Hidrogelovi s intrinzičnom antimikrobnom aktivnosti

Čačić, Ana

Professional thesis / Završni specijalistički

2020

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:163:364065

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ana Čačić

HIDROGELOVI S INTRINZIČNOM ANTIMIKROBNOM AKTIVNOSTI

Specijalistički rad

Zagreb, 2020.

PSS studij: Razvoj lijekova

Mentori rada: Izv. prof. dr. sc. Željka Vanić

Prof. dr. sc. Maja Šegvić Klarić

Specijalistički rad obranjen je dana _____ 2020. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, _____ pred povjerenstvom u sastavu:

1.

2.

3.

Rad ima 65 listova.

Predgovor

Ovaj specijalistički rad je izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Željke Vanić te prof. dr. sc. Maje Šegvić Klarić.

Željela bih zahvaliti izv. prof. dr. sc. Željki Vanić na razumijevanju i strpljenju, pomoći i sjajnom mentorstvu tijekom izrade i pisanja rada.

Željela bih također zahvaliti prof. dr. sc. Maja Šegvić Klarić na podršci i sjajnom mentorstvu tijekom izrade i pisanja rada.

Mikrobiološka ispitivanja provedena su u PLIVA d.o.o., Mikrobiološki i biološki laboratoriji, te se ovim putem od srca zahvaljujem kolegama na pomoći.

SAŽETAK

Cilj istraživanja

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je ispitati intrinzični antimikrobni učinak izvornih kitozanskih hidrogelova koji su korišteni kao polučvrste podloge za uklapanje liposomskih disperzija azitromicina. Kako bi se utvrdilo utječe li kitozan na antibakterijsku aktivnost liposomski uklopljenog antibiotika te doprinosi li fosfolipidni sastav liposoma antimikrobnoj aktivnosti, ispitan je antibakterijski učinak kitozanskih hidrogelova s liposomski uklopljenim azitromicinom, a dobiveni rezultati uspoređivani su s antibakterijskom aktivnosti: liposoma s azitromicinom, otopine azitromicina, kitozanskih hidrogelova s azitromicinom te izvornih kitozanskih hidrogelova.

Materijali i metode

Eksperimentalni dio rada obuhvaćao je izradu kitozanskih hidrogelova iz kitozana različitih molekularnih masa, pripravu nekoliko tipova liposoma s uklopljenim azitromicinom, te izradu liposomskih hidrogelova umješavanjem liposoma u kitozanske hidrogelove. Ispitivanja intrinzičnog antimikrobnog učinka izvornih kitozanskih hidrogelova provedena su tako da su hidrogelovi inokulirani određenim test mikroorganizmima (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* i *Aspergillus brasiliensis*) i čuvani u propisanim uvjetima, a redukcija broja mikroorganizama praćena je kroz određene vremenske intervale tijekom 28 dana. Ispitivanje utjecaja kitozana na antibakterijsku aktivnost različitih liposoma s azitromicinom provedeno je primjenom *in vitro* agar-difuzijskog testa na bakterijskom soju *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Rezultati

Neovisno o tipu kitozana iz kojeg su pripravljeni, svi izvorni kitozanski hidrogelovi su pokazali intrinzičnu antimikrobnu aktivnost na ispitivane mikroorganizme, čime je potvrđeno da nije

potrebno dodatno konzerviranje topikalnih formulacija koje sadrže kitozanske hidrogelove kao polučvrste podloge. Nadalje, čvrstoća/elastičnost liposomskih dvoslojeva utjecala je na antibakterijsku aktivnost ispitivanih liposoma s azitromicinom i liposomskih hidrogelova. Pritom je najjači učinak postignut s liposomima karakteriziranim izrazito čvrstim (rigidnim) dvoslojevima (konvencionalnim liposomima). Svi kitozanski hidrogelovi potencirali su antibakterijski učinak liposomski uklopljenog azitromicina, što je potvrđeno većim zonama inhibicije u odnosu na one postignute otopinom azitromicina.

Zaključak

Rezultati svih provedenih ispitivanja ukazuju na mogućnost primjene kitozanskih hidrogelova kao podloga za topikalne lijekove i nanoterapeutike namijenjene liječenju infekcija kože. Međutim, neophodno je provesti daljnja *in vivo* ispitivanja kako bi se dokazala njihova terapijska učinkovitost.

SUMMARY

Objectives

One of objectives of this study was to examine the intrinsic antimicrobial activity of the chitosan hydrogels, which were used as vehicles (bases) for incorporation of the azithromycin liposomes. To determine whether chitosan hydrogels could potentiate antibacterial activity of the incorporated azithromycin liposomes and to examine the effect of bilayer fluidity on the antibacterial activity of encapsulated azithromycin, the studies were performed with chitosan hydrogels containing incorporated azithromycin liposomes and the results were compared with azithromycin liposomes (liquid dispersions), solution of azithromycin, hydrogels containing azithromycin solution and the plain chitosan hydrogels.

Material and Methods

The experimental part of this study included preparation of the plain chitosan hydrogels from the different molecular weight chitosans as well as preparation and characterization of the several types of liposomes encapsulating azithromycin, which were incorporated into the chitosan hydrogels (liposomal hydrogels). Intrinsic antimicrobial activities of the plain chitosan hydrogels were examined by the reduction of number of the test microorganisms *(Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans and Aspergillus brasiliensis)*, which were inoculated into the hydrogels, stored for 28 days and tested at determined time intervals. *In vitro* antibacterial activity of the different azithromycin containing liposomal hydrogels toward *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 was performed by agar well diffusion method.

Results

All the plain chitosan hydrogels have shown intrinsic antimicrobial activities, confirming that there is no need for the use of preservatives in the topical formulations based on the chitosan

hydrogels. Furthermore, the elasticities/rigidities of the different azithromycin liposomes have influenced their antibacterial activities as well as antibacterial activities of the liposomal hydrogels. Conventional liposomes, characterized by rigid bilayers, have demonstrated the most pronounced antibacterial activity. All the chitosan hydrogels contributed the antibacterial activity of the incorporated azithromycin liposomes, what was confirmed by a larger inhibition zones formed, compared to those obtained by hydrogels containing azithromycin solution and the zones formed by the free drug.

Conclusion

Considering all the results, it can be assumed that the chitosan hydrogels could be used as vehicles for topical formulations and liposomes aimed for the treatment of skin infections. However, further *in vivo* studies should be carried out to confirm the efficacy of the innovative formulations.

SADRŽAJ SPECIJALISTIČKOG RADA

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA 1
   1.1. Fiziološki i histološki aspekti kože 1
   1.2. Oštećenja kože i proces zacjeljivanja 1
   1.3. Dermalna primjena lijekova 3
   1.4. Hidrogelovi 4
   1.5. Kitozan 5
   1.6. Djelovanje i primjena hidrogelova na bazi kitozana 7
   1.7. Liposomi 9
      1.7.1. Konvencionalni liposomi 13
      1.7.2. Deformabilni liposomi 13
      1.7.3. Etosomi 14
      1.7.4. Propilenglikol liposomi 15
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 16
3. MATERIJALI I METODE 18
   3.1. Materijali 18
   3.2. Postupak priprave kitozanskih hidrogelova 20
   3.3. Postupak pripreme liposoma 20
      3.3.1. Mjerenje veličine i zeta potencijala liposoma 22
      3.3.2. Određivanje elastičnosti/rigidnosti liposoma s azitromicinom 22
   3.4. Priprava liposomskih hidrogelova s azitromicinom 22
   3.5. Ispitivanje antimikrobnog učinka izvornih kitozanskih hidrogelova 23
   3.6. Ispitivanje antibakterijskog učinka liposomskih hidrogelova metodom difuzije 27
4. REZULTATI 29
   4.1. Kitozanski hidrogelovi 29
   4.2. Fizičko-kemijska svojstva liposoma s azitromicinom 29
   4.3. Antimikrobna aktivnost izvornih kitozanskih hidrogelova 30
   4.4. Antibakterijska aktivnost liposomskih hidrogelova 43
5. RASPRAVA 48
6. ZAKLJUČCI 56
7. LITERATURA 58
8. ŽIVOTOPIS 65

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Fiziološki i histološki aspekti kože

Koža je najveći ljudski organ koji doseže do 10% ukupne tjelesne mase te djeluje kao zaštitna barijera između organizma i okoliša. Štiti od prodora mikroorganizama, UV zračenja i gubitka tjelesnih tekućina (1). Osim zaštitne funkcije, koža je također odgovorna za termoregulaciju, izlučivanje produkata metabolizma (elektroliti, aminokiseline) te sintezu melanina i vitamina D. Osjetilni je organ jer su u njoj smješteni receptori za dodir, hladnoću, toplinu i bol (2).

Koža se histološki sastoji od: epidermisa, dermisa i hipodermisa (potkožno tkivo). Epidermis je građen od 5 različitih slojeva, pri čemu vanjski, rožnati sloj (*stratum corenum*) čini glavnu prepreku prolasku tvari iz okoliša u organizam. Epidermis sudjeluje u regulaciji tjelesne temperature i zadržavanju vlage unutar kože. Nije prokrvljen, već se opskrbljuje hranjivim tvarima iz dermisa. Dermis je značajno deblji od epidermisa i koži daje oblik, čvrstoću i elastičnost. Sastoji se od stanica vezivnog tkiva, većinom fibroblasta, odgovornih za sintezu kolagena i elastina. Strukturno je građen od papilarnog i retikularnog sloja te sadrži adnekse kože, živce, krvne i limfne žile. Ispod dermisa je smješten hipodermis (*subcutis*) koji predstavlja masno potkožno tkivo (2, 3).

1.2. Oštećenja kože i proces zacjeljivanja

Infekcije kože obuhvaćaju jednostavne, ali i komplicirane infekcije kože i potkožnog tkiva te variraju od jednostavnih supkutanih apscesa do teških nekrotizirajućih infekcija koje su nerijetko posljedica oštećenja kože, tj. rana (4).

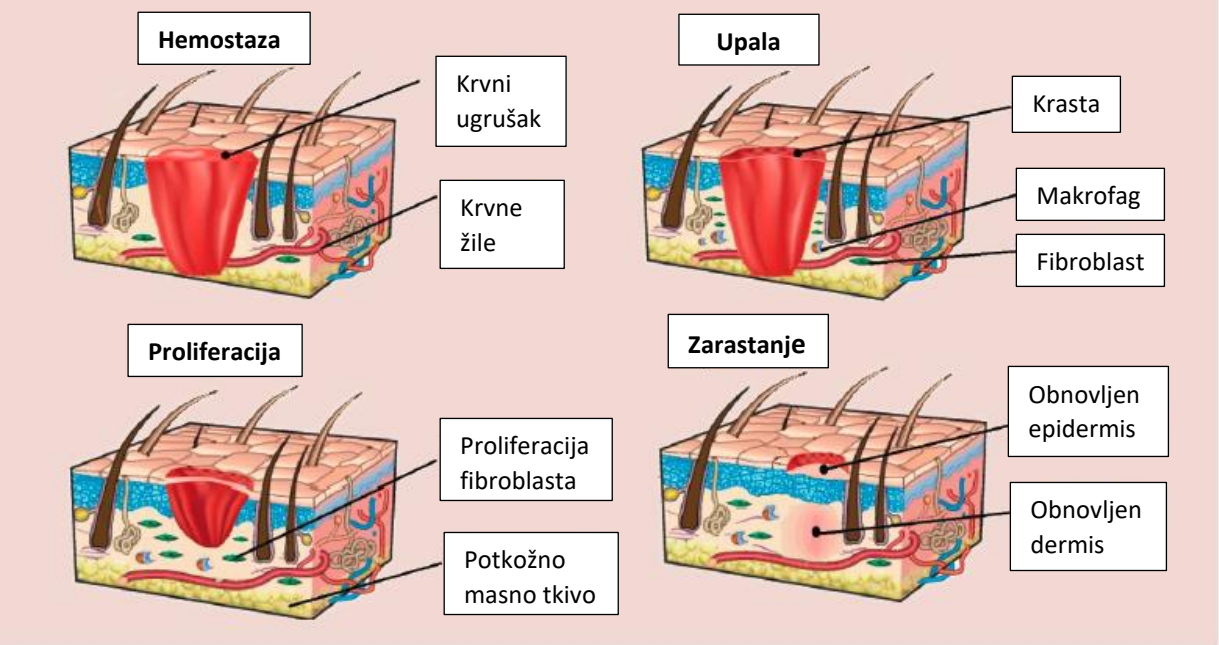
Rane se klasificiraju u dvije skupine, akutne i kronične. Akutne rane nastaju traumatskim oštećenjima kože kao što su ozljede, operacije, toplinske ili kemijske opekline. Ukoliko se neadekvatno liječe, akutne rane mogu prerasti u kronične koje su praćene razvojem

biofilmova. Kronične rane često nastaju zbog metaboličkih poremećaja uzrokovanih sistemskim bolestima poput dijabetesa, vaskularnih bolesti ili pretilosti. Zacjeljivanje, odnosno izlječenje akutnih rana redovito traje kraće u odnosu na zacjeljivanje kroničnih rana (5).

Zacjeljivanje rana je kompleksan biološki proces povezan s općom pojavom rasta i regeneracije tkiva. Zacjeljivanje rana odvija se kroz niz međusobno povezanih faza u kojima različite stanične i izvanstanične komponente djeluju zajedno kako bi ponovno uspostavile integritet oštećenog tkiva i zamijenile izgubljeno tkivo (6). Procesi akutnog zacjeljivanja tkiva obuhvaćaju četiri međusobno povezane i vremenski ovisne faze (Slika 1): (i) faza koagulacije i hemostaze, (ii) upalna faza, (iii) proliferativna faza te (iv) faza zarastanja (7). U prvoj fazi (hemostaza), krvne žile postaju sužene te se uslijed agregacije trombocita i degranulacije stvara ugrušak. Aktivacijom procesa koagulacije počinje niz kaskadnih procesa koji završavaju tvorbom fibrina. U sljedećoj, upalnoj fazi na mjesto rane infiltriraju se neutrofili, a zatim monociti iz kojih diferencijacijom nastaju makrofagi. Treća je faza epitelizacije (proliferativna faza) u kojoj nastupa angiogeneza, sintetizira se novi kolagen i formira ekstracelularni matriks. U završnoj fazi zarastanja novosintetizirani kolagen se remodelira, zaustavlja se rast krvnih žila čime se smanjuje protok krvi i metabolička aktivnost te se smanjenim brojem stanica i krvnih žila formira ožiljak koji se odlikuje visokom čvrstoćom. Ta zadnja faza može trajati dulji vremenski period (8-10).

Na proces zacjeljivanja može utjecati niz lokalnih (zahvaćeno područje i dubina rane, infekcija rane, prisutnost stranog tijela, prokrvljenost područja rane), ali i sustavnih čimbenika kao što su dob i spol, spolni hormoni, stres, ishemija, prisutnost različitih bolesti, pretilost, primjena lijekova, alkoholizam, pušenje i prehrana (11-14). Infekcija rane te razmnožavanje bakterija u rani također mogu značajno utjecati na procese uključene u

proces zacjeljivanja. Infekcija rane ne samo da može inhibirati višestruke procese uključene u progresiju zacjeljivanja rane, već može rezultirati i sistemskom infekcijom te pojavom sepse (15). Dodatan problem tome predstavlja porast rezistencije bakterija na antibiotike (6).



Slika 1. Faze zacjeljivanja rana (16). Preuzeto i prilagođeno hrvatskome jeziku uz dozvolu *Future Medicine Ltd.*-a.

1.3. Dermalna primjena lijekova

Lokalnom primjenom lijekova mogu se osigurati dostatno visoke koncentracije lijeka u koži i pritom smanjiti njegova razina u sistemskoj cirukulaciji, čime se izbjegavaju neželjene nuspojave. U usporedbi s oralnim putem primjene lijekova, dermalnom primjenom se, osim gore navedenih učinaka, izbjegava i nepovoljan utjecaj gastrointestinalnog sustava, zaobilazi prvi prolaz lijeka kroz jetru, a sama primjena je jednostavna i dobro prihvaćena od strane pacijenta. Usprkos navedenim prednostima lokalne primjene lijekova, barijerna priroda kože, koju čini rožnati sloj (*stratum corneum*), značajna je prepreka permeabilosti većini lijekova. Da bi se povećala permeabilnost lijeka u kožu, pozornost se posvećuje razvoju novih terapijskih (nano)sustava kojima bi se nadvladali nedostaci postojećih klasičnih

farmaceutskih oblika (17). Terapijski (nano)sustavi koji bi omogućili ciljano djelovanje lijeka i njegovo kontinuirano oslobađanje na oboljelom mjestu kroz dulji vremenski period, od velikog su značaja jer bi se time samnjile nuspojave, toksičnost i učestalost doziranja, što bi bilo povoljnije za pacijenta. Navedene učinke moguće je postići uklapanjem lijeka u odgovarajuće nanonosače, tj. nanočestice (18).

Prikladnu konzistenciju nanočestica s uklopljenom djelatnom tvari za primjenu na kožu moguće je postići uklapanjem nanočestica u polučvrste podloge. U tom pogledu posebno su prikladni hidrogelovi (19), i to oni izrađeni iz kitozana zbog njegovog povoljnog utjecaja na proces zacjeljivanja rana (20).

1.4. Hidrogelovi

Hidrogelovi su trodimenzionalne mreže sastavljene od niti polimera, koje mogu vezati i do 1000 puta više vode od njihove vlastite težine. Zbog velikog udjela vode u svom sastavu, hidrogelovi izazivaju osjećaj hlađenja što je povoljno svojstvo budući da je upala praćena porastom temperature oboljelog područja. Hidrogelovi općenito djeluju kao barijera prodoru bakterija i drugih mikroorganizama u ranu, apsorbiraju eksudat iz rana, osiguravaju vlažnu okolinu, potpomažu hemostazu, potiču proliferaciju fibroblasta, migraciju keratinocita i zacjeljivanje rana (16).

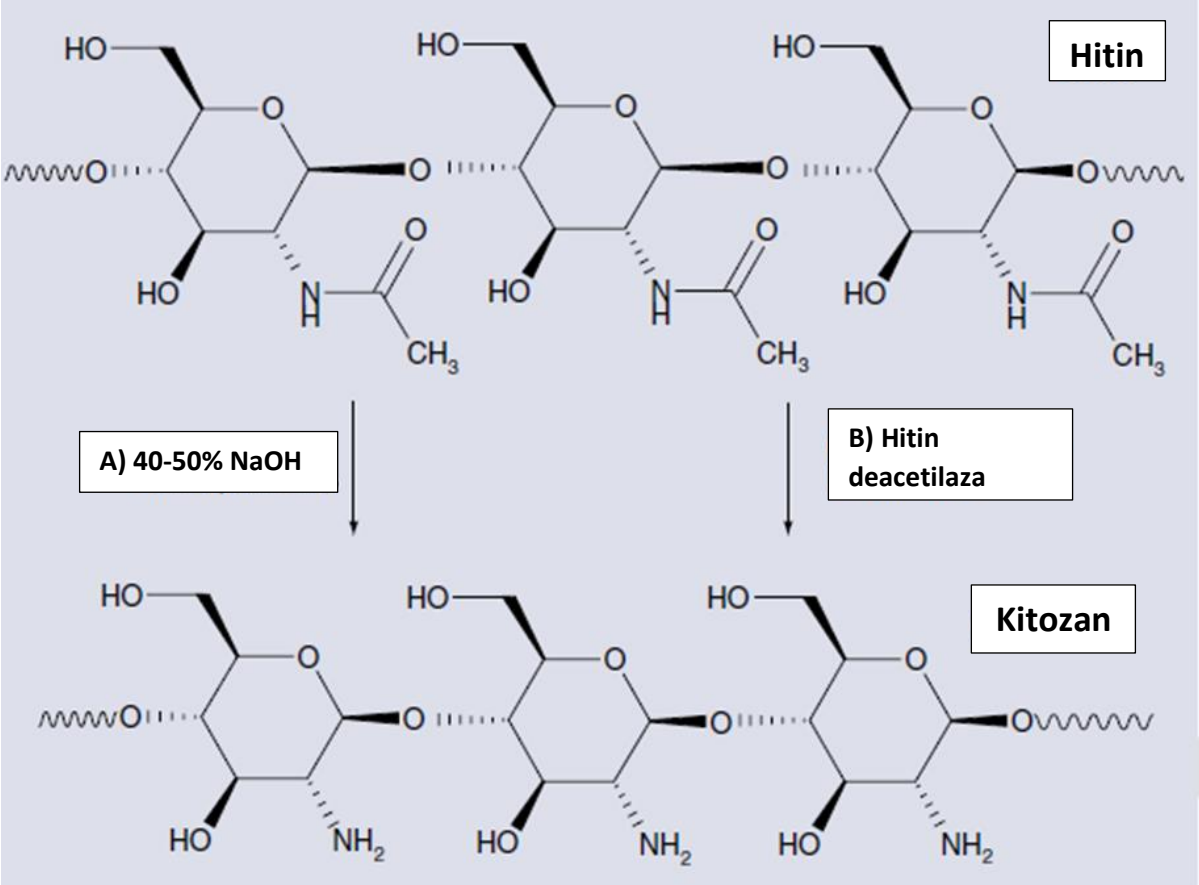
Karakteristike hidrogelova značajno ovise o korištenim polimerima i interakcijama unutar mreže polimera. Polimeri mogu biti kovalentno umreženi unutar hidrogela ili međusobno povezani elektrostatskim interakcijama, vodikovim vezama ili hidrofobnim silama. Hidrogelovi mogu biti proizvedeni od raznih vrsta gelirajućih tvari (polimera), koji mogu biti prirodnog, polusintentskog ili sintetskog porijekla. Nerijetko se hidrogelovi izrađuju iz kombinacije sintetskih i prirodnih polimera (21, 22). Od sintetskih polimera često se koriste

derivati poliakrilne kiseline (Carbopol®), polivinilpirolidon i polietilenglikol. Derivati celuloze (metilceluloza, hidroksietilceluloza, natrijkarboksimetilceluloza) poznati su kao polusintetski polimeri, dok se alginat, hijaluronska kiselina, pektin i kitozan ubrajaju u prirodne polimere (23).

