

# Fizikalna karakterizacija liposomskih hidrogelova s diltiazemkloridom i azitromicin dihidratom

---

Milardović, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:163:437783>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-09**



Repository / Repozitorij:

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



**Maja Milardović**

**Fizikalna karakterizacija liposomskih  
hidrogelova s diltiazemkloridom i azitromicin  
dihidratom**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Oblikovanje lijekova, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju, pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Željke Vanić. Dio ispitivanja proveden je u suradnji sa prof. dr. Natašom Škalko-Basnet (Department of Pharmacy, University of Tromsø The Arctic University of Norway).

## **Zahvala**

*Veliko hvala mojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Željki Vanić na pruženoj pomoći i stručnom vodstvu tijekom izrade ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se na susretljivosti, potpori i velikom strpljenju.*

*Zahvaljujem i svim ostalim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju na ugodnoj atmosferi, a posebice zahvaljujem Zori Rukavina, mag. pharm. na pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.*

*Ovom prilikom zahvaljujem se i dr. May Wenche Jøraholmen i prof. dr. Nataši Škalko-Basnet na provedenoj teksturnoj analizi liposomskih gelova na Department of Pharmacy, University of Tromsø The Arctic University of Norway.*

*Na kraju neizmjereno zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na pruženoj velikoj podršci i razumijevanju tijekom cijelog studija.*

# SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
1.1.	Liposomi .....	1
1.1.1.	Konvencionalni liposomi.....	2
1.1.2.	Deformabilni liposomi.....	3
1.1.3.	Propilenglikol liposomi .....	4
1.1.4.	Kationski liposomi.....	4
1.2.	Hidrogelovi .....	5
1.2.1.	Kitozan .....	6
1.2.2.	Kitozanski gelovi.....	7
1.3.	Koža.....	8
1.3.1.	Primjena lijekova na kožu i sluznice .....	10
1.3.2.	Analna fisura .....	11
1.4.	Diltiazem.....	12
1.5.	Azitromicin .....	13
2.	OBRAZLOŽENJE TEME .....	16
3.	MATERIJALI I METODE .....	17
3.1.	Materijali.....	17
3.2.	Metode .....	18
3.2.1.	Optimizacija postupka izrade kitozanskog gela .....	18
3.2.2.	Priprava liposoma .....	18
3.2.2.1.	Priprava konvencionalnih liposoma s diltiazemkloridom .....	18
3.2.2.2.	Priprava propilenglikol liposoma s diltiazemkloridom .....	19
3.2.2.3.	Priprava konvencionalnih liposoma s aztromicin dihidratom .....	19
3.2.2.4.	Priprava propilenglikol liposoma s azitromicin dihidratom.....	20
3.2.2.5.	Priprava deformabilnih liposoma s azitromicin dihidratom.....	20
3.2.2.6.	Priprava kationskih liposoma s azitromicin dihidratom.....	21
3.2.3.	Mjerenje srednjeg promjera, indeksa polidisperznosti i zeta potencijala liposoma ..	22
3.2.4.	Uklapanje liposoma u kitozanske gelove .....	22
3.2.5.	Teksturna analiza gelova s uklopljenim liposomima .....	23
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	24
4.1.	Optimizacija kitozanskih hidrogelova .....	24
4.2.	Fizikalna karakterizacija liposoma s diltiazemkloridom i azitromicin dihidratom .....	26
4.2.1.	Fizikalna karakterizacija liposomskih hidrogelova .....	30
5.	ZAKLJUČCI.....	37
6.	LITERATURA.....	38
7.	SAŽETAK .....	45

# 1. UVOD

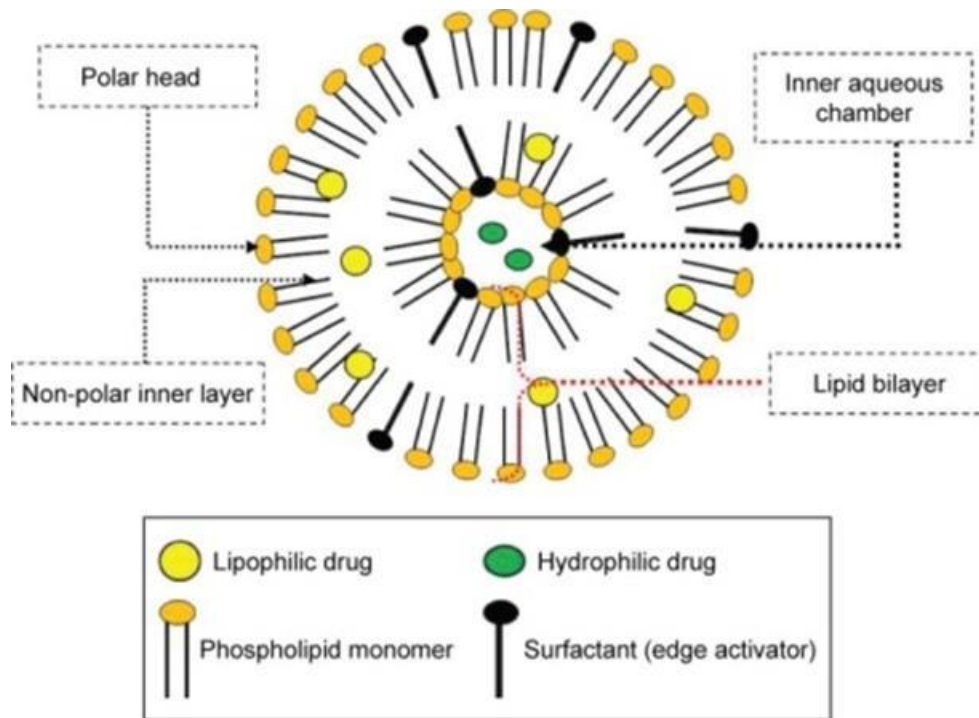
## 1.1. Liposomi

Liposomi su terapijski sustavi u rasponu veličina od oko 20 nm (mali unilamelarni liposomi, SUV) do 50  $\mu\text{m}$  (multivezikularni liposomi, MVL). Osnovnu građevnu jedinicu liposoma čine molekule fosfolipida složene u jedan (unilamelarni liposomi) ili više koncentrično položenih dvoslojeva (oligo- i multi-lamelarni liposomi) koji omeđuju unutarnju, vodenu fazu. Fosfolipidi su amfipatske molekule, diesteri fosfatne kiseline koji su s jedne strane esterificirani derivatom sfingozina ili glicerola, a s druge kolinom, serinom, inozitolom, etanolaminom ili glicerolom. Dvosloj nastaje orijentacijom hidrofilnih polarnih „glava“ fosfolipida prema unutarnjoj i vanjskoj vodenoj fazi, a hidrofobnih nepolarnih „repeva“ jednog prema drugom (Slika 1). Osim fosfolipida, ovojnica liposoma često sadrži kolesterol. Njegova je uloga slična kao i u biološkim membranama; ugrađuje se u dvosloj između molekula fosfolipida te povećava njegovu čvrstoću (rigidnost) uslijed smanjene slobode kretanja fosfolipidnih molekula (Vanić, 2012a).

Strukturna svojstva liposoma omogućavaju uklapanje lijekova (djelatnih tvari) različite molekulske mase i stupnja lipofilnosti. Hidrofilni lijekovi uklapaju se u vodenu fazu, lipofilni se ugrađuju unutar fosfolipidnog dvosloja, a amfipatske molekule se raspoređuju između te dvije regije (Vanić i sur., 2015). Zbog svoje sličnosti s biološkim membranama, neimunogenosti i biorazgradljivosti, liposomi su u potpunosti fiziološki prihvatljivi što im osigurava primjenu u različitim terapijskim područjima (Vanić, 2012a). Primijenjeni parenteralno liposomi su najviše ispitivani za liječenje tumorskih i infektivnih oboljenja, vakcinaciju te dijagnostiku oboljenja organa u kojima se nakupljaju (jetra, slezena). Veliki dio ispitivanja odnosi se na primjenu liposoma kao terapijskih nanosustava za lokalnu primjenu na kožu i sluznice (Vanić, 2012b).

Kompatibilnost građevnih elemenata liposoma (fosfolipidi, kolesterol i voda) te sastavnica kože čini ih učinkovitim nanosustavom za dermalnu i transdermalnu dostavu lijekova. Osim što se uklapanjem u liposome može povećati stabilnost nekih lijekova, moduliranjem intracelularnog lipidnog matriksa fosfolipidi pospješuju apsorpciju hidrofilnih tvari koje u suprotnom ne bi mogle prodrijeti u/kroz kožu (de Leeuw i sur., 2009). Usporenim oslobađanjem lijeka, primjerice retinoida iz liposoma (Schäfer-Korting i sur., 1994), smanjuju se potencijalne iritacije kože, a čak i prazni liposomi (bez uklopljene djelatne tvari) dovode do

značajne hidratacije epidermisa što je od iznimne važnosti kod terapije kožnih oboljenja kao što su *xerosis cutis* ili atopijski dermatitis (de Leeuw i sur., 2009). Zbog tekuće prirode i potrebe za zadržavanjem na mjestu nanošenja, liposome namijenjene primjeni na kožu je potrebno uklopiti u odgovarajuću podlogu (*vehikulum*), primjerice hidrogel ili kremu (Vanić i sur., 2015).



**Slika 1.** Shematski prikaz fosfolipidnog dvosloja liposoma (Hussain i sur., 2017)

### 1.1.1. Konvencionalni liposomi

Konvencionalni liposomi (prva generacija liposoma) su građeni od fosfolipida neutralnog ili negativnog naboja na površini, s dodatkom kolesterola ili bez njega (Vanić i sur., 2015). Pokazali su se prikladnim nosačima u topikalnoj primjeni na kožu i sluznice, ali ne i za postizanje sistemskih učinaka (transdermalna, transmukozna primjena) zbog lošeg prolaska lijeka kroz površinski sloj kože ili epitelne stanice sluznica (Vanić i sur., 2015). Stoga se konvencionalni liposomi, kao nosači lijekova, istražuju uglavnom za postizanje lokalnog učinka u površinskim slojevima epidermisa (Banović i sur., 2011).

### 1.1.2. Deformabilni liposomi

Istraživanja na području transdermalne primjene lijekova dovela su do razvoja novog tipa fosfolipidnih vezikula. Riječ je o deformabilnim liposomima, za čije su uvođenje zaslužni Cevc i Blume (1992), a u literaturi poznati i pod nazivima: ultradeformabilni, elastični, fleksibilni, ultrafleksibilni te Transferosomi<sup>®</sup>. Osnovna razlika u građi konvencionalnih i deformabilnih liposoma očituje se u prisustvu surfaktanata (rubni aktivatori), uz molekule fosfolipida u fosfolipidnom dvosloju. Rubni aktivatori destabiliziraju dvosloj što se očituje povećanjem elastičnosti membrane. Tip surfaktanta i njegova koncentracija u fosfolipidnom dvosloju izravno utječu na učinkovitost dostave lijeka u dublje slojeve kože i transdermalno. U slučaju niske koncentracije surfaktanta formirat će se rigidnije vezikule, a previsoka koncentracija mogla bi dovesti do nastanka miješanih micela. Primjeri najčešće korištenih rubnih aktivatora su: natrijev kolat, natrijev deoksikolat, oleinska kiselina, Span 20, Span 40, Span 60, Span 80, Span 85, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 te Tween 85 (Hussain i sur., 2017).

Poboljšana dostava lijeka u/kroz kožu primjenom deformabilnih liposoma posljedica je prolaska intaktnih elastičnih vezikula te učinka membranskih komponenti liposoma (fosfolipidi i surfaktanti) na povećanje penetracije lijeka u kožu utjecajem na intercelularni lipidni matriks (Vanić i sur., 2015). Iako je opće prihvaćen mehanizam prolaska intaktnih vezikula, nije sasvim jasno penetriraju li intaktne vezikule kroz kožu ili pak djeluju kao promotori apsorpcije. Prvi mehanizam zahtijeva neokluzivne uvjete i postojanje transepidermalnog osmotskog gradijenta koji je prisutan zbog razlike u koncentraciji vode na površini i u dubljim slojevima kože. Takvi uvjeti dovode do isparavanja vode iz suspenzije liposoma na koži pa su vezikule djelomično dehidrirane. Da bi zadržale početni oblik liposomi su prisiljeni slijediti koncentracijski gradijent sve do dubljih, hidratiziranih slojeva epidermisa, istovremeno koristeći svojstvo elastičnosti kako bi intaktne prošle između stanica rožnatog sloja (El Maghraby i sur., 2008). Drugi mehanizam pretpostavlja interakciju liposoma s kožom, pri čemu (fosfo)lipidi iz ovojnice liposoma modificiraju intercelularne lipide rožnatog sloja čime se otvara put prolaska djelatne tvari (lijeka) u kožu (Elsayed i sur., 2007a).

### **1.1.3. Propilenglikol liposomi**

Noviji tip elastičnih liposoma su propilenglikol liposomi čiji sastav čine fosfolipidi, propilenglikol i voda. Prve propilenglikol liposome razvili su Elsayed i suradnici (2007b) s ciljem uklapanja lokalnog anestetika cinhokaina. Dokazana je veća sposobnost uklapanja lijeka te veća stabilnost liposoma s propilenglikolom u odnosu na konvencionalne i deformabilne liposome istog fosfolipidnog sastava. Naspram konvencionalnih liposoma, propilenglikol liposomi posjeduju fleksibilnije membrane te zbog bolje penetracije omogućuju postizanje veće koncentracije lijeka u ciljnom tkivu (Zhao i sur., 2013).

Elmoslemany i suradnici (2012) su pokazali bolju uspješnost uklapanja mikonazol nitrata u propilenglikol liposome te veću fizičku stabilnost u usporedbi s konvencionalnim liposomima. Također je utvrđena veća antifungalna aktivnost u usporedbi s konvencionalnim liposomima. Zaključeno je da prisutnost propilenglikola u strukturi liposoma značajno doprinosi antifungalnoj aktivnosti mikonazol nitrata.

