

In vitro ispitivanje oslobađanja azitromicina iz kationskih liposoma uklopljenih u kitozanski gel

Mihaljević, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:163:170145>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

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



Nikolina Mihaljević

***In vitro* ispitivanje oslobađanja azitromicina iz
kationskih liposoma uklopljenih u kitozanski gel**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

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.

Zahvala:

Srdačno se zahvaljujem izv. prof. sc. Željki Vanić i asistentici Zori Rukavina, mag. pharm. na susretljivosti, strpljenju i stručnom vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.

Posebno se želim zahvaliti svojoj obitelji zbog ljubavi, velike podrške i razumijevanja tijekom cijelog studiranja.

Hvala svim prijateljima koji su svojim prisutstvom uljepšali vrijeme provedeno na fakultetu.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. HIDROGELOVI.....	1
1.1.2. Kitozan: strukturna svojstva i primjena	2
1.1.3. Antimikrobni učinak kitozana.....	3
1.2. LIPOSOMI	4
1.2.1. Struktura i svojstva liposoma	5
1.2.2. Klasifikacija liposoma.....	6
1.2.3. Konvencionalni liposomi	7
1.2.4. Kationski liposomi	8
1.3. PRIPREMA LIPOSOMA.....	10
1.3.1. Metoda hidratacije suhog fosfolipidnog sloja.....	10
1.3.2. Soniciranje	11
1.3.3. Ekstruzija	11
1.4. FIZIKALNA KARAKTERIZACIJA LIPOSOMA.....	12
1.4.1. Zeta potencijal.....	13
1.5. LIPOSOMI U KITOZANSKOM GELU ZA TOPIKALNU PRIMJENU.....	13
1.6. <i>IN VITRO</i> ISPITIVANJA OSLOBAĐANJA LIJEKA PRIMJENOM FRANZ-DIFUZIJSKE ČELIJE	15
1.7. AZITROMICIN.....	16
2. OBRAZLOŽENJE TEME	19
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1. MATERIJALI.....	21
3.2. METODE.....	22
3.2.1. Priprava kitozanskog hidrogela.....	22
3.2.2. Priprava liposoma	22
3.2.3. Određivanje veličine liposoma i indeksa polidisperznosti.....	24

3.2.4. Određivanje zeta potencijala	24
3.2.5. Odjeljivanje liposomske frakcije lijeka od neuklopljene frakcije.....	25
3.2.6. Priprava kitozanskog gela s liposomima.....	25
3.2.7. <i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja azitromicina iz liposoma uklopljenih u kitozanski hidrogel	25
3.2.8. Određivanje sadržaja azitromicina oslobođenog iz liposoma tijekom <i>in vitro</i> ispitivanja.....	26
3.2.9. Izrada kalibracijskog pravca	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. FIZIKALNA KARAKTERIZACIJA LIPOSOMA.....	28
4.1.1. Srednji promjer liposoma i indeks polidisperznosti.....	28
4.1.2. Zeta potencijal liposoma	29
4.2. <i>IN VITRO</i> ISPITIVANJE OSLOBAĐANJA AZITROMICINA IZ LIPOSOMA UKLOPLJENIH U KITOZANSKI HIDROGEL	30
5. ZAKLJUČCI.....	37
6. LITERATURA:.....	38
7. SAŽETAK.....	41
8. SUMMARY	42

1. UVOD

1.1. HIDROGELOVI

Hidrogelovi su polukruti farmaceutsko-tehnološki oblici nastali bubrenjem hidrofilnih polimera u vodi (npr. derivati celuloze) ili bubrenjem i umrežavanjem hidrofilnih polimera u vodi (npr. derivati poliakrilne kiseline, alginati, kitozan i dr.). Jedno od najvažnijih svojstva polimera koji tvore hidrogelove je bubrenje. Ono je posljedica prisustva hidrofilnih funkcionalnih grupa u polimernoj strukturi: amino ($-NH_2$), amidne ($-CONH-$, $-CONH_2$), hidroksilne ($-OH$) i sulfatne skupine ($-SO_3H$), koje omogućuju apsorpciju vode i vodenih otopina što rezultira širenjem polimernih lanaca u gelu i zauzimanjem većeg volumena (Ahmadi i sur., 2015). Hidrogelovi mogu mijenjati svoj volumen pod utjecajem fizičkih i kemijskih čimbenika kao što je ionska jakost otopine, sastav otapala i pH (Ahmed, 2015).

Kod neionskih polimera do bubrenja dolazi zbog interakcije polimernih lanaca s otapalom, dok se kod ionskih polimera proces odvija ponajviše zbog snažnih osmotskih i elektrostatskih sila. Naime, zbog prisustva iona u molekulama hidrofilnih polimera i njihovog odsustva u otapalu, dolazi do difuzije vode u polimernu strukturu te se uspostavlja ravnoteža s otapalom. Polimerni ionski lanci mogu biti pozitivno ili negativno nabijeni. U oba slučaja, zbog istovrsnog naboja unutar polimerne strukture, dolazi do međusobnog odbijanja lanaca u vodenom mediju čime se povećava apsorpcija vode u gel (Sinko, 2011).

Hidrogelovi se mogu klasificirati prema izvoru polimernog materijala, polimernom sastavu, konfiguraciji, načinu umrežavanja polimernih lanaca (uspostavljenim vezama) i ukupnom naboju na polimernim lancima (Ahmed, 2015).

Prema izvoru polimernog materijala razlikujemo prirodne i sintetske hidrogelove. Polimerni lanci u prirodnim hidrogelovima mogu biti polisaharidi kao što su alginat, celuloza, hitin, kitozan, dekstran, hijaluronska kiselina, pektin i ksantanska guma te proteini kao što su želatina, keratin i kolagen. Sintetski polimeri koji se koriste za pripremu hidrogelova su poli(vinil klorid), poliakrilamid, (poli)etilenglikol i drugi (Ahmadi i sur., 2015).

Prirodni polimeri za razliku od sintetskih obično pokazuju bolju biorazgradljivost te podliježu enzimski-kontroliranoj biorazgradnji čime nastaju biokompatibilni međuprodukti. S druge

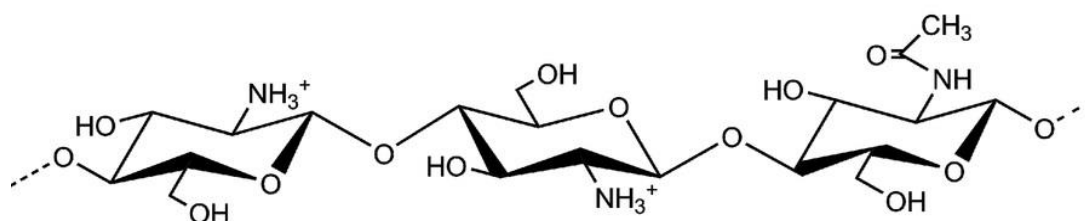
strane, sintetski polimeri su manje podložni hidrolizi i imaju sporiji stupanj razgradnje što im omogućuje produljeno zadržavanje u originalnom obliku (Ahmadi i sur., 2015).

Hitin je jedan on najrasprostanjenijih polisaharida u prirodi, odmah nakon celuloze. Jedinice glukozamina u hitinu vezane su beta-1,4 glikozidnom vezom s visokim stupnjem N-acetilacije. Trodimenzionalna konfiguracija u obliku alfa uzvojnice stabilizirana je vodikovim vezama. Strukturno je sličan celulozi; jedina razlika očituje se u tome što su hidroksilne skupine u molekuli celuloze, u molekulama hitina, zamijenjene s amino skupinama. Bijele je boje, čvrst i neelastičan, a u prirodi je sastavni dio egzoskeleta rakova i insekata gdje služi kao potporni materijal, ali ga se može pronaći i u nekim vrstama gljiva. Glavni industrijski izvori hitina su ljuske škampa, jastoga i rakova. Zbog netopljivosti u organskim otapalima primjena mu je ograničena (Jones, 2004).

1.1.2. Kitozan: strukturna svojstva i primjena

Glavni derivat hitina naziva se kitozan koji je zbog svojih pozitivnih bioloških svojstva kao što su netoksičnost, biokompatibilnost i biorazgradivost privukao veliku pozornost i počeo se istraživati za uporabu u medicini i farmaciji.

Danas se kitozan proizvodi alkalnom deacetilacijom hitina te se dobiva vodotopljivi linearni polisaharid koji se sastoji od 2-acetamid-2-deoksi-D-glukoze i 2-amino-2-deoksi-D-glukoze povezane beta-1,4 glikozidnom vezom (Slika 1). Međutim, gotovo nikada deacetilacija nije potpuna te se udio pojedinog monosaharida u molekuli kitozana može razlikovati. Zapravo, kitozan nije točno definiran spoj, već se pod tim pojmom označuje heterogena skupina polimera. Točna granica s obzirom na stupanj deacetilacije između hitina i kitozana nije definirana. Moguće su kemijske modifikacije kitozana zbog nabijenih amino skupina. Različite funkcionalne skupine mogu se kovalentno vezati na kitozanski skelet te na taj način utjecati na ograničenu topljivost u vodi (Nilsen-Nygaard i sur., 2015).



Slika 1. Strukturni prikaz kitozana (Nilsen-Nygaard i sur., 2015)

Fizikalno-kemijska svojstva kitozana kao što su čistoća, viskoznost, stupanj deacetilacije, molekulska masa i polimorfna struktura variraju ovisno o brojnim čimbenicima u procesu proizvodnje (Jalšenjak i sur., 1998). pKa amino skupina je približno 6,5 što znači da je kitozan pozitivno nabijen u kiselim i neutralnim otopinama. Uzrok pH-ovisne topljivosti leži u njegovim amino skupinama ($-NH_2$) koje u kiselom mediju postaju pozitivno nabijene (NH_3^+) uzrokujući elektrostatsko odbijanje unutar molekule polimera, čime nastaje topljivi polikationski polisaharid. Kitozan je topljiv u organskim kiselinama kada je pH manji od 6, a netopljiv u vodi, alkalnom mediju ili u organskim otapalima. Međutim, netralizacijom s kiselinama kao što su klorovodična, octena, mliječna ili mravlja nastaju soli kitozana koje imaju bolju topljivost u vodi (Rabea i sur., 2003).

Zbog velike zastupljenosti amino skupina u polimernom lancu kitozan je dobar koagulans, flokulans i kelator metalnih iona. Posjeduje i neke terapijske učinke uključujući hemostatsko i antimikrobno djelovanje (Jalšenjak i sur., 1998).

1.1.3. Antimikrobni učinak kitozana

Kitozan pokazuje antimikrobnu aktivnost zbog čega je predmet rasprave brojnih znanstvenih radova te se zadnjih desetak godina intenzivno istražuje. Spektar antimikrobne aktivnosti uključuje gljivice, alge i bakterije, pri čemu je pokazao veći potencijal prema Gram pozitivnim bakterijama (Rabea i sur., 2003).

Točni mehanizmi antimikrobne aktivnosti kitozana nisu u potpunosti istraženi, međutim predloženo je više načina kako ostvaruje svoje djelovanje. Jedna od mogućnosti je da interakcijom pozitivnog naboja amino skupina s negativnim nabojem na površini bakterijske stanice povećava permeabilnost lipidne membrane bakterija. Esencijalne tvari i proteini izlaze iz stanice, što dovodi do smrti bakterije. Djelovanje je učinkovitije prema Gram pozitivnim bakterijama, zbog toga što nemaju lipopolisaharidnu ovojnicu. Osim toga, kitozan kao kelirajući agens može selektivno vezati metale u tragovima i tako utjecati na rast bakterija i proizvodnju toksina te vezanjem vode inhibirati aktivnost enzima u bakterijskoj stanici. Penetracijom u jezgru stanice i vezanjem na molekulu DNA može inhibirati sintezu mRNA i proteina (Rabea i sur., 2003).

Na antimikrobnu aktivnost kitozana utječu brojni unutarnji (intrinzički) i vanjski (ekstrinzički) parametri. Pod intrinzičke faktore ubrajaju se vrsta/tip kitozana, njegova

molekulska masa, stupanj deacetilacije, viskoznost i koncentracija kitozana u otopini, dok su ekstrinzički faktori povezani s utjecajem okoliša poput pH, temperature, ionske jakosti, prisutnosti metalnih iona i organskih tvari u otopini.

Provedena su brojna istraživanja o aktivnosti kitozana prema Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama te je uočena razlika u djelovanju s obzirom na njegovu molekulsku masu. Kod *Escherichiae coli*, Gram negativne bakterije, antimikrobna aktivnost raste smanjenjem molekulske mase kitozana. Smatra se da kitozan manje molekulske mase lakše ulazi u stanicu te svojim pozitivnim nabojem privlači tvari negativnog naboja važne za rast i razmnožavanje bakterija i dolazi do flokulacije. Posljedično se narušava fiziološka aktivnost i metabolizam bakterije te stanica umire. Na primjeru *Staphylococcus aureus*, Gram pozitivne bakterije, povećanjem molekulske mase kitozana antimikrobna aktivnost raste zbog nastajanja filma na površini bakterije čime je onemogućena apsorpcija hranjivih tvari (Zheng i Zhu, 2003).