1.5. Kitozan

Kitozan je polimer β-1,4-vezanih jedinica glukozamina (2-amino-2-deoksi-β-D-glukoze) i manje količine N-acetilglukozamina. Dobiva se iz hitina (Slika 2), drugog najzastupljenijeg biopolimera u prirodi (24, 25). Primarne amino skupine karakteristične za kitozan pridonose pKa vrijednosti kitozana koja iznosi oko 6,5 (26). U pH okruženju nižem od navedene pKa vrijednosti, amino skupine su protonirane čime kitozan postaje topljivi kationski polielektrolit, dok u okruženju višeg pH amino skupine bivaju deprotonirane čime se pokreće precipitacija polimernih lanaca, te je stoga topljivost kitozana ovisna o pH. Protonirane amino skupine mogu stvarati ionske komplekse s brojnim anionskim makromolekulama poput lipida, proteina, DNA, a također mogu ući u interakcije i s drugim molekulama zbog čega dolazi do acetilacije, kvarternizacije, reakcije s aldehidima i ketonima te kelacije metala. Također, primarne amino skupine omogućuju različite kemijske modifikacije kovalentnim vezanjem drugih funkcionalnih skupina na izvornu molekulu kitozana. Takvim kemijskim modifikacijama se mogu podesiti svojstva kitozana prema točno određenim namjenama (27). Hidroksilne skupine također pridonose reaktivnosti jer omogućuju stvaranje vodikovih veza s polarnim atomima susjednih molekula te reakcije eterifikacije i esterifikacije (28). Prisutnost kationskih amino skupina u molekuli kitozana omogućuje dobru interakciju (adheziju) polimera s negativno nabijenom površinom sluznica. Time se omogućuje dulje zadržavanje formulacije na mjestu primjene i stvaraju uvjeti za učinkovitu lokalnu dostavu

lijeka (29). Osim toga, interakcija kitozana s epitelnim stanicama rezultira reverzibilnim otvaranjem uskih staničnih veza čime se povećava paracelularna permeabilnost (30).



Slika 2. Priprema kitozana iz hitina alkalnom deacetilacijom (A) i enzimatskom deacetilacijom (B) (24). Preuzeto uz dozvolu *Taylor & Francis*-a, prilagođeno hrvatskom jeziku.

Kitozan je kao prirodni kationski polimer dosta istraživan kao antimikrobno sredstvo za prevenciju i liječenje infekcija. Parametri kao što su molekularna masa kitozana, ioniziranost, stupanj deacetilacije te pH medija mogu utjecati na antimikrobna svojstva kitozana (24). Točan mehanizam antimikrobnog djelovanja kitozana nije u potpunosti razjašnjen, no smatra se da nije isti za gram-pozitivne i gram-negativne bakterije zbog razlike u građi njihove stanične stijenke. Pri pH nižem od pKa vrijednosti kitozana, kitozan je polikation koji ulazi u elektrostatske interakcije s anionskim strukturama poput lipopolisaharida i proteina na površini gram-negativnih bakterija (31). Gram-pozitivne bakterije u svojoj stijenci sadrže

negativno nabijene grupe (poput teikoične kiseline) s kojima pozitivno nabijene molekule kitozana stupaju u interakcije mijenjajući permeabilnost stijenke, što uzrokuje gubitak esencijalnih tvari iz bakterijske stanice (32). Kitozan također ima izvrsne kapacitete keliranja metala čineći tako esencijalne hranjive tvari potrebne za rast bakterija nedostupnima (33). Dodatni predloženi mehanizam antibakterijskog učinka uključuje vezanje kitozana za bakterijsku DNA pomoću protoniranih amino skupina i posljedično inhibiciju sinteze mRNA i proteina. Antifungalni učinak kitozana temelji se na supresiji sporulacije i germinacije spora (32). Inhibitorni učinak kitozana na bakterije i gljivice izraženiji je u kiselom pH području (31), budući da je u lužnatom okruženju kitozan slabo topljiv, a njegove amino skupine nisu nabijene (34). Osim povišenja pH, na antimikrobnu aktivnost kitozana negativno utječu povišena temperatura i stajanje tijekom duljeg vremenskog perioda (33).

1.6. Djelovanje i primjena hidrogelova na bazi kitozana

Antimikrobna svojstva kitozana također ovise o farmaceutskom obliku kitozana. Kitozan se najčešće primjenjuje u obliku filmova ili hidrogelova kao obloga za rane, pri čemu se može kombinirati i s drugim djelatnim tvarima (24). Hidrogelovi kitozana su karakterizirani dobrom bioadhezivnosti, biokompatibilnosti i biorazgradljivosti, ali i biološkim učincima; bakteriostatskom i hemostatskom djelovanju te učinku na zacjeljivanje rana (35, 36). Osim toga, pokazalo se da kitozanski hidrogelovi ubrzavaju obnovu oštećenog vezivnog tkiva, a time i proces cijeljenja rana (37).

Hidrogelovi na bazi kitozana imaju značajnu ulogu u različitim fazama zacjeljivanja rana. Koagulacija i hemostaza se počinju odvijati u rani odmah nakon ozljede, sprječavajući krvarenje i osiguravajući prikladnu sredinu potrebnu stanicama u kasnijim fazama cijeljenja rane (38). Trombociti imaju važnu ulogu u koagulaciji krvi te oslobađanjem određenih

citokina poboljšavaju proces zacjeljivanja (39). Kitozan potiče površinski induciranu trombozu i koagulaciju krvi te ubrzava koagulaciju *in vivo* utječući na aktivaciju trombocita. Kitozan je stoga hemostat koji pomaže prirodno zgrušavanje krvi, ali i blokira živčane završetke smanjujući tako bol (40). U sljedećoj fazi zacjeljivanja rana dominiraju upalne reakcije posredovane citokinima, kemokinima, faktorima rasta i njihovim djelovanjem na stanične receptore. Aktiviraju se unutarstanične signalne kaskade koje pridonose staničnoj proliferaciji, migraciji i diferencijaciji. Osim toga, kemijski faktori stimuliraju različite tipove stanica kao što su granulociti i makrofagi na mjesto rane čime se potiče zacjeljivanje rane (41). Istraživanja su pokazala da obloge na bazi kitozana mogu ubrzati oporavak različitih tkiva i regulirati izlučivanje upalnih faktora kao što su interleukin 8, prostaglandin E, interleukin 1b i drugi (42). Osim toga, pokazalo se da kitozan djeluje na aktivnost polimorfonuklearnih leukocita, makrofaga i neutrofila u upalnom području, potičući granulaciju tkiva (43). Proliferativna faza, koja počinje između 2. i 10. dana nakon ozljede kože (stvaranja rane), obuhvaća neoangiogenezu, formiranje granulacijskog tkiva i ekstracelularnog matriksa, te reepitelizaciju (44). Hidrogelovi na bazi kitozana mogu stimulirati proliferaciju fibroblasta i angiogenezu, taloženje kolagena i hijaluronske kiseline u rani što pomaže njenom bržem zacjeljivanju i prevenciji nastanka ožiljka (42, 45, 46). U fazi zarastanja rane kolagenska vlakna pravilno se raspoređuju rezultirajući stvaranjem novog epitela i zacjeljivanjem rane. N-acetilglukozamin prisutan u kitozanu glavna je komponenta važna za zacjeljivanje tkiva (47).

Osim što mogu potaknuti zacjeljivanje rana u različitim fazama cijeljenja rane, hidrogelovi na bazi kitozana mogu i ublažiti faktore koji negativno djeluju na proces cijeljenja. Naime, upalni odgovor je osnova za zacjeljivanje rana, no prekomjerna upalna reakcija može dovesti do nekroze lokalnih stanica, što sprječava zacjeljivanje. Ako se upala ne kontrolira na vrijeme,

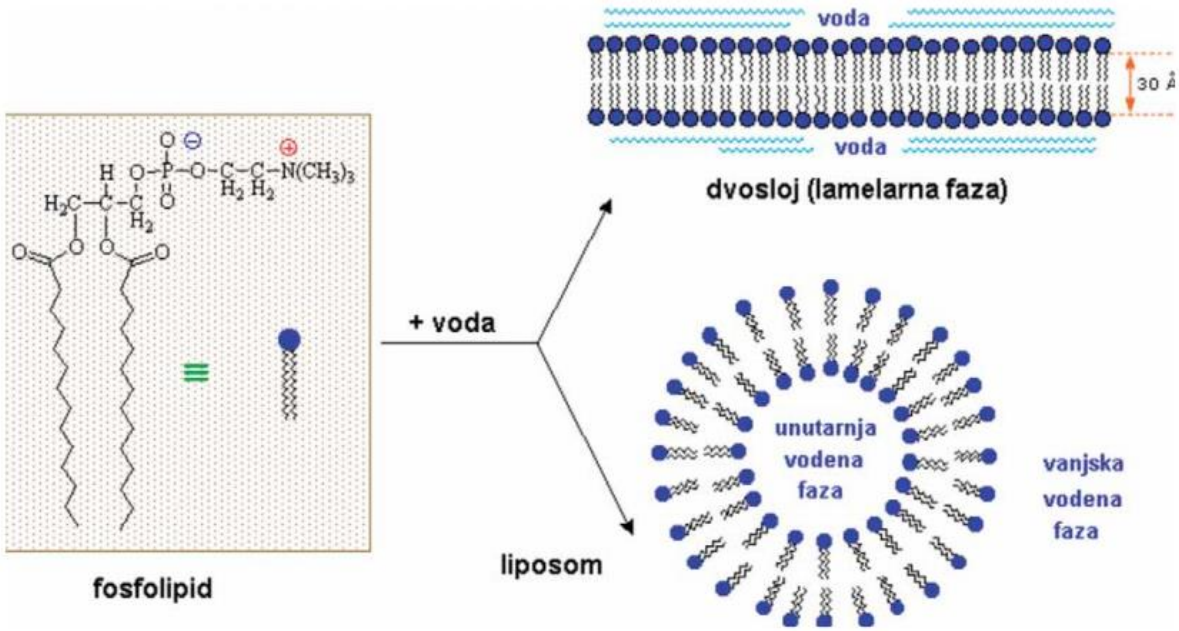
može dovesti do sistemske infekcije koja potencijalno može ugroziti život. Prisutnost bakterija i inflamatornih stanica u području rane povećava potrošnju kisika i drugih hranjivih tvari, čime je narušena proliferacija fibroblasta. Oslobađanjem proteaza i slobodnih radikala kisika nakon što neutrofili fagocitiraju bakterije u inficiranom području, dolazi do oštećenja tkiva i otapanja kolagena umjesto njegovog deponiranja u tkivo. Eksudati i povećana napetost kože uz samu ranu uzrokuju rastvaranje rane, što rezultira odgađanjem zacjeljivanja (48, 49). Zbog svojih antiinflamatornih i antibakterijskih svojstava kitozanski hidrogelovi mogu inhibirati upalnu reakciju unutar rane te osigurati prikladno mikrookruženje za zacjeljivanje (32, 36).

Osim obloga za rane, kitozanski hidrogelovi se istražuju i kao podloge za uklapanje različitih djelatnih tvari, npr. antimikrobnih lijekova, faktora rasta, matičnih stanica itd. (20). Uklapanje djelatnih tvari moguće je i u odgovarajuće mikro- i nano-nosače poput mikrokapsula, mikrosfera, nanosfera, micela, polimernih prolijekova, virosoma, kubosoma, nanofibrila te u različite lipidne nanočestice među kojima istaknuto mjesto zauzimaju liposomi (50).

1.7. Liposomi

Otkriće liposoma vezano je uz profesora Banghama koji je sa svojim suradnicima opisao pojavu da tekući kristali lecitina u kontaktu s vodom formiraju tvorevine veoma slične biološkim membranama (51). Premda su prvotno istraživani kao modelne biološke membrane, 70-ih godina prošlog stoljeća počinju istraživanja liposoma kao nosača lijekova. Razlog tome je njihova specifična struktura koja omogućuje uklapanje lijekova različitih svojstava (50).

Osnovnu građevnu jedinicu liposoma čine fosfolipidi koji su u ovojnici liposoma složeni u obliku dvosloja, pri čemu su polarne, hidrofilne „glave“ orijentirane prema vanjskoj i unutarnjoj vodenoj fazi zaklanjajući pritom nepolarne, hidrofobne „repove“ (lanci masnih kiselina) jednog prema drugome (Slika 3) (18).



Slika 3. Shematski prikaz formiranja liposoma hidratacijom fosfolipida (52). Preuzeto i prilagođeno hrvatskome jeziku.

Liposomi su fiziološki kompatibilne fosfolipidne vezikule koje se sastoje od jednog (unilamelarni liposomi), nekoliko (oligolamelarni liposomi) ili mnogo koncentrično raspoređenih fosfolipidnih dvoslojeva (multilamelarni liposomi) koji okružuju unutarnje vodene odjeljke. Osim toga, postoje i multivezikularni liposomi u kojima su dvoslojevi fosfolipida nekoncentrično položeni te sadrže više unutarnjih vodenih odjeljaka (53).

Zbog specifičnih strukturnih svojstava u liposomima se mogu uklopiti lijekovi različite lipofilnosti. Hidrofilni lijekovi se uklapaju u vodeni odjeljak/e, lipofilni unutar dvosloja, dok će se amfipatski razdijeliti između ta dva područja. Svojstva liposoma određena su fosfolipidnim sastavom, čvrstoćom/elastičnošću dvoslojeva, veličinom liposoma, površinskim nabojem i

lamelarnosti (54). Njihov sastav i fizikalno-kemijska svojstva mogu povećati ili ograničiti ulazak i difuziju lijeka u/kroz kožu (55).

Predloženo je više mogućih mehanizama/interakcija liposoma i kože (Slika 4):

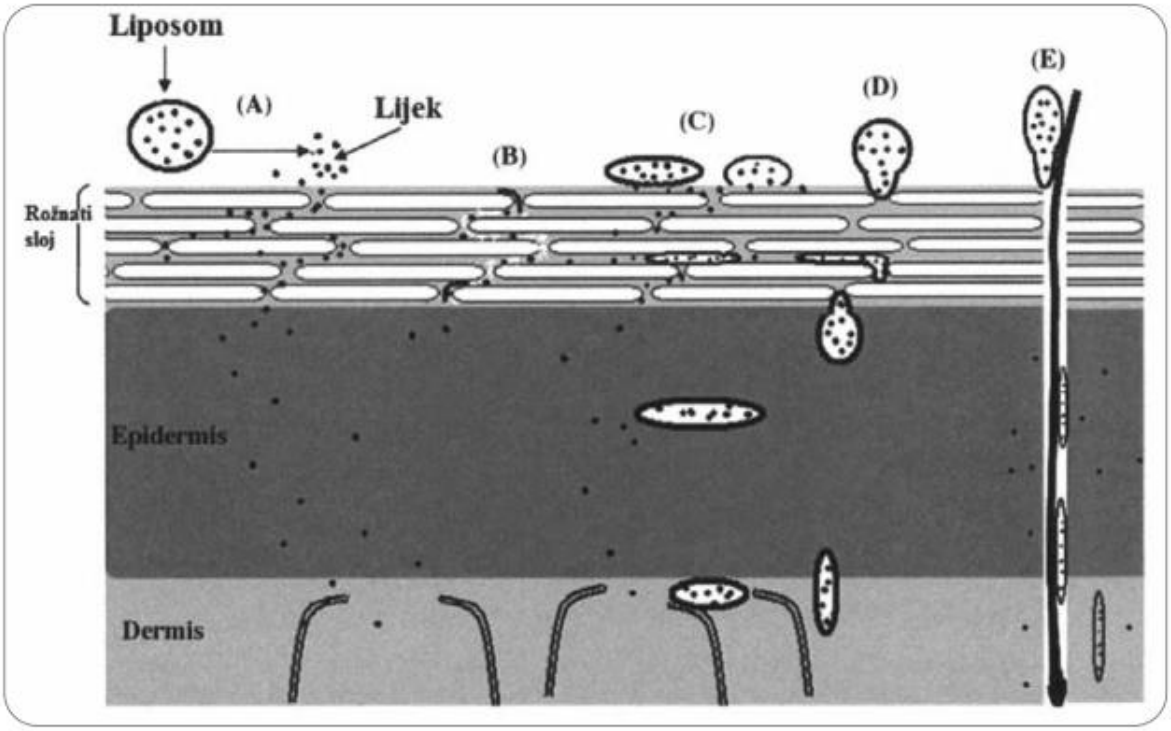
a) penetracija oslobođenog lijeka iz liposoma u kožu,

b) poticanje prolaska lijeka kroz kožu,

c) adsorpcija liposoma na površini kože,

d) prolaz intaktnih liposoma i

e) prolaz liposoma putem kožnih privjesaka (dlačnih folikula) (56).

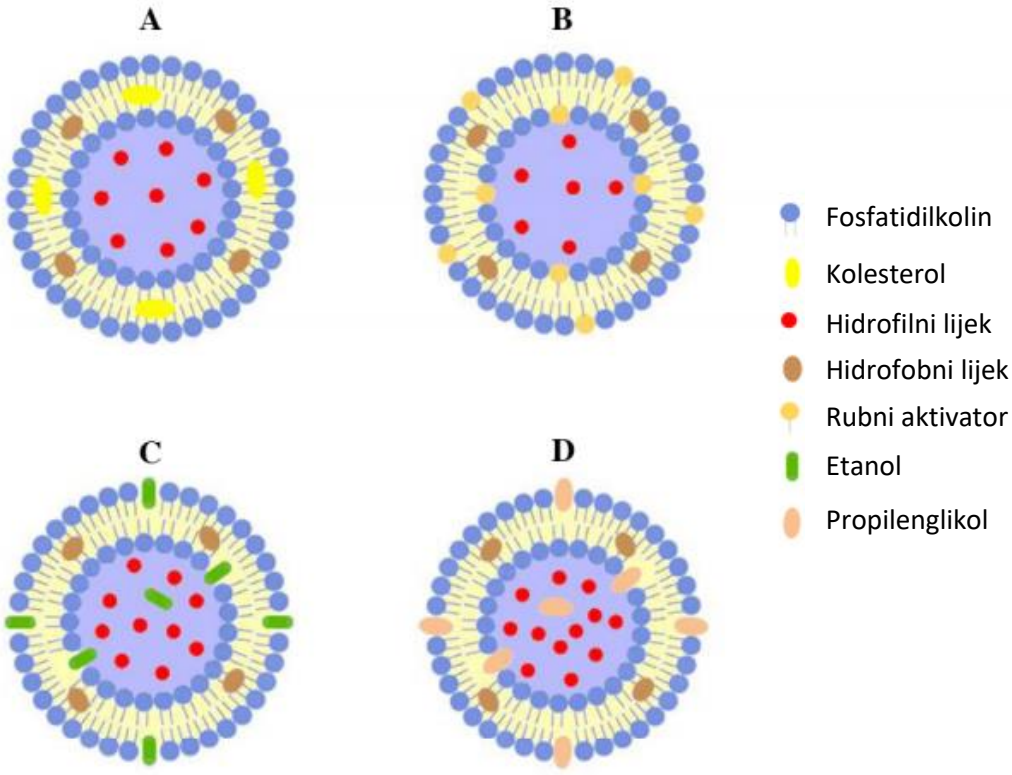


Slika 4. Interakcije liposoma i kože: prolaz oslobođenog lijeka iz liposoma (A), poticanje prolaska lijeka kroz kožu (B), adsorpcija i/ili fuzija liposoma (C), prolazak intaktnih vezikula (D) i prolazak liposoma uz dlačne folikule (E) (56). Preuzeto i prilagođeno hrvatskome jeziku uz dozvolu *Elsevier*-a.

