflux transporters* (ETs) i *highly specific nutrient transporters* (NTs) ([Daneman i Prat, 2015](#)). ETs su lokalizirani na lumenalnoj strani membrane endotelnih stanica te prenose male lipofilne molekule u krv, koje bi u suprotnom difundirale u sloj stanične membrane. NTs su transporteri specijalizirani za prenošenje određenih nutrijenata iz krvi u CNS, te odvodnju otpadnih produkata iz CNS u krv. Osim ograničenog prolaska molekula kroz i između endotelnih stanica, ECs također ekspimiraju znatno manje leukocitnih adhezijskih molekula (eng. *leukocyte adhesion molecules*, LAMs) što limitira količinu imunoloških stanica koje ulaze u CNS ([Daneman i Prat, 2015](#)).

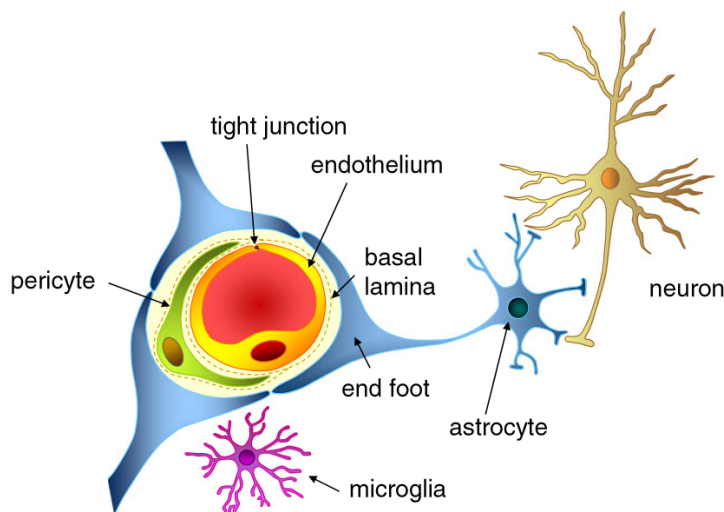
Zidne stanice (eng. *mural cells*) uključuju sve stanice (glatki mišići stijenki velikih krvnih žila, periciti) koje su priložene s ablumenalne strane krvnih žila i/ili umetnute u bazalnu membranu (BM). Zidne stanice kapilara BBB su **periciti** (Slika 13.), a oni su mezenhimske stanice koje se nalaze umetnute u BM, između endotelnih stanica i astrocitnih nožica, a pružaju svoje nastavke koji se mogu protezati čak i preko nekoliko endotelnih stanica ([Daneman i Prat, 2015](#)). Imaju ulogu u održavanju vaskularnog tonusa i stabilnosti jer sadrže kontraktilne proteine, zaduženi su za popravak krvnih žila, reguliraju infiltraciju imunoloških stanica, angiogenezu te protok krvi u mozgu s obzirom na njegovu aktivnost ([Daneman i Prat, 2015](#); [Tajes i dr., 2014](#)). Važno je spomenuti da je omjer pericita i endotelnih stanica u kapilarama BBB otprilike 1:3, dok je, primjerice, u također vrlo aktivnom tkivu poput mišićnog, omjer 1:100 ([Daneman i Prat, 2015](#)).

Astrociti su velika skupina glijastanica koji pružaju svoje nastavke (Slika 13.) do neurona i do kapilara BBB te imaju ulogu njihovih poveznica. Zbog neurovaskularne veze kojoj posreduju, astrociti imaju ulogu reguliranja kontrakcije/relaksacije glatkih mišića u stijenkama moždanih arteriola i pericita koji okružuju kapilare, što omogućava optimiziranje dotoka krvi u potrebite dijelove mozga ([Daneman i Prat, 2015](#)). Uz to, imaju i važnu ulogu u formaciji i održavanju krvno-moždane barijere (osiguravaju čvrste veze između endotelnih stanica, sadrže akvaporine kojima reguliraju ionski sastav i volumen BBB), te imaju ulogu u ekspresiji i polariziranoj lokalizaciji transportera u membrani endotelnih stanica ([Tajes i dr., 2014](#)).