Nadalje, kitozan s većim stupnjem deacetilacije pokazuje veću učinkovitost u inhibiciji rasta bakterija vjerojatno zbog većeg postotka protoniranih amino skupina u polimernom lancu. Međutim, utjecaj pH na antimikrobnu aktivnost je obrnuto proporcionalan; kitozan iskazuje aktivnost jedino u kiselom mediju zbog slabe topljivosti pri višem pH (Rabea i sur., 2003). S porastom koncentracije kitozana u otopini, povećava se i njegova antimikrobna aktivnost, međutim djelovanje prema Gram negativnim i Gram pozitivnim bakterijama se razlikuje. Istraživanja su pokazala da 0,1% otopina kitozana, molekulske mase 305 kDa, bolje inhibira rast Gram pozitivnih bakterija, dok je prema Gram negativnim bakterijama gotovo neučinkovita. Porastom koncentracije kitozana molekulske mase 305 kDa na 1% inhibira se rast i Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija (Zheng i Zhu, 2003).

1.2. LIPOSOMI

Liposomi su prvi put opisani sredinom šezdesetih godina, kada su istraživanja izoliranih i pročišćenih fosfolipida pokazala da oni u vodi spontano stvaraju strukture slične biološkim membranama. Danas je poznato da su liposomi sferične fosfolipidne tvorevine koje je sastoje od dvije faze. Unutarnja, vodena faza obavijena je jednom ili više koncentrično položenih fosfolipidnih membrana. Veličina im može varirati od nano- do mikro-metarskih dimenzija (Jalšenjak i sur., 1998).

Zbog strukturne sličnosti s biološkim membranama, biokompatibilnosti i biorazgradljivosti liposomi su gotovo netoksični ili niske toksičnosti (ovisno o lipidnom sastavu) i relativno sigurni kao terapijski sustavi u dostavi lijekova. Njihova struktura im omogućuje uklapanje molekula različitih fizikalno-kemijskih svojstva što im pruža široku primjenu u medicini i farmaciji kao nosača lijekova. Uklapanje u liposome može ukloniti ili smanjiti toksičnost biološki aktivnih tvari, omogućiti ciljanu dostavu lijeka (djelatne tvari) na željeno mjesto djelovanja, zaštititi lijek od razgradnje i utjecati na farmakokinetiku aktivne tvari (Alhariri i sur., 2013).

Navedena pozitivna svojstva im omogućuju primjenu kod infektivnih oboljenja, u dijagnostici, hormonskoj terapiji, onkologiji, stimulaciji imunološkog odgovora te genskoj terapiji.

1.2.1. Struktura i svojstva liposoma

Fosfolipidi čine osnovnu građevnu jedinicu liposoma. To su diesteri fosfatne kiseline, prva esterska veza ostvarena je s derivatom glicerola ili sfingozina, a druga može biti s kolinom, etanolaminom, serinom, inozitolom ili glicerolom. Fosfolipidi su u liposomskoj ovojnici složeni u obliku dvosloja, pri čemu je polarni dio molekule orijentiran prema vanjskoj odnosno unutrašnjoj vodenoj fazi, dok se hidrofilni dijelovi nalaze unutar dvosloja, okrenuti jedan prema drugome (Vanić, 2012a).

Liposomske ovojnice mogu sadržavati i kolesterol koji se ugrađuje između molekula fosfolipida te im na taj način smanjuje pokretljivost čime se povećava čvrstoća (rigidnost) dvosloja. Ovisno o temperaturi, fosfolipidne membrane mogu se nalaziti u čvrstoj (gel) fazi te fazi tekućih kristala (sol). Temperatura pri kojoj je odvija prijelaz iz jedne u drugu fazu naziva se temperatura faznog prijelaza (T_c) te je različita za pojedini fosfolipid jer ovisi o duljini i stupnju zasićenosti lanaca masnih kiselina u molekulama fosfolipida. Tako fosfolipidi s lancima veće duljine i višeg stupnja zasićenosti imaju temperaturu faznog prijelaza većih vrijednosti. Poznavanje T_c je od velikog značaja pri proizvodnji i istraživanju liposoma kao terapijskih sustava. Fluidnost ili rigidnost membrane utječe na svojstva liposoma kao što su permeabilnost, fuzija, agregacija, vezanje na proteine plazme jer ti parametri ujedno utječu i na stabilnost liposoma i njihovo ponašanje u biološkim fluidima. Na primjer, što je T_c niža,

fluidnost membrane je veća i ona je permeabilnija za uklopljeni sadržaj, čime je stabilnost liposoma smanjena (Vanić 2012a).

Dakle, odabirom fosfolipida može se utjecati na svojstva liposoma jer oni određuju čvrstoću ili fluidnost, s jedne strane, a s druge naboj na površini o čemu također ovisi stabilnost liposoma *in vivo*, ali i fizička stabilnost liposomskih pripravaka.

Zbog svojih strukturnih obilježja pogodni su za uklapanje različitih lijekova koji se ovisno o polarnosti raspoređuju unutar vodene ili lipidne faze ili između ovih dviju faza. Tako lipofilni lijekovi imaju veći afinitet uklapanja u fosfolipidni dvosloj, hidrofilni u unutarnju vodenu jezgru, a amfipatski između vodene i lipidne faze (Vanić, 2012a). Hidrofilni i lipofilni lijekovi ugrađuju se u liposome bez njihovog kemijskog vezanja ili prethodne modifikacije, te se postiže relativno veliki omjer lijek – lipidi (Jalešnjak i sur., 1998).

1.2.2. Klasifikacija liposoma

Za morfologiju liposoma uglavnom je odgovoran način njihove pripreme, a u manjoj mjeri i fosfolipidni sastav. Klasificiraju se prema veličini i broju fosfolipidnih slojeva te prema strukturnim svojstvima i načinu oslobađanja uklopljenog sadržaja.

S obzirom na veličinu i broj fosfolipidnih dvoslojeva liposome možemo podijeliti na:

- i) unilamelarne liposome (*unilamellar vesicles*, UV), promjera 20 - 100 nm
- ii) srednje-velike unilamelarne liposome (*medium sized unilamellar vesicles*, MUV), promjera većeg od 100 nm
- iii) velike unilamelarne liposome (*large unilamellar vesicles*, LUV) promjera 100 - 1000 nm
- iv) veoma velike unilamelarne liposome (*giant unilamellar vesicles*, GUV) promjera većeg od 1000 nm
- v) oligolamelarne liposome (*oligolamellar vesicles*, OLV)
- vi) multilamelarne liposome (*multilamellar vesicles*, MLV)
- vii) multivezikularne liposome (*multivesicular liposomes*, MVL)

Unilamelarni liposomi sadrže jedan koncentrični fosfolipidni dvosloj i razlikuju se veličinom (i-iii), dok oligolamelarne liposome karakterizira postojanje nekoliko fosfolipidnih dvoslojeva između kojih prostor ispunjava vodena faza. Za multilamelarne liposome je karakteristično da

sadrže velik broj koncentrično postavljenih dvoslojeva, dok volumen vodene faze unutar središnje ovojnice te između ovojnica može varirati. Multivezikularni liposomi sastoje su od mnogo manjih vezikula koje su naizmjenično razmještene unutar velikog liposoma (Vanić, 2012a).

Klasifikacijom prema strukturnim svojstvima i načinu oslobađanja uklopljenog sadržaja liposomi se dijele na:

- i) konvencionalne
- ii) sterički stabilizirane
- iii) imunoliposome
- iv) polimorfne liposome

Skupina polimorfni liposoma obuhvaća novije generacije liposoma koje su vrlo reaktivne prema okruženju i uključuje: pH-osjetljive, temperaturno-osjetljive i kationske liposome (Vanić, 2012a).

1.2.3. Konvencionalni liposomi

Liposomi čiji dvoslojevi fosfolipida imaju neutralan ili negativan naboj na površini te mogu sadržavati i kolesterol koji povećava rigidnost ovojnice, nazivamo konvencionalni liposomi. Osim strukturnih karakteristika, obilježava ih i nespecifična reaktivnost prema okruženju u kojem se nalaze. Nakon intravenske primjene imaju kratko vrijeme zadržavanja u cirkulaciji zbog velikog afiniteta za ulazak u stanice retikuloendotelnog sustava i makrofage. Stoga se primjenjuju u liječenju infektivnih oboljenja, vakcinaciji i dijagnostici infektivnih organa u kojima se nakupljaju (jetra, slezena). Mogu se primjenjivati i kao nosači lijekova u terapijskim sustavima za lokalnu primjenu na kožu i sluznice (Vanić, 2012a).

Konvencionalni liposomi se mogu razlikovati po svojim fizikalnim karakteristikama kao što su veličina, sastav lipida, naboj na površini vezikula, broj fosfolipidnih dvoslojeva te fluidnost (elastičnost) membrane. Najčešći lipid koji se koristi kod pripreme konvencionalnih liposoma je lecitin. To je zapravo smjesa fosfolipida, u kojoj je najviše zastupljen fosfatidilkolin. Lanci masnih kiselina mogu biti različitih duljina te različitog stupnja zasićenosti. Prirodni lecitin se dobiva ekstrakcijom i pročišćavanjem iz jaja ili soje. Karakteristično je da lecitin iz soje ima više nezasićenih veza od lecitina dobivenog iz žutanjka jaja (Vanić 2012a).

1.2.4. Kationski liposomi

Danas se kationski liposomi najčešće istražuju u genskoj terapiji kao neviralni vektori za prijenos DNA u stanicu jer su se pokazali sigurnijima od viralnih, iako imaju slabiju transfekcijsku efikasnost (Shim i sur., 2013).

Naime, zbog pozitivnog naboja na površini fosfolipidnih vezikula i negativno nabijenih fosfatnih skupina nukleinskih kiselina dolazi do interakcije pri čemu nastaju kompleksi lipid-DNA koje nazivamo lipopleksi. Takav kompleks može fuzijom s plazmatskom membranom ući u stanicu (Vanić 2012a). Kationski liposom, kao neviralni vektor za uspješnu transfekciju, treba osigurati da nukleinska kiselina stigne do ciljane stanice i određenog odjeljka (citoplazma ili jezgra) na substaničnoj razini. Efikasnost isporuke nukleinskih kiselina ovisi o tipu lipida, prisutnosti ko-lipida te njihovom udjelu i raspodjeli u liposomu. Iako imaju visok potencijal za isporuku lijeka *in vivo*, dostava na specifičnu metu još uvijek predstavlja izazov. Površina vezikule se može modificirati s malim molekulama i peptidima te na taj način poboljšati isporuka lijeka (Shim i sur., 2013). Pozitivno nabijeni lipid također štiti nukleinsku kiselinu u stanici od razgradnje. Kationski liposomi su biorazgradljivi jer se u organizmu mogu razgraditi na lipidne komponente pomoću endogenih enzima. Njihov nedostatak u genskoj terapiji je što prema nekim istraživanjima pokazuju vrlo visoku citotoksičnost te da bi se ona reducirala i na taj način poboljšala isporuka nukleinskih kiselina *in vivo*, lipopleksi se mogu obložiti netoksičnim i biorazgradivim polimerima (Shim i sur., 2013).

Osim u genskoj terapiji kationski liposomi mogu se koristiti i u dostavi peptida i proteina. Zbog svoje specifične strukture i svojstava imaju antimikrobni potencijal te uklapanjem antibiotika u takve liposome, sinergističkim djelovanjem može se pojačati njihova antimikrobna aktivnost i učinak na rezistentne mikroorganizme (Ribiero i Carrasco, 2013). Prema istraživanjima antimikrobne aktivnosti, kationski liposomi su potentniji nego neutralni i negativno nabijeni liposomi. Kod ispitivanja efikasnosti liposomskih preparacija s različitim površinskim nabojem s uklopljenim klaritomicinom prema *Pseudomonas aeruginosa*, sve su preparacije u usporedbi sa slobodnim lijekom imale poboljšanu minimalnu inhibitornu koncentraciju (*minimum inhibitory concentration*, MIC) i minimalnu baktericidnu koncentraciju (*minimum bactericidal concentration*, MBC). Međutim, kationski liposomi djelovali su na smanjenje faktora virulencije i bakterijske pokretljivosti. Poboljšana antimikrobna aktivnost kationskih liposoma može se objasniti interakcijom negativno nabijene bakterijske stanice i pozitivnog naboja na površini liposoma (Alhariri i sur., 2013).

