

Utjecaj koncentracije i površinskog naboja liposoma na reološka svojstva kitozanskih liposomskih gelova

Bočkaj, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:163:346550>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-03**



Repository / Repozitorij:

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



Jelena Bočkaj

**Utjecaj koncentracije i površinskog naboja liposoma na reološka
svojstva kitozanskih liposomskih gelova**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Zore Rukavine.

Ovim putem želim izraziti iskrenu zahvalnost mentorici doc. dr. sc. Zori Rukavini na prihvaćenju molbi za mentorstvo. Vaše uloženo vrijeme i stručno vodstvo bili su od iznimne važnosti za moj napredak, posebice ovaj eksperimentalni rad.

Posebno se želim zahvaliti bratu Marku i baki Štefaniji na konstantnom vjetru u leđa, svom dečku na neizmjerne podršci i ljubavi te svim prijateljima koji su bili dio ove priče. Vaša podrška i zajedništvo učinili su moje studentske dane nezaboravnima.

S mnogo ljubavi i poštovanja ovaj rad posvećujem svojim roditeljima. Hvala vam za nesebičnost i bezuvjetnu ljubav koju ste mi pružili svih ovih godina. Zbog vas sam danas ovdje.

Sadržaj

Jelena Bočkaj.....	1
1. UVOD	1
1.1. KOŽA.....	1
1.1.1. Građa i izgled kože.....	1
1.1.2. Funkcija kože	1
1.1.3. Primjena lijekova na kožu	2
1.2. LIPOSOMI.....	3
1.2.1. Klasifikacija liposoma.....	5
1.2.1.1. Konvencionalni liposomi	5
1.2.1.2. Propilenglikol liposomi	5
1.2.1.3. Deformabilni liposomi	6
1.2.1.4. Etosomi.....	7
1.2.1.5. Kationski liposomi	7
1.3. LIPOSOMSKI GELOVI.....	7
1.4. KITOZANSKI GELOVI.....	8
1.5. REOLOGIJA	9
1.5.1. Rotacijski testovi	11
1.5.2. Oscilacijski testovi	12
1.6. AZITROMICIN	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME	15
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. MATERIJALI	16
3.2. METODE	17
3.2.1. Priprava liposoma.....	17
3.2.2. Mjerenje veličine i indeksa polidisperznosti.....	18
3.2.3. Priprema kitozanskog gela	18
3.2.4. Uklapanje liposoma u kitozanski gel i reološka ispitivanja liposomskih gelova...	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA LIPOSOMA	20
4.2. REOLOŠKA KARAKTERIZACIJA LIPOSOMA U KITOZANSKOM GELU	21
4.2.1. Rotacijski testovi	21
4.2.2. Oscilacijski testovi	27
5. ZAKLJUČCI.....	32
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA	34

7. LITERATURA.....	35
8. SAŽETAK.....	42
SUMMARY	43
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. KOŽA

1.1.1. Građa i izgled kože

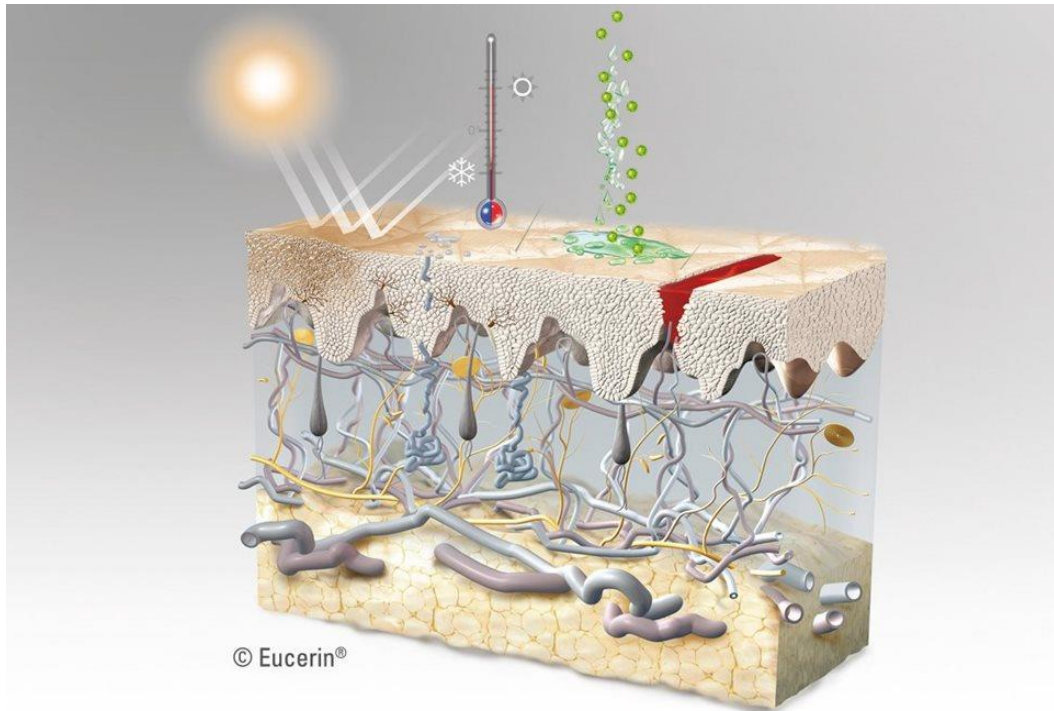
Koža je najveći (cca 1,7 m²), najteži (cca 18 % tjelesne težine) i najvidljiviji ljudski organ. Njezina se debljina razlikuje ovisno o području tijela odnosno najdeblja koža je na dlanovima i tabanima, dok s druge strane najtanja na vjeđama i prepuciju. Strukturno se sastoji od tri osnovna sloja: epidermisa, dermisa i hipodermisa te kožnih adneksa (nokti, dlake, žlijezde lojnice i znojnice) (Čajkovac, 2000). Tekstura odnosno izgled kože varira ovisno o stanju površinskog sloja, poznatog kao rožnati sloj, dok naboranost kože ovisi o stanju dermisa. Mehanička svojstva kože ovise o strukturi i svojstvima kolagena i elastičnih vlakana (elastina). Biomehanička svojstva ljudske kože od velike su važnosti jer su odgovorna za zdravlje ili bolesti kože, strukturni integritet te dakako za njeno očuvanje, obnavljanje i starenje u dermisu, koji je dublji sloj kože, izloženost UV zračenju može rezultirati znakovima oštećenja vezivnog tkiva.

Površina kože ima različite vrijednosti pH koje variraju od 4,1 na vlasištu do 7,2 na stopalima. Najveći dio kože na tijelu ima blago kiselu pH vrijednost (5,5) zbog čega nije povoljna sredina za razvoj mikroorganizama, jer je za većinu medicinski značajnih bakterija optimalni pH za rast i razvoj oko 7. Na površini kože se nalaze brojni mikroorganizmi (bakterije i gljivice), koje u slučaju narušavanja integriteta rožnatog sloja mogu postati patogene. Porastom pH vrijednosti kože stvaraju se uvjeti za razvoj gljivičnih oboljenja (Čajkovac, 2000). Štoviše, za formulacije namijenjene za liječenje infekcija kože čak je i poželjno da su blago kisele, jer se pokazalo da pH inficirane kože postaje bazičniji u odnosu na fiziološki pH kože (Wallace i sur., 2019).

1.1.2. Funkcija kože

Koža je najveća međupovršina između tijela i okoliša stoga je osnovna funkcija kože barijerna funkcija smještena u najgornjem sloju kože, rožnatom sloju (*stratum corneum*). S jedne strane, funkcija ljudske kože je zaštita našeg tijela od kemijskih, fizičkih i mikrobioloških oštećenja, gubitka vode i drugih endogenih tvari. Koža je ujedno medijator upale, u njoj se odvijaju imunološki procesi i sintetizira vitamin D. Budući da koža čini jedinstvenu cjelinu s organizmom kojeg pokriva, različita se zbivanja mogu očitovati na koži, a isto tako promjene kože mogu izazvati cijeli niz poremećaja u samom organizmu npr.

većina akutnih zaraznih bolesti izaziva raznovrsne osipe koji za posljedicu imaju nastanak stanja šoka prilikom gubitak tekućine i koncentracije krvi. Nadalje, koža je uključena u termoregulaciju tijela i služi kao organ za izlučivanje/apsorpciju - izlučuje nepotrebne tvari iz organizma i može primati tvari, što je važno za djelovanje kozmetičkih i dermatoterapijskih preparata te za sistemska farmakoterapiju koja se primjenjuje putem kože (Čajkovac, 2000).



Slika 1. Prikaz osnovnih funkcija kože (preuzeto s www.eucerin.hr)

1.1.3. Primjena lijekova na kožu

Ljekoviti oblici koji se primjenjuju topikalno na kožu dijele se u dvije glavne kategorije: pripravci za lokalni učinak i pripravci za sistemski učinak. Lokalni učinak uključuje djelovanje pripravka na površini kože, epidermisu i potencijalno dermisu, te je prikladan za liječenje lokalnih oboljenja kože. Većina lijekova primjenjuje se na koži upravo s ciljem postizanja lokalnog terapijskog učinka. Naime, dermalnom primjenom osiguravaju se visoke koncentracije lijeka na/u koži uz smanjenje njegove razine u sistemske cirkulaciji, čime se izbjegavaju ili smanjuju brojne neželjene nuspojave.

Posljednjih desetljeća koža se sve više istražuje i kao put primjene lijekova za postizanje sistemskog terapijskog učinka. Naime, transdermalna primjena lijekova podrazumijeva apsorpciju lijeka kroz kožu kako bi se postigao učinak na udaljenom mjestu od

mjesta primjene (Prausnitz i Langer, 2008) te u usporedbi s oralnom primjenom lijekova nudi brojne prednosti. Prije svega, eliminira se utjecaj varijabli koje utječu na gastrointestinalnu apsorpciju lijeka: različiti pH, prisutnost hrane i motilitet crijeva, a zaobilaznjem prvog prolaska kroz jetru sprječava se brza metabolička razgradnja lijekova, što je posebno važno za lijekove s malom bioraspoloživostu. Nadalje, kontinuiranim i kontroliranim otpuštanjem lijeka kroz kožu izbjegavaju se fluktuacije koncentracije lijeka u plazmi, što je osobito značajno kod lijekova s uskom terapijskom širinom (Singh i sur., 2015).

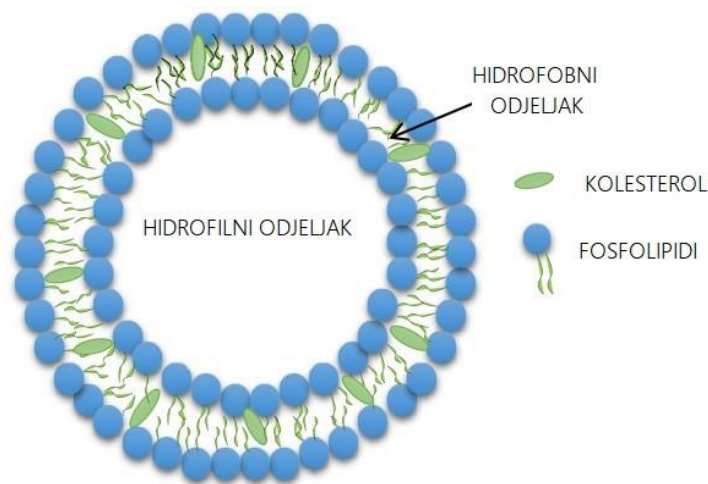
(Trans)dermalna primjena lijekova je jednostavna i prihvatljiva pacijentima, zbog čega je razina suradljivosti pacijenata visoka. No, unatoč tim prednostima, barijerna priroda kože značajna je prepreka u (trans)dermalnoj primjeni lijekova. Naime, rožnati sloj kože, sastavljen od odumrlih stanica keratinocita okruženih visokoorganiziranim lipidnim matriksom, odgovoran je za nisku permeabilnost većine lijekova. Kako bi se povećala (trans)dermalna dostava lijekova, posljednjih se desetljeća velika pažnja posvećuje razvoju novih terapijskih sustava temeljenih na nanočesticama, koji bi trebali nadvladati nedostatke postojećih klasičnih terapijskih sustava. Među njima posebno mjesto zauzimaju fosfolipidne vezikule, liposomi, koje svojim specifičnim sastavom, građom i svojstvima olakšavaju transport uklopljene ljekovite tvari u/kroz kožu (Banović i sur., 2011).

1.2. LIPOSOMI

Liposomi su sferične fosfolipidne vezikule veličine uglavnom od 100 do 500 nm, a veličinom se mogu kretati u rasponu od 20 pa sve do 10 000 nm. Glavna sastavnica liposoma su amfipatske molekule tzv. fosfolipidi. Fosfolipidi su po kemijskom sastavu diesteri fosfatne kiseline koji su s jedne strane esterificirani derivatom sfingozina ili glicerola, a s druge strane serinom, kolinom, inozitolom, etanolaminom ili glicerolom (Vanić, 2012). Zbog ovakve kemijske strukture molekule fosfolipida imaju tzv. hidrofilnu „glavu“, koja će se u vodenom mediju usmjeriti prema vodenoj fazi, i hidrofobni „rep“ koji će se u vodenom mediju usmjeriti jedan prema drugome. Na taj način fosfolipidi formiraju fosfolipidni dvosloj, a ukoliko je molekularni oblik fosfolipidnih molekula cilindričan, oni će u vodenom mediju stvarati vezikularne strukture koje omogućuju uklapanje aktivnih tvari različitih fizikalno-kemijskih karakteristika (Banović i sur., 2011). Točnije, hidrofilni lijek se može se uklopiti u unutarnji hidrofilni odjeljak vezikula, a suprotno tome, hidrofobni lijek može se uklopiti u lipofilni dvosloj. Amfipatske djelatne tvari mogu uklopiti na granici ta dva odjeljka.

Uspješnost uklapanja lijeka ovisi o svojstvima samog lijeka, a načelno se hidrofobni lijek uklapaju s većom učinkovitošću uklapanja.

Uz fosfolipide, u ovojnici liposoma često se nalazi kolesterol. On poboljšava karakteristike fosfolipidnog dvosloja povećavajući njegovu mikroviskoznost i rigidnost te smanjujući propusnost membrane za molekule topljive u vodi (Banović i sur., 2011). Sastav (fosfo)lipidnog dvosloja liposoma utječe na njihova svojstva kao što su veličina čestica, površinski naboj, stabilnost, fluidnost membrane itd.



Slika 2. Građa liposoma (preuzeto i prilagođeno s <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9118483/>)

Važno svojstvo fosfolipidnog dvosloja liposoma je temperatura faznog prijelaza. To je temperatura na kojoj se odvija prijelaz iz gel faze u fazu tekućih kristala. Što je ta temperatura viša, manja je fluidnost membrane te je manje permeabilna za uklopljeni sadržaj, što rezultira većom stabilnošću liposoma (Vanić, 2012).

Kakav će biti terapijski učinak lijeka iz liposomskih pripravaka ovisi o interakciji liposoma sa stanicama kože, a na to utječu fosfolipidni sastav i termodinamičko stanje dvosloja (sol- ili gel-stanje) te metoda priprave vezikula (Bouwstra i Honeywell-Nguyen, 2002). Bolji unos lijeka u kožu postignut je liposomima čiji je lipidni sastav uključivao lipide kože (Egbaria i sur., 1990) te čija je membrana liposoma bila u sol-, a ne gel-stanju (Van Kuijk-Meuwissen i sur., 1998). Također, smanjenje udjela kolesterola u fosfolipidnom dvosloju liposoma, čime se povećava njegova fluidnost, rezultiralo je boljim prolaskom lijeka

kroz rožnati sloj. Pokazalo se da i drugi fizičko-kemijski parametri, kao što su veličina liposoma, naboj na površini te lamelarnost mogu utjecati na isporuku lijeka u kožu (Honeywell-Nguyen i sur., 2005).

