

Liposomi kao nosači lijekova: metode priprave

Vanić, Željka

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2012, 68, 457 - 466**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:376525>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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



Liposomi kao nosači lijekova: metode priprave

ŽELJKA VANIĆ

Zavod za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu

UVOD

Tijekom četrdesetak godina poznavanja liposoma kao nosača lijekova razvijeni su brojni postupci za njihovu pripravu. Odabirom odgovarajuće metode moguće je pripremiti liposome određene veličine, lamelarnosti i sadržaja uklopljenog lijeka. Pritom je važno voditi računa o svojstvima lijeka koji se želi uklopiti u liposome, kompoziciji fosfolipida koji će sačinjavati dvosloj, organskim otapalima i detergensima za otapanje membranskih komponenti, kao i o mogućnostima njihovog uklanjanja iz gotovog pripravka. Optimalna metoda priprave bila bi ona koja rezultira liposomima visoke uspješnosti uklapanja lijeka, te izbjegava uporabu štetnih organskih otapala, a da je pritom cijeli postupak jednostavan i reproducibilan.

S obzirom da isti fosfolipidi različitih proizvođača mogu međusobno varirati u sastavu, prije priprave liposoma potrebno je provesti kvantifikaciju fosfolipida odgovarajućom metodom (1). Dobar odabir membranskih komponenti važan je zbog mogućeg utjecaja na toksičnost, ali i na stabilnost gotovog pripravka. Uobičajeno je korištenje nezasićenih fosfolipida: fosfatidilkolina (lecitina) iz žutanjaka jaja (PC), fosfatidne kiseline (PA) i fosfatidilglicerola (PG), te zasićenih fosfolipida: dimiristoil-fosfatidilkolina (DMPC), dipalmitoil-fosfatidilkolina (DPPC), dipalmitoil-fosfatidne kiseline (DPPA) i dimiristoil-fosfatidilglicerola (DMPG). Za njih je dobro poznato da su gotovo netoksični. Stearilamin se dodaje u membranu kada se želi postići pozitivan naboj na površini. Međutim, *in vivo* istraživanja primjene takvih liposoma na animalnom modelu upućuju na potencijalnu toksičnost uzrokovanu stearilaminom (2). Da bi se postigla adekvatna čvrstoća (stabilnost) fosfolipidnog dvosloja, neovisno o naboju na površini liposoma, često se rabi kolesterol (3).

METODE PRIPRAVE

Gotovo sve metode priprave 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 pripreve liposoma vrijedi pravilo da se lipofilni lijekovi dodaju zajedno s fosfolipidima otopljenima u organskom otapalu, dok se hidrofilni dodaju otopljeni u vodenoj fazi.

S obzirom na način dispergiranja fosfolipida, metode pripreve liposoma se mogu podijeliti u tri velike skupine: fizičkog dispergiranja, dvofaznog dispergiranja i solubilizacije pomoću detergensa. Također je moguća podjela s obzirom na morfološka svojstva liposoma, te se u tom smislu razlikuju metode pripreve oligo- i multi-lamelarnih liposoma (OLV, MLV), malih i velikih unilamelarnih liposoma (SUV, LUV) te multivezikularnih liposoma (MVL).