Mogući mehanizam interakcije kationskih vezikula s bakterijskom stanicom sastoji se od nekoliko koraka (Ribiero i Carrasco, 2013):

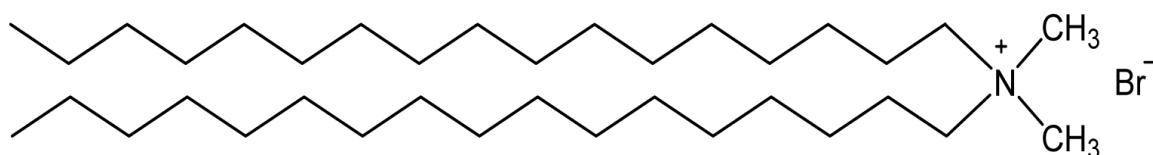
- i) adsorpcija i penetracija kationskog lipida na stanični zid,
- ii) reakcija sa staničnom membranom (lipidima ili proteinima negativnog naboja) pri čemu se narušava organizacija lipidnog dvosloja,
- iii) unutarstanične tvari male molekulske mase izlaze iz stanične membrane,
- iv) razgradnja nukleinskih kiselina i proteina u stanici,
- v) autolitički enzimi uzrokuju lizu stanice.

Što je kationski lipid hidrofobniji ima veći potencijal za ugradnju u staničnu membranu i tako u većoj mjeri narušava membranski lipidni dvosloj. Međutim, preveliko povećanje hidrofobnosti molekule može onemogućiti antimikrobnu aktivnost zbog ireverzibilne agregacije u vodi (Ribiero i Carrasco, 2013).

Općenito, pozitivni naboj na makromolekulama ili nanočesticama povećava efikasnost u prijenosu nukleinskih kiselina i isporuci lijeka. Glavni nedostatak takvih čestica je citotoksičnost. Stoga se provode daljnja istraživanja kako bi se razvio fiziološki prihvatljiv, biokompatibilni terapijski nanosustav.

Didecildimetilamonij bromid (DODAB) je sintetski kationski lipid te se često koristi u pripravi kationskih liposoma zbog visoke kemijske stabilnosti za koju je odgovorna njegova kemijska struktura. Zbog prisustva zasićenih lanaca ugljikovodika i stabilne kvarterne amonijeve polarne glave u strukturi ne podliježe kiseloj niti bazičnoj hidrolizi ili lipidnoj peroksidaciji. U vodenom okruženju spontano dolazi do nekovalentnog povezivanja i stvaranja vezikula odnosno dvosloja (Mamizuka i Carmona-Ribiero, 2007). Njegova kemijska struktura je prikazana na Slici 2.

DODAB ima baktericidno djelovanje zbog pozitivnog naboja. Adsorpcijom DODAB-a na površinu bakterijske membrane koja je negativno nabijena uzrokuje smrt stanice. Prednost kationskih liposoma nad konvencionalnim je relativno niska cijena u odnosu na sintetske, pročišćene lipide, stabilnost i antimikrobna aktivnost (Mamizuka i Carmona-Ribiero, 2007).



Slika 2. Didecildimetilamonij bromid (DODAB) (Carmona-Ribeiro i Carrasco, 2013)

1.3. PRIPREMA LIPOSOMA

Optimalna metoda priprave liposoma je ona koja rezultira liposomima visoke uspješnosti uklapanja lijeka, a izbjegava uporabu štetnih organskih otapala te da je cijeli postupak jednostavan i reproducibilan. Izborom odgovarajuće metode mogu se pripremiti liposomi različitih morfoloških karakteristika. Metode priprave liposoma uključuju tri ili četiri osnovne faze: (i) uklanjanje organskog otapala u kojem s fosfolipidi otopljeni, (ii) dispergiranje fosfolipida u vodenom mediju, (iii) homogenizaciju nastale liposomske suspenzije i (iv) analizu konačnog produkta. Kod svih postupka priprave liposoma vrijedi pravilo da se lipofilni lijekovi dodaju zajedno sa fosfolipidima otopljenima u organskom otapalu, dok se hidrofilni dodaju otopljeni u vodenoj fazi (Vanić, 2012b).

U ovom eksperimentu liposomi su pripremljeni postupkom fizičkog dispergiranja fosfolipida metodom hidratacije suhog fosfolipidnog sloja.

1.3.1. Metoda hidratacije suhog fosfolipidnog sloja

Metoda hidratacije suhog fosfolipidnog sloja, tzv. film metoda najčešći je postupak priprave liposoma u laboratorijskim uvjetima. U literaturi se navodi i kao metoda priprave ručnim protresivanjem jer se temelji na pripremi tankog fosfolipidnog sloja te dodatku vodenog medija uz ručno protresivanje. Postupak se provodi u okruglim tikvicama većeg volumena da bi nakon otparavanja organskog otapala na stijenkama tikvice nastao suhi fosfolipidni film velike površine. Dodatkom vodenog medija dolazi do hidratacije fosfolipida i spontanog formiranja liposoma. Nastali multilamelarni liposomi film metodom su prilično veliki i visokog indeksa polidisperznosti. Potrebno ih je homogenizirati soniciranjem u ultrazvučnoj kupelji/sondi ili ekstruzijom kroz polikarbonatne membrane određene veličine pora pri čemu se dobivaju homogene preparacije oligolamelarnih ili unilamelarnih liposoma (Vanić 2012b).

1.3.2. Soniciranje

Soniciranje je uobičajena metoda koja se koristi za pripravu malih unilamelarnih vezikula iz suspenzije velikih unilamelarnih i oligolamelarnih vezikula.

Postupak se može provoditi u ultrazvučnim kupeljima ili upotrebom ultrazvučne sonde ovisno o lipidnoj koncentraciji i Tc lipida. Ukoliko se radi o pripravcima multilamelarnih vezikula visokih koncentracija fosfolipida prihvatljivija je uporaba ultrazvučnih sonda. Međutim, zbog visoke energije u sustavu može doći do pregrijavanja liposomskih suspenzija te posljedično razgradnje fosfolipida. Osim toga, tijekom soniciranja postoji mogućnost otpuštanja čestica titana iz sonde u pripravak zbog čega je potrebno naknadno centrifugiranje liposomskih suspenzija ukloniti zaostale čestice titana iz pripravka.

S druge strane, upotrebom ultrazvučnih kupelji kod preparacija MLV-a s nižom koncentracijom lipida zbog mogućnosti termostatiranja nema rizika za pregrijavanje liposomskih preparacija te ne postoji mogućnost otpuštanja čestica titana u pripravak. Nedostatak soniciranja s ultrazvučnom kupelji je što se rijetko kada mogu dobiti homogene preparacije zbog manje snage ultrazvučnih valova u usporedbi sa sustavima koji koriste sondu (Vanić 2012a).

1.3.3. Ekstruzija

Pojam „ekstruzija liposoma“ je postao sinonim za proces u kojemu se disperzije multilamelarnih liposoma protiskuju kroz filtere definiranih veličina pora u cilju dobivanja homogene disperzije liposoma u kojoj je veličina vezikula približno jednaka veličini pora membrane.

Pod utjecajem tlaka, koncentrični dvoslojevi multilamelarnih vezikula se deformiraju te prolaskom kroz filter dolazi do pucanja i ponovnog spajanja membrane. Prije protiskivanja kroz konačnu, željenu veličinu pora, suspenzija multilamelarnih liposoma se protiskuje (ekstrudira) kroz filter većeg promjera pora (Hope i sur., 1994). Na taj način se olakšava postupak homogenizacije, sprječava oštećenje filtera i gubitak lipida (www.avantilipids.com). Da bi se dobila homogena liposomska preparacija čija je veličina vezikula slična porama na filtru potrebno je ciklički ponavljati proces protiskivanja kroz pore.

Što su pore na filtru manjeg promjera liposomska suspenzija će biti homogenija (Hope i sur., 1994).

Ekstruzija liposoma je jedna od najčešće korištenih metoda za dobivanje liposoma željene veličine zbog toga što može biti primijenjena na različitim vrstama liposoma. Proces je brz i može se provoditi na sobnoj ili povišenoj temperaturi (termostatiranjem uređaja) čime je prikladan i za lipide veće T_c. Nadalje, u procesu se ne koriste organska otapala i detergensi; stoga nema opasnosti od onečišćenja preparacije štetnim tvarima (Hope i sur., 1994).

1.4. FIZIKALNA KARAKTERIZACIJA LIPOSOMA

Fizikalna karakterizacija liposoma uključuje mjerenje veličine čestica, indeksa polidisperznosti i zeta potencijala. Provođi se zbog određivanja stabilnosti liposomskih pripravaka tijekom čuvanja (uskladištenja) pripravka i za predviđanje ponašanja liposoma u *in vivo* uvjetima (Alhariri i sur., 2013).

Mjerenjem veličine liposoma (srednjeg promjera) i indeksa polidisperznosti dobivaju se podatci o homogenosti liposomske preparacije. Praćenjem promjena tih parametara može se predvidjeti dugoročna stabilnost pripravka. Fizička nestabilnost očituje se povećanjem veličine liposoma kao i omjera lipid : uklopljeni lijek (uspješnost uklapanja) zbog fuzije i agregacije dvoslojeva liposoma ili raspada uklopljene tvari. Čuvanjem na nižim temperaturama poboljšava se stabilnost pripravka. Osim stabilnosti, veličina čestica utječe i na distribuciju liposoma u organizmu. *In vivo* istraživanja liposomskih preparacija s različitim promjerom vezikula, 360, 230 i 120 nm, pokazala su da se liposomi s promjerom od 120 nm sporije eliminiraju iz cirkulacije u usporedbi s liposomima većeg srednjeg promjera (Alhariri i sur., 2013).

Najčešće korištene metode u mjerenju veličine čestica su fotonska korelacijska spektroskopija (*photon correlation spectroscopy*, PCS) i elektronska mikroskopija. PCS tehnika mjeri vremenski ovisnu fluktuaciju u intenzitetu raspršene svjetlosti koja se pojavljuje zbog toga što čestice podliježu Brownovom gibanju. Analizom intenziteta fluktuacije omogućuje određivanje koeficijenta te konačno veličina čestice (www.malvern.com). Nedostatak takve metode je što ne daje uvid u morfologiju liposoma te ukoliko dođe do agregacije vezikula, instrument može signalizirati pogreške u mjerenju. Elektronska mikroskopija za razliku od

PCS-a daje uvid u morfologiju liposoma pa se može vidjeti oblik, lamelarnost i odrediti veličina pojedine vezikule (Alhariri i sur., 2013).

1.4.1. Zeta potencijal

Površina čestica disperzne faze može biti električki nabijena zbog adsorpcije iona iz otopine ili disocijacije površinskih skupina. Uz nabijenu površinu čestice dolazi do nakupljanja iona suprotnog naboja iz otopine (disperznog sredstva), s tim da se udaljavajući od površine čestice, broj pozitivnih i negativnih iona izjednačava te se oko čestice formira dvostruki električni sloj. Prvi sloj čini naboj na površini same čestice, a neposredno uz njih nalazi se drugi sloj suprotno nabijenih iona koji čine Sternov sloj, a čija je debljina reda veličine iona. Treći sloj je Gouy-Chapmanov sloj (difuzijski dio dvostrukog sloja). Potencijal na površini čestice je maksimalan, a potom naglo opada u Sternovom sloju, dok je u Gouy-Chapmanovom sloju pad eksponencijalan. U električnom polju dispergirane nabijene čestice putuju prema elektrodi suprotnog predznaka. Zajedno s česticom giba se i Sternov sloj te dio molekula otapala koji je od ostalog medija odvojen tzv. plohom smicanja. Potencijal na udaljenosti plohe smicanja naziva se elektrokinetički zeta potencijal (Jalešnjak i sur., 1998).

Čestice s velikim pozitivnim ili negativnim vrijednostima zeta potencijala teže međusobnom odbijanju, dok kod čestica s niskim vrijednostima zeta potencijala ne postoji sila koja bi spriječila njihovu agregaciju i flokulaciju. Stoga, kao granica između nestabilnih i stabilnih sustava je uzeto, +30 mV ili -30 mV. Čestice s zeta potencijalom pozitivnijim od +30 mV ili negativnijim od -30 mV se smatraju stabilnima (www.malvern.com).

1.5. LIPOSOMI U KITOZANSKOM GELU ZA TOPIKALNU PRIMJENU

U liječenju lokalnih kožnih infekcija topikalna antimikrobna terapija ima prednost nad oralnim liječenjem zbog toga što omogućuje primjenu nižih doza s višom koncentracijom na mjestu primjene lijeka te se posljedično smanjuje rizik od nuspojava i rezistencije ostvarene mikrobiomom u crijevima (Hurler i sur., 2012). Međutim, ostvarene koncentracije lijeka na mjestu djelovanja primjenom klasičnih ljekovitih oblika za lokalnu primjenu često su preniske zbog nedovoljne penetracije lijeka u kožu (na mjesto djelovanja), uslijed čega se terapija prolongira i nerijetko dovodi do razvoja bakterijske rezistencije. Formulacije za topikalnu primjenu trebaju biti netoksične i ne smiju iritirati kožu. Naime, iritacije kože česta su

nuspojava konvencionalnih pripravaka uslijed visokih koncentracija lijeka u ljekovitom obliku da bi se ostvario koncentracijski gradijent neophodan za difuziju lijeka u kožu. Zbog toga se zadnjih desetljeća istražuju novi pristupi i razvijaju inovativni terapijski sustavi za topikalnu primjenu lijekova kojima bi se nadvladali nedostaci postojećih klasičnih sustava (Hurler i sur., 2013).