Nakon oslobađanja lijeka iz liposoma na površini kože, lijek može penetrirati u rožnati sloj (*stratum corenum*). Međutim, smatra se da je dostava oslobođenog lijeka u kožu zanemariva zbog prirodne barijerne uloge rožnatog sloja kojeg čine gusto pakirane, keratinizirane stanice

uronjene u lipidni matriks. Transport uklopljenih djelatnih tvari u kožu omogućen je prvenstveno zbog interakcije lipidne komponente liposoma s lipidima rožnatoga sloja, čime se destabilizira čvrsta barijerna struktura kože te otvara put prolaska djelatnih tvari u kožu (57). Adsorpcija i/ili fuzija liposoma na površini kože omogućuje uklopljenim tvarima da difuzijom ulaze u epidermis. Mogućnost liposoma da intaktni prolaze kroz rožnati sloj ovisi prvenstveno o veličini liposoma i elastičnosti fosfolipidnog dvosloja. Prolaz liposoma putem kožnih privjesaka također ovisi o promjeru liposoma i elastičnosti dvoslojeva, no taj put nije dominantan zbog gustoće dlačnih folikula (56, 58).

Prema elastičnosti/rigidnosti fosfolipidnih dvoslojeva liposoma te pristunosti površinski aktivnih tvari (rubnih aktivatora) ili suotapala, liposomi se klasificiraju na konvencionalne i elastične liposome (Slika 5). Elastični liposomi obuhvaćaju deformabilne liposome, etosome, propilenglikol liposome i invasome.



Slika 5. Shematski prikaz različitih vrsta liposoma: konvencionalni liposom (A), deformabilni liposom (B), etosom (C), propilenglikol liposom (D) (59). Preuzeto i prilagođeno hrvatskome jeziku uz dozvolu *Eureka Science (FZC)*-a.

1.7.1. Konvencionalni liposomi

Fosfolipidni dvoslojevi konvencionalnih liposoma sastoje se od neutralnih fosfolipida (fosfatidilkolin) ili kombinacije neutralnih i negativno nabijenih fosfolipida, bez ili s dodatkom kolesterola (Slika 5A). Većina studija potvrdila je mali potencijal konvencionalnih liposoma u transdermalnoj dostavi lijekova. Oni se većinom odlažu na površini kože zbog rigidnosti fosfolipidnih dvoslojeva, pri čemu fosfolipidi djeluju kao pospješivači penetracije uklopljenog lijeka u gornje slojeve epidermisa (54, 58, 60, 61).

1.7.2. Deformabilni liposomi

Početkom 90-ih godina prošlog stoljeća Cevc i Blume (57) predstavili su liposome karakterizirane elastičnim fosfolipidnim dvoslojevima, tzv. deformabilne liposome. Poznati su i pod nazivima elastični, fleksibilni, ultraformabilni liposomi ili Transferosomi® (62, 63). Osim neutralnih fosfolipida ili kombinacije neutralnih i negativno/pozitivno nabijenih (fosfo)lipida, dvoslojevi deformabilnih liposoma sadrže 10-30% (m/m) rubnog aktivatora koji destabilizira integritet/čvrstoću liposomskih dvoslojeva čime se povećava deformabilnost/elastičnost membrane liposoma (Slika 5B). Rubni aktivatori zapravo su jednolančani surfaktanti s velikim radijusom zaobljenosti, čime se smanjuje stabilnost dvosloja, narušava njegova struktura tj. povećava deformabilnost ovojnice. Optimalnim omjerom fosfolipida i surfaktanta postižu se željena elastična svojstva liposoma (58).

Predložena su dva mehanizma kojima deformabilni liposomi poboljšavaju dostavu lijeka u/kroz kožu; prolaz intaktnih vezikula i poticanje prolaska lijeka kroz kožu (Slika 4). Koji će mehanizam prevladati ponajviše ovisi o fizičko-kemijskim svojstvima uklopljenog lijeka. Uklapanje hidrofilnih lijekova u deformabilne liposome može dovesti do stvaranja još jedne lipidne barijere na površini kože smanjujući tako njihov prolaz u kožu, te je stoga za njih

važnija interakcija fosfolipida liposoma i kože nego prolaz intaktnih liposoma. S druge pak strane, za lipofilne lijekove dominira mehanizam prolaska intaktnih vezikula jer liposomska ovojnica ne čini zapreku prolaska zbog visoke topljivosti lijeka u lipidima. Hoće li se lijek odlagati u gornjim slojevima kože ili će prodrijeti u dublje slojeve kože, ovisi i o oslobađanju lijeka iz vezikula, a na njega utječe afinitet vezanja lijeka u vezikule i topljivost lijeka u lipidima kože. Zato će liposomi iz kojih se lijek sporo oslobađa, djelovati poput spremišnih sustava koji polako oslobađaju lijek u kožu (56, 58, 64).

1.7.3. Etosomi

Etosomi su elastični liposomi koje su izvorno razvili Touitou i suradnici (65). Sastoje se od fosfolipida i vode kao i konvencionalni liposomi, ali dodatno sadrže visok udio etanola (20-45%) (Slika 5C). Etanol je u etosomima prisutan u vanjskom ili unutarnjem monosloju liposoma, te unutarnjem vodenom odjeljku etosoma i vanjskoj vodenoj fazi. Predloženi mehanizam poboljšane dostave lijeka u kožu putem etosoma uključuje učinak etanola iz vanjske vodene faze etosoma na fluidiziranje intercelularnog lipidnog matriksa kože, te učinak etanola unutar fosfolipidnog dvosloja na povećanu membransku elastičnost etosoma. Lipidi rožnatog sloja kože pri fiziološkoj temperaturi veoma su gusto pakirani i konformacijski posloženi. U kontaktu s lipidima, etanol smanjuje temperaturu faznoga prijelaza lipida te tako povećava njihovu fluidnost, što u konačnosti rezultira porastom propusnosti rožnatoga sloja kože. Budući da etanol povećava i fleksibilnost ovojnice etosoma, takve elastične vezikule lakše prolaze kroz rožnati sloj u kojem je narušen integritet intercelularnog lipidnog matriksa (58). U usporedbi s deformabilnim liposomima, koji mogu povećati isporuku uklopljene djelatne tvari (lijeka) u kožu samo kada se primjenjuju pod neokluzivnim zavojima

(63), etosomi su učinkoviti i pod neokluzivnim (66, 67) i pod okluzivnim uvjetima primjene (66, 68).

1.7.4. Propilenglikol liposomi

Propilenglikol liposomi predstavljaju noviju generaciju elastičnih liposoma sastavljenih od fosfolipida, propilenglikola i vode (Slika 5D). Udio propilenglikola u liposomskim disperzijama varira od 10-30% (69). Slično kao i etanol u etosomima, propilenglikol utječe na narušavanje integriteta rožnatog sloja kože, povećava elastičnost liposomskih dvoslojeva te pospješuje topljivost i uklapanje slabo topljivih lijekova u liposome. Propilenglikol liposomi su se pokazali prikladnima za dermalnu i transdermalnu dostavu lijekova (70-72).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Kitozan je biorazgradljiv i bioadhezivan polimer što je od iznimne važnosti u pogledu izrade i primjene kitozanskih hidrogelova kao polučvrstih podloga za oblikovanje topikalnih lijekova. Kitozan posjeduje i biološke učinke, djeluje hemostatski i potiče zacjeljivanje rana. Premda je dokazano da sam kitozan djeluje antimikrobno na različite vrste bakterija i gljivica (31), pregledom literature nisu pronađene studije u kojima je ispitivan antimikrobni učinak samih kitozanskih hidrogelova, bez uklopljene djelatne tvari.

Stoga je jedan od ciljeva ovog rada bio ispitati intrinzični antimikrobni učinak kitozanskih hidrogelova, pripravljenih iz različitih tipova kitozana: niske, srednje i visoke molekularne mase. Ispitivanja su provedena na način da su hidrogelovi inokulirani test mikroorganizmima (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231 i *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404) i čuvani u propisanim uvjetima, a redukcija broja mikroorganizama praćena je kroz određene vremenske intervale tijekom 28 dana.

Kako bi se utvrdilo potenciraju li kitozanski hidrogelovi antimikrobni učinak uklopljenog antibiotika, provedena su *in vitro* ispitivanja antibakterijskog djelovanja različitih tipova kitozanskih hidrogelova s uklopljenim azitromicinom na bakterijskom soju *S. aureus* ATCC 6538 agar-difuzijskim testom. Ispitivanja su dodatno proširena na liposomske hidrogelove (liposomi s azitromicinom uklopljeni u kitozanski hidrogel), budući da je dokazano da se uklapanjem antibiotika u liposome određenih fizičko-kemijskih svojstava može povećati njegova antibakterijska aktivnost, modificirati permeabilnost lijeka u kožu te osigurati produljeno oslobađanje antibiotika, što se u konačnosti odražava na terapijsku učinkovitost. Ispitivanja su provedena s liposomima negativnog naboja na površini koji su se međusobno razlikovali po elastičnosti/rigidnosti fosfolipidnih dvoslojeva, te je antibakterijska aktivnost

različitih liposomskih hidrogelova s azitromicinom uspoređivana s kontrolnim kitozanskim hidrogelovima azitromicina, liposomskim disperzijama azitromicina, otopinom azitromicina te izvornim kitozanskim hidrogelovima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

- kitozan male molekularne mase (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države, SAD)
- kitozan srednje molekularne mase (Fluka Biochemika, Steinheim, Njemačka)
- kitozan velike molekularne mase (Fluka Biochemika, Steinheim, Njemačka)
- mliječna kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- propilenglikol (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- etanol (BDH Prolabo, Lutterworth, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- azitromicin dihidrat (PLIVA Croatia Ltd., Zagreb, Hrvatska)
- fosfatidilkolin iz žumanjaka jaja (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Njemačka)
- fosfatidilglicerol-natrij (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Njemačka)
- monoacilfosfatidilkolin iz soje (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Njemačka)
- hidrogenirani sojin fosfatidilkolin (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Njemačka)
- fosfatni pufer, pH 7,5
- fosfatni pufer, pH 8,0
- uređaj za određivanje srednjeg promjera i zeta potencijala liposoma (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments, Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- standard za određivanje veličine liposoma, 200 nm (Duke Scientific Corporation, SAD)
- standard za određivanje zeta potencijala, -50 mV (Zeta Potential Transfer Standard, Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- celulozno-nitratna membrana veličine pora 0,45 µm (Sartorius AG, Göttingen, Njemačka)
- polikarbonatna membrana promjera pora 400 nm (LiposoFast Basic, Avestin, Kanada)
- pH-metar i elektroda za polučvrste pripravke (Mettler-Toledo, Greifensee, Švicarska)

- triptoza sojin agar (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francuska)
- Sabouraudov dekstrozni agar (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francuska)
- D/E bujon za neutralizaciju (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Francuska)
- Difco antibiotski medij 11 (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Francuska)

Fosfatni pufer, pH 7,5 pripremljen je otapanjem 1,3609 g KH_2PO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvatska) u demineraliziranoj vodi koristeći odmjernu tikvicu od 1000 ml. pH pufera je podešen na 7,5 dodatkom 10 M otopine KOH. Tako pripravljen pufer je zatim profiltriran kroz celulozno-nitratnu membranu veličine pora 0,45 µm.

Fosfatni pufer, pH 8,0, korišten u mikrobiološkim ispitivanjima, pripremljen je otapanjem 16,73 g K_2HPO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvatska) i 0,523 g KH_2PO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvatska) u pročišćenoj vodi (odmjerna tikvica od 1000 ml).

Sva mikrobiološka ispitivanja provedena su u aseptičkim uvjetima primjenjujući aseptične tehnike rada.

3.2. Postupak priprave kitozanskih hidrogelova

Kitozanski hidrogelovi (4%, 3% i 2,5% m/m) pripravljeni su otapanjem kitozana niske (LMW), srednje (MMW) i visoke molekularne mase (HMW) u 3,5% (v/v) mliječnoj kiselini (Tablica 1) u čaši od 150 ml, miješanjem polimera i kiseline sa staklenim štapićem. Potom je dodan propilenglikol te se smjesa nastavila miješati tijekom daljnjih 5-10 minuta. Nakon toga je dodana demineralizirana voda, smjesa je homogenizirana, prekrivena parafilmom i ostavljena preko noći na sobnoj temperaturi kako bi se omogućilo potpuno bubrenje i hidratacija polimera. Ukupna masa ovako pripravljenih hidrogelova iznosila je 100 g.

Tablica 1. Sastav kitozanskih hidrogelova

Tip kitozana	Kitozan (g)	3,5% (v/v) mliječna kiselina (g)	Propilenglikol (g)	Demineralizirana voda (g)
LMW	4	44	10	42
MMW	3	44	10	43
HMW	2,5	40	10	47,5

HMW, kitozan visoke molekularne mase; LMW, kitozan niske molekularne mase; MMW, kitozan srednje molekularne mase.

3.3. Postupak pripreme liposoma

Pripravljeni su konvencionalni i dvije formulacije elastičnih liposoma s azitromicinom. Konvencionalni liposomi (CL) su pripremljeni modificiranom proliposomskom metodom (73). Fosfatidilkolin i azitromicin (Tablica 2) otopljeni su u etanolu (300 mg), nakon čega je dodano 0,5 ml fosfatnog pufera (pH 7,5) uz kontinuirano miješanje na magnetskoj mješalici (600 okretaja/min, 60 °C). Tako pripravljena proliposomska mikstura ohlađena je na sobnu temperaturu i zatim je prevedena u liposomsku disperziju polaganim dodavanjem fosfatnog pufera (pH 7,5) do konačnog volumena disperzije liposoma (10 ml). Kontinuirano miješanje

disperzije (600 okretaja/min) na sobnoj temperaturi nastavljeno je tijekom daljnjih 45 minuta.

Za pripravu elastičnih liposoma, propilenglikol liposoma (PGL) i deformabilnih propilenglikol liposoma (DPGL), korištena je metoda razrjeđenja poliola (74). Odgovarajuće mase različitih fosfolipida i azitromicina (Tablica 2) su otopljene u propilenglikolu u čašici od 25 ml koristeći magnetsku miješalicu (600 okretaja/min, 50 °C). Zatim je dodan 1 ml fosfatnog pufera (pH 7,5), prethodno zagrijan na istu temperaturu. Smjesa je miješana oko 2 min (50 °C) te je nakon toga razrijeđena s 9 ml fosfatnog pufera (pH 7,5), postepenim dodavanjem (kap po kap), uz kontinuirano miješanje na magnetskoj mješalici (45 min).

Konačni volumen svih liposomskih disperzija iznosio je 10 ml.

Disperzije propilenglikol i deformabilnih propilenglikol liposoma s azitromicinom (PGL i DPGL) su ručno ekstrudirane kroz polikarbonatne membrane promjera pora 400 nm na sobnoj temperaturi (3 ciklusa), dok su konvencionalni liposomi (CL) prije ekstruzije prethodno zagrijani na temperaturu od 50 °C. Sve disperzije liposoma čuvane su u hladnjaku na 4 °C do daljnjih ispitivanja.

Tablica 2. Sastav liposoma s azitromicinom

Tip liposoma	EPC (mg)	EPG (mg)	SPC-3 (mg)	SLPC-80 (mg)	AZT (mg)	PG (g)	Fosfatni pufer, pH 7,5 (ml)
CL	140	10	50	-	30	-	10
PGL	190	10	-	-	30	1	9
DPGL	160	10	-	30	30	1	9

AZT, azitromicin; CL, kovencionalni (klasični) liposomi; DPGL, deformabilni propilenglikol liposomi; EPC, fosfatidilkolin iz žumanjaka jaja; EPG, fosfatidilglicerol-natrij; PG, propilenglikol; PGL, propilenglikol liposomi; SLPC-80, monoacilfosfatidilkolin iz soje; SPC-3, hidrogenirani sojin fosfatidilkolin.

3.3.1. Mjerenje veličine i zeta potencijala liposoma

Srednji promjeri, indeksi polidisperznosti (PDI) i zeta potencijali liposoma s azitromicinom određivani su na instrumentu Zetasizer 3000HS na 25 °C koristeći kut raspršivanja od 90° (za mjerenje veličine i indeksa polidisperznosti) i kapilarnu ćeliju s optičkim modulatorom pri 1000 Hz (za mjerenje zeta potencijala). Prije mjerenja, instrument je kalibriran s odgovarajućim standardima za veličinu i zeta potencijal. Uzorci za mjerenje su pripremljeni razrjeđivanjem liposomskih disperzija s odgovarajućim volumenom fosfatnog pufera, pH 7,5 (74).

3.3.2. Određivanje elastičnosti/rigidnosti liposoma s azitromicinom

Elastičnost/rigidnost fosfolipidnih dvoslojeva različitih tipova liposoma s azitromicinom određena je korištenjem uređaja koji omogućuje kontinuiranu ekstruziju liposoma kroz polikarbonatne membrane veličine pora od 100 nm (r_p) pod stalnim tlakom (2,5 bara) u određenom vremenu (5 minuta). Ispitivanje se baziralo na određivanju mase ekstrudiranih liposoma (J) i srednjeg promjera liposoma nakon ekstruzije (r_v) (74). Stupanj elastičnosti/rigidnosti fosfolipidnih dvoslojeva (E) liposoma s azitromicinom izračunat je primjenom sljedećeg izraza:

$$E = J \cdot (r_v/r_p)^2.$$

3.4. Priprava liposomskih hidrogelova s azitromicinom

Liposomi s azitromicinom (CL, PGL i DPGL), kod kojih je prethodno provedeno odjeljivanje neukloplјenog azitromicina, ručno su umiješani u različite kitozanske hidrogelove (pripravljene iz kitozana različitih molekularnih masa) u koncentraciji 30% (m/m; liposomi/kitozanski hidrogel s liposomima). Na isti način pripravljeni su i kontrolni uzorci

hidrogelova. Oni su umjesto liposoma sadržavali otopinu azitromicina uklopljenu u kitozanske hidrogelove u koncentracijama koje odgovaraju koncentraciji azitromicina u liposomima. Za otapanje azitromicina korištena je smjesa koncentriranog etanola i vode (6/4, v/v). Udio otopine azitromicina u kontrolnim kitozanskim hidrogelovima iznosio je 30% (m/m).

3.5. Ispitivanje antimikrobnog učinka izvornih kitozanskih hidrogelova

Procjena antimikrobne aktivnosti izvornih kitozanskih hidrogelova (4% niskomolekularni kitozan, 3% srednjemolekularni kitozan i 2,5% visokomolekularni kitozan, m/m) određivana je na temelju logaritamske redukcije broja test mikroorganizama u odnosu na njihov početni (inokulirani) broj koristeći farmakopejske metode koje se primijenjuju za ispitivanje učinkovitosti konzervansa u pripravcima za topikalnu primjenu (Ph. Eur. 9.0, poglavlje 5.1.3., 2018; USP41-NF36, poglavlje <51>, 2018). Kriteriji prihvatljivosti prema farmakopejskim zahtjevima za topikalne pripravke prikazani su u Tablicama 3 i 4, pri čemu se Tablica 3 odnosi na Europsku farmakopeju (Ph. Eur. 9.0, poglavlje 5.1.3., 2018), a Tablica 4 na Američku farmakopeju (USP41-NF36, poglavlje <51>, 2018). Kriterij A predstavlja preporučenu antimikrobnu djelotvornost pripravka. U opravdanim slučajevima kada se ne može postići antimikrobna djelotvornost u skladu s kriterijem A (npr. zbog povećanog rizika od nuspojava), mora biti zadovoljen kriterij B (Ph. Eur. 9.0, poglavlje 5.1.3., 2018). Smatra se da nije prisutno povećanje broja test mikroorganizama ukoliko njihov broj nije veći od 0,5 $\log_{10}$ u odnosu na njihov broj u prethodnom vremenskom intervalu (USP41-NF36, poglavlje <51>, 2018).

