

# Priprava i karakterizacija propilenglikol liposoma s azitromicinom

---

Milić, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:319268>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-06**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Tea Milić**

**Priprava i karakterizacija propilenglikol  
liposoma s azitromicinom**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Oblikovanje lijekova, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju, pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Željke Vanić.

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Liposomi.....	1
1.1.1. Struktura i svojstva liposoma.....	1
1.1.2. Klasifikacija liposoma.....	2
1.2. Priprema liposoma.....	2
1.2.1. Metoda hidratacije suhog fosfolipidnog filma.....	3
1.2.2. Ekstruzija liposoma.....	4
1.2.3. Fizikalna svojstva liposoma.....	5
1.3. Dermalna primjena lijekova.....	7
1.3.1. Propilenglikol (PG liposomi).....	8
1.4. <i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja lijeka.....	9
1.5. Azitromicin.....	11
2. Obrazloženje teme.....	13
3. Materijali i metode.....	14
3.1. Materijali.....	14
3.2. Metode.....	15
3.2.1. Priprema liposoma.....	15
3.2.2. Određivanje veličine liposoma.....	16
3.2.3. Određivanje zeta potencijala liposoma.....	16
3.2.4. Ispitivanje <i>in vitro</i> oslobađanja azitromicina iz liposoma.....	16
3.2.5. Određivanje sadržaja azitromicina.....	17
3.2.5.1. Izrada kalibracijskog pravca.....	18
3.2.5.2. Određivanje sadržaja azitromicina u liposomskim formulacijama.....	19

3.2.5.3. Određivanje sadržaja azitromicina oslobođenog iz liposomskih formulacija.....	20
3.2.5.4. Statistička obrada podataka.....	20
4. Rezultati i rasprava.....	21
4.1. Fizikalne karakteristike liposoma.....	21
4.1.1. Veličina i polidisperznost liposoma.....	21
4.1.2. Zeta potencijal liposoma.....	23
4.2. In vitro oslobađanje lijeka iz propilenglikol (PG) i konvencionalnih liposoma.....	24
5. Zaključci.....	30
6. Literatura.....	31
7. Sažetak.....	33
SUMMARY.....	34

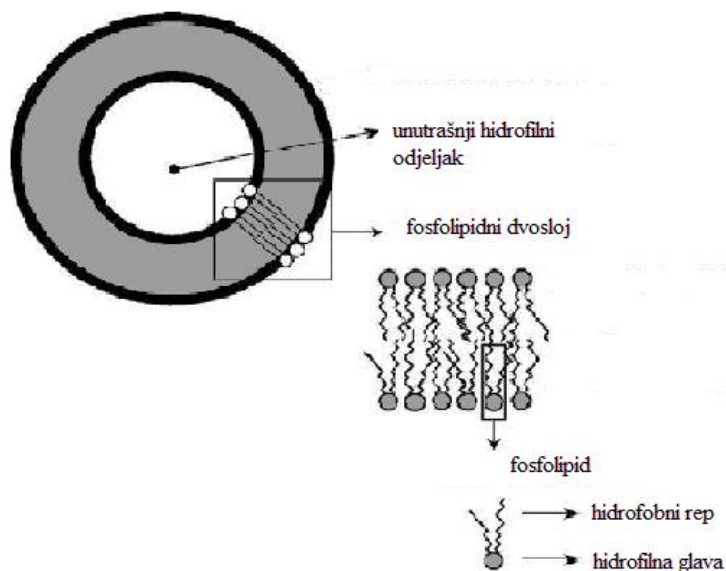
# 1. UVOD

## 1.1. LIPOSOMI

### 1.1.1. Struktura i svojstva liposoma

Liposomi su sferične vezikule nanometarskih dimenzija građene od jednog ili više fosfolipidnih dvoslojeva koji obavijaju jednu ili više unutarnjih vodenih faza. Fosfolipidi su amfipatske molekule cilindričnog oblika građene od hidrofilnih „glava“ i hidrofobnih „repova“ (lanci masnih kiselina). Hidrofobni, nepolarni dijelovi molekula fosfolipida usmjereni su prema unutrašnjoj, dok su polarne glave fosfolipida orijentirane prema vanjskoj strani sferične lamelarne strukture (Vanić, 2012a).

Strukturalna svojstva liposoma omogućuju uklapanje lijekova različitih fizičko-kemijskih svojstava, kao i makromolekula poput proteina. Ako je u sustavu prisutna lijekovita tvar, ona je ovisno o polarosti, smještena bilo u vodenoj fazi ili u nepolarnom dijelu ovojnice. Hidrofilne i lipofilne supstancije ugrađuju se u liposome bez njihova kemijskog vezanja ili prethodne kemijske modifikacije, a uz postizanje relativno velikog omjera lijek-lipidi (Jalšenjak i sur., 1998).



## Slika 1. Struktura liposoma (www.intechopen.com)

Zbog svoje sličnosti s biološkim membranama, neimunogenosti i biorazgradljivosti, u potpunosti su fiziološki prihvatljivi što im osigurava primjenu u različitim terapijskim područjima: infektivna oboljenja (virusna, bakterijska, gljivična, parazitska), dijagnostika, hormonska terapija, onkologija, stimulacija imunološkog odgovora, vakcinacija (Vanić, 2012a).

### 1.1.2. Klasifikacija liposoma

Liposomi se mogu klasificirati prema veličini i broju fosfolipidnih dvoslojeva te prema strukturnim svojstvima i načinu oslobađanja uklopljenog sadržaja. Prema veličini i broju fosfolipidnih dvoslojeva, razlikuju se skupine unilamelarnih, multilamelarnih, oligolamelarnih i multivezikularnih liposoma.

Unilamelarni liposomi (*unilamellar vesicles*, UV) sadrže jednu fosfolipidnu ovojnica, a prema veličini se dijele na male unilamelarne liposome (*small unilamellar vesicles*, SUV), promjera 20–100 nm, srednje-velike unilamelarne liposome (*medium sized unilamellar vesicles*, MUV) promjera većeg od 100 nm, velike unilamelarne liposome (*large unilamellar vesicles*, LUV) promjera 100–1000 nm te veoma velike unilamelarne liposome (*giant unilamellar vesicles*, GUV) promjera većeg od 1000 nm (Vanić, 2012a).

## 1.2. PRIPREMA LIPOSOMA

Za pripremu liposoma najčešće se koriste biorazgradljivi i kompatibilni fosfolipidi i sfingolipidi, kao što su fosfatidilkolin, fosfatidilserin, fosfatidilglicerol i sfingomijelin (www.intechopen.com).

Gotovo sve metode pripreme liposoma uključuju tri ili četiri osnovne faze, a to su: uklanjanje organskog otapala u kojem su fosfolipidi otopljeni, dispergiranje fosfolipida u vodenom mediju, homogenizaciju nastale liposomske suspenzije i analizu konačnog produkta. Također, za sve postupke pripreme liposoma vrijedi pravilo da se lipofilni lijekovi dodaju zajedno s fosfolipidima otopljenima u organskom otapalu, dok se hidrofilni dodaju otopljeni u vodenoj fazi.

Iako postoje različite metode pripreme liposoma kao što su metoda smrzavanja-taljenja, postupci dvofaznog dispergiranja fosfolipida, uparavanje U/V emulzija, metoda pripreme

višestrukih emulzija, solubilizacija fosfolipida, metoda dehidracije-rehidracije, metoda hidracije suhog fosfolipidnog sloja, tzv. film metoda najčešći je postupak pripreme liposoma u laboratorijskim uvjetima (Vanić, 2012b).

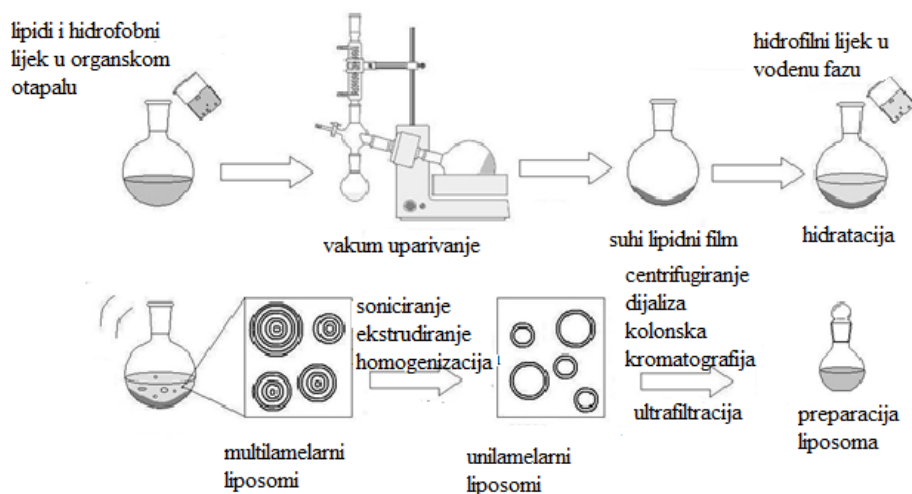
### **1.2.1. Metoda hidracije suhog fosfolipidnog filma**

Metoda hidracije suhog fosfolipidnog sloja, tzv. film metoda najčešći je postupak pripreme liposoma u laboratorijskim uvjetima. Temelji se na pripremi tankog fosfolipidnog sloja te dodatku vodenog medija uz snažno protresivanje. Postupak se provodi u okruglim tikvicama većeg volumena, da bi nakon otparavanja organskog otapala, na stijenkama tikvice nastao suhi fosfolipidni film velike površine. Dodatkom vodenog medija dolazi do hidracije fosfolipida i spontanog formiranja liposoma (Vanić, 2012b). Vrijeme hidracije razlikuje se prema vrsti korištenih fosfolipida. Potpuna hidracija postiže se ostavljanjem hidratiziranog filma tijekom 12 sati. Prikladni hidracijski mediji su destilirana voda, fiziološka otopina te različiti puferi neutralnog pH (Dua i sur., 2012).

Produkt hidracije su velike multilamelarne vezikule u kojima su lipidni dvosloji odvojeni vodenim slojevima. Ako se za pripremu liposoma koriste samo neutralni fosfolipidi (fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin) dobivaju se vezikule sa malim vodenim odjeljcima, no ako se dodaju nabijeni fosfolipidi (fosfatidilglicerol, fosfatidilserin, fosfatidilinozitol, fosfatidna kiselina), zbog odbojnih interakcija, povećavaju se unutarnji vodeni prostori, što olakšava uklapanje hidrofilnih lijekova.

Pozornost valja obratiti na temperaturu koja tijekom pripreme liposoma mora biti iznad temperature faznog prijelaza ( $T_c$ ) korištenih fosfolipida. Temperatura faznog prijelaza ( $T_c$ ) lipida je temperatura na kojoj se odvija prijelaz iz gel faze u fazu tekućih kristala. Poznavanje  $T_c$  i s tim u vezi fluidnosti membrane važno je pri proizvodnji i istraživanju terapijskih sustava zasnovanih na liposomima. Naime, fluidnost ili rigidnost membrane utječe na svojstva liposoma kao što su permeabilnost, fuzija, agregacija, vezanje za proteine plazme. Svi ti parametri utječu na stabilnost liposoma i njihovo ponašanje u biološkim fluidima (Vanić, 2012b).