Važno svojstvo u dizajniranju novog terapijskog sustava za lokalnu dostavu antimikrobnog lijeka u liječenju lokalnih infekcija je bioadhezivnost. Ono određuje vrijeme zadržavanja na mjestu primjene i farmakološki odgovor. Kitozanski hidrogelovi pokazuju svojstvo bioadhezivnosti zbog prisutnosti pozitivno nabijenih amino skupina u strukturi koje stvaraju elektrostatske veze s negativnim nabojem na površini kože (Hurler i sur., 2012). Osim toga, kitozan zbog intrinzičnih antimikrobnih svojstva u kombinaciji s mogućnošću dostave uklopljenog antimikrobnog lijeka pokazuje veliki potencijal u liječenju lokalnih infekcija (Hurler i sur., 2012). Polimerni hidrogelovi mogu apsorbirati tkivni ekstrudat, prevenirati dehidrataciju, ali i omogućiti izmjenu plinova kod kožnih oboljenja zbog svoje porozne strukture. Također, utječu na reepitelizaciju epidermisa i depoziciju kolagena u tkivo (Pachuaui, 2015).

Iako hidrogelovi imaju dobra svojstva kao terapijski sustavi u liječenju lokalnih kožnih infekcija, njihova je primjena ograničena za dostavu velikog broja lijekova zbog nedostatne topljivosti lijeka u gelu i slabe kontrole oslobađanja uklopljenog lijeka iz takvog sustava. Korištenjem liposoma kao nosača lijeka, može se poboljšati topljivost lipofilnih lijekova i omogućiti kontrolirano oslobađanje uklopljenog lijeka (Hurler i sur., 2011). Liposomi zbog svoje fosfolipidne strukture mogu uklapati lipofilne i hidrofilne lijekove i tako povećati topljivost i bioraspoloživost lijeka (Pachuaui, 2015). Optimalna veličina liposoma za topikalnu primjenu na kožu smatra se da je oko 200 - 300 nm (Hurler i sur., 2012; Palac i sur., 2014).

Primijenjeni u izvornom, tekućem obliku (suspenzija), liposomi su neprikladni za primjenu na kožu zbog kratkog vremena zadržavanja na mjestu primjene. Stoga ih je bolje koristiti uklopljene u odgovarajućem vehikulumu (podlozi). Podloga mora biti kompatibilna s liposomima. Ona značajno utječe i na profil oslobađanja uklopljene djelatne/aktivne tvari iz liposoma što se reflektira na promjenu bioraspoloživosti i posljedično terapijski učinak samog lijeka (djelatne/aktivne tvari) (Hurler i sur., 2012).

Uklapanjem koloidnih sustava (nosača lijekova) u polučvrste oblike kao što su hidrogelovi predstavlja izazov u topikalnoj terapiji. Mobilnost liposomskih vezikula i njihov potencijal dostave lijeka na/u kožu ovisi o samoj interakciji s podlogom. Pretpostavka je da liposomi povećavaju makroviskoznošću te mijenjaju reološka i strukturna svojstva hidrogela. Stoga je teško predvidjeti oslobađanje lijeka iz takvog sustava (Hurler i sur., 2012). Istraživanja su pokazala da pozitivan naboj liposomskih vezikula s uklopljenim lijekom u gelu pokazuje najveću stabilnost zbog interakcija s negativnim nabojem na površini kože (Vanić i Škalco-Basnet, 2013).

U konačnosti, ishod topikalne terapije ne ovisi samo o potentnosti i postignutoj koncentraciji lijeka na oboljelom području već i o svojstvima aplicirane formulacije, reološkim i teksturnim svojstvima, bioadhezivnosti i profilu oslobađanja lijeka (Hurler i sur., 2012).

1.6. IN VITRO ISPITIVANJA OSLOBAĐANJA LIJEKA PRIMJENOM FRANZ-DIFUZIJSKE ČELIJE

Ispitivanje oslobađanja lijeka iz njegovog dozirnog oblika jedno je od ključnih ispitivanja tijekom razvoja gotovog lijeka. *In vitro* metode su se pokazale vrlo pouzdane za ispitivanja oslobađanja lijeka iz polučvrstih ljekovitih oblika. Udio oslobođenog lijeka u *in vitro* uvjetima posljedica je fizičko-kemijskih karakteristika samog lijeka (djelatne tvari), njegove topljivosti, pKa vrijednosti, veličine čestica aktivne tvari, ali i fizičko-kemijskih svojstva dozirnog oblika (podloge kad je riječ o polučvrstim oblicima). Najčešće se *in vitro* ispitivanja oslobađanja djelatne tvari provode primjenom Franz-difuzijske ćelije (www.particlescience.com).

Franz-difuzijska ćelija sastoji se od donorskog i receptorskog odijeljka između kojih se nalazi membrana (sintetskog podrijetla, definiranog sastava i veličine pora). Najčešće se koriste polisulfonske i celuloza-acetatne/nitratne mebrane s porama veličine 45 µm zbog inertnosti i komercijalne dostupnosti. Ispitivani uzorak se nanosi na membranu kroz donorski odjeljak. On može biti u obliku otopine, suspenzije, kreme, gela, losiona, paste, pudera ili adhezivnog flastera. Malim promjenama u ispitivanoj formulaciji poput koncentracije i dodatka promotora permeabilnosti mogu se dobiti nove informacije o svojstvima i ponašanju tvari (www.particlescience.com).

Za ispitivanja permeabilnosti u/kroz kožu umjesto membrane, u Franz-difuzijskoj ćeliji se postavlja uzorak kože animalnog ili humanog podrijetla te sintetske, polimerne membrane

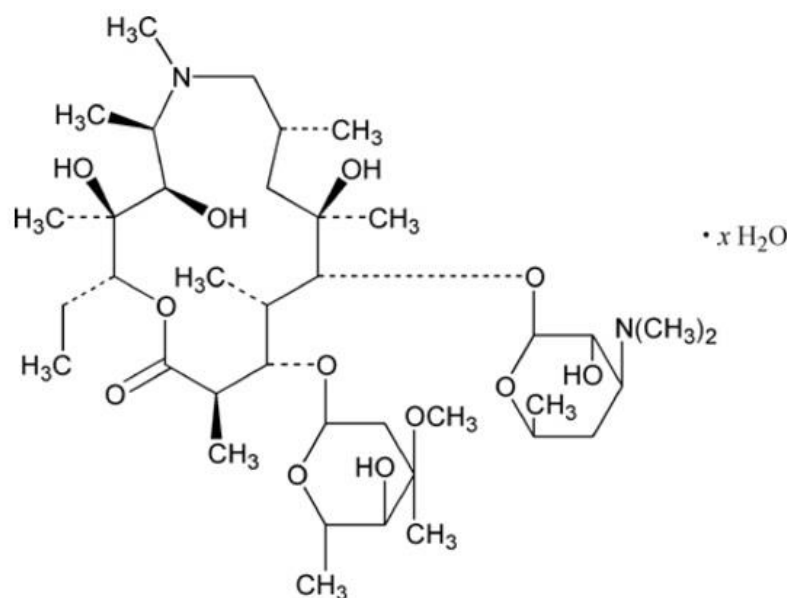
koje svojim sastavom imitiraju sastav i propusnost humane kože. Od animalnih izvora koristi se koža malih (miš, štakor, kunić, zmija) i velikih životinja (svinja, majmun), pri čemu se najprikladnijom pokazala koža svinje (vanjska strana uha). Humana koža je najprikladnija, no postoje velike varijabilnosti u rezultatima ovisno o dijelu tijela s kojeg se uzima, dobi, patološkim čimbenicima itd. (Flaten i sur., 2015).

Izbor receptorskog medija ovisi o prirodi ispitivane tvari (www.permeagear.com). Potrebno je poznavati topljivost ispitivanog uzorka (lijeka/djelatne tvari) da bi se eksperiment mogao ispravno provesti. Naime, u receptorskom mediju potrebno je imati uvjete osigurane topljivosti, koji vrijede do trenutka kada koncentracija supstancija nije veća od 10 - 15% topljivosti supstancije. U *in vitro* ispitivanjima uvjeti za osiguranu topljivost relativno se lako mogu postići podešavanjem medija (Jalešnjak i sur., 1998). Ukoliko se radi o hidrofilnim tvarima koje ioniziraju kao receptorski medij se najčešće koristi vodena otopina fosfatnog pufera (PBS, pH = 7,4). Kod lipofilnih uzoraka u receptorski medij je potrebno dodati organska otapala (etanol), kako bi se poboljšala njihova topljivost i ostvarili uvjeti osigurane topljivosti (www.permeagear.com).

Ovisno o potrebama ispitivanja, uzorkovanje se može razlikovati prema frekvenciji, vremenskom intervalu i volumenu uzorka. Kako bi se dobili pouzdani rezultati, volumeni alikvota uzeti za analizu i vremenski razmak između pojedinačnih uzorkovanja trebaju biti jednaki te je najbolje eksperiment ponoviti nekoliko puta. Tijekom cijelog eksperimenta volumen receptorskog medija je konstantan te se poznavajući koncentraciju ispitivane tvari u alikvotu može izračunati ukupna koncentracija oslobođene tvari u vremenu uzimanja uzorka (www.particlescience.com).

1.7. AZITROMICIN

Azitromicin (Slika 3) je antibiotik iz skupine makrolida koju karakterizira makrociklički laktonski prsten na koji su vezani deoksi šećeri. Dobiven je iz eritromicina ugradnjom metiliranog dušika u njegov 14-eročlani laktonski prsten, na poziciji 9a, čime nastaje 15-eročlani prsten (Katzung i sur., 2011). Njegov kemijski naziv je 9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A. Molekulska masa azitromicina je 749,0, a logP iznosi 4,02. Azitromicin je bijeli, amorfni prašak gorka okusa i bez mirisa. Temperatura tališta je između 113 – 115 °C. Vrlo dobro je topljiv u metanolu i kloroformu, dok je u vodi slabo topljiv (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>; Zorc i Butula, 1995).



Slika 3. Azitromicin (www.pharmacopeia.cn)

Antimikrobna aktivnost azitromicina temelji se na inhibiciji sinteze proteina vezanjem na 50S podjedinicu ribosoma čime je blokirana translokacija aminoacila i onemogućeno nastajanje početnog kompleksa (Katzung i sur., 2011).

Azitromicin je indiciran za liječenje infekcija gornjih dišnih sustava (faringitis, sinusitis), donjih dišnih puteva (akutna egzacerbacija kroničnog bronhitisa, izvanbolnički stečena pneumonija), *otitis media*, infekcije kože i potkožnog tkiva (umjereni oblik *acne vulgaris*, *erythema migrans*, erizipel, impetigo, piodermija), nekomplicirani uretritis/cervicitis uzrokovan s bakterijom *Chlamydia trachomatis*, infekcije želuca i dvanaesnika uzrokovane s *Helicobacter pylori* (Francetić i sur., 2015; www.halmed.com).

Zbog specifične farmakokinetike azitromicin se razlikuje od ostalih antimikrobnih lijekova te je stoga i njegova primjena i doziranje drugačije. Uobičajena terapija je 1 x 500 mg/dan oralno tijekom tri dana (Francetić i sur., 2015).

Apsorpcija iz gastrointestinalnog trakta je dobra i oralna bioraspoloživost kreće se između 35 i 52%. Karakterizira ju niska koncentracija lijeka nakon primjene u plazmi, a visoka u tkivima. Azitromicin ima tendenciju nakupljanja unutarstanično zbog svoje kemijske strukture. Kiselost staničnog prostora pogoduje njegovom nakupljanju; stoga najvišu koncentraciju postiže u lizosomima gdje dolazi do disocijacije molekule lijeka i nemogućnosti

izlaska iz organela (*ion trapping*). Za klinički učinak azitromicina važno je njegovo nakupljanje u fagocitima uključujući polimorfonukleare, monocite, makrofage i fibroblaste jer je time povećana njegova koncentracija na mjestu infekcije gdje se pri doticaju s uzročnikom ubrzava njegovo otpuštanje iz fagocita (Francetić, 2009).

Prepoznato je deset metabolita azitromicina koji nastaju uglavnom N-demetilacijom i O-demetilacijom te hidrolizom, ali ni jedan ne pokazuje antimikrobno djelovanje. Za razliku od ostalih makrolida, azitromicin ne podliježe biotransformaciji putem CYP 3A4 pa ne stupa u interakcije svojstvene makrolidima. Eliminira se najvećim dijelom putem žuči nepromijenjen, a manje urinom (Francetić, 2009).