Tablica 3. Kriteriji prihvatljivosti prema zahtjevima Europske farmakopeje (Ph. Eur. 9.0, poglavlje 5.1.3., 2018)

Mikroorganizmi	**Kriterij**	**Logaritamska redukcija**			
		2. dan	**7. dan**	**14. dan**	**28. dan**
Bakterije	A	2	3	-	NI
	B	-	-	3	NI
Kvasci i plijesni	A	-	-	2	NI
	B	-	-	1	NI

NI, nema povećanja broja mikroorganizama u odnosu na ispitivanje u prethodnom vremenskom razdoblju.

Tablica 4. Kriteriji prihvatljivosti prema zahtjevima Američke farmakopeje (USP41-NF36, poglavlje <51>, 2018)

Mikroorganizmi	**Interval**	**Kriterij prihvatljivosti**
Bakterije	**14. dan**	Ne manje od 2,0 logaritamske redukcije u odnosu na početni broj mikroorganizama.
	28. dan	Ne smije biti veći broj mikroorganizama u odnosu na njihov broj 14. dana.
Kvasci i plijesni	**14. dan**	Ne smije biti veći broj mikroorganizama u odnosu na početni broj mikroorganizama.
	28. dan	Ne smije biti veći broj mikroorganizama u odnosu na početni broj mikroorganizama.

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti izvornih kitozanskih hidrogelova provedeno je na sljedećim test mikroorganizmima:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538,
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027,
- *Escherichia coli* ATCC 8739,
- *Candida albicans* ATCC 10231 i
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

Suspenzije navedenih ATCC kultura pripremljene su tzv. *seed lot* postupkom održavanja kultura mikroorganizama s manje od pet pasaža od jedne serije matične kulture. Suspenzije inokuluma s koncentracijom mikroorganizama od 10^8 CFU/ml pripremljene su u fiziološkoj otopini za bakterije i kvasce, a za plijesni u fiziološkoj otopini s 0,05% Polisorbata 80. Ciljana koncentracija test mikroorganizama u ispitivanom uzorku iznosila je 10^5–10^6 CFU/ml odnosno CFU/g, a volumen inokuluma iznosio je 0,5–1% volumena ispitivanog uzorka.

Ispitivanje je provedeno na slijedeći način: U odgovarajuće spremnike odvagano je po 20 g ispitivanih uzoraka izvornih kitozanskih hidrogelova, pri čemu je za svaki test mikroorganizam upotrebljavan zaseban spremnik. Uzorak hidrogela u spremniku je inokuliran s 0,1 ml suspenzije bakterija i 0,2 ml suspenzije kvasaca, odnosno plijesni. Nakon inokulacije, uzorci hidrogelova su dobro izmiješani radi postizanja homogene distribucije mikroorganizama te su čuvani pri temperaturi 20–25 °C, zaštićeni od svjetla, tijekom 28 dana.

Broj ispitivanih (test) mikroorganizama u inokuliranim uzorcima kitozanskih hidrogelova određivan je neposredno po inokulaciji, te u propisanim vremenskim intervalima u skladu s navedenim farmakopejskim zahtjevima (Tablice 3 i 4) prema farmakopejskim metodama (Ph.

Eur. 9.0, poglavlje 5.1.3., 2018; USP41-NF36, poglavlje <51>, 2018) određivanja broja mikroorganizama ugradnjom u krutu hranjivu podlogu (eng. *Pour-plate method*). U tu svrhu odvagano je po 1 g inokuliranog uzorka hidrogela za svaki test mikroorganizam te su pripremljena serijska razrjeđenja uzorka od 10^{-1} do 10^{-5} u epruvetama s 9 ml bujona za neutralizaciju. Broj mikroorganizama je određivan direktnom metodom u duplikatu, na način da je u Petrijeve zdjelice paralelno stavljeno po 1 ml svakog razrjeđenja ispitivanog uzorka i homogenizirano s 15–20 ml prethodno otopljene hranjive podloge. Za rast bakterija upotrebljavan je triptoza sojin agar (eng. *Tryptic Soy Agar, TSA)* te je provedena inkubacija tijekom 3–5 dana pri 30–35 °C. Za rast kvasaca i plijesni korišten je Sabouraudov dekstrozni agar (eng*. Sabouraud Dextrose Agar, SDA*). Inkubacija je provedena pri 20–25 °C tijekom 5 dana za kvasce, te tijekom 5–7 dana za plijesni.

Tijekom provedbe testa antimikrobne aktivnosti izvornih kitozanskih hidrogelova paralelno je proveden test negativne kontrole odnosno kontrole mikrobiološke čistoće uzoraka hidrogelova koji nisu inokulirani test mikroorganizmima, te test pozitivne kontrole kojeg su predstavljali inokulimi ispitivanih mikroorganizama.

Nakon provedene inkubacije uzoraka kitozanskih hidrogelova inokuliranih test mikroorganizmima, na temelju broja izraslih kolonija u zadanim vremenskih intervalima, izračunat je broj mikroorganizama u 1 g ispitivanog uzorka prema sljedećem izrazu:

$$X \cdot \frac{1}{10^{-n}},$$

pri čemu X predstavlja broj izraslih kolonija u određenom razrjeđenju, a n označava razrjeđenje uzorka. Na temelju broja mikroorganizama u 1 g ispitivanog uzorka izračunata je pripadajuća logaritamska ($\log_{10}$) vrijednost.

3.6. Ispitivanje antibakterijskog učinka liposomskih hidrogelova metodom difuzije

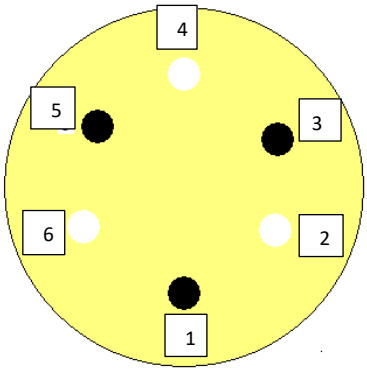
Antibakterijska aktivnost različitih liposomskih hidrogelova s azitromicinom određivana je *in vitro* tzv. agar-difuzijskim testom na bakterijskom soju *S. aureus* ATCC 6538. U tu svrhu priređen je inokulum bakterije *S. aureus* ATCC 6538 u koncentraciji od $1x10^8$ CFU/ml. Razrijeđen je puferiranom otopinom natrij klorida, pH 7,0 (1:10) i zatim ravnomjerno dispergiran (1:100) u tekućem antibiotskom mediju 11. Po 20 ml inokuliranog agara pipetirano je u svaku sterilnu Petrijevu ploču (90 x 15 mm) i ostavljeno na ravnoj površini da se skrutne. Zatim je na svakoj ploči izbušeno šest jažica (promjera 6 mm) pomoću steriliziranih cijevi od nehrđajućeg čelika i po 0,1 ml tekuće disperzije uzorka je dodano u jažice. Ploče su postavljene na inkubaciju na 37 °C u aerobnim uvjetima tijekom naredna 24 sata. Nakon inkubacije opažen je konfluentan rast bakterija na ploči, što je ujedno dokaz hranjivosti podloge. Promjeri zona inhibicije rasta bakterija mjereni su u milimetrima.

Ako zona inhibicije nije prisutna oko jažice, smatra se da ispitivani uzorak nema baktericidno djelovanje na ispitivani soj bakterija.

Ovim postupkom ispitivani su: uzorci različitih tipova liposoma s azitromicinom, uzorci liposomskih hidrogelova pripravljenih s različitim tipovima liposoma i kitozana, različiti kitozanski hidrogelovi s otopinom azitromicina te izvorni kitozanski hidrogelovi. U tri jažice (Slika 6; pozicije 2, 4 i 6), ukapavana je disperzija liposoma s azitromicinom kao referentna disperzija. U preostale tri jažice (Slika 6; pozicije 1, 3 i 5) stavljene su tekuće disperzije liposomskih hidrogelova, pri čemu je koncentracija azitromicina u liposomskim hidrogelovima bila ekvivalentna onoj u liposomskim disperzijama. Masa azitromicina u 0,1 ml ispitivanih uzoraka iznosila je oko 1 µg. Isti postupak proveden je s otopinom azitromicina (Slika 6; pozicije 2, 4 i 6) kao referentnom otopinom, te kitozanskim hidrogelovima s inkorporiranom otopinom azitromicina (Slika 6; pozicije 1, 3 i 5). Pritom je koncentracija

azitromicina u hidrogelovima bila ista kao u liposomskim hidrogelovima. Dodatno je kao kontrola ispitano djelovanje izvornih kitozanskih hidrogelova (Slika 6, pozicije 1, 3 i 5) i otapala korištenog za pripremu otopine azitromicina (Slika 6, pozicije 2,4 i 6).

Sva ispitivanja su provedena u duplikatu.



Slika 6. Shematski prikaz ukapavanja tekućih disperzija ispitivanih uzoraka u bijele (pozicije 2, 4 i 6) i crne jažice (pozicije 1, 3 i 5).

Pozicija	Uzorak	Uzorak	Uzorak	Uzorak	Uzorak
2, 4, 6	CL	PGL	DPGL	AZT	OT
1	CL-LMW	PGL-LMW	DPGL-LMW	AZT-LMW	LMW
3	CL-MMW	PGL-MMW	DPGL-MMW	AZT-MMW	MMW
5	CL-HMW	PGL-HMW	DPGL-HMW	AZT-HMW	HMW

AZT, otopina azitromicina; AZT-HMW, visokomolekularni kitozanski hidrogel s otopinom azitromicina; AZT-LMW, niskomolekularni kitozanski hidrogel s otopinom azitromicina; AZT-MMW, srednjemolekularni kitozanski hidrogel s otopinom azitromicina; CL, konvencionalni liposomi s azitromicinom; CL-HMW, konvencionalni liposomi s azitromicinom u visokomolekularnom kitozanskom hidrogelu; CL-LMW, konvencionalni liposomi s azitromicinom u niskomolekularnom kitozanskom hidrogelu; CL-MMW, konvencionalni liposomi s azitromicinom u srednjemolekularnom kitozanskom hidrogelu; DPGL, deformabilni propilenglikol liposomi s azitromicinom; DPGL-HMW, deformabilni propilenglikol liposomi s azitromicinom u visokomolekularnom kitozanskom hidrogelu; DPGL-LMW, deformabilni propilenglikol liposomi s azitromicinom u niskomolekularnom kitozanskom hidrogelu; DPGL-MMW, deformabilni propilenglikol liposomi s azitromicinom u srednjemolekularnom kitozanskom hidrogelu; HMW, visokomolekularni kitozanski hidrogel; LMW, niskomolekularni kitozanski hidrogel; MMW, srednjemolekularni kitozanski hidrogel; OT, otapalo korišteno za pripremu otopine azitromicina (smjesa etanola i vode, 4/6, v/v); PGL, propilenglikol liposomi s azitromicinom; PGL-HMW, propilenglikol liposomi s azitromicinom u visokomolekularnom kitozanskom hidrogelu; PGL-LMW, propilenglikol liposomi s azitromicinom u niskomolekularnom kitozanskom hidrogelu; PGL-MMW, propilenglikol liposomi s azitromicinom u srednjemolekularnom kitozanskom hidrogelu.

4. REZULTATI

4.1. Kitozanski hidrogelovi

Svim izvornim kitozanskim hidrogelovima izmjeren je pH korištenjem pH-metra i elektrode za polučvrste pripravke. Mjerenja su provedena na temperaturi od 25 °C, a rezultati su prikazani Tablicom 5.

Tablica 5. pH vrijednosti izvornih kitozanskih hidrogelova

Tip kitozana	Koncentracija kitozana (%, m/m)	pH vrijednost
LMW	4	4,66
MMW	3	4,97
HMW	2,5	4,67

HMW, visokomolekularni kitozan; LMW, niskomolekularni kitozan; MMW, srednjemolekularni kitozan.

4.2. Fizičko-kemijska svojstva liposoma s azitromicinom

U hidrogelove pripravljene iz kitozana različitih molekularnih masa uklopljeni su različiti tipovi liposoma s azitromicinom; konvencionalni (CL), propilenglikol (PGL) i deformabilni propilenglikol liposomi (DPGL). Provedna je osnovna fizičko-kemijska karakterizacija liposoma, a rezultati su prikazani Tablicom 6.

Tablica 6. Fizičko-kemijska svojstva liposoma s azitromicinom

Tip liposoma	Srednji promjer (nm)	PDI	Zeta potencijal (mV)	Stupanj elastičnosti (E)	µg uklopljenog AZT/mg lipida
CL	253 ± 3	0,17 ± 0,03	-62,5 ± 0,8	0,56 ± 0,2	6,86 ± 0,9
PGL	216 ± 2	0,19 ± 0,02	-56,2 ± 0,7	12,64 ± 0,2	7,86 ± 0,3
DPGL	179 ± 1	0,20 ± 0,02	-54,3 ± 0,6	17,02 ± 0,3	7,55 ± 0,7

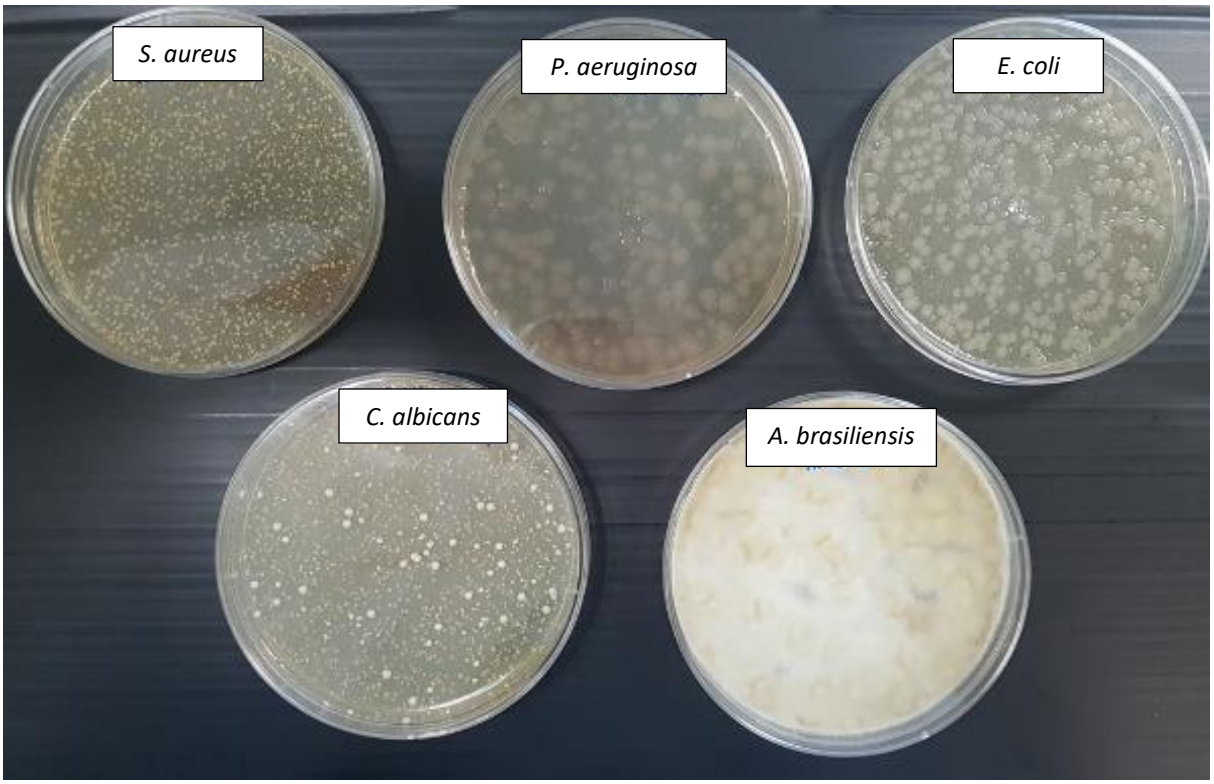
AZT, azitromicin; CL, konvencionalni liposomi s azitromicinom; DPGL, deformabilni propilenglikol liposomi s azitromicinom; PDI, indeks polidisperznosti; PGL, propilenglikol liposomi s azitromicinom. Prikazani rezultati predstavljaju prosječne vrijednosti dobivene iz 3 mjerenja (srednji promjer, indeks polidisperznosti, stupanj elastičnosti, uklapanje AZT-a), odnosno 5 mjerenja (zeta potencijal).

Srednji promjeri liposoma s azitromicinom kretali su se između 180 nm (DPGL) i 250 nm (CL) te su bili karakterizirani niskim indeksom polidisperznosti (≤0,2). Takvi rezultati posljedica su provedene homogenizacije izvornih liposomskih disperzija postupkom ekstruzije liposoma kroz polikarbonatne membrane. Izrazito negativne vrijednosti zeta potencijala svih liposoma (-55 do -60 mV) posljedica su prisutnog fosfatidilglicerola (5%) u fosfolipidnim dvoslojevima. Konvencionalni liposomi su bili karakterizirani čvršćim/rigidnim membranama u odnosu na elastične liposome; PGL i DPGL. Tako je stupanj membranske elastičnosti (E) propilenglikol liposoma bio 22 puta veći, a kod deformabilnih propilenglikol liposoma gotovo 30 puta veći od stupnja membranske elastičnosti konvencionalnih liposoma (0,56). Takvi rezultati posljedica su prisutnog propilenglikola (10%) u disperzijama propilenglikol i deformabilnih propilenglikol liposoma, koji se interkalira u vanjske i unutarnje monoslojeve te doprinosi fleksibilnosti (elastičnosti) dvoslojeva. Veća elastičnost deformabilnih propilenglikol liposoma (17) u odnosu na propilenglikol liposome (12,6) posljedica je prisutnog lizofosfolipida (30%) u dvoslojevima deformabilnih propilenglikol liposoma. Neovisno o fosfolipidnom sastavu i prisustvu propilenglikola, svi liposomi uklopili su podjednaki udio azitromicina koji se kretao od 6,86 μg/mg lipida (CL) do 7,86 μg/mg lipida (PGL).

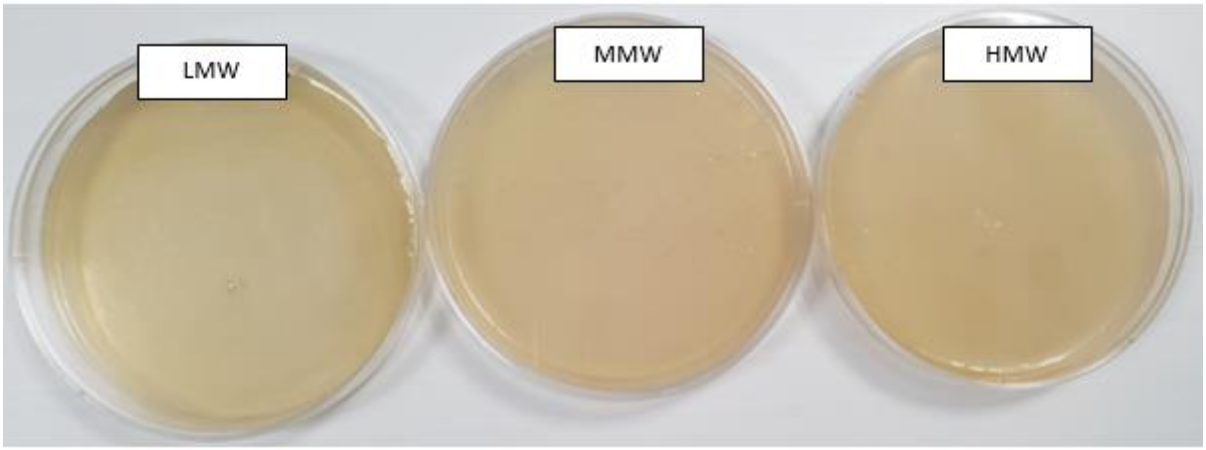
4.3. Antimikrobna aktivnost izvornih kitozanskih hidrogelova

Procjena antimikrobnog učinka izvornih kitozanskih hidrogelova provedena je na način detaljno opisan u poglavlju 3.5. Rezultati ispitivanja izraženi su kao logaritamska redukcija broja mikroorganizama u odnosu na inokulum (početni broj mikroorganizama), odnosno kao logaritamska redukcija broja mikroorganizama između dva vremenska intervala ispitivanja (ovisno o kriterijima prihvatljivosti navedenim u Tablicama 3 i 4). Pritom su kolonije ispitivanih mikroorganizama na TSA, odnosno SDA hranjivim podlogama predstavljale

inokulume odnosno pozitivnu kontrolu (Slika 7), a hidrogelovi koji nisu inokulirani test mikroorganizmima negativnu kontrolu (Slika 8).