1.2.1. Klasifikacija liposoma

Liposomi se mogu klasificirati u kategorije obzirom na različite čimbenike. Primjerice prema naboju na površini pri neutralnom pH medija razlikujemo neutralno, pozitivno i negativno nabijene liposome. Prema veličini i lamelarnosti liposomi mogu biti veliki/mali unilamelarni, oligolamelarni, multilamelarni ili multivezikularni. Prema sastavu i površinskim svojstvima razlikuju se konvencionalni liposomi, sterički stabilizirani (dugo-cirkulirajući) ili tzv. „stealth“ liposomi, imunoliposomi, kationski liposomi itd.

U kontekstu topikalne primjene na kožu relevantna je klasifikacija liposoma na konvencionalne ili klasične liposome, kationske liposome, propilenglikol liposome, deformabilne liposome, etosome.

1.2.1.1. Konvencionalni liposomi

Konvencionalni liposomi je izraz koji se primjenjuje za klasične liposome koji predstavljaju prvu generaciju liposoma razvijenih kao nosača lijekova. Oni se sastoje od jednog (unilamelarni liposomi) ili više koncentrično raspoređenih fosfolipidnih dvostrukih slojeva (oligo- ili multilamelarni liposomi) koji obavijaju unutarnje vodene komore. Dvostruki slojevi sastoje se od neutralnih fosfolipida ili kombinacija neutralnih i fosfolipida s površinskim nabojima. Kolesterol je kao dio membrane često prisutan u konvencionalnim liposomima, a služi za poboljšanje čvrstoće dvostrukog sloja vezikula i povećanje fizikalno-kemijske stabilnosti liposomske formulacije. Konvencionalni liposomi pokazali su se prikladnim nosačima u topikalnoj primjeni lijekova na kožu i sluznice, ali ne i za postizanje sistemskog učinaka (transdermalna, transmukozna primjena), zbog lošeg prolaska lijeka kroz površinski sloj kože ili epitelne stanice sluznica (Vanić i sur., 2015).

1.2.1.2. Propilenglikol liposomi

Noviji tip elastičnih liposoma su propilenglikol liposomi, koji se sastoje od fosfolipida, propilenglikola i vode. Elsayed i suradnici (2007b) prvi su razvili propilenglikol liposome s ciljem uklapanja lokalnog anestetika cinhokaina te dokazali da liposomi s

propilenglikolom imaju veću sposobnost uklapanja lijeka i veću stabilnost u odnosu na konvencionalne i deformabilne liposome istog fosfolipidnog sastava. U usporedbi s konvencionalnim liposomima, propilenglikol liposomi imaju fleksibilnije/elastičnije membrane, što omogućava bolju penetraciju i postizanje veće koncentracije lijeka u ciljnom tkivu (Zhao i sur., 2013). Elmoslemany i suradnici (2012) su primjerice pokazali da propilenglikol liposomi imaju bolju sposobnost uklapanja mikonazolnitrata, veću fizičku stabilnost u usporedbi s konvencionalnim liposomima te veću antifungalnu aktivnost u usporedbi s konvencionalnim liposomima. Zaključeno je da prisutnost propilenglikola u strukturi liposoma značajno doprinosi antifungalnoj aktivnosti mikonazolnitrata.

1.2.1.3. Deformabilni liposomi

Deformabilni liposomi nalaze se u literaturi pod različitim nazivima: elastični, fleksibilni, ultrafleksibilni liposomi, Transferosomi[®]. To su lipidne elastične vezikule čija je membrana građena od fosfolipida i rubnog aktivatora. Rubni aktivator je jednolančani surfaktant s velikim polumjerom zaobljenosti, čime se smanjuje stabilnost dvosloja i narušava njegova struktura. Optimalnim omjerom fosfolipida i surfaktanta postižu se željena elastična svojstva. Ako je količina rubnog aktivatora premala, vezikule su krute, dok u prevelikoj količini dolazi do transformacije lipidnih vezikula u micle. Kao rubni aktivatori uglavnom se primjenjuju: natrijev kolat, natrijev deoksikolat, Span 60, Span 65, Span 80, Tween 20, Tween 60, Tween 80 i dikalijev glicirizinat. Postupak pripreme deformabilnih liposoma veoma je sličan pripravi konvencionalnih liposoma, s tim da se ponekad u postupku hidratacije tankoga fosfolipidnoga sloja vodeni mediji može zamijeniti 7 %-tnim etanolom (Elsayed i sur., 2007a). Pretpostavlja se da bi se elastični liposomi zbog svoje elastičnosti i bolje penetracije antigena u kožu te mogućnosti kontroliranog oslobađanja antigena u budućnosti mogli istraživati u svrhu stvaranja terapijski učinkovitih transdermalnih vakcina (Tyagi i sur., 2016). Elastični liposomi pokazali su se učinkovitima u terapiji reumatskih bolesti zbog bolje transdermalne dostave uklopljene djelatne tvari u odnosu na konvencionalne ljekovite oblike poput gelova i masti (Singh i sur., 2016).

Dok se konvencionalni liposomi uglavnom koriste kao spremišni sustavi radi postizanja lokalnog učinka, za deformabilne je liposome zabilježeno da mogu intaktni proći kroz kožu prenoseći terapijske koncentracije lijeka (Cevc i Blume, 1992).

1.2.1.4. Etosomi

Novija generacija lipidnih vezikula nazivaju se etosomi. Sastavljeni su od fosfolipida, vode i etanola (20 – 45 %). Pripremaju se otapanjem smjese lipida i lijeka u etanolu kojoj se postepeno dodaje vode na faza uz neprekidno miješanje. Prisutni etanol povećava fluidnost membrane i solubilizaciju djelatnih tvari, te ima utjecaja na veličinu etosoma. Etanol uzrokuje negativan naboj na površini što rezultira smanjenjem veličine vezikula odnosno prilikom smanjenja koncentracije etanola, veličina će porasti. Utvrđeno je da su, zbog visokog udjela etanola, etosomi značajno manji od konvencionalnih liposoma istog fosfolipidnog sastava. Također, etanol povećava topljivost većine lijekova tako da etosomi posjeduju visoku uspješnost uklapanja, samim time i bolju terapijsku učinkovitost. Za razliku od konvencionalnih liposoma koji dostavljaju lijekove uglavnom u gornje slojeve kože, etosomi prodiru puno dublje u kožu i postižu veće koncentracije u koži (Touitou i sur., 2000).

1.2.1.5. Kationski liposomi

Kationski liposomi su tip liposoma koji u fosfolipidnom dvosloju sadrže pozitivno nabijene lipide (Felgner i sur., 1987). Kationski liposomi najviše su istraživani za dostavu lijekova u genskoj terapiji kao ne-viralni vektori. Njihov pozitivan naboj na površini pospješuje interakciju s negativno nabijenim molekulama kao npr. nukleinskim kiselinama. Tako nastaju lipopleksi odnosno lipid-DNK kompleksi koji fuzijom s plazmatskom membranom omogućuju unos uklopljenog sadržaja (nukleinskih kiselina) u stanicu (Vanić, 2012). Međutim, kationski liposomi se zbog zanimljivih antimikrobnih svojstava istražuju i u lokalnoj antimikrobnoj terapiji, uključujući antimikrobnu terapiju kožnih oboljenja. Naime, antimikrobnom učinku kationskih liposoma s uklopljenom antimikrobnom djelatnom tvari doprinose i lipidi koji se koriste za njihovu pripravu. Često se primjenjuje sintetski kationski lipid dioktadecildimetilamonijev bromid (DODAB) u kombinaciji s fosfolipidima. On se veže na membrane bakterijskih i gljivičnih stanica što rezultira promjenom površinskog negativnog naboja stanice u pozitivan. Taj pozitivan naboj u konačnici dovodi do njihove smrti (Campanha i sur, 1999; Vieira i Carmano-Ribeiro, 2006).

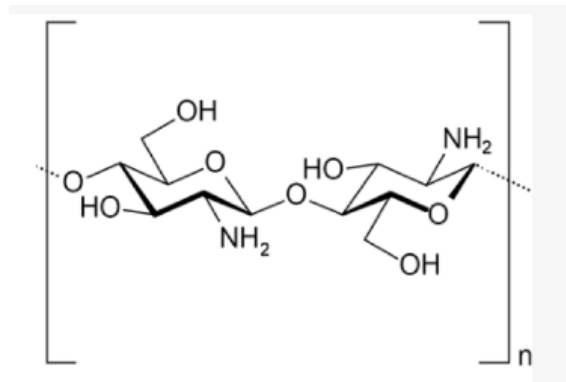
1.3. LIPOSOMSKI GELOVI

Liposomi su se pokazali kao iznimno korisni i svestrani sustavi za dopremu lijekova, uz niz korisnih svojstava poput poboljšanog terapijskog indeksa uklopljenog lijeka, ciljane i kontrolirane dostave lijeka na željeno mjesto te smanjene toksičnosti u odnosu na slobodni

lijek. Ipak, liposomi imaju i neke nedostatke. Jedan od njih je tekuća priroda liposomskih formulacija, zbog čega im zadržavanje na mjestu primjene kod lokalne primjene može biti ograničeno. Iz tog razloga razvijane su različite polučvrste podloge za uklapanje liposoma, kako bi se dobili terapijski sustavi tipa liposomi-u-podlozi, koji pokazuju prikladniju viskoznost i produljenu retencije na mjestu primjene u odnosu na tekuće liposomske disperzije te produljeno i kontrolirano oslobađanje lijeka. Najčešće korištene polučvrste podloge za uklapanje liposoma su hidrogelovi koji zbog visokog sadržaja vode osiguravaju dobru topljivost lijekova i bržu migraciju lijeka kroz podlogu, a ujedno pokazuju i dobru kompatibilnost s liposomskim formulacijama (Binaymotlagh i sur., 2024; Rehman i Zulfakar, 2013).

1.4. KITOZANSKI GELOVI

Kitozan je biokompatibilan, prirodni, biorazgradljivi kationski polimer koji nastaje djelomičnom alkalnom N-deacetilacijom hitina. Sastoji se od β -(1,4)-D-glukozamina i N-acetil-D-glukozamina. Nakon deacetilacije, amino skupine glukozamina postaju slobodne. U kiselom mediju ($\text{pH} < 6,5$), amino skupine su protonirane, što povećava topljivost kitozana u vodi (Rinaudo, 2006).



Slika 3. Struktura kitozana (preuzeto s <https://www.mdpi.com/1660-3397/13/3/1133>)

Postoji više tipova kitozana koji se međusobno razlikuju po molekulskoj masi (MW, eng. *molecular weight*) koja može biti od 4 do 2000 kDa, zatim stupnju deacetilacije (DD, eng. *degree of deacetylation*) koji iznosi 66 – 95 % te svojstvima kao što su npr. topljivost i viskoznost otopina kitozana. Biokompatibilnost kitozana ovisi o stupnju deacetilacije i molekulskoj masi. Kod većeg stupnja deacetilacije povezanost toksičnosti, molekulske mase i koncentracije je znatno izraženija nego kod manjeg stupnja deacetilacije (Mun i sur., 2006).

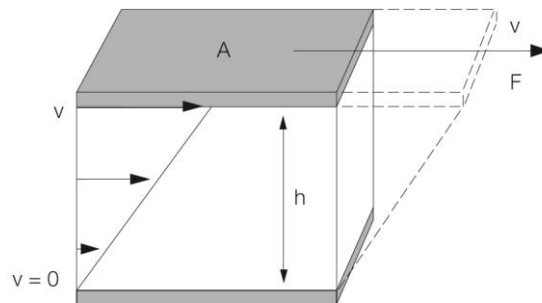
Kitozan može djelovati antibakterijski, antimikotički i antiparazitski te ima pozitivan utjecaj na procese cijeljenja rane, pri čemu visokomolekularni kitozani s većim stupnjem deacetilacije imaju bolji učinak na samo cijeljenje rane (Kean i Thanou, 2010). Antimikrobna aktivnost kitozana može dodatno pridonositi uspješnom cijeljenju rane jer sprječava infekciju rane. Točan mehanizam nije razjašnjen, no smatra se da pozitivno nabijeni kitozan reagira s negativno nabijenim sastavnicama bakterije. To rezultira promjenom permeabilnosti i u konačnici istjecanjem citoplazmatskog materijala. Također, smatra se da kitozani velike molekulske mase stvaraju polimerni štit koji sprječava protok hranjivih tvari, dok kitozani manje molekulske mase mogu penetrirati u stanicu i prekinuti neke fiziološke procese kao npr. interferirati sa sintezom mRNA. Uz sve to, kitozan može i kelirati metale što u konačnici rezultira inhibicijom rasta mikroorganizma pa i njihovom smrću (Zivanovic i sur., 2015). Antifungalni učinak kitozana temelji se na supresiji sporulacije i germinacije spora (Chung i Chen, 2008). Kitozan ne utječe samo na mikroorganizme već može djelovati i na domaćina na način da pokreće ili smanjuje obrambene procese u tkivima, recimo inhibirajući određene enzime, što rezultira imunomodulacijskim učincima (Fong i Hoemann, 2018). Svi ti učinci zajedno pridonijeli su sve većem interesu za proučavanje kitozana i kitozanskih podloga u dermalnoj, oralnoj, bukalnoj, vaginalnoj, rektalnoj i okularnoj primjeni lijekova (Nilsen-Nygaard i sur., 2015).

Kitozanski hidrogelovi dobivaju se na dva načina. Prvi način dobivanja kitozanske viskoelastične podloge je kovalentnim poprečnim povezivanjem kitozanskih polimera. Drugi način je nekovalentnim umrežavanjem tih istih polimera primjerice otapanjem kitozana u razjedenim organskim kiselinama, kako bi se izbjegla potencijalna toksičnost poprečnih umreživača i reagensa, no, s druge strane takvi gelovi pokazuju manju robusnost i lošija mehanička svojstva u odnosu na gelove dobivene kovalentnim povezivanjem polimera (Nilsen-Nygaard i sur., 2015). Kitozanski hidrogelovi intenzivno se istražuju kao biorazgradljivi matriksi u tkivnom inženjerstvu, kao funkcionalni oblozi za rane te kao polučvrste podloge za uklapanje različitih djelatnih tvari poput antimikrobnih lijekova, faktora rasta, matičnih stanica itd. (Liu i sur., 2018), ali i za uklapanje nanočestica poput liposoma u cilju postizanja kontrolirane dopreme lijekova (Binaymotlagh i sur., 2024).

1.5. REOLOGIJA

Reologija je znanstvena disciplina koja proučava tečenje materijala i/ili njegove deformacije pri djelovanju neke vanjske sile. Pri velikim razrjeđenjima i malim molekulskim

masama otopljenih tvari, sustavi se ponašaju kao Newtonovi fluidi, odnosno idealne tekućine i prate Newtonom zakon tečenja opisan jednačbom: $F = \eta \times A \times v/h$, gdje je F primijenjena sila, η označava dinamički koeficijent viskoznosti, A površinu ploča, v je brzina gibanja gornje ploče, a h razmak između ploča. Na Slici 4. prikazan je fluid koji se nalazi između dviju ravnih paralelnih ploča, razmaknutih za udaljenost h i dovoljno velikih površina da se mogu zanemariti učinci rubova. Donja ploča miruje, a gornja ploča površine A , pod djelovanjem sile F , giba se paralelno sa svojom ravninom brzinom v . Čestice uz donju ploču koja se ne giba imaju brzinu $v = 0$, dok čestice uz gornju, gibajuću ploču imaju brzinu jednaku brzini ploče. Takav profil gibanja naziva se lamelarno strujanje (Picout i Ross-Murphy, 2003).