Azitromicin je na hrvatskom tržištu jedino dostupan u ljekovitim oblicima za oralnu (filmom obložene tablete, kapsule i prašak za oralnu suspenziju), intravensku (koncentrat za otopinu za infuziju) i oftamičku primjenu (kapi za oko) (www.halmed.hr). S obzirom da nema registriranog farmaceutskog oblika azitromicina za lokalnu primjenu na kožu, postoji veliki interes za razvojem takve formulacije.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Azitromicin je na hrvatskom tržištu dostupan za intravensku, oralnu i oftalmičku primjenu. Zbog svog širokog spektra djelovanja, indiciran je za mnoge bolesti među kojima su i infekcije kože i mekog tkiva (*acne vulgaris*, erizipel, *erythema migrans*, imetigo i piodermija). Upravo iz tog razloga povećan je interes za razvojem prikladnog terapijskog sustava azitromicina za lokalnu primjenu na kožu s ciljem izbjegavanja sistemskih nuspojava i smanjenja doziranja lijeka, dok bi koncentracije na mjestu primjene bile više. Također, izbjegavanjem prolaska lijeka kroz gastrointestinalni trak onemogućena je bakterijska rezistencija uzrokovana mikrobiomom crijeva.

Pripravak namijenjen lokalnoj primjeni azitromicina na kožu trebao bi osigurati dostavu uklopljene tvari u oboljelo mjesto u kožu (inficirano područje) u potrebnoj koncentraciji koja djeluje bakteriostatski, a pritom biti fiziološki prihvatljiv, neimunogen te ne smije iritirati kožu. U tom pogledu posebno su se zanimljivim pokazali liposomi te kitozanski hidrogelovi kao podloge za liposome. Brojna istraživanja su pokazala da se uklapanjem u liposome smanjuje minimalna inhibitorna koncentracija antibiotika u usporedbi s neuklopljenim antibiotikom te se s nižim dozama lijeka može ostvariti antimikrobni učinak (Rukavina i Vanić, 2016). S druge strane zanimljivo je istaknuti da i prazan kitozanski hidrogel (bez uklopljene antimikrobne tvari) pokazuje izvjestan antimikrobni potencijal, te bi se uklapanjem u liposome i podlogu od kitozanskog gela mogao značajno pojačati antimikrobni učinak azitromicina. Također, takvom formulacijom moglo bi se postići produljeno oslobađanje antibiotika i dobro zadržavanje pripravka na mjestu primjene, čime bi se smanjila i učestalost doziranja.

U svrhu ispitivanja oslobađanja azitromicina iz liposoma uklopljenih u kitozanski hidrogel, pripremljeni su liposomi s azitromicinom različitog lipidnog sastava i naboja na površini metodom hidratacije suhog fosfolipidnog sloja (SPC liposomi, SPC-CHIT liposomi i DPPC/DODAB liposomi). Provedena je karakterizacija pripremljenih liposomskih disperzija bazirana na mjerenju srednjeg promjera liposoma, indeksa polidisperznosti i zeta potencijala. Tako priređeni liposomi uklopljeni su u podlogu kitozanskog gela pripremljenog iz kitozana velike molekulske mase te je ispitan profil oslobađanja lijeka primjenom Franz-difuzijske ćelije. Rezultati su uspoređivani s kontrolom (otopina azitromicina u kitozanskom hidrogelu).

Na temelju dobivenih rezultata istraživanja utvrdili bi se potencijali istraživnog sustava i dobile smjernice za daljnja ispitivanja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

Instrumenti i pribor:

- celuloza-acetatne membrane 0,2 μm (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- filteri veličine pora 0,22 μm (Minisart, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Njemačka)
- filteri veličine pora 0,45 μm (Minisart, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Njemačka)
- Franz difuzijska ćelija (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- HPLC instrument (Shimadzu LC-10AD, Kyoto, Japan)
- kolona za HPLC (Kinetex, Phenomenex, SAD)
- optički mikroskop (Olympus BH2, Olympus optical Co. Ltd, Tokio, Japan)
- sustav za filtraciju (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- rotirajući vakuum uparivač (Büchi Rotavapor R-200, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švicarska)
- ultrazvučna sonda (Ultrasonic Homogenizer 4710, Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, SAD)
- Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija)
- pH metar (Mettler-Toledo, Greifensee, Švicarska)
- mini-ekstruder (LiposoFast, Avestin, Kanada)
- ultracentrifuga (Beckman Optima LE-80K Ultracentrifuge, Beckman Coulter Inc., Fullerton, SAD)

Kemikalije:

- acetonitril (Avantor Performance Materials B.V., Deventer, Nizozemska)
- apsolutni etanol i metanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- azitromicin (PLIVA Hrvatska Ltd., Zagreb, Hrvatska)
- dioktadecildimetilamonijev bromid (Sigma-Aldrich Company, St. Louis, MO)

- LIPOID S 75, sojin lecitin sa 75% fosfatidilkolina (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Njemačka)
- dipalmitoilfosfatidilkolin (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Njemačka)
- glicerol (T.T.T.doo, Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- kitozan, *medium molecular weight*, MMW (Sigma-Aldrich, Island)
- kitozan, *high molecular weight*, HMW (Fluka, SAD)
- trietanolamin 50% (w/w) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ledena octena kiselina (Alkaloid, Skopje)
- 10 mM otopina NaCl, pripremljena otapanjem 0,5844 g NaCl u 1000 ml demineralizirane vode
- fosfatni pufer (0,01 M, pH = 7,5), pripremljen otapanjem 1,3609 g KH₂PO₄ u demineraliziranoj vodi u tikvici od 1000 mL i podešavanjem pH s 10 M KOH.

3.2. METODE

3.2.1. Priprava kitozanskog hidrogela

Kitozanski hidrogel pripremljen je otapanjem/dispergiranjem 0,15 g kitozana velike molekulske mase (*high molecular weight*, HMW) u 4,425 g 2,5% (w/v) octene kiseline te je dodana jednaka količina (4,425 g) demineralizirane vode i 1 g glicerola. Konačna koncentracija kitozana u pripravku bila je 1,5% (w/w). Gel je zatim bio podvrgnut soniciranju u trajanju od 30 minuta kako bi u potpunosti izbubrio, nakon čega je degaziran u ultrazvučnoj kupelji kroz 30 minuta.

pH gela podešen je na pH 5,5 - 6 dodatkom odgovarajuće količine trietanolamina u pripravak uz intenzivno miješanje. Mjerenja su provedena korištenjem pH metra opremljenog s elektrodom za polučvrste pripravke.

3.2.2. Priprava liposoma

Sve su liposomske preparacije: (i) liposomi iz sojinog lecitina (SPC liposomi), (ii) kitozanom obloženi SPC liposomi (SPC-CHIT liposomi) i (iii) kationski dipalmitoilfosfatidilkolin/dioktadecildimetilamonijev bromid liposomi (DPPC/DODAB

liposomi) pripremljene metodom hidratacije suhog fosfolipidnog sloja, tzv. film metodom. SPC-CHIT liposomi pripremljeni su oblaganjem SPC liposoma otopinom kitozana.

Odgovarajuće mase lipida i azitromicina (Tablica 1) otopljene su u tikvici okruglog dna (250 ml) u 5 ml apsolutnog etanola. Tikvica je priključena na rotirajući vakuum uparivač, čija je vodena kupelj termostatisana na 40 °C. Vakuum pumpom se postepeno smanjivao tlak u sustavu do potpunog uklanjanja etanola (20 mbar) u svrhu nastajanja suhog, tankog lipidnog filma na stjenkama tikvice. Dodatkom 10 ml pročišćene vode u tikvicu i snažnim miješanjem/protresivanjem fosfolipidni film je rehidriran, pri čemu je došlo do spontanog nastajanja liposoma, multilamelarnih vezikula široke distribucije veličine.

Tablica 1. Sastav liposomskih preparacija s azitromicinom

Uzorak	SPC (mg)	DPPC (mg)	DODAB (mg)	AZI (mg)	0,3%-tna otopina KITOZANA (ml)	VODA (ml)
SPC	100	-	-	15	-	5
DPPC/DODAB	-	70	30	15	-	5
SPC-CHIT	100	-	-	15	2,5	2,5

SPC, sojin lecitin (75% fosfatidilkolina); AZI, azitromicin; DPPC, dipalmitoilfosfatidilkolin; DODAB, dioktadecildimetilamonijev bromid; CHIT, kitozan

Homogenizacija pripremljenih liposomskih disperzija provedena je dvjema različitim metodama. SPC liposomi su ekstrudirani kroz polikarbonatnu membranu na način da je sadržaj prvo protisnut tri puta kroz membranu veličine pora 400 nm, a zatim se postupak

ponovio kroz membranu veličine pora 100 nm. DPPC/DODAB liposomi su homogenizirani primjenom ultrazvučnog sonikatora sa sondom pri frekvenciji 40 Hz tijekom 20 sekundi.

SPC-CHIT liposomi su dobiveni oblaganjem prethodno ekstrudiranih SPC liposoma prema sljedećem protokolu:

Otopina kitozana (0.3%, w/v) korištena za oblaganje liposoma priređena je otapanjem kitozana srednje molekulske mase (*medium molecular weight*, MMW) u 0,1% (v/v) ledenoj octenoj kiselini. Priređena otopina kitozana (2,5 mL) dodavana je kap po kap jednakom volumenu SPC liposoma prethodno odijeljenih i ukoncentriranih pomoću ultracentrifuge uz kontrolirano miješanje na magnetskoj mješalici na sobnoj temperaturi tijekom 60 minuta. Tako priređeni kitozansom obloženi liposomi su potom pohranjeni u hladnjaku preko noći prije daljnjih ispitivanja, te nisu podvrgnuti daljnjim metodama homogenizacije zbog mogućnosti narušavanja kitozanskog omotača oko vezikula.

3.2.3. Određivanje veličine liposoma i indeksa polidisperznosti

Srednji promjer i indeks polidisperznosti liposoma određeni su na uređaju Zetasizer 3000HS metodom fotonske korelacijske spektroskopije (*photon correlation spectroscopy*, PCS). Mjerenje je provedeno pri temperaturi od 25 °C.

U kivetu za mjerenje, dodane su dvije kapi uzorka liposoma koje su potom razrijeđene s 10 mM otopinom NaCl. Otopina NaCl prethodno je filtrirana kroz Minisart filtere veličine pora 0,45 µm kako bi se uklonila eventualna onečišćenja. Mjerenje veličine liposoma provedeno je prije i poslije ekstruzije.

Uzorci su također pregledani pomoću optičkog mikroskopa (objektiv 40).

3.2.4. Određivanje zeta potencijala

Zeta potencijal svih preparacija liposoma određen je na uređaju Zetasizer 3000HS PCS metodom. Korištena je protočna kiveta s optičkim modulatorom čije se radno područje nalazi na 1000 Hz. Uređaj je prije mjerenja kalibriran standardnom otopinom čiji zeta potencijal iznosi $-42 \text{ mV} \pm 4,2 \text{ mV}$.

Nekoliko kapi liposomske suspenzije razrijeđeno je adekvatnom količinom 10 mM otopine NaCl. Otopina NaCl prethodno je filtrirana kroz Minisart filtere veličine pora 0,45 µm. Mjerenja su provedena pri temperaturi od 25 °C.

3.2.5. Odjeljivanje liposomske frakcije lijeka od neuklopljene frakcije

Prije uklapanja liposoma u kitozanske gelove provedeno je odjeljivanje lijeka uklopljenog u liposome od neuklopljene frakcije pomoću ultracentrifuge.

1 mL liposomske suspenzije razrijeđen je jednakim volumenom demineralizirane vode i ultracentrifugiran 1 h na 100 000 x g pri 20 °C. Nakon postupka ultracentrifugiranja uklonjen je supernatant (neuklopljeni azitromicin), a istaloženi pelet (liposomi s uklopljenim azitromicinom) resuspendiran na početni volumen od 1 mL.

3.2.6. Priprava kitozanskog gela s liposomima

U 1,4 g pripremljenog 1,5% (w/w) kitozanskog hidrogela velike molekulske mase, dodano je 0,6 g liposoma. Smjesa je ručno miješana staklenim štapićem 2 minute. Koncentracija liposoma u gelu iznosila je 30% (w/w). Na isti način pripremljen je uzorak kontrolnog gela koji je umjesto liposoma sadržavao otopinu azitromicina u etanolu.

3.2.7. *In vitro* ispitivanje oslobađanja azitromicina iz liposoma uklopljenih u kitozanski hidrogel

Za *in vitro* ispitivanje oslobađanja azitromicina iz liposoma uklopljenih u kitozanski gel korištena je Franz-difuzijska ćelija.

Uzorak gela (1 g) ravnomjerno je postavljen na prethodno nakvašenu celuloza nitratnu membranu veličine pora 0,22 µm. Receptorski medij činila je 5% (v/v) otopina etanola u fosfatnom puferu (0,01M, pH = 7,5).