Slika 2. Metoda hidratacije suhog fosfolipidnog filma, tzv. film metoda  
([www.intechopen.com](http://www.intechopen.com))

### 1.2.2. Ekstruzija liposoma

Pojam ekstruzija liposoma označava proces u kojem se multilamelarni liposomi protiskuju kroz filtere određenih veličina pora kako bi se dobili maleni unilameralni liposomi ujednačene (slične) veličine. Ekstruzija je jedna od najčešće korištenih metoda za dobivanje liposoma određene veličine jer se može koristiti za razne tipove lipidnih vezikula, kratko je vrijeme provedbe postupka, ne koriste se organska otapala i detergensi te je moguće dobiti homogenu populaciju unilamelarnih vezikula.

Kao i kod svih postupaka smanjenja veličine liposoma, važno je postupak provoditi na temperaturi iznad temperature faznog prijelaza ( $T_c$ ) korištenih fosfolipida. U suprotnom vezikule ne bi mogle proći kroz pore filtera zbog rigidnosti membrane.

Postupak se sastoji od višestrukog protiskivanja suspenzije liposoma kroz polikarbonatne filtere definirane veličine pora pri čemu dolazi do homogenizacije liposoma. Prije protiskivanja kroz konačnu, željenu veličinu pora suspenzija multilamelarnih liposoma se prefiltrira kroz filter većeg promjera pora. Na taj način se olakšava postupak homogenizacije, sprječava oštećenje filtera i gubitak lipida ([www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com)).

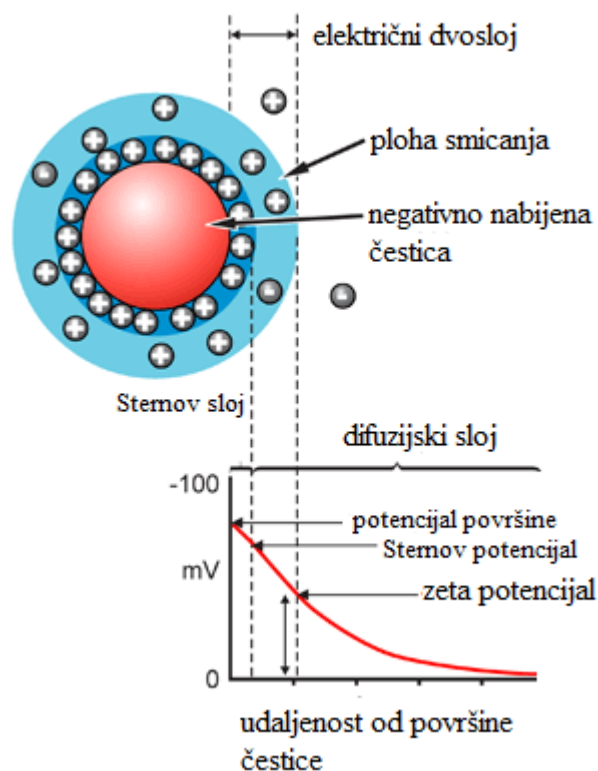
### 1.2.3. Fizikalna svojstva liposoma

Fizikalna karakterizacija liposoma od velike je važnosti za predviđanje mogućih interakcija sa stanicama nakon *in vivo* primjene i stabilnosti formulacije. Osnovni parametri koji se procjenjuju su veličina čestica (srednji promjer), indeks polidisperznosti i zeta potencijal.

Interakcija liposoma sa stanicama na mjestu djelovanja uvelike je određeno veličinom liposoma. Smatra se da liposomi srednjeg promjera oko 120 nm omogućuju bolju dopremu lijeka do dermisa dok se liposomi većeg srednjeg promjera nakupljaju u rožnatom sloju i gornjim slojevima epidermisa. Istraživanja pokazuju da i liposomi manjeg srednjeg promjera (<100 nm) ne omogućuju dostatnu koncentraciju lijeka u dubljim slojevima kože što ukazuje na moguću teoriju da liposomi ne prolaze intaktni kroz slojeve kože (Plessis i sur., 1994; Verma i sur., 2003).

Veličina čestica mjeri se pomoću dinamičkog raspršenja svjetlosti (*dynamic light scattering*, DLS). Ova tehnika mjeri vremenski ovisne promjene u intenzitetu rasipanja svjetlosti koje se javljaju zbog Brownovog gibanja čestica (kaotično gibanje čestica malih dimenzija koje često mijenjaju smjer zbog sudaranja s česticama fluida). Analiza tih promjena intenziteta omogućuje određivanje koeficijenata difuzije čestica koji se onda pretvore u raspodjelu veličine čestica ([www.malvern.com](http://www.malvern.com)).

Na površini čestice možemo razlikovati dva područja, prvo područje nalazi se uz samu površinu čestice i obuhvaća ione vezane na površinu. U drugom području, koje nazivamo difuzni sloj, nalaze se difuzno raspršeni ioni suprotnog naboja od naboja površine. Unutar difuznog sloja nalazi se elektrokinetička ili zeta ploha koja predstavlja granicu zamišljenog pokretnog i stacionarnog dijela difuznog sloja, a karakterizirana je elektrokinetičkim ili zeta potencijalom ( $\zeta$ ). Navedena područja zajedno čine električni dvosloj. Dvostruki električni sloj može se predočiti kao električni kondenzator od dviju suprotno nabijenih površina. Na slici 3. shematski je prikazana promjena potencijala u sloju ovisno o udaljenosti od površine čestice. Potencijal na površini čestice je maksimalan, potom naglo opada (Sternov sloj), a zatim eksponencijalno (Gouy-Chapmanov sloj) (Pilepić, 2007).



Slika 3. Shematski prikaz zeta-potencijala (www.nanocomposix.eu)

Poznavanje zeta potencijala liposoma može pomoći predvidjeti sudbinu liposoma u *in vivo* uvjetima, ali i stabilnost formulacije tijekom uskladištenja. Ako sve čestice u uzorku imaju veliki negativni ili pozitivni zeta-potencijal, onda će težiti međusobnom odbijanju i neće biti tendencije agregacije čestica. Međutim, ako čestice imaju niske vrijednosti zeta-potencijala onda neće biti sile koja bi spriječila spajanje čestica i flokulaciju. Općenito, čestice s zeta-potencijalom pozitivnijim od +30 mV ili negativnijim od -30 mV obično se smatraju stabilnima (Laouini i sur., 2012).

### 1.3. DERMALNA PRIMJENA LIJEKOVA

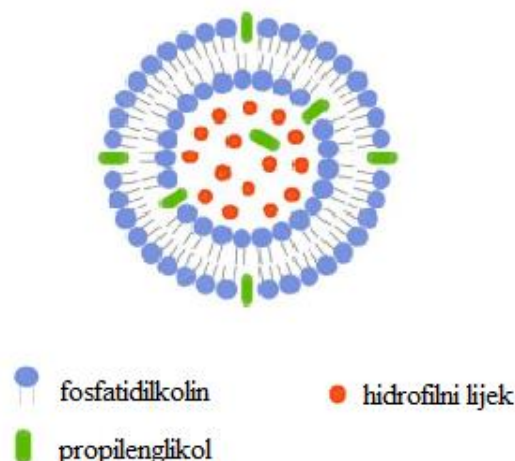
Većina lijekova primjenjuje se na kožu radi postizanja lokalnog terapijskog učinka. Takvom dermalnom primjenom mogu se osigurati dostatno visoke koncentracije lijeka u koži i pritom smanjiti njegova razina u sistemskoj cirkulaciji, čime se izbjegavaju neželjene nuspojave (Banović i sur., 2010).

No, rožnati sloj kože, kojeg čine odumrle stanice keratinocita okružene visokoorganiziranim lipidnim matriksom, odgovoran je za nisku permeabilnost većine lijekova. Ljekovite tvari koje se primjenjuju na kožu moraju proći rožnati sloj do ciljnih stanica u dublje slojeve epidermisa i dermisa. Parametri koji utječu na isporuku lokalno primijenjenih lijekova uključuju veličinu molekule, lipofilnost, vrstu formulacije, prisustvo promotora penetracije i fizičko stanje rožnatog sloja kože (Vanić, 2015).

Kako bi se omogućila penetracija ljekovite tvari kroz kožu mogu se koristiti kemijski promotori penetracije, primjerice sulfoksidi poput dimetilsulfoksida (DMSO), pirolidoni (2-pirolidon), alkoholi (etanol, propilenglikol), površinski aktivne tvari, terpeni, urea i masne kiseline (oleinska kiselina) ili fizikalne metode kao što su ionoforeza, sonoforeza, elektroporacija i mikro igle. Drugi pristup temelji se na upotrebi terapijskih nanočestica koje mogu povećati penetraciju hidrofilnih lijekova kroz kožu i omogućiti kontrolirano oslobađanje lipofilnih lijekova na mjestu djelovanja (Escobar-Chávez i sur., 2012; Vanić, 2015). Među nanočesticama posebno mjesto zauzimaju lipidne vezikule poput klasičnih (konvencionalnih) liposoma (opisani u *poglavlju 1.1.1.*), deformabilnih liposoma, etosoma i propilenglikol liposoma (PG liposoma). Deformabilni liposomi lipidne su elastične vezikule čija je membrana građena od fosfolipida i surfaktanta. Optimalnim omjerom fosfolipida i surfaktanta postižu se željena elastična svojstva vezikula. Brojna su istraživanja potvrdila sposobnost prolaska deformabilnih liposoma s uklopljenim ljekovitim tvarima u dublje slojeve kože, pri čemu se učinak mogao uspoređivati sa subkutanom primjenom. Etosomi su novija generacija lipidnih vezikula sastavljenih od fosfolipida, vode i etanola, a upravo etanol daje posebna svojstva tim vezikulima. U kontaktu s lipidima, etanol smanjuje temperaturu faznoga prijelaza lipida te tako povećava njihovu fluidnost, što u konačnosti rezultira porastom propusnosti rožnatoga sloja kože. Osim toga, etanol ima učinak i na etosome tako da povećava fleksibilnost ovojnice (Banović i sur., 2010).

### 1.3.1. Propilenglikol liposomi (PG liposomi)

Propilenglikol liposomi (PG liposomi) noviji su tip fosfolipidnih vezikula predloženi od Elsayed i sur. koji omogućuju efikasniju isporuku ljekovitih tvari u kožu. Sastoje se od fosfolipida, propilenglikola i vode, a karakterizira ih visoka sposobnost uklapanja ljekovite tvari. Poboljšana isporuka ljekovite tvari PG liposomima posljedica je zajedničkog djelovanja promotora penetracije, fosfolipida i propilenglikola. Propilenglikol, poznat kao suotapalo i humektans, ima značajnu ulogu jer povećava topljivost uklopljene ljekovite tvari. Prisutnost propilenglikola ili drugih promotora penetracije u fosfolipidnom dvosloju značajno povećava elastičnost liposoma. PG liposomi mogu se pripremiti korištenjem propilenglikola kao otapala za fosfolipide i lipofilni lijek ili kao dio vodene faze formulacije. Preliminarne *in vivo* studije na životinjskim modelima kože pokazuju da su PG liposomi omogućili bolju penetraciju lokalnog anestetika cinhokaina u odnosu na deformabilne liposome i etosome (Vanić, 2015). U drugom istraživanju ispitivani su PG liposoma za transdermalnu primjenu kurkumina kao protuupalnog sredstva. Usporedbom PG liposoma sa drugim elastičnim vezikulama pokazalo se da je uklapanje kurkumina bilo najveće u PG liposomima (>90%) (Elsayed i sur., 2007). Također, istraživanje koje su proveli Elmoslemany i suradnici s PG liposomima s uklopljenim mikanozol nitratom u svrhu liječenja gljivične infekcije kože, pokazalo je da PG liposomi imaju veću antifungalnu aktivnost, stabilnost i sposobnost uklapanja ljekovite tvari u usporedbi sa konvencionalnim (klasičnim) liposomima (Elmoslemany i sur., 2012).