### **1.1.4. Kationski liposomi**

Liposomi koji u fosfolipidnom dvosloju sadrže pozitivno nabijene lipide nazivaju se kationskim liposomima, a prvi su ih opisali Felgner i suradnici (1987). Najčešće su istraživani za dostavu lijekova u genskoj terapiji kao ne-viralni vektori. Naime, pozitivan naboj na površini čestica pospješuje interakciju s negativno nabijenim molekulama kao što su nukleinske kiseline. Tako nastaju lipid-DNK kompleksi (lipopleksi) koji fuzijom s plazmatskom membranom omogućuju unos uklopljenog sadržaja (nukleinske kiseline) u stanicu (Vanić, 2012b).

Osim u dostavi nukleinskih kiselina, peptida i proteina, kationski se liposomi istražuju i u lokalnoj antimikrobnoj terapiji. Antimikrobnom učinku kationskih liposoma s uklopljenom antimikrobnom djelatnom tvari doprinose i lipidi koji se koriste za njihovu pripremu. Česta je primjena sintetskog kationskog lipida dioktadecildimetilamonijevog bromida (DODAB) u kombinaciji s fosfolipidima. DODAB vezanjem na membrane bakterijskih stanica (Campanhã i sur., 1999) te stanica gljivica dovodi do inverzije površinskog negativnog naboja stanice u pozitivan naboj. Pozitivan naboj na površini stanica mikroorganizama posljedično dovodi do njihove smrti (Vieira i Carmona-Ribeiro, 2006).



## 1.2. Hidrogelovi

Hidrogelovi su polukruti farmaceutski oblici sastavljeni od trodimenzionalne mreže hidrofilnih polimera unutar koje je zarobljena velika količina vode (Ahmed, 2015), a pritom se polimerni lanci ne otapaju u vodi nego bubre. Mogućnost adsorpcije vode proizlazi iz prisustva hidrofilnih funkcionalnih skupina u strukturi polimera kao što su  $-OH$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$  i  $-SO_3H$ , dok njihova umreženost onemogućava otapanje u istoj (Ahmadi i sur., 2015).

Brzina i stupanj adsorpcije vode ovise o gustoći umreženih lanaca, kemijskoj strukturi polimera, tj. broju i vrsti hidrofilnih skupina te vanjskim uvjetima kao što su pH, temperatura i svjetlost (Ahmadi i sur., 2015). Stupanj bubrenja određuje mehanizam oslobađanja lijeka iz polimernog matriksa, dok mehanička svojstva formirane 3D-mreže određuju postojanost cjelokupnog sustava za dostavu lijeka, ali i kompatibilnost s okolnim tkivom na mjestu primjene (Šoljić Jerbić, 2017).

Hidrogelovi se mogu pripremiti iz prirodnih ili sintetskih polimera. Prednost pri odabiru polimera se daje sintetskim derivatima zbog definirane strukture, stabilnosti, velikog kapaciteta adsorpcije vode te visoke čvrstoće gela (Ahmed, 2015). S druge strane, prirodni polimeri pokazuju veću biokompatibilnost u odnosu na sintetske zbog biorazgradljivosti. Najčešće korišteni prirodni polimeri u izradi hidrogelova su polisaharidi: alginat, celuloza, hitin, kitozan, dekstran, hijaluronska kiselina, pektin, škrob, ksantanska guma te proteini: kolagen, svila, keratin, elastin, resilin i želatina (Ahmadi i sur., 2015). Određeni tipovi ovih polimera pokazuju naglašena mukoadhezivna svojstva te su prikladni za primjenu na sluznice. Udio vode u hidrogelu može iznositi 80-90%, a osim vode često su prisutni humektansi (ovlaživači) poput glicerola i propilenglikola koji mogu preuzeti i ulogu suotapala. Zbog mikrobiološke kontaminacije hidrogelovi se obavezno konzerviraju (Baćirević-Laćan i sur., 2015).

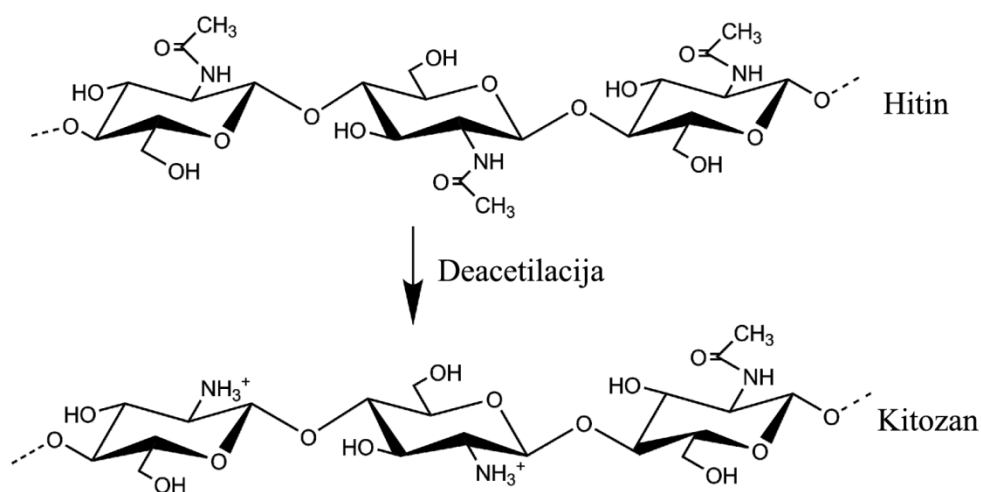
Hidrogelovi su prikladne podloge za uklapanje hidrofilnih lijekova (djelatnih tvari) namijenjenih topikalnoj primjeni na kožu i sluznice. Trenutno je na tržištu Republike Hrvatske registrirano pet lijekova na bazi hidrogela za vaginalnu primjenu i dvadeset i pet za primjenu na kožu te jedan pripravak za oftalmičku primjenu. Većina registriranih hidrogelova su na bazi karbomera (karbopola) i hidroksietilceluloze ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)). Zbog jednostavne strukture gelovi se istražuju i kao podloge za uklapanje nanofarmaceutika namijenjenih primjeni na kožu i sluznice.

Posljednjih desetljeća uvelike se istražuju termo- i pH-osjetljivi gelovi (Bikram i West, 2008), a od prirodnih polimera za pripremu gelova velikog potencijala ima kitozan zbog brojnih povoljnih terapijskih učinaka.

### 1.2.1. Kitozan

Kitozan je linearni polisaharid sastavljen od 5000 glukozaminskih jedinica ( $\beta$ -(1-4)-D-glukozamin i N-acetil-D-glukozamin) koji nastaje alkalnom deacetilacijom hitina uz 40-50% NaOH (Slika 2). Dobiva se iz skeleta rakova, morskih člankonožaca i glavonožaca (Dai i sur., 2011), a novija istraživanja ukazuju na kulturu gljivica *Aspergillus niger* kao potencijalni izvor (Rabea i sur., 2003). Iako je hitin drugi prirodni polimer po zastupljenosti u prirodi nakon celuloze (Cheung i sur., 2015), kitozan se prirodno pojavljuje jedino u staničnom zidu nekih *Mucor* vrsta (Nilsen-Nygaard i sur., 2015). Međutim najčešći izvori korišteni za industrijsko dobivanje hitina su otpadne ljuštore škampa, jastoga i rakova (Cheung i sur., 2015; Nilsen-Nygaard i sur., 2015; Felt i sur., 1998).

Hitin i kitozan se međusobno razlikuju s obzirom na stupanj deacetiliranih skupina - svojstvo koje kitozanu u odnosu na hitin smanjuje rigidnost i povećava topljivost (Ahmadi i sur., 2015). Kitozan je topljiv u kiselinama ( $\text{pH} < 6$ ), dok su u vodi topljive jedino soli kitozana. Primarne amino skupine karakteristične za kitozan imaju  $\text{pK}_a$  oko 6,5 (Stand i sur., 2001). U pH okruženju nižem od navedenog, amino skupine su protonirane, čime kitozan postaje topljivi kationski polielektrolit, dok su u okruženju višeg pH amino skupine deprotonirane čime se pokreće precipitacija polimernih lanaca, te je stoga topljivost kitozana ovisna o pH (Nordtveit i sur., 1996).



**Slika 2.** Shematski prikaz dobivanja kitozana iz hitina (Nilsen-Nygaard i sur., 2015)

Kitozan se zbog svoje niske cijene, netoksičnosti i biorazgradljivosti uvelike istražuje u biomedicini. Osim kao pomoćna tvar u farmaceutskim oblicima, kitozan posjeduje biološke učinke među kojima je posebno važno njegovo antimikrobno djelovanje. Ono ovisi o vrsti i koncentraciji kitozana, stupnju polimerizacije i deacetilacije te okolišnim čimbenicima (pH medija). Osim velikog broja bakterijskih vrsta, antimikrobno djelovanje kitozana proučavano je i na gljivicama, algama te virusima (Rabea i sur., 2003).

Pretpostavljena su dva dominantna mehanizma antibakterijskog djelovanja kitozana. Prema prvom mehanizmu, kitozan visoke molekularne mase može formirati membranu na površini bakterijske stanice te tako sprječavati ulazak potrebnih nutrijenata. Prema drugom mehanizmu koji je karakterističan za kitozan niske molekularne mase, molekule kitozana ulaze u bakterijsku stanicu te narušavaju njezinu fiziologiju flokulacijom negativno nabijenih molekula. Prvi mehanizam opažen je kod *Gram-pozitivnih*, a drugi kod *Gram-negativnih* bakterija (Zheng i Zhu, 2003).

Najnovija *in vitro* i *in vivo* istraživanja upućuju na antitumorsko djelovanje kitozana uvjetovano molekularnom masom i stupnjem deacetilacije polimera. Zabilježena je i antioksidativna aktivnost kitozana ispitana na *in vitro* modelima (Cheung i sur., 2015).

### **1.2.2. Kitozanski gelovi**

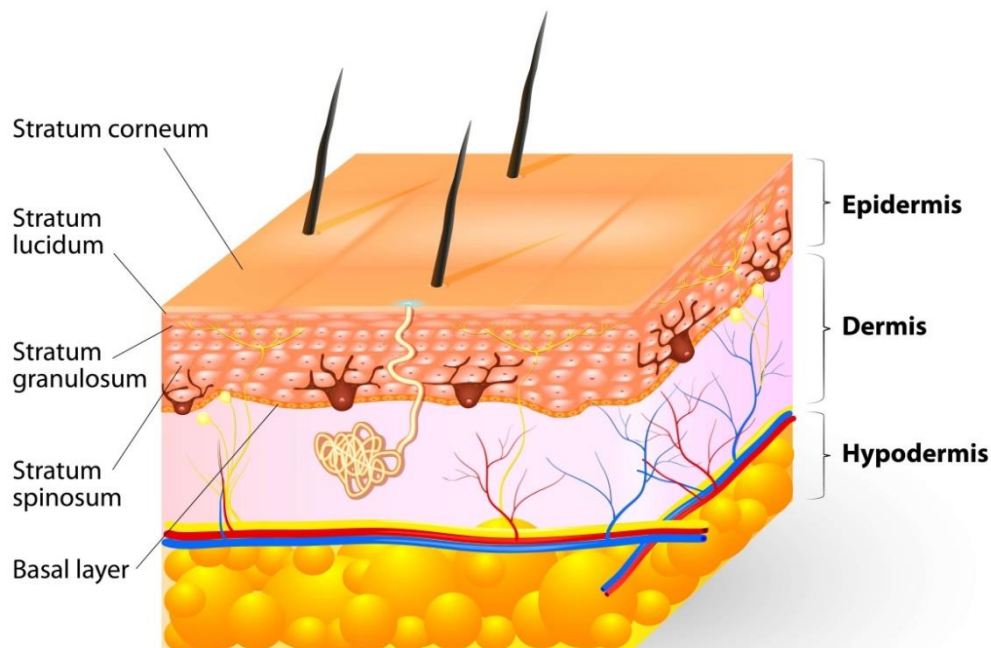
Postupak geliranja kitozana moguće je provesti na više načina. Jedna od mogućnosti je reacetilacija uz octeni anhidrid, čime se povećava omjer acetiliranih skupina. Za izradu transparentnih gelova koristi se beta-glicerol fosfat pri povišenoj temperaturi. Nadalje, kitozan je moguće gelirati dodatkom alkalija u strogo kontroliranim uvjetima ili pak dodatkom umreživača i kompleksirajućih tvari (Nilsen-Nygaard i sur., 2015).

Razgradnja kitozana u ljudskom tijelu odvija se posredstvom lizozima (enzim), kiselina, gastrointestinalnih enzima ili bakterija prisutnih u kolonu. Kitozan je biokompatibilan ne samo sa zdravom već i ozlijeđenom kožom, a zbog svoje kationske prirode dobro prijanja na negativno nabijene biološke površine (sluznice) (Ahmadi i sur., 2015). Stoga su hidrogelovi kitozana u širokoj primjeni kao terapijski sustavi za kontroliranu (trans)dermalnu, oralnu, nazalnu, bukalnu, rektalnu, vaginalnu i okularnu primjenu lijekova (Nilsen-Nygaards i sur., 2015). Gelove kitozana moguće je primijeniti intranazalno za dostavu lijekova u središnji živčani sustav. Naik i Nair (2014) potvrdili su da je termo-osjetljivi kitozanski gel prikladan za dostavu antidepresiva doksepina kroz sluznicu nosa. Ispitivana formulacija pokazala je optimalna svojstva geliranja, sigurnosti i učinkovitosti primjene.

Niska imunogenost omogućuje primjenu kitozana u rekonstrukciji tkiva te izradi materijala za zarastanje rana. Stimulirajući aktivnost makrofaga i proliferaciju stanica, kitozan i njegovi derivati ubrzavaju proces cijeljenja te preveniraju nastanak ožiljaka (Cheung i sur., 2015). Razmatrana je i učinkovitost kitozanskih gelova u prevenciji i liječenju tumora. Antitumorsko djelovanje kitozanskog gela uočeno je primjenom subkutanog cjepiva kod miševa oboljelih od melanoma (Highton i sur., 2015). Daljnja istraživanja potvrdila su profilaktičko djelovanje cjepiva s kitozanskim gelom kod tumora mokraćnog mjehura na miševima koje se temeljilo na aktivaciji CD8+ T-stanica (Highton i sur., 2016).

### 1.3. Koža

Koža je najveći ljudski organ koji prekriva čitavo tijelo i služi kao prva linija obrane od mikroorganizama, topline, kemikalija, toksina i dehidracije. Građena je od tri sloja; epidermis, dermis i potkožni sloj (*subcutis*, hipodermis) (Slika 3).