3.2 Histokemija krvno-moždane barijere

U novije doba, uporabom sofisticiranih eksperimentalnih pristupa⁶ na području genomike i proteomike krvno-moždane barijere, otkriven je niz molekula ekspimiranih od strane endotelnih stanica, a koje su vrlo važne za razumijevanje strukture i transporta tvari kroz BBB ([Daneman i Prat, 2015](#)). Podatci su uspoređivani s endotelnim stanicama neneuralnih tkiva te je na temelju toga zaključivano o važnosti pojedinih molekula BBB. Endotelne stanice i periciti BBB izlučuju izvanstanični matriks koji se naziva vaskularna bazalna membrana, dok astrocitni nastavci izlučuju parenhimsku

⁶Korištenjem *microarray* tehnologije, RNA sekvenciranja i masene spektroskopije na pročišćenim mikrovaskularnim segmentima BBB, pročišćenim endotelnim stanicama te kultiviranim endotelnim stanicama ([Daneman i Prat, 2015](#)).



Slika 13: Shema prikazuje poprečni presjek moždane kapilare čiji promjer čini jedna endotelna stanica (žuto), a okružuju je periciti (zeleno) i nožice astrocita (plavo) koji čine dodatni sloj oko kapilare (Joan Abbott, 2013).

bazalnu membranu koja je nastavak vaskularne (Daneman i Prat, 2015). Bazalne su membrane u osnovi ablumenalni 30–40 μm debeli slojevi molekula poput kolagena tipa IV, heparin sulfat proteoglikana, laminina, fibronektina i ostalih glikoproteina (Serlin, Shelef i Friedman, 2015), iako se razlikuju u nekim tipovima molekula.

Osim molekula bazalne membrane, otkrivene su molekule zaslužne za formiranje **čvrstih čvorova (eng. tight junctions)** između endotelnih stanica, te **transporteri** koji sudjeluju u prijenosu tvari između krvi i CNS. Endotelne stanice CNS su povezane čvrstim čvorovima/spojevima (TJs) koji onemogućavaju paracelularni prolaz iona i molekula iz krvi u CNS i obratno. TJs se formiraju interakcijom transmembranskih proteina, koji su također povezani sa citoskeletom vlastite stanice, na apikalnim stranama lateralnih dijelova ECs (Slika 14.). Istraživanja (Daneman i Prat, 2015) su pokazala da su TJs propusni za nenabijene molekule maksimalne veličine 4 nm, dok veće molekule ne propuštaju paracelularnim putem, što sugerira da TJs formiraju pore promjera otprilike 4 nm. Transmembranske molekule koje sudjeluju u formiranju TJs su kladini, okladini te JAMs (eng. *junctional adhesion molecules*) (Daneman i Prat, 2015). Kladini čine porodicu transmembranskih molekula čije četiri domene prolaze kroz staničnu membranu, a zaduženi su za formiranje paracelularnih membrana ili pora koje reguliraju propusnost TJs (Günzel i Yu, 2013). Okladin je protein sa također četiri transmembranske domene, ali njegova uloga ase više očituje u stabilizaciji TJs, a ne formiranju, kao što je to uloga kladina (Cummins, 2012). JAMs čine veliku imunoglobulinsku porodicu proteina koje, između ostalih, ekspimiraju i epitelne, tj. endotelne stanice kako bi omogućile međusobni kontakt sa susjednim stanicama, a posebno su ekspimirani u području TJs (Ebnet i dr., 2004).

Budući da su endotelne stanice specijalizirane za nepropuštanje nespecifičnih količina molekula kroz i između svojih membrana, postoje specijalizirani transportni sustavi koji uključuju dva tipa transportera: *efflux transporters* (ETs) i *nutrient transporters* (NTs). ETs koriste hidrolizu ATP-a za transport tvari u smjeru suprotnom od njihovog koncentracijskog gradijenta, dok NTs prenose tvari niz njihov koncentracijski gradijent (Daneman i Prat, 2015). Glukoza i aminokiseline ulaze i izlaze putem specifičnih nosača – *solute carriers*, smještenih na lumenalnoj ili ablumenalnoj strani membrane, ioni ulaze putem ionskih kanala i nosača, ali kontrolirano jer je njihova