Volumen medija u akceptorskom odjeljku Franz-difuzijske ćelije iznosio je 16 ml te je tijekom eksperimenta neprestano miješan magnetskim mješačem (200 - 300 okretaja/min). Cijeli je sustav termostatiran na 37 °C kako bi temperatura na membrani bila što sličnija

temperaturi površine kože (32 - 34 °C). Otvor za uzorkovanje i donorski odjeljak na ćeliji pokriveni su parafilmom kako bi se spriječilo isparavanje vode.

Uzorkovanje (0,5 ml) se provodilo svakih 30 minuta tijekom 6 sati te je zadnja frakcija uzeta 24 sata nakon postavljanja eksperimenta. Nakon svakog uzorkovanja, receptorski medij je nadopunjen ekvivalentnom količinom (0,5 ml) termostatiranog medija.

3.2.8. Određivanje sadržaja azitromicina oslobođenog iz liposoma tijekom *in vitro* ispitivanja

U prikupljenim uzorcima na način kako je objašnjeno u prethodnom poglavlju 4.2.7., koncentracija oslobođenog azitromicina je određivana tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (*high performance liquid chromatography*, HPLC).

Prije analize, sastavnice mobilne faze su filtrirane vakuum filtracijom kroz filtere veličine pora 0,22 µm i degazirane kako ne bi oštetile i onečistile kolonu. Svi uzorci s oslobođenim azitromicinom prikupljenim tijekom eksperimenta su filtrirani pomoću filtra veličine pora 0,22 µm. Pojedina analiza je trajala 5 minuta.

Kromatografski parametri tijekom analize bili su:

- mobilna faza: acetonitril i fosfatni pufer (0,01 M, pH = 7,5) u omjeru 70 : 30
- brzina protoka mobilne faze: 1,2 ml/min
- kolona: C18, reverzno fazna
- temperatura kolone: 40 °C
- valna duljina detekcije: 210 nm (UV-VIS detektor).

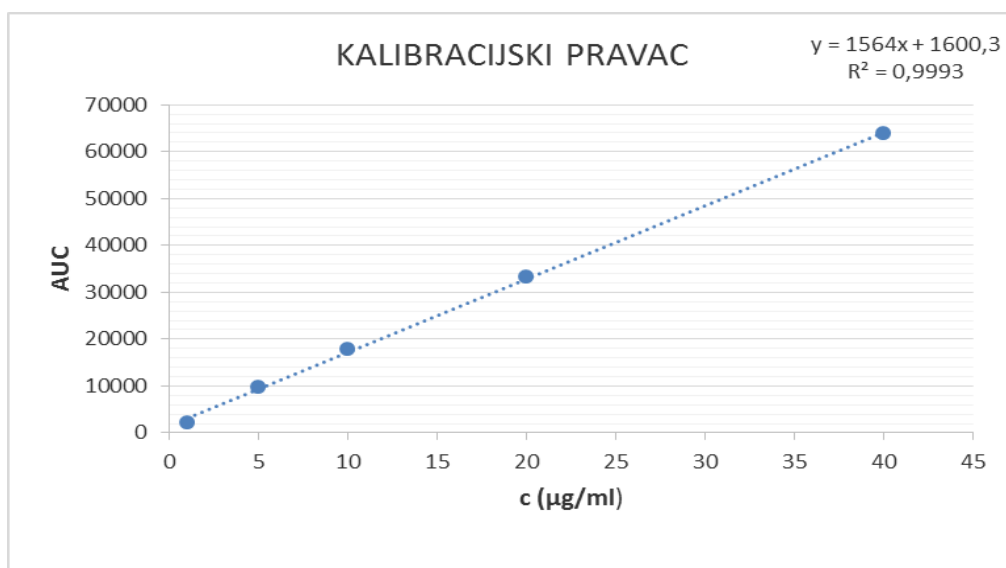
Iz kromatografski dobivenih vrijednosti površina ispod krivulje (AUC) i kalibracijskog pravca izračunata je koncentracija azitromicina u svakom mjerenom uzorku. Količina azitromicina u alikvotu uzorka (Δ) dobivena je množenjem koncentracije azitromicina (µg/ml) u prikupljenom uzorku s 0,5 ml, što odgovara volumenu uzorka. Količina lijeka u ukupnom receptorskom mediju u određenom vremenu dobivena je množenjem koncentracije azitromicina u uzorku s ukupnim volumenom receptorskog medija (16 ml). Potom je izračunata kumulativna količina oslobođenog azitromicina u receptorskom mediju (Q).

Kumulativni udio (%) oslobođenog azitromicina dobiven je iz omjera kumulativne količine (Q) azitromicina u receptorskom mediju i sadržaja azitromicina u liposomskih preparacijama.

3.2.9. Izrada kalibracijskog pravca

Za izradu kalibracijskog pravca pripremljeno je šest otopina azitromicina u metanolu u različitim koncentracijama: 1, 5, 10, 20, 40, 100 µg/ml. Uz pomoć HPLC-a izmjerena je površina ispod krivulje (AUC) na valnoj duljini 210 nm po tri puta za svaku otopinu.

Kalibracijski pravac (Slika 4) izrađen je iz ovisnosti dobivenih srednjih vrijednosti površine ispod krivulje ($y = \text{AUC}$) o koncentraciji azitromicina ($x = c \text{ (}\mu\text{g/ml)}$). Linearnost metode izražena je koeficijentom korelacije regresijskog pravca ($R = 0,9996$). Nepoznate koncentracije azitromicina mogu se izračunati iz jednadžbe kalibracijskog pravca ($x = y - 1600,3 / 1564$).



Slika 4. Kalibracijski pravac (otopina azitromicina u metanolu)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. FIZIKALNA KARAKTERIZACIJA LIPOSOMA

4.1.1. Srednji promjer liposoma i indeks polidisperznosti

Sve liposomske preparacije su pripremljene tzv. film metodom, nakon čega su prelimirano analizirane pomoću optičkog mikroskopa. Ustanovljeno je da se radi o heterogenim preparacijama multilamelarnih liposoma velikog srednjeg promjera (100 nm - 10 μ m), što je i očekivano s obzirom na korištenu metodu priprave. Metodom fotonske korelacijske spektroskopije (PCS) određen je srednji promjer vezikula i indeks polidisperznosti prije i nakon podvrgavanja liposoma homogenizaciji.

PCS metodom je potvrđen velik srednji promjer i široka razdioba veličina originalnih preparacija SPC i DPPC/DODAB liposoma (672 nm, PI 1,000 za SPC te 2811 nm, PI 1,000 za DPPC/DODAB liposome) (Tablica 2). S obzirom da lamelarnost i veličina vezikula utječu na oslobađanje uklopljenog lijeka koji se primjenjuje na kožu, bila je potrebna dodatna obrada, odnosno homogenizacija liposomskih preparacija. U svrhu optimizacije veličine i homogenizacije korištene su dvije metode, ekstruzija i sonikacija. SPC liposomi su ekstrudirani kroz polikarbonatnu membranu veličine pora 400 nm i 100 nm po tri puta za svaku membranu. Budući da je srednji promjer izvorno pripremljenih disperzija DPPC/DODAB liposoma bio veći od 2000 nm, te zbog prisustva DPPC ($T_c \approx 40$ °C), homogenizacija je provedena primjenom ultrazvučnog sonikatora sa sondom frekvencije 40 HZ tijekom 20 sekundi. Dobiveni su liposomi manjeg srednjeg promjera i homogenije distribucije veličina što se vidi iz manjeg indeksa polidisperznosti, kako je prikazano u Tablici 2.

SPC-CHIT liposomi dobiveni oblaganjem prethodno ekstrudiranih SPC liposoma otopinom kitozana, nisu podvrgnuti daljnjim metodama homogenizacije zbog mogućnosti oštećenja kitozanskog omotača oko vezikula. Iz rezultata prikazanih Tablicom 2 vidljivo je da su se SPC i SPC-CHIT liposomi razlikovali u srednjem promjeru za otprilike 200 nm što je posljedica oblaganja površine liposoma kitozanom koji dovodi do porasta izvorne veličine vezikula (Joraholmen i sur., 2014).

Penetracija liposoma u kožu ovisi o brojnim parametrima među kojima značajnu ulogu ima veličina liposoma. Tako su Verma i sur. (2003) pokazali da se u rasponu veličina od 100 - 500 nm najveći potencijal dostave lijeka u unutarnje slojeve kože imali liposomi promjera oko 120 nm dok su se oni većeg srednjeg promjera odlagali u površinskim slojevima (Verma i sur., 2003).

Tablica 2. Srednji promjeri i indeksi polidisperznosti liposoma s azitromicinom

Liposomi (sastav)	Srednji promjer liposoma (nm)		Indeks polidisperznosti	
	Prije homogenizacije	Nakon homogenizacije	Prije homogenizacije	Nakon homogenizacije
SPC	672,0 ± 85,1	133,1 ± 1,2*	1,000	0,138 ± 0,001*
DPPC/DODAB	2811,0 ± 160,9	251,9 ± 11,0**	1,000	0,283 ± 0,006**
SPC-CHIT	332,3 ± 10,2***		0,370 ± 0,053***	

* nakon ekstruzije ** nakon homogeniziranja pomoću ultrazvučnog sonikatora sa sondom

*** nakon oblaganja prethodno ekstrudiranih SPC liposoma 0,3% otopinom kitozana

SPC, sojin lecitin (75% fosfatidilkolina); DPPC, dipalmitoilfosfatidilkolin; DODAB, dioktadecildimetilamonijev bromid; SPC-CHIT, kitozanom obloženi SPC liposomi

4.1.2. Zeta potencijal liposoma

Mjerenja zeta potencijala liposomskih preparacija provedena su prije homogenizacije, budući da na vrijednosti ne utječe veličina vezikula, već isključivo ovise o sastavu liposoma odnosno vrsti fosfolipida. Rezultati su prikazani u Tablici 3.

Izmjereni zeta potencijali liposomskih preparacija bili su manji od -30 mV odnosno veći od +30 mV što pokazuje da su sve ispitivane liposomske suspenzije fizički stabilne. Stabilnost je posljedica jakih odbojnih interakcija između istovrsnog naboja na površini vezikula te iz tog razloga ne dolazi do agregacije liposoma.

DPPC/DODAB liposomi su pripravljeni iz kationskih lipida, stoga je njihov zeta potencijal pozitivan, dok SPC liposomi imaju negativne vrijednosti zeta potencijala zbog prisustva negativno nabijenih fosfolipida prisutnih u sojinom lecitinu.

Oblaganjem konvencionalnih negativno nabijenih SPC liposoma otopinom kitozana koji je pozitivno nabijen zbog amino skupina u svojoj strukturi, zeta potencijal SPC-CHIT vezikula je postao pozitivan.

Tablica 3. Zeta potencijali ispitivanih liposomskih preparacija

Liposomi (sastav)	Zeta potencijal (mV)
SPC	-43,3 ± 0,8
DPPC/DODAB	+53,1 ± 5,0
SPC-CHIT	+39,9 ± 0,9

SPC, sojin lecitin (75% fosfatidilkolina); DPPC, dipalmitoilfosfatidilkolin; DODAB, dioktadecildimetilamonijev bromid; SPC-CHIT, kitozanom obloženi SPC liposomi

4.2. IN VITRO ISPITIVANJE OSLOBAĐANJA AZITROMICINA IZ LIPOSOMA UKLOPLJENIH U KITOZANSKI HIDROGEL

In vitro ispitivanja oslobađanja azitromicina iz liposoma uklopljenih u kitozanski hidrogel provedena su korištenjem Franz-difuzijske ćelije. Uzorci su prikupljeni tijekom 24 sata kako je ranije opisano te su analizirani uz pomoć HPLC-a. Iz dobivenih vrijednosti površina ispod krivulje (AUC) nakon analize i kalibracijskog pravca izračunate su koncentracije (c) i kumulativni udio (%) azitromicina oslobođenog tijekom eksperimenta u određenom vremenu. Ispitivane su tri različite liposomske preparacije uklopljene u kitozanski hidrogel: konvencionalni liposomi (SPC liposomi), konvencionalni liposomi dobiveni naknadnim oblaganjem 0,3% otopinom kitozana (SPC-CHIT liposomi) i kationski liposomi (DPPC/DODAB liposomi). Rezultati *in vitro* oslobađanja azitromicina iz različitih liposomskih preparacija uklopljenih u kitozanski hidrogel predloženi su Tablicama 4, 5 i 6,

dok su rezultati oslobađanja otopine azitromicina iz gela priređene kao kontrole preuzete iz diplomskog rada Marine Jug.