**Slika 3.** Građa ljudske kože (www.dreamstime.com)

Vanjski, rožnati sloj (*stratum corneum*) epidermisa, sastoji se od 10 do 20 slojeva spljoštenih, orožnjelih stanica (Igarashi i sur., 2005) mrtvih korneocita, krajnjeg produkta terminalne diferencijacije epidermalnih keratinocita (Matsui i Amagai, 2015). Te su stanice uklopljene u visokoorganizirani lipidni matriks (Igarashi i sur., 2005), tako da nalikuju ciglenom zidu što otežava prolaz makromolekula, ali i molekula lijeka kroz kožu (Richmond i Harris, 2014). Ostala četiri sloja su svijetli sloj (*stratum lucidum*), zrnati sloj (*stratum granulosum*), trnasti sloj (*stratum spinosum*) i bazalni sloj (*stratum basale*). Svijetli sloj postoji samo na području dlanova i tabana gdje je koža deblja i izložena trenju. Prosječna debljina epidermisa je oko 0,2 milimetara, ali ona varira ovisno o dijelu tijela i udjelu vode koju epidermis zadržava. Iako u epidermisu nema krvnih ni limfnih žila to je metabolički aktivno tkivo u čijem se bazalnom sloju stalno stvaraju nove stanice. Kod zdrave kože jedan ciklus obnove epidermisa traje 28 do 30 dana ili 13 do 14 dana u područjima gdje je proliferacija stanica brža, poput kože lica (Igarashi i sur., 2005).

Dermis je izgrađen od proteina ekstracelularnog matriksa koji koži daju strukturu i elastičnost (Richmond i Harris, 2014), zauzima mnogo veću površinu od epidermisa i smatra se glavnim dijelom kože. Ovaj sloj je mnogo deblji i sadrži mali broj stanica. Građen je prvenstveno od kolagenskih i elastinskih vlakana. Dermis se sastoji od dva sloja: papilarnog i retikularnog. Papilarni sloj sadrži velik broj živčanih završetaka, kapilara i vode, pa sudjeluje u regulaciji tjelesne temperature i dostavi hranjivih tvari epidermisu. Retikularni sloj se nalazi ispod papilarnog sloja, a čini ga gusta mreža proteinskih vlakana (Igarashi i sur., 2005). Epidermis i dermis odvojeni su bazalnom membranom, tankim, uskim slojem proteina ekstracelularnog matriksa koji regulira gibanje stanica i proteina među slojevima.

Treći sloj kože, potkožno masno tkivo, grade adipociti, a tu se nalaze i živci, te krvne i limfne žile (Richmond i Harris, 2014). Njegova debljina ovisi o spolu, dobi i endokrinom sustavu organizma, te prehrani. Djeluje kao toplinski izolator i ublažava mehaničke podražaje (Igarashi i sur., 2005).

Površina kože ima različite vrijednosti pH koje variraju od 4,1 na vlasištu do 7,2 na stopalima. Najveći dio kože na tijelu ima blago kiselu pH vrijednost (5,5) i nije povoljna sredina za razvoj mikroorganizama, jer je za većinu medicinski značajnih bakterija optimalni pH oko 7. Na površini kože se nalaze brojni mikroorganizmi (bakterije i gljivice), koje u slučaju narušavanja integriteta rožnatog sloja mogu postati patogene. Porastom pH vrijednosti kože stvaraju se uvjeti za razvoj gljivičnih oboljenja (Čajkovac, 2000).

Sluznica se definira kao nekeratinizirani epitel koji prekriva površine gastrointestinalnog, respiratornog, urinarnog i genitalnog trakta te oka. Iako građa sluznice

ovisi o njenom anatomskom položaju ona uvijek uključuje unutarnji sloj vezivnog tkiva, te vanjski, sloj epitelnih stanica koji štiti sluznicu od oštećenja. Uobičajena je i prisutnost stanica koje vrše apsorpciju ili pak sekreciju sluzi, čija je glavna komponenta mukopolisaharid mucin. Izlučena sluz priječi prolaz tvarima iz okoliša i mikroorganizmima dublje u tkivo te tako štiti sluznicu od oštećenja ([www.britannica.com](http://www.britannica.com)). Za primjenu lijekova zanimljive su sluznice koje se nalaze u blizini kože: nazalna, oralna, genitalna i analna područja (Elsner, 2011).

### 1.3.1. Primjena lijekova na kožu i sluznice

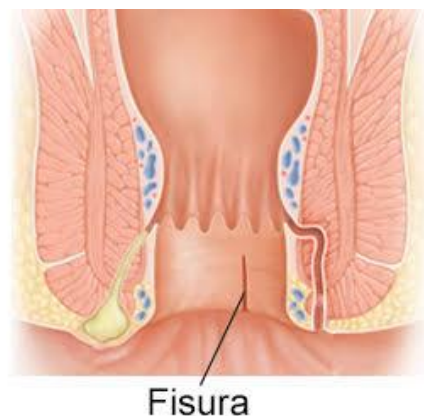
Ljekoviti oblici koji se primjenjuju topikalno na kožu dijele se u dvije kategorije - pripravci koji ostvaruju lokalni (topikalni) učinak i pripravci kojima se postiže sistemski učinak. Lokalni učinak na koži i u njoj podrazumijeva djelovanje pripravka na površini kože, u *stratum corneumu*, epidermisu i potencijalno dermisu za liječenje lokalnih oboljenja. Transdermalna primjena lijekova podrazumijeva apsorpciju lijeka kroz kožu za ostvarivanje učinka na mjestu udaljenom od mjesta primjene (Prausnitz i Langer, 2008).

Primjenom lijeka na kožu (postizanje lokalnog ili sistemskog učinka) izbjegava se prvi prolaz lijeka kroz jetru te utjecaj varijabilnog pH u gastrointestinalnom sustavu, čimbenika koji ograničavaju oralnu primjenu lijekova. Ostale prednosti primjene lijekova na kožu uključuju: dobro prihvaćanje od strane pacijenata (adherencija), jednostavnu, bezbolnu i neinvazivnu primjenu, povećanu bioraspoloživost lijeka, bolji fiziološki i farmakološki učinak. Zadržavanjem lijeka na/u koži (lokalni učinak) njegova je koncentracija u krvi i tkivima udaljenim od mjesta primjene gotovo zanemariva, čime je smanjena učestalost neželjenih reakcija u odnosu na sistemsku primjenu (Singh i sur., 2015).

Primjena lijekova na kožu s ciljem djelovanja unutar kože ili transdermalno često je otežana zbog postojanja kožne barijere (*stratum corneum*). Stoga je tijekom razvoja nove formulacije neophodno razviti podlogu (*vehikulum*) odgovarajućih svojstava koja će omogućiti dostavu uklopljene djelatne tvari na željeno mjesto djelovanja (unutar kože ili transdermalno). Uobičajene polučvrste podloge su masti, kreme i hidrogelovi. Zbog visokog sadržaja vode hidrogelovi osiguravaju dobru topljivost lijekova te omogućuju bržu migraciju lijeka kroz podlogu što ih čini prikladnim oblicima namijenjenim primjeni lijekova na kožu, a naročito na sluznice (Rehman i Zulfakar, 2013).

### 1.3.2. Analna fisura

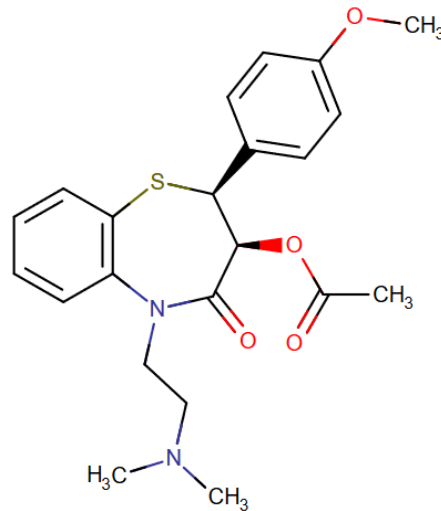
Analna fisura je patofiziološko stanje s uzdužnim rascjepom u epitelu analnog kanala koji se proteže od ruba anusa distalno prema nazubljenoj liniji (Slika 4). Simptomi uključuju bol za vrijeme i nakon defekacije, krvarenje svijetlo crvene boje, te pojavu na dodir bolno osjetljive kvržice veličine graška. Analne fisure se klasificiraju u akutne i kronične. S jednakom učestalošću javljaju se i kod muškaraca i žena, a moguća je pojava i kod djece (Beaty i Shashidharan, 2016).



**Slika 4.** Shematski prikaz analne fisure (www.health.harvard.ed)

U 50% slučajeva analna fisura se povlači spontano primjenom nefarmakoloških mjera kao što su povećan unos vlakana i tekućine te tople sjedeće kupke koje ublažuju bol (Schlichtemeier i Engel, 2016). Farmakološko liječenje uključuje topikalnu primjenu lijekova koji relaksiraju unutarnji sfinkter i pospješuju dotok krvi u zahvaćeno područje. Riječ je o magistralnim pripravcima, mastima s nitroglicerinom ili blokatorima kalcijevih kanala (nifedipinom ili diltiazemom). Uobičajena terapija uključuje primjenu 0,2% gliceril-trinitrata u obliku masti ili 2% diltiazemklorida u obliku hidrogela 2 puta dnevno tijekom 6-8 tjedana (Wald i sur., 2014). Smanjena suradljivost javlja se kod 20-30 % pacijenata zbog sistemske apsorpcije gliceril-trinitrata koja dovodi do vazodilatacije i teških glavobolja. Bolju podnošljivost pokazali su topikalni pripravci blokatora kalcijevih kanala (Beaty i Shashidharan, 2016). Za pacijente kod kojih nakon 6 do 8 tjedana lokalne terapije ne dođe do poboljšanja, preporuča se kirurški zahvat (Schlichtemeier i Engel, 2016).

## 1.4. Diltiazem



**Slika 5.** Strukturna formula diltiazema ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca))

Diltiazem (Slika 5) je dostupan u obliku topljive soli - diltiazemklorida ( $C_{22}H_{27}ClN_2O_4S$ ). Riječ je o bijelom do skoro bijelom kristaličnom prašku koji je dobro topljiv u vodi, metanolu i u metilen kloridu, a slabo topljiv u anhidričnom etanolu (Ph. Eur. 8.0, 2014).

Mehanizam djelovanja diltiazema sastoji se u inhibiciji prolaska ekstracelularnog kalcija kroz ion-specifične kanale na staničnoj membrani, točnije otvoreni ili inaktivni L-tip kalcijevih kanala (Striessnig i sur., 2015). Zbog zaustavljenog prolaza kalcija relaksira se glatka muskulatura, posljedično dolazi do vazodilatacije koronarnih krvnih žila i pada krvnog tlaka. Diltiazem reducira ponovno punjenje srca i otpor koronarnih krvnih žila i povećava opskrbu srca krvlju. Dovodi do usporavanja provođenja impulsa u atrioventrikularnom čvoru i ima slabo inhibitorno djelovanje na kontraktilnost miokarda (<http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-14-02-08.pdf>).

Nakon oralne primjene diltiazem se gotovo u potpunosti apsorbira i podliježe mehanizmu „prvog prolaska“ te se značajno veže za proteine plazme (30-40% lijeka vezano za albumin). Zbog lučenja u majčino mlijeko u količinama jednakim onima u serumu primjena diltiazema za vrijeme dojenja se ne preporučuje. Diltiazem se u jetri deacetilira u dezacetildiltiazem te se u obliku metabolita 35% doze izlučuje urinom, a ostatak fecesom (<http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-14-02-08.pdf>).

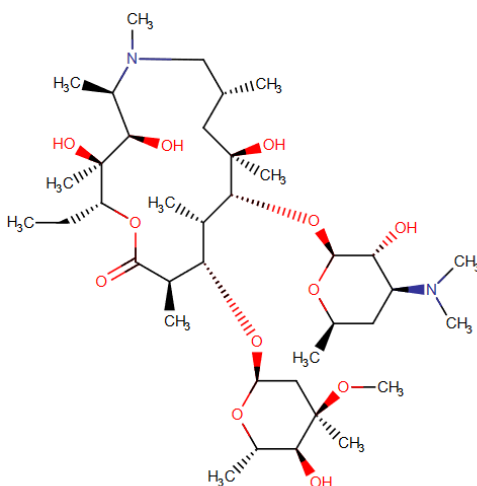


U Republici Hrvatskoj su registrirane samo tablete od 60 i od 90 mg diltiazemklorida za oralnu primjenu indicirane za kroničnu stabilnu *anginu pectoris*, prevenciju anginoznog napada, vazospastičnu anginu (Prinzmetalovu anginu) te esencijalnu hipertenziju (<http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-14-02-08.pdf>)

Smatra se da bi blokatori kalcijevih kanala mogli biti od koristi i u liječenju Raynaudova sindroma, migrene, plućnog edema, pa čak i sprječavanju prijevremenog poroda (Elliott i sur., 2001).

Zbog utjecaja na relaksaciju glatke muskulature i vazodilataciju, topikalno primijenjeni diltiazem u obliku magistralnog pripravka upotrebljava se u terapiji akutnih i kroničnih analnih fisura.

## 1.5. Azitromicin



**Slika 6.** Strukturna formula azitromicina ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca))

Azitromicin se pojavljuje u obliku monohidrata i dihidrata ( $C_{38}H_{72}O_{12}$ ,  $x H_2O$ ,  $x=1$  ili  $2$ ) kao bijeli ili skoro bijeli prašak, netopljiv u vodi, a topljiv u anhidričnom etanolu i metilen kloridu (Ph. Eur. 8.0, 2014). Mehanizam antibakterijskog djelovanja azitromicina sličan je onom ostalih makrolidnih antibiotika. Vežući se na 23 S podjedinicu rRNA, azitromicin sprječava slaganje 50 S podjedinice ribosoma posljedično onemogućujući translokaciju aminokiselina i sintezu polipeptidnog lanca (Parnham i sur., 2014). Bazični karakter azitromicina omogućava njegovu pojačanu penetraciju kroz vanjsku bakterijsku membranu što ga čini učinkovitijim spram *Gram-negativnih* bakterija (Dinos i sur., 2001) poput *Chlamydia spp.* (Retsema i sur., 1987).