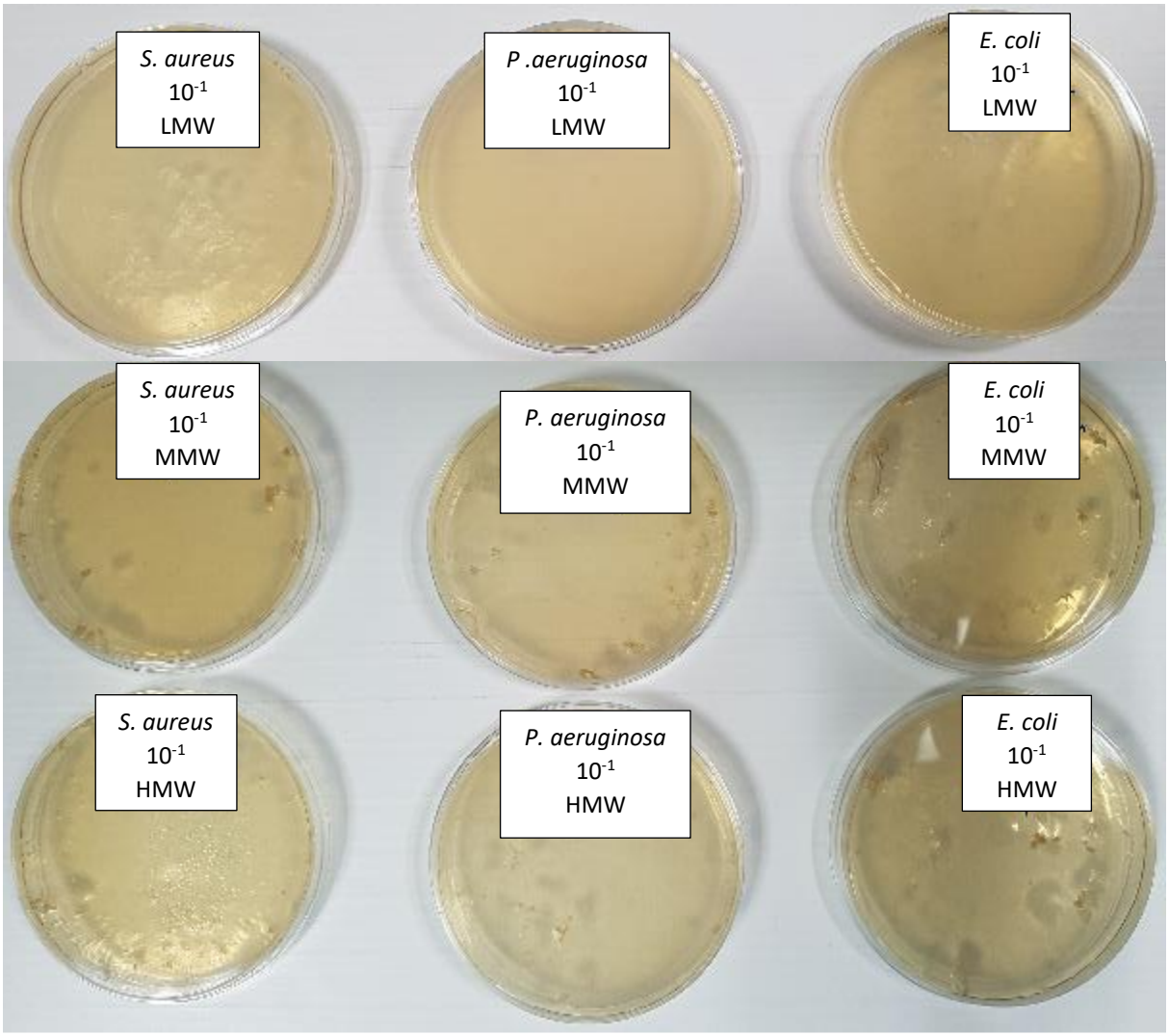
Slika 7. Kolonije ispitivanih sojeva bakterija na TSA, te kvasaca i plijesni na SDA hranjivim podlogama (inokulum, pozitivna kontrola).



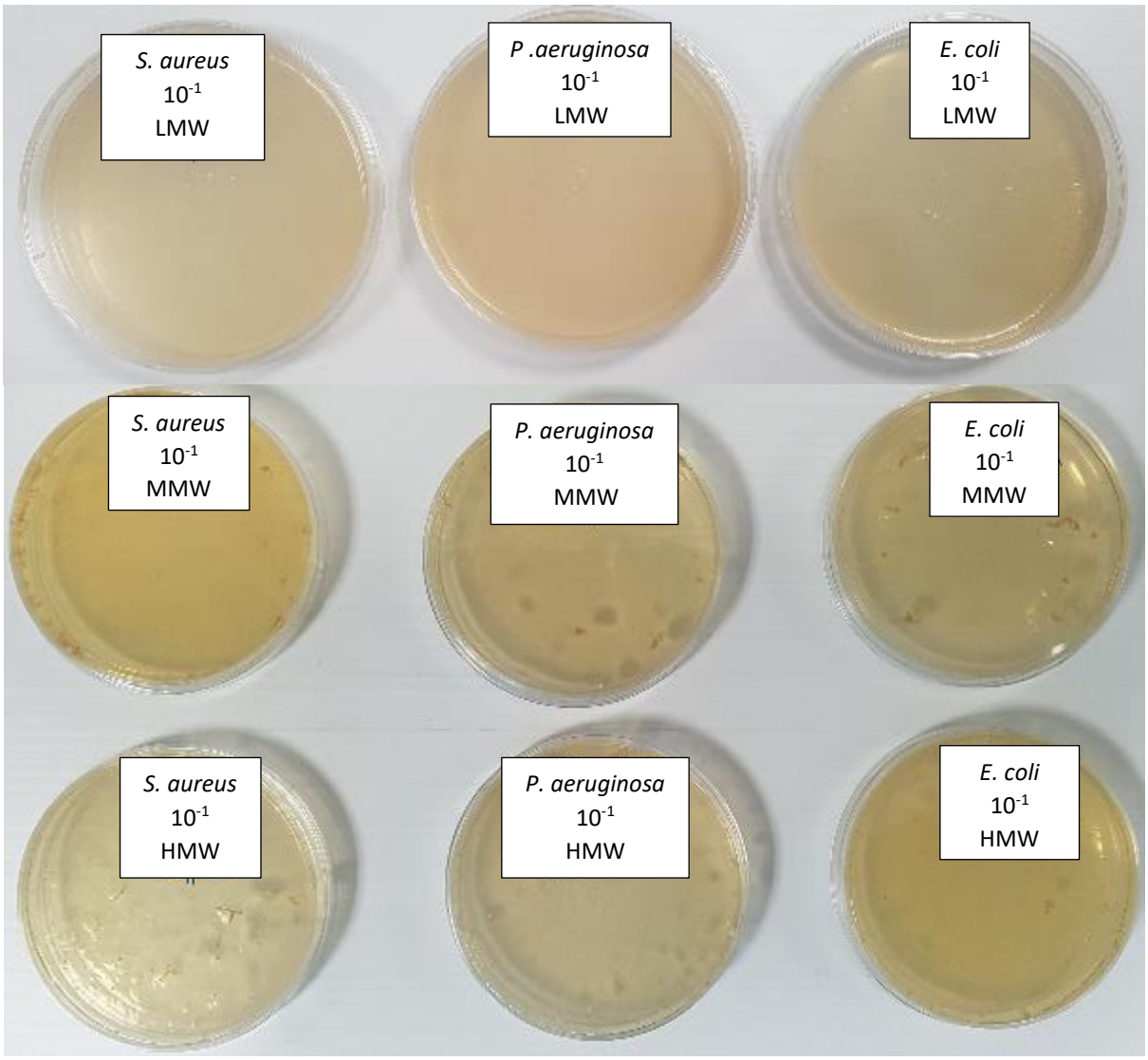
Slika 8. Izvorni kitozanski hidrogelovi pripravljeni iz niskomolekularnog (LMW), srednjemolekularnog (MMW) i visokomolekularnog (HMW) kitozana koji nisu inokulirani ispitvanim mikroorganizmima (negativna kontrola na TSA hranjivoj podlozi), nakon 28 dana inkubacije.

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti izvornih kitozanskih hidrogelova prikazani su Slikama 9-16 te Tablicama 7-9.

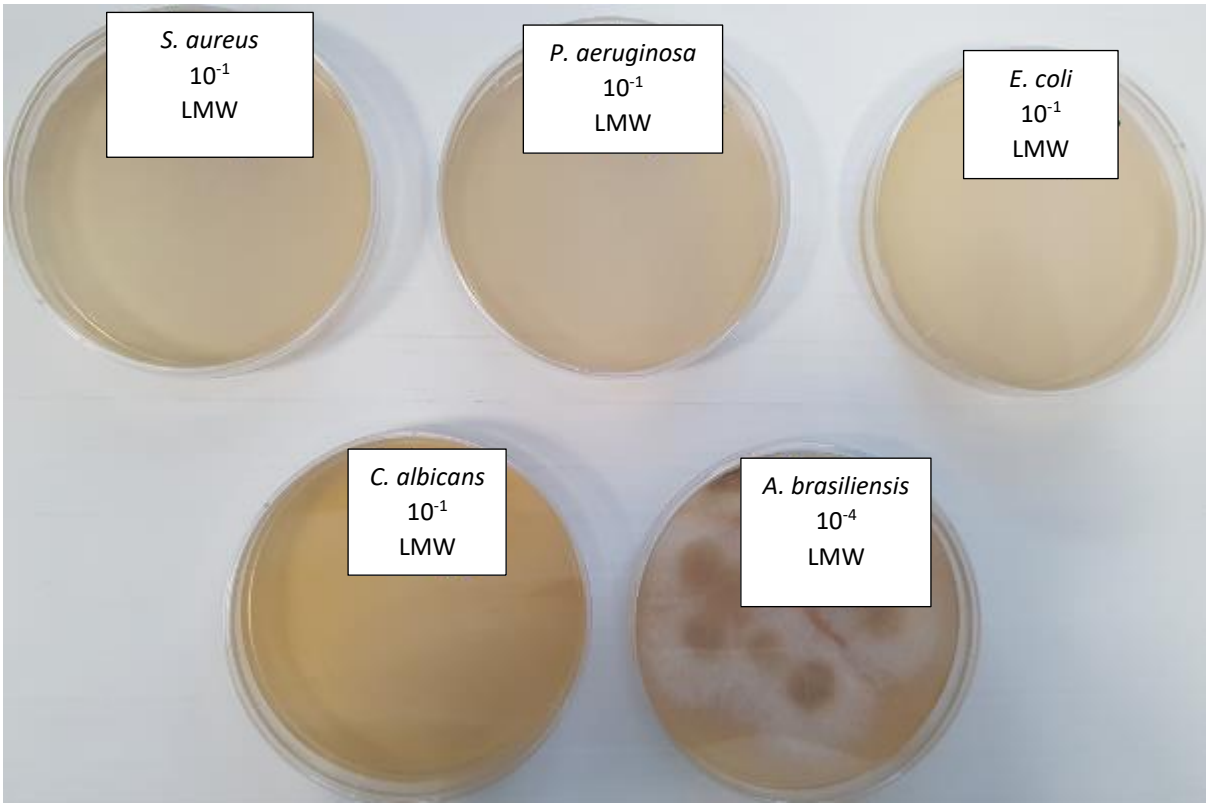
Neovisno o tipu kitozana korištenom za izradu hidrogelova, tijekom 28 dana ispitivanja svi su hidrogelovi pokazali intrinzičnu antibakterijsku i antifungalnu aktivnost prema zadanim uvjetima testiranja (poglavlje 3.5.). Jedino je aktivnost kitozanskih hidrogelova prema plijesni (*A. brasiliensis* ATCC 16404) bila slaba, te je već nakon 14 dana ispitivanja uočeno prisustvo određenog broja kolonija plijesni (niskomolekularni kitozanski hidrogel: 7,0 x 10^4 CFU/ml, Slika 11; srednjemolekularni kitozanski hidrogel: 1,1 x 10^4 CFU/ml, Slika 13 te visokomolekularni kitozanski hidrogel: 1,1 x 10^4 CFU/ml, Slika 13). Prema zahtjevima Europske farmakopeje (Tablica 3), niskomolekularni kitozanski hidrogel nije zadovoljio zahtjev za logaritamskim smanjenjem broja plijesni nakon 14 dana, dok su srednjemolekularni i visokomolekularni kitozanski hidrogelovi nakon 14 dana pokazali smanjenje broja plijesni za 1 log te time zadovoljili kriterij B. Međutim, uzevši u obzir zahtjeve Američke farmakopeje (Tablica 4), s obzirom da uočen rast plijesni nije bio veći u odnosu na početni broj (Tablice 7-9), kriteriji prihvatljivosti za plijesni za 14. dan su zadovoljeni. U sljedećem vremenskom intervalu (28. dan) i dalje je bio prisutan rast plijesni (niskomolekularni kitozanski hidrogel: 2,0 x 10^4 CFU/ml, Slika 14; srednjemolekularni kitozanski hidrogel: 6,0 x 10^3 CFU/ml, Slika 16; visokomolekularni kitozanski hidrogel: 8,0 x 10^3 CFU/ml, Slika 16), no s obzirom da uočen broj kolonija plijesni nije bio veći u odnosu na početni broj, tj. u odnosu na ispitivanje u prethodnom vremenskom intervalu, zadovoljeni su kriteriji prihvatljivosti i prema Europskoj i prema Američkoj farmakopeji (Tablice 3 i 4).



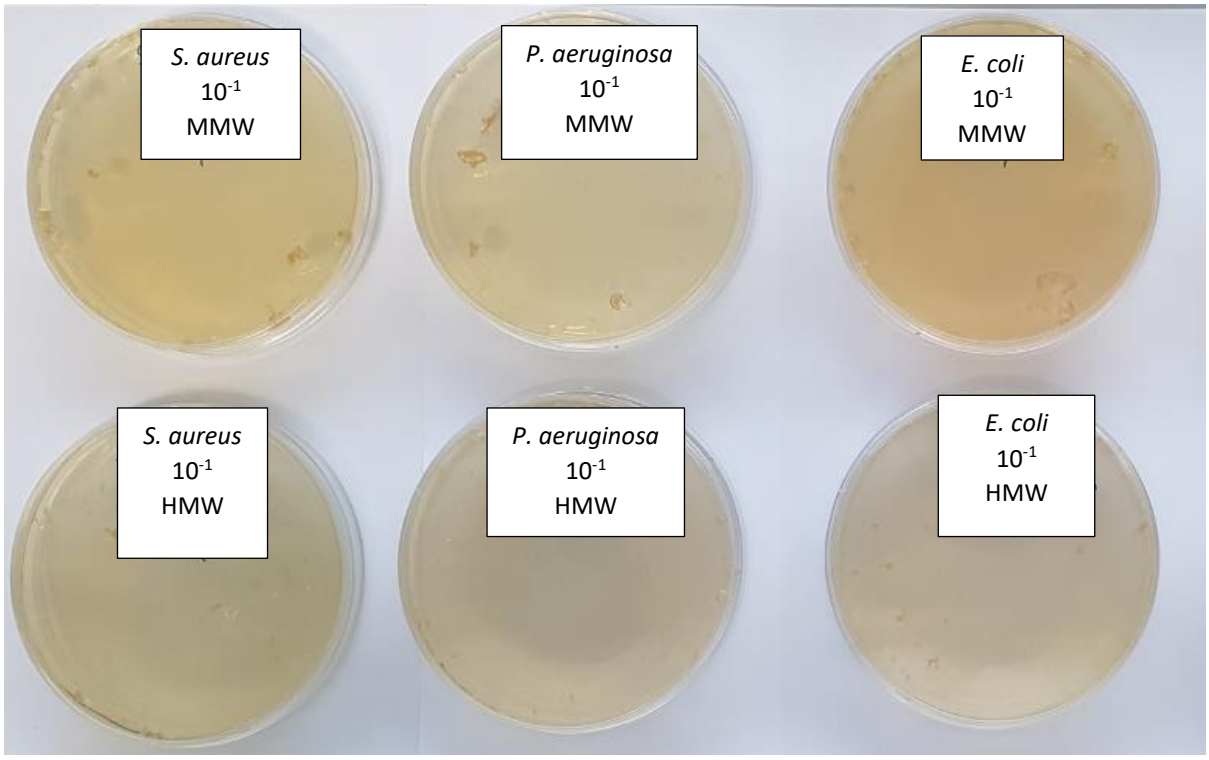
Slika 9. Uzorci izvornih kitozanskih hidrogelova inokulirani ispitivanim bakterijskim sojevima, nakon 2 dana inkubacije. HMW, hidrogel pripravljen iz visokomolekularnog kitozana; LMW, hidrogel pripravljen iz niskomolekularnog kitozana; MMW, hidrogel pripravljen iz srednjemolekularnog kitozana.



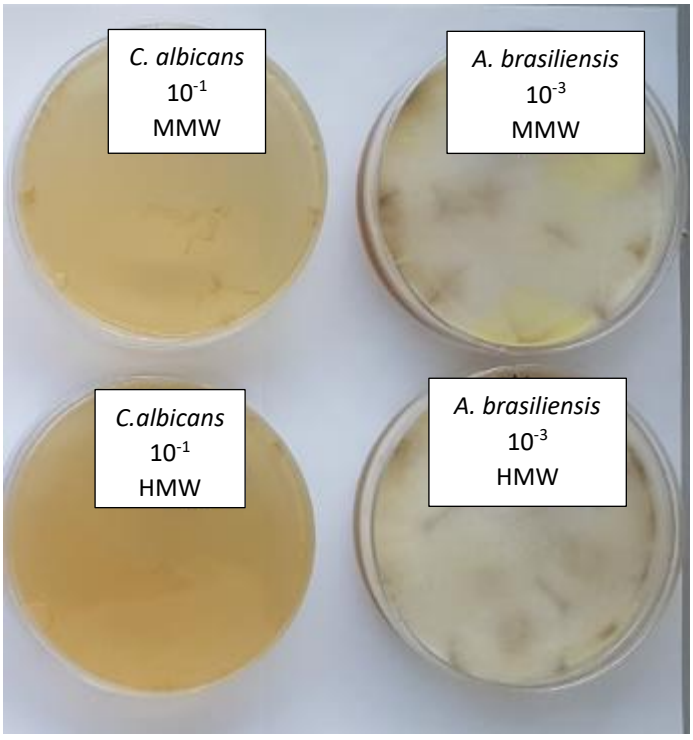
Slika 10. Uzorci izvornih kitozanskih hidrogelova inokulirani ispitivanim bakterijskim sojevima, nakon 7 dana inkubacije. HMW, hidrogel pripravljen iz visokomolekularnog kitozana; LMW, hidrogel pripravljen iz niskomolekularnog kitozana; MMW, hidrogel pripravljen iz srednjemolekularnog kitozana.