4 Povezanost liposoma s krvno-moždanom barijerom

Postoji nekoliko različitih načina na koje je moguće premostiti krvno-moždanu barijeru s ciljem dostavljanja lijekova radi tretiranja bolesti CNS. Načini premošćivanja mogu se kategorizirati u tri velike grupe: invazivne metode, farmakološke metode i fiziološke metode (Vieira i Gamarra, 2016). Invazivne metode uključuju aplikaciju lijeka direktno u tkivo CNS tehnikama poput mikročipova, uvođenja katetera, prekidanja krvno-moždane barijere (Vieira i Gamarra, 2016). Invazivne metode sa sobom povlače nužnost hospitalizacije, ali i rizike poput oštećenja moždanog tkiva, toksičnost, infekcije itd. Sljedeća kategorija metoda su farmakološke metode koje uključuju medicinsko-biokemijske alternacije molekula kako bi one bile pogodnije za premošćivanje BBB. Primjer jednog od pokušaja alternacije lijeka jest sinteza malih, izrazito lipofilnih molekula koje bi mogle pasivno difundirati kroz sloj endotelne stanice, no time se gube sve prednosti koje bi lijek imao u polariziranoj formi (Vieira i Gamarra, 2016). Posljednji, ali i najnapredniji, tip metoda prijenosa velikih molekula preko BBB su fiziološke metode koje se temelje na principu iskorištavanja transcitoznog/endocitoznog potencijala endotelne stanice BBB ciljajući na specifične transportne receptore koje ECs ekspimiraju (Vieira i Gamarra, 2016). Međutim, nedovoljna koncentracija cirkulirajućeg terapeutika koja stigne do CNS, prijevremena razgradnja, nespecifično vezanje na druge receptore itd. su razlozi koji i fiziološke metode stavljaju u drugi plan.

Uz korak razvitku nanotehnologije, razvila se i grana nanomedicine u kojoj su znanstvenici pronašli rješenje za nedostatke koji se javljaju s prethodno navedenim metodama premošćivanja BBB. Od velike raznolikosti sintetiziranih nanočestica, liposomi obećavaju najveći potencijal za postizanje željenog cilja, a to je što efikasnija dostava lijeka sa što manje negativnih ishoda ili nuspojava. Liposomi se u medicini koriste u dvije svrhe – terapijskoj i dijagnostičkoj svrsi (Akbarzadeh i dr., 2013).

4.1 Terapeutska svrha

Inkapsulacija aktivnog oblika lijeka u liposom štiti molekulu od prijevremene enzimatske razgradnje ili imunološke i kemijske inaktivacije. Također, minimalizira se izlaganje lijeka zdravom tkivu pa je koncentracija tvari, koja dopiže do željenog tkiva, veća (Bozzuto i Molinari, 2015). Prema podacima (Nogueira i dr., 2015), do 2015. godine pokrenuto je više od 1500 kliničkih studija s liposomima kao temeljem istraživanja za primjenu liječenja ljudi.

Kada je riječ o liječenju neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove bolesti (AD) ili Parkinsonove bolesti (PD), liposomi potencijalno poboljšavaju ishode liječenja, više nego što ih ima sam terapeutik. AD je progresivno i ireverzibilno stanje demencije, tj. gubitka kognitivnih sposobnosti, koje dovodi do atrofije moždanog tkiva i neurodegeneracije, a najčešće pogađa ljude u šezdesetim godinama (NIA, 2017). Neuropatogeneza je utvrđeno da u moždanom tkivu osobe koja pati od AD dolazi do nakupljanja netopljivih agregata poput depozita β -amiloida i stvaranja neurofibrilarnih tračaka tau proteina u kori mozga i subkortikalnoj sivoj tvari (MSD, 2017). Također, neki podaci (Vieira i Gamarra, 2016) govore i o drugim mogućim uzrocima poput deficita u kolinergičkim neurotransmiterskim sustavima, povećane razine slobodnih radikala u CNS ili veće koncentracije proupalnih citokina. Povezano s nedostatkom kolinergičkih sustava ⁷, javlja se smanjena količina neurotransmitera acetilkolina, a time je onemogućena pravilna i brza komunikacija između neurona. Iz tog su razloga danas najkorišteniji tretmani za ublažavanje simptoma AD – acetilkolinesterazni inhibitori (Rees i Brimijoin, 2003). Inhibitori sprječavaju aktivnost enzima za razgradnju acetilkolina i time omogućavaju njegovu dovoljnu količinu, ali njihova je aktivnost

⁷Kolinergični sustav je mreža neurona koji koriste neurotransmiter acetilkolin u prenošenju akcijskog potencijala (Kreutzer, DeLuca i Caplan, 2011).

povezana i sa snažnim nuspojavama (Vieira i Gamarra, 2016). Istraživanja (Vieira i Gamarra, 2016) su pokazala da su acetilkolinesterazni inhibitori inkorporirani u liposome i aplicirani intranazalno pokazali znatno veću efikasnost u tretiranju nuspojava, nego slobodno cirkulirajuće molekule terapeutika.