Spektar djelovanja azitromicina proširen je zahvaljujući sposobnosti da inhibira rast biofilma bakterijskih vrsta kao što je *Pseudomonas aeruginosa* te bakterijsku produkciju mukusa. Najveća posebnost azitromicina očituje se u visokim koncentracijama antibiotika na mjestu infekcije zbog nakupljanja u makrofagima i polimorfonuklearnim leukocitima na nesaturabilan način ovisan o vremenu, temperaturi i pH, gdje zatim modulira njihovu aktivnost (Markotić, 2014).

Farmakokinetička ispitivanja su pokazala da azitromicin u tkivima postiže koncentracije i do 50 puta više nego u plazmi (<http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-14-02-343.pdf>). Za tkivnu distribuciju azitromicina i intracelularno nakupljanje odgovorna je kemijska struktura azitromicina (Slika 6). Naime u laktonski prsten umetnut je metilirani dušik. Azitromicin vrlo brzo ulazi u stanice i kako raste kiselost pojedinih staničnih prostora tako je koncentracija azitromicina viša, te zbog veće disocijacije, dolazi do tzv. „*ion trapping*“ s konačno najvišom koncentracijom u lizosomima (Van Bambeke i Tulkens, 2001). Za razliku od ostalih makrolida, azitromicin ne ulazi u interakcije s citokromom 3A4. Drugim riječima zabilježena je mala vjerojatnost izazivanja štetnih nuspojava te visoka razina sigurnosti (Parnham i sur., 2014).

Antimikrobni spektar azitromicina uključuje različite *Gram-pozitivne* i *Gram-negativne* mikroorganizme, anaerobe te intracelularne i klinički atipične uzročnike. Koristi se u liječenju infekcija gornjih i donjih dišnih puteva, posebice kod pneumonija uzrokovanih atipičnim agensima uključujući *Legionella pneumophila*, kože i potkožnog tkiva, infekcije želuca i dvanaesnika uzrokovane s *Helicobacter pylori*, nekomplikiranih genitalnih infekcija izazvanih s *Chlamydia trachomatis* te konjuktivitisa ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

Vrijeme polueliminacije iz plazme odražava vrijeme polueliminacije iz tkiva i iznosi od 2 do 4 dana, zbog čega je trajanje terapije značajno skraćeno. Ukupna doza azitromicina iznosi 1500 mg, daje se tijekom 3 dana, a u liječenju nekomplikiranih spolno prenosivih bolesti ukupna doza je 1000 mg i daje se jednokratno (<http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-14-02-343.pdf>).

Uz pojačanu kliničku upotrebu antibiotika, velika prijetnja njihovoj djelotvornosti je razvitak rezistencije. Dva su mehanizma bakterijske rezistencije na azitromicin; promjena strukture veznog mjesta, što onemogućava vezanje lijeka, te povećana aktivnost efluksnih pumpi, čime se značajno smanjuje koncentracija azitromicina unutar stanice (Parnham i sur., 2014).

U Republici Hrvatskoj su registrirani različiti oblici azitromicina namijenjeni: oralnoj primjeni (filmom obložene tablete, kapsule, prašak i tablete za oralne suspenzije),

parenteralnoj primjeni (prašak za koncentrat za infuzijsku otopinu) i okularnoj primjeni (kapi) ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)). Međutim, trenutno nema registriranih oblika azitromicina za topikalnu primjenu na kožu.

S obzirom na dokazanu djelotvornost sistemski primijenjenog azitromicina spram određenih *Lieshmania* vrsta *in vitro* i *in vivo*, razmatrana je djelotvornost topikalno primijenjenog lijeka uklopljenog u liposome kod lišmanioza. Takva primjena u odnosu na konvencionalnu terapiju spriječila bi neželjene sistemske nuspojave i potaknula adherenciju pacijenata (Rajabi i sur., 2016). Iz navedenih razloga, zanimljiva je mogućnost topikalne primjene azitromicina i kod drugih, posebice kompliciranih, MRSA-uzrokovanih kožnih infekcija.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Liposomi se zbog svojih strukturnih svojstava i fiziološke prihvatljivosti dugi niz godina istražuju kao nosači lijekova i primjenjuju različitim putevima primjene. Topikalnom primjenom liposoma na kožu i sluznice moguće je značajno povećati koncentraciju lijeka lokalno i smanjiti mogućnost sistemske apsorpcije i nuspojava. Međutim, tekuća konzistencija može predstavljati ograničenje njihove primjene zbog kratkog zadržavanja formulacije na mjestu primjene.

Hidrogelovi su se pokazali prikladnom podlogom za uklapanje liposoma zbog jednostavnog sastava i hidrofilnosti, koja pozitivno utječe na stabilnost fosfolipidnih vezikula (Palac i sur., 2015). Inovativni hidrogelovi na bazi kitozana imaju velikog potencijala kao podloge za primjenu lijekova na kožu i sluznice zbog svoje biorazgradljivosti, bioadhezivnosti te antimikrobnih svojstava. Hurler i suradnici (2012) su pokazali da su određeni tipovi kitozanskih gelova prikladne podloge za umješavanje liposoma s uklopljenim djelatnim tvarima.

Svrha ovog rada bila je pripremiti kitozanske gelove prikladne za uklapanje liposoma s hidrofilnim i lipofilnim lijekovima (diltiazemklorid i azitromicin dihidrat) te provesti fizikalnu karakterizaciju nastalih gelova. Pripravljene su kitozanski gelovi s različitim tipovima i udjelima kitozana te je provedena optimizacija postupka izrade gela.

Liposomi s azitromicinom i diltiazemkloridom različitog (fosfo)lipidnog sastava pripremljeni su film metodom, proliposomskom i metodom razrjeđenja poliola. Provedena je homogenizacija liposomskih disperzija te fizikalna karakterizacija koja je uključivala mjerenje srednjeg promjera, indeksa polidisperznosti i zeta potencijala. Različiti tipovi liposoma s diltiazemkloridom i azitromicin dihidratom su umješavani u 2,5% kitozanski gel (optimalna formulacija gela) te je provedeno ispitivanje mehaničkih svojstava nastalih formulacija određivanjem teksturnih svojstava (čvrstoće, kohezivnosti i adhezivnosti). Željelo se utvrditi kako sastav liposoma i uklopljena djelatna tvar utječu na fizikalna svojstva izvornog kitozanskog gela.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

Instrumenti i pribor:

- rotacijski vakuum uparivač Büchi Rotavapor R-200 (Büchi Labortechnik AG, Švicarska)
- Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, Velika Britanija)
- Texture Analyser TA.XT Plus (Stable Micro Systems Ltd., Velika Britanija)
- pH metar (Mettler-Toledo, Švicarska)
- ultrazvučna kupelj (Branson 1210, Sjedinjene Američke Države)
- ručni mini-ekstruder (Avestin Inc., Kanada)
- polikarbonatne membrane promjera pora 100 i 400 nm (Avestin Inc., Kanada)
- filteri veličine pora 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Njemačka)

Kemikalije:

- Lipoid S75, sojin lecitin sa 75% fosfatidilkolina (Lipoid GmbH, Njemačka)
- Phospholipon H (Lipoid GmbH, Njemačka)
- natrijev deoksikolat (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC) (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- dimetildiokatadecilamonijbromid (DODAB) (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- azitromicin dihidrat (PLIVA Hrvatska Ltd., Hrvatska)
- diltiazemklorid (Fagron, Belgija)
- kitozan velike molekularne mase (high molecular weight, HMW) (Fluka, Sjedinjene Američke Države)
- kitozan srednje molekularne mase (medium molecular weight, MMW) (Fluka, Sjedinjene Američke Države)
- etanol, 96 vol% (Kemika, Hrvatska)
- mliječna kiselina 88% (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- propilenglikol (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- fosfatni pufer, PBS pH 7,5 i 6,8

3,5% (w/w) mliječna kiselina pripravljena je miješanjem 3,98 g 88% mliječne kiseline (Sigma-Aldrich, Njemačka) i 96,02 g demineralizirane vode.

0,01 M fosfatni pufer pH 7,5 (PBS) pripremljen je otapanjem 1,3609 g  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$  u demineraliziranoj vodi do 1000 ml. Za podešavanje pH vrijednosti korišten je 10 M KOH.

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Optimizacija postupka izrade kitozanskog gela**

Tijekom optimizacije postupka izrade kitozanskog gela korišteni su različiti tipovi, koncentracije i stupanj usitnjenosti kitozana. Hidrogelovi su pripremljeni s različitim udjelima 3,5 % mliječne kiseline, a sam postupak izrade bio je u čaši ili pateni (Tablica 1). Udio propilenglikola bio je isti za sve hidrogelove i iznosio je 10 % (w/w).

Ukratko, kitozan je izvagan u zdjelici za vaganje, prebačen u čašu (ili patenu) te otopljen u mliječnoj kiselini rastrljavanjem sa staklenim štapićem ili pistilom. Potom je u smjesu umiješan propilenglikol te je postepeno dodana demineralizirana voda do 10 g gela. Nakon soniciranja na ultrazvučnoj kupelji (cca 30 min) gelovi su pokriveni parafilmom i ostavljeni na sobnoj temperaturi tijekom 24 sata da bi u potpunosti izbubriili.

### **3.2.2. Priprava liposoma**

#### **3.2.2.1. Priprava konvencionalnih liposoma s diltiazemkloridom**

Konvencionalni liposomi s diltiazemkloridom pripremljeni su proliposomskom metodom (Pavelić i sur., 2001). Fosfatidilkolin (110 mg) i Phospholipon H (15 mg) su otopljeni u čašici (25 ml) u 0,3 g 96 vol% etanola miješanjem na magnetnoj miješalici uz blago zagrijavanje do 50 °C. Zatim je naglo dodano 0,5 ml prethodno pripremljene otopine diltiazemklorida (0,5g/5ml, odmjerna tikvica) uz intenzivno miješanje (600 okretaja/minuta). Proliposomska disperzija ohlađena je na sobnu temperaturu i postepeno razrjeđivana na magnetnoj miješalici (600 okretaja/minuta) dokapavanjem fosfatnog pufera (pH 6,8) do 5 ml (ukupni volumen liposomske disperzije). Tijekom narednih 45 minuta novonastala

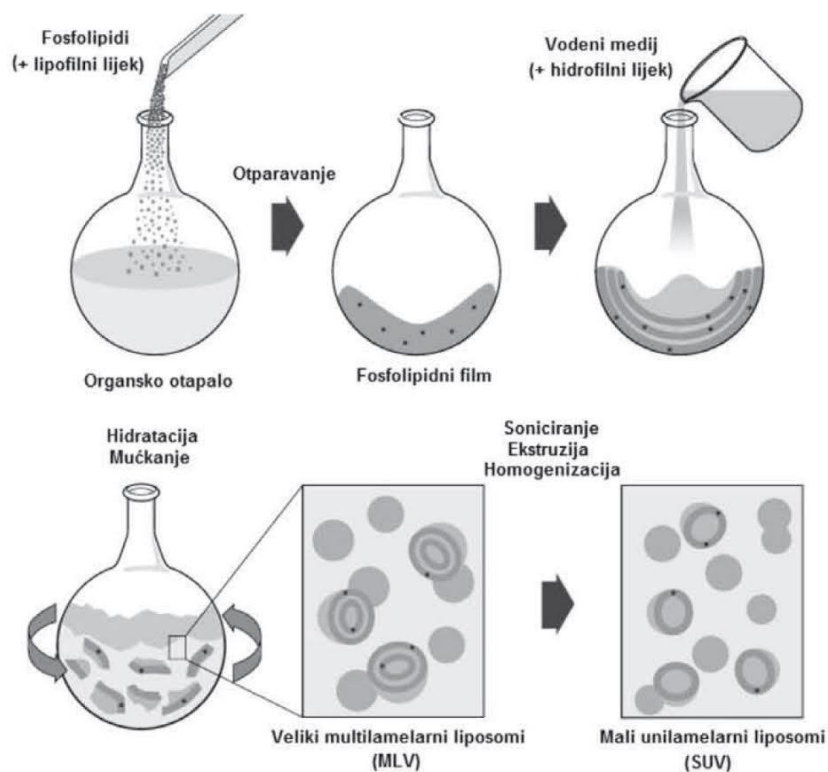
liposomska disperzija miješana je na miješalici, a zatim ostavljena još 3 sata da se u potpunosti hidratira (prilagođeno prema Pepić, 2017).

#### **3.2.2.2. Priprava propilenglikol liposoma s diltiazemkloridom**

Elastični liposomi s diltiazemkloridom pripremljeni su metodom razrjeđenja poliola (Pavelić i sur., 2001). Fosfatidilkolin (125 mg) je otopljen u čašici od 25 ml u 0,5 g propilenglikola miješanjem na magnetskoj miješalici uz blago zagrijavanje. Zatim je dodano 2,5 ml prethodno pripremljene otopine diltiazemklorida (0,5g/5ml, odmjerne tikvice) uz intenzivno miješanje (600 okretaja/min). Nastala homogena viskozna disperzija je potom razrjeđivana dodavanjem fosfatnog pufera (pH 6,8) uz neprekidno miješanje na magnetskoj miješalici tijekom 30-ak minuta, a zatim ostavljena još 3 sata da se u potpunosti hidratira. Ukupan volumen liposomske disperzije iznosio je 5 ml (prilagođeno prema Pepić, 2017).

#### **3.2.2.3. Priprava konvencionalnih liposoma s azitromicin dihidratom**

Konvencionalni liposomi s azitromicin dihidratom pripremljeni su tzv. „film metodom“ (Vanić, 2012a) (Slika 7). 100 mg sojinog fosfatidilkolina i 15 mg azitromicina odvagano je u čašici od 25 ml i otopljeno u 2 ml apsolutnog etanola (96 vol%) uz soniciranje na ultrazvučnoj kupelji. Otopina je kvantitativno prenesena u tikvicu okruglog dna od 100 ml, uz dodatno ispiranje s etanolom (2 ml), te je cjelokupni etanol otparen na vakuumskom rotacijskom uparivaču pri 40 °C. Osušeni fosfolipidni film s azitromicinom je zatim hidratiziran dodatkom 5 ml fosfatnog pufera (pH 7,5) na sobnoj temperaturi ručnim protresivanjem tikvice i mućkanjem do potpune hidratacije filma.