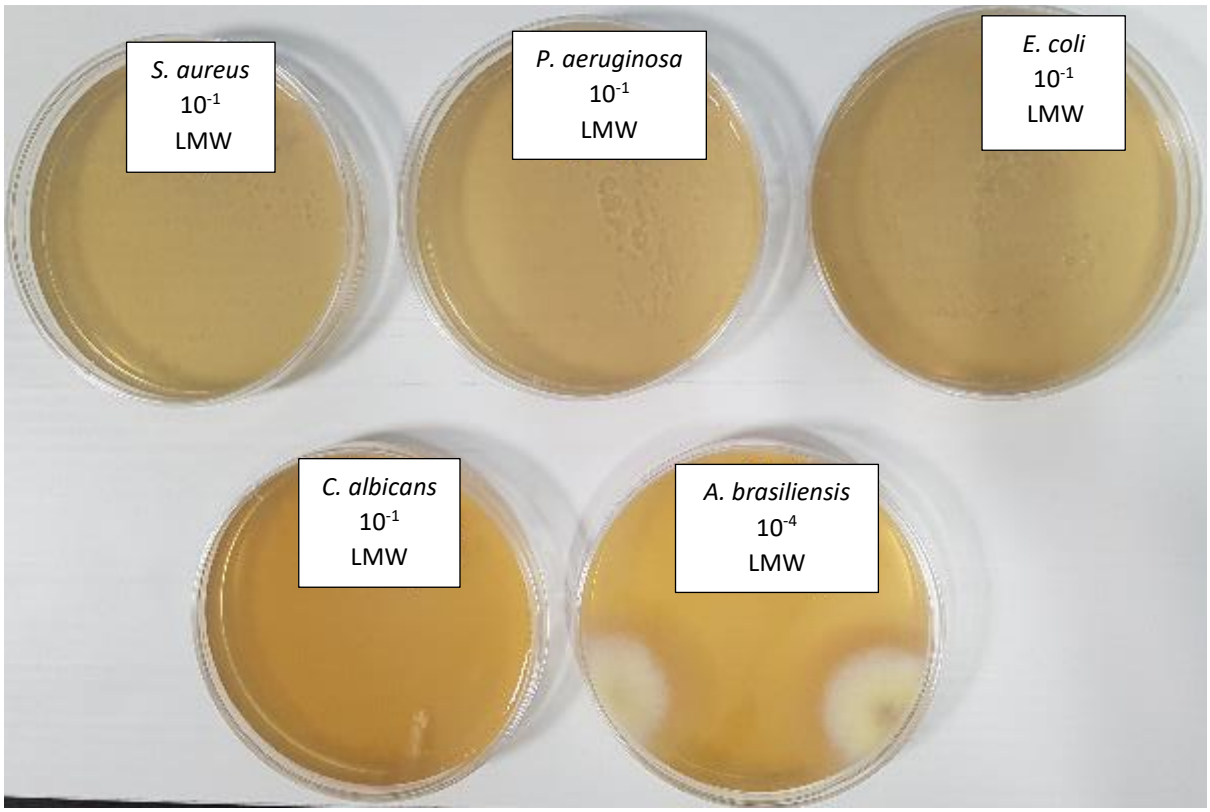
Slika 11. Uzorci izvornog kitozanskog hidrogela pripravljenog iz niskomolekularnog (LMW) kitozana inokulirani ispitivanim mikroorganizmima, nakon 14 dana inkubacije.



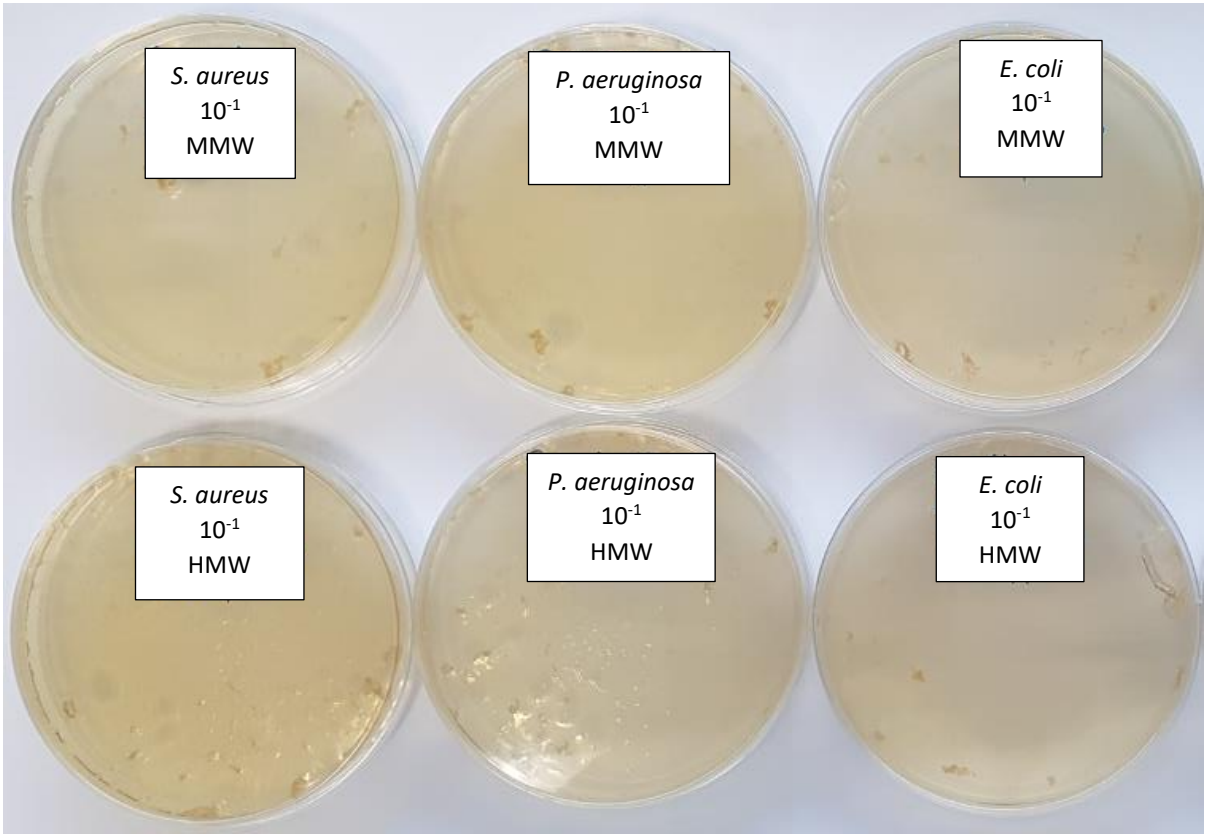
Slika 12. Uzorci izvornih kitozanskih hidrogelova pripravljenih iz srednjemolekularnog (MMW) i visokomolekularnog (HMW) kitozana inokulirani ispitivanim bakterijskim sojevima, nakon 14 dana inkubacije.



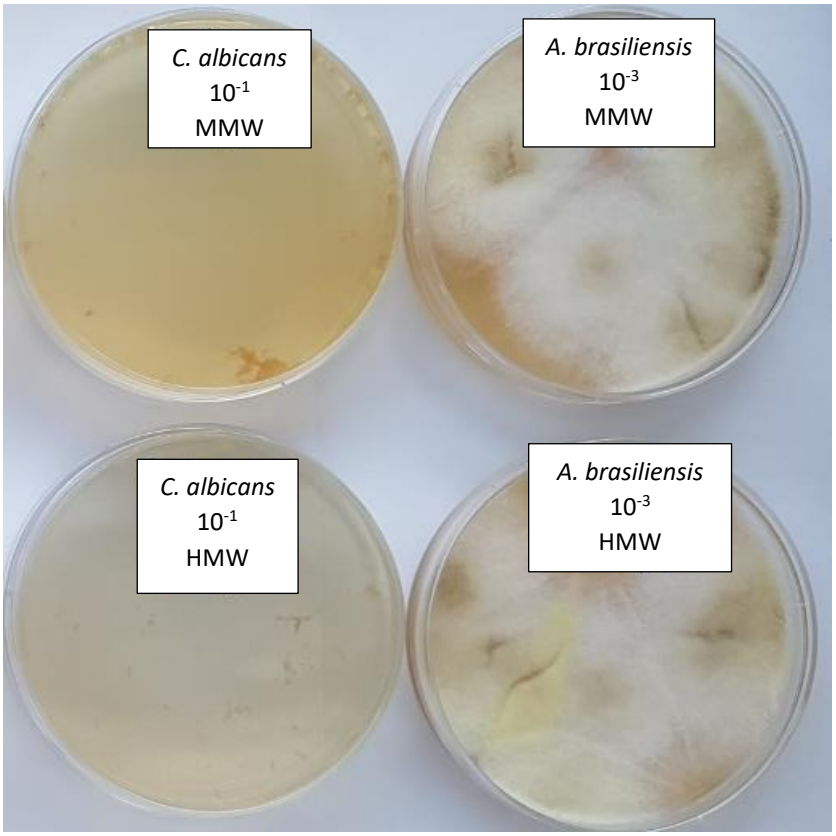
Slika 13. Uzorci izvornih kitozanskih hidrogelova pripravljenih iz srednjemolekularnog (MMW) i visokomolekularnog (HMW) kitozana inokulirani ispitivanim sojevima *C. albicans* i *A. brasiliensis*, nakon 14 dana inkubacije.



Slika 14. Uzorci izvornog kitozanskog hidrogela pripravljenog iz niskomolekularnog (LMW) kitozana inokulirani ispitivanim mikroorganizmima, nakon 28 dana inkubacije.



Slika 15. Uzorci izvornih kitozanskih hidrogelova pripravljenih iz srednjemolekularnog (MMW) i visokomolekularnog (HMW) kitozana inokulirani ispitivanim bakterijskim sojevima, nakon 28 dana inkubacije.



Slika 16. Uzorci izvornih kitozanskih hidrogelova pripravljenih iz srednjemolekularnog (MMW) i visokomolekularnog (HMW) kitozana inokulirani ispitivanim sojevima *C. albicans* i *A. brasiliensis* nakon 28 dana inkubacije.

Tablica 7. Antimikrobna aktivnost kitozanskog hidrogela pripravljenog iz niskomolekularnog (LMW) kitozana inokuliranog ispitivanim mikroorganizmima tijekom 28 dana inkubacije, izražena kao logaritamska redukcija broja mikroorganizama u odnosu na početni (inokulirani) broj mikroorganizama u hidrogelu

	S. aureus **ATCC 6538**	***P. aeruginosa*** **ATCC 9027**	***E. coli*** **ATCC 8739**	***C. albicans*** **ATCC 10231**	***A. brasiliensis*** **ATCC 16404**
Inokulum CFU/ml (log)	$3,0 \times 10^5$ (5,5)	$4,3 \times 10^5$ (5,6)	$3,5 \times 10^5$ (5,5)	$4,2 \times 10^5$ (5,6)	$1,0 \times 10^5$ (5)
Interval / log redukcija					
2. dan CFU/ml	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	/	/
log redukcija	**>4,5**	**>4,6**	**>4,5**	/	/
7. dan CFU/ml	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	/	/
log redukcija	**>4,5**	**>4,6**	**>4,5**	/	/
14. dan CFU/ml	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$7,0 \times 10^4$
log redukcija	**>4,5**	**>4,6**	**>4,5**	**>4,6**	**0,2**
28. dan CFU/ml	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$2,0 \times 10^4$
log redukcija	**NI**	**NI**	**NI**	**NI**	**NI**

Prikazani rezultati predstavljaju prosječne vrijednosti broja mikroorganizama na 2 Petrijeve zdjelice.
NI, nema povećanja broja mikroorganizama u odnosu na ispitivanje u prethodnom vremenskom razdoblju.

Tablica 8. Antimikrobna aktivnost kitozanskog hidrogela pripravljenog iz srednjemolekularnog (MMW) kitozana inokuliranog ispitivanim mikroorganizmima tijekom 28 dana inkubacije, izražena kao logaritamska redukcija broja mikroorganizama u odnosu na početni (inokulirani) broj mikroorganizama u hidrogelu

	S. aureus **ATCC 6538**	***P. aeruginosa*** **ATCC 9027**	***E. coli*** **ATCC 8739**	***C. albicans*** **ATCC 10231**	***A. brasiliensis*** **ATCC 16404**
Inokulum CFU/ml (log)	$3,0 \times 10^5$ (5,5)	$4,3 \times 10^5$ (5,6)	$3,5 \times 10^5$ (5,5)	$4,2 \times 10^5$ (5,6)	$1,0 \times 10^5$ (5)
Interval / log redukcija					
2. dan CFU/ml	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	/	/
log redukcija	**>4,5**	**>4,6**	**>4,5**	/	/
7. dan CFU/ml	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	/	/
log redukcija	**>4,5**	**>4,6**	**>4,5**	/	/
14. dan CFU/ml	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$1,1 \times 10^4$
log redukcija	**>4,5**	**>4,6**	**>4,5**	**>4,6**	**1,0**
28. dan CFU/ml	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$6,0 \times 10^3$
log redukcija	**NI**	**NI**	**NI**	**NI**	**NI**

Prikazani rezultati predstavljaju prosječne vrijednosti broja mikroorganizama na 2 Petrijeve zdjelice.
NI, nema povećanja broja mikroorganizama u odnosu na ispitivanje u prethodnom vremenskom razdoblju.

Tablica 9. Antimikrobna aktivnost kitozanskog hidrogela pripravljenog iz visokomolekularnog (HMW) kitozana inokuliranog ispitivanim mikroorganizmima tijekom 28 dana inkubacije, izražena kao logaritamska redukcija broja mikroorganizama u odnosu na početni (inokulirani) broj mikroorganizama u hidrogelu

	S. aureus **ATCC 6538**	***P. aeruginosa*** **ATCC 9027**	***E. coli*** **ATCC 8739**	***C. albicans*** **ATCC 10231**	***A. brasiliensis*** **ATCC 16404**
Inokulum CFU/ml (log)	$3,0 \times 10^5$ (5,5)	$4,3 \times 10^5$ (5,6)	$3,5 \times 10^5$ (5,5)	$4,2 \times 10^5$ (5,6)	$1,0 \times 10^5$ (5)
Interval / log redukcije					
2. dan CFU/ml	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	/	/
log redukcija	**>4,5**	**>4,6**	**>4,5**	/	/
7. dan CFU/ml	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	/	/
log redukcija	**>4,5**	**>4,6**	**>4,5**	/	/
14. dan CFU/ml	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$1,2 \times 10^4$
log redukcija	**>4,5**	**>4,6**	**>4,5**	**>4,6**	**0,9**
28. dan CFU/ml	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$8,0 \times 10^3$
log redukcija	**NI**	**NI**	**NI**	**NI**	**NI**

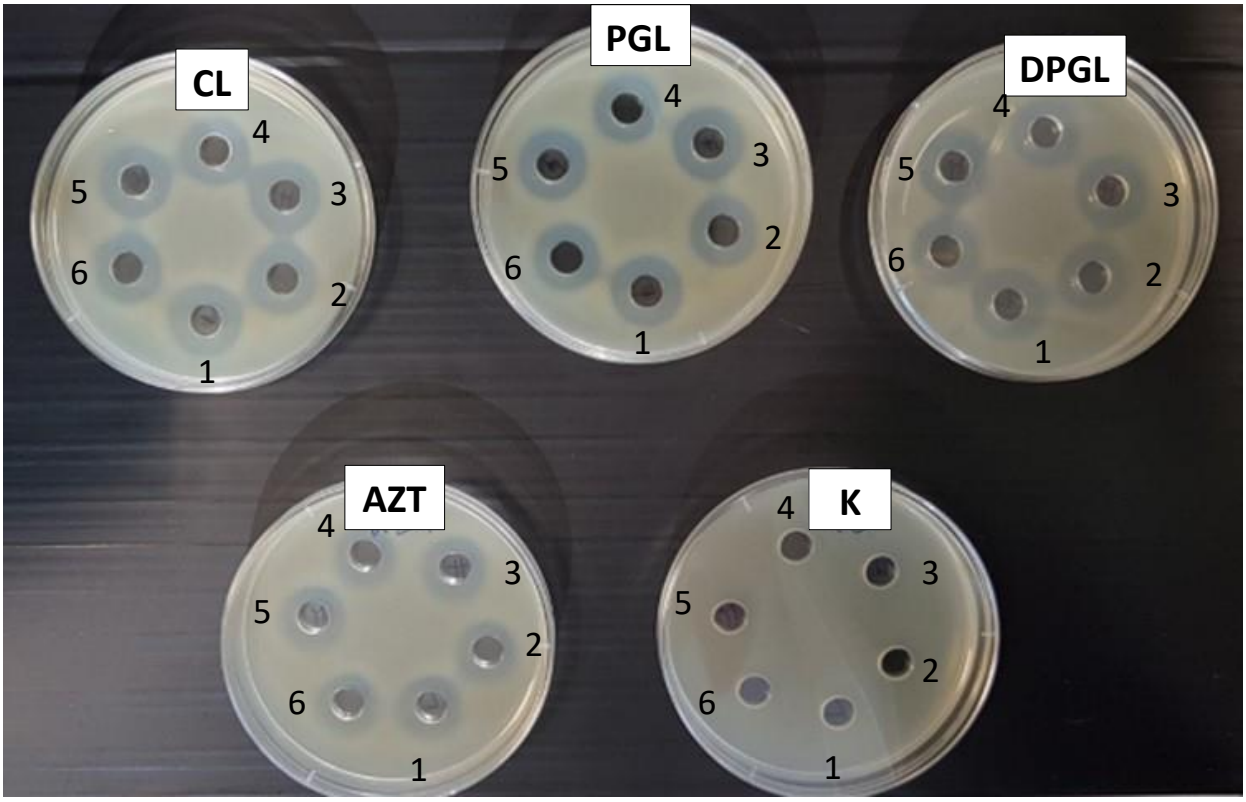
Prikazani rezultati predstavljaju prosječne vrijednosti broja mikroorganizama na 2 Petrijeve zdjelice.
NI, nema povećanja broja mikroorganizama u odnosu na ispitivanje u prethodnom vremenskom razdoblju.

Rezultati provedenih ispitivanja antimikrobne aktivnosti kitozanskih hidrogelova pripravljenih iz niskomolekularnog (LMW) kitozana (Tablica 7), srednjemolekularnog (MMW) kitozana (Tablica 8) i visokomolekularnog (HMW) kitozana (Tablica 9) potvrđuju da su svi hidrogelovi pokazali initrinzični antimikrobni učinak. Pri tome taj učinak zadovoljava kriterije antimikrobne djelotvornosti prema bakterijama i kvascima za svaki pojedini vremenski interval u skladu sa farmakopejskim zahtjevima za konzervanse u topikalnim pripravcima, kako je navedeno u Tablicama 3 i 4. Jedino je aktivnost hidrogelova prema plijesni (*A.*

brasiliensis ATCC 16404) bila slaba, te prema zahtjevima Europske farmakopeje (Tablica 3) niskomolekularni kitozanski hidrogel nije zadovoljio zahtjev za logaritamskim smanjenjem broja plijesni nakon 14 dana, dok su srednjemolekularni i visokomolekularni kitozanski hidrogelovi nakon 14 dana pokazali smanjenje broja plijesni za 1 log te time zadovoljili kriterij B. Zahtjevi za 28. dan zadovoljeni su s obzirom da nije bilo povećanja broja mikroorganizama u odnosu na ispitivanje u prethodnom vremenskom razdoblju. Uzevši u obzir zahtjeve Američke farmakopeje (Tablica 4), aktivnost svih kitozanskih hidrogelova prema plijesnima (*A. brasiliensis* ATCC 16404) zadovoljila je zadane zahtjeve.

4.4. Antibakterijska aktivnost liposomskih hidrogelova

Određivanje antibakterijske aktivnosti različitih liposomskih hidrogelova s azitromicinom provedeno je korištenjem *in vitro* agar-difuzijske metode na *S. aureus* ATCC 6538. Rezultati ispitivanja prikazani su Slikom 17 i Tablicom 10.