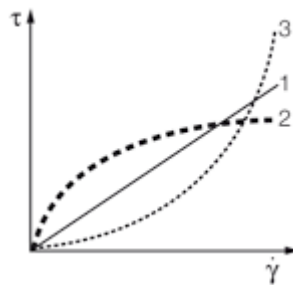
Slika 4. Izračun smičnih naprezanja i brzine smicanja korištenjem modela dviju ploča s površinom smicanja A , širinom razmaka h , silom smicanja F i brzinom v (preuzeto iz <https://www.anton-paar.com>)

Kod Newtonovih je sustava međusobna ovisnost sile i brzine smicanja proporcionalna. Fluidi ne slijede linearan odnos naprezanja i smične deformacije i to su onda ne-Newtonovi fluidi. Modifikacija poznatog Newton-ovog zakona tečenja daje jednačbu: $\tau = \eta \times D$, gdje je τ smično naprezanje (eng. *shear stress*) koje je jednako omjeru sile smicanja F (eng. *shear force*) koja djeluje na površinu A , a D gradijent brzine smicanja (eng. *shear rate*). U viskozimetrijskim mjerenjima η je dinamička viskoznost i konstantna je veličina za jednostavne sustave (Newton-ovi sustavi kao npr. otopine niske koncentracije ili tekućine kao što je voda i zrak) pri datoj temperaturi. Za ne-Newton-ove sustave, koje proučava reologija, η nije konstantna veličina, te se obilježava kao prividna viskoznost, η_{priv} . Ne-Newton-ovi sustavi (guste disperzije, koloidne otopine, polimerne otopine), a takvi su najčešći u farmaceutici. U konačnici, viskoznost η se definira trenjem između slojeva fluida, a prikazuje se kao omjer smičnog naprezanja i brzine smicanja (Jalšenjak, 2003).

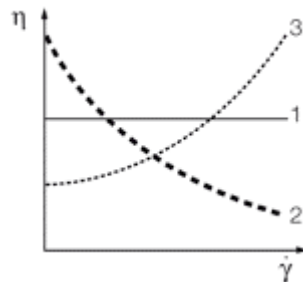
Za određivanje reoloških svojstava formulacija danas se koriste brojni tipovi instrumenata (viskozimetri, reometri), koji rade na različitim principima, a prilagođeni su specifičnim zahtjevima u pogledu primjene i točnosti (preciznosti) rezultata, a primjenjuju se i različiti testovi za reološku karakterizaciju materijala.

1.5.1. Rotacijski testovi

Rotacijski testovi jedan su od vidova reološke karakterizacije uzoraka. Kod rotacijskih testova rotacija može odvijati pri kontroliranoj brzini smicanja pa je rezultat smično naprezanje ili na način da se rotacija odvija pri kontroliranom smičnom naprezanju, a rezultat je različita brzina smicanja. Rotacijski testovi primjenjivi su za Newtonovske sustave tj. idealno viskozne tekućine i viskoelastične tekućine. Oni obuhvaćaju krivulju tečenje tzv. reogram (eng. *flow curve*) koji pokazuje ovisnost smičnog naprezanja o brzini smicanja (Slika 5) i krivulju viskoznosti (eng. *viscosity curve*) koja prikazuje ovisnost viskoznosti o brzini smicanja (Slika 6). Kod idealnih sustava, viskoznost ne ovisi o brzini smicanja, što i prikazuje krivulja (1) na Slici 6. Druge dvije krivulje na Slici 6. prikazuju pseudoplastični (2) i dilatantni (3) sustav.



Slika 5. Krivulja tečenja za idealni sustav (1), pseudoplastični sustav (2) i dilatantni sustav (3) (preuzeto s <https://www.anton-paar.com>)



Slika 6. Krivulja viskoznosti za idealni sustav (1), pseudoplastični sustav (2) i dilatantni sustav (3) (preuzeto s <https://www.anton-paar.com>)

1.5.2. Oscilacijski testovi

Oscilacijski testovi jedan su od načina reološke karakterizacije gdje se oscilacija može odvijati pri kontroliranoj deformaciji pa je rezultat smično naprezanje i fazni pomak ili pak se oscilacija odvija pri kontroliranom smičnom naprezanju pa je rezultat deformacija i fazni pomak. Oscilacijski testovi, osim za Newtonovske sustave i viskoelastične tekućine, primjenjivi su još i za viskoelastične krutine i idealno elastične krutine. Oni obuhvaćaju test promjene amplitude (eng. *amplitude sweep*) koji daje graf ovisnosti modula pohrane i modula gubitka o deformaciji ili o smičnom naprezanju. Cilj tog ispitivanja je ispitati kako se uzorak ponaša tijekom mjerenja pri normalnim uvjetima, te detektirati granicu prilikom koje dolazi do narušavanja unutarnje strukture materijala. Postoji još i test promjene frekvencije (eng. *frequency sweep*), test promjene temperature (eng. *temperature sweep*) i vremenski test (eng. *time sweep*).

Kompleksni modul smicanja predstavlja G^* (Pa), a opisuje viskoelastično ponašanje uzorka. Sastoji se od modula pohrane (G') i modula gubitka (G''). Modul pohrane predstavlja elastični dio viskoelastičnog ponašanja, koji opisuje kruto stanje uzorka, a modul gubitka karakterizira viskozni dio viskoelastičnog ponašanja, što se može vidjeti kao ponašanje tekućeg stanja uzorka. Omjer tih dvaju modula viskoelastičnog ponašanja opisuje faktor gubitka ($\tan \delta$), pri čemu $\tan \delta = G'' / G'$. Ukoliko je sustav idealno elastičan, viskozna komponenta jednaka je 0, samim time i faktor gubitka. Suprotno, u slučaju idealno viskozno sustava, nema elastične komponente pa se vrijednost faktora gubitka približava beskonačnosti.

1.6. AZITROMICIN

Azitromicin (AZT) je polusintetski antibiotik koji spada u skupinu azalida. Molekula lijeka je nastala tako što je modificiran laktonski prsten eritromicina A u položaju 9a, na način da se ugradio metilirani atom dušika u aglukonskom dijelu, dajući molekulu 9-deoksi-9-a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A, čija je molekulska masa 749,0.

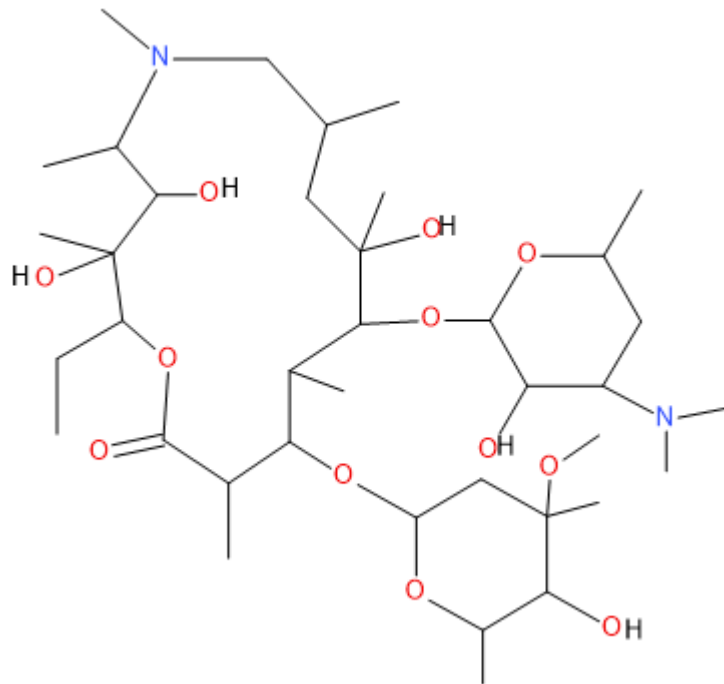
AZT, slično kao i ostali makrolidi, djeluje bakteriostatski tako da inhibira sintezu bakterijskih proteina vežući se na 50S podjedinicu ribosoma te dodatno inhibira translokaciju peptida. Djeluje na većinu gram-pozitivnih i neke gram-negativne bakterije, te anaerobne i intracelularne mikroorganizme. Dodatno još ima imunomodulirajuće i protuupalno djelovanje što rezultira širokim spektrom indikacija kao što su bronhitis, pneumonija, sinusitis,

faringitis/tonzilitis, otitis media, infekcije kože i potkožnog tkiva, nekomplikirane spolne infekcije uzrokovane vrstama *Chlamydia trachomatis* i *Neisseria gonorrhoeae* te bakterijska infekcija oka kao što je konjuktivitis. Pretežito se primjenjuje za infekcije gornjeg i donjeg respiratornog sustava uzrokovane atipičnim uzročnicima, kao antibiotik izbora kod bolesnika preosjetljivih na penicilin ili kada je penicilin neprikladan za korištenje iz drugih razloga (Heidary i sur., 2022).

Dobro se apsorbira iz probavnog sustava, čemu pridonosi i dobra stabilnost AZT u kiselom okruženju želuca. Zbog povećane lipofilnosti razdioba AZT bitno je različita od razdiobe eritromicina. Karakteristična je visoka sklonost vezanju za tkiva i stanice te sporo izlučivanje iz organizma. Nizak afinitet vezanja na proteine plazme jedan je od čimbenika koji pridonose brzom raspodjeli i brzom prodoru AZT iz cirkulacije u tkivo. Zbog visokih koncentracija u tkivima, koje se postižu terapijskim dozama, AZT djeluje i baktericidno, ponajprije na mikroorganizme u fazi razmnožavanja. Sposobnost prodiranja u stanice omogućuje AZT djelotvornost na intracelularne patogene, kao i nakupljanje u neutrofilnim granulocitima, monocitima i makrofagima, koji ga procesom kemotaksije usmjeruju na mjesto upale. Na taj se način postižu mnogo veće koncentracije AZT u području upale nego u zdravom tkivu, čime se ostvaruje usmjereno i ciljano djelovanje antibiotika. To sve rezultira puno manjom terapijskom dozom od srodnih makrolidnih antibiotika, a ujedno i kraćim ukupnim trajanjem terapije.

AZT se u klinici primjenjuje u obliku soli azitromicin dihidrata, uglavnom oralnim putem kao kapsule, tablete ili prašak za oralnu suspenziju. Moguća je i parenteralna primjena u obliku otopine za intravensku infuziju čije trajanje ne smije biti kraće od 60 minuta te lokalno u obliku kapi ili masti za oči. Važno je naglasiti da se AZT prašak za koncentrat za otopinu za infuziju ne smije primjenjivati intramuskularno ni kao bolus.

Moguće nuspojave koje prate primjenu AZT, a koje bi trebalo spriječiti na vrijeme, su superinfekcije (uključujući i gljivične infekcije) i pseudomembranozni kolitis koji možemo spriječiti nadomještanjem korisnih crijevnih bakterija odnosno probioticima. U slučaju primjene viših doza nego što su preporučene, potrebno je uzeti medicinski ugljen i pratiti vitalne funkcije organa. Time se sprječava mučnina, povraćanje, proljev te vraća sluh ukoliko je izgubljen.



Slika 7. Struktura AZT (Izrađeno pomoću programa BIOVIA Draw 2017)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

AZT, kao vrlo potentan antibiotik, uspješno se koristi za liječenje infekcija kože, no dosad nije registrirana niti jedna formulacija koja bi se primjenjivala topikalno, već se primjenjuje isključivo sistemski. Sistemski put primjene antibiotika može uključivati niz nuspojava, a lokalnom primjenom bi se dio njih uklonio ili minimizirao.

U lokalnoj primjeni antibiotika za liječenje infekcija kože i potkožnih tkiva obećavajuću ulogu kao nosači antibiotika pokazali su liposomi. Liposomi posjeduju mnoge povoljne karakteristike kao što je netoksičnost, biokompatibilnost, biorazgradljivost i neimunogenost te kontrolirano i produljeno oslobađanje uklopljenog lijeka. Uklapanjem AZT-a u liposome (AZT-liposomi) moguće je postići bolje otapanje lijeka, kontrolirano i odgođeno oslobađanje na mjestu primjene te poboljšanje antibakterijskog i antibiofilm učinka (Rukavina i sur., 2018). Međutim, tekuća konzistencija liposomskih disperzija može biti ograničavajući faktor u topikalnoj primjeni liposoma zbog smanjenog zadržavanja na mjestu primjenu. Stoga je u ranijem istraživanju (Rukavina i sur., 2023) odabran kitozanski gel za uklapanje različitih vrsta AZT-liposoma kako bi se postigla prikladnija polučvrsta konzistencija formulacije. Kitozanski gel izabran je kao podloga za uklapanje AZT-liposoma i zbog niza benefita kao što je odgovarajuća viskoznost, biorazgradljivost i intrinzična antimikrobna svojstva koja potencijalno mogu doprinijeti ukupnom antimikrobnom učinku liposomskog gela. U navedenom istraživanju pokazalo se da dodatak 30 % (m/m) liposomske disperzije u kitozanski gel smanjuje njegovu viskoznost i utječe na viskoelastična svojstva gela.

Cilj ovog rada bio je pripremiti liposomske gelove uklapanjem različitih vrsta AZT-liposoma (konvencionalni liposomi, propilenglikol liposomi, kationski liposomi) u kitozanski gel pri 3 različite koncentracije u formulaciji (10, 20 i 30 %, m/m), kako bi se utvrdilo kakav utjecaj ima koncentracija AZT-liposoma u kitozanskom gelu, odnosno sastav/površinski naboj uklopljenih liposoma na viskoelastična i reološka svojstva izvornog gela tj. konačne formulacije liposomskog gela. Drugim riječima, cilj je bio provjeriti hipotezu da pri visokom udjelu liposoma u kitozanskom gelu (30 %, m/m) fosfolipidni sastav i površinski naboj uklopljenih liposoma ne pokazuju dominantnu ulogu u reološkim svojstvima formulacije, već je presudni faktor koji utječe na promjenu reoloških svojstava izvornog kitozanskog gela upravo udio tekuće liposomske disperzije koja se dodaje u sustav liposomi-u-gelu.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

Za pripravu liposoma korišteni su dimetildioktadecilamonij bromid (DODAB) proizvođača Sigma-Aldrich (Švicarska), propilenglikol proizvođača Kemig (Hrvatska), dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC) i sojin lecitin (lipoid S75) proizvođača Lipoid GmbH (Njemačka).

Za uparavanje uzoraka korišten je rotacijski vakuum uparivač Büchi Rotavapor R-200, Büchi, (Labortechnik AG, Švicarska). Za ekstruziju liposoma korišten je mini-ekstruder proizvođača LiposoFast Basic, Avestin (Kanada) te polikarbonatne membrane dijametra 19 mm te veličine pora 400 i 100 nm (Liposofast, Avestin, Kanada).

U svrhu rehidracije tankog lipidnog filma pripremljen je fosfatni pufer (PBS) koncentracije 0,01M i pH 7,5 na način da se 1,3609 g kalijevog dihidrogenfosfata KH_2PO_4 otopilo u pročišćenoj vodi u tikvici od 1000 ml. Postepenim dodavanjem 1M kalijeve lužine (KOH) u PBS koji se neprestano miješa na magnetskoj mješalici podešen je pH na pH-metru (Seven Direct SD23, Mettler Toledo, Švicarska) te je u konačnici filtriran kroz celuloza-nitratni filter veličine 0,45 μm proizvođača Sartorius Stedim Biotech (Njemačka).

Ispitivanje veličine i indeksa polidisperznosti provedeno je na zetasizeru Malvern zetasizer ultra (UK), a PBS korišten za razrjeđivanje uzoraka je prethodno filtriran kroz Minisart filtre promjera pora 200 nm (Sigma Aldrich, Njemačka).

Za izradu kitozanske podloge korišten je kitozan visoke molekulske mase proizvođača Sigma-Aldrich (Njemačka) te 88 %-tna mliječna kiselina proizvođača Carlo Erba Reagents (Francuska) koju smo razrijedili do 3,5 %-tne na način da je u odmjerne tikvici od 500 ml 19,886 ml 88 %-tne mliječne kiseline razrijeđeno pročišćenom vodom do oznake. Za ultrazvučno soniciranje korištena je ultrazvučna kupelj (Bandelin electronic GmbH & Co., Berlin, Njemačka). Za reološka ispitivanja korišten je reometar Physica MCR 301 (Anton Paar, Austrija).