**Slika 7.** Priprava liposoma metodom hidratacije suhog fosfolipidnog sloja („film metoda“) (Vanić, 2012a)

#### 3.2.2.4. Priprava propilenglikol liposoma s azitromicin dihidratom

Propilenglikol liposomi s azitromicin dihidratom pripremljeni su iz 85 mg fosfatidilkolina i 15 mg azitromicin dihidrata na način opisan za konvencionalne i deformabilne liposome. Razlika je jedino u postupku hidratacije filma pri čemu je korištena 30% (w/v) otopina propilenglikola u puferu, pH 7.5. Konačni volumen liposomske disperzije iznosio je 5 ml.

#### 3.2.2.5. Priprava deformabilnih liposoma s azitromicin dihidratom

Fosfatidilkolin (85 mg), natrijev deoksikolat (15 mg) i azitromicin dihidrat (15mg) odvagani su u čašici i otopljeni u 2 ml apsolutnog etanola uz soniciranje na ultrazvučnoj kupelji. Otopina je kvantitativno prenesena u tikvicu okruglog dna od 100 ml uz ispiranje s etanolom (2 ml), te je cjelokupni sadržaj etanola otparen iz preparacije na uparivaču pri 40 °C. Suhi fosfolipidni film je zatim hidratiziran dodatkom 5 ml fosfatnog pufera (pH 7,5) na sobnoj temperaturi ručnim protresivanjem tikvice i mućkanjem do potpune hidratacije filma.



### 3.2.2.6. Priprava kationskih liposoma s azitromicin dihidratom

Kationski liposomi s azitromicin dihidratom pripremljeni su otapanjem 73 mg dipalmitoilfosfaditilkolina (DPPC), 27 mg dimetildioktadecilamonijbromida (DODAB) i 15 mg azitromicin dihidrata u 2 ml etanola uz soniciranje na ultrazvučnoj kupelji. Otopina je kvantitativno prenesena u tikvicu okruglog dna od 100 ml, isprana dodatno s 2 ml etanola te je cjelokupni etanol otparen na vakuumskom rotacijskom uparivaču pri 60 °C. Osušeni lipidni film s azitromicinom je potom hidratiziran dodatkom 5 ml fosfatnog pufera (pH 7,5), zagrijanog na istu temperaturu, uz rotaciju na uparivaču uz održavanje temperature (60 °C) do potpune hidratacije.

Sve su preparacije liposoma (s diltiazemkloridom i azitromicin dihidratom) homogenizirane ručnim mini-ekstruderom (Slika 8) ekstrudiranjem tri puta kroz polikarbonatne membranske filtere promjera pora 400 nm, dok su liposomi s azitromicin dihidratom dodatno ekstrudirani (jedanput) kroz filtere promjera pora 100 nm.



**Slika 8.** Ekstruzija liposomskih disperzija kroz polikarbonatne membranske filtere  
(<http://www.avestin.com>)

### **3.2.3. Mjerenje srednjeg promjera, indeksa polidisperznosti i zeta potencijala liposoma**

Srednji promjeri i indeks polidisperznosti liposoma različitog (fosfo)lipidnog sastava i uklopljene djelatne tvari određeni su metodom fotonske korelacijske spektroskopije (PCS). Mjerenja su provedena na uređaju Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, Velika Britanija) pri temperaturi od 25 °C, osim za kationske liposome čije je mjerenje provedeno na 40 °C. Uzorak je pripremljen u jednokratnoj kiveti razrjeđivanjem 1 kapi liposomske disperzije (približno 20 µl) s 1 mM otopinom NaCl prethodno profiltrirane kroz filter veličine pora 0,45 µm. Mjerenja su provedena s izvornim i homogeniziranim liposomskim disperzijama.

Zeta potencijali liposoma različitog (fosfo)lipidnog sastava i uklopljene djelatne tvari izmjereni su na uređaju Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, Velika Britanija). Mjerenje je provedeno pri sobnoj temperaturi, nakon kalibracije instrumenta mjerenjem zeta potencijala standarda (*Malvern Zeta Potential Transfer Standard 50±5 mV*). Uzorak je pripremljen razrjeđenjem liposomske disperzije s 1 mM otopinom NaCl.

### **3.2.4. Uklapanje liposoma u kitozanske gelove**

U degazirani 2,5% kitozanski gel pripremljen iz kitozana velike molekularne mase (optimalna formulacija gela) umiješani su liposomi s uklopljenim diltiazemkloridom ili azitromicin dihidratom, kojima je prethodno odijeljena neuklopljena frakcija lijeka. Miješanje je provedeno staklenim štapićem do potpune homogenizacije smjese te je formulacija liposomi-u-hidrogelu ponovno degazirana. Udio liposoma u konačnoj formulaciji iznosio je 30% (w/w).

Na isti način pripremljen je uzorak kontrolnog gela koji je umjesto liposoma sadržavao otopinu diltiazemklorida ili azitromicin dihidrata u istoj masi koliko je iznosio udio liposoma u pripravku liposomi-u-hidrogelu (30%).

### **3.2.5. Teksturna analiza gelova s uklopljenim liposomima**

Određivanje teksturnih svojstava liposomskih hidrogelova provedeno je na uređaju Texture Analyser TA.XT Plus (Stable Micro Systems Ltd., UK). Čaša (100 ml) je napunjena uzorkom liposoma-u-hidrogelu (otprilike 50 ml), tako da se izbjegne uklapanje zraka i omogući nastanak glatke površine gela. Disk promjera 40 mm utisnut je u hidrogel brzinom 1 mm/s do dubine od 10 mm i ponovno izvučen. Izmjerena je čvrstoća hidrogela te su izračunati teksturni parametri koji pokazuju kohezivnost i adhezivnost. Mjerenja su izvedena u triplikatu, a svaki uzorak bio je mjeren 5 puta na sobnoj temperaturi. Kontrolni uzorci hidrogelova ispitani su pod istim uvjetima (Hurler i sur., 2012).

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

### **4.1. Optimizacija kitozanskih hidrogelova**

Pripremljeni su gelovi različitog udjela kitozana i mliječne kiseline (Tablica 1). Formulacije neprikladne konzistencije, nedovoljno izbubrenog polimera i neodgovarajuće pH vrijednosti su odbačene iz daljnje obrade (ispitivanja). Pokazano je da su gelovi izrađeni od kitozana velike molekularne mase i pri nižim koncentracijama polimera imali odgovarajuću (željenu konzistenciju) koja bi bila prikladna za uklapanje liposoma. Stoga je u većini izrađenih gelova bio korišten visokomolekularni (HMW) kitozan.

**Tablica 1.** Pregled korištenih tipova kitozana te udjela kitozana i mliječne kiseline tijekom optimizacije postupka pripreve hidrogela

Tip kitozana	Kitozan (%)	3,5% mliječna kiselina (g)	Usitnjavanje polimera	Izrada	Komentar
MMW	4	4,4	-	čša	nedovoljno otopljen/izbubren kitozan
HMW	4	4,4	-	čša	nedovoljno otopljen/izbubren kitozan
HMW	3,5	3,85	-	čša	nedovoljno otopljen/izbubren kitozan
HMW	3	3	-	čša	nedovoljno otopljen/izbubren kitozan
HMW	3	3	-	patena	nedovoljno otopljen/izbubren kitozan
HMW	3	3,3	-	čša	nedovoljno otopljen/izbubren kitozan
HMW	3	3,5	-	patena	nedovoljno otopljen/izbubren kitozan
HMW	3	3,5	-	čša	nedovoljno otopljen/izbubren kitozan
HMW	3	4	-	čša	nedovoljno otopljen/izbubren kitozan
HMW	3	4,5	-	čša	neodgovarajući pH (4,62)
HMW	3	5	-	čša	neodgovarajući pH (4,35)
HMW	3	5	-	čša	neodgovarajući pH (4,30)
HMW	3	5,5	-	čša	neodgovarajući pH (4,24)
HMW	3	6	-	čša	neodgovarajući pH (3,78)
HMW	3	6,5	-	čša	neodgovarajući pH (3,70)
HMW	2,5	2,75	-	čša	nedovoljno otopljen/izbubren kitozan
HMW	2,5	3	+	čša	nedovoljno otopljen/izbubren kitozan
HMW	2,5	3,25	+	čša	nedovoljno otopljen/izbubren kitozan
HMW	2,5	3,5	+	čša	<b>optimalna formulacija, pH 5,05</b>
HMW	2	2,2	-	čša	preniska konzistencija gela
HMW	1,5	1,65	-	čša	preniska konzistencija gela

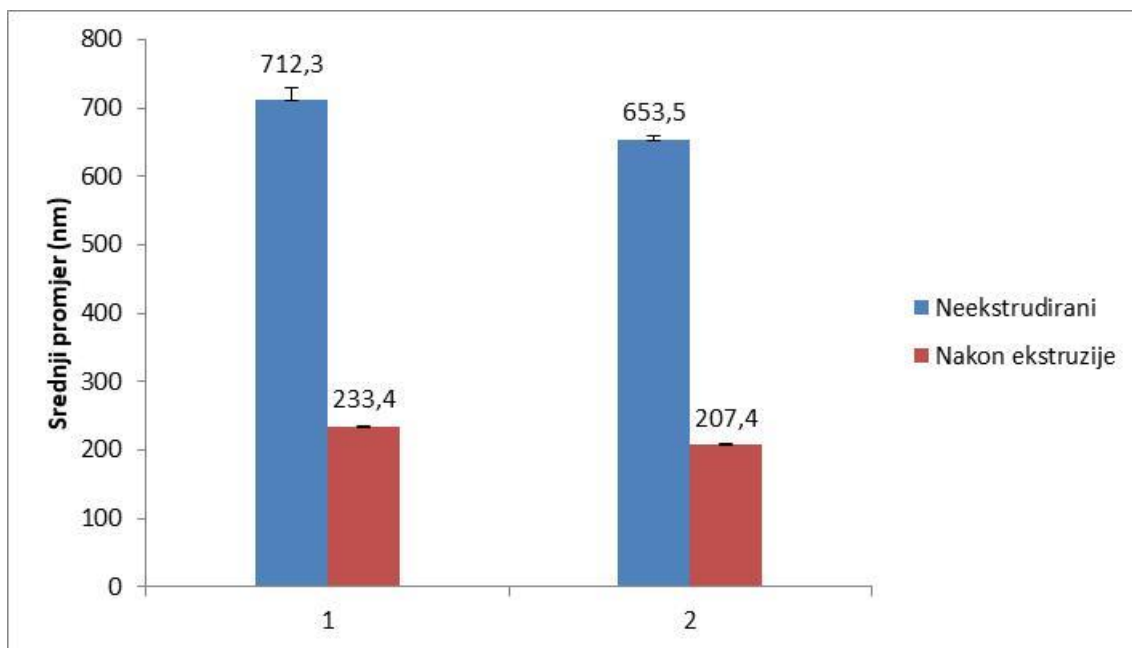
HMW, kitozan velike molekularne mase; MMW, kitozan srednje molekularne mase. Kitozan (%) predstavlja udio kitozana u 100 g hidrogela (w/w). Usitnjavanje kitozana provedeno je mljevenjem prethodno smrznutog polimera na -70 °C. Masa hidrogela tijekom optimizacije postupka izrade iznosila je 10 g.

Nakon izrade, svakom gelu je izmjerena pH korištenjem pH metra s pH elektrodom za polučvrste pripravke. Velik broj faktora, kao što su endogeni faktori: dob, genetska predispozicija te predio kože, ali i egzogenih poput primjene kozmetičkih preparata ili detergensa utječe na pH vrijednosti kože (Ali i Yosipovitch, 2013). Te vrijednosti mogu varirati između pH 4 i 7, ali najčešće je površina kože blago kisela (pH=5,5) što je čini nepovoljnom sredinom za razvoj mikroorganizama (Čajkovac, 2000). Kako ne bi izazivao iritacije kod primjene, pH hidrogela trebao bi biti što bliže ovoj vrijednosti. Stoga je prilikom postupka optimizacije izrade hidrogela bilo potrebno uspostaviti odgovarajuću ravnotežu između dovoljno izdubrenog gela i željenog pH.

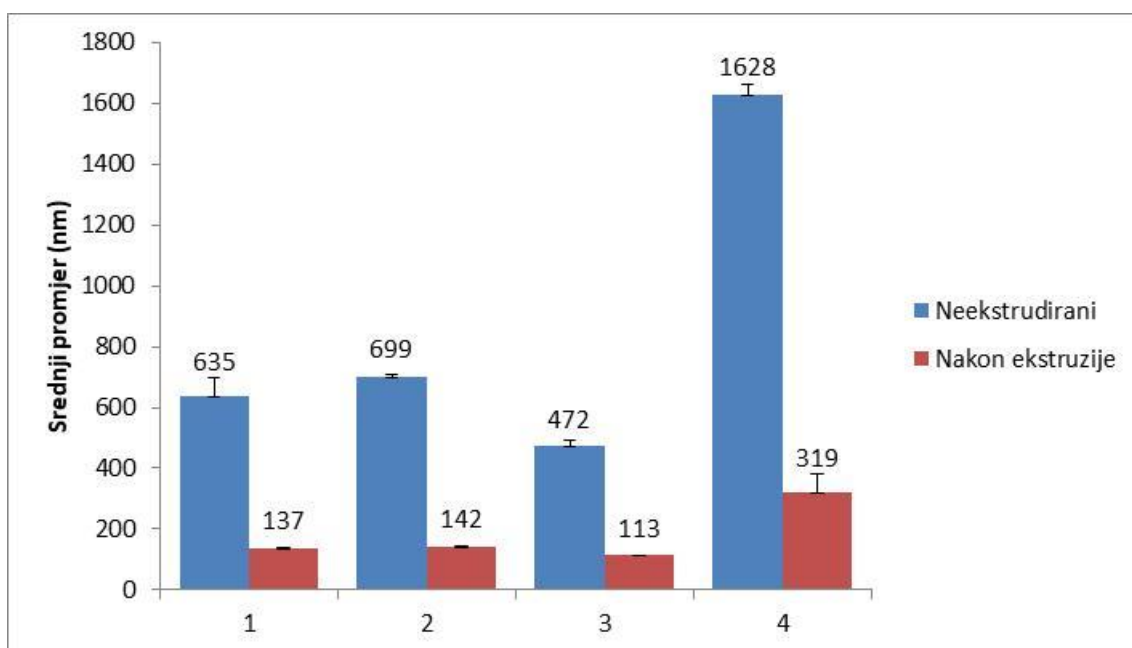
Provedena optimizacija postupka izrade hidrogela pokazala je optimalnom preparaciju kitozanskog hidrogela s 2,5% (w/w) kitozana velike molekularne mase izrađenu s 3,5 g 3,5% mliječne kiseline. Izmjereni pH iznosio je 5,05.