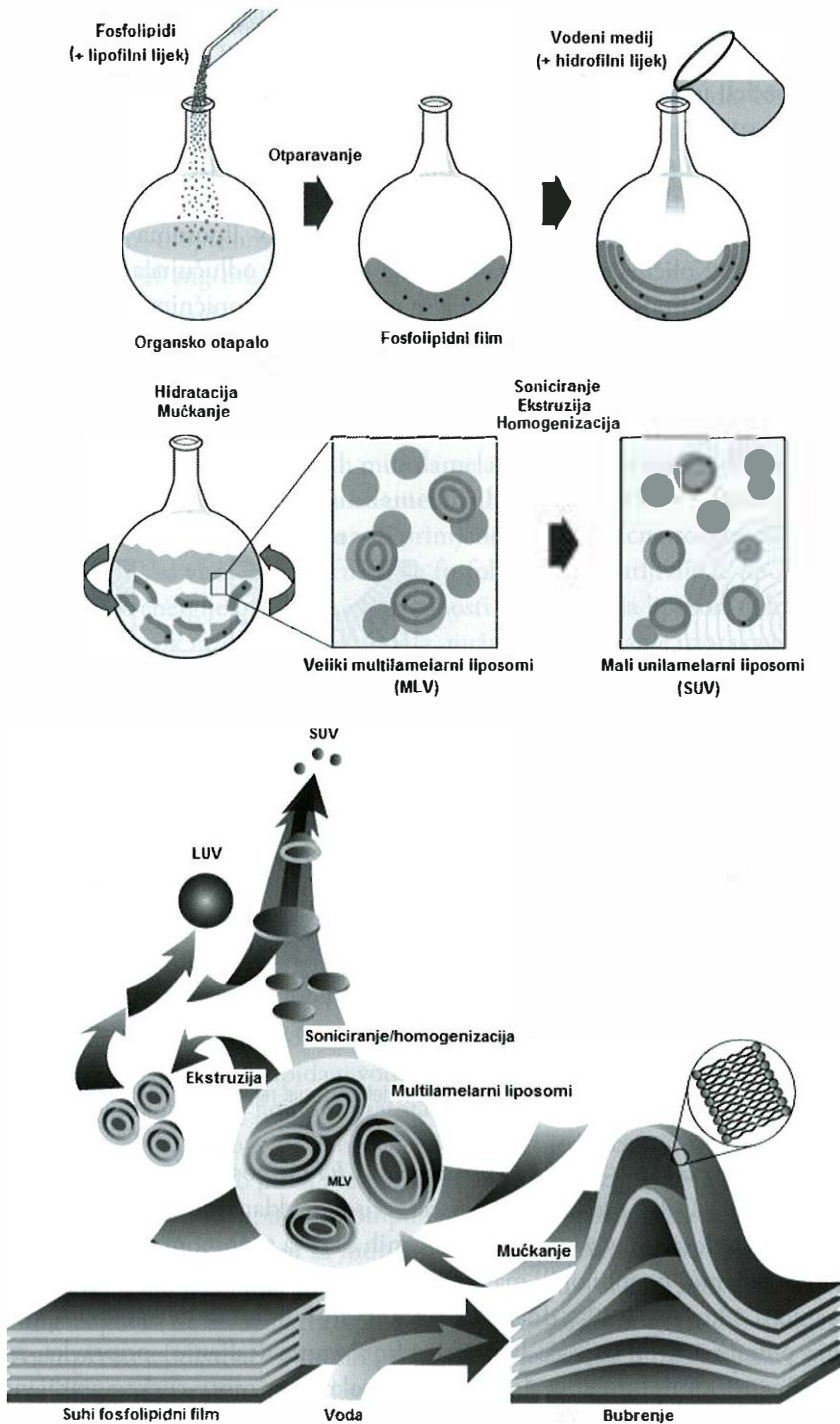
Priprava liposoma postupcima fizičkog dispergiranja fosfolipida

Metoda hidratacije suhog fosfolipidnog sloja, tzv. **film metoda** najčešći je postupak pripreve liposoma u laboratorijskim uvjetima. Temelji se na pripremi tankog fosfolipidnog sloja te dodatku vodenog medija uz snažno protresivanje. Stoga se nerijetko u literaturi označava i kao metoda pripreve liposoma ručnim protresivanjem (*hand shaking method*). 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 hidratacije fosfolipida i spontanog formiranja liposoma (slika 1.). Pozornost valja obratiti na temperaturu koja tijekom pripreve liposoma mora biti iznad temperature faznog prijelaza (T_f) korištenih fosfolipida. Nastali liposomi su multilamelarne strukture i zbog toga su prikladni za uklopavanje lipofilnih lijekova. Ako se za izradu upotrebljavaju samo neutralni fosfolipidi dobivaju se MLV-i gusto pakiranih dvoslojeva s veoma malim vodenim odjeljcima. Dodatkom negativno nabijenih fosfolipida (PG, PA, PS), zbog odbojnih interakcija između pojedinih ovojnica unutar MLV-a, povećavaju se unutarnji vodeni prostori što je važno ako se uklapaju hidrofilni lijekovi. Isti se učinak može postići s MLV priređenim iz neutralnih fosfolipida primjenom postupka naglog smrzavanja liposomskih suspenzija u tekućem dušiku (4).