Povezanost liposoma i BBB još je uvijek nedovoljno eksperimentalno usavršeno područje da bi se ta strategija koristila na širem spektru oboljelih, no postoje lijekovi poput onih protiv gljivičnih infekcija, tumora jajnika/dojki, sarkoma itd., koji se već dugi niz godina u primijenjuju u sastavu liposoma (Chang i Yeh, 2011).

4.2 Dijagnostička svrha

Liposomi su dobro poznati primarno kao sredstva za dostavljanje terapijski aktivnih molekula, no u njih je također moguće inkorporirati neinvazivna kontrastna sredstva koja služe u dijagnostičke svrhe. Primjerice, jedan od većih problema u terapiji glioma (tumora glija stanica) jest njegova detekcija u ranim fazama razvoja. Kod glioma, potencijalno najbolja meta za detekciju rastućeg tumorskog tkiva jest mjesto pojačane angiogeneze. Ovdje se još jednom ističe prednost velike biokemijske varijabilnosti liposoma s obzirom na njihovu mogućnost sadržavanja magnetskih, optički aktivnih i kemijski aktivnih tvari koje se lako detektiraju. Neke od modernih metoda detekcije su magnetska rezonancija (MRI), optičko snimanje, ultrazvuk i SPECT tomografija (eng. *single-proton-emission computed tomography*) (Vieira i Gamarra, 2016). Provedena su istraživanja (Vieira i Gamarra, 2016) u kojima su dizajnirani liposomi sadržavali specifične receptore za poznate molekule eksprimirane na angiogenetski aktivnim stanicama te je MRI tehnikom detekcije dobivena jasna linija tumorskih margina, a PET (eng. *positron emission tomography*) snimanjem struktura glioma.

Nanotehnologija daje mogućnost sinteze i multifunkcionanih, tzv. teragnostičkih (eng. *theragnostic*), liposoma koji imaju ujedinjenu terapijsku i dijagnostičku ulogu. Takvi liposomi sadrže različite molekule sposobne za vezivanje nanočestice na ciljano tkivo, biomarkere za detekciju lokacije izvana, inaktivne molekule koje reagiraju na vanjski podražaj te na taj način iniciraju ispuštanje terapeutika i sl. (Allen i Cullis, 2012). No, kako se kompleksnost nanočestica odmiče od osnovnog modela prema složenijem, povećava se rizičnost i težina izvedivosti, ali i cijena cijelog procesa.

5 Sažetak

Uz korak rapidnom razvijanju nanoindustrije u posljednjih nekoliko desetaka godina, trend mijenjanja perspektive na mikroskopsku razinu javlja se i u području medicine. Od njihovog otkrića u drugoj polovici prošlog stoljeća, nanočestice su pokazale izniman potencijal u poboljšanju metoda liječenja ljudskih bolesti. Javlja se varijetet nanočestica poput micela, biokompatibilnih polimera, mikročipova i sličnih, no poseban naglasak stavlja se na liposomalne nanočestice. Liposomi su sferične strukture veličine 50–450 nm sastavljene od jedne ili više koncentričnih fosfolipidnih membrana koje su organizirane tako da "glave" fosfolipida vanjskog sloja i "glave" fosfolipida unutarnjeg sloja dvosloja graniče s vodenim medijem. Upravo zbog ovakve orijentacije fosfolipida, liposomi imaju mogućost inkapsuliranja lipofilnih (unutar samog dvosloja) i hidrofilnih (unutar središnjeg vodenog medija) tvari. Metode pripreme liposoma nisu striktno ograničene pa je tako moguće prilagoditi osnovni model pripreme prema željenom ishodu, a to je dobivanje liposoma specifičnog dizajna koji će inkapsulirane tvari dostaviti do specifičnog tkiva. Dizajn liposoma može se razlikovati s obzirom na njihovu veličinu, lamelarnost (broj dvosloja u jednoj čestici), sastav tvari, koje čestici daju posebna svojstva poput naboja, u dvosloju itd. Ta se karakteristika počela promatrati sa velikim zanimanjem kada je riječ o neurodegenerativnim bolestima poput Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti, glioma i sl. U slučaju bolesti središnjeg živčanog sustava (CNS) najveći problem predstavlja krvno-moždana barijera koja je lokalizirana na čvrstoj vezi između endotelnih stanica moždanih kapilara i drugih stanica (pericita, astrocitnih nastavaka, neuronskih nastavaka) koje tvore dodatni čvrsti sloj oko njih. Rezultati dosadašnjih istraživanja sa liposomima kao terapijskim agensima, čija je zadaća dostavljanje terapeutika do specifičnog tkiva, i dijagnostičkim agensima, koji sadrže molekulske markere za detekciju stanja nekog tkiva, pokazali su se pozitivnom smjernicom za daljnji razvoj. Do danas se na tržištu nalazi velik broj lijekova koji koriste upravo liposome kao nanonosače, no za bolesti, čija je etimologija neurološke prirode, taj je stupanj tek potrebno dostići.