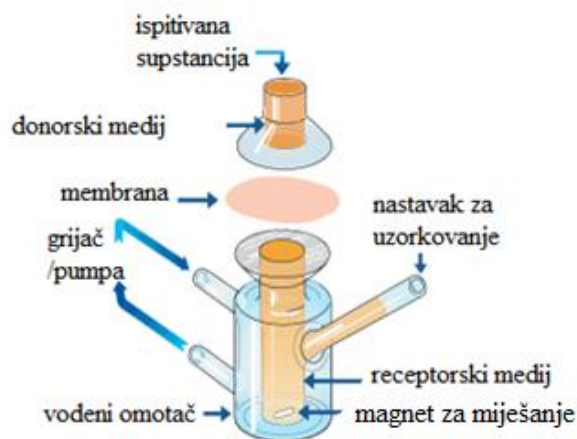


Slika 4. Struktura propilenglikol liposoma (Vanić, 2015).

#### 1.4. IN VITRO ISPITIVANJE OSLOBAĐANJA LIJEKA

Upotreba *in vitro* difuzijskih ćelija najčešća je primjenjivana metoda za ispitivanje permeabilnosti lijeka iz određenih formulacija preko kože i sluznica, ali se veoma često koristi i za ispitivanje oslobađanja lijeka. Posredno može pružiti uvid u odnose između kože, lijeka i formulacije. Takvo testiranje je vrlo korisno, ne samo za dizajn i razvoj novih formulacija, već i za procjenu toksičnosti i kvalitete supstancija.

Franz difuzijska ćelija (Slika 5.) sastoji se od donorskog i akceptorskog (receptorskog) odjeljka točno određenog volumena s odjeljkom za uzorkovanje. Međusobno su akceptorski i donorski odjeljak povezani membranom na koju se nanosi ispitivani uzorak formulacije. Sustav zahtjeva kontroliranu temperaturu uz stalno miješanje. Receptorski medij se obično zagrijava na temperaturu 37 °C kako bi se održala temperatura 32 °C na površini membrane gdje se nanosi uzorak. Naime, temperatura na površini kože je 32 °C pa se na taj način pokušavaju oponašati *in vivo* uvjeti.



Slika 5. Dijelovi Franz difuzijske ćelije (www.permegear.com)

Za ispitivanja *in vitro* oslobađanja lijeka koriste se polimerne membrane, najčešće sintetičke membrane od polisulfona te membrane iz miješanih estera celuloznog acetata i nitrata (www.permegear.com).

Prilikom izbora receptorskog medija uzima se onaj koji prema svojstvima odgovara ispitivanoj supstanciji, primjerice vodeni pufer za hidrofilne supstancije ili vodeno-alkoholni medij za slabo hidrofobne supstancije.

Dakle, prvi zadatak u razvoju metode je mjerenje topljivosti ispitivane supstancije u nekoliko otapala u rasponu od vodene otopine kao što je fosfatni pufer do vodeno-alkoholne otopine u omjeru 50:50 (v/v). Namjera je da se identificiraju otapala koja će pružiti uvjete osigurane topljivosti. Uvjeti osigurane topljivosti se uspostavljaju ako receptorski medij ima relativno visoku sposobnost da "oslobodi" lijek, tj. da omogući njegovu topljivost ([www.particlesciences.com](http://www.particlesciences.com)).

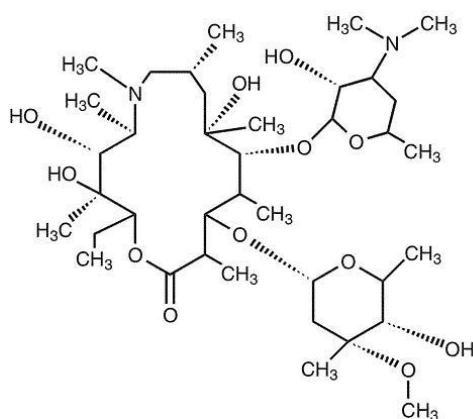
Topljivost je svojstvo otopljene tvari koje je definirano koncentracijom otopljene tvari u zasićenoj otopini pri određenoj temperaturi. Prema Europskoj farmakopeji uvjeti osigurane topljivosti uspostavljaju se kada je volumen medija u kojem se odvija otapanje supstancije tri puta razrijeđeniji od zasićene otopine te supstancije.

U *in vitro* ispitivanjima otapanja uvjeti za sigurnu topljivost postižu se podešavanjem volumena medija (Jalšenjak i sur., 1998). Prema tome, ako se koristi supstancija visoke permeabilnosti, uz veliki volumen receptorskog medija, lako će doći do difuzije supstancije u receptorski medij. To znači da postoji uvjet osigurane topljivosti. Ukoliko se koristi supstancija visoke permeabilnosti i mali volumen receptorskog medija doći će do nakupljanja supstancije u receptorskom mediju što će smanjiti koncentracijski gradijent i usporiti protok supstancije (nema uvjeta osigurane topljivosti). Također, primjenom supstancije niske permeabilnosti može biti otežana detekcija te supstancije u velikom volumenu receptorskog medija ([www.permeagear.com](http://www.permeagear.com)).

Učestalost i način uzorkovanja određeno je ciljevima eksperimenta. Ako nije poznata propusnost membrane za određeni spoj, u početku je poželjno uzimati male uzorke tijekom dugog vremenskog razdoblja te tako odrediti permeabilnost. Ako je potrebno odrediti ukupnu količinu ljekovite tvari koja prijeđe membranu u određenom vremenskom razdoblju, može se uzeti manje uzoraka u duljim vremenskim razmacima. Najbolje je učiniti nekoliko ponavljanja s istim uzorkom kako bi se dobili pouzdaniji rezultati ([www.permeagear.com](http://www.permeagear.com)).

## 1.5. AZITROMICIN

Kemijsko ime azitromicina je 9-deoksi-9a-aza-9a-metil-9a homoeritromicin A. Azitromicin je bijeli, amorfni prašak, bez mirisa, gorka okusa. Vrlo je dobro topljiv u metanolu i kloroformu, a slabo topljiv u vodi. Talište mu je između 118 i 122 °C, a molekularna masa 749,0 (Zorc i Butula, 1995).



Slika 6. Struktura azitromicina (www.theodora.com)

Azitromicin je antibiotik iz skupine makrolida. Slično ostalim makrolidima, azitromicin inhibira sintezu proteina, vezanjem na 50S podjedinicu ribosoma. Djeluje na većinu gram-pozitivnih i neke gram-negativne bakterije te anaerobne mikroorganizme (Vrhovac, 2007).

Indiciran je za infekcije gornjih dišnih putova (faringitis, tonzilitis, sinusitis, otitis media), te infekcije donjih dišnih putova (akutna egzacerbacija kroničnog bronhitisa, izvanbolnički stečena pneumonija), infekcije kože i potkožnog tkiva (umjereni oblik *acne vulgaris*, *erythema migrans* (prvi stadij lajmske bolesti), erizipel, impetigo i piodermija), spolno prenosivih bolesti (nekomplikirani uretritis, cervicitis uzrokovan bakterijom *Chlamydia trachomatis*), infekcije želuca i dvanaesnika uzrokovane s *Helicobacter pylori*, te kronični prostatitis uzrokovan bakterijom *Chlamydia trachomatis* (www.almp.com).

Zbog svojih farmakokinetičkih karakteristika azitromicin je različit od ostalih antimikrobnih lijekova. Farmakokinetiku azitromicina karakterizira niska koncentracija u plazmi i visoka i trajna koncentracija u tkivima. Azitromicin se dobro raspodjeljuje u tkiva. Postiže visoke koncentracije intracelularno. Koncentracija u stanici raste kako raste kiselost



pa je maksimalna koncentracija azitromicina u lizosomima. Klinički je važno da azitromicin postiže visoke koncentracije u obligatnim ili fakultativnim fagocitima koji su od velikog značenja u liječenju bakterijskih infekcija, osobito onih izazvanih intracelularnim uzročnicima. Za razliku od ostalih makrolida azitromicin ne stimulira niti inhibira mikrosomski sustav jetre pa ne stupa u interakcije karakteristične za makrolide. Poznato je deset metabolita azitromicina koji nastaju uglavnom N-demetilacijom i O-demetilacijom te hidrolizom. Niti jedan od metabolita nije aktivan, tj. nema antibakterijski učinak (Francetić, 2008).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Posljednjih se desetljeća velika pozornost posvećuje razvoju novih terapijskih sustava temeljenih na nanočesticama, kojima bi se nadvladali nedostaci postojećih klasičnih sustava. Primjenom novih terapijskih sustava i usmjeravanjem lijeka na željeno mjesto djelovanja (lokalno) mogu se smanjiti nuspojave, izbjeći sistemska apsorpcija, povećati bioraspoloživost lijekova te omogućiti bolju kontrolu terapije. Među njima posebno mjesto zauzimaju liposomi koji svojim specifičnim sastavom i svojstvima olakšavaju transport uklopljene ljekovite tvari.

Za mnoga kožna oboljenja prioritet je omogućiti visoku koncentraciju lijeka u dubljim slojevima kože, ali izbjeći transdermalni prijenos lijeka u sistemska cirkulaciju. Na taj način smanjuje se mogućnost nuspojava lijeka te njegova akumulacija u organizmu. Istraživanja su pokazala da konvencionalni (klasični) liposomi ne prodiru u dublje slojeve kože, već se zadržavaju u površinskom, rožnatom sloju. Zbog toga se posljednjih godina intenzivno razvijaju nove klase lipidnih vezikula poput deformabilnih (elastičnih) liposoma, etosoma i propilenglikol (PG) liposoma koji značajno olakšavaju transport uklopljene ljekovite tvari u dublje slojeve kože.

U ovom radu prikazana je optimizacija PG liposoma s azitromicinom. Naime, azitromicin je na tržištu zastupljen u obliku tableta, kapsula i sirupa za oralnu primjenu te otopina za parenteralnu primjenu. Zbog mogućih nuspojava i toksičnosti koje su posljedica sistemske primjene, razvoj prikladnog oblika azitromicina za dermalnu primjenu bio bi od velikog značaja. Priređeni su liposomi s 10, 20 i 30 % propilenglikola film metodom i ekstruzijom, te je provedena fizikalna karakterizacija koja je uključivala određivanje srednjeg promjera, razdiobe veličina liposoma i zeta potencijala. Za kontrolu su poslužili konvencionalni liposomi (priređeni iz istog fosfolipida, ali bez dodatka PG). Ispitivanje oslobađanja lijeka iz različitih PG liposoma provedeno je korištenjem Franz difuzijske ćelije.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 MATERIJALI

Korištene supstancije, otapala i pufer su bili:

- Sojin fosfatidilkolin (Lipoid S75) – (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Njemačka),
- Azitromicin (Mr 749,0) (Pliva, Zagreb, Hrvatska),
- Etanol, metanol i propilenglikol (PG) (Kemika, Zagreb, Hrvatska),
- Acetonitril (Avantor Performance Materials, Nizozemska),
- Fosfatni pufer - pripremljen otapanjem  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,36 g) u 1000 mL destilirane vode i podešavanjem pH na pH 7,5 dodatkom otopine 10 M KOH.