S obzirom da su film metodom pripremljeni MLV-i prilično veliki (do 10-ak μm) i visokog indeksa polidisperznosti, koja upućuje na heterogenost sustava, neophodna je daljnja obrada. Homogenizacija MLV-a se provodi ekstruzijom kroz polikarbonatne membrane određene veličine pora ili soniciranjem (ultrazvučna kupelj, sonda), pri čemu se dobivaju homogene preparacije oligolamelarnih (OLV) ili unilamelarnih (LUV, SUV) liposoma (slika 1.). Važno je napomenuti da reduciranje veličine MLV-a nerijetko rezultira značajnim gubitkom u sadržaju početno uklopljenog hidrofilnog lijeka.

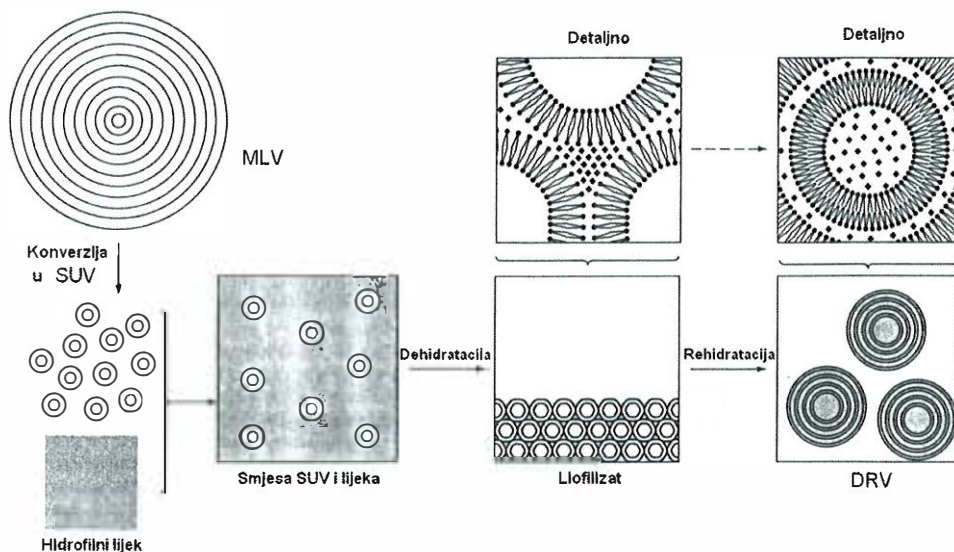
Metoda dehidratacije-rehidratacije (*dehydration-rehydration vesicles, DRV*)

je postupak pripreve liposoma kojim se postiže visoko uklopavanje hidrofilnih lijekova i osjetljivih bioloških molekula kao što su proteini i nukleinske kiseline. Načelo DRV metode temelji se na maksimalnoj izloženosti fosfolipida visokim koncentracijama lijeka prije formiranja vezikula. Postupak uključuje pripravu praznih MLV-a koji se



Slika 1. Priprema liposoma metodom hidratacije suhog fosfolipidnog sloja (film metoda) (5)

soniciranjem prevode u SUV pri čemu fosfolipidi postižu najveću moguću razinu dispergiranoosti u vanjskoj vodenoj fazi. Takvoj disperziji SUV-a dodaje se otopina lijeka koji se želi uklopiti u liposome te se liofilizacijom ukloni voda iz sustava (slika 2.). Veziikule su tada u metastabilnom stanju s polarnim glavama fosfolipidnih molekula jedna blizu drugoj i orijentirane prema molekulama lijeka. Kontroliranom rehidracijom, tj. dodatkom 10 puta manje količine vode od originalnog volumena pripravka, inicijalizirana je fuzija SUV-a i formiranje DRV liposoma unutar kojih je uklopljeni lijek. Količina vode koja se dodaje u toj fazi odlučujuća je za uklapanje lijeka. Nakon toga liposomska suspenzija se razrjeđuje izotoničnim puferom do propisanog volumena pripravka. Uspješnost uklapanja lijekova u liposome pripravljene DRV metodom je visoka. Obično iznosi 40–50 %, a može biti i veća dodatkom negativno nabijenih fosfolipida. Po morfološkim obilježjima, DRV liposomi su oligo- ili multi-lamelarni (6).



