

# Reološka karakterizacija i ispitivanje stabilnosti formulacija liposomi-u-kitozanskom gelu

---

Frankol, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:084093>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

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



**Ivana Frankol**

**Reološka karakterizacija i ispitivanje stabilnosti  
formulacija liposomi-u-kitozanskom gelu**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Oblikovanje Lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Zore Rukavine.

*Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Zori Rukavini na utrošenom trudu i prenesenom znanju te svima koji su me podržavali kroz cijelo akademsko obrazovanje.*

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Liposomi.....	2
1.1.1. Struktura i svojstva liposoma .....	2
1.1.2. Klasifikacija liposoma.....	4
1.2. Priprema liposoma.....	6
1.2.1. Metoda hidratacije suhog fosfolipidnog sloja (film metoda).....	7
1.3. Hidrogelovi.....	9
1.3.1. Kitozanski hidrogelovi.....	10
1.3.2. Liposomi uklopljeni u hidrogelove.....	12
1.4. Reologija.....	12
1.4.1. Rotacijski i oscilacijski testovi.....	14
1.5. Azitromicin.....	16
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	19
3. MATERIJALI I METODE.....	21
3.1. Materijali .....	22
3.2. Metode.....	23
3.2.1. Izrada liposoma .....	23
3.2.2. Određivanje srednjeg promjera i indeksa polidisperznosti liposoma.....	24
3.2.3. Izrada kitozanskog gela i formulacija liposomi-u-gelu.....	24
3.2.4. Reološka karakterizacija formulacija .....	25
3.2.5. Ispitivanje pH formulacija.....	25
3.2.6. Ispitivanje stabilnosti formulacija tijekom skladištenja.....	26
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	27
4.1. Veličina i polidisperznost AZT-liposoma .....	28
4.2. Reološka karakterizacija formulacija .....	30
4.2.1. Rotacijski testovi.....	30
4.2.1. Oscilacijski testovi .....	34
4.3. pH formulacija.....	43
5. ZAKLJUČAK.....	45
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	48
7. LITERATURA .....	51
8. SAŽETAK / SUMMARY.....	58
9. TEMELJNA IDENTIFIKACIJSKA KARTICA.....	61

# **1. UVOD**

## **1.1. Liposomi**

Liposomi su biokompatibilne vezikule sastavljene od lipidnih dvoslojeva koje imaju širok raspon primjene, posebice u dostavi lijekova i farmakoterapiji. Njihov (fosfo)lipidni sastav i fizikalno-kemijske karakteristike vrlo su prilagodljivi te se mogu modificirati kako bi se zadovoljile specifične potrebe u raznim područjima znanosti i biomedicine. Liposome je prvi opisao Bangham 1964. godine kada su istraživanja izoliranih i pročišćenih fosfolipida pokazala da oni u vodi spontano stvaraju strukture veoma nalik biološkim membranama. Liposomi su tada opisani kao zatvorene sferične vezikule sastavljene od fosfolipida, koje nastaju u suvišku vode (Bangham i Horen, 1964).

Liposomi se sastoje od unutarnjeg vodenog odjeljka kojeg obavija jedna ili više koncentrično posloženih fosfolipidnih membranama. S obzirom na strukturnu sličnost s biološkim membranama te na dokazana svojstva biokompatibilnosti i biorazgradljivosti, liposomi se, ovisno o (fosfo)lipidnom sastavu, smatraju gotovo netoksičnima ili vrlo niske toksičnosti. Stoga se liposomi smatraju relativno sigurnim terapijskim nanosustavima za dostavu lijekova (Bulbake i sur., 2017).