#### **4.2. Fizikalna karakterizacija liposoma s diltiazemkloridom i azitromicin dihidratom**

Srednji promjeri i indeksi polidisperznosti različitih tipova liposoma s različitim uklopljenim djelatnim tvarima (prije i nakon ekstruzije) prikazani su Slikama 9 i 10 te Tablicom 2.



**Slika 9.** Srednji promjeri liposoma s diltiazemkloridom, prije i nakon ekstruzije (1-konvencionalni liposomi, 2-propilenglikol liposomi)



**Slika 10.** Srednji promjeri liposoma s azitromicin dihidratom prije i nakon ekstruzije (1-konvencionalni liposomi, 2-propilenglikol liposomi, 3-deformabilni liposomi, 4-kationski liposomi)

**Tablica 2.** Vrijednosti indeksa polidisperznosti liposoma s diltiazemkloridom i azitromicin dihidratom

Djelatna tvar	Formulacija liposoma	Indeks polidisperznosti	
		Prije ekstruzije	Nakon ekstruzije
Diltiazem klorid	Konvencionalni	0,473±0,082	0,275±0,8
	Propilenglikol	0,569±0,073	0,235±0,025
Azitromicin dihidrat	Konvencionalni	0,91±0,08	0,10±0,01
	Propilenglikol	1,00±0,00	0,19±0,03
	Deformabilni	0,81±0,11	0,13±0,04
	Kationski	1,00±0,00	0,43±0,10

Iz prikaza rezultata (Slike 9 i 10, Tablica 2) očito je da se ekstruzijom značajno smanjuje veličina (srednji promjeri) te indeksi polidisperznosti izvorno pripremljenih liposoma (neovisno o kojem je tipu liposoma i uklopljenoj djelatnoj tvari riječ).

Usporedba različitih tipova liposoma s azitromicin dihidratom ukazuje na izrazito veći promjer kationskih liposoma (ekstrudirani i neekstrudirani) (Slika 10) koji je posljedica specifičnog lipidnog sastava i fizikalnih svojstava liposoma. Deformabilni liposomi s azitromicin dihidratom bili su značajno manjeg srednjeg promjera (113 nm) u odnosu na konvencionalne liposome (137 nm) što je u skladu s literaturnim podacima (Palac i sur., 2015), dok su propilenglikol liposomi veličinom (142 nm) bili slični konvencionalnim liposomima.

U slučaju uklopljene hidrofilne djelatne tvari (diltiazemklorid) u različite tipove liposoma (Slika 9), (konvencionalni i elastični), srednji promjer elastičnih propilenglikol liposoma je bio značajno manji (207 nm) od konvencionalnih liposoma (233 nm). Dobiveni rezultati u suglasnosti su s literaturom. Naime brojne studije su pokazale manji promjer elastičnih propilenglikol liposoma u odnosu na konvencionalne liposome istog fosfolipidnog sastava (Palac i sur., 2014; Vanić i sur., 2014; Elmoslemany i sur., 2012).

Indeks polidisperznosti ukazuje na heterogenost/homogenost liposomskih preparacija. Vrijednosti indeksa polidisperznosti izvornih liposomskih disperzija (i s diltiazemkloridom i s azitromicin dihidratom) ukazuju na značajnu heterogenost disperzija, osobito propilenglikol i kationskih liposoma s azitromicinom (Tablica 2). Obje izvorne preparacije liposoma s diltiazemkloridom imale su indekse polidisperznosti 0,47 (konvencionalni liposomi) i 0,57



(propilenglikol liposomi). Iako su te vrijednosti značajno, gotovo upola manje, od vrijednosti dobivenih indeksa polidisperznosti izvornih preparacija liposoma s azitromicin dihidratom, i dalje ukazuju na heterogenu distribuciju veličine liposoma. Manje vrijednosti indeksa polidisperznosti neekstrudiranih liposoma s diltiazemkloridom u usporedbi s liposomima s azitromicin dihidratom posljedica su korištenih različitih metoda pripreme liposoma. Naime, film metoda (korištena za izradu liposoma s azitromicin dihidratom) karakteristična je po stvaranju velikih multilamelarnih liposoma promjera većeg od 10  $\mu\text{m}$ , dok proliposomska i metoda razrjeđenja poliola rezultiraju značajno manjim oligo- i multi-lamelarnim liposomima.

Imajući u vidu terapijsku primjenu liposoma kao nosača lijekova i kontrolirano oslobađanje lijeka iz vezikula, široka razdioba veličina može predstavljati poteškoću, pa je nužna homogenizacija pripravka, odnosno smanjivanje veličine liposoma (Mandić i sur., 2012). Kako bi se dobili liposomi uže distribucije veličina, provedena je ekstruzija preparacija. Tako su ekstrudirani liposomi s azitromicin dihidratom imali indeks polidisperznosti u rasponu 0,10-0,19 (izrazito homogene disperzije) dok su jedino kationski liposomi i dalje imali značajno veći indeks polidisperznosti (0,43).

Zeta potencijal indirektno upućuje na površinski naboj liposoma (Samadikhak i sur., 2011). Naboj na površini liposoma mjera je njihove fizičke i *in vivo* stabilnosti te omogućuje predviđanje stabilnosti disperzija tijekom uskladištenja, ali i mogućih interakcija liposoma s biološkim okruženjem ([www.malvernpanalytical.com](http://www.malvernpanalytical.com)).

Izmjereni zeta potencijali različitih tipova liposoma s različitim djelatnim tvarima (Tablica 3) prvenstveno su posljedica fosfolipidnog sastava liposoma, a ne uklopljene djelatne tvari. Sve su liposomske preparacije izuzev kationskih liposoma s azitromicin dihidratom (+ 62 mV) imale negativan zeta potencijal (-43 mV do -54 mV) koji ukazuje na adekvatnu fizičku stabilnost svih ispitivanih liposomskih disperzija. Zanimljivo je spomenuti da su Ogiso i suradnici (2001) pokazali kako negativno nabijeni liposomi dopiru do dermisa kroz *stratum corneum* uz folikul dlake puno brže od pozitivno nabijenih čestica. S druge strane, poznato je da kationski liposomi uspostavljaju dobar kontakt s negativno nabijenim stanicama (elektrostatski) te zbog kationskih lipida mogu doprinijeti antimikrobnom učinku formulacije (liposomi s azitromicinom). Stoga je potrebno provesti daljnja *in vitro* ispitivanja koja bi te pretpostavke potvrdila.

**Tablica 3.** Vrijednosti zeta potencijala ispitivanih liposomskih preparacija

Djelatna tvar	Formulacija liposoma	Zeta potencijal (mV)
<b>Diltiazemklorid</b>	Konvencionalni	-51,9±0,5
	Propilenglikol	-54,3±0,6
<b>Azitromicin dihidrat</b>	Konvencionalni	-43,9±0,7
	Propilenglikol	-48,4±1,9
	Deformabilni	-45,8±0,5
	Kationski	+62,2±1,1

#### 4.2.1. Fizikalna karakterizacija liposomskih hidrogelova

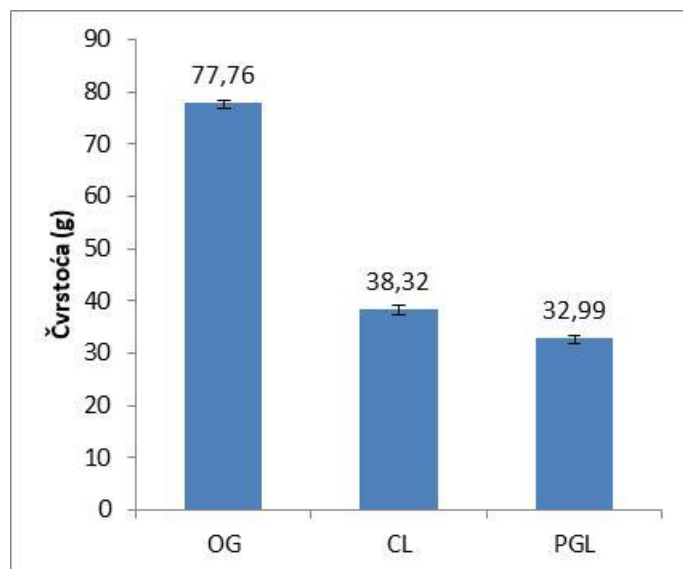
Jedno od važnih svojstava u karakterizaciji gela je njegova čvrstoća. Čvrstoća se mjeri umetanjem diska u uzorak pri definiranoj brzini uz mjerenje sile potrebne za prolazak kroz gel. Dakle, sila potrebna za prodiranje u gel do određene dubine predstavlja čvrstoću gela. Čvrstoća ispitivanog gela ne ovisi samo o sastavu (Hurler i sur., 2012) gela već i o veličini i obliku uzorka gela, veličini sonde, brzini te dubini prodiranja (Grillet i sur., 2012). Ona je usko povezana s koncentracijom polimera u uzorku gela te ukazuje na mogućnost njegove primjene na kožu (Hurler i sur., 2012).

Adhezija podrazumijeva međusobno privlačenje površina dvaju tijela načinjenih od različitih tvari koje su posljedica elektromagnetskog međudjelovanja molekula na površini dvaju tijela (Lopac, 2009). Rad koji je potreban za izvlačenje diska iz polučvrstog uzorka mjeri sposobnosti prijanjanja formulacije na disk (Hurler i Škalko-Basnet, 2012). Kao i čvrstoća, adhezivnost gela ovisi o koncentraciji polimera i prisutnim pomoćnim tvarima i upućuje na mogućnost zadržavanja gela na koži (Hurler i sur., 2012).

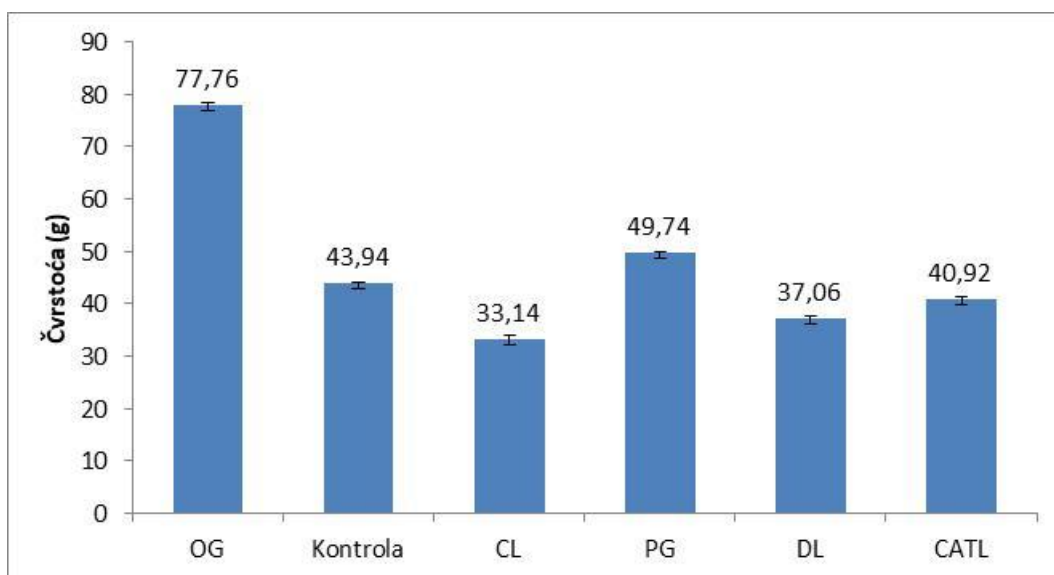
Kohezija je privlačna sila elektromagnetskog podrijetla između molekula u nekoj tvari koja drži čestice te tvari na okupu (Lopac, 2009). Kohezivnost u teksturnoj analizi određuje rad koji je potreban da bi se disk utisnuo u gel te posredno ukazuje na mogućnost istiskivanja gela iz spremnika (tube) (Hurler i Škalko-Basnet, 2012).

Kod optimiziranja formulacija namijenjenih topikalnoj primjeni potrebno je uspostaviti ravnotežu između kohezivnosti i adhezivnosti ispitivane polučvrste formulacije (gela), osobito u svrhu postizanja produljenog zadržavanja formulacije na mjestu primjene (Hurler i sur., 2012).

Mehanička svojstva liposomskih gelova utvrđena su mjerenjem čvrstoće, adhezivnosti i kohezivnosti teksturnim analizatorom na način detaljno opisan u poglavlju 3.2.5. Analizirani teksturni parametri (čvrstoća, kohezivnost i adhezivnost) u korelaciji su s primjenjivošću formulacije na kožu i sluznicu, istiskivanjem pripravka iz spremnika te zadržavanju pripravka na mjestu primjene. Rezultati provedenih ispitivanja su prikazani Slikama 11-16.