Slika 2. Priprava liposoma metodom dehidracije-rehidracije (6)

Metoda smrzavanja-taljenja (*freeze-thaw, FT*) je postupak priprave liposoma, koji slično kao i DRV metoda, omogućuje visoko uklapanje hidrofilnih lijekova. Temelji se na naglom smrzavanju smjese praznih SUV-a otopinom lijeka, te njezinom postupnom taljenju, na sobnoj ili malo povišenoj temperaturi (20–30 °C). Pri naglom smrzavanju u tekućem dušiku dolazi do pucanja fosfolipidnih dvoslojeva liposoma i stvaranja pukotina kroz koje će lijek pri odmrzavanju (taljenju) pripravka, a prije ponovne fuzije fosfolipidnih dvoslojeva, zbog visokog koncentracijskog gradijenta ući u unutrašnju vodenu fazu liposoma. Novonastali liposomi su izrazito veliki i po morfološkim svojstvima većinom unilamelarni (LUV). Uklapljeni volumen u FT lipo-

somima raste do 30 % ukupnog volumena suspenzije. U usporedbi s DRV metodom, koja je prikladna za sve fosfolipidne kompozicije neovisno o naboju na površini, FT metoda nije dobar izbor za pripravu liposoma iz neutralnih fosfolipida. Naime, naboj je potreban da bi nastali kristali leda koji omogućuju formiranje pukotina u membranama vezikula. Iz istih se razloga otopine soli visoke ionske jakosti, sukroza (krioprotektant), te divalentni metalni ioni koji neutraliziraju naboj na površini ne mogu uspješno uklapati u liposome priredene tim postupkom. Također i koncentracija fosfolipida veća od 40 mg/mL smanjuju uspješnost uklapanja lijeka u FT liposome (4).

Liposomi pripremljeni DRV ili FT metodom su izrazito veliki i široke razdiobe veličine, što za mnoge primjene nije prihvatljivo te ih je potrebno homogenizirati. Radi toga primjenjuje se postupak ekstrudiranja suspenzija liposoma kroz membrane određene veličine pora te soniciranje.

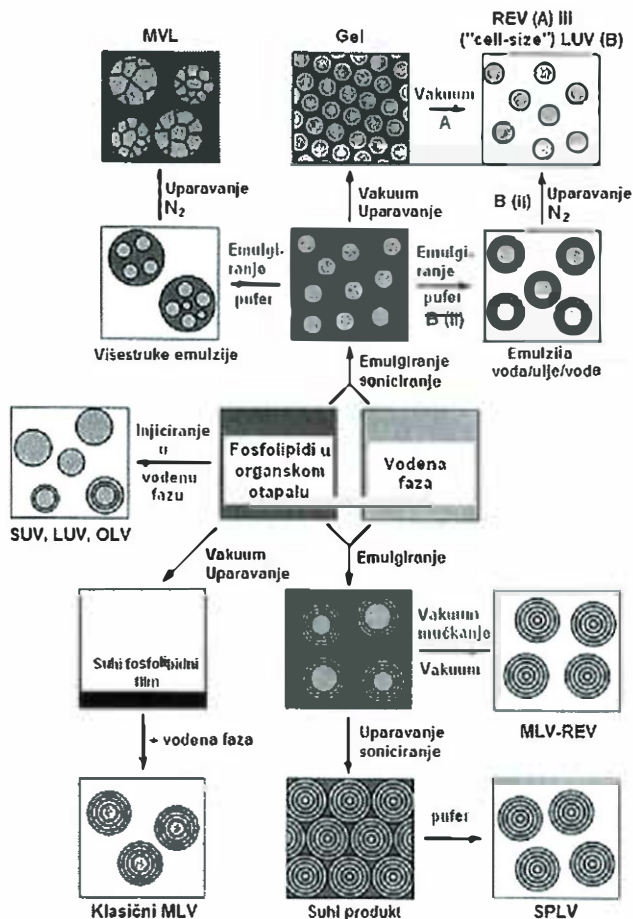
Soniciranje suspenzija velikih multilamelarnih i oligolamelarnih vezikula uobičajena je **metoda pripreme malih unilamelarnih liposoma** (SUV). Postupak se može provoditi u ultrazvučnim kupeljima ili primjenom ultrazvučne sonde. Ako se radi o pripravicima MLV-a visokih koncentracija fosfolipida prihvatljivija je uporaba sondi. No, zbog visoke energije u sustavu i mogućnosti pregrijavanja liposomskih suspenzija, koja može biti uzrok razgradnje fosfolipida, nužno je soniciranje uzoraka u posudama s ledom. Osim toga, pri soniciranju dolazi do otpuštanja čestica titana iz sonde te ih je potrebno ukloniti naknadnim centrifugiranjem suspenzije liposoma. Za pripravke MLV-a manjih koncentracija fosfolipida preporuča se uporaba ultrazvučnih kupelji. Time je izbjegnuto otpuštanje titana u pripravak, a zbog mogućnosti termostatiranja ne postoji ni rizik od pregrijavanja liposomskih preparacija. S obzirom da se pripravak može sonicirati zatvoren, također ne postoji opasnost od izlaganja potencijalno toksičnim lijekovima. Upravo zbog regulacije temperature kupelji, ta tehnika je prikladna za soniciranje liposoma priređenih iz sintetskih fosfolipida visoke T_c . No, manja snaga valova u ultrazvučnoj kupelji nego onih u sustavima sa sondom, razlog je da se rijetko kada mogu dobiti homogene preparacije SUV-a (4).