Tablica 4. *In vitro* oslobađanje azitromicina iz SPC liposoma-u-gelu

t (h)	c (µg/mL)	Δ (µg)	Q (µg)	%	SD (%)
0	0,00	0	0,000	0,00	0,00
0,5	2,83	1,416081	45,315	4,85	1,06
1	5,60	2,80	91,002	9,82	0,54
1,5	8,12	4,058344	134,083	14,39	2,07
2	9,84	4,920077	165,716	17,90	1,94
2,5	13,67	6,834879	231,910	24,95	1,43
3	17,18	8,591592	294,960	31,74	1,35
3,5	16,68	8,341272	295,541	31,77	2,44
4	18,08	9,0414	326,287	35,15	0,14
4,5	18,45	9,223625	341,159	36,76	0,18
5	17,48	8,740409	334,920	36,15	2,59
5,5	18,06	9,027813	352,857	37,99	0,88
6	17,05	8,526375	345,839	37,27	0,76
24	17,08	8,539322	354,780	38,24	0,69

t (h), vrijeme uzorkovanja od postavljanja eksperimenta; *c (µg/ml)*, koncentracija azitromicina u receptorskom mediju; Δ (µg), količina lijeka u alikvotu uzorka; *Q (µg)*, kumulativna količina oslobođenog lijeka tijekom određenog vremenskog razdoblja; *V (ml)*, volumen receptorskog medija; *SD (%)*, standardna devijacija. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost provedenih mjerenja (*n* = 3).

SPC, sojin lecitin (75% fosfatidilkolina)

Tablica 5. *In vitro* oslobađanje azitromicina iz SPC-CHIT liposoma-u-gelu

<u>t (h)</u>	<u>c</u> ($\mu\text{g/mL}$)	<u>Δ (μg)</u>	<u>Q (μg)</u>	<u>%</u>	<u>SD</u> (%)
0	0,00	0,00	0,000	0,00	0,00
0,5	1,91	0,95	30,551	3,40	0,35
1	4,51	2,26	73,163	7,17	2,37
1,5	6,52	3,26	107,535	10,46	3,54
2	9,23	4,62	154,164	16,22	2,74
2,5	12,63	6,31	213,140	24,99	2,33
3	15,53	7,76	265,827	31,31	3,63
3,5	15,97	7,98	280,677	34,38	4,91
4	17,26	8,63	309,282	39,73	8,48
4,5	17,18	8,59	316,656	40,20	7,67
5	16,60	8,30	315,978	39,82	7,49
5,5	17,15	8,58	333,096	42,29	8,43
6	16,57	8,29	332,428	42,87	9,27
24	16,41	8,21	338,164	42,75	7,82

t (h), vrijeme uzorkovanja od postavljanja eksperimenta; *c* ($\mu\text{g/mL}$), koncentracija azitromicina u receptorskom mediju; Δ (μg), količina lijeka u alikvotu uzorka; *Q* (μg), kumulativna količina oslobođenog lijeka tijekom određenog vremenskog razdoblja; *V* (ml), volumen receptorskog medija; *SD* (%), standardna devijacija. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost provedenih mjerenja (*n* = 3).

SPC-CHIT , *SPC* liposomi obloženi kitozanom

Tablica 6. *In vitro* oslobađanje azitromicina iz DPPC/DODAB liposoma-u-gelu

<u>t (min)</u>	<u>c</u> <u>($\mu\text{g/mL}$)</u>	<u>Δ (μg)</u>	<u>Q (μg)</u>	<u>%</u>	<u>SD</u> <u>(%)</u>
0	0,00	0,000	0,00	0,00	0,00
0,5	2,56	1,280	40,94	3,66	1,47
1	6,35	3,177	102,95	8,49	1,07
1,5	9,14	4,571	150,73	12,84	0,63
2	12,15	6,077	203,50	17,06	1,21
2,5	15,33	7,667	260,46	22,13	1,30
3	18,04	9,018	311,35	26,12	2,17
3,5	21,10	10,551	369,44	31,40	1,93
4	21,55	10,776	387,18	33,60	0,64
4,5	22,83	11,414	418,35	35,75	1,58
5	23,87	11,937	446,53	37,77	2,55
5,5	24,06	12,031	461,46	38,49	3,28
6	24,45	12,225	479,70	39,71	3,88
24	24,05	12,026	485,54	39,77	4,67

t (h), vrijeme uzorkovanja od postavljanja eksperimenta; *c* ($\mu\text{g/mL}$), koncentracija azitromicina u receptorskom mediju; Δ (μg), količina lijeka u alikvotu uzorka; *Q* (μg), kumulativna količina oslobođenog lijeka tijekom određenog vremenskog razdoblja; *V* (ml), volumen receptorskog medija; *SD* (%), standardna devijacija. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost provedenih mjerenja (*n* = 3).

DPPC, dipalmitoilfosfatidilkolin; *DODAB*, dioktadecildimetilamonijev bromid

Usporedbom oslobađanja lijeka iz svih liposomskih preparacija u gelu i kontrole, otopine azitromicina uklopljene u kitozansku podlogu, uočena je statistički značajna razlika (ANOVA, $p < 0,05$). Naime, otopina azitromicina inkorporirana u hidrogel, sastoji se od samo jedne faze te ne postoji barijera kroz koju molekule lijeka trebaju difundirati da bi se našle u receptorskom mediju Franz-difuzijske ćelije. Stoga je takvo oslobađanje brže nego kod liposomskih preparacija koje pokazuju sporiji trend oslobađanja azitromicina.

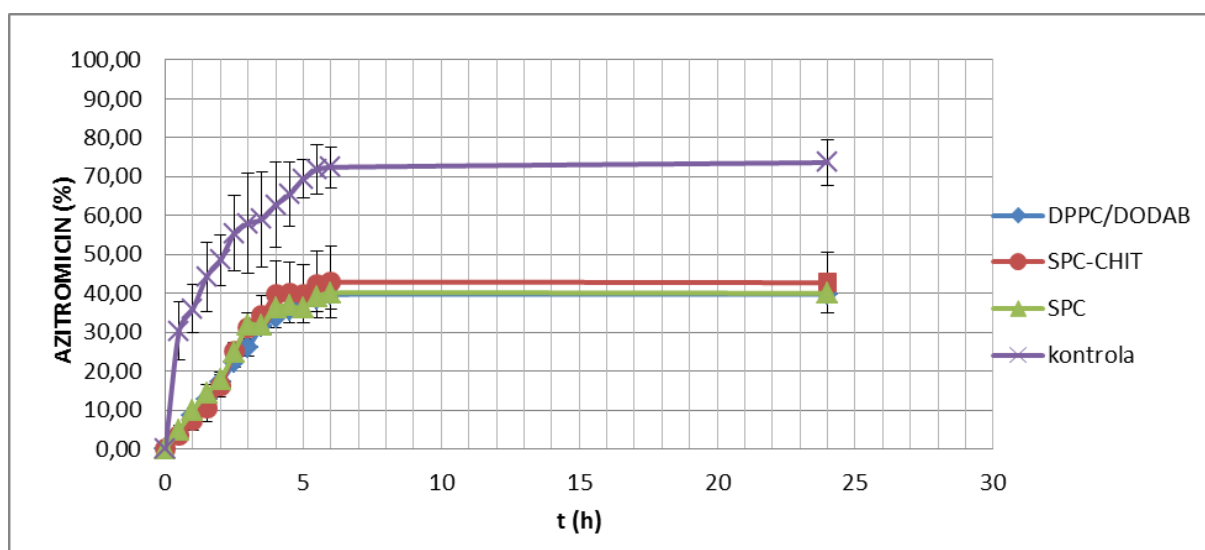
Analizom eksperimentalnih podataka kod svih ispitivanih liposoma uklopljenih u gel uočava se oslobađanje približno jednake količine azitromicina tijekom vremena; zapravo postoji mala razlika koja nije statistički značajna (ANOVA, $p > 0,05$). Nakon 24 sata se iz SPC liposomske preparacije oslobodilo 40,03%, iz DPPC/DODAB liposoma 39,77% te iz SPC-CHIT liposomske preparacije 42,75%. Kako se kitozanski gel koristio kao podloga za različite liposomske preparacije te se njegov sastav tijekom eksperimenta nije mijenjao, drugačiji rezultati dobiveni tijekom ispitivanja oslobađanja isključivo su rezultat različitog sastava liposoma i njihove interakcije s hidrogelom. U istraživanju Hurler i sur. (2012) gdje je liposomska preparacija s kloramfenikolom uklopljena u podlogu kitozanskog hidrogela i karbopola, nije uočena značajna razlika u oslobađanju, što znači da sama tekstura gela nije značajno utjecala na oslobađanje lijeka. Pozitivna svojstva uklapanja liposoma u gel očituju se u povećanoj stabilnosti formulacije te mogućnosti produljenog i kontroliranog oslobađanja (Vanić i Škalko-Basnet, 2013). Osim toga, antimikrobni potencijal kitozana mogao bi pridonijeti poboljšanoj antimikrobnoj aktivnosti antibiotika.

Usporedbom konvencionalnih liposoma prije i poslije oblaganja s 0,3% otopinom MMW kitozana, primjećuje se nešto veći udio oslobođenog azitromicina kod obloženih liposoma, međutim ta razlika nije statistički značajna (t-test, $p > 0,05$). Nadalje, usporedbom konvencionalnih liposoma i kationskih DPPC/DODAB liposoma, u ovom istraživanju nije nađena statistički značajna razlika (t-test, $p > 0,05$) u oslobađanju lijeka, iz čega bi se moglo zaključiti da razlika u naboju ne utječe značajno na oslobađanje lijeka iz takve formulacije.

Na Slici 5. grafički je prikazano *in vitro* oslobađanje azitromicina iz svih preparacija liposoma-u-kitozanskom gelu. Može se uočiti trend brzog oslobađanja azitromicina iz liposoma tijekom prva 4 sata od postavljanja eksperimenta nakon čega je primijećeno nastajanje platoa, što se može objasniti uspostavom dinamičke ravnoteže između donorskog i receptorskog medija. Također, može se uočiti vrlo brzo oslobađanje lijeka iz kontrolnog

uzorka, za razliku od ispitivanih liposomskih preparacija, postoji statistički značajna razlika (ANOVA, $p < 0,05$), gdje je oslobađanje znatno sporije.

Rezultati provedenih istraživanja u ovom diplomskom radu ukazuju na mogućnost topikalne primjene liposoma s azitromicinom uklopljenim u kitozanski hidrogel. Međutim, potrebno je provesti daljnja istraživanja formulacije kao što su ispitivanja antibakterijske aktivnosti, ispitivanja permeabilnosti, bioadhezivnosti, testove stabilnosti i druge, kako bi se dokazala njihova učinkovitost i sigurnost primjene.



Slika 5. In vitro oslobađanje azitromicina iz liposoma uklopljenih u kitozanski hidrogel tijekom 24 sata

AZITROMICIN (%), kumulativni udio oslobođenog azitromicina iz različitih liposomskih preparacija i kontrolnog uzorka; *DPPC/DODAB*, dipalmitoilfosfatidilkolin/dioktadecildimetilamonijev bromid; *SPC-CHIT*, kitozanom obloženi SPC liposomi; *SPC*, sojin lecitin (75% fosfatidilkolina)

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih ispitivanja te obradom i analizom dobivenih rezultata moguće je izvesti sljedeće zaključke:

- pH vrijednost izvorno priređenih kitozanskih gelova iznosila je između 4,50 i 5,00 te je potrebno provesti neutralizaciju gelova na pH 5,5 - 6 prije dodatka liposoma.
- Sve liposomske preparacije pripravljene metodom hidratacije suhog fosfolipidnog sloja, bile su velikog srednjeg promjera i indeksa polidisperznosti te je neophodno provesti homogenizaciju istih.
- Nakon oblaganja SPC liposoma otopinom kitozana dolazi do značajnog povećanja srednjeg promjera liposoma te promjene vrijednosti zeta potencijala.
- Vrijednosti zeta potencijala svih liposomskih vezikula bile su manje od -30mV, a veće od +30mV što ukazuje na fizičku stabilnost pripremljenih disperzija.
- Uklapanjem azitromicina u liposome te umiješavanjem u kitozanski hidrogel postiže se značajno sporije oslobađanje lijeka nego konvencionalnim gelom.
- Sve liposomske preparacije pokazuju sličan profil oslobađanja (međusobno ne postoji statistički značajna razlika).
- Potrebno je provesti dodatna istraživanja u pogledu antimikrobne aktivnosti formulacija i dokazivanja sigurnosti i učinkovitosti primjene na kožu.

6. LITERATURA:

Ahmadi, F., Oveisi, Z., Samani, M.S., Amoozgar, Z., 2015. Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications, *Research in Pharmaceutical Sciences*, 10, 1-16.

Ahmed, E.M., 2015. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *Journal of Advanced Research*, 6, 105-121.

Alhariri, M., Azghani, A., Omri, A., 2013. Liposomal antibiotics for the treatment of infectious diseases, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 10, 1523-1524.

Avanti Lipids Polar, 2016. Mini-extruder assembly instructions. <https://avantilipids.com/divisions/equipment/mini-extruder-assembly-instructions/> (pristupljeno 01.05.16).