Slika 17. Zone inhibicije liposomskih hidrogelova s azitromicinom, kitozanskih hidrogelova s otopinom azitromicina i izvornih kitozanskih hidrogelova (pozicije 1, 3 i 5) te disperzija liposoma s azitromicinom i otopine azitromicina (pozicije 2, 4 i 6).
CL (konvencionalni liposomi): pozicija 1, CL-LMW hidrogel; pozicija 3, CL-MMW hidrogel; pozicija 5, CL-HMW hidrogel; pozicije 2, 4, 6 – CL (disperzije konvencionalnih liposoma s azitromicinom).
PGL (propilenglikol liposomi): pozicija 1, PGL-LMW hidrogel; pozicija 3, PGL-MMW hidrogel; pozicija 5, PGL-HMW hidrogel; pozicije 2, 4, 6 – PGL (disperzije propilenglikol liposoma s azitromicinom).
DPGL (deformabilni propilenglikol liposomi): pozicija 1, DPGL-LMW hidrogel; pozicija 3, DPGL-MMW hidrogel; pozicija 5, DPGL-HMW hidrogel; pozicije 2, 4, 6 – DPGL (disperzije propilenglikol liposoma s azitromicinom).
AZT (otopina azitromicina): pozicija 1, AZT-LMW hidrogel; pozicija 3, AZT-MMW hidrogel; pozicija 5, AZT-HMW hidrogel; pozicije 2, 4, 6 – AZT (otopina azitromicina).
K (Kontrola, ne sadrži azitromicin): pozicija 1, LMW hidrogel; pozicija 3, MMW hidrogel; pozicija 5, HMW hidrogel, pozicije 2, 4, 6 – OT (otapalo za pripremu otopine azitromicina (smjesa etanola i vode, 4/6, v/v)).

Tablica 10. Vrijednosti inhibicijskih zona (mm) liposomskih hidrogelova s azitromicinom i hidrogelova s otopinom azitromicina (Slika 17, pozicije 1, 3 i 5) te liposomskih disperzija s azitromicinom i otopine azitromicina (Slika 17, pozicije 2, 4 i 6)

Uzorak	**Veličina zone (mm)**
CL	18,47 ± 0,28
CL-LMW	19,56 ± 0,35
CL-MMW	19,07 ± 0,60
CL-HMW	19,08 ± 0,42
PGL	17,85 ± 0,24
PGL-LMW	18,83 ± 0,16
PGL-MMW	18,50 ± 0,39
PGL-HMW	18,86 ± 0,21
DPGL	17,59 ± 0,22
DPGL-LMW	18,72 ± 0,33
DPGL-MMW	18,46 ± 0,02
DPGL-HMW	18,41 ± 0,37
AZT	15,95 ± 0,20
AZT-LMW	17,14 ± 0,27
AZT-MMW	17,05 ± 0,04
AZT-HMW	16,86 ± 0,16

Prikazani rezultati predstavljaju prosječne vrijednosti 6 mjerenja za liposomske disperzije s azitromicinom i otopinu azitromicina, odnosno 2 mjerenja za sve uzorke hidrogelova.

AZT, otopina azitromicina; AZT-HMW, visokomolekularni kitozanski hidrogel s otopinom azitromicina; AZT-LMW, niskomolekularni kitozanski hidrogel s otopinom azitromicina; AZT-MMW, srednjemolekularni kitozanski hidrogel s otopinom azitromicina; CL, konvencionalni liposomi s azitromicinom; CL-HMW, konvencionalni liposomi s azitromicinom u visokomolekularnom kitozanskom hidrogelu; CL-LMW, konvencionalni liposomi s azitromicinom u niskomolekularnom kitozanskom hidrogelu; CL-MMW, konvencionalni liposomi s azitromicinom u srednjemolekularnom kitozanskom hidrogelu; DPGL, deformabilni propilenglikol liposomi s azitromicinom; DPGL-HMW, deformabilni propilenglikol liposomi s azitromicinom u visokomolekularnom kitozanskom hidrogelu; DPGL-LMW, deformabilni propilenglikol liposomi s azitromicinom u niskomolekularnom kitozanskom hidrogelu; DPGL-MMW, deformabilni propilenglikol liposomi s azitromicinom u srednjemolekularnom kitozanskom hidrogelu; PGL, propilenglikol liposomi s azitromicinom; PGL-HMW, propilenglikol liposomi s azitromicinom u visokomolekularnom kitozanskom hidrogelu; PGL-LMW, propilenglikol liposomi s azitromicinom u niskomolekularnom kitozanskom hidrogelu; PGL-MMW, propilenglikol liposomi s azitromicinom u srednjemolekularnom kitozanskom hidrogelu.

Rezultati provedenih ispitivanja pokazuju da se uklapanjem u liposome povećava antibakterijska aktivnost azitromicina (Slika 17, Tablica 10). Elastičnost/rigidnost liposomskih dvoslojeva utjecala je na antibakterijski učinak, pri čemu je najveća zona inhibicije rasta *S. aureus* ATCC 6538 postignuta primjenom konvencionalnih liposoma (18,47 mm), dok su nešto niže vrijednosti dobivene primjenom propilenglikol liposoma (17,85 mm) i deformabilnih propilenglikol liposoma (17,59 mm). U usporedbi s liposomima, inhibicijska zona za otopinu azitromicina iznosila je 15,95 mm. Uklapanjem otopine azitromicina u različite tipove kitozanskih hidrogelova inhibicijske zone su blago porasle te su se kretale od 16,86 mm za visokomolekularni kitozanski hidrogel (AZT-HMW) do 17,14 mm za niskomolekularni hidrogel (AZT-LMW). Dodatno je antistafilokokni učinak porastao uklapanjem disperzija liposoma u kitozanske hidrogelove (liposomski hidrogelovi). Pritom je najjači učinak zabilježen s liposomskim hidrogelom pripravljenim iz konvencionalnih liposoma i uklopljenim u niskomolekularni kitozanski hidrogel (CL-LMW). Zona inhibicije iznosila je 19,56 mm, što je više od zone inhibicije postignute primjenom disperzije konvencionalnih liposoma (18,47 mm) te više od inhibicijskih zona postignutih primjenom liposomskih hidrogelova pripravljenih iz propilenglikol liposoma i deformabilnih propilenglikol liposoma. Usporedba različitih tipova kitozanskih hidrogelova pokazala je neznatan utjecaj tipa kitozana na antibakterijsku aktivnost, pri čemu je za sve uzorke liposomskih hidrogelova i hidrogelova s otopinom azitromicina postojao isti trend: niskomolekularni kitozan (LMW) > srednjemolekularni kitozan (MMW) > visokomolekularni kitozan (HMW).

Premda uzorci izvornih kitozanskih hidrogelova nisu izravno inhibirali bakterijski rast (nisu formirane inhibicijske zone) (Slika 17, uzorak K), očito je da kitozan doprinosi antibakterijskoj aktivnosti jer je za sve uzorke hidrogelova s azitromicinom aktivnost porasla, bilo da je riječ o

otopini azitromicina uklopljenoj u kitozanske hidrogelove ili različitim tipovima liposoma s azitromicinom uklopljenih u kitozanske hidrogelove (Tablica 10).

5. RASPRAVA

Infekcije kože i mekih tkiva, uključujući opekline i rane, predstavljaju ozbiljan javnozdravstveni problem, pogotovo zbog rastuće bakterijske rezistencije na antibiotike (6). Među najčešćim uzročnicima infekcija akutnih i kroničnih rana su: *S. aureus*, meticilin-rezistentni *S. aureus* (MRSA), *Streptococcus haemolyticus*, *P. aeruginosa*, *Bacteroides* spp. i *C. albicans* (75). *S. aureus* također uzrokuje različita dermatološka oboljenja poput impetiga, celulitisa, folikulitisa i atopijskog dermatitisa (76).

Uobičajena terapija nekompliciranih infekcija kože provodi se lokalnom ili kombinacijom lokalne i sistemske primjene antimikrobnih lijekova. S druge strane, liječenje kompleksnih, kroničnih infekcija kože poput dubokih rana, inficiranih opeklina i ulceracija obuhvaća postupke mehaničke obrade rane u kombinaciji s lokalnom i/ili sistemskom antimikrobnom terapijom te primjenom funkcionalnih obloga za rane (77).

Brojne kliničke studije su pokazale da se liječenje relativno uspješno provodi sistemskom primjenom vrlo visokih doza antibiotika širokog spektra djelovanja. No takva terapija često je praćena nizom neželjenih nuspojava (gastrointestinalne smetnje, povećana incidencija gljivičnih infekcija) i slabljenjem imunuloškog sustava pacijenta te povećanom tendencijom razvoja bakterijske rezistencije (78).

Lokalna primjena antibiotika je stoga u prednosti nad sistemskom primjenom jer se izbjegavaju neželjene sistemske nuspojave, a doze su značajno niže budući se lijek primjenjuje direktno na mjesto djelovanja (inficirano područje). Osim toga, sama primjena je jednostavna i dobro prihvaćena od strane pacijenta (79). Međutim, konvencionalni farmaceutski oblici za topikalnu primjenu antimikrobnih lijekova (kreme, masti, gelovi) nisu uvijek učinkoviti u terapiji. Razlog tome je slaba penetracija antimikrobnog lijeka u inficirano

područje i/ili formiranje biofilmova koji predstavljaju barijeru prolasku antimikrobnih lijekova u žarište infekcije. Stoga su od velikog značaja istraživanja inovativnih farmaceutskih oblika (terapijskih nanosustava) kojima bi se omogućila učinkovita lokalna antimikrobna terapija. U tom pogledu posebno su interesantni liposomi jer se pokazalo da povećavaju penetraciju uklopljenog lijeka u kožu i njegovu antimikrobnu aktivnost, budući da se sa nižim dozama antibiotika postiže bakteriostatski/baktericidni učinak. Dodatno je zbog produljenog oslobađanja lijeka učestalost doziranja smanjena (80-82). Primjerice, uklapanjem azitromicina u kationske liposome, minimalne inhibitorne koncentracije na MRSA kliničke izolate bile su čak 32 puta niže od onih utvrđenih za otopinu azitromicina, a sami liposomi su bili u potpunosti biokompatibilni sa stanicama keratinocita i fibroblasta *in vitro* (72).

Odgovarajuću viskoznost liposoma za primjenu na kožu i sluznice moguće je postići uklapanjem u polučvrste podloge (83, 84). U usporedbi s emulzijskim podlogama, hidrogelovi su izrazito prikladni za uklapanje liposoma jer ne sadrže površinski aktivne tvari (emulgatore), jednostavne su strukture i sadrže visoki udio vode. Brojne studije ukazuju na kompatibilnost hidrogelova pripravljenih iz polimera poliakrilne kiseline (Carbopol®) s liposomima (73, 83-88). Uklapanjem liposoma u hidrogelove može se očuvati njihova izvorna veličina, što pogoduje fizičkoj stabilnosti liposoma, te dodatno produljiti oslobađanje uklopljenog lijeka (88).

Hidrogelovi se kao polučvrste podloge često koriste u oblikovanju lijekova namijenjenih lokalnoj primjeni na kožu i sluznice. Većina polimera korištenih za izradu hidrogelova su bioadhezivnih svojstava čime se omogućuje dobro zadržavanje pripravka na mjestu primjene. U usporedbi s mastima i kremama, oslobađanje lijeka iz hidrogela je značajno brže (89), što može biti pogodno za brzi nastup terapijskog učinka.

Hidrogelovi također čine osnovu funkcionalnih obloga za rane. Tako hidrogelovi izrađeni iz umreženih polimera mogu vezati na sebe eksudat iz vlažnih rana i otpuštati uklopljeni antimikrobni lijek na mjesto infekcije, dok oni polučvrste konzistencije s visokim sadržajem vode pružaju odgovarajuću vlažnost suhim ranama (77).

Valja napomenuti da određeni hidrogelovi, sami za sebe, bez uklopljenog lijeka, mogu imati biološki učinak. U tom smislu posebno su zanimljivi kitozanski hidrogelovi, zbog djelovanja kitozana na poticanje zacjeljivanja rana te hemostatskog i antimikrobnog učinka. Pokazano je da kitozanski hidrogelovi utječu na zacjeljivanje rana u različitim fazama cijeljenja rana: potiču proliferaciju fibroblasta, angiogenezu, odlaganje kolagena i sintezu hijaluronske kiseline te sprječavaju razvoj infekcije, što se odražava u bržem zacjeljivanju rana i prevenciji stvaranja ožiljaka (20).

Na biološki učinak kitozana utječu njegova molekularna masa i stupanj deacetilacije. Pokazano je da kitozan visoke molekularne mase s većim stupnjem deacetilacije ima bolji učinak na zacjeljivanje rana od kitozana niske i srednje molekularne mase, dok kitozan niske molekularne mase s manjim stupnjem deacetilacije ima veći učinak na redukciju rasta i replikacije mikroorganizama (33, 90).

Premda je dokazano da kitozan, sam za sebe, posjeduje antimikrobni učinak na različite vrste bakterija i gljivica (31), pregledom literature nisu pronađene studije u kojima je ispitivan učinak samih kitozanskih hidrogelova, bez uklopljene antimikrobne djelatne tvari.

Stoga je u sklopu ovog rada ispitivan antimikrobni učinak kitozanskih hidrogelova, pripravljenih iz različitih tipova kitozana: niske, srednje i visoke molekularne mase. Ispitivanja su provedena na način da su hidrogelovi inokulirani određenim test mikroorganizmima (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* i *A. brasiliensis*) i čuvani u propisanim uvjetima, a

porast broja mikroorganizama praćen je kroz određene vremenske intervale tijekom 28 dana.

Neovisno o tipu kitozana iz kojeg su pripravljeni, svi uzorci kitozanskih hidrogelova su pokazali intrinzični antibakterijski i antifungalni učinak tijekom ispitivanog vremenskog razdoblja (Slike 9-16). Jedini izuzetak su bili uzorci inokulirani s plijesni. Naime, nakon 14 i 28 dana inkubacije hidrogelova inokuliranih s *A. brasiliensis*, uočen je mikrobiološki rast. Međutim, uzimajući u obzir zadane kriterije antimikrobne učinkovitosti, porast *A. brasiliensis* u ispitivanim vremenskim periodima nije bio veći u odnosu na broj kolonija u početnom inokulumu, čime su zadovoljeni kriteriji prihvatljivosti prema Američkoj farmakopeji navedeni u Tablici 4. Uzimajući u obzir kriterije prihvatljivosti prema Europskoj farmakopeji (Tablica 3), niskomolekularni kitozanski hidrogel nije zadovoljio zahtjev za logaritamskim smanjenjem broja plijesni nakon 14 dana, dok su srednjemolekularni i visokomolekularni kitozanski hidrogelovi nakon 14 dana pokazali smanjenje broja plijesni za 1 log te time zadovoljili kriterij B. Nakon 28 dana, broj kolonija plijesni nije bio veći u odnosu na ispitivanje u prethodnom vremenskom intervalu čime su zadovoljeni zahtjevi za taj vremenski period prema Europskoj farmakopeji (Tablica 3).

Postupak ispitivanja antimikrobne aktivnosti hidrogelova korišten u ovom radu je postupak kojem se procjenjuje djelotvornost konzervansa u farmaceutskim pripravcima za topikalnu primjenu (Ph. Eur. 9.0, poglavlje 5.1.3., 2018; USP41-NF36, poglavlje <51>, 2018). Za razliku od ostalih komercijalno dostupnih hidrogelova koji se obavezno konzerviraju zbog visokog sadržaja vode (≥ 80%), rezultati provedenih ispitivanja dokazali su mikrobiološku stabilnost kitozanskih hidrogelova prema bakterijama i gljivicama, što ukazuje da nije potrebno

dodatno konzervirati topikalne formulacije koje sadrže kitozanske hidrogelove kao polučvrste podloge.

S obzirom da su svi kitozanski hidrogelovi bili karakterizirani blago kiselim pH (Tablica 5), osim na kožu, bili bi prikladni i za primjenu na vaginalnu sluznicu, za liječenje blagih bakterijskih i gljivičnih infekcija te regulaciju vaginalne mikrobiote.

Kitozan je biorazgradljiv, netoksičan i bioadhezivan polimer, što je od iznimne važnosti u pogledu korištenja kitozanskih hidrogelova kao polučvrstih podloga za oblikovanje topikalnih lijekova čime bi se omogućilo dostatno zadržavanje pripravka na mjestu primjene. Imajući u vidu biološke učinke kitozana na zacjeljivanje rana i njegovu intrinzičnu antimikrobnu aktivnost, uklapanjem antimikrobnih djelatnih tvari u kitozanske hidrogelove mogle bi se dobiti terapijski izuzetno učinkovite polučvrste formulacije za liječenje infektivnih oboljenja kože i sluznica.

U sklopu ovog rada provedena su istraživanja u kojima je u kitozanske hidrogelove uklopljen makrolidni antibiotik, azitromicin. Budući da je u prethodnim studijama pokazano da se uklapanjem azitromicina u liposome potencira antibakterijska aktivnost na *E. coli* (74) i *S. aureus* (72), istraživanja u sklopu ovog rada dodatno su obuhvatila različite liposomske hidrogelove s azitromicinom (kitozanski hidrogelovi s liposomski uklopljenim azitromicinom). Ispitano je nekoliko tipova liposoma s azitromicinom koji su se međusobno razlikovali po membranskoj elastičnosti: konvencionalni, propilenglikol i deformabilni propilenglikol liposomi. Naime, poznato je da elastičnost/rigidnost liposomskog dvosloja utječe na permeabilnost uklopljenog lijeka u kožu, ali i antimikrobni učinak. Dok su u studiji koju su proveli Rukavina i sur. (72) propilenglikol liposomi sadržavali čak 30% propilenglikola, a deformabilni liposomi bili sastavljeni od sojinog lecitina i natrijevog deoksikolata,

propilenglikol liposomi u ovom ispitivanju su imali svega 10% propilenglikola, a deformabilni su umjesto deoksikolata sadržavali lizofosfolipid te dodatno 10% propilenglikola. Svi su liposomi bili negativnog naboja na površini te homogene distribucije veličina. Deformabilni propilenglikol liposomi su bili najmanji od svih ispitivanih nanoformulacija (srednji promjer 180 nm) što je posljedica prisutnog rubnog aktivatora te je u skladu s literaturnim saznanjima za deformabilne liposome (84, 91).

Ispitivanja antimikrobnog učinka provedena *in vitro* agar-difuzijskim testom na soju *S. aureus* ATCC 6538 pokazala su veći antibakterijski učinak svih liposomskih hidrogelova u odnosu na kitozanske hidrogelove s otopinom azitromicina (Tablica 10). Liposomski hidrogelovi s azitromicinom su također bili učinkovitiji u odnosu na disperzije liposoma s azitromicinom (Tablica 10). Tako su zone inhibicije liposomskih hidrogelova bile veće u odnosu na inhibicijske zone liposoma s azitromicinom što upućuje na doprinos kitozanskog hidrogela antibakterijskom učinku liposomski uklopljenog azitromicina, premda izvorni kitozanski hidrogelovi nisu imali izravan antibakterijski učinak (nisu formirane inhibicijske zone) (Slika 17, uzorak K), ali su pokazali intrinzičnu antibakterijsku aktivnost pri visokim koncentracijama primjenjenog hidrogela (Tablice 7-9). Tome u prilog idu i rezultati postignuti s različitim kitozanskim hidrogelovima koji su sadržavali otopinu azitromicina (Slika 17, Tablica 10) pri čemu su zone inhibicije ispitivanih hidrogelova bile veće od onih izmjerenih testiranjem čiste otopine azitromicina.

Usporedba antibakterijske aktivnosti različitih tipova liposoma pokazala je najveću aktivnost konvencionalnih liposoma u hidrogelu pripravljenom iz niskomolekularnog kitozana, dok je nešto niži antibakterijski učinak utvrđen za propilenglikol liposome i deformabilne propilenglikol liposome. Najniža aktivnost postignuta je s otopinom azitromicina.

Uklapanjem otopine azitromicina u kitozanske hidrogelove, antibakterijska aktivnost je blago porasla. Usporedba različitih tipova kitozana korištenih za izradu hidrogelova, pokazala je neznatan utjecaj tipa kitozana na antibakterijsku aktivnost, premda je za sve uzorke hidrogelova (liposomski hidrogelovi i hidrogelovi s otopinom azitromicina) postojao isti trend, odnosno aktivnost je slijedila niz: niskomolekularni kitozan (LMW) > srednjemolekularni kitozan (MMW) > visokomolekularni kitozan (HMW).