Metoda pripreme liposoma visokotlačnom homogenizacijom temelji se na propuštanju disperzije fosfolipida u vodi, odnosno vodenoj otopini hidrofilnog lijeka, kroz sapnice visokotlačnog homogenizatora. Formirani liposomi su unilamelarne strukture, većinom SUV, a ako je potrebno postići bolju ujednačenost u veličini, postupak se može ponoviti nekoliko puta. Prednost te metode je u izbjegavanju uporabe organskih otapala za otapanje lipidnih komponenti, a postupak pripreme liposoma je brz, jednostavan i veoma prikladan za industriju. S druge strane, treba obratiti pozornost na činjenicu da dio produkta trajno zaostaje u sustavu i nadalje, moguću osjetljivost liposoma na povišenu temperaturu zbog zagrijavanja tijekom procesa homogenizacije (7). Postupkom visokotlačne homogenizacije pripremaju se fosfolipidni gelovi, tj. pripravci liposoma veoma visoke koncentracije fosfolipida (8). Osim toga, metodu je moguće primjeniti i u slučajevima kada je potrebno smanjiti lamelarnost i postići bolju ujednačenost u veličini liposoma pripremljenih drugim metodama (7).

Priprava liposoma postupcima dvofaznog dispergiranja fosfolipida

Priprema liposoma dispergiranjem fosfolipida između dviju faza temelji se na miješanju (hidrataciji) fosfolipida otopljenih u organskom otapalu s vodenim medijem, u kojem može biti otopljen hidrofilni lijek. Pri tome se mogu rabiti: a) organska otapala koja se miješaju s vodom, b) organska otapala koja se ne miješaju s vodom, s većim udjelom vodene faze te c) organska otapala koja se ne miješaju s vodom, s većim udjelom organskog otapala u odnosu na vodenu fazu. Za razliku od postupaka fizičkog dispergiranja fosfolipida gdje se proces hidratacije fosfolipida događa nakon uklanjanja organskog otapala, kod postupaka dvofaznog dispergiranja fosfolipida, organsko otapalo se uklanja nakon hidratacije. Osnovna načela različitih metoda priprave liposoma shematski su prikazane na slici 3.

Metodom etanolnog injiciranja, koju su izvorno razvili Batzri i Korn (9), liposomi nastaju brzim injiciranjem etanolne otopine fosfolipida kroz tanku iglu u vodeni



Slika 3. Shematski prikaz različitih postupaka priprave liposoma (6)