Flaten, G.E., Palac, Z., Engesland, A., Filipović-Grčić, J., Vanić, Ž., Škalko-Basnet, N., 2015. In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75, 10–24.

Francetić, I., 2008. Farmakokinetika azitromicina, *Medicus*, 17, 9-14.

Francetić, I., Makar-Aušperger, K., Reiner, Ž., Anić, B., Belev, B., Herceg, M., Krznarić Ž., Likić, R., Lovrenčić, A., Macolić-Šarinić, V., Vrhovac, R., 2015. Farmakoterapijski priručnik, sedmo izd. Medicinska naklada, Zagreb, 411-412.

HALMED: Agencija za lijekove i medicinske proizvode, 2014. Baza lijekova: azitromicin. <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Azitromicin-Belupo-500-mg-filmom-oblozene-tablete/10639/> (pristupljeno 10.03.16).

Hope, M.J., Nayar, R., Mayer, L.D., Cullis, R., 1994. Reduction of liposome size and preparation of unilamellar vesicles by extrusion techniques, *Liposome Technology*, 1, 123-138.

Hurler, J., Berg, O.A., Skar, M., Conradi, A.H., Johnsen, P.J., Šalko-Basnet, N., 2012. Improved burns therapy: Liposomes-in-hydrogel delivery system for mupirocin, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101, 3906-3915.

Hurler, J., Engesland, A., Kermany, B.P., Škalko-Basnet, N., 2011. Improved texture analysis for hydrogel characterization: Gel cohesiveness, adhesiveness and hardness, *Journal of Applied Polymer Science*, 125, 180-188.

- Hurler, J., Sorensen, K.K., Fallarero, A., Vuorela, P., Škalko-Basnet, N., 2013. Liposomes-in-Hydrogel Delivery System with Mupirocin: *In Vitro* Antibiofilm Studies and *In Vivo* Evaluation in Mice Burn Model, *BioMed Research International*, 2013, 1-8.
- Jalšenjak, I., Jalšenjak, V., Filipović-Grčić, J., 1998. Farmaceutika, Školska knjiga, Zagreb, 65-66, 70-71.
- Jones, D., 2004. Pharmaceutical Applications of Polymers for Drug Delivery, *Polysaccharides for Drug Delivery and Pharmaceutical Applications*, 15, 15.
- Joraholmen, M.W., Vanić, Ž., Tho, I., Škalko-Basnet, N., 2014. Chitosan-coated liposomes for topical vaginal therapy: Assuring localized drug effect, *International Journal of Pharmaceutics*, 472, 94-101.
- Katzung, B.G., Masters, S.B., Trevor, A.J., 2011. Temeljna i klinička farmakologija, jedanaesto izd. Medicinska naklada, Zagreb.
- Malvern Instruments, 2014. Size and zeta potential characterisation od anionic and cationic liposomes on the Zetasizer Nano, <http://www.malvern.com/> (pristupljeno 01.04.16).
- Mamizuka, E.M., Carmona-Ribiero, A.M., 2007. Cationic Liposomes as Antimicrobial Agents, *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 636-647.
- Nilsen-Nygaard, J., Strand, S.P., Varum, K.M., Draget, K.I., Nordgard, C.T., 2015. Chitosan: Gels and interfacial properties, *Polymers*, 7, 552-579.
- Pachau, L., 2015. Recent developments in novel drug delivery systems for wound healing, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 12, 1-15.
- Palac, Z., Engesland A., Flaten G.E., Škalko-Basnet, N., Filipović-Grčić, J., Vanić, Ž., 2014. Liposomes for (trans)dermal drug delivery: The skin-PVPA as a novel in vitro stratum corneum model in formulation development, *Journal of Liposome Research*, 24, 1-10.
- Particle Sciences, 2009. *In vitro* realese testing methods for semisolid formulations, <http://www.particlesciences.com/news/technical-briefs/2009/in-vitro-release-testing-methods/> (pristupljeno 01.04.16).
- PermeGear, 2015. Difusion testing fundamentals. <http://permegear.com/wp-content/uploads/2015/08/primer/> (pristupljeno 01.04.16).

PubChem: Open Chemistry Database, 2015. Azithromycin.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/azithromycin/> (pristupljeno 13.09.16).

Rabea, E., Badawy, M.I., Stevens, C.V., Smaghe, G., Steurbaut, W., 2003. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action, *Biomacromolecules*, 4, 1457-1464.

Ribiero, AM., Carrasco, L.D.M., 2013. Cationic Antimicrobial Polymers and Their Assemblies, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 9906-9946.

Rukavina, Z., Vanić, Ž., 2016. Current trends in development of liposomes for targeting bacterial biofilms. *Pharmaceutics*, 8, 18.

Shim, G., Kim, M., Park, J.Y., Oh, Y., 2013. Application of cationic liposomes for delivery of nucleic acids, *Asian Journal of Pharmaceutical Science*, 8, 72-80.

Sinko, P.J., 2011. Solubility and Distribution Phenomena, *Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 182–196.

U.S. Pharmacopeia: Azithromycin, 2010.

http://pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m6740/, (pristupljeno 10.09.16).

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

Vanić, Ž., 2012b. Liposomi kao nosači lijekova: metode priprave, *Farmaceutski Glasnik*, 68, 457-466.

Vanić, Ž., Škalko-Basnet, N., 2013. Nanopharmaceuticals for improved topical vaginal therapy: Can they deliver?, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50, 29-41.

Verma, S., Blume, G., Fahr, A., 2003. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin, *International Journal of Pharmaceutics*, 258, 141–151.

Zheng, L.Y., Zhu, J.F., 2003. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights, *Carbohydrate Polymers*, 54, 527-530.

Zorc, B., Butula, I., 1995. Vježbe iz farmaceutske kemije, 12-16.

7. SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je ispitati oslobađanje azitromicina iz kationskih liposoma uklopljenih u kitozanski gel. U tu svrhu pripravljene su film metodom dvije preparacije kationskih liposoma; DPPC/DODAB liposomi te SPC liposomi obloženi kitozanom, a za usporedu su poslužili negativno nabijeni SPC liposomi. Sve su formulacije karakterizirane u pogledu srednjeg promjena, indeksa polidisperznosti i zeta potencijala, prije i nakon homogenizacije disperzija korištenjem ekstrudera i ultrazvučne sonde. Nakon odijeljivanja neuklopljenog lijeka liposomi su umiješani u kitozanski gel pripremljen iz kitozana velike molekulske mase. Koncentracija liposoma u gelu bila je 30% (w/w). Srednji promjer liposoma, nakon provedene homogenizacije, kretao se između 130 (SPC liposomi) i 250 nm (DPPC/DODAB); jedino su oni obloženi kitozanom bili su nešto veći zbog specifičnosti postupka izrade. Zeta potencijali kationskih liposoma bili su veći od +30 mV, dok je za SPC liposome zeta potencijal bio manji od -30 mV, što ukazuje na fizičku stabilnost svih pripremljenih disperzija. Rezultati *in vitro* ispitivanja oslobađanja azitromicina iz liposoma-u-gelu ukazuju na brzi trend oslobađanja lijeka u prva 4 sata ispitivanja i polaganiji tijekom idućih 20 sati. Nije uočena statistički značajna razlika u profilu oslobađanja lijeka između ispitivanih kationskih i anionske formulacije liposoma. Usporedba s kontrolnim gelom (sadrži otopinu azitromicina umjesto liposoma), ukazuje na polaganiji trend oslobađanja azitromicina iz svih liposomskih pripravaka.

8. SUMMARY

The aim of this study was to examine the release profile of azithromycin from liposomes embedded in chitosan hydrogel. For that purpose, two type of cationic liposomes were prepared by film hydration method: DPPC/DODAB liposomes and SPC liposomes coated with 0,3% (w/w) chitosan solution. Negatively charged SPC liposomes served for comparison. All liposomal preparations were physically characterized before and after homogenization by measuring mean diameter, size distribution and zeta potential. Homogenization of different liposome dispersions was performed using an ultrasonic probe sonicator or extruder. After separation of unencapsulated drug, the liposomes were mixed into a gel prepared from high-molecular weight chitosan. The concentration of liposomes in the gel was 30% (w/w). After homogenization, the mean diameter ranged between 130 nm (SPC liposomes) and 250 nm (DPPC/DODAB). Liposomes coated with chitosan were slightly higher due to the specificities of the manufacturing process. Zeta potentials of the cationic liposomes were higher than +30 mV, while the zeta potential of the SPC liposomes was less than -30 mV, indicating the physical stability of all the prepared liposome dispersions. *In vitro* release results indicate a trend of rapid drug release in the first 4 hours and slower in the next 20 hours. There were no statistically significant differences in the drug release from all the tested cationic and anionic liposomes. When compared to control (gel containing solution of azithromycin instead of the liposomes), slower release of azithromycin from all the tested liposome formulations was proven.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

IN VITRO ISPITIVANJE OSLOBAĐANJA AZITROMICINA IZ KATIONSКИH LIPOSOMA UKLOPLJENIH U KITOZANSKI GEL

Nikolina Mihaljević

SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je ispitati oslobađanje azitromicina iz kationskih liposoma uklopljenih u kitozanski gel. U tu svrhu pripravljene su film metodom dvije preparacije kationskih liposoma; DPPC/DODAB liposomi te SPC liposomi obloženi kitozonom, a za usporedu su poslužili negativno nabijeni SPC liposomi. Sve su formulacije karakterizirane u pogledu srednjeg promjena, indeksa polidisperznosti i zeta potencijala, prije i nakon homogenizacije disperzija korištenjem ekstrudera i ultrazvučne sonde. Nakon odijeljivanja neuklopljenog lijeka liposomi su umiješani u kitozanski gel pripravljen iz kitozana velike molekulske mase. Koncentracija liposoma u gelu bila je 30% (w/w). Srednji promjer liposoma, nakon provedene homogenizacije, kretao se između 130 (SPC liposomi) i 250 nm (DPPC/DODAB); jedino su oni obloženi kitozonom bili su nešto veći zbog specifičnosti postupka izrade. Zeta potencijali kationskih liposoma bili su veći od +30 mV, dok je za SPC liposome zeta potencijal bio manji od -30 mV, što ukazuje na fizičku stabilnost svih pripremljenih disperzija. Rezultati in vitro ispitivanja oslobađanja azitromicina iz liposoma-u-gelu ukazuju na brzi trend oslobađanja lijeka u prva 4 sata ispitivanja i polaganiji tijekom idućih 20 sati. Nije uočena statistički značajna razlika u profilu oslobađanja lijeka između ispitivanih kationskih i anionske formulacije liposoma. Usporedba s kontrolnim gelom (sadrži otopinu azitromicina umjesto liposoma), ukazuje na polaganiji trend oslobađanja azitromicina iz svih liposomskih pripravaka.

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

Rad sadrži: 42 stranice, 5 grafičkih prikaza, 6 tablica i 37 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: kitozan, liposomi, azitromicin, *in vitro* oslobađanje

Mentor: **Dr. sc. Željka Vanić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Željka Vanić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Dr. sc. Mario Jug, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Dubravka Vitali-Čepo, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2016.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

IN VITRO RELEASE OF AZITHROMYCIN FROM CATIONIC LIPOSOMES INCORPORATED INTO CHITOSAN GEL

Nikolina Mihaljević

SUMMARY

The aim of this study was to examine the release profile of azithromycin from liposomes embedded in chitosan hydrogel. For that purpose, two type of cationic liposomes were prepared by film hydration method: DPPC/DODAB liposomes and SPC liposomes coated with 0,3% (w/w) chitosan solution. Negatively charged SPC liposomes served for comparison. All liposomal preparations were physically characterized before and after homogenization by measuring mean diameter, size distribution and zeta potential. Homogenization of different liposome dispersions was performed using an ultrasonic probe sonicator or extruder. After separation of unencapsulated drug, the liposomes were mixed into a gel prepared from high-molecular weight chitosan. The concentration of liposomes in the gel was 30% (w/w). After homogenization, the mean diameter ranged between 130 nm (SPC liposomes) and 250 nm (DPPC/DODAB). Liposomes coated with chitosan were slightly higher due to the specificities of the manufacturing process. Zeta potentials of the cationic liposomes were higher than +30 mV, while the zeta potential of the SPC liposomes was less than -30 mV, indicating the physical stability of all the prepared liposome dispersions. In vitro release results indicate a trend of rapid drug release in the first 4 hours and slower in the next 20 hours. There were no statistically significant differences in the drug release from all the tested cationic and anionic liposomes. When compared to control (gel containing solution of azithromycin instead of the liposomes), slower release of azithromycin from all the tested liposome formulations was proven.

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

Thesis includes: 42 pages, 5 figures, 6 tables and 37 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Chitosan, liposomes, azithromycin, *in vitro* release

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
Mario Jug, 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

The thesis was accepted: May 2016.