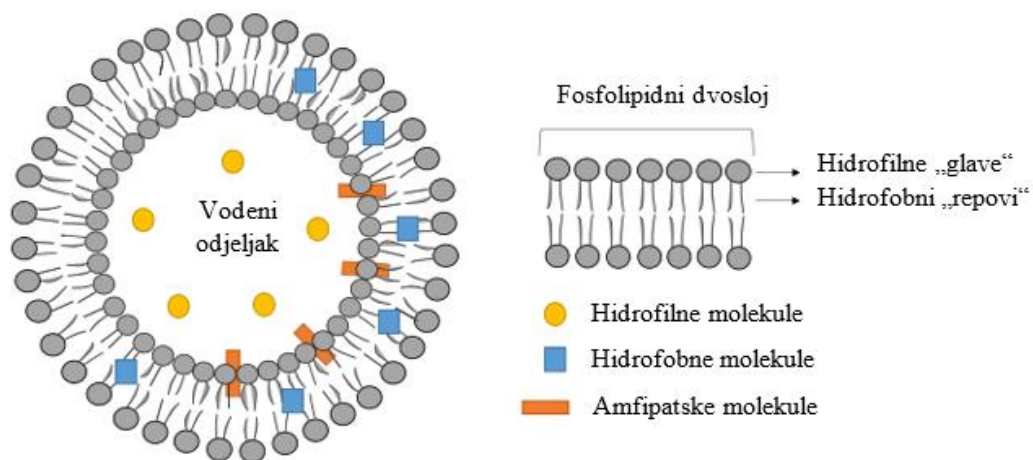
Zahvaljujući njihovoj specifičnoj strukturi, još jedna od prednosti liposoma kao nosača djelatnih tvari jest sposobnost uklapanja molekula različitih fizikalno-kemijskih svojstava. Pritom se hidrofilne molekule uklapaju u vodeni odjeljak/odjeljke liposoma, lipofilne molekule se uklapaju u fosfolipidni dvosloj, dok se amfifilne molekule smještaju na dodiru vodenog i fosfolipidnog odjeljka. 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). Radi ovih svojstava, primjena liposoma moguća je kod infektivnih oboljenja, u dijagnostici, hormonskoj terapiji, onkologiji, stimulaciji imunološkog odgovora te genskoj terapiji. Liposomi se koriste i za transdermalnu i lokalnu dostavu mnogih lijekova, kao i za sustavno liječenje lokalnih bolesti.

### **1.1.1. Struktura i svojstva liposoma**

Liposomi su sferične vezikule u rasponu veličina od oko 20 nm do 10  $\mu$ m, a najčešće u rasponu od 100 do 500 nm. Građeni su od jednog ili više fosfolipidnih dvoslojeva koji omeđuju unutarnju, vodenu fazu. Osnovnu građevnu jedinicu čine fosfolipidi, amfipatske molekule, odnosno diesteri fosfatne kiseline koji su s jedne strane esterificirani derivatom sfingozina ili

glicerola, a s druge strane serinom, kolinom, inozitolom, etanolaminom ili glicerolom (Vanić, 2012a). Fosfolipidi se u ovojnici liposoma samoorganiziraju u oblik dvosloja na način da su hidrofilne polarne „glave“ orijentirane prema unutarnjoj i vanjskoj vodenoj fazi, a hidrofobni nepolarni „repovi“ jedan prema drugom (Pepić i sur., 2012) kao što je prikazano na Slici 1.

Ovojnica liposoma često sadrži kolesterol koji u liposomima ima sličnu ulogu kao i u biološkim membranama - ugrađuje se u dvosloj između molekula fosfolipida čime povećava njegovu čvrstoću (rigidnost) uslijed smanjene slobode kretanja fosfolipidnih molekula (Vanić, 2012a). Sastav lipida utječe na karakteristike liposoma koje uključuju: veličinu čestica, krutost, fluidnost, stabilnost i električni naboj.



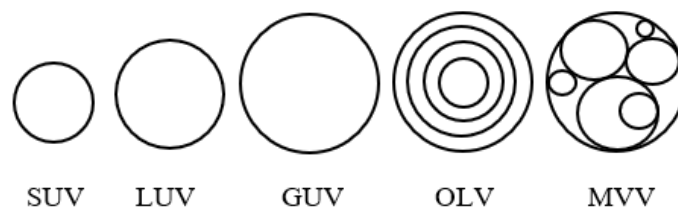
**Slika 1.** Prikaz strukture liposoma (preuzeto i prilagođeno prema Guimarães i sur., 2021)