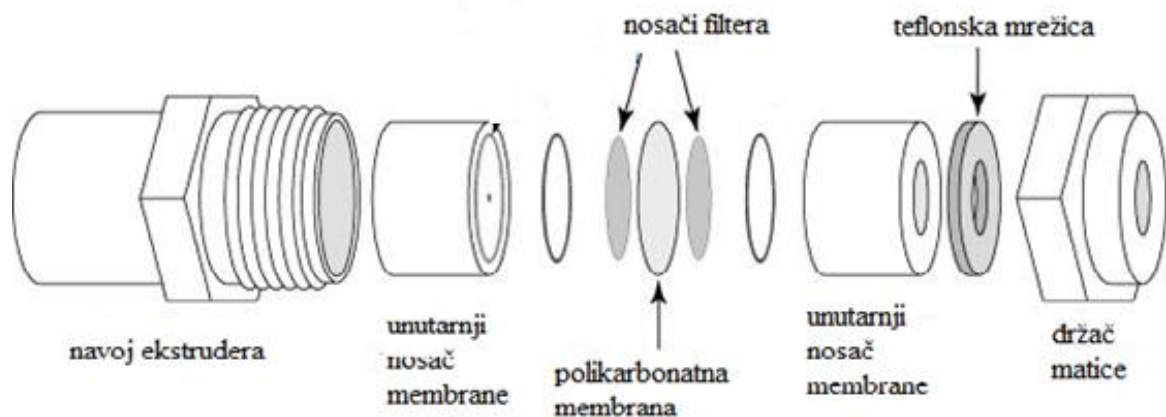
## 3.2. METODE

### 3.2.1. Priprema liposoma

Propilenglikol liposomi (PG-liposomi) s uklopljenim azitromicinom pripremljeni su metodom hidratacije suhog fosfolipidnog filma. Sojin fosfatidilkolin (200 mg) i azitromicin (30 mg) otopljeni su u etanolu (5 mL) u tikvici s okruglim dnom.

Etanol je uklonjen pomoću rotirajućeg vakum uparivača. Suhi lipidni film hidratiziran je 10 % (v/v), 20 % (v/v), odnosno 30 % (v/v) otopinom propilenglikola u destiliranoj vodi. Otopine su pripremljene dodavanjem 1, 2, odnosno 3 mL propilenglikola u tikvicu od 10 mL i dopunjene destiliranom vodom do oznake. Za usporedbu pripremljeni su i klasični (konvencionalni) liposomi isključivo od sojinog fosfatidilkolina sa uklopljenim azitromicinom. Metoda pripreme bila je ista osim što je hidratacija suhog lipidnog filma provedena s 10 mL destilirane vode, bez dodatka propilenglikola.

Svi liposomi su ekstrudirani pomoću ekstrudera tri puta kroz polikarbonatne membrane veličine pora 400 nm, a potom i kroz membrane veličine pora 100 nm (LiposoFast, Avestin, Kanada).



Sika 7. Dijelovi ekstrudera ([www.funakoshi.co.jp](http://www.funakoshi.co.jp))

### 3.2.2. Određivanje veličine liposoma

Srednji promjer i indeks polidisperznosti liposoma određen je foton korelacijskom spektroskopijom (*photon correlation spectroscopy*, PCS) na uređaju Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija).

U kivetu za mjerenje stavljena je jedna kap uzorka (10 µl) razrijeđena sa 3,5 ml 10 mM NaCl koji je prethodno filtriran kroz filtere Minisart veličine pora 0,45 µm (Minisart, Sartorius, Goettingen, Njemačka). Mjerenje je provedeno na 25 °C.



Slika 8. Zetasizer, Malvern ([www.malvern.com](http://www.malvern.com))

### 3.2.3. Određivanje zeta potencijala liposoma

Zeta potencijal mjenen je na uređaju Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija). Kalibracija uređaja provedena je upotrebom standardne otopine (Zeta Potential Transfer Standard, Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija) čiji zeta potencijal iznosi  $-42 \pm 4,2$  mV. Nekoliko kapi uzorka liposoma razrijeđeno je 10 mM NaCl. Sva mjerenja provedena su na 25 °C.

### 3.2.4 Ispitivanje *in vitro* oslobađanja azitromicina iz liposoma

Oslobađanje azitromicina iz liposoma provedeno je na Franz difuzijskoj ćeliji. 0,5 ml liposomskih formulacija (PG-liposomi i klasični liposomi) s uklopljenim azitromicinom nanoseno je ravnomjerno na celuloza acetat membranu (Sartorius, Goettingen, Njemačka). Također, ispitivanje je provedeno i s kontrolom koja je sadržavala azitromicin u 40% (m/v)

etanolnoj otopini. Kao i kod liposomskih formulacija na membranu je nanoseno 0,5 mL otopine azitromicina.

Franz difuzijska ćelija bila je temperirana na temperaturu 37 °C korištenjem vodene kupelji. Na taj način osiguralo se da temperatura na površini membrane gdje se nanosi uzorak bude 32 °C. Receptorski medij volumena 16 mL činila je otopina 5% (v/v) etanola u fosfatnom puferu (PBS).

Receptorski medij odabran je kako bi se postigli uvjeti osigurane topljivosti tako da su pripravljene otopine etanola i vode u omjeru 40:60 (v/v), propilenglikola i vode u omjeru 40:60 (v/v) te fosfatnog pufera i etanola u omjeru 40:60 (v/v). U svaku otopinu dodano je 10 mg azitromicina. Otopina fosfatnog pufera i etanola dodatno se razrijedila i napravljen je niz otopina u kojima je volumni udio etanola u fosfatnom puferu iznosio 20%, 10%, 5% i 2,5%. Usporedbom otopina pokazalo se da je topljivost azitromicina najbolja u otopini fosfatnog pufera i etanola. Te je za najpogodniji receptorski medij odabrana 5% (v/v) otopina etanola u fosfatnom puferu.

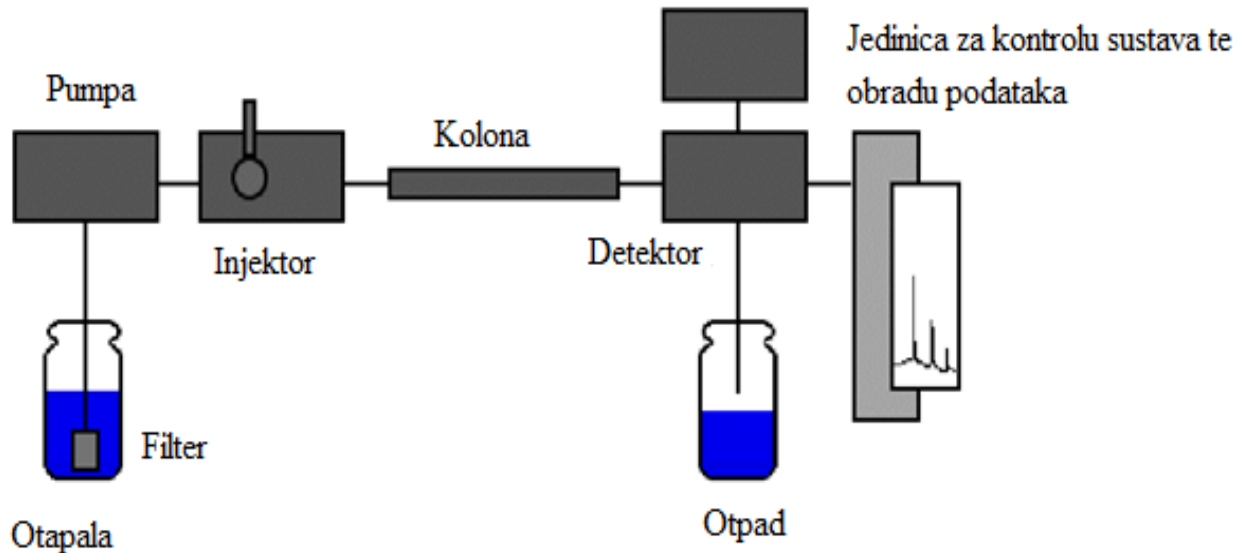
Receptorski medij neprestano je miješan pomoću magnetskog mješača (300–400 okretaja/min). Uzorkovanje (0,5 ml) provodilo se svakih 30 min tijekom 6 sati te zadnje uzorkovanje 24 sata nakon postavljanja eksperimenta. Receptorski medij je nakon svakog uzorkovanja nadopunjen svježim medijem (0,5 ml).

### 3.2.5 Određivanje sadržaja azitromicina

Za detekciju i određivanje sadržaja azitromicina u uzorcima koristila se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*high performance liquid chromatography*, HPLC). Mjerenja su provedena na uređaju Shimadzu LC-10 AD (Kyoto, Japan) koristeći C18, reverzno-faznu kolonu (Kinetex, Phenomenex). Uvjeti kromatografske analize za sve uzorke bili su sljedeći:

- Mobilna faza: acetoniril s fosfatnim puferom (0,01M) u omjeru 7:3 (v/v) ; pH 7,5
- Protok mobilne faze: 1,2 ml/min
- Temperatura: 40 °C
- Valna duljina detekcije: 210 nm (UV-Vis detektor)

Prije injektiranja uzoraka na kolonu svaki uzorak liposomske formulacije filtriran je kroz filtere veličine pora 0,22 μm kako bi se izbjegla bilo kakva mogućnost oštećenja kolone.