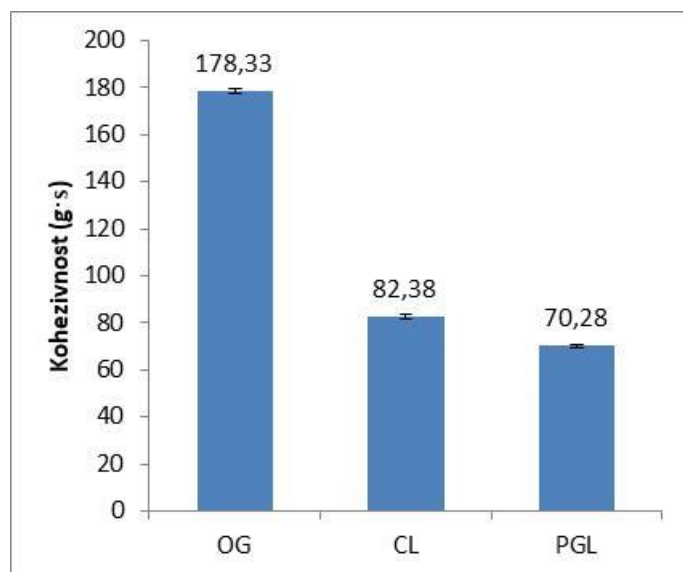
**Slika 11.** Utjecaj različitih tipova liposoma s diltiazemkloridom na čvrstoću 2,5% kitozanskog gela (OG-originalni gel, CL-konvencionalni liposomi, PGL-propilenglikol liposomi)



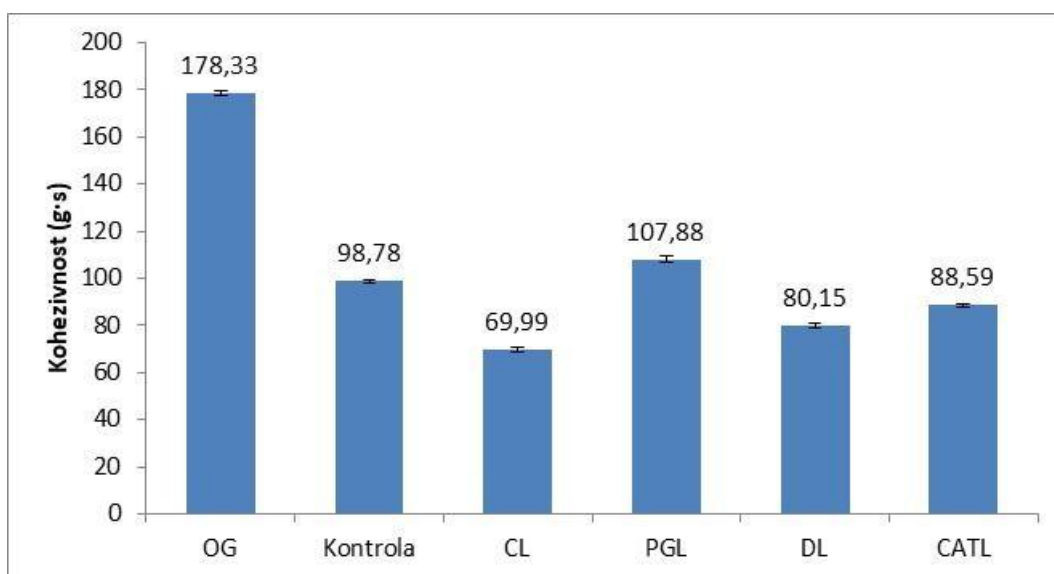
**Slika 12.** Utjecaj različitih tipova liposoma s azitromicin dihidratom na čvrstoću 2,5% kitozanskog gela (OG-originalni gel, CL-konvencionalni liposomi, PGL-propilenglikol liposomi, DL-deformabilni liposomi, CATL-kationski liposomi)

Slike 11 i 12 jasno pokazuju da umješavanjem liposoma u izvorni kitozanskih gel opada njegova čvrstoća. Tako je primjerice umješavanjem konvencionalnih liposoma s diltiazemkloridom u 2.5% kitozanski gel značajno narušena njegova izvorna čvrstoća (Slika 11), što je i logično budući da je sadržaj liposomske disperzije u gelu iznosio 30% (w/w). Čvrstoća formulacije propilenglikol liposoma-u-kitozanskom gelu bila je neznatno niža (33 g) u odnosu na formulaciju s konvencionalnim liposomima (38 g).

Najmanju čvrstoću među liposomskim gelovima s azitromicin dihidratom (Slika 12) imali su konvencionalni liposomi-u-kitozanskom gelu (33 g), dok su deformabilni i kationski liposomi imali podjednaki utjecaj koji je bio usporediv s kontrolom (otopina azitromicina-u-kitozanskom gelu). Najmanji pad izvorne čvrstoće gela postignut je umješavanjem propilenglikol liposoma (50 g).



**Slika 13.** Utjecaj različitih tipova liposoma s diltiazemkloridom na kohezivnost 2,5% kitozanskog gela (OG-originalni gel, CL-konvencionalni liposomi, PGL-propilenglikol liposomi)

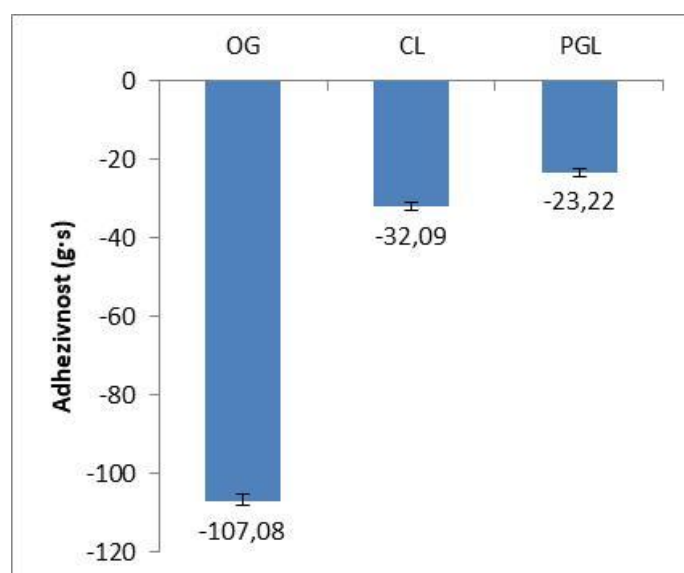


**Slika 14.** Utjecaj različitih tipova liposoma s azitromicin dihidratom na kohezivnost 2,5% kitozanskog gela (OG-originalni gel, CL-konvencionalni liposomi, PGL-propilenglikol liposomi, DL-deformabilni liposomi, CATL-kationski liposomi)

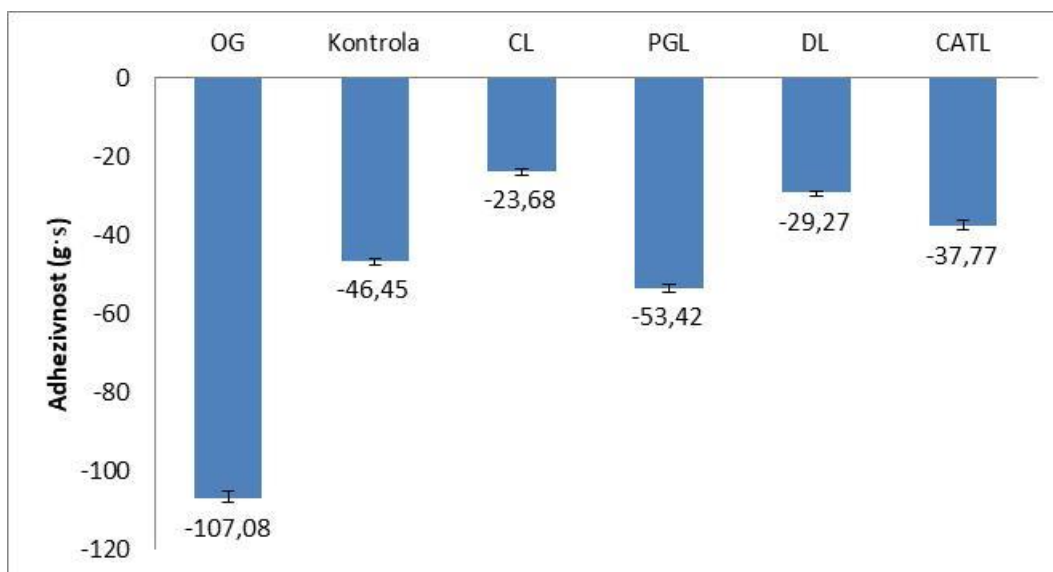
Kohezivnost izvornog kitozanskog gela također značajno opada umješavanjem liposoma (Slike 13 i 14), slično kao kod čvrstoće (Slike 11 i 12). Usporedba različitih tipova liposoma s diltiazemkloridom uklopljenim u 2,5% kitozanski gel pokazala je da su propilenglikol liposomi imali većeg utjecaja na pad kohezivnosti izvornog gela od

konvencionalnih liposoma (Slika 13). Obrnuta pojava zabilježena je kad je uklopljena djelatna tvar u liposomima bila azitromicin dihidrat (Slika 14). Naime, kohezivnost je bila najmanja za formulaciju konvencionalnih liposoma-u-gelu (70 g·s) u usporedbi s propilenglikol liposomima (108 g·s). Usporedba liposomskih formulacija s kontrolnim gelom (99 g·s), ukazuje na najbolje očuvanje izvorne kohezivnosti kitozanskog gela umješavanjem propilenglikol liposoma. Za razliku od propilenglikol liposoma, uklapanje deformabilnih liposoma značajno je smanjilo izvornu kohezivnost gelova dok su kationski liposomi imali povoljniji učinak (manje izražen pad kohezivnosti) od deformabilnih i konvencionalnih liposoma (Slika 13).

Slike 15 i 16 pokazuju utjecaj različitih tipova liposoma s diltiazemkloridom i azitromicin dihidratom na promjene adhezivnosti izvornog 2,5% kitozanskog gela.



**Slika 15.** Utjecaj različitih tipova liposoma s diltiazemkloridom na adhezivnost 2,5% kitozanskog gela (OG-originalni gel, CL-konvencionalni liposomi, PGL-propilenglikol liposomi)



**Slika 16.** Utjecaj različitih tipova liposoma s azitromicin dihidratom na kohezivnost 2,5% kitozanskog gela (OG-originalni gel, CL-konvencionalni liposomi, PGL-propilenglikol liposomi, DL-deformabilni liposomi, CATL-kationski liposomi)

Smanjenje adhezivnosti potvrđeno je za sve preparacije liposoma uklopljene u 2,5% kitozanski gel, neovisno o uklopljenoj djelatnoj tvari u liposomima. Slično kao i za čvrstoću (Slika 11) i kohezivnost (Slika 13), adhezivnost izvornog kitozanskog gela je bila manje narušena uklapanjem konvencionalnih liposoma s diltiazemkloridom nego s propilenglikol liposomima. Nasuprot tome, među ispitivanim različitim tipovima liposoma s azitromicin dihidratom, propilenglikol liposomi su imali najpovoljniji učinak po pitanju očuvanja izvorne adhezivnosti kitozanskog gela u odnosu na ostale tipove liposoma (Slika 16).

Rezultati provedene fizikalne karakterizacije kitozanskih gelova s različitim tipovima liposoma i uklopljenim djelatnim tvarima teksturnim analizatorom bila su u suglasnosti s postojećom literaturom. Dodatkom uklopljene djelatne tvari, nanonosača (liposoma s uklopljenim lijekom) ili pak modifikacijom sastava podloge mijenjaju se njezina izvorna teksturna svojstva: čvrstoća, kohezivnost i adhezivnost (Palac i sur., 2015; Vanić i sur., 2014; Hurler i sur., 2012).

Provedena ispitivanja mehaničkih svojstava liposomskih gelova pokazuju da se teksturnom analizom inovativnog kitozanskog gela može utvrditi kako tip liposoma

(fosfolipidni sastav), prisutstvo suotapala i fizikalno-kemijska svojstva uklopljene djelatne tvari u liposomima mijenjaju fizikalna svojstva izvornog gela koja se odražavaju u promjenama mehaničkih svojstava gela tijekom nanošenja pripravka na površinu (koža ili sluznica), istiskivanju iz spremnika (tube) i zadržavanju pripravka na mjestu primjene.



## 5. ZAKLJUČCI

Temeljem svih provedenih ispitivanja i obradom dobivenih rezultata moguće je izvesti sljedeće zaključke:

- 2,5% kitozanski gel pripremljen iz kitozana velike molekularne mase odabran je optimalnom podlogom za uklapanje liposoma s diltiazemkloridom i azitromicin dihidratom
- pH optimalne formulacije kitozanskog hidrogela iznosio je 5,05
- metoda pripreme, (fosfo)lipidni sastav, prisustvo surfaktanta i suotapala utječu na fizikalna svojstva liposoma
- homogenizacijom liposomskih disperzija s diltiazemkloridom i azitromicin dihidratom dobiveni su liposomi srednjeg promjera do 300 nm, te niskog indeksa polidisperznosti ( $< 0,23$ ), što ih čini prikladnim za topikalnu primjenu na kožu i sluznice
- zeta potencijali svih evaluiranih preparacija liposoma posljedica su njihovog (fosfo)lipidnog sastava, a ne uklopljene djelatne tvari te ukazuju na formiranje fizički stabilnih liposomskih disperzija
- uklapanje različitih tipova liposoma s različitim djelatnim tvarima u 2,5 % kitozanski gel odrazilo se u promjenama teksturnih svojstava izvornog gela: čvrstoći, kohezivnosti i adhezivnosti
- propilenglikol liposomi s azitromicin dihidratom imali su najmanji učinak na promjene svih teksturnih svojstava izvornog gela, dok su u slučaju uklopljenog diltiazemklorida konvencionalni liposomi pokazali povoljniji učinak
- pokazano je da (fosfo)lipidni sastav liposoma, prisustvo suotapala i lipofilnost uklopljene djelatne tvari različito doprinose mehaničkim svojstvima liposomskih hidrogelova:
  - a) čvrstoći (nanošenje pripravaka na kožu ili sluznicu),
  - b) kohezivnosti (istiskivanje formulacije iz spremnika (tube) i
  - c) adhezivnosti (zadržavanje formulacije na mjestu primjene).

## 6. LITERATURA

Ahmadi F, Oveisi Z, Mohammadi Samani S, Amoozgar Z. Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. *Res Pharm Sci*, 2015, 10, 1–16.

Ahmed EM. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res*, 2015, 6, 105–121.

Ali SM, Yosipovitch G. Skin pH: From Basic Science to Basic Skin Care. *Acta Derm Venereol*, 2013, 93, 261-267.

Azitromicin: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00207>, pristupljeno: 26.07.2018.

Azitromicin; sažetak opisa svojstava lijeka: <http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-14-02-343.pdf>, pristupljeno: 15.06.2018.

Baćirević-Laćan M, Jug M, Vanić Ž. Oblikovanje lijekova praktikum. Zagreb Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2015, str. 62.

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

Beaty JS, Shashidharan M. Anal Fissure. *Clin Colon Rectal Surg*, 2016, 29, 30–37.

Bikram M, West J. Thermo-responsive systems for controlled drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 2008, 5, 1077-1091.