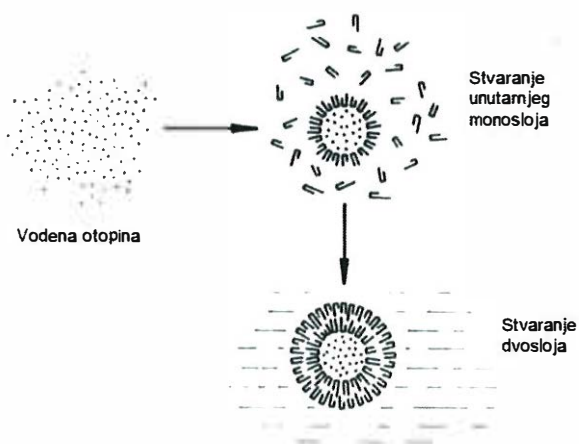
medij uz neprekidno miješanje. Metoda je veoma jednostavna, a formirani liposomi su unilamelarni, SUV. No, ako se brzina injiciranja fosfolipidne otopine smanji, nastaju populacije nešto većih liposoma koji morfološki pripadaju skupini oligolamelarnih vezikula (OLV). Glavna ograničenja te metode vezana su uz topljivost fosfolipida u etanolu, te volumen etanola koji može biti uveden u vodeni medij (maksimalno 7,5 vol. %), što rezultira razrijeđenim liposomskim suspenzijama.

Premda konceptualno slična, **metoda eternog injiciranja** značajno se razlikuje od prethodne. Naime, radi se o polaganom injiciranju otopine fosfolipida u organskom otapalu, koje se ne miješa s vodom (eter), u vodenu fazu zagrijanu na temperaturu koja osigurava isparavanje etera. Formirani liposomi su stabilni, a morfološki unilamelarni, LUV (4).

Iako veoma jednostavne za pripravu, i etanolna i eterna metoda rezultiraju niskim uklapanjem hidrofilnih lijekova. Također, obje metode obilježava mali udio organskog otapala u odnosu na udio vodene faze (4).

U trećoj skupini metoda pripreme liposoma postupcima dispergiranja fosfolipida između dviju faza su one, u kojima je udio organskog otapala koje se ne miješa s vodom značajno veći od udjela vodene faze. Njih obilježava *formiranje V/U emulzija* dodatkom vode (vodene otopine lijeka) u uljnu fazu (otopinu fosfolipida u organskom otapalu) te bi se stoga te metode mogle klasificirati i kao emulzijske. Osnovno načelo stvaranja liposoma emulzijskim postupcima prikazano je na slici 4. U prvoj fazi nastaje unutarnji monosloj budućeg liposoma, a u drugoj se formira vanjski monosloj i uklanja organsko otapalo. Liposomi koji pritom nastaju morfološki se razlikuju ovisno o specifičnostima pojedinog postupka (slika 3.).

Metodu pripreme liposoma uparavanjem V/U emulzija (*reverse phase evaporation, REV*) izvorno su razvili Szoka i Papahajopoulos za pripravu velikih unilamelarnih liposoma (10). Temelji se na stvaranju V/U emulzije brzim injiciranjem vodene

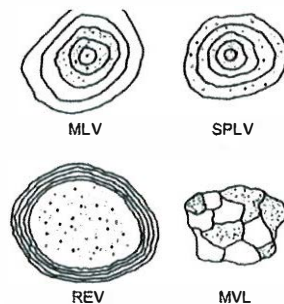


Slika 4. Osnovna načela nastajanja liposoma emulzijskim metodama (4)

otopine u otopinu fosfolipida u organskom otapalu (uz soniciranje), te otparavanju organskog otapala, pri čemu nastaje polučvrsti gel. U toj fazi (gel), monoslojevi fosfolipida koji okružuju vodene jezgre su međusobno veoma gusto pakirani i vjerojatno ponegdje, oko nekih vezikula, već formiraju dvosloj. Intenzivnim mućkanjem gela raspada se određeni broj vodenih vezikula, a preostali monoslojevi oblažu intaktne vezikule formirajući fosfolipidne dvoslojeve čime nastaje gusta suspenzija *velikih unilamelarnih liposoma (LUV-REV)* promjera oko 500 nm. Da bi se osigurali vanjski monoslojevi, barem 50 % vezikula se mora raspasti, tako da uklapanje hidrofilnih lijekova može iznasti maksimalno 50 % (4).