Ovisno o temperaturi, fosfolipidne molekule postoje u različitim fazama: visoko organiziranoj čvrstoj ili gel fazi i fazi tekućih kristala. Moguć je prijelaz gel faze u fazu tekućih kristala, a zove se temperatura faznog prijelaza ( $T_c$ ). Temperatura faznog prijelaza ovisi o duljini i stupnju zasićenosti lanaca masnih kiselina u fosfolipidima. Ukoliko se poveća duljina lanaca masnih kiselina kao i stupnja njihove zasićenosti, posljedično raste i temperatura faznog prijelaza. Osim temperature faznog prijelaza, važna je i fluidnost, tj. rigidnost koja ima utjecaj na permeabilnost, fuziju, agregaciju i vezanje liposoma za proteine plazme, čime utječe i na stabilnost samih liposoma. Što je  $T_c$  niža, fluidnost membrane je viša i ona je permeabilnija, čime je stabilnost liposoma smanjena (Vanić, 2012a).

### 1.1.2. Klasifikacija liposoma

Liposomi se mogu klasificirati prema veličini i broju fosfolipidnih dvoslojeva, prema fosfolipidnom sastavu, elastičnosti/rigidnosti dvoslojeva, površinskom naboju ili prisutnosti određenih površinskih liganada. Navedena svojstva mogu imati značajan utjecaj na stabilnost liposoma, način oslobađanja uklopljenih djelatnih tvari (lijekova) i interakciju s biološkim sustavima (Vanić, 2015).

Liposomi se prema strukturi razvrstavaju u četiri kategorije koje se razlikuju po veličini i broju dvoslojeva: unilamelarni, multilamelarni, oligolamelarni i multivezikularni liposomi (Slika 2). Unilamelarni liposomi građeni su od jedne fosfolipidne ovojnice, a prema veličini mogu biti: mali (eng. *small unilamellar vesicles*, SUV) veličine 20-100 nm, srednje veliki (eng. *medium sized unilamellar vesicles*, MUV) u rasponu veličina 100-500 nm, veliki (eng. *large unilamellar vesicles*, LUV) veličine 500-1000 nm i veoma veliki unilamelarni liposomi (eng. *giant unilamellar vesicles*, GUV) koji su veći od 1000 nm. Multilamelarni liposomi (eng. *multilamellar vesicles*, MLV) veći su od 500 nm te sadrže velik broj koncentričnih fosfolipidnih dvoslojeva. Oligolamelarni liposomi veličine su 100-1000 nm (eng. *oligolamellar vesicles*, OLV), a sastoje se od nekoliko koncentričnih fosfolipidnih dvoslojeva između kojih se nalaze vodeni odjeljci. Multivezikularni liposomi (eng. *multivesicular liposomes*, MVV) veći su od 1000 nm, a građeni su od fosfolipidnih dvoslojeva koji nisu položeni koncentrično radi čega formiraju strukture nalik na pjenu. Lamelarnost liposoma izravno utječe na sposobnost uklapanja lijeka, sposobnost permeacije, kinetiku oslobađanja lijeka, interakcije sa stanicama kao i na ulazak liposoma u stanicu (Kotla i sur., 2017).



**Slika 2.** Shematski prikaz veličine i strukture liposoma. SUV, *small unilamellar vesicle*; LUV, *large unilamellar vesicle*; GUV, *giant unilamellar vesicle*; OLV, *oligolamellar vesicles*; MVV, *multivesicular liposomes*



Prema fosfolipidnom sastavu, tj. prema prisustvu tvari koje utječu na elastičnost/rigidnost fosfolipidnog dvosloja, razlikuju se konvencionalni i elastični liposomi. U elastične liposome ubrajaju se deformabilni liposomi, propilenglikol liposomi, etosomi i invasomi.