3.2. METODE

3.2.1. Priprava liposoma

Pripremljene su tri različite vrste AZT-liposoma hidratacijom tankog fosfolipidnog sloja odnosno tzv. film metodom. Izrađeni su konvencionalni (CL), propilenglikol (PGL) i kationski (CATL) liposomi u koje je uklopljen AZT na način da se pomiješaju lipidi s 15 mg lipofilnog lijeka (AZT) u organskom otapalu (5 ml 96 %-tnog etanola). Za CL i PGL formulacije korišten je lipoid S75, dok se za CATL koristio DPPC i DODAB u molarnom omjeru 17:3. Sastav liposoma prikazan je u Tablici 1. Nakon otapanja lipida i AZT-a u etanolu, etanol je uklonjen uparavanjem pomoću rotacijskog vakuumskeg uparivača pri temperaturi od 40 °C za CL i PGL, tj. 60 °C za CATL, uz postepeno snižavanje tlaka. Kad je sav etanol ispario, dobiveni tanki lipidni film rehidriran je dodatkom 5 ml PBS-a. Takve liposomske formulacije ekstrudirane su pomoću ručnog mini-ekstrudera primjenom jednolikog pritiska.

Postupak ekstruzije uključivao je 2 uzastopna koraka: protiskivanje uzoraka tri puta kroz polikarbonatne membrane promjera pora 400 nm, a zatim tri puta kroz polikarbonatne membrane promjera 100 nm. Ekstruzija za CL i PGL liposome izvedena je pri sobnoj temperaturi. Za CATL, zbog sadržaja lipida više temperature faznog prijelaza, ekstruzija je provedena pri 60 °C, tako što su liposomska formulacija i ručni mini-ekstruder prethodno ugrijani na vodenoj kupelji.

Tablica 1. Sastav AZT-liposoma

LIPOSOMSKE FORMULACIJE	Lipoid S75 (mg)	PG (mg)	DPPC (mg)	DODAB (mg)	AZT (mg)
CL	100	-	-	-	15
PGL	100	1000	-	-	15
CATL	-	-	85	15	15

CATL, kationski liposomi; CL, konvencionalni liposomi; DODAB, dimetildioktadecilamonijev bromid; DPPC, dipalmitoilfosfatidilkolin; Lipoid S75, sojin lecitin; PG, propilenglikol; PGL, propilenglikol liposomi.

3.2.2. Mjerenje veličine i indeksa polidisperznosti

Metodom fotonske korelacijske spektroskopije određeni su srednji promjer vezikula i indeks polidisperznosti liposoma na Zetasizer uređaju. Prije samog mjerenja, uređaj je kalibriran upotrebom standarda. Provedena su 3 mjerenja na temperaturi od 25 °C tijekom 120 s pod kutom raspršenja 90 °. Prije samog mjerenja pripremi se uzorak na način da se uzorak redispersira, a kapljica uzorka prebaci u kivetu te razrijedi prethodno filtriranim PBS-om kako bi se dobili razrijeđeni, blago opalescirajući uzorci.

3.2.3. Priprema kitozanskog gela

Kitozanska podloga za uklapanje AZT-liposoma pripremljena je dispergiranjem 2,5 g kitozana visoke molekulske mase u 10 g propilenglikola. Postupak je uključivao intenzivno ručno miješanje staklenim štapićem tijekom 5 minuta, nakon čega je dodana prethodno izrađena 3,5 %-tna mliječna kiselina (37,5 g) kako bi se postiglo potpuno bubrenje gela, uz postizanje pH vrijednost što bliže pH kože. Nakon dodatka mliječne kiseline smjesa se ponovo intenzivno miješa 5 minuta, a zatim sonicira uz miješanje na ultrazvučnoj kupelji tijekom 60 minuta. Zadnji korak je postepeno dodavanje pročišćene vode u manjim obrocima sve do ukupne mase od 100 g kako bi konačna koncentracija kitozana u gelu iznosila 2,5 %. Gel je prekriven parafilmom i ostavljen da izbubri tijekom narednih 48 sati pri sobnoj temperaturi. Zadnji korak pripreme kitozanskog gela odnosi se degaziranje gela pomoću centrifuge (3 min, 2800 rpm). U konačnici je pomoću pH metra s elektrodom za polučvrste uzorke (Seven Direct SD23, Mettler Toledo, Švicarska) izmjeren pH dobivenog gela, koji je iznosio 4,03.

3.2.4. Uklapanje liposoma u kitozanski gel i reološka ispitivanja liposomskih gelova

AZT-liposomi ručno su umiješani u prethodno izrađenu kitozansku podlogu u tri različite koncentracije, odnosno svaka od korištenih vrsta AZT-liposoma (CL, PGL, CATL) dodana je u 10 %, 20 % i 30 %-tnoj koncentraciji (m/m) u kitozanski gel (CHG) kako je sažeto prikazano u Tablici 2.

Reološka ispitivanja izvornog kitozanskog gela i liposomskih gelova provedena su na reometru koristeći mjerno tijelo PP25 i temperaturnu ploču P-PTD200. Testiranje je provedeno na dvije temperature kako bi se oponašali tipični uvjeti skladištenja (25 °C) i fiziološki uvjeti temperature kože (32 °C), a sva su mjerenja provedena u duplikatu.

Tablica 2. Koncentracija AZT-liposoma u liposomskim gelovima

Liposomski gel	Vrsta Liposoma	Koncentracija liposoma u liposomskom gelu (m/m, %)
CL-CHG-10 %	CL	10
CL-CHG-20 %		20
CL-CHG-30 %		30
PGL-CHG-10 %	PGL	10
PGL-CHG-20 %		20
PGL-CHG-30 %		30
CATL-CHG-10 %	CATL	10
CATL-CHG-20 %		20
CATL-CHG-30 %		30

CATL, kationski liposomi; CHG, kitozanski gel CL, konvencionalni liposomi; PGL, propilenglikol liposomi.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA LIPOSOMA

Fizikalno-kemijska svojstva liposoma, poput veličine, polidisperznosti i zeta potencijala, mogu značajno utjecati na terapijsku učinkovitost liposoma i sposobnost dostave uklopljene djelatne tvari (Vanić i sur., 2021). Stoga su u eksperimentalnom dijelu ovog rada izmjereni srednji promjer, indeks polidisperznosti i zeta potencijal pripremljenih liposoma pomoću metode fotonske korelacijske spektroskopije. Navedena fizikalna svojstva su izmjerena 24 sata nakon izrade liposoma i nakon postupka ekstruzije za sve formulacije AZT-liposoma (CL, PGL i CATL). Rezultati mjerenja prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Fizikalno-kemijska svojstva AZT-liposoma

Vrsta liposoma	Srednji promjer (nm)	Indeks polidisperznosti	Zeta potencijal (mV)
CL	133,1 ± 1,5	0,126 ± 0,022	- 42,7 ± 1,2
PGL	117,5 ± 0,5	0,114 ± 0,005	- 47,9 ± 1,4
CATL	333,7 ± 39,3	0,686 ± 0,305	+ 59,4 ± 1,1

CATL, kationski liposomi; CL, konvencionalni liposomi; PGL, propilenglikol liposomi. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju.

Metodom hidratacije fosfolipidnog sloja nastaju veliki multilamelarni liposomi s visokim indeksom polidisperznosti (Torchilin i Weissig, 2003). Stoga je za dobivanje unilamelarnih liposoma manjeg i ujednačenijeg srednjeg promjera bilo potrebno primjeniti metodu ekstruzije. Ekstruzijom kroz polikarbonatne membrane veličine pora 400 nm (3x) i 100 nm (3x) dobiveni su liposomi srednjeg promjera u rasponu od 133 nm do 333 nm. Najmanji srednji promjer izmjeren je za formulaciju PGL (118 nm), uz najmanji indeks polidisperznosti (0,114) što potvrđuje homogenost raspodjele veličina vezikula u ovom uzorku. CL formulacija pokazala je neznatno veći srednji promjer vezikula (133 nm), uz također nizak indeks polidisperznosti. Najveći srednji promjer pokazali su CATL, što je očekivano uzimajući u obzir fosfolipini sastav ove formulacije. CATL su također pokazali i najveću heterogenost dobivenih vezikula, što se može zaključiti na temelju relativno visokog indeksa polidisperznosti (0,686).

Optimiziranjem veličine liposoma može se postići ravnoteža između količine lijeka koja se može uklopiti u liposome i veličine liposomskih vezikula. Ove vrijednosti moraju biti u skladu s ciljanim putem primjene i dostave lijeka. Prema dosadašnjim istraživanjima, liposomi srednjeg promjera do 300 nm optimalni su za dermalnu primjenu lijeka (Hurler i sur., 2012) te pokazuju povoljnije zadržavanje u višim slojevima kože (Rukavina i sur., 2019). Iz toga proizlazi da su CL i PGL formulacije AZT-liposoma nakon postupka ekstruzije imale srednji promjer u prikladnom rasponu za dermalnu primjenu (do 300 nm), dok je promjer vezikula CATL formulacije bio malo izvan tog optimalnog raspona.

Što se tiče zeta potencijala, dobiveni rezultati su u skladu s fosfolipidnim sastavom liposoma. Zeta potencijal CL i PGL formulacije bio je negativan (- 45 mV, tj. - 48 nm) budući da navedene formulacije kao lipidni konstituens sadrže sojin fosfatidilkolin. S druge strane, CATL formulacija pokazuje pozitivne vrijednosti zeta potencijala (+ 59 nm) jer sadrži kationski lipid DODAB u svom fosfolipidnom dvosloju.

Opisani rezultati fizikalno kemijske karakterizacije liposoma u suglasju su s ranije provedenim istraživanjima (Rukavina i sur., 2018; Rukavina i sur., 2023).

4.2. REOLOŠKA KARAKTERIZACIJA LIPOSOMA U KITOZANSKOM GELU

Mjerenje profila viskoznosti (eng. *viscosity curve*) i oscilacijskih testova (eng. *amplitude sweep*) provedeno je radi reološke karakterizacije liposomskih gelova te samog kitozanskog gela odnosno izvornog gela bez uklopljenih AZT-liposoma. Ovim testovima utvrđena su reološka i viskoelastična svojstva pripremljenih formulacija.

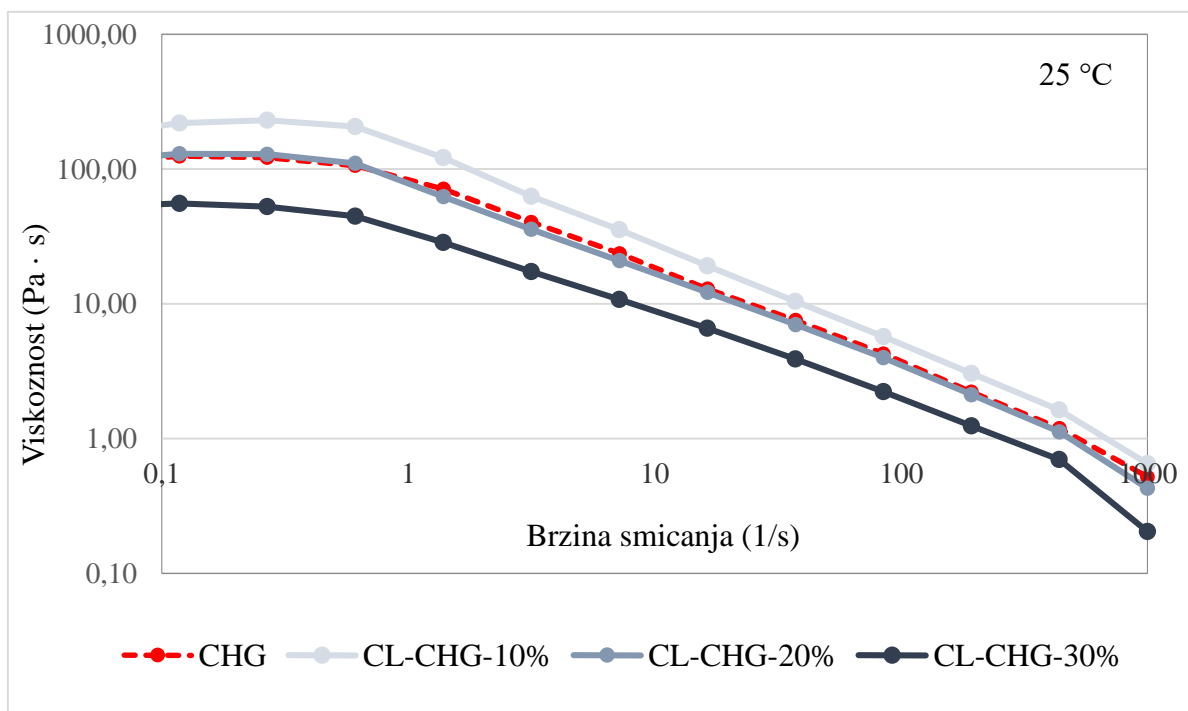
4.2.1. Rotacijski testovi

Ispitivanje viskoznosti CHG i liposomskih gelova (CL-CHG, PGL-CHG, CATL-CHG) provedeno je na dvije različite temperature: 25 °C što predstavlja tipičnu temperaturu skladištenja (Slika 8, Slika 9, Slika 10) i 32 °C koja odgovara fiziološkim uvjetima temperature kože (Slika 11, Slika 12, Slika 13). Viskoznost je prikazana u odnosu na brzinu smicanja, pokazujući smanjenje prilikom povećanja brzine smicanja viskoznost. Točnije, pri manjim brzinama smicanja analizirani sustavi pokazuju konstantnu viskoznost s obzirom na postojanje brojnih međumolekulskih interakcija, pri čemu su lanci polimera međusobno umreženi. Povećanjem vanjske sile smanjuje se viskoznost sustava te u trenu kada je postignuta kritična vrijednost brzine smicanja ili smičnog naprezanja dolazi do pada viskoznosti, kao rezultat pucanja međumolekulskih interakcija te reorganizacije lanaca

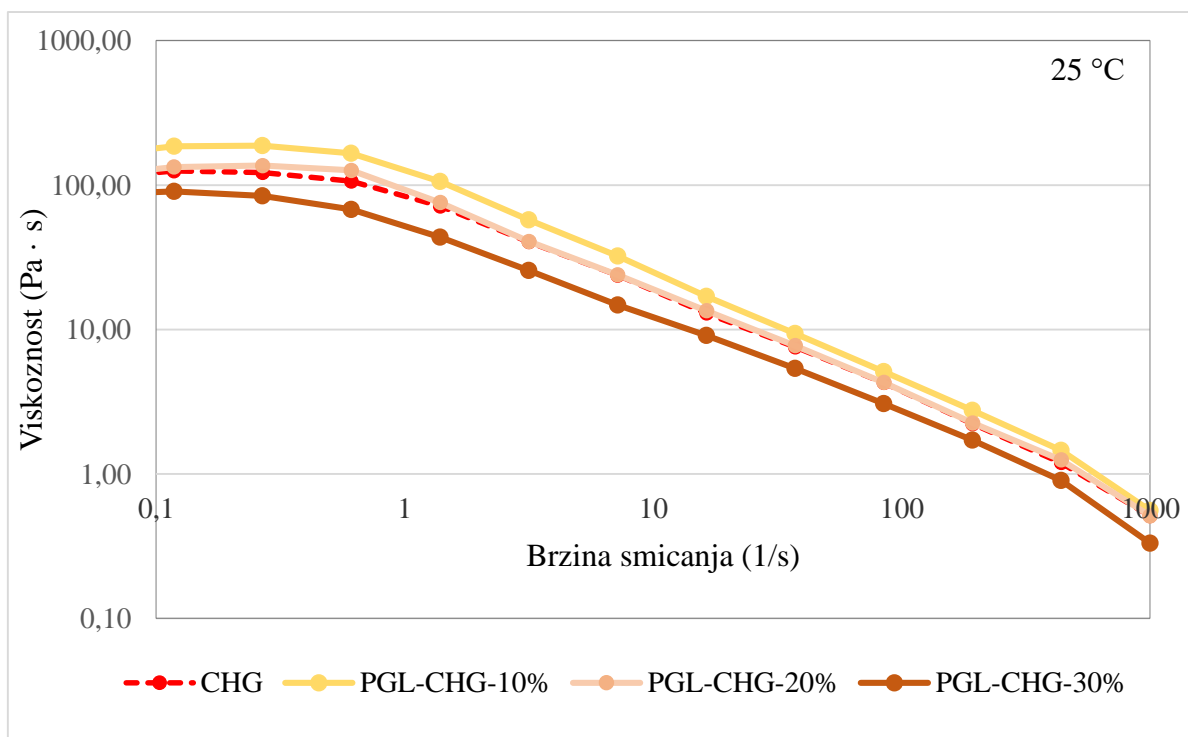
polimera u gelu uslijed djelovanja sile (Chen i sur., 2017). Takvo je pseudoplastično tečenje karakteristično i poželjno za hidrogelove koji se primjenjuju u farmaceutske svrhe jer omogućuje razmazivanje podloge po površini primjenom vanjske sile, dok se prestankom djelovanja sile formulacija zadržava na mjestu primjene (das Neves i Bahia, 2006).