6 Summary

Following the steps of currently rapid development of nanotechnology, medicine has turned its perspective in the same way and that is the synthesis of nanoparticles which will improve our dealing with modern health issues. Since their discovery in the second half of the 20th century, nanoparticles have shown nothing but promising outcomes in solving diseases which humankind is coping with. There is a variety of available nanoparticles like micelles, biocompatible polymers, microchips etc., but the most optimistic and worth to mention ones are liposomal nanoparticles. Liposomes are spherical particles, which vary from 50 to 450 nm in size, and are composed of one or more concentric phospholipid bilayers. Bilayers are oriented in a way that the "heads" of outer and inner phospholipid molecules in a bilayer are in contact with aqueous medium. A formation of a bilayer like this provides liposomes to encapsulate both lipophilic and hydrophilic molecules in their membrane or aqueous core, respectively. Due to the great diversity of possible liposomal designs, methods of synthesis may vary from experiment to experiment. Liposomes can be designed differently by the criteria like size, lamellarity, types of molecules incorporated in their membranes etc. This interesting characteristic became popular in a field of developing therapeutics that are meant to ease the symptoms or even cure some of the neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease, Parkinson's disease, gliomas etc. When it comes to central nervous system (CNS) illnesses, there is a problem in overcoming the blood-brain barrier (BBB) which strictly regulates the transfer of molecules between blood and CNS. BBB is localized in the endothelial cells of brain capillaries and other types of cells (pericytes, astrocyte feet, neuronal feet) which form another protective layer over those capillaries. Results of current experiments showed that liposomes have a great future in being therapeutic (which are programmed to carry a therapeutic drug) and diagnostic (which carry biomarkers for external detecting) agents. Up until now, many liposomal drugs are being used in treating diseases, but the ones which will be specialized in overcoming the BBB have yet to reach this level.

7 Reference

- Ahmad, Mahmood i dr. (2013). „Comprehensive Review on Magnetic Drug Delivery Systems: A Novel Approach for Drug Targeting”. 2.
- Akbarzadeh, A i dr. (2013). „Liposome: classification, preparation and application”. *SpringerOpen Journal*.
- Akhtar, Nida et al. (2016). „Ethosomes as vesicles for effective transdermal delivery: From bench to clinical implementation”. *Current Clinical Pharmacology*.
- Allen, Therese M. i Pieter R. Cullis (2012). „Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications”. *Elsevier*.
- Bangham, A. D., M. M. Standish i Watkins J. C. (1965). „Diffusion of Univalent Ions across the Lamellae of Swollen Phospholipids”. *Journal of Molecular Biology*.
- Bangham, A.D. i R.W. Horne (1964). „Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope”. *Journal of Molecular Biology*.
- Boundless.com (2017). *Phospholipids*. URL: <https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/biological-macromolecules-3/lipids-55/phospholipids-300-11433/>.
- Bozzuto, Giuseppina i Agnese Molinari (2015). „Liposomes as nanomedical devices”. *International Journal of Nanomedicine*.
- Brain Disorders: By the Numbers* (2014). URL: <https://mcgovern.mit.edu/brain-disorders/by-the-numbers>.
- Chang, Hsin-I i Ming-Kung Yeh (2011). „Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy”. *International Journal of Nanomedicine*.
- Cummins, Philip M. (2012). „Occludin: One Protein, Many Forms”. *Molecular and Cellular Biology*.
- Daneman, Richard i Alexandre Prat (2015). „The Blood-Brain Barrier”. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Deamer, David W. (2010). „From “Banghasomes” to liposomes: A memoir of Alec Bangham, 1921–2010”. *The FASEB Journal*.
- Ebnet, K i dr. (2004). „Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions?”: *Journal of Cell Science*.
- Feynman, Richard P. (1960). „There’s Plenty of Room at the Bottom”. *Engineering and Science*.
- Günzel, Dorothee i Alan S. L. Yu (2013). „Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability”. *Physiological reviews*.
- Haub, Carl (2011). *World Population Aging: Clocks Illustrate Growth in Population Under Age 5 and Over Age 65*. URL: <http://www.prb.org/Publications/Articles/2011/agingpopulationclocks.aspx>.
- Huang, Shao-Ling, David D McPherson i Robert C. MacDonald (2013). „A Method to Co-encapsulate Gas and Drugs in Liposomes for Ultrasound-Controlled Drug Delivery”. *Ultrasound in Medicine and Biology*.
- Institute, National Cancer (2017). URL: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=46066>.
- integratedhealth.com (2017). URL: <http://www.integratedhealth.com/supplements/liposomes.html>.
- Joan Abbott, N (2013). „Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery”. *Journal of Inherited Metabolic Disease*.
- Kono, K i dr. (2010). „Highly temperature-sensitive liposomes based on a thermosensitive block copolymer for tumor-specific chemotherapy”. *Biomaterials*.
- Kooijmans, Sander AA i dr. (2012). „Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems”. *International Journal of Nanomedicine*.
- Kreutzer, Jeffrey S., John DeLuca i Bruce Caplan (2011). *Encyclopedia of Clinical Neuropsychology*. Springer.