Slika 9. Shematski prikaz HPLC sustava (www.pharmaguideline.com)

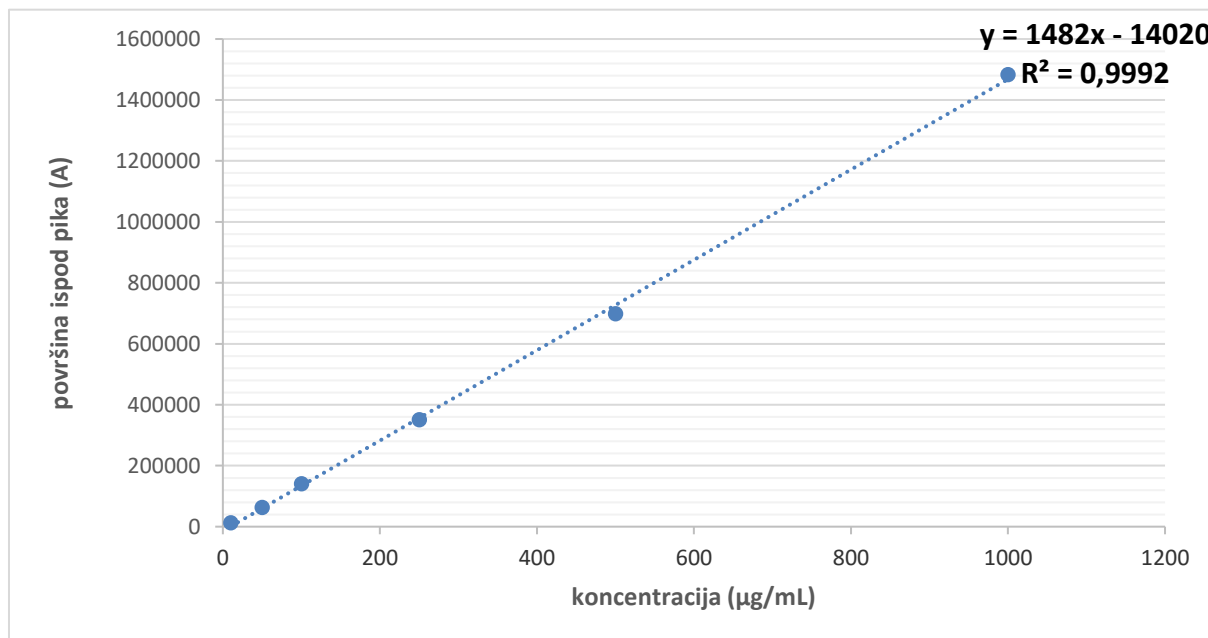
### 3.2.5.1. Izrada kalibracijskog pravca

U metanolu je pripremljeno 5 otopina različitih koncentracija azitromicina (1000, 500, 250, 100, 50, 10 μg/ml). Za svaku otopinu 3 puta je izmjerena površina ispod pika korištenjem HPLC uređaja.

Za izradu kalibracijskog pravca koristila se srednja vrijednost izmjerenih površina ispod pika. Iz dobivenih ovisnosti površine ispod pika (y) o koncentraciji azitromicina (x) izrađen je kalibracijski pravac. Linearnost metode izražena je koeficijentom korelacije regresijskog pravca (R=0,9992). Nepoznate koncentracije azitromicina izačunavaju se iz jednadžbe kalibracijskog pravca:  $x = y + 14020 / 1482$

x- koncentracija azitromicina ( $\mu\text{g/ml}$  )

y- površina ispod pika na kromatogramu (A)



Slika 10. Kalibracijski pravac azitromicina

### 3.2.5.2. Određivanje sadržaja azitromicina u liposomskim formulacijama

100  $\mu\text{L}$  uzoraka liposoma preneseno je u tikvicu od 10 mL te nadopunjeno metanolom do oznake. Metanol je razorio strukturu lipidnog dvosloja liposoma te omogućio oslobađanje azitromicina iz liposoma i njegovu kromatografsku kvantifikaciju. Svaki ovako priređen uzorak liposoma nanesen je na kolonu HPLC-a i određena mu je površina ispod pika.



### 3.2.5.3. Određivanje sadržaja azitromicina oslobođenog iz liposomskih formulacija

Uzorci prikupljeni na Franz difuzijskoj ćeliji tijekom 24 sata redom su injektirani na kolonu HPLC-a te su zabilježene površine ispod pikova.

Iz dobivenih vrijednosti površina ispod pika pomoću kalibracijskog pravca (*poglavlje 3.2.5.1*) određena je koncentracija azitromicina u 0,5 mL svakog uzorka prikupljenog tijekom 24 sata. Sadržaj azitromicina ( $\Delta$ ) u svakom uzorku izračunat je umnoškom koncentracije ( $\mu\text{g/mL}$ ) azitromicina u prikupljenom uzorku i volumena uzorka (0,5mL). Sadržaj azitromicina u cijelom receptorskom mediju dobiven je množenjem koncentracije ( $\mu\text{g/mL}$ ) azitromicina u uzorku volumena 0,5 mL i ukupnog volumena receptorskog medija (16 mL). Zatim je izračunat ukupni, tj. kumulativni sadržaj (Q) azitromicina u receptorskom mediju. Udio (%) oslobođenog azitromicina izračunat je iz omjera kumulativnog sadržaja (Q) azitromicina u receptorskom mediju i sadržaja azitromicina u uzorcima liposoma koji su se nanosili na membranu Franz difuzijske ćelije.

### 3.2.5.4. Statistička obrada podataka

Statistička analiza dobivenih rezultata provedena je upotrebom t-testa (za usporedbu 2 skupine rezultata), odnosno ANOVA testa (za usporedbu 3 skupine rezultata). Razina značajnosti iznosi 0,05 (5%) pa ukoliko je p vrijednost manja od 0,05 zaključuje se da postoji statistički značajna razlika između skupina, odnosno ukoliko je p vrijednost veća od 0,05 zaključuje se da ne postoji statistički značajna razlika između skupina. Razine značajnosti t-testom i ANOVA testom izračunate su u programu Microsoft Excel 2010.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. FIZIKALNE KARAKTERISTIKE LIPOSOMA

Liposomi (propilenglikol i konvencionalni) pripremljeni su metodom hidratacije suhog fosfolipidnog filma kako je opisano u poglavlju 3.2.1.. Fizikalna svojstva liposoma: srednji promjer, indeks polidisperznosti i zeta potencijal određeni su fotonskom korelacijskom spektroskopijom (*photon correlation spectroscopy*, PCS). Rezultati su prikazani u Tablici 1 (*poglavlje 4.1.1*) i Tablici 2 (*poglavlje 4.1.2*).

#### 4.1.1. Veličina i polidisperznost liposoma

Tablica 1. Prikaz vrijednosti srednjeg promjera i indeksa polidisperznosti liposoma

Uzorak	Srednji promjer liposoma		Indeks polidisperznosti	
	Prije ekstruzije (nm)	Nakon ekstruzije (nm)	Prije ekstruzije	Nakon ekstruzije
SPC-PG 10%	545,3 ± 6,4	132,8 ± 0,9	0,712 ± 0,012	0,131 ± 0,025
SPC-PG 20%	698,8 ± 8,1	110,8 ± 1,9	1,0 ± 0,0	0,130 ± 0,009
SPC-PG 30%	527,7 ± 36,4	120,7 ± 1,7	1,0 ± 0,0	0,085 ± 0,008
SPC	635,1 ± 62,2	137,6 ± 1,9	0,905 ± 0,085	0,098 ± 0,008

SPC-PG 10 % - liposomi sa 10 % (v/v) propilenglikola ; SPC-PG 20 %- liposomi sa 20 % (v/v) propilenglikola; SPC-PG 30 %- liposomi sa 30 % (v/v) propilenglikola; SPC-AZI-konvencionalni (klasični liposomi) bez propilenglikola. Svi liposomi sadrže uklopljen azitromicin. Prikazane vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost ± S.D. (n=3).

Film metodom pripravljeni su multilamelarni liposomi prilično velikog srednjeg promjera (oko 500 nm) i visokog indeksa polidisperznosti (0,7-1,0) koji upućuje na široku distribuciju veličina. To je potvrđeno i pregledom liposomskih formulacija korištenjem svjetlosnog mikroskopa (Olympus BH-2, Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) pri čemu su zapaženi multilamelarni liposomi raznih veličina. Provođenjem statističkog t-testa utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ) između srednjeg promjera klasičnih liposoma i propilenglikol (PG) liposoma, što bi moglo ukazati na činjenicu da sastav liposoma ne utječe toliko na njihovu veličinu.

Zbog heterogenosti liposomskih preparacija bila je nužna njihova daljnja obrada. Homogenizacija multilamelarnih liposoma provedena je ekstruzijom originalno pripravljenih liposoma kroz polikarbonatne membrane veličine pora 400 nm (3 puta), a potom i 100 nm (3 puta). Nakon ekstruzije kroz membrane veličine pora 100 nm dobiveni su liposomi manjeg indeksa polidisperznosti (0,085-0,131) i srednjeg promjera između 110 i 140 nm. U svim liposomskim formulacijama dobiveni su liposomi prikladni za dermalnu primjenu pošto je potvrđeno da vezikule promjera oko 120 nm najbolje dopremaju lijek u niže slojeve epidermisa (Verma i sur., 2003).

#### 4.1.2 Zeta potencijal liposoma

Tablica 2. Prikaz vrijednosti zeta potencijala liposoma

Uzorak	Zeta potencijal (mV)
SPC-PG 10 %	-45,0 ± 2,0
SPC-PG 20%	-36,5 ± 2,5
SPC-PG 30 %	-48,4 ± 1,7
SPC	-43,3 ± 0,8

SPC-PG 10 %- liposomi sa 10 % (v/v) propilenglikola ; SPC-PG 20 %- liposomi sa 20 % (v/v) propilenglikola; SPC-PG 30 % - liposomi sa 30 % (v/v) propilenglikola; SPC-konvencionalni (klasični liposomi) bez propilenglikola. Svi liposomi sadrže uklopljen azitromicin. Prikazane vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost ± S.D. (n=5)

Propilenglikol liposomi i konvencionalni liposomi s azitromicinom priređeni iz sojinog fosfatidilkolina imali su negativan zeta potencijal koji se kretao u rasponu od -48,4 do -36,5 mV. Dobivene vrijednosti zeta potencijala bile su negativne za sve liposome jer su pripremljeni iz sojinog fosfatidilkolina (S 75). Negativan zeta potencijal (manji od -30 mV) ukazuje na fizički stabilne disperzije liposoma. Naime, zbog negativnijih vrijednosti zeta potencijala dolazi do steričkog odbijanja čestica te je smanjena mogućnost njihove agregacije.

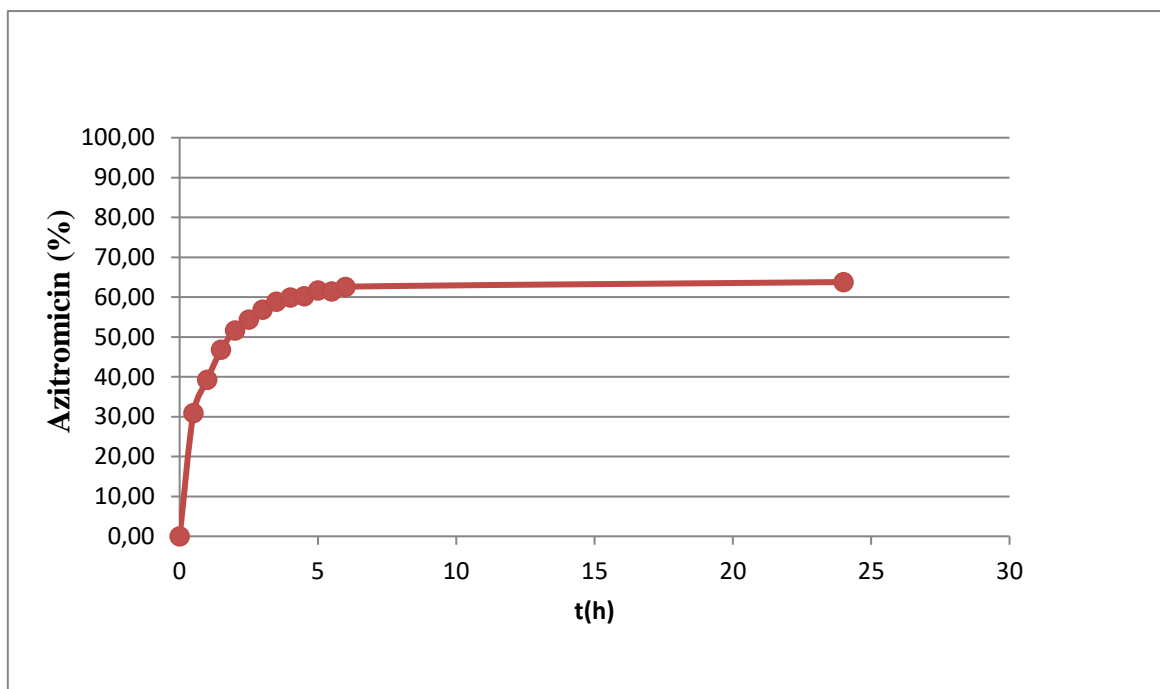
Općenito, čestice s zeta-potencijalom pozitivnijim od +30 mV ili negativnijim od -30 mV obično se smatraju stabilnima (Laouini i sur., 2012).