Za uzorke CL-CHG (Slika 8) i PGL-CHG (Slika 9) krivulje viskoznosti dobivene pri 25 °C pokazuju da uklapanjem 10 % (m/m) liposomske disperzije CL tj. PGL u CHG dolazi do povećanja viskoznosti formulacije u odnosu na viskoznost izvornog CHG, uz zadržana pseudoplastična svojstva tečenja. Kada je koncentracija liposomske disperzije CL tj. PGL u liposomskom gelu povećan na 20 % (m/m) nije došlo do značajne promjene viskoznosti i tečenja izvornog CHG, budući da se krivulje CL-CHG-20 % i PGL-CHG-20 % gotovo preklapaju s krivuljom koja označuje izvorni CHG. Nasuprot tome, pri koncentraciji liposoma od 30 % (m/m) u liposomskom gelu uočeno je smanjenje viskoznosti formulacije u odnosu na izvorni CHG, upravo kako je ranije zabilježeno u studiji Rukavine i suradnika (2023).

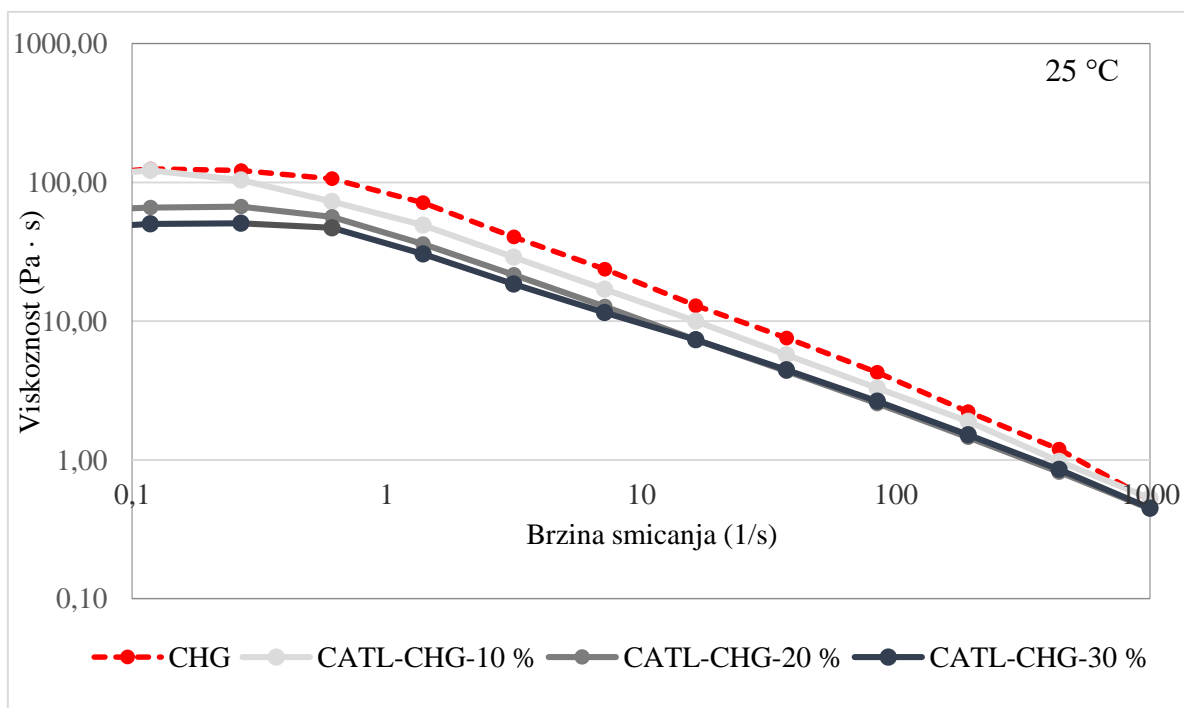
Uzorak CATL-CHG je pokazao nešto drugačije ponašanje u odnosu na uzorke CL-CHG i PGL-CHG. Naime, dodatkom 10, 20 ili 30 % CATL liposoma u CHG dolazi do smanjenja viskoznosti u odnosu na izvorni CHG, pri čemu je smanjenje viskoznosti uzorka izraženije što je koncentracija liposoma u liposomskom gelu veća. Krivulje viskoznosti pritom zadržavaju isti oblik (Slika 10).



Slika 8. Krivulja viskoznosti za izvorni kitozanski gel i CL-CHG liposomske gelove pri 25 °C.



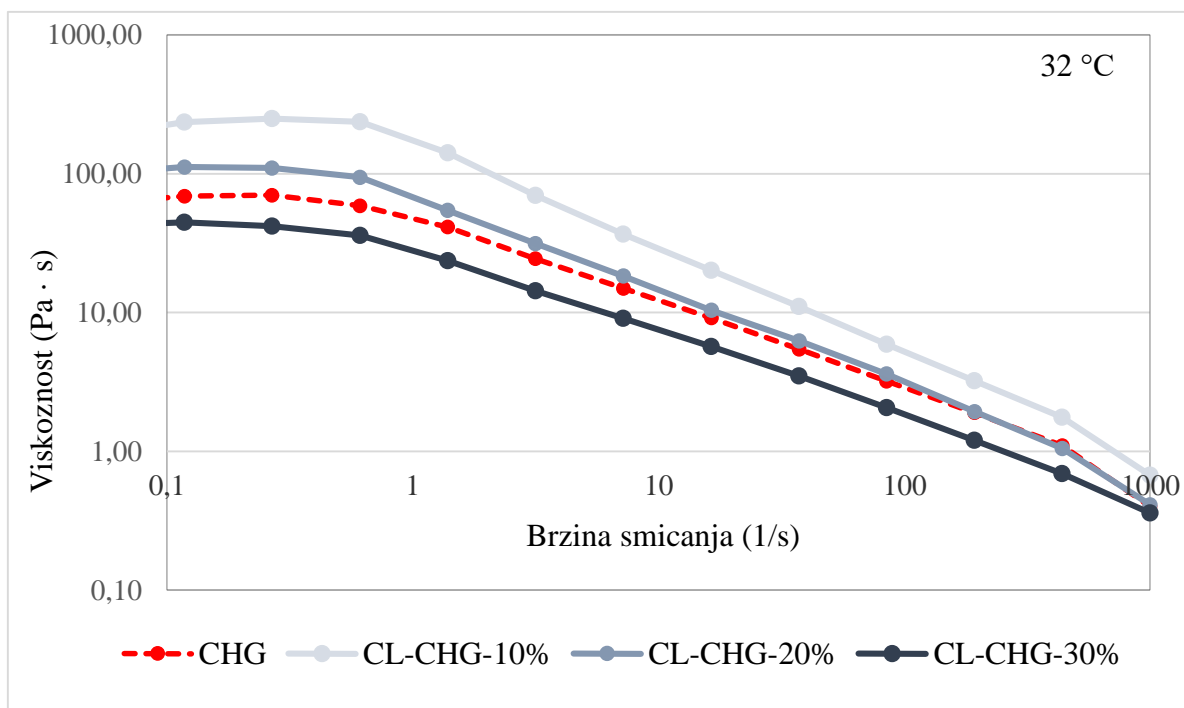
Slika 9. Krivulja viskoznosti za izvorni kitozanski gel i PGL-CHG liposomske gelove pri 25 °C.



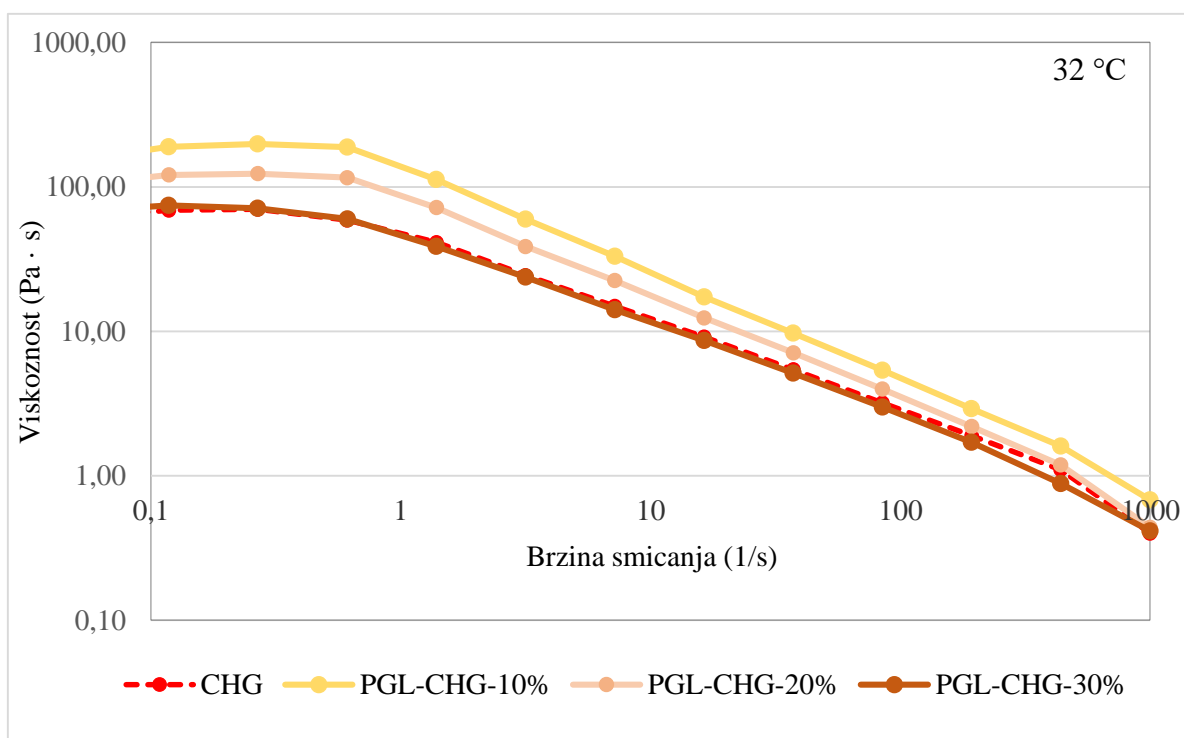
Slika 10. Krivulja viskoznosti za izvorni kitozanski gel i CATL-CHG liposomske gelove pri 25 °C.

Mjerenja provedena pri 32 °C pokazuju da liposomski gel CL-CHG-30 % ima smanjenu viskoznost u uspoređi s izvornim CHG, uz zadržana svojstva tečenja (Slika 11). Međutim, kada je koncentracija CL u formulaciji 20 % (CL-CHG-20%) dolazi do blagog povećanja viskoznosti u odnosu na izvorni CHG, odnosno značajnijeg povećanja viskoznosti kada je koncentracija CL 10 % (CL-CHG-10 %). Za uzorak PGL-CHG-30 % pri 32 °C utvrđeno je da pokazuje gotovo nepromijenjenu krivulju viskoznosti u odnosu na izvorni CHG. Formulacija s manjim udjelom PGL (PGL-CHG-20 %) pokazala se viskoznijom u odnosu na izvorni CHG, dok je formulacija s 10 % PGL (PGL-CHG-10 %) bila najviskoznija pri zadanim uvjetima temperature (Slika 12). Činjenica da PGL ne uzrokuje značajno smanjenje viskoznosti CHG čak ni pri koncentraciji od 30 %, može se najvjerojatnije pripisati prisustvu propilenglikola u liposomima, a za kojeg je poznato da može imati pozitivan utjecaj na teksturna i reološka svojstva gelova (Jøraholmen i sur., 2019).

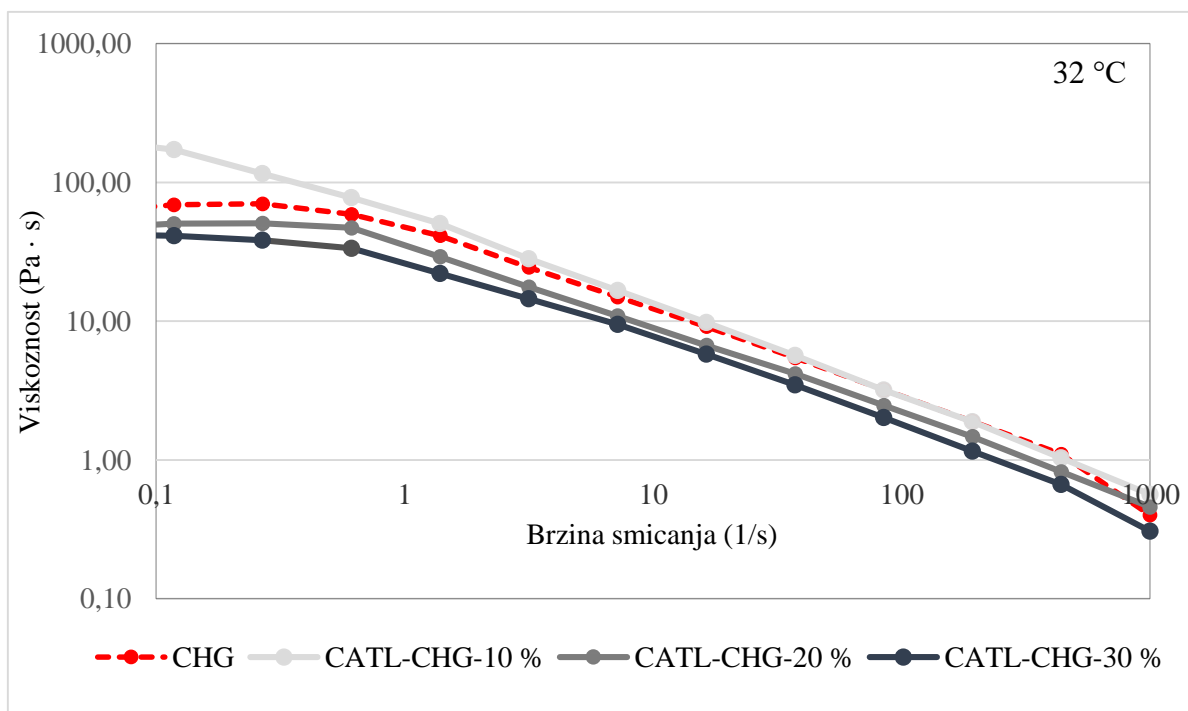
Pri temperaturi od 32 °C, dodatak CATL u izvorni CHG pokazao je različit utjecaj na viskoznost podloge u odnosu na dodatak CL i PGL, slično kao i za mjerenja pri 25 °C. Naime, dodatak CATL u izvorni CHG rezultirao je smanjenjem viskoznosti gela uz zadržan profil tečenja, pri čemu je pad viskoznosti bio razmjern koncentraciji dodane tekuće liposomske formulacije (Slika 13).



Slika 11. Krivulja viskoznosti za izvorni kitozanski gel i CL-CHG liposomske gelove pri 32 °C.



Slika 12. Krivulja viskoznosti za izvorni kitozanski gel i PGL-CHG liposomske gelove pri 32 °C.



Slika 13. Krivulja viskoznosti za izvorni kitozanski gel i CATL-CHG liposomske gelove pri 32 °C.

Krivulje viskoznosti dobivene za različite liposomske gelove (CL-CHG, PGL-CHG, CATL-CHG) pokazuju da fosfolipidni sastav liposoma, tj. površinski naboj, ima određeni utjecaj na viskoznost formulacije, koji više dolazi do izražaja pri nižim koncentracijama liposoma u sustavu. Naime, krivulje viskoznosti na 25 °C pokazuju da negativno nabijeni liposomi CL i PGL pri koncentraciji od 10 % uzrokuju povećanje viskoznosti u odnosu na izvorni CHG, dok pozitivno nabijeni CATL pokazuju blago smanjenje viskoznosti. Pri temperaturi od 32 °C, što je temperatura koja odgovara uvjetima temperature na koži, povećanje viskoznosti nakon dodatka negativno nabijenih liposoma (CL, PGL) uočljivo je pri koncentraciji liposoma od 10 % i 20 %, dok je za pozitivno nabijene CATL pri 10 % i 20 % uočen suprotan efekt (smanjenje viskoznosti).