Konvencionalni liposomi mogu biti građeni od jednog fosfolipidnog dvosloja (unilamelarni liposomi) ili više koncentričnih fosfolipidnih dvoslojeva (oligolamelarni ili multilamelarni liposomi). U njihovom sastavu mogu se nalaziti i neutralni fosfolipidi ili kombinacija neutralnih i negativno nabijenih fosfolipida, a često je prisutan i kolesterol koji povećava rigidnost fosfolipidne ovojnice. Takvi su liposomi okarakterizirani nespecifičnom reaktivnošću prema okruženju u kojem se nalaze. Konvencionalni liposomi razlikuju se prema fizikalnim karakteristikama koje uključuju veličinu, sastav lipida, broj fosfolipidnih dvoslojeva, fluidnost membrane i naboj na površini vezikula. Najčešće se u pripravi konvencionalnih liposoma koristi lecitin, odnosno smjesa fosfolipida u kojoj je najviše zastupljen fosfatidilkolin. Konvencionalni liposomi kratkotrajno se zadržavaju u cirkulaciji i većinom se koriste kao nosači lijekova u terapijskim sustavima za lokalnu primjenu na koži i sluznicama (Vanić, 2012a). Skupina konvencionalnih liposoma predstavlja prvu generaciju liposoma istraživanih za dermalnu primjenu lijekova. Konvencionalni liposomi primjenjuju se u terapijskim sustavima za lokalnu dostavu lijekova. Za dostavu lijekova u kožu pomoću konvencionalnih liposoma, ustanovljeno je da se postiže značajno veća koncentracija lijeka u u rožnatom sloju i gornjim slojevima epidermisa uz malu sistemsku apsorpciju čime je potvrđen lokalizirani terapijski učinak (Tabbakhian i sur., 2006). U svrhu dostave lijekova u dublje slojeve kože ili radi postizanja transdermalnog učinka, razvijeni su liposomi sastavljeni od elastičnih fosfolipidnih dvoslojeva, poput deformabilnih liposoma, propilenglikol liposoma i etosoma.

Deformabilni ili elastični, ultrafleksibilni, Transferosomi<sup>®</sup> su elastične vezikule u sastavu čije se membrane nalazi i jednolančani surfaktant, odnosno rubni aktivator, a čija je uloga narušavanje integriteta dvosloja što mu smanjuje kompaktnost i čvrstoću (rigidnost). Time se povećava elastičnost (deformabilnost) dvosloja. Kao rubni aktivatori najčešće se koriste natrijev kolat, natrijev deoksikolat, Span 60<sup>®</sup>, Span 65<sup>®</sup>, Span 80<sup>®</sup>, Tween 20<sup>®</sup>, Tween 60<sup>®</sup>, Tween 80<sup>®</sup> i dikalijev glicirizinat (Hussain i sur, 2017). Sastav deformabilnih liposoma može sadržavati i manju količinu etanola ( $\leq 10\%$ ) koji se dodaje u vodenu fazu pri izradi liposoma. Uz optimalni molarni omjer fosfolipida i surfaktanta, nastaju elastične vezikule kojima je očuvan integritet membrana. U slučaju kada je količina surfaktanta premala, vezikule nisu dovoljno elastične, a kod prevelike količine liposomi prelaze u micidele (Benson, 2006).

Ključna značajka deformabilnih liposoma je njihova sposobnost promjene oblika i deformacije kao odgovor na vanjske podražaje, kao što su promjene temperature ili mehanički stres. U usporedbi s građom konvencionalnih liposoma, surfaktant ugrađen u lipidne dvoslojeve deformabilnih liposoma može destabilizirati dvoslojeve i osigurati fleksibilnu membranu, koja omogućuje vezikulama da otvore izvanstanične putove među stanicama u *stratum corneum*, a zatim se deformiraju kako bi se provukli kroz te prolaze u dublje slojeve od kože (Zhang i sur., 2020). Dok se konvencionalni liposomi koriste kao spremišni sustavi s ciljem postizanja lokalnog učinka, deformabilni liposomi imaju mogućnost intaktnog prolaska kroz kožu radi čega mogu prenositi terapijske koncentracije lijeka (Cevc i Blume, 1992).

Propilenglikol liposomi noviji su tip elastičnih liposoma. Građeni su od fosfolipida, propilenglikola i vode. Propilenglikol je prisutan u unutarnjoj i vanjskoj vodenoj fazi liposoma, a ima ulogu (su)otapala za fosfolipide i lipofilni lijek, no može se dodati i kao dio vodene faze pri izradi liposoma. S obzirom na prisutnost propilenglikola u unutarnjoj vodenoj fazi, povećana je topljivost lijeka pa su u odnosu na konvencionalne i deformabilne liposome, propilenglikol liposomi okarakterizirani većom uspješnošću uklapanja djelatnih tvari (Palac i sur., 2014; Vanić i sur., 2014). Propilenglikol je prisutan i u fosfolipidnom sloju te ga čini fleksibilnijim.