Pošto vrijednosti zeta potencijala ne ovise o veličini, već samo o sastavu liposoma, nije bilo potrebno mjeriti zeta potencijal liposoma nakon njihove ekstruzije.

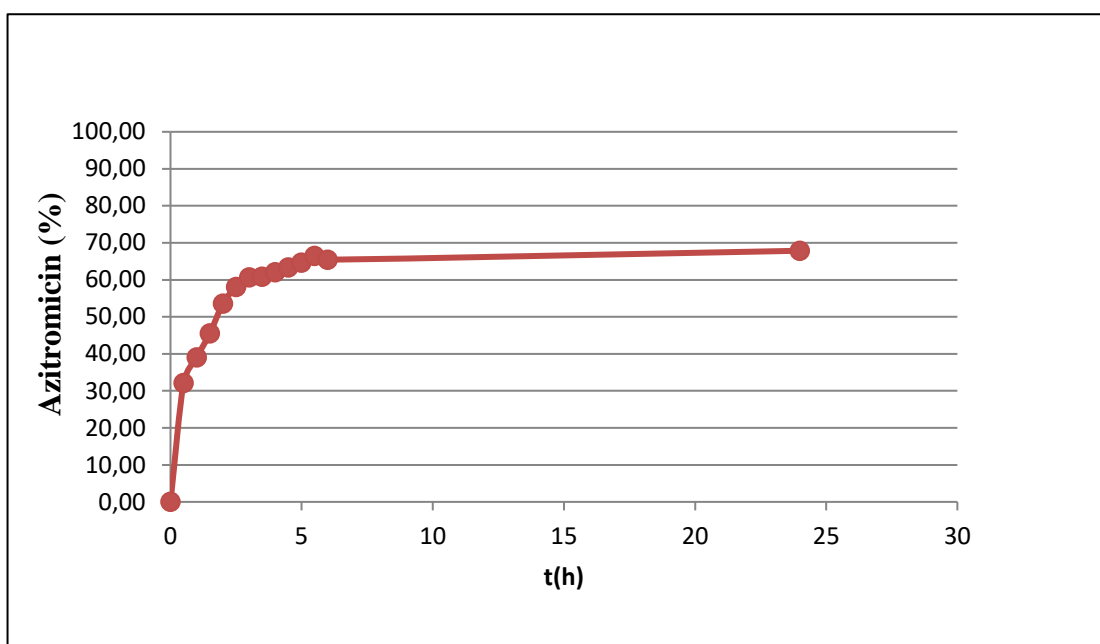
#### 4.2. In vitro oslobađanje lijeka iz propilenglikol (PG) i konvencionalnih liposoma

Oslobađanje azitromicina iz liposoma provedeno je na Franz difuzijskoj ćeliji. Uzorci prikupljeni na Franz difuzijskoj ćeliji tijekom 24 sata redom su injektirani na kolonu HPLC-a te su zabilježene površine ispod pikova. Iz dobivenih vrijednosti površina ispod pika pomoću kalibracijskog pravca (*poglavlje 3.2.5.1*) određena je koncentracija azitromicina u 0,5 mL svakog uzorka prikupljenog tijekom 24 sata. Udio (%) oslobođenog azitromicina izračunat je iz omjera kumulativnog sadržaja azitromicina u receptorskom mediju i sadržaja azitromicina u uzorcima liposoma koji su se nanosili na membranu Franz difuzijske ćelije (*poglavlje 3.2.5.2.*)

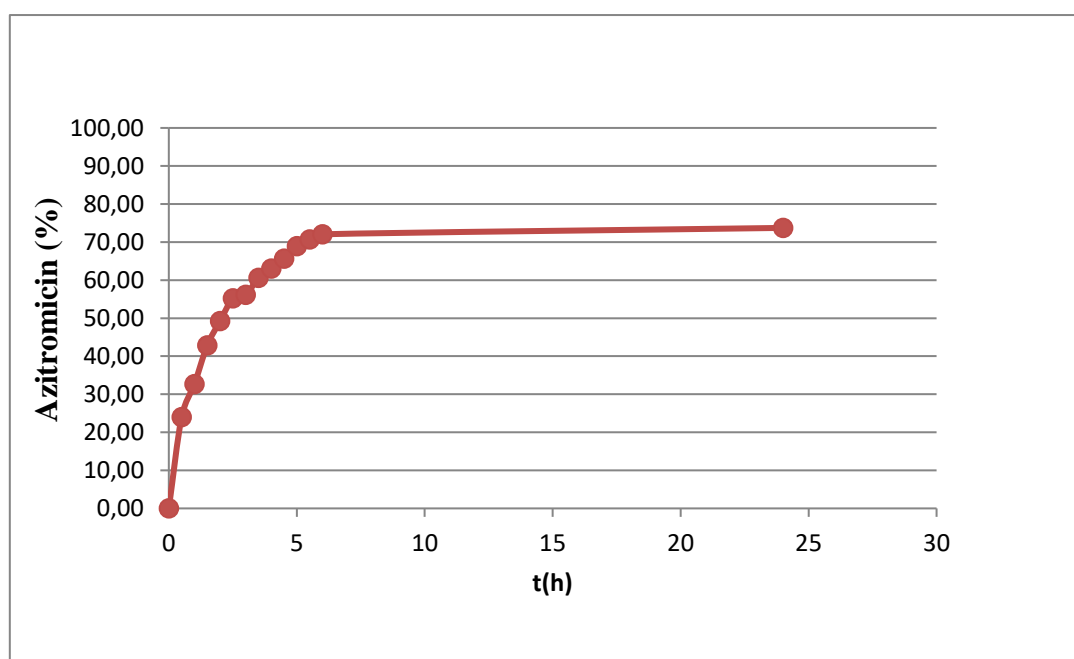
Za sve liposomske formulacije grafički je prikazan sadržaj (%) azitromicina oslobođenog 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6 te 24 sata nakon postavljanja eksperimenta na Franz difuzijskoj ćeliji.



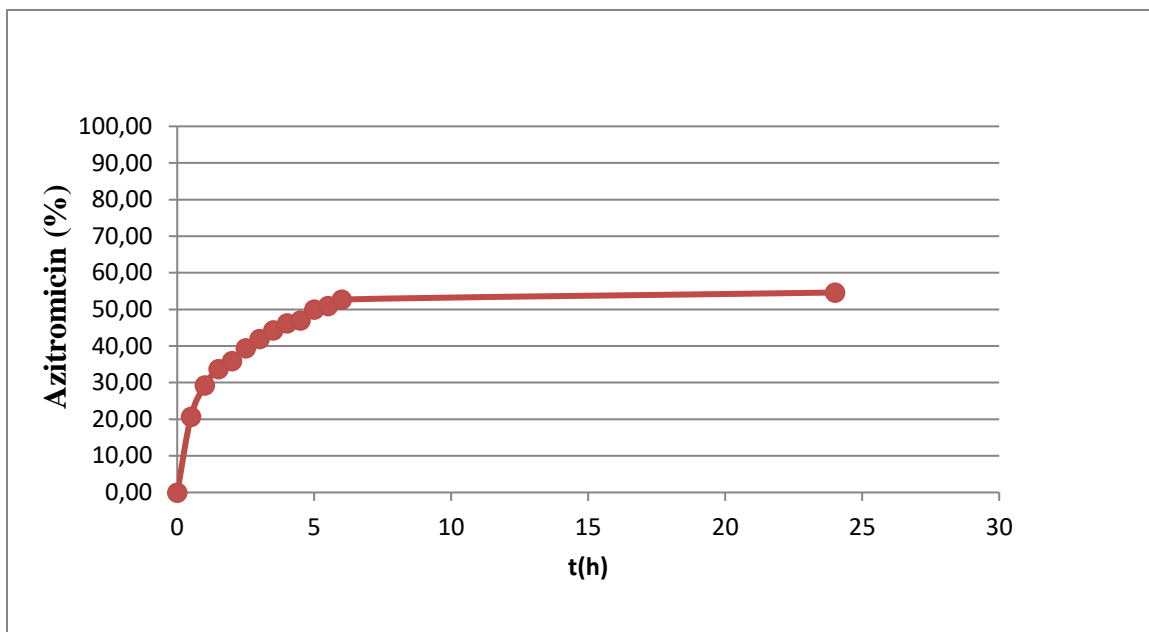
Slika 11. Grafički prikaz sadržaja (%) azitromicina oslobođenog iz liposoma sa 10 % propilenglikola u ovisnosti o vremenu (h).



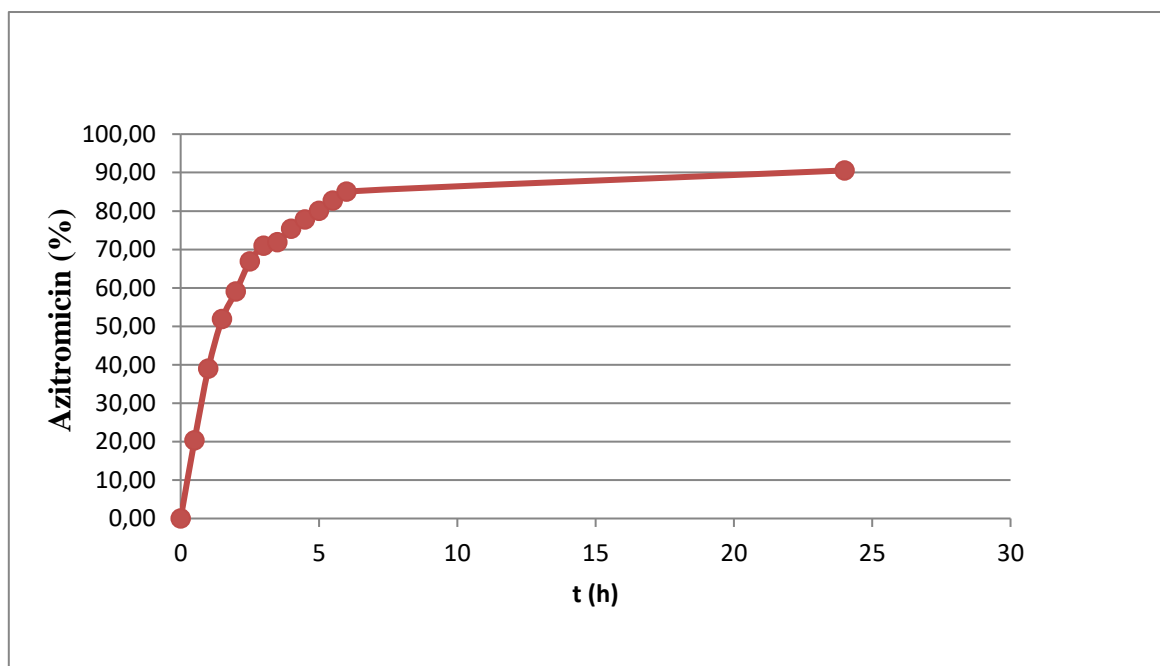
Slika 12. Grafički prikaz sadržaja (%) azitromicina oslobođenog iz liposoma sa 20 % propilenglikola u ovisnosti o vremenu (h).