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

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

Cheung RCF, Ng TB, Wong JH, Chan WY. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Mar Drugs*, 2015, 13, 5156–5186.

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

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.

de Leeuw J, de Vijlder HC, Bjerring P, Neumann HAM. Liposomes in dermatology today. *J Eur Acad Dermatol*, 2009, 23, 505-516.

Diltiazem: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00343>, pristupljeno 26.07.2018.

Diltiazemklorid; sažetak opisa svojstava lijeka: <http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-14-02-08.pdf>, pristupljeno: 15.06.2018.

Dinos GP, Michelinaki M, Kalpaxis DL. Insights into the Mechanism of Azithromycin Interaction with an *Escherichia coli* Functional Ribosomal Complex. *Mol Pharmacol* 2001, 59, 1441-1445.

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

Elliott WJ, Ram CVS. Calcium Channel Blockers, *J Clin Hypertens*, 2013, 13, 687-689.

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

Elsayed MM, Abdallah OY, Naggar VF, Khalafallah NM. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. *Int J Pharm*, 2007a, 332, 1–16.

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

Elsner P. Anatomical and Physiological Basis of Topical Therapy of the Mucosa. *Curr Probl Dermatol*, 2011, 40, 1–8.

European Pharmacopoeia 8.0. Strasbourg, Council of Europe, 2014, str.1610, 2062.

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

Felt O, Buri P, Gurny R. Chitosan: A Unique Polysaccharide for Drug Delivery, *Drug Dev Ind Pharm*, 1998, 24, 979-993.

Fisura: <https://www.health.harvard.edu/bladder-and-bowel/anal-disorders>, pristupljeno: 27.07.2018.

Građa kože: <https://www.dreamstime.com/royalty-free-stock-image-layers-human-skin-melanocyte-melanin-epidermis-melanocytes-produce-pigment-which-can-then-transfer-to-other-image37423406>, pristupljeno: 27.07.2018.

Grillet AM, Wyatt NB, Gloe LM. Polymer Gel Rheology and Adhesion. Rheology, De Vicente J, urednik, Rijeka, InTech, 2012, str. 59-80.

Highton AJ, Girardin A, Bell GM, Hook S, Kemp RA. Chitosan gel vaccine protects against tumour growth in an intracaecal mouse model of cancer by modulating systemic immune responses. *BMC Immunol*, 2016, 17, 39.

Highton AJ, Kojarunchitt T, Girardin A, Hook S, Kemp RA. Chitosan hydrogel vaccine generates protective CD8 T cell memory against mouse melanoma. *Immunol Cell Biol*, 2015, 93, 634–640.

Hurler J, Engesland A, Poorahmary Kermany B, Škalko-Basnet N. Improved Texture Analysis for Hydrogel Characterization: Gel Cohesiveness, Adhesiveness, and Hardness. *Applied Polymer Science*, 2012, 125, 180-188.

Hurler J, Škalko-Basnet N. Potentials of Chitosan-Based Delivery Systems in WoundTherapy: Bioadhesion Study. *J Funct Biomater*, 2012, 3, 37-48.

Hussain A, Singh S, Sharma D, Webster TJ, Shafaat K, Faruk A. Elastic liposomes as novel carriers: recent advances in drug delivery. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12, 5087–5108.

Igarashi T, Nishino K, Nayar KS. The Appearance of Human Skin. New York, Columbia University, 2005, str. 11-21.

Indikacije za primjenu i ljekoviti oblici azitromicina: <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/>, pristupljeno: 15.06.2018.

Lijekovi na bazi hidrogela: <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/>, pristupljeno: 11.08.2018.

Lopac V. Leksikon fizike. Zagreb, Školska knjiga, 2009, str. 9, 118.

Mandić N, Vanić Ž, Filipović-Grčić J. Liposomi s kalceinom: odabir optimalne metode priprave. *Farm glas*, 2012, 68, 697-708.

Markotić A. Protuupalno djelovanje azitromicina u respiratornim infekcijama. *Medicus*, 2014, 23, 63-68.

Matsui T, Amagai M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *Int Immunol*, 2015, 27, 269-280.

Naik A, Nair H. Formulation and Evaluation of Thermosensitive Biogels for Nose to Brain Delivery of Doxepin. *Biomed Res Int*. 2014, 847547.

Nilsen-Nygaard J, Strand SP, Vårum KM, Draget KI, Nordgård CT. Chitosan: Gels and Interfacial Properties. *Polymers*, 2015, 7, 552-579.

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.

Ogiso T, Yamaguchi T, Iwaki M, Tanino T, Miyake Y. Effect of positively and negatively charged liposomes on skin permeation of drugs. *J Drug Target*, 2001, 9, 49–59.

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 Liposom Res*, 2014, 24, 313-322.

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.

Parnham MJ, Erakovic Haber V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Perletti G, Verleden GM, Vos R. Azithromycin: Mechanisms of action and their relevance for clinical applications. *Pharmacol Therapeut*, 2014, 143, 225–245.

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

Pepić I. *In vitro* ispitivanja oslobađanje diltiazemklorida iz liposomskih gelova. Diplomski rad, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2017, str. 12-13.

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

Rabea E, Badawy M, Stevens VC, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 2003, 4, 1457-1465.

Rajabi O, Layegh P, Hashemzadeh S, Khoddami M. Topical liposomal azithromycin in the treatment of acute cutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther*, 2016, 29, 358-363.

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

Retsema J, Girard A, Schelkly W, Manousos M, Anderson M, Bright G, Borovoy R, Brennan L, Mason R. Spectrum and mode of action of azithromycin (CP-62, 993), a new 15-

membered-ring macrolide with improved potency against gram-negative organisms. *Antimicrob Agents Chemother*, 1987, 31, 1939–1947.

Richmond JM, Harris JE. Immunology and Skin in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2014, 4, a015339.

Ručni mini-ekstruder: <http://www.avestin.com>, pristupljeno: 27.07.2018.

Samadikhah HR, Majidi A, Nikkhah M, Hosseinkhani S. Preparation, characterization, and efficient transfection of cationic liposomes and nanomagnetic cationic liposomes. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6, 2275–2283.

Schäfer-Korting M, Korting HC, Ponce-Poschl E. Liposomal tretinoin for uncomplicated acne vulgaris. *Clin Investig*, 1994, 72, 1086-1091.

Schlichtemeier S, Engel A, Clinical academic and Associate professor. Anal fissure. *Aust Prescr*, 2016, 39, 14–17.

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

Sluznica: <https://www.britannica.com/science/mucous-membrane>, pristupljeno: 13.08.2018.

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

Striessnig J, Ortner NJ, Pinggera A. Pharmacology of L-type Calcium channels: Novel Drugs for Old Targets? *Curr Mol Pharmacol*, 2015, 8, 110-22.

Šoljić Jerbić I. Primjena polimera u farmaceutskoj industriji. *Kemija u industriji*, 2017, 66, 505–518.

Van Bambeke F, Tulkens PM. Macrolides: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Int J Antimicrob Agents*, 2001, 18, 17-23.

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

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

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

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 Liposom Res*, 2014, 24, 27-36.

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

Wald A, Bharucha AE, Cosman BC, Whitehead WE. ACG clinical guideline: management of benign anorectal disorders. *Am J Gastroenterol*, 2014, 109, 1141-1157.

Zeta potencijal: <https://www.malvernpanalytical.com/en/>, pristupljeno: 15.07.2018.

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

Zheng LY, Zhu JF. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohyde Polym*, 2003, 54, 527–530.



## 7. SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je pripraviti kitozanski gel odgovarajućih fizikalnih svojstava koji bi bio prikladan za uklapanje liposoma s hidrofilnim i lipofilnim djelatnim tvarima (diltiazemklorid i azitromicin dihidrat) te provesti fizikalnu karakterizaciju liposomskih gelova. Pripravljene su kitozanski gelovi s različitim tipovima i udjelima kitozana te je provedena optimizacija postupka izrade gela. Liposomi s diltiazemkloridom i azitromicin dihidratom, različitog (fosfo)lipidnog sastava, pripremljeni su film metodom, proliposomskom i metodom razrjeđenja poliola. Provedena je homogenizacija liposomskih disperzija te fizikalna karakterizacija koja je uključivala mjerenje srednjeg promjera, indeksa polidisperznosti i zeta potencijala. Različiti tipovi liposoma s diltiazemkloridom i azitromicin dihidratom su umješavani u 2,5% kitozanski gel (optimalna formulacija gela) te je provedeno ispitivanje mehaničkih svojstava liposomskih gelova određivanjem teksturnih svojstava (čvrstoće, kohezivnosti i adhezivnosti). Pokazano je da (fosfo)lipidni sastav liposoma, prisustvo suotapala i lipofilnost uklopljene djelatne tvari značajno doprinose mehaničkim svojstvima liposomskih hidrogelova koja utječu na nanošenje pripravaka na kožu ili sluznicu (čvrstoća), istiskivanje formulacije iz spremnika (kohezivnost) i zadržavanje formulacije na mjestu primjene (adhezivnost).

## SUMMARY

The aim of this study was to develop optimal formulation of chitosan-based gel suitable for incorporation of liposomes with hydrophilic and lipophilic active ingredients (diltiazem chloride and azithromycin dihydrate), and to perform physical characterization of the optimized hydrogels. Hydrogels containing different types and weight ratio of chitosan and lactic acid were prepared, and the preparation method was optimized. Liposomes with diltiazem chloride and azithromycin dihydrate composed of the different (phospho)lipid components were prepared by film method, proliposome and polyol dilution method, respectively. Homogenization of liposome dispersions was performed by extrusion through polycarbonate membranes. All the liposomes were physically characterized by determining mean diameters, polydispersity indexes and zeta potentials. Different types of the liposomes were incorporated into 2,5% chitosan gel (optimal gel formulation) and the mechanical properties of the hydrogels were evaluated by determining the textural characteristics of the gels: hardness, cohesiveness and adhesiveness. It was shown that the (phospho)lipid composition, presence of surfactant and cosolvent as well as lipophilicity of the incorporated drug contribute to the mechanical properties of the liposomal hydrogels. These properties influence: application of the formulation to the skin or mucosa (hardness), removal of the formulation from container/tube (cohesiveness) as well as the retention of the formulation at the site of administration (adhesiveness).

# Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

## FIZIKALNA KARAKTERIZACIJA LIPOSOMSKIH HIDROGELOVA S DILTIAZEMKLORIDOM I AZITROMICIN DIHIDRATOM

Maja Milardović

### SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je pripremiti kitozanski gel odgovarajućih fizikalnih svojstava koji bi bio prikladan za uklapanje liposoma s hidrofilnim i lipofilnim djelatnim tvarima (diltiazemklorid i azitromicin dihidrat) te provesti fizikalnu karakterizaciju liposomskih gelova. Pripremljeni su kitozanski gelovi s različitim tipovima i udjelima kitozana te je provedena optimizacija postupka izrade gela. Liposomi s diltiazemkloridom i azitromicin dihidratom, različitog (fosfo)lipidnog sastava, pripremljeni su film metodom, proliposomskom i metodom razrjeđenja poliola. Provedena je homogenizacija liposomskih disperzija te fizikalna karakterizacija koja je uključivala mjerenje srednjeg promjera, indeksa polidisperznosti i zeta potencijala. Različiti tipovi liposoma s diltiazemkloridom i azitromicin dihidratom su umješavani u 2,5% kitozanski gel (optimalna formulacija gela) te je provedeno ispitivanje mehaničkih svojstava liposomskih gelova određivanjem teksturnih svojstava (čvrstoće, kohezivnosti i adhezivnosti). Pokazano je da (fosfo)lipidni sastav liposoma, prisustvo suotapala i lipofilnost uklopljene djelatne tvari značajno doprinose mehaničkim svojstvima liposomskih hidrogelova koja utječu na nanošenje pripravaka na kožu ili sluznicu (čvrstoća), istiskivanje formulacije iz spremnika (kohezivnost) i zadržavanje formulacije na mjestu primjene (adhezivnost).

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

Rad sadrži: 46 stranica, 16 grafičkih prikaza, 3 tablice i 76 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: liposomi, diltiazemklorid, azitromicin dihidrat, kitozan, hidrogel, teksturna analiza

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

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

**Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, izvanredna profesorica, Sveučilišta u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.

**Dr. sc. Višnja Drinovac Vlah**, poslijedoktorandica, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet.

Rad prihvaćen: rujan 2018.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Technology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### *PHYSICAL CHARACTERIZATION OF LIPOSOMAL HYDROGELS WITH INCORPORATED DILTIAZEM CHLORIDE AND AZITHROMYCIN DIHYDRATE*

*Maja Milardović*

## SUMMARY

The aim of this study was to develop optimal formulation of chitosan-based gel suitable for incorporation of liposomes with hydrophilic and lipophilic active ingredients (diltiazem chloride and azithromycin dihydrate), and to perform physical characterization of the optimized hydrogels. Hydrogels containing different types and weight ratio of chitosan and lactic acid were prepared, and the preparation method was optimized. Liposomes with diltiazem chloride and azithromycin dihydrate composed of the different (phospho)lipid components were prepared by film method, proliposome and polyol dilution method, respectively. Homogenization of liposome dispersions was performed by extrusion through polycarbonate membranes. All the liposomes were physically characterized by determining mean diameters, polydispersity indexes and zeta potentials. Different types of the liposomes were incorporated into 2,5% chitosan gel (optimal gel formulation) and the mechanical properties of the hydrogels were evaluated by determining the textural characteristics of the gels: hardness, cohesiveness and adhesiveness. It was shown that the (phospho)lipid composition, presence of surfactant and cosolvent as well as lipophilicity of the incorporated drug contribute to the mechanical properties of the liposomal hydrogels. These properties influence: application of the formulation to the skin or mucosa (hardness), removal of the formulation from container/tube (cohesiveness) as well as the retention of the formulation at the site of administration (adhesiveness).

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

Thesis includes: 46 pages, 16 figures, 3 tables and 76 references. Original is in Croatian language.

Keywords: liposomes, diltiazem chloride, azithromycin dihydrate, chitosan, hydrogel, textural analysis

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

Reviewers: **Željka Vanić, Ph.D.**, Associate Professor, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.**, Associate Professor, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Višnja Drinovac Vlah, Ph.D.**, Postdoctoral researcher, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2018.