Etosomi su fosfolipidne vezikule sastavljene od fosfolipida, vode i etanola (od 20 do 40 %). Radi visokog udjela etanola, etosomi su značajno manje veličine od konvencionalnih liposoma jednakog fosfolipidnog sastava. Razlog tome je etanol koji uzrokuje negativan naboj na površini, a to smanjuje veličinu liposomskih vezikula. Etosomi posjeduju visoku uspješnost uklapanja lijekova, pogotovo lipofilnih lijekova, radi multilamelarne građe vezikula i velikog udjela etanola koji povećava topljivost lijekova (Banović i sur., 2011). Etosomi, kao i deformabilni liposomi, pokazuju unaprijeđenu učinkovitost u (trans)dermalnoj isporuci lijekova (Elsayed i sur., 2007).

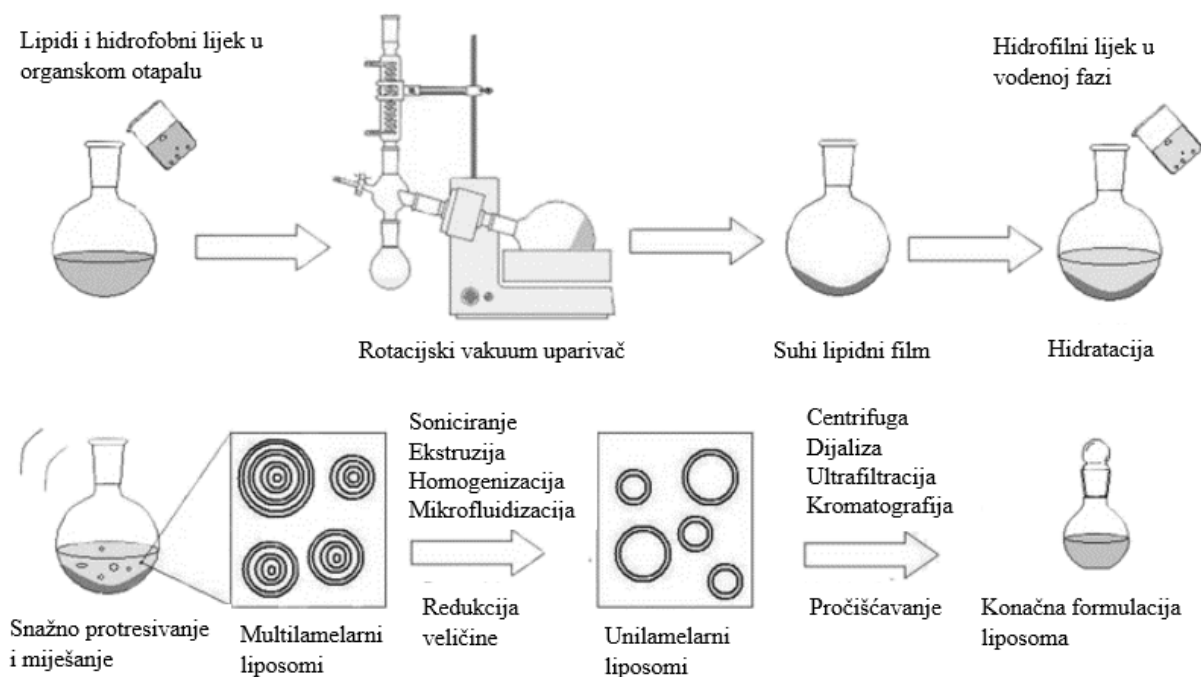
## **1.2. Priprema liposoma**

Metode izrade liposoma su mnogobrojne, a optimalna metoda pripreme liposoma je ona kojom nastaju liposomi s visokom uspješnosti uklapanja lijeka, a čija uporaba izbjegava štetna organska otapala. Važno je da je postupak pripreme liposoma jednostavan i reproducibilan. Odabirom odgovarajuće metode moguće je izraditi liposomske formulacije određenih svojstava poput veličine, lamelarnosti i sadržaja uklopljenog lijeka.