Utjecaj koncentracije fosfolipida na morfologiju liposoma priređenih tom metodom je veoma važan. LUV-REV se formiraju isključivo uz niže koncentracije fosfolipida (6). Ako se za izradu liposoma REV metodom upotrebljavaju visoke koncentracije fosfolipida, nastat će *multilamelarni liposomi s velikom središnjom vodenom jezgrom (MLV-REV)*. Naime, suvišak fosfolipida u sustavu će oko vodenih vezikula stvoriti višestruke slojeve. U takvim okolnostima za konverziju gela u liposomsku suspenziju nije neophodan raspad 50 % vezikula kao za LUV-REV; budući da se vanjski fosfolipidni monosloj može premjestiti iz jedne u drugu vezikulu. Tako nastali MLV-REV liposomi imaju izrazito veliku vodenu jezgru okruženu s desetak i više gusto pakiranih fosfolipidnih dvoslojeva (slika 5.). Da bi se izbjegao raspad određenog broja vodenih vezikula, može se u polučvrsti gel dodati određena količina vode. Time bi se dodatno povećala uspješnost uklapanja hidrofilnih lijekova (4). Maksimalno uklapanje za hidrofilne lijekove može iznositi 90 %, ali ako se ta vrijednost izrazi u masenim omjerima (masa uklopljenog lijeka po masi fosfolipida) to je 50 % od uklapanja koje se postiže DRV postupkom (6).

Modifikacijom REV metode mogu se pripremiti *stabilni plurilamelarni liposomi (stable plurimalellar vesicles, SPLV)*. Postupak je specifičan po tome što se, nakon pripreme VIU emulzije s većom koncentracijom fosfolipida, organsko otapalo uklanja sušenjem emulzije u struji dušika koje je praćeno soniciranjem na ultrazvučnoj kupelji. Pritom dolazi do redistribucije i izjednačavanja vodene faze i u njoj otopljenog hidrofilnog lijeka između svih dvoslojeva MLV-a. Zbog toga se tim postupkom pripremljeni liposomi morfološki razlikuju od MLV-REV liposoma (slika 5.). Naime, SPLV imaju malu vodenu jezgru, a glavnina uklopljenog hidrofilnog lijeka je raspoređena u vodenim odjeljcima smještenim između pojedinih dvoslojeva (4). Uspješnost uklapanja hidrofilnih lijekova je oko 30 %, a ako se izrazi u masi uklopljenog lijeka po masi fosfolipida, tada je uklapanje u SPLV 10 puta manje nego u MLV priređene DRV metodom (6).



Slika 5. Multilamelarne vezikule morfološki različitih odjeljaka i mjesta uklapanja hidrofilnog lijeka (4).

Očito je, da se multilamelarni liposomi priređeni različitim metodama morfološki razlikuju. Međutim i distribucija uklopljenog lijeka unutar pojedinih vodenih odjeljaka istog MLV-a može varirati. Dok kod SPLV-a postoji jednolična dispergiranaost lijeka između svih odjeljaka, kod MLV-a pripremljenih film metodom glavina uklopljenog lijeka je u unutarnjim vodenim regijama, a u onima pripremljenim REV metodom, lijek je isključivo u središnjoj vodenoj jezgri (slika 5.).

Metodom pripreme višestrukih emulzija (*multiple emulsion vesicles*) nastaju *multivezikularni liposomi* (MVL). Postupak uključuje pripremu početne V/U emulzije dispergiranjem vodene otopine lijeka u otopini fosfolipida u organskom otapalu, koja se potom emulgira u vanjsku vodenu fazu stvarajući pritom višestruku V/U/V emulziju (slika 3.). Nakon uklanjanja organskog otapala u struji dušika, nastaju multivezikularni liposomi s više vodenih odjeljaka unutar iste vezikule. Vodeni prostori unutar jednog MVL-a nisu koncentrično razdijeljeni kao u MLV-u, već su odijeljeni jednim zajedničkim fosfolipidnim dvoslojem (slika 5.). MVL su prilično veliki, 1000–2000 nm (4), a uspješnost uklapanja hidrofilnih lijekova je visoka (do 90 %). Premda je postupak njihove pripreme složen, te zahtijeva primjenu odgovarajućih fosfolipida, valja istaknuti da je metoda prilagođena za industrijsku proizvodnju (6). Tim postupkom, teoretski, moglo bi se uklapati više različitih lijekova u istu vezikulu (MVL) pri čemu bi lijekovi bili međusobno odijeljeni po vodenim prostorima MVL-a (4), no koliko je to moguće provesti u praksi, ostaje upitno.