Blago veća antibakterijska aktivnost konvencionalnih liposoma u odnosu na preostale dvije preparacije liposoma najvjerojatnije je posljedica membranske elastičnosti/rigidnosti liposomskih dvoslojeva, pri čemu je aktivnost rasla s porastom čvrstoće liposomskih dvoslojeva. U ispitivanjima koja su proveli Rukavina i sur. (72) utvrđeno je suprotno; elastični liposomi imali su evidentno jači antistafilokokni učinak u odnosu na konvencionalne liposome. Moguće objašnjenje najvjerojatnije leži u velikoj rigidnosti membrana konvencionalnih liposoma u ovom radu koji su pripravljeni iz hidrogeniranih fosfolipida (stupanj elastičnosti 0,56), u odnosu na konvencionalne liposome pripravljene iz sojinog lecitina (72) kod koji je stupanj elastičnosti iznosio 1,5. Međutim, potrebno je provesti dodatna istraživanja kojima bi se te pretpostavke i potvrdile. Također valja napomenuti da su *in vitro* testiranja antibakterijskog učinka liposomskih hidrogelova s azitromicinom u okviru ovog rada provedena u duplikatu i preliminarnog su karaktera. Daljnja istraživanja obuhvatila bi veći broj replikata kako bi se provela odgovarajuća statistička obrada rezultata.

Elastičnost/rigidnost liposomskih dvoslojeva također doprinosi permeabilnosti uklopljenog lijeka u/kroz kožu i sluznicu. Što je membrana liposoma elastičnija, uklopljena djelatna tvar bolje permeira u niže slojeve epidermisa (71) ili sluznice (74), dok je permeabilnost značajno smanjena iz liposoma rigidnih/čvrstih membrana (72, 74). Takva saznanja su od velikog

značaja u pogledu postizanja učinkovite lokalne antimikrobne terapije. Naime, korištenjem konvencionalnih liposoma rigidnih membrana uklopljenih u kitozanski hidrogel omogućila bi se lokalizacija uklopljenog lijeka na površini kože (inficirana rana ili sluznica), dok bi se primjenom elastičnih liposoma uklopljenih u kitozanski hidrogel omogućila dostava antibiotika u dublje slojeve epidermisa, što bi bilo značajnije kod tretiranja dubinskih, kroničnih infekcija kože i mekih tkiva.

6. ZAKLJUČCI

Pripravljeni su hidrogelovi korištenjem niskomolekularnog, srednjemolekularnog i visokomolekularnog kitozana te su u hidrogelove uklopljeni različiti tipovi liposoma s azitromicinom: konvencionalni liposomi, propilenglikol liposomi i deformabilni propilenglikol liposomi. Provedena su ispitivanja antimikrobnog učinka izvornih kitozanskih hidrogelova i liposomskih hidrogelova s azitromicinom te su na osnovu svih provedenih ispitivanja izvedeni slijedeći zaključci:

- Neovisno o tipu kitozana korištenog za izradu hidrogela, svi izvorni kitozanski hidrogelovi su pokazali intrinzičnu antimikrobnu aktivnost na ispitivane mikroorganizme, čime je potvrđeno da nije potrebno dodatno konzerviranje topikalnih formulacija koje sadrže kitozanske hidrogelove kao polučvrste podloge. Budući da su ispitivani mikroorganizmi (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* i *C. albicans*), česti uzročnici infekcija kože, za pretpostaviti je da bi kitozanski hidrogelovi bili pogodni za sprječavanje sekundarnih infekcija rana.
- Svi kitozanski hidrogelovi potencirali su antibakterijski učinak uklopljenog antibiotika (azitromicin), što je potvrđeno većim zonama inhibicije u odnosu na one postignute otopinom azitromicina.
- Uklapanjem azitromicina u liposome postignut je jači antibakterijski učinak od otopine azitromicina.
- Kitozanski hidrogelovi dodatno su potencirali antibakterijsku aktivnost liposoma s azitromicinom, što je potvrđeno većim zonama inhibicije bakterijskog rasta u odnosu na one dobivene disperzijama liposoma.
- Čvrstoća/elastičnost liposomskih dvoslojeva utjecala je na antibakterijsku aktivnost ispitivanih liposoma s azitromicinom i liposomskih hidrogelova. Pritom je najjači

učinak postignut s liposomima karakteriziranim izrazito čvrstim (rigidnim) dvoslojevima (konvencionalnim liposomima).

Rezultati svih provedenih ispitivanja ukazuju na mogućnost primjene kitozanskih hidrogelova kao podloga za topikalne lijekove i nanoterapeutike namijenjene liječenju infekcija kože. Međutim, neophodno je provesti ispitivanja antibakterijskog učinka liposomskih hidrogelova na većem broju replikata te daljnja *in vivo* ispitivanja kako bi se dokazala njihova terapijska učinkovitost.

7. LITERATURA

1. Metcalfe AD, Ferguson MWJ. Tissue engineering of replacement skin: The crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. J R Soc Interface 2007;4:413-437.

2. Filipović-Grčić J, Pepić I, Šimić D, Tomić I, Zeljko Penavić J. Upravljanje simptomima kožnih bolesti i poremećaja s kojima se susreću ljekarnici. Sveučilište u Mostaru; 2018.

3. Clark R. ur. The molecular and cellular biology of wound repair. Springer Science & Business Media; 2013.

4. Barie PS, Wilson SE. Impact of evolving epidemiology on treatments for complicated skin and skin structure infections: The surgical perspective. J Am Coll Surg 2015;220:105-116.

5. Moura LIF, Dias AMA, Leal EC, Carvalho L, De Sousa HC, Carvalho E. Chitosan-based dressings loaded with neurotensin - An efficient strategy to improve early diabetic wound healing. Acta Biomater 2014;10:843-857.

6. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. J Pharm Sci 2008;97:2892-2923.

7. Minutti CM, Knipper JA, Allen JE, Zaiss DMW. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. Semin Cell Dev Biol 2017;61:3-11.

8. Batičić Pučar L, Grčić A, Pernjak Pugel E, Detel D, Varljen J. Proces cijeljenja rane i dipeptidil-peptidaza IV. Med Flum 2017;53:4-15.

9. Ebaid H, Ahmed OM, Mahmoud AM, Ahmed RR. Limiting prolonged inflammation during proliferation and remodeling phases of wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats supplemented with camel undenatured whey protein. BMC Immunol 2013;14:31.

10. Leonida MD, Kumar I. Wound healing and skin regeneration. U: Bionanomaterials for skin regeneration. Springer International Publishing; 2016, str. 17-25.

11. Guo S, Dipietro LA. Factors Affecting Wound Healing. J Dent Res 2010;89:219-229.

12. McDaniel JC, Browning KK. Smoking, chronic wound healing, and implications for evidence-based practice. J Wound Ostomy Continence Nurs 2014;41:415-423.

13. Vileikyte L. Stress and wound healing. Clin Dermatol 2007;25:49-55.

14. Cole-King A, Harding KG. Psychological factors and delayed healing in chronic wounds. Psychosom Med 2001;63:216-220.

15. Robson MC. Wound infection. A failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria. Surg Clin North Am 1997;77:637-650.

16. Zarrintaj P, Moghaddam AS, Manouchehri S i sur. Can regenerative medicine and nanotechnology combine to heal wounds? The search for the ideal wound dressing. Nanomedicine (Lond) 2017;12:2403-2422.

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

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

19. Yang K, Han Q, Chen B i sur. Antimicrobial hydrogels: Promising materials for medical application. Int J Nanomedicine 2018;13:2217-2263.

20. 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.

21. Hoare TR, Kohane DS. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. Polymer 2008;49:1993-2007.

22. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. Adv Drug Deliv Rev 2002;54:3-12.

23. Gulrez SKH, Al-Assaf S, O'Phillips G. Hydrogels: Methods of preparation, characterisation and applications. U: Carpi A. ur. Progress in molecular and environmental bioengineering - From analysis and modeling to technology application. Intech; 2011, str. 517-561.

24. Dai T, Tanaka M, Huang YY, Hamblin MR. Chitosan preparations for wounds and burns: Antimicrobial and wound-healing effects. Expert Rev Anti Infect Ther 2011;9:857-879.

25. Mendes JJ, Marques-Costa A, Vilela C i sur. Clinical and bacteriological survey of diabetic foot infections in Lisbon. Diabetes Res Clin Pract 2012;95:153-161.

26. Stand SP, Tommeraas K, Varum KM, Ostgaard K. Electrophoretic light scattering studies of chitosans with different degrees of N-acetylation. Biomacromolecules 2001;2:1310-1314.

27. Nordtveit RJ, Varum KM, Smidsrod O. Degradation of partially N-acetylated chitosans with hen egg white and human lysozyme. Carbohydr Polym 1996;29:163-167.

28. Alves NM, Mano JF. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. Int J Biol Macromol 2008;43:401-414.

29. Ahmadi F, Oveisi Z, Samani SM, Amoozgar Z. Chitosan based hydrogels: Characteristics and pharmaceutical applications. Res Pharm Sci 2015;10:1-16.

30. Amidi M, Mastrobattista E, Jiskoot W, Hennink WE. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. Adv Drug Deliv Rev 2010;62:59-82.

31. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. Int J Food Microbiol 2010;144:51-63.

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

33. Goy RC, de Britto D, Assis OBG. A review of the antimicrobial activity of chitosan. Polimeros 2009;19:241-247.

34. Aiedeh K, Taha MO. Synthesis of iron-crosslinked chitosan succinate and iron-crosslinked hydroxamated chitosan succinate and their in vitro evaluation as potential matrix materials for oral theophylline sustained-release beads. Eur J Pharm Sci 2001;13:159-168.

35. Elviri L, Bianchera A, Bergonzi C, Bettini R. Controlled local drug delivery strategies from chitosan hydrogels for wound healing. Expert Opin Drug Deliv 2017;14:897-908.

36. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. Adv Drug Deliv Rev 2010;62:83-99.

37. Alsarra IA, Hamed AY, Mahrous GM, El Maghraby GM, Al-Robayan AA, Alanazi FK. Mucoadhesive polymeric hydrogels for nasal delivery of acyclovir. Drug Dev Ind Pharm 2009;35:352-362.

38. Robson MC, Steed DL, Franz MG. Wound healing: Biologic features and approaches to maximize healing trajectories. Curr Probl Surg 2001;38:72-140.

39. Okamoto Y, Yano R, Miyatake K, Tomohiro I, Shigemasa Y, Minami S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. Carbohydr Polym 2003;53:337-342.

40. Muzzarelli RAA, Morganti P, Morganti G i sur. Chitin nanofibrils/chitosan glycolate composites as wound medicaments. Carbohydr Polym 2007;70:274-284.

41. Nedelec B, De Oliveira A, Saint-Cyr M, Garrel DR. Differential effect of burn injury on fibroblasts from wounds and normal skin. Plast Reconstr Surg 2007;119:2101-2109.

42. Jayakumar R, Prabaharan M, Sudheesh Kumar PT, Nair SV, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. Biotechnol Adv 2011;29:322-337.

43. Takei T, Nakahara H, Ijima H, Kawakami K. Synthesis of a chitosan derivative soluble at neutral pH and gellable by freeze-thawing, and its application in wound care. Acta Biomater 2012;8:686-693.

44. Ud-Din S, Bayat A. Non-invasive objective devices for monitoring the inflammatory, proliferative and remodelling phases of cutaneous wound healing and skin scarring. Exp Dermatol 2016;25:579-585.

45. Muzzarelli RAA. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. Carbohydr Polym 2009;76:167-182.

46. Kim IY, Seo SJ, Moon HS i sur. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. Biotechnol Adv 2008;26:1-21.

47. Archana D, Singh BK, Dutta J, Dutta PK. In vivo evaluation of chitosan-PVP-titanium dioxide nanocomposite as wound dressing material. Carbohydr Polym 2013;95:530-539.

48. Choudhury AJ, Gogoi D, Chutia J i sur. Controlled antibiotic-releasing Antheraea assama silk fibroin suture for infection prevention and fast wound healing. Surgery 2016;159:539-547.

49. Obermeier A, Schneider J, Wehner S i sur. Novel high efficient coatings for anti-microbial surgical sutures using chlorhexidine in fatty acid slow-release carrier systems. PLoS One 2014;9:e101426.

50. Torchilin VP. Nanoparticles as drug carriers. Imperial College Press; 2006.

51. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. J Mol Biol 1965;13:238-252.

52. Shematski prikaz formiranja liposoma hidratacijom fosfolipida.
Dostupno na: http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/lipids.htm.
Pristupljeno 10. siječnja, 2020.

53. Fenske DB, Cullis PR. Liposomal nanomedicine. Expert Opin Drug Deliv 2008;5:24-44.

54. Sinico C, Fadda AM. Vesicular carriers for dermal drug delivery. Expert Opin Drug Deliv 2009;6:813-825.

55. Baroli B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: Fiction or reality? J Pharm Sci 2010;99:21-50.

56. El Maghraby GM, Barry BW, Williams AC. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. Eur J Pharm Sci 2008;34:203-222.

57. 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.

58. Elsayed MMA, Abdallah OY, Naggar VF, Khalafallah NM. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research. Int J Pharm 2007;332:1-16.

59. Vanić Ž, Holsæter AM, Škalko-Basnet N. (Phospho)lipid-based nanosystems for skin administration. Curr Pharm Des 2015;21:4174-4192.

60. Barry BW. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. Eur J Pharm Sci 2001;14:101-114.

61. El Maghraby GM, Williams AC, Barry BW. Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin? J Pharm Pharmacol 2006;58:415-429.

62. Cevc G. Transfersomes, liposomes and other lipid suspensions on the skin: Permeation enhancement, vesicle penetration, and transdermal drug delivery. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 1996;13:257-388.

63. Cevc G, Gebauer D, Stieber J, Schätzlein A, Blume G. Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. Biochim Biophys Acta 1998;1368:201-215.

64. Honeywell-Nguyen PL, Bouwstra JA. The in vitro transport of pergolide from surfactant-based elastic vesicles through human skin: A suggested mechanism of action. J Control Release 2003;86:145-156.

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

66. Dayan N, Touitou E. Carriers for skin delivery of trihexyphenidyl HCl: Ethosomes vs. liposomes. Biomaterials 2000;21:1879-1885.

67. Elsayed MMA, Abdallah OY, Naggar VF, Khalafallah NM. Deformable liposomes and ethosomes: Mechanism of enhanced skin delivery. Int J Pharm 2006;322:60-66.

68. Ainbinder D, Touitou E. Testosterone ethosomes for enhanced transdermal delivery. Drug Deliv 2005;12:297-303.

69. Vanić Ž. Phospholipid vesicles for enhanced drug delivery in dermatology. J Drug Discov Develop and Deliv 2015;2:1010.

70. Manconi M, Caddeo C, Sinico C i sur. Ex vivo skin delivery of diclofenac by transcutol containing liposomes and suggested mechanism of vesicle-skin interaction. Eur J Pharm Biopharm 2011;78:27-35.

71. Palac Z, Engesland A, Flaten GE, Škalko-Basnet N, Filipović-Grčić J, Vanić Ž. Liposomes for (trans)dermal drug delivery: The skin-PVPA as a novel in vitro stratum corneum model in formulation development. J Liposome Res 2014;24:313-322.

72. Rukavina Z, Šegvić Klarić M, Filipović-Grčić J, Lovrić J, Vanić Ž. Azithromycin-loaded liposomes for enhanced topical treatment of methicillin-resistant Staphyloccocus aureus (MRSA) infections. Int J Pharm 2018;553:109-119.

73. Pavelić Ž, Škalko-Basnet N, Jalšenjak I. Characterisation and in vitro evaluation of bioadhesive liposome gels for local therapy of vaginitis. Int J Pharm 2005;301:140-148.

74. Vanić Ž, Rukavina Z, Manner S i sur. Azithromycin-liposomes as a novel approach for localized therapy of cervicovaginal bacterial infections. Int J Nanomedicine 2019;14:5957-5976.

75. Kučišec-Tepeš N. Word of Introduction: Atypical Wounds. Acta Med Croatica 2012;66:3-4.

76. Creech CB, Al-Zubeidi DN, Fritz SA. Prevention of recurrent staphylococcal skin infections. Infect Dis Clin North Am 2015;29:429-464.

77. Boateng J, Catanzano O. Advanced therapeutic dressings for effective wound healing - A review. J Pharm Sci 2015;104:3653-3680.

78. Dai T, Huang YY, Sharma SK, Hashmi JT, Kurup DB, Hamblin MR. Topical antimicrobials for burn wound infections. Recent Pat Antiinfect Drug Discov 2010;5:124-151.

79. Lipsky BA, Hoey C. Topical antimicrobial therapy for treating chronic wounds. Clin Infect Dis 2009;49:1541-1549.

80. Abed N, Couvreur P. Nanocarriers for antibiotics: A promising solution to treat intracellular bacterial infections. Int J Antimicrob Agents 2014;43:485-496.

81. Martin, C, Low WL, Gupta A i sur. Strategies for antimicrobial drug delivery to biofilm. Curr Pharm Des 2015;21:43-66.

82. Nafee N. Nanocarriers against bacterial biofilms: Current status and future perspectives. U: Rai M, Kon K. ur. Nanotechnology in diagnosis, treatment and prophylaxis of infectious diseases. Academic Press Elsevier; 2015, str. 167-189.

83. Palac Z, Hurler J, Škalko-Basnet N, Filipović-Grčić J, Vanić Ž. Elastic liposomes-in-vehicle formulations destined for skin therapy: The synergy between type of liposomes and vehicle. Drug Dev Ind Pharm 2015;41,1247-1253.

84. Vanić Ž, Hurler J, Ferderber K, Golja Gašparović P, Škalko-Basnet N, Filipović-Grčić J. Novel vaginal drug delivery system: Deformable propylene glycol liposomes-in-hydrogel. J Liposome Res 2014;24:27-36.

85. Pavelić Ž, Škalko-Basnet N, Schubert R. Liposomal gels for vaginal drug delivery. Int J Pharm 2001;219:139-149.

86. Pavelić Ž, Škalko-Basnet N, Jalšenjak I. Liposomal gel with chloramphenicol: Characterization and in vitro release. Acta Pharm 2004;54:319-330.

87. Pavelić Ž, Škalko-Basnet N, Schubert R, Jalšenjak I. Liposomal gels for vaginal drug delivery (review). U: Düzgünes N. ur. Liposomes, part D, Methods in enzymology. Academic Press Elsevier; 2004, str. 287-299.

88. Pavelić Ž, Škalko-Basnet N, Filipović-Grčić J, Martinac A, Jalšenjak I. Development and in vitro evaluation of a liposomal vaginal delivery system for acyclovir. J Control Release 2005;106:34-43.

89. Barry BW. Transdermal drug delivery. U: Aulton ME. ur. The design and manufacture of medicines. Curchill Livingstone Elsevier; 2007, str. 565-597.

90. Alsarra IA. Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds. Int J Biol Macromol 2009;45:16-21.

91. Vanić Ž, Hafner A, Bego M, Škalko-Basnet N. Characterization of various deformable liposomes with metronidazole. Drug Dev Ind Pharm 2013;39:481-448.

8. ŽIVOTOPIS

Radno iskustvo:

2019.-danas. Manufacturing Scinece & Technology, Hospira Zagreb d.o.o., a Pfizer company

2015.-2019. Mikrobiološki i biološki laboratoriji, Pliva, Zagreb

2014.-2015. mag.pharm. pripravnik, Ljekarne Hanžić, Zagreb

Školovanje:

2017.-2020. Poslijediplomski specijalistički studij Razvoj lijekova, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2009.-2014. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, smjer: Farmacija

Članstva:

Hrvatska ljekarnička komora
Hrvatsko farmaceutsko društvo

Publikacije:

Bljajić K, Petlevski R, Vujić L, **Čačić A**, Šoštarić N, Jablan J, Saraiva de Carvalho I, Zovko Končić M. Chemical composition, antioxidant and α-glucosidase-inhibiting activities of the aqueous and hydroethanolic extracts of Vaccinium myrtillus leaves. Molecules 2017;22:703.

Prezentacije:

Brajković A, **Čačić A,** Ortner Hadžiabdić M, Bačić Vrca V. Bezreceptni lijekovi u hospitaliziranih bolesnika, FARMEBS, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, lipanj 2016 (Brajković A, **Čačić A,** usmeno priopćenje).

Brajković A, **Čačić A**, Amidžić Klarić D, Ćosić A, Ortner Hadžiabdić M, Bačić Vrca V. Over-the-counter medicine use before and during hospitalization, 1st Croatian Congress on Clinical Pharmacy with International Participation, Zagreb, April 2014 (posterska prezentacija).