Gotovo sve metode uključuju tri ili četiri osnovne faze: uklanjanje organskog otapala u kojem su otopljeni fosfolipidi, dispergiranje fosfolipida u vodenom mediju, homogenizaciju liposomske suspenzije te analizu konačnog produkta. Prema načinu dispergiranja fosfolipida, metode pripreme liposoma mogu se podijeliti u tri skupine: fizičkog dispergiranja, dvofaznog dispergiranja i solubilizacije fosfolipida detergensom. U metode fizičkog dispergiranja spadaju metoda hidratacije suhog fosfolipidnog sloja, tzv. film metoda i metoda dehidratacije-rehidratacije, metoda pripreme liposoma visokotlačnom homogenizacijom kao i metoda smrzavanja-taljenja. U izradi liposoma postupcima dvofaznog dispergiranja fosfolipida, priprema se temelji na miješanju organskog otapala u kojem su otopljeni fosfolipidi, s vodenim medijem u kojem može biti otopljen hidrofilni lijek. U trećoj skupini, metodi solubilizacije detergensom, stvaranje liposoma posredovano je detergensima koji solubilizacijom fosfolipida omogućavaju lakši kontakt fosfolipida s vodom pri čemu nastaju miješane micle različite veličine i svojstva ovisno o detergensu. S obzirom na morfološka svojstva liposoma, postoji i mogućnost podjele na metode pripreme malih i velikih unilamelarnih liposoma (SUV, LUV), oligo- i multi-lamelarnih liposoma (OLV, MLV) te multivezikularnih liposoma (MLV) (Vanić, 2012a).

### **1.2.1. Metoda hidratacije suhog fosfolipidnog sloja**

Metoda hidratacije suhog fosfolipidnog sloja, tzv. *film metoda* je najčešći postupak izrade liposoma u laboratorijskim uvjetima. Metoda uključuje otapanje fosfolipida u organskom otapalu (diklormetan, kloroform, etanol ili smjesa kloroforma i metanola). Potom slijedi isparavanje pod vakuum pumpom na temperaturi 45-60 °C kojim se uklanja organsko otapalo nakon čega se formira suhi, tanki lipidni film (Lombardo i Kiselev, 2022). Lipidni film hidratira se odgovarajućim vodenim medijem (destilirana voda, fiziološka otopina i različiti puferi neutralnog pH) pri čemu se formiraju heterogeni liposomi multilamelarne strukture (MLV). Konačno, ekstruzijom kroz polikarbonatne membrane dobivaju se mali homogeni liposomi (Zhang, 2017).



**Slika 3.** Shematski prikaz izrade liposoma metodom hidratacije suhog fosfolipidnog filma, tzv. film metoda (preuzeto i prilagođeno prema Lopes i sur., 2013)

Ukoliko se za izradu liposoma koriste samo neutralni fosfolipidi (fosfatidiletanolamin, fosfatidilkolin), produkt su vezikule s malim vodenim odjeljcima. Ako se dodaju nabijeni fosfolipidi (fosfatidilglicerol, fosfatidilinozitol, fosfatidilserin ili fosfatidna kiselina), povećava se prostor unutarnje vodene faze zbog odbojnih interakcija, što naposljetku olakšava uklapanje hidrofилnih lijekova. Tijekom izrade liposoma film metodom potrebno je obratiti pozornost i na temperaturu koja mora biti iznad temperature faznog prijelaza ( $T_c$ ) fosfolipida koji su upotrijebljeni.

Multilamelarni liposomi pripremljeni film metodom poprilično su veliki (oko 10  $\mu\text{m}$ ) i visokog indeksa polidisperznosti što upućuje na heterogenost sustava. Radi toga, potrebna je daljnja obrada kako bi se postigao homogeni sustav. Proces homogenizacije može se provoditi ekstruzijom kroz polikarbonske membrane određenih veličina pora ili postupkom soniciranja nastaju homogeni pripravci oligolamelarnih (OLV) i unilamelarnih liposoma (ULV). Soniciranje se odvija u ultrazvučnoj kupelji ili pomoću ultrazvučne sonde, no zbog visoke energije sustava i mogućnosti pregrijavanja potrebno je postupak provoditi u posudi s ledom. Bitno je naglasiti kako u procesu smanjenja veličine multilamelarnih liposoma može doći i do gubitka dijela početno uklopljenog lijeka (Vanić, 2