Slična istraživanja provedena s kitozanskim gelovima (Čačić i sur., 2023; Kaplan i sur.; 2018) su pokazala da dodatak liposoma u kitozanski gel utječe na smanjenje njegove viskoznosti. S druge strane, Hemmingsen i suradnici (2021) su u svom istraživanju pokazali da nakon dodatka liposomskih formulacija u kitozanski gel njegova viskoznost ostaje nepromijenjena. Nabrojane studije razlikuju se s obzirom na koncentraciju kitozana u izvornom gelu, koncentracija liposomske disperzije koja je dodana u gel prilikom izrade liposomskih gelova te obzirom na naboj površinskih vezikula. U istraživanju Hemmingsen i

suradnika (2021) kitozanski hidrogel je sadržavao 4,5 % kitozana, koncentracija liposomske disperzije bila je 10 % (m/m), a površinski naboj vezikula bio je pozitivan. Čačić i suradnici (2023) koristili su 4 %-tni kitozanski gel, koncentracija liposoma iznosio je 30 % (m/m), a svi liposomi bili su negativnog površinskog naboja. Kaplan i suradnici (2018) pripravili su 2 %-tni kitozanski gel uz dodatak 10 % negativno neutralnih/negativno nabijenih liposoma.

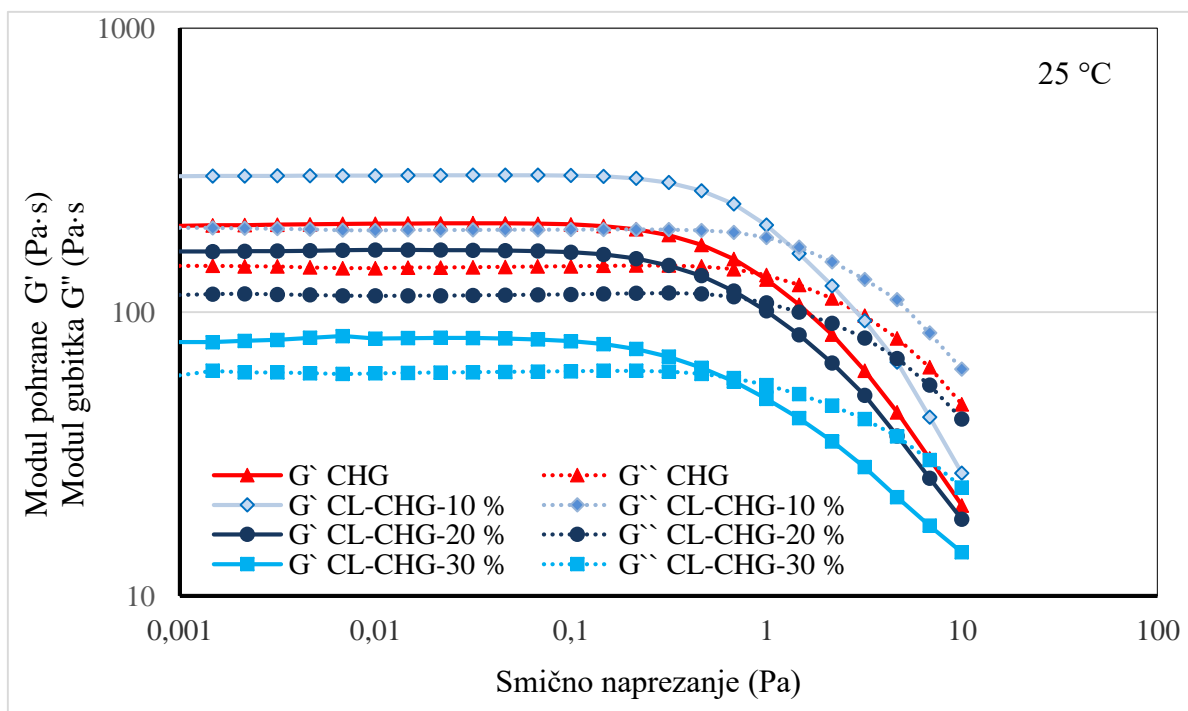
Uzimajući u obzir ranije studije i profile viskoznosti dobivene u ovom istraživanju (Slike 8 – 13), može se zaključiti da na viskoznost liposomskog gela pri manjoj koncentraciji liposoma u formulaciji može utjecati sastav/površinski naboj liposoma, ali je on manje značajan pri većoj koncentraciji liposoma u liposomskom gelu (30 %). Naime, pri velikom udjelu liposoma u gelu, dolazi do značajnijeg razrjeđivanja formulacije, pa neovisno o eventualnim interakcijama liposoma i podloge, tj. neovisno o površinskom naboju vezikula, dolazi do smanjenja viskoznosti liposomskog gela.

4.2.2. Oscilacijski testovi

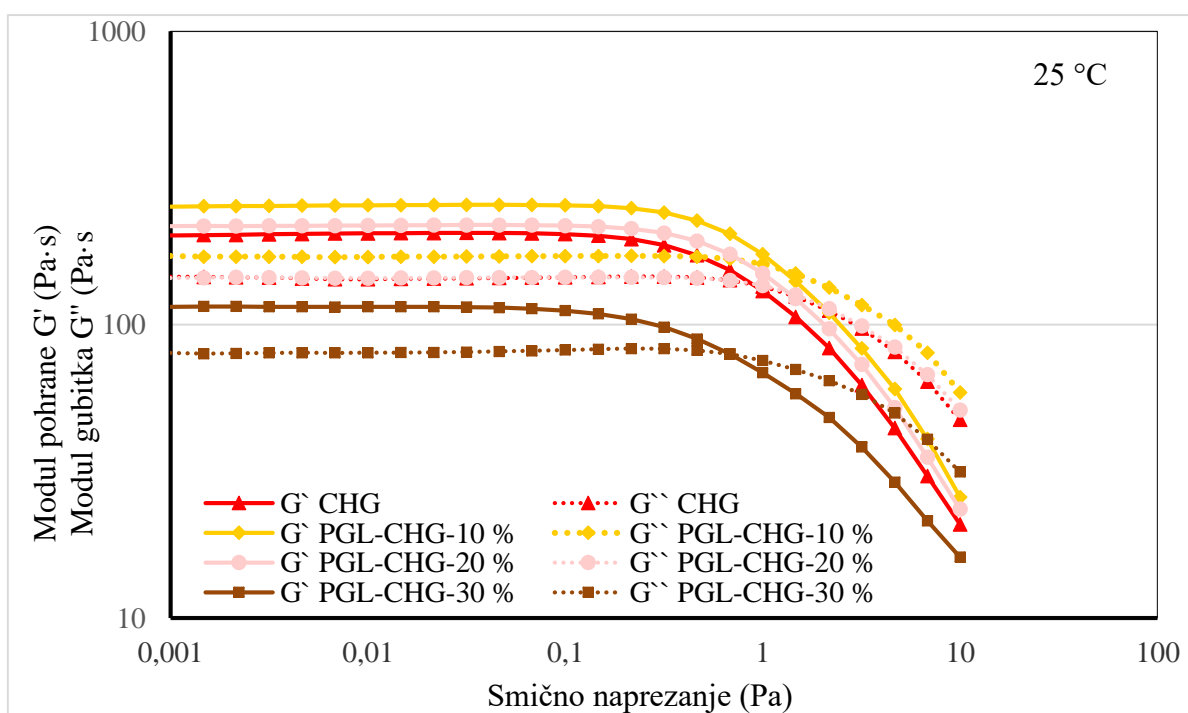
Viskoelastična su svojstva u korelaciji s fizičkim izgledom hidrogelova i terapijskom učinkovitošću polukrutih formulacija (Zhang i sur., 2020). Viskoelastični karakter polučvrstih formulacija najbolje odražavaju oscilacijski testovi, stoga se primjenjuju u reološkoj karakterizaciji hidrogelova (Simões i sur., 2020). U testovima promjene amplitude pri rastućem oscilacijskom naprežanju (eng. *shear stress*) prate se vrijednosti modula skladištenja (G' , eng. *storage modulus*) i modula gubitka (G'' , eng. *loss modulus*) te se, u svrhu procjene čistoće, homogenosti, stabilnosti i/ili robusnosti formulacije, prati ponašanje uzorka u nedestruktivnom deformacijskom rasponu i utvrđuje gornja granica linearne viskoelastične regije (LVR).

Testovi promjene amplitude su provedeni pri 25 °C i 32 °C za izvorni CHG i liposomske gelove pri koncentracijama od 10 %, 20 % i 30 % liposoma u gelu. Sve ispitivane formulacije liposomskih gelova pokazuju linearnu viskoelastičnu regiju (LVR). To je zapravo konstantni plato. odnosno regija u kojoj se vrijednosti modula skladištenja (G') i modula gubitka (G'') ne mijenjaju tj. ne ovise o deformaciji, već samo koreliraju s molekularnom strukturom. Ukoliko je LVR raspon širok, kao što je to slučaj za sve ispitane uzorke (Slike 14–19) formulacije se mogu smatrati dobro dispergiranim i stabilnim (Zhang i sur., 2020).

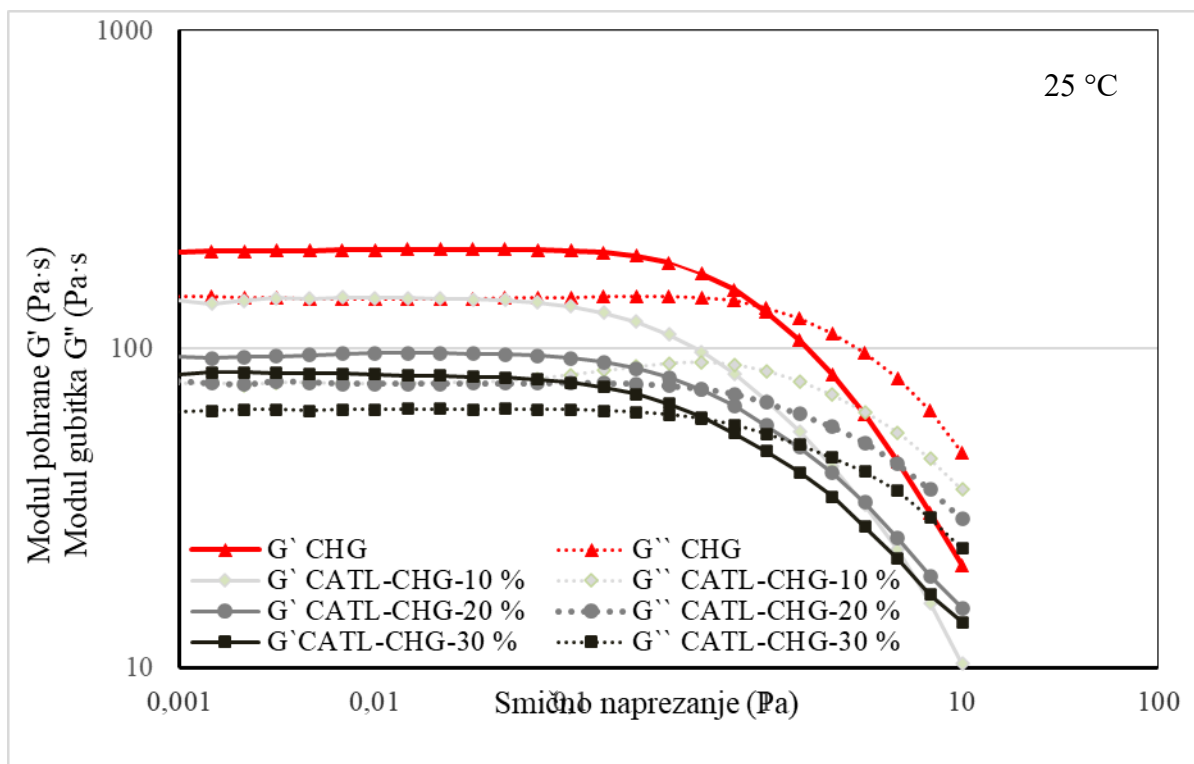
Priroda ispitivanih uzoraka vidi se u odnosu G' i G'' . Što je G' veći od G'' to su dominantnija elastična svojstva, a ukoliko je G' manji od G'' , prevladava viskoznije ponašanje uzorka (Barnes, 2000). Vrijednosti $G' > G''$ koje su utvrđene kako za izvorni CHG, tako i sve liposomske gelove (Slike 14–19), karakteristične su za viskoelastične krutine kao što su hidrogelovi i mogu se pripisati postojanju kemijskih veza ili fizikalno-kemijskih interakcija između polimernih lanaca. Dobiveni rezultati pokazuju da dodatak liposoma u izvorni CHG u koncentraciji $\leq 30\%$ (m/m) ne narušava značajno unutarnju strukturu gela jer svi liposomski gelovi pokazali $G' > G''$, kao i izvorni CHG. Iznad utvrđenih vrijednosti LVR smanjuje se odstupanje između G' i G'' što je vidljivo iz prikazanih grafova (Slika 14-19). To je također tipično ponašanje za polimerne hidrogelove, a uzrok je rastezanje polimernih lanca i djelomično kidanje vodikovih veza u hidrogelu pri visokim vrijednostima smičnog naprezanja. Nakon točke u kojoj se vrijednosti G' i G'' izjednače, sustav se počinje ponašati kao viskozna tekućina s $G' < G''$. Što se ovo izjednačenje vrijednosti G' i G'' događa pri višim vrijednostima smičnog naprezanja, to se može smatrati da je sustav robusniji (Zhang i sur., 2020). Ako se promatraju točke izjednačenja vrijednosti G' i G'' u dobivenim mjerenjima za CHG i sve liposomske gelove, liposomski gelovi pokazuju smanjenje robusnosti s povećanjem koncentracije liposoma u gelu, pri obje ispitivane temperature (25 i 32 °C).



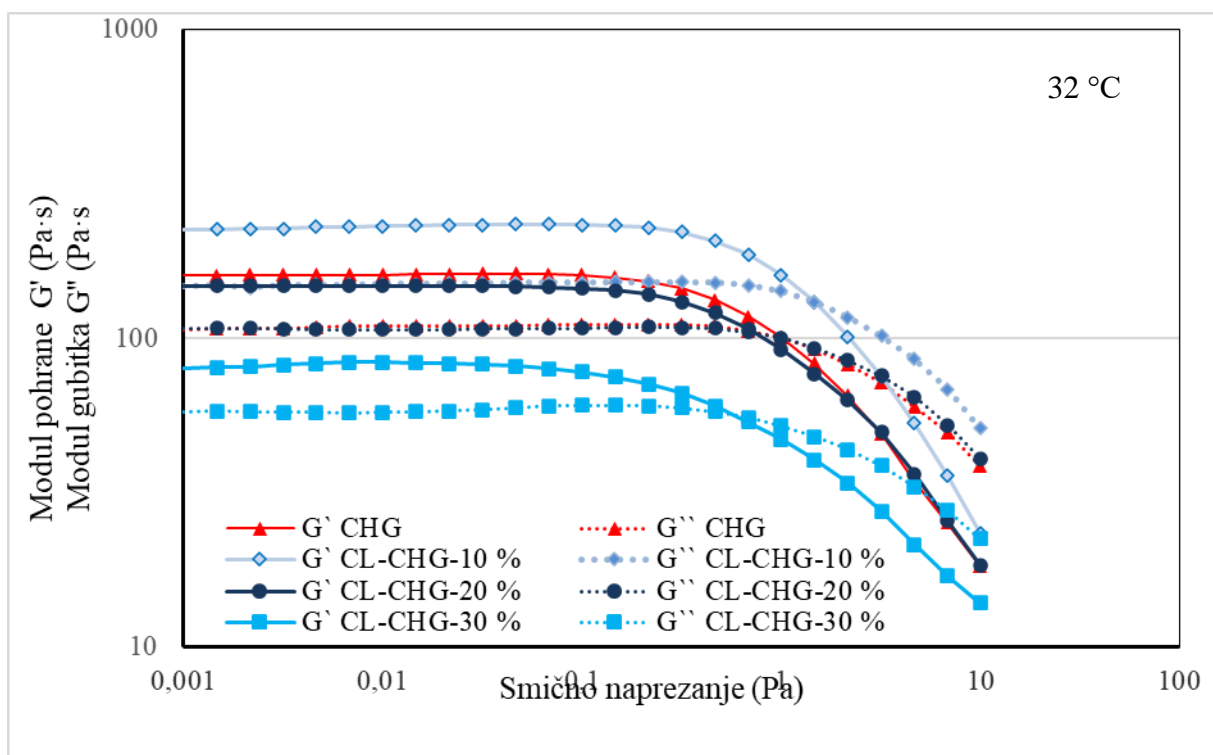
Slika 14. Grafički prikaz ovisnosti modula gubitka G'' i modula pohrane G' o smičnom naprezanju za izvorni CHG i CL-CHG liposomske gelove pri 25 °C.