- Krukemeyer, MG i dr. (2015). „History and Possible Uses of Nanomedicine Based on Nanoparticles and Nanotechnological Progress”. *Nanomedicine & Nanotechnology*.
- Madni, Asadullah i dr. (2014). „Liposomal Drug Delivery: A Versatile Platform for Challenging Clinical Applications”. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*.
- Merriam-Webster (2017a). *angiogenesis*. URL: <https://www.merriam-webster.com/dictionary/angiogenesis>.
- (2017b). *dialysis*. URL: <https://www.merriam-webster.com/dictionary/dialysis>.
- (2017c). *liposome*. URL: <https://www.merriam-webster.com/dictionary/liposome>.
- MSD (2017). *Alzheimerova bolest*. URL: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/neurologija/delirij-i-demencija/alzheimerova-bolest>.
- NIA, National Institute of Aging (2017). *Alzheimer’s Disease Fact Sheet*. URL: <https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-fact-sheet>.
- Nogueira, E i dr. (2015). „Design of liposomal formulations for cell targeting”. *Elsevier*.
- Patil, Yogita P. i Sameer Jadhav (2013). „Novel methods of liposome preparation”. *Elsevier*.
- Prasad, Paras N. (1994). *Frontiers of Polymers and Advanced Materials*. first. Springer US.
- Rees, TM i S Brimijoin (2003). „The role of acetylcholinesterase in the pathogenesis of Alzheimer’s disease.” *Drugs Today*.
- Reese, T.S. i Morris J. Karnovsky (1967). „Fine structural localisation of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase”. *The Journal of Cell Biology*.
- Serlin, Yonatan, Boris Shelef Ilan Knyazer i Alon Friedman (2015). „Anatomy and Physiology of the Blood-Brain Barrier”. *Seminars in Cell and Developmental Biology*.
- Tajes, Marta i dr. (2014). „The blood-brain barrier: Structure, function and therapeutic approaches to cross it”. *Molecular Membrane Biology*.
- Trevisan, Julia i dr. (2011). „Technological Aspects of Scalable Processes for the Production of Functional Liposomes for Gene Therapy”.
- Vieira, Débora B i Lionel F Gamarra (2016). „Getting into the brain: liposome-based strategies for effective drug delivery across the blood-brain barrier”. *International Journal of Nanomedicine*.
- Vitor, Micaela Tamara, Caroline Casagrande Sipoli i Lucimara Gaziola De La Torre (2015). „Droplet-based Microfluidic Systems for Production and Transfection In Vitro of Non-Viral Vectors for Gene Delivery”. *Research & Reviews in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*.
- Wikipedia (2017). URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Ether_lipid.
- Zhu, Guizhi, Lei Mei i Weihong Tan (2014). „Nanomedicine”. *The Scientist*.
- Žarković, Neven (2017). URL: <http://www.irb.hr/Istrazivanje/Zavodi/Zavod-za-molekularnu-medicinu/Laboratorij-za-oksidacijski-stres>.