Priprava liposoma solubilizacijom fosfolipida

Stvaranje liposoma može biti posredovano detergensima koji solubilizacijom fosfolipida olakšavaju njihov kontakt s vodom. Pritom nastaju miješane micle (detergens/fosfolipid) različite veličine i svojstava ovisno o upotrebljenom detergensu i njegovoj koncentraciji. Ako se iz takvih sustava uklanjaju molekule detergensa, dijalizom kroz polupropusnu membranu ili gel kromatografijom, miješane micle postaju bogatije fosfolipidima. U trenutku kada koncentracija detergensa padne ispod kritične micelarne koncentracije, fosfolipidi spontano formiraju stabilne, zatvorene lamelarne tvorbe da bi se minimalizirale neželjene interakcije hidrofobnih dijelova molekula fosfolipida s vodom. Nastali liposomi su veliki unilamelarni (LUV). Postupak pripreme je relativno dugotrajan, ali je metoda prikladna za ugradnju lipofilnih supstancija i proteina. Na taj način često se pripremaju liposomi koji se u istraživanjima koriste kao modelne membrane (11, 12).

Liposomes as drug carriers: preparation methods

by Ž. Vanić

A b s t r a c t

The key point to grasp in considering the manufacture of liposomes is that phospholipid membranes form spontaneously as a result of unfavourable interactions between phospholipids and water. Thus the emphasis in making liposomes is not

towards assembling the membranes (which happens on its own accord), but towards getting the membranes to form vesicles of the right size and structure, and to entrap drugs with high efficiency and in such a way that they do not leak out of the liposome once formed.

All methods of making liposomes involve three or four basic stages: drying down of lipids from organic solvents, dispersion of the lipids in aqueous media, purification of the resultant liposomes and analysis of the final product. The main difference between the various methods of manufacture is in the way in which the membrane components are dispersed in aqueous media, before being allowed to coalesce in the form of bilayer sheets. The methods are classified according to three basic modes of dispersion: physical dispersion, two-phase dispersion and detergent solubilization.

Literatura – References

1. Bartlett GRJ. Phosphorous assay in column chromatography. *J Biol Chem.* 1959; 234:466–468.
2. Nishiya T, Lam RTT. Mechanistic study on toxicity of positively charged liposomes containing stearylamine to blood: use of carboxymethyl chitin to reduce toxicity. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1993; 1:213–219.
3. Betagery GV, Jenkins SA, Parsons, DL. Liposome drug delivery systems. Lancaster-Basel: Technomic Publishing Company, 1993.
4. New RRC. Liposomes, a practical approach. Oxford-New York-Tokyo: IRL Press, 1989.
5. <http://www.avantilipids.com>, datum pristupa: 9. 3. 2012.
6. Kirby C, Gregoriadis G. Liposomes In: Mathiowith E. (Ed.) *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery.* New York-Chiester-Weinheim-Brisbane-Singapore-Toronto: Wiley, 1999:461–492.
7. Brandl M, Bauchmann D, Dreschler M, Bauer KH. Liposome preparation using high-pressure homogenizers In: *Liposome Technology.* 2nd ed. London-Tokyo: CRC Press, 1992.
8. Brandl M, Dreschler M, Bauchmann D, Tardi C, Schmidtgen M, Bauer KH. Preparation and characterization of semi-solid phospholipid dispersions and dilution thereof. *Int J Pharm.* 1998; 170:187–199.
9. Batzri S, Korn ED. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Bioch Biophys Acta.* 1973; 298: 1015–1019.
10. Szoka F, Papahadjopoulos D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Ann Rev Biophys Bioeng.* 1980; 9:467–508.
11. Milsmann MHW, Schwendener RA, Weder HG. The preparation of large single bilayer liposomes by a fast and controlled dialysis. *Bioch Biophys Acta.* 1978; 512:147–155.
12. Schubert R, Wolburg H, Schmidt KH, Roth H. Loading of performed liposomes with high trapping efficiency by detergent-induced formation of transient membrane holes. *Chem Phys Lipids.* 1991; 58:121–129.

Primljeno 19. ožujka 2012.