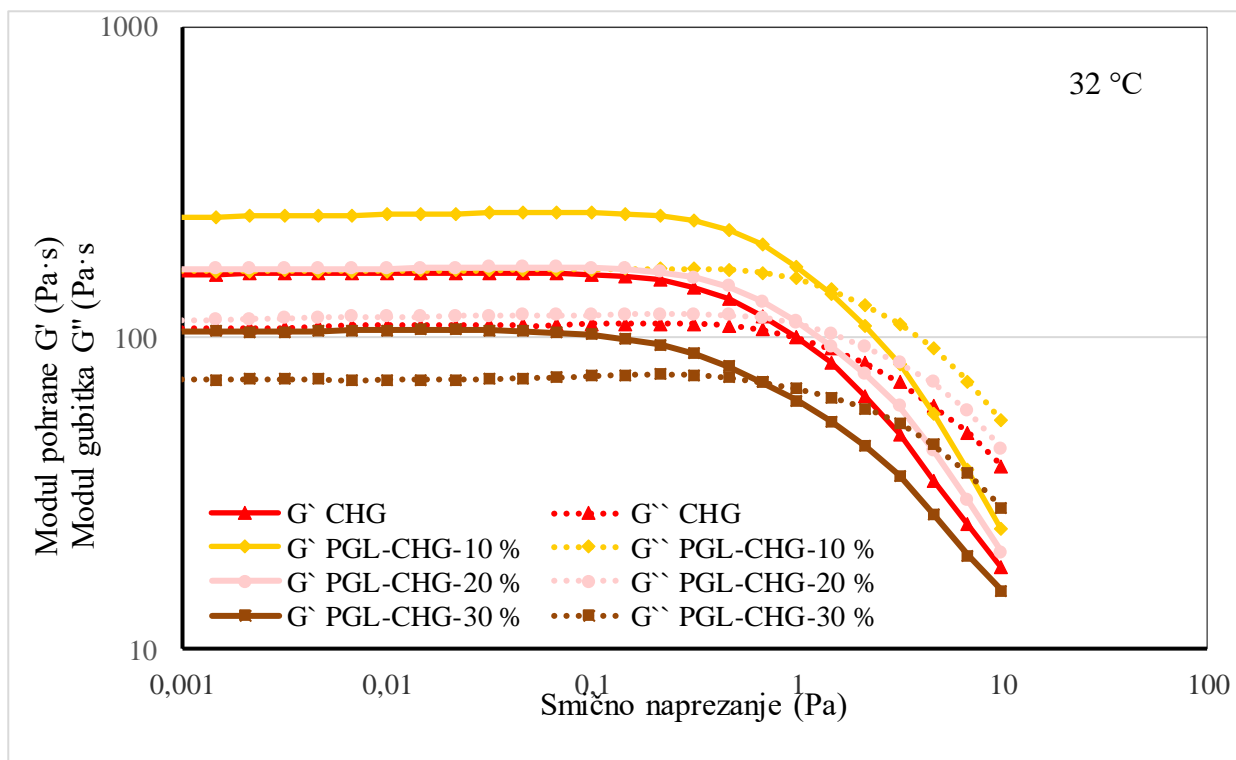
Slika 15. Grafički prikaz ovisnosti modula gubitka G'' i modula pohrane G' o smičnom naprezanju za izvorni CHG i PGL-CHG liposomski gel pri 25 °C.



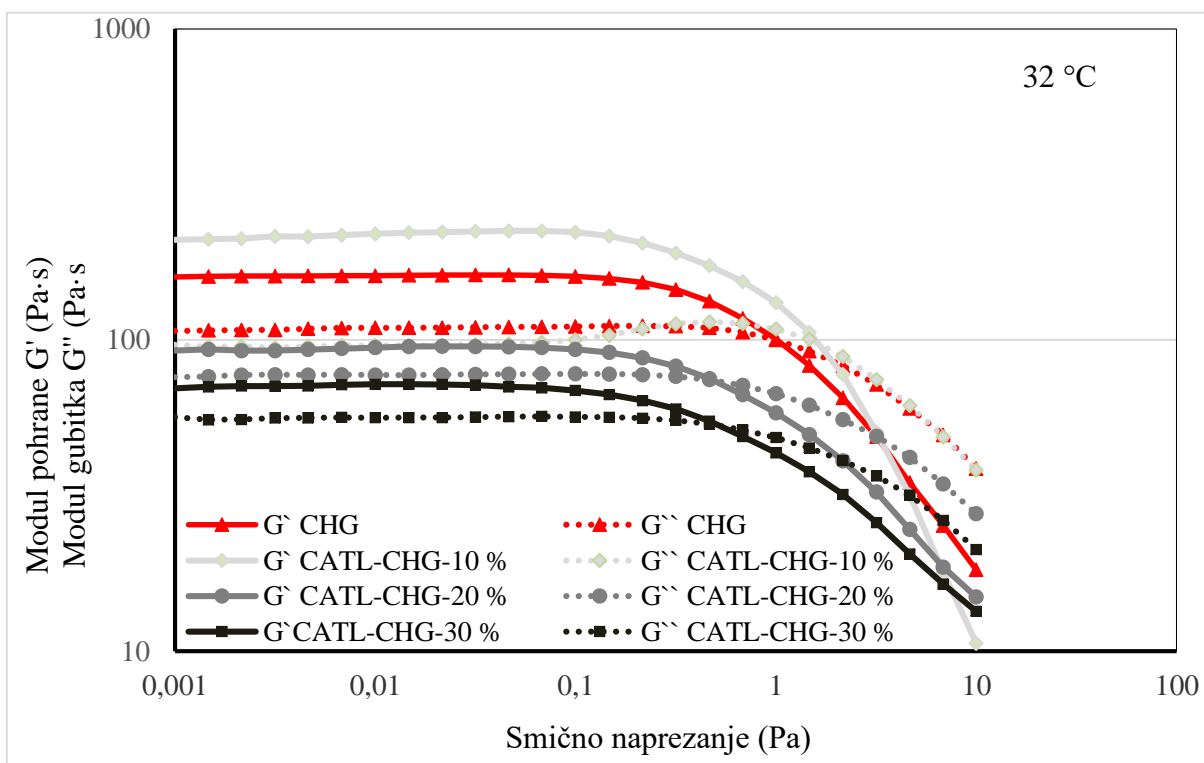
Slika 16. Grafički prikaz ovisnosti modula gubitka G'' i modula pohrane G' o smičnom naprezanju za izvorni CHG i CATL-CHG liposomski gel pri 25 °C.



Slika 17. Grafički prikaz ovisnosti modula gubitka G'' i modula pohrane G' o smičnom naprezanju za izvorni CHG i CL-CHG liposomski gel pri 32 °C.



Slika 18. Grafički prikaz ovisnosti modula gubitka G'' i modula pohrane G' o smičnom naprežanju za izvorni CHG i PGL-CHG liposomski gel pri 32 °C.



Slika 19. Grafički prikaz ovisnosti modula gubitka G'' i modula pohrane G' o smičnom naprežanju za izvorni CHG i CATL-CHG liposomski gel pri 32 °C.

5. ZAKLJUČCI

- Liposomski gelovi pripremljeni su uklapanjem 3 različite vrste AZT-liposoma u CHG, pri čemu su uklopljeni liposomi bili srednjeg promjera < 130 nm (CL i PGL), odnosno 330 nm (CATL), uz odgovarajući indeks polidisperznosti. Zeta potencijal CL i PGL liposoma bio je negativan (-43 mV, -48 mV), dok su CATL pokazali pozitivnu vrijednost zeta potencijala ($+59$ mV).
- Reološkom karakterizacijom CHG i liposomskih gelova utvrđeno je pseudoplastično ponašanje svih formulacija, što je poželjno za ciljanu topikalnu primjenu na kožu.
- Za uzorke CL-CHG-10 % i PGL-CHG-10 % krivulje viskoznosti pri 25 °C pokazuju povećanu viskoznost u odnosu na viskoznost izvornog CHG. CL-CHG-20 % i PGL-CHG-20 % su pokazali viskoznost sličnu izvornom CHG, dok je pri koncentraciji CL tj. PGL od 30 % (CL-CHG-30 %, PGL-CHG-30 %) uočeno smanjenje viskoznosti u odnosu na izvorni CHG.
- Pri 32 °C CL-CHG-30 % pokazuje smanjenu viskoznost u uspoređivanju s izvornim CHG, uz zadržana svojstva tečenja. Međutim, kada je koncentracija CL u formulaciji 20 % dolazi do blagog povećanja viskoznosti u odnosu na izvorni CHG, odnosno značajnijeg povećanja viskoznosti kada je koncentracija CL 10 % (CL-CHG-10 %).
- PGL-CHG-30 % pri 32 °C pokazuje gotovo nepromijenjenu krivulju viskoznosti u odnosu na izvorni CHG. Formulacija s PGL-CHG-20 % pokazala se viskoznijom u odnosu na izvorni CHG, dok je formulacija s 10 % PGL (PGL-CHG-10 %) bila najviskozija.
- Uzorak CATL-CHG je pokazao nešto drugačije ponašanje u odnosu na uzorke CL-CHG i PGL-CHG. Dodatkom 10, 20 ili 30 % CATL liposoma u CHG dolazi do smanjenja viskoznosti u odnosu na izvorni CHG, pri čemu je smanjenje viskoznosti uzorka izraženije što je koncentracija liposoma u liposomskom gelu veći. Opisano ponašanje CATL liposomskih gelova potvrđeno je na obje mjerne temperature (25 i 32 °C).
- Uzimajući u obzir profile viskoznosti liposomskih gelova može se zaključiti da na viskoznost liposomskog gela pri manjoj koncentraciji liposoma (10 i 20 %) može utjecati sastav/površinski naboj liposoma, ali je on manje značajan pri većoj koncentraciji liposoma u liposomskom gelu (30 %). Naime, pri velikom udjelu liposoma u gelu, dolazi do značajnijeg razrjeđivanja formulacije, što je vjerojatno dominantni generator smanjenja viskoznosti sustava.

- Tijekom oscilacijskih testova promjene amplitude, izvorni CHG i svi liposomski gelovi pokazuju širok linearno visko-elastični raspon s modulom skladištenja (G') većim od modula gubitka (G''), što predstavlja viskoelastično ponašanje karakteristično za gelove i potvrđuje da dodatak liposoma u CHG ne narušava strukturu gela. Očuvana struktura gela može osigurati produljeno zadržavanje na mjestu primjene i produljeno oslobađanje lijeka, a uzorci sa širokom LVR regijom ujedno se mogu smatrati dobro dispergiranim i stabilnim.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

AZT- azitromicin

CATL - kationski liposomi s azitromicinom

CHG - kitozanski hidrogel

CL - konvencionalni liposomi s uklopljenim azitromicinom

DD- stupanj deacetilacije (eng. *degree of deacetylation*)

DL - deformabilni liposomi s uklopljenim azitromicinom

DODAB - dimetildioktadecilamonijev bromid

DPPC - dipalmitoilfosfatidilkolin

G' - modul pohrane (eng. *storage modulus*)

G'' - modul gubitka (eng. *loss modulus*)

γ – smična deformacija

HMW – visoka molekulska masa (eng. *high molecular weight*)

LVR – linearni viskoelastični raspon (eng. *linear viscoelastic range*)

PBS – fosfatni pufer

PC – fosfatidilkolin

PGL – propilenglikol liposomi s uklopljenim azitromicinom

S75 – sojin lecitin

SDCh – natrijev deoksikolat

T_c – temperatura faznog prijelaza

7. LITERATURA

Banović J, Bego M, Cuković N, Vanić Ž. Lipidne vezikule za (trans)dermalnu primjenu lijekova. *Farmaceutski glasnik*. 2011, 67(4);229-244

Barnes HA, *A Handbook of Elementary Rheology*, University of Wales, 2000

Basics of rheology | Anton Paar Wiki [Internet]. Anton Paar. Dostupno na: <https://wiki.anton-paar.com/hr-en/basics-of-rheology/#introduction-to-rheology> [pristupljeno 20.05.2024.]

Binaymotlagh R, Hajareh Haghighi F, Chronopoulou L, Palocci C. Liposome-Hydrogel Composites for Controlled Drug Delivery Applications. *Gels*. 2024; 10(4):284.

Bouwstra JA, Honeywell-Nguyen PL. Skin structure and mode of action of vesicles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54: 4 1-55.

Campanhã MTN, Mamizuka EM, Carmona-Ribeiro AM. Interactions between cationic liposomes and bacteria: the physical-chemistry of the bactericidal action. *J Lipid Res*, 1999, 40, 1495–1500

Cevc G, Blume G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim. Biophys. Acta* 1992; 1104: 226-232.

Chen MH, Wang LL, Chung JJ, Kim YH, Atluri P, Burdick JA. Methods to Assess Shear-Thinning Hydrogels for Application As Injectable Biomaterials. *ACS Biomater Sci Eng*, 2017, 3, 3146–3160

Chung YC, Chen CY. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresour Technol* 2008; 99: 2806-2814.

Croisier F., Jerome C., Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, *European Polymer Journal*, 49 (2013) 780-792.

Čačić A. Hidrogelovi s intrizičnom antimikrobnom aktivnosti. [Završni specijalistički rad] Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2020 [pristupljeno 25.05.2024.]

Čačić A, Amidžić Klarić D, Keser S, Radiković M, Rukavina Z, Wenche Jøraholmen M, Uzelac L, Kralj M, Škalko-Basnet N, Šegvić Klarić M, Vanić Ž. A novel approach for the treatment of aerobic vaginitis: azithromycin liposomes-in-chitosan hydrogel. *Pharmaceutics*, 2023, 15, 1356

Čajkovic M. Kozmetologija. Jastrebarsko, Naklada Slap, 2000, str. 25-67

das Neves J, Bahia MF. Gels as vaginal drug delivery systems. *Int J Pharm*, 2006, 318, 1-14

Egbaria K, Ramachandran C, Weiner N. Topical delivery of cyclosporin: evaluation of various formulations using in vitro diffusion studies in hairless mouse skin. *Skin Pharmacol*. 1990; 3:21-28. 1

Elmoslemany RM, Abdallah O, 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. Deformable liposomes and ethosomes as carriers for skin delivery of ketotifen. *Pharmazie* 2007a; 62:133-137.

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

Fong D, Hoemann CD. Chitosan immunomodulatory properties: perspectives on the impact of structural properties and dosage. *Future Sci OA* 2018; 4(1)

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. Lipofection: a highly efficient lipid-mediated DNA transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, 84, 7413–7417.

Heidary M, Samangani AE, Kargari A, Nejad AK, Yashmi I, Motahar M, et al. Mechanism of action, resistance, synergism, and clinical implications of azithromycin. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2022;36(6)

Hemmingsen LM, Giordani B, Pettersen AK Vitali b, Basnet P, Škalko-Basnet N. Liposomes-in-chitosan hydrogel boosts potential of chlorhexidine in biofilm eradication *in vitro*. *Carbohydr Polym*, 2021, 10, 262

Honeywell-Nguyen PL, Bouwstra JA. Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. *Drug Discov. Today: Technol.* 2005; 2:67-74.