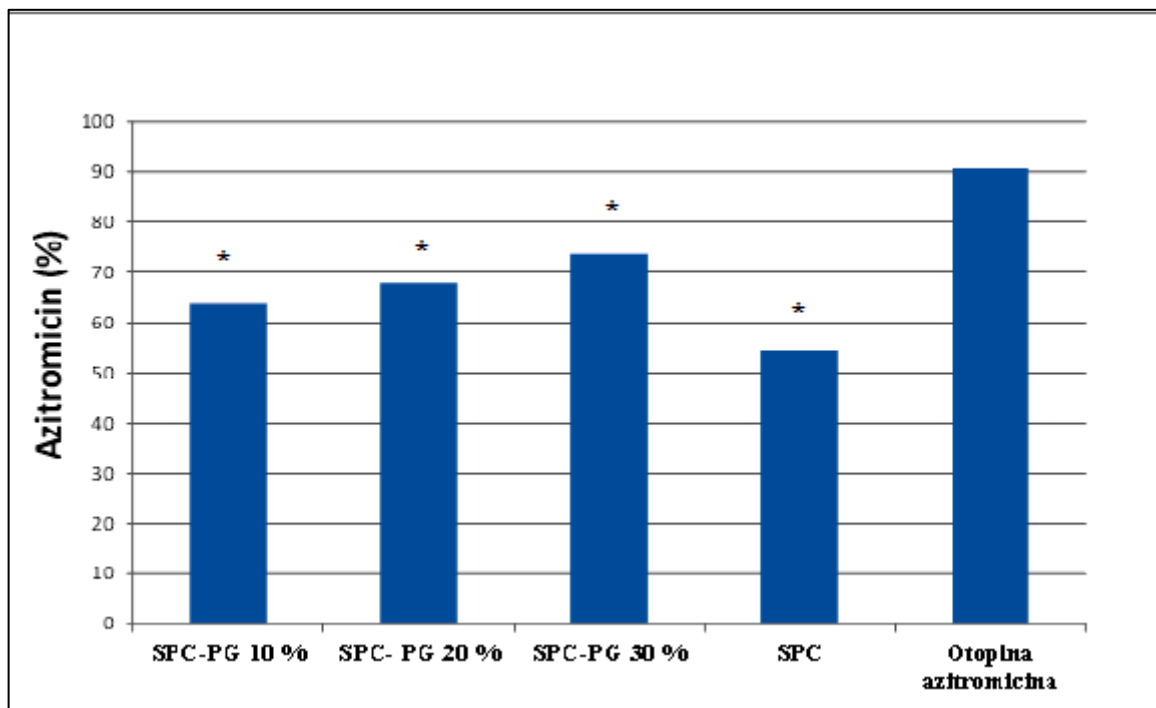
Slika 13. Grafički prikaz sadržaja (%) azitromicina oslobođenog iz liposoma sa 30 % propilenglikola u ovisnosti o vremenu (h).



Slika 14. Grafički prikaz sadržaja(%) azitromicina oslobođenog iz klasičnih liposoma u ovisnosti o vremenu (h).



Slika 15. Grafički prikaz sadržaja (%) azitromicina difundiranog iz otopine azitromicina (kontrola) u ovisnosti o vremenu (h).



Slika 16. Sažeti prikaz udjela (%) oslobođenog azitromicina iz različitih PG liposoma, klasičnih liposoma te azitromicina iz otopine (kontrola) nakon 24 sata. \*Statistički značajna razlika u sadržaju (%) oslobođenog azitromicina iz liposomskih formulacija koje su sadržavale različiti udio propilenglikola i klasičnih liposoma u odnosu na otopinu azitromicina (kontrola) (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Iz liposomskih formulacija sa 10 % propilenglikola nakon 24 sata oslobodilo se 63,8 % azitromicina (Slika 11). Iz liposomskih formulacija sa 20 % propilenglikola nakon 24 sata oslobodilo se 67,9 % azitromicina (Slika 12), a sadržaj oslobođenog azitromicina iz liposoma sa 30 % propilenglikola nakon 24 sata bio je 73,7 % (Slika 13). Došlo je do većeg oslobađanja azitromicina iz liposoma sa većim udjelom (%) propilenglikola. Statističkom analizom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u sadržaju oslobođenog azitromicina nakon 24 sata ispitivanja iz liposoma sa različitim udjelom propilenglikola i klasičnih liposoma u odnosu na kontrolu (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Iz klasičnih liposoma nakon 24 sata oslobodilo se 54,6 % azitromicina (Slika 14). Očekivano, veći sadržaj lijeka oslobodio se iz propilenglikol (PG) liposoma i taj je udio rastao s udjelom propilenglikola. Također je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika u sadržaju oslobođenog azitromicina tijekom 24 sata iz svih PG liposoma u odnosu na klasične liposome ( $p < 0,05$ ).

Dobiveni rezultati oslobađanja azitromicina iz propilenglikol liposoma i klasičnih liposoma tijekom 24 sata slični su rezultatima nedavnog istraživanja koje su proveli Palac i



suradnici (2014). U istraživanju se provodilo *in vitro* ispitivanje oslobađanja hidrofilnog lijeka-diklofenak natrija iz konvencionalnih (klasičnih), propilenglikol (PG) i deformabilnih liposoma, a rezultati pokazuju da se najmanji sadržaj lijeka oslobodio iz konvencionalnih (klasičnih) liposoma (oko 60 %) dok se iz liposoma sa 10 % propilenglikola oslobodilo oko 70 % lijeka. Smatra se da je povećano oslobađanje lijeka iz propilenglikol (PG) liposoma posljedica ugradnje propilenglikola u fosfolipidni dvosloj pri čemu se povećava elastičnost vezikula te one lakše oslobađaju uklopljeni lijek (Palac i sur., 2014). U svezi s time u istraživanju koje su proveli Palac i suradnici provedeno je i ispitivanje elastičnosti liposoma. Sposobnost elastičnosti (deformabilnosti) liposoma izražena je stupnjem deformabilnosti, tj. membranske elastičnosti (E). Vrijednost E za deformabilne liposome iznosila je 5,59, što je 5 puta veća vrijednost u odnosu na klasične (konvencionalne) liposome (1,08). Približno jednaka vrijednost faktora E (5,21) dobivena je ispitivanjem elastičnosti liposoma sa 10 % (w/v) propilenglikola. Ovaj rezultat također upućuje na to da je propilenglikol odgovoran za povećanu elastičnost membrane liposoma. Iako se očekivalo povećanje faktora deformabilnosti (E) s povećanjem koncentracije propilenglikola u liposomu dogodilo se suprotno. Naime, stupanj membranske elastičnosti za liposome s 30 % propilenglikola iznosio je 3,69. Zbog takvog rezultata liposomi s 30 % propilenglikola bili su isključeni iz daljnjih ispitivanja u tom istraživanju. Zanimljivo je primijetiti da rezultati istraživanja u ovom radu pokazuju povećanu sposobnost oslobađanja lijeka iz liposoma povećanjem koncentracije propilenglikola u liposomu. No pošto je u istraživanju (Palac i sur., 2014) korišten hidrofilni lijek-diklofenak natrij, a ne lipofilni te također u ovom radu nije ispitivana elastičnost liposoma rezultate nije moguće u potpunosti uspoređivati.

Na temelju svega navedenoga može se pretpostaviti da bi u ispitivanjima permeabilnosti, propilenglikol (PG) liposomi, vrlo vjerojatno pokazali bolju permeabilnost kroz kožu zbog svojih elastičnih svojstava. U svrhu ispitivanja permeabilnosti trebali bi se koristiti *ex vivo* modeli kože. Na taj način bi se uočio utjecaj fizikalnih i kemijskih svojstava liposoma na njihovu penetraciju kroz kožu.

Nadalje, kod svih ispitivanih liposomskih preparacija uočeno je progresivno povećanje koncentracije oslobođenog azitromicina tijekom prva tri sata, nakon čega dolazi do uspostavljanja platoa. Stvaranje platoa može se objasniti zasićenjem membrane i receptorskog medija nakon određenog vremenskog razdoblja provedbe *in vitro* ispitivanja, tj. dolazi do uspostave dinamičke ravnoteže između nanesenog uzorka i receptorskog medija.

Ispitivanje na Franz difuzijskoj ćeliji provedeno je i s kontrolom koja je sadržavala azitromicin u 40% etanolnoj otopini. Općenito, lijek uklopljen u liposome prolazi fazu oslobađanja iz liposoma i difuzije kroz membranu. Pošto je na membranu nanescena samo otopina azitromicina nije bilo faze oslobađanja lijeka već je lijek pasivno difundirao kroz membranu i nakupljao se u receptorskom mediju. Sadržaj azitromicina koji je pasivno difundirao kroz membranu nakon 24 sata iznosio je 90,6 % (Slika 15). Za razliku od otopine, iz liposomskih formulacija u vremenskom razdoblju od 24 sata oslobodila se manja količina ljekovite tvari, ali je oslobađanje produljeno. Kontrolirano i produljeno oslobađanje lijeka iz liposoma vrlo je važno svojstvo terapijskog sustava jer omogućava predviđanje farmakokinetike ljekovite tvari i smanjuje učestalost doziranja pripravka. Na slici 16. grafički je prikazan sadržaj (%) oslobođenog azitromicina iz propilenglikol (PG) liposoma, klasičnih liposoma te azitromicina iz otopine (kontrola) tijekom 24 sata.

Iz svega navedenog može se zaključiti da dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost uporabe azitromicina uklopljenog u propilenglikol (PG) liposome kao terapijskog sustava u terapiji kožnih oboljenja. No, naravno, potrebno je napraviti još brojna ispitivanja poput ispitivanja permeabilnosti, testova stabilnosti, antibakterijske aktivnosti, *in vitro* ispitivanja oslobađanja azitromicina iz liposoma uklopljenih u ljekovite oblike za dermalnu primjenu i dr. kako bi se potvrdila njihova učinkovitost.

## 5. ZAKLJUČCI

Metoda hidratacije suhog fosfolipidnog filma pokazala se pogodnom za dobivanje liposoma u laboratorijskim uvjetima.

Ekstruzijom izvornih liposomskih preparacija kroz polikarbonatne membrane dobiveni su liposomi srednjeg promjera između 110 i 140 nm.

Izmjerene vrijednosti zeta potencijala ukazuju na fizički stabilne disperzije liposomskih formulacija, pošto su sve vrijednosti zeta potencijala manje od -30 mV.

Receptorski medij koji sadrži 5% otopinu etanola u fosfatnom puferu pokazao se prikladnim za *in vitro* ispitivanje oslobađanja azitromicina.

Veći sadržaj (%) azitromicina oslobodio se iz PG liposoma u odnosu na konvencionalne (klasične) liposome. Pri tome najveći sadržaj azitromicina oslobodio se iz liposomskih formulacija sa 30 % (v/v) propilenglikola, nakon kojih slijede formulacije sa 20 % (v/v) te 10 % (v/v) propilenglikola.

Za sve uzorke liposoma ustanovljen je sličan profil oslobađanja azitromicina iz liposoma karakteriziran brzim oslobađanjem u prvih nekoliko sati i uspostavljanjem platoa nakon šest sati ispitivanja.

Dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost uporabe azitromicina uklopljenog u PG liposome kao terapijskog sustava u terapiji kožnih oboljenja.

## 6. LITERATURA

Banović J, Bego M, Cuković N, Vanić Ž. Lipidne vezikule za (trans)dermalnu primjenu lijekova. *Farm glas* 67, 2011, 229-244.

Diffusion testing fundamentals, <http://www.permeagear.com/primer.pdf>, pristupljeno 25.4.2015.

Dua J.S, Rana A. C, Bhandari A.K. Liposome: methods of preparation and applications. *J Pharm Sci*, 2012, 3, 14-20.

Elmoslemany RM, Abdallah OY, El-Khordagui LK, Khalafallah NM. Propylene glycol liposomes as a topical delivery system for miconazole nitrate: comparison with conventional liposomes. *AAPS PharmSciTech*, 2012, 13, 723-731.

Elsayed MM, Abdallah OY, Naggar VF, Khalafallah NM. PG-liposomes: novel lipid vesicles for skin delivery of drugs. *J Pharm Pharmacol*, 2007, 59, 1447-1450.

Escobar-Chávez J. J, Rodríguez-Cruz M. I, Domínguez-Delgado L. C. Chemical and Physical Enhancers for Transdermal Drug Delivery. U: *Pharmacology*. Luca Gallelli, urednik, InTech, 2012, 19, str. 398-420.

Extrusion of liposomes, <http://www.avantilipids.com>, pristupljeno 26.4.2015.

Francetić I. Farmakokinetika azitromicina. U: *Medicus*. Kolumbić Lakoš A, urednik, Pliva Hrvatska, Zagreb, 2008, str. 9-14.

In Vitro Release Testing Methods, 2009, [http://www.particlesciences.com/docs/technical\\_briefs/TB\\_10.pdf](http://www.particlesciences.com/docs/technical_briefs/TB_10.pdf), pristupljeno 9.5.2015.

Jalšenjak I, Jalšenjak V, Filipović-Grčić J. Farmaceutika. Zagreb, Školska knjiga, 1998, str. 129.

Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *J Colloid Sci Biotechnol*, 2012, 1, 147-168.

Liposomes as carriers of anticancer drugs, 2013., <http://www.intechopen.com>, pristupljeno 25.04.2015.

Palac Z, Engesland A, Flaten Eide G, Šalko-Basnet N, Filipović-Grčić J, Vanić Ž. Liposomes for (trans)dermal drug delivery: the skin-PVPA as a novel *in vitro stratum corneum* model in formulation development. *J Liposome Res*, 2014, 24(4), 313-322.

Pilepić V. Praktikum fizikalne kemije 1, Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2007.

Plessis J, Ramachandran C, Weiner N, Müller DG. The influence of particle size of drug of liposomes on the deposition into skin. *Int J Pharm*, 1994, 3, 277-282.

Popis lijekova, 2015., <http://www.almp.hr/>, pristupljeno 25.5.2015.

Prausnitz R. M , Langer R. Transdermal drug delivery. *Nat Biotechnol*, 2008, 26, 1261-1268.

Preparation of liposomes, <http://www.avantilipids.com>, pristupljeno 26.4.2015.

Size and zeta potential characterization of liposomes using the Zetasizer Nano, <http://www.malvern.com>, pristupljeno 30.4.2015.

Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: strukturna svojstva i klasifikacija. *Farm glas* 68, 2012a, 391-400.

Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: metode pripreve. *Farm glas* 68, 2012b, 457-466.

Vanić Ž. Phospholipid Vesicles for Enhanced Drug Delivery in Dermatology. *J Drug Discov Develop and Deliv*, 2015, 1-9.

Verma D.D, Verma S, Blume G, Fahr A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *Int J Pharm*, 2003, 3, 277-282.

Vrhovac B. Farmakoterapijski priručnik. Zagreb, Medicinska naklada, 2007, str. 350.

Zorc B, Butula I. Vježbe iz farmaceutske kemije, Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 1995, 12-18.

## 7. SAŽETAK

Cilj ovog rada bila je priprava propilenglikol (PG) liposoma, njihova fizikalna karakterizacija te ispitivanje *in vitro* oslobađanja uklopljenog lipofilnog lijeka-azitromicina. Propilenglikol (PG) liposomi pripremljeni su metodom hidratacije suhog fosfolipidnog filma i ekstruzije kroz polikarbonatne membranske filtre te su im određeni zeta-potencijal, srednji promjer i indeks polidisperznosti. Postupkom ekstruzije dobivene su homogenije liposomske preparacije. Nakon ekstruzije kroz membrane veličine pora 100 nm dobiveni su liposomi manjeg indeksa polidisperznosti (0,085-0,131) i srednjeg promjera između 110 i 140 nm. Izmjereni zeta potencijal kretao se u rasponu od -48,4 do -36,5mV. Negativan zeta potencijal (manji od -30 mV), ukazao je na fizički stabilne disperzije liposoma. *In vitro* ispitivanje oslobađanja azitromicina provedeno je na Franz difuzijskoj ćeliji. Ispitivanje je provedeno i s klasičnim (konvencionalnim) liposomima te kontrolom koja je sadržavala azitromicin u 40% etanolnoj otopini. Sadržaj oslobođenog azitromicina određen je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (*high performance liquid chromatography*, HPLC). Sukladno očekivanjima veći sadržaj (%) azitromicina oslobodio se iz PG liposoma u odnosu na klasične (konvencionalne) liposome. Pri tome se najveći sadržaj azitromicina oslobodio iz liposomskih formulacija s 30 % (v/v) propilenglikola, nakon kojih slijede formulacije s 20 % (v/v) te 10 % (v/v) propilenglikola.

## SUMMARY

The aim of this study was to develop and evaluate propylene glycol (PG) liposomes with incorporated lipophilic drug-azithromycin. PG liposomes were prepared by a film hydration method, following extrusion of preparations through the polycarbonate membrane filters, and characterized by means of mean diameter, polydispersity index and zeta potential. Size distribution of liposomal suspension after the extrusion (100 nm pore size) was relatively homogeneous with polydispersity index 0.085-0.131 and a mean diameter 110-140 nm. Measured zeta potential values were in the range between -48.4 and -36.5 mV. The negative zeta potentials (less than -30 mV) indicated a formation of physically stable liposome dispersions. *In vitro* release studies of azithromycin PG liposomes were performed on a Franz cell diffusion system. Investigations were performed also with the classical (conventional) liposomes and the control containing azithromycin in 40% ethanol solution. The amount of released azithromycin was determined by HPLC method (*high performance liquid chromatography*). As expected, the highest amount (%) of azithromycin was released from the liposome formulation with 30% (v/v) of propylene glycol, followed by a formulation with 20% (v/v) and 10% (v /v) propylene glycol.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmaceutsku tehnologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### *PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA PROPILENGLIKOL LIPOSOMA S AZITROMICINOM*

*Tea Milić*

#### SAŽETAK

Cilj ovog rada bila je priprava propilenglikol (PG) liposoma, njihova fizikalna karakterizacija te ispitivanje in vitro oslobađanja uklopljenog lipofilnog lijeka-azitromicina. Propilenglikol (PG) liposomi pripremljeni su metodom hidratacije suhog fosfolipidnog filma i ekstruzije kroz polikarbonatne membranske filtre te su im određeni zeta-potencijal, srednji promjer i indeks polidisperznosti. Postupkom ekstruzije dobivene su homogenije liposomske preparacije. Nakon ekstruzije kroz membrane veličine pora 100 nm dobiveni su liposomi manjeg indeksa polidisperznosti (0,085-0,131) i srednjeg promjera između 110 i 140 nm. Izmjereni zeta potencijal kretao se u rasponu od -48,4 do -36,5mV. Negativan zeta potencijal (manji od -30 mV), ukazao je na fizički stabilne disperzije liposoma. In vitro ispitivanje oslobađanja azitromicina provedeno je na Franz difuzijskoj ćeliji. Ispitivanje je provedeno i s klasičnim (konvencionalnim) liposomima te kontrolom koja je sadržavala azitromicin u 40% etanolnoj otopini. Sadržaj oslobođenog azitromicina određen je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (high performance liquid chromatography, HPLC). Sukladno očekivanjima veći sadržaj (%) azitromicina oslobodio se iz PG liposoma u odnosu na klasične (konvencionalne) liposome. Pri tome se najveći sadržaj azitromicina oslobodio iz liposomskih formulacija s 30 % (v/v) propilenglikola, nakon kojih slijede formulacije s 20 % (v/v) te 10 % (v/v) propilenglikola. te lipofilnost uklopljene djelatne tvari značajno utječu na stupanj membranske elastičnosti liposoma.

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

Rad sadrži: 34 stranice, 16 slika, 2 tablice i 25 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: prolipilenglikol liposomi; azitromicin; lokalna primjena

Mentor: **Dr. sc. Željka Vanić**, *docentica, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Željka Vanić**, *docentica, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.*

**Dr. sc. Mario Jug**, *izvanredni profesor, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.*

**Dr. sc. Lovorka Vujić**, *docentica, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.*

Rad prihvaćen: lipanj 2015.



## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of pharmaceutical technology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### *DEVELOPMENT AND EVALUATION OF PROPYLENE GLYCOL LIPOSOMES WITH AZITROMYCIN*

Tea Milić

#### SUMMARY

The aim of this study was to develop and evaluate propylene glycol (PG) liposomes with incorporated lipophilic drug-azithromycin. PG liposomes were prepared by a film hydration method, following extrusion of preparations through the polycarbonate membrane filters, and characterized by means of mean diameter, polydispersity index and zeta potential. Size distribution of liposomal suspension after the extrusion (100 nm pore size) was relatively homogeneous with polydispersity index 0.085-0.131 and a mean diameter 110-140 nm. Measured zeta potential values were in the range between -48.4 and -36.5 mV. The negative zeta potentials (less than -30 mV) indicated a formation of physically stable liposome dispersions. In vitro release studies of azithromycin PG liposomes were performed on a Franz cell diffusion system. Investigations were performed also with the classical (conventional) liposomes and the control containing azithromycin in 40% ethanol solution. The amount of released azithromycin was determined by HPLC method (high performance liquid chromatography). As expected, the highest amount (%) of azithromycin was released from the liposome formulation with 30% (v/v) of propylene glycol, followed by a formulation with 20% (v/v) and 10% (v/v) propylene glycol.

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

Thesis includes: 34 pages, 16 figures, 2 tables and 25 references. Original is in Croatian language.

Keywords: propylene glycol liposomes, azithromycin, local drug delivery

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

Reviewers: **Željka Vanić, Ph.D.**, *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Mario Jug, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Lovorka Vujić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2015.