Hurler J, Berg OA, Skar M, Conradi AH, Johnsen PJ, Škalko-Basnet N. Improved Burns therapy: Liposomes in hydrogel delivery system for mupirocin. *J Pharm Sci*, 2012, 101 (10), 3906-3915

Jalšenjak, I. Farmaceutika Repetitorij osnova; Praktikum; Seminarski zadaci; FBF, 2010., 16.-17.

Jøraholmen, M.W.; Basnet, P.; Tostrup, M.J.; Moueffaq, S.; Škalko-Basnet, N. Localized Therapy of Vaginal Infections and Inflammation: Liposomes-In-Hydrogel Delivery System for Polyphenols. *Pharmaceutics* 2019, 11, 53. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11020053>

Kaplan M, Tuğcu-Demiröz F, Vural I and Çelebi N. Development and characterization of gels and liposomes containing ovalbumin for nasal delivery. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2018, 44, 108- 117

Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Delivery Rev*, 2010, 62, 3-11

Kesharwani P, Kumari K, Gururani R, Jain S, Sharma S. Approaches to Address PK-PD Challenges of Conventional Liposome Formulation with Special Reference to Cancer, Alzheimer's, Diabetes, and Glaucoma: An Update on Modified Liposomal Drug Delivery System. *Curr Drug Metab.* 2022;23(9):678-692

Kocić I. In vitro ispitivanja biokompatibilnosti liposoma različitog (fosfo)lipidnog sastava sa stanicama fibroblasta [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2019 [pristupljeno 27.05.2024.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:353408>

Lai-Cheong JE, McGrath JA. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine* 2021;49(6):337–42

Liu H, Wang C, Li C i sur. A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. *RSC Adv* 2018; 8:7533-7549

Mediately [Internet]. Mediately. Available from: <https://mediately.co/hr/drugs?q=azitromicin>

Mun S, Decker E. A, McClements D. J. „Effect of molecular weight and degree of deacetylation of chitosan on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant–chitosan membranes“. *Journal of Colloid and Interface Science*, 296, 2, 2006., 581–90.

Nižić L, Ugrina I, Špoljarić D, Saršon V, Kučuk M.S, Pepić I, Hafner A. Innovative sprayable in situ gelling fluticasone suspension: Development and optimization of nasal deposition. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, 563, 445–456

Novosel M. In vitro ispitivanje oslobađanja azitromicina iz elastičnih liposoma [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2015 [pristupljeno 05.06.2024.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:79133>

Nilsen-Nygaard J, Strand SP, Vårum KM, Draget KI, Nordgård CT. Chitosan: gels and interfacial properties. *Polymers* 2015; 7(3): 552-579.

Pavelić Ž, Škalko-Basnet N, Jalšenjak I. Gel s liposomski uklopljenim kloramfenikolom: karakterizacija i oslobađanje in vitro ;2004.

Picout DR, Ross-Murphy SB. Rheology of biopolymer solutions and gels. *ScientificWorldJournal*. 2003; 3:105-21

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

Rehman K, Zulfakar MH. Recent advances in gel technologies for topical and transdermal drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm*, 2014, 40, 433-440.

Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 2006, 31, 603–632

Rukavina, Z; Jøraholmen, M.W; Škalko-Basnet, N.; Božić, D; Golja Gašparović, P; Vanić, Ž Texture characterization of chitosan-based liposomal hydrogels for dermal delivery of azithromycin // EUFEPS Annual Meeting 2023 Book of abstracts. Lisbon: EUFEPS, 2023. str. 127-127

Rukavina Z. Razvoj novih fosfolipidnih terapijskih sustava za topikalnu antimikrobnu terapiju [Disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2019 [pristupljeno 26.05.2024.]

Simões S, Miranda M, Cardoso C, Veiga F, Vitorino C. Rheology by Design: A regulatory Tutorial for Analytical Method Validation. *Pharmaceutics*, 2020, 12, 820

Singh D, Mital N, Kaur G. Topical Drug Delivery Systems: A Patent Review. *Expert Opin Ther Pat*, 2015, 26, 213-228.

Singh S, Vardhan H, Kotla NG, Maddiboyina B, Sharma D, Webster TJ. The role of surfactants in the formulation of elastic liposomal gels containing a synthetic opioid analgesic. *Int J Nanomed*, 2016, 11, 1475–1482.

Torchilin V, Weissig. Liposomes: A Practical Approach. New York; Oxford University Press. 2003

Touitou E, Dayan N, Bergelson L, Godin B, Eliaz M. Ethosomes-novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *J. Control. Release* 2000; 65:403-418.

Tyagi RK, Garg NK, Dalai SK, Awasthi A. Transdermal immunization of *P. falciparum* surface antigen (MSP-119) via elastic liposomes confers robust immunogenicity. *Hum Vacc Immunother*, 2016, 12, 990-992.

Van Kuijk-Meuwissen MEMJ, Junginger HE, Bouwstra JA. Interactions between liposomes and human skin in vitro, a confocal laser scanning microscopy study. *Biochim. Biophys. Acta* 1998; 1371 :31-39

Vanić Ž. In vitro ispitivanja biokompatibilnosti liposoma različitog (fosfo)lipidnog sastava sa stanicama fibroblasta .Repozitorij Farmaceutsko-biokemijskog Fakulteta Sveučilišta U Zagrebu. 2019

Vanić Ž. In vitro ispitivanje oslobađanja azitromicina iz elastičnih liposoma. Repozitorij Farmaceutsko-biokemijskog Fakulteta Sveučilišta U Zagrebu. 2015

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

Vanić Ž, Jøraholmen MW, Škalko-Basnet N. Nanomedicines for the topical treatment of vulvovaginal infections: Addressing the challenges of antimicrobial resistance, *Adv Drug Deliv*, 2021, 178

Vanić Ž. Phospholipid vesicles for enhanced drug delivery in dermatology; *J Drug Discov Develop and Deliv.*;2014;1(2):8.

Vanić Ž, Maja ŠK. Hidrogelovi s intrinzičnom antimikrobnom aktivnosti . Repozitorij Farmaceutsko-biokemijskog Fakulteta Sveučilišta U Zagrebu. 2020.

Vanić Ž, Rukavina Z, Manner S, Fallarero A, Uzelac L, Kralj M, Amidžić Klarić D, Bogdanov A, Raffai T, Virok DP, Filipović-Grčić J, Škalko-Basnet N. Azithromycin-liposomes as a novel approach for localized therapy of cervicovaginal bacterial infections. *Int J Nanomed.*, 2019, 14, 5957-5976

Verma D. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *International Journal of Pharmaceutics* 2003;258(1–2):141–51

Vieira DB, Carmona-Ribeiro AM. Cationic lipids and surfactants as antifungal agents: mode of action. *J Antimicrob Chemother*, 2006, 58, 760–767.

Wallace LA, Gwynne L, Jenkins T. Challenges and opportunities of pH in chronic wounds. *Ther. Deliv.*, 2019, 10, 719–735

Zhang H, Osmałek T, Michniak-Kohn B. Deformable Liposomal Hydrogel for Dermal and Transdermal Delivery of Meloxicam. *Int J Nanomed*, 2020, 15, 9319-9335

Zhao YZ, Dai DD, Lu CT, Chen LJ, Lin M, Shen XT, Li XK, Zhang M, Jiang X, Jin RR, Li X, Lv HF, Cai L, Huang PT. Epirubicin loaded with propylene glycol liposomes significantly overcomes multidrug resistance in breast cancer. *Cancer Lett*, 2013, 330, 74-83

Zivanovic S, Davis RH, Golden DA. Chitosan as an antimicrobial in food products. U: Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality. *Taylor TM*. 2015, 153-173

8. SAŽETAK

Liposomski gelovi (CL-CHG, PGL-CHG, CATL-CHG) pripremljeni su uklapanjem različitih vrsta AZT-liposoma u CHG pri 3 različite koncentracije (10, 20 i 30 %, m/m). Uklopljeni su liposomi bili srednjeg promjera < 130 nm (CL i PGL), odnosno 330 nm (CATL). Zeta potencijal CL i PGL bio je izrazito negativan (– 43 mV, – 48 mV), dok su CATL pokazali izrazito pozitivnu vrijednost zeta potencijala (+ 59 mV). Krivulje viskoznosti dobivene za liposomske gelove pokazuju da fosfolipidni sastav liposoma, tj. površinski naboj, ima određeni utjecaj na viskoznost formulacije, koji više dolazi do izražaja pri nižim koncentracijama liposoma u sustavu. Naime, negativno nabijeni liposomi CL i PGL pri koncentraciji od 10 % ili 20 % uzrokuju povećanje viskoznosti u odnosu na izvorni CHG, dok je za pozitivno nabijene CATL pri 10 % i 20 % uočen suprotan efekt (smanjenje viskoznosti). Pri najvećoj koncentraciji liposoma u gelu (30 %), dolazi do smanjenja viskoznosti formulacije neovisno o površinskom naboju liposoma, što je vjerojatno rezultat značajnog smanjenja koncentracije kitozana u gelu uslijed razrjeđivanja dodatkom tekuće faze. Tijekom oscilacijskih testova promjene amplitude, izvorni CHG i svi liposomski gelovi pokazuju širok LVR s modulom skladištenja (G') većim od modula gubitka (G''), što predstavlja viskoelastično ponašanje karakteristično za gelove i potvrđuje da dodatak liposoma u CHG u koncentraciji $\leq 30\%$ (m/m) ne narušava strukturu gela. Očuvana struktura gela može osigurati produljeno zadržavanje na mjestu primjene i produljeno oslobađanje lijeka, a uzorci sa širokom LVR regijom ujedno se mogu smatrati dobro dispergiranim i stabilnim.

SUMMARY

Liposomal gels (CL-CHG, PGL-CHG, CATL-CHG) were prepared by incorporating different types of AZT-liposomes into CHG at three different concentrations (10, 20, 30%, w/w). The incorporated liposomes had an average diameter <130 nm (CL, PGL) or 330 nm (CATL). The zeta potential of CL and PGL liposomes was strongly negative (-43 mV, -48 mV), while CATL exhibited strongly positive zeta potential (+59 mV). The viscosity curves obtained for the liposomal gels indicate that the phospholipid composition/surface charge of the liposomes, has an impact on the viscosity of the formulation, which is more pronounced at lower liposome concentrations in the formulation. Specifically, negatively charged CL and PGL liposomes at 10% or 20% cause an increase in viscosity compared to the original CHG, while for positively charged CATL at 10% and 20%, an opposite effect (viscosity decrease) was observed. At the highest liposome concentration in the gel (30 %), the viscosity of the formulation decreases regardless of the surface charge of the liposomes, which is likely the result of a significant reduction in the chitosan concentration in the gel due to dilution by the added liquid phase. During oscillatory amplitude tests, the original CHG and all liposomal gels show a wide LVR with a storage modulus (G') greater than the loss modulus (G''), which represents viscoelastic behavior characteristic of gels and confirms that the addition of liposomes to CHG at a concentration $\leq 30\%$ (w/w) does not compromise the gel structure. The preserved gel structure can ensure prolonged retention at the site of application and extended drug release. Moreover, samples with a broad LVR region can also be considered well-dispersed and stable.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko- biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Farmaceutsku tehnologiju
Ul. kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

UTJECAJ KONCENTRACIJE I POVRŠINSKOG NABOJA LIPOSOMA NA REOLOŠKA SVOJSTVA KITOZANSKIH LIPOSOMSKIH GELOVA

Jelena Bočkaj

SAŽETAK

Liposomski gelovi (CL-CHG, PGL-CHG, CATL-CHG) pripremljeni su uklapanjem različitih vrsta AZT-liposoma u CHG pri 3 različite koncentracije (10, 20 i 30 %, m/m). Uklopljeni su liposomi bili srednjeg promjera < 130 nm (CL i PGL), odnosno 330 nm (CATL). Zeta potencijal CL i PGL bio je izrazito negativan (- 43 mV, - 48 mV), dok su CATL pokazali izrazito pozitivnu vrijednost zeta potencijala (+ 59 mV). Krivulje viskoznosti dobivene za liposomske gelove pokazuju da fosfolipidni sastav liposoma, tj. površinski naboj, ima određeni utjecaj na viskoznost formulacije, koji više dolazi do izražaja pri nižim koncentracijama liposoma u sustavu. Naime, negativno nabijeni liposomi CL i PGL pri koncentraciji od 10 % ili 20 % uzrokuju povećanje viskoznosti u odnosu na izvorni CHG, dok je za pozitivno nabijene CATL pri 10 % i 20 % uočen suprotan efekt (smanjenje viskoznosti). Pri najvećoj koncentraciji liposoma u gelu (30 %), dolazi do smanjenja viskoznosti formulacije neovisno o površinskom naboju liposoma, što je vjerojatno rezultat značajnog smanjenja koncentracije kitozana u gelu uslijed razrjeđivanja dodatkom tekuće faze. Tijekom oscilacijskih testova promjene amplitude, izvorni CHG i svi liposomski gelovi pokazuju širok LVR s modulom skladištenja (G') većim od modula gubitka (G''), što predstavlja viskoelastično ponašanje karakteristično za gelove i potvrđuje da dodatak liposoma u CHG u koncentraciji $\leq 30\%$ (m/m) ne narušava strukturu gela. Očuvana struktura gela može osigurati produljeno zadržavanje na mjestu primjene i produljeno oslobađanje lijeka, a uzorci sa širokom LVR regijom ujedno se mogu smatrati dobro dispergiranim i stabilnim.

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

Rad sadrži: 43 stranice, 19 grafičkih prikaza, 3 tablice i 64 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Deformabilni liposomi, azitromicin, karbopolski gel, kitozanski gel, Biokompatibilnost, HaCaT stanice

Mentor: **Doc. dr. sc. Zora Rukavina**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Doc. dr. sc. Zora Rukavina**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Laura Nižić Nodilo, *viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Kristina Radić, *viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: Kolovoz 2024.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Technology
Ul. kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

INFLUENCE OF LIPOSOME CONCENTRATION AND SURFACE CHARGE ON THE RHEOLOGICAL PROPERTIES OF CHITOSAN LIPOSOMAL GELS

Jelena Bočkaj

SUMMARY

Liposomal gels (CL-CHG, PGL-CHG, CATL-CHG) were prepared by incorporating different types of AZT-liposomes into CHG at three different concentrations (10, 20, 30%, w/w). The incorporated liposomes had an average diameter <130 nm (CL, PGL) or 330 nm (CATL). The zeta potential of CL and PGL liposomes was strongly negative (-43 mV, -48 mV), while CATL exhibited strongly positive zeta potential (+59 mV). The viscosity curves obtained for the liposomal gels indicate that the phospholipid composition/surface charge of the liposomes, has an impact on the viscosity of the formulation, which is more pronounced at lower liposome concentrations in the formulation. Specifically, negatively charged CL and PGL liposomes at 10% or 20% cause an increase in viscosity compared to the original CHG, while for positively charged CATL at 10% and 20%, an opposite effect (viscosity decrease) was observed. At the highest liposome concentration in the gel (30 %), the viscosity of the formulation decreases regardless of the surface charge of the liposomes, which is likely the result of a significant reduction in the chitosan concentration in the gel due to dilution by the added liquid phase. During oscillatory amplitude tests, the original CHG and all liposomal gels show a wide LVR with a storage modulus (G') greater than the loss modulus (G''), which represents viscoelastic behavior characteristic of gels and confirms that the addition of liposomes to CHG at a concentration $\leq 30\%$ (w/w) does not compromise the gel structure. The preserved gel structure can ensure prolonged retention at the site of application and extended drug release. Moreover, samples with a broad LVR region can also be considered well-dispersed and stable.

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

Thesis includes: 43 pages, 19 figures, 3 tables and 43 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Deformable liposomes, azithromycin, carbopol gel, chitosan gel, biocompatibility, HaCaT cells

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

Reviewers: **Zora Rukavina, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Laura Nižić Nodilo, Ph.D. Senior Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Kristina radić, Ph.D. Senior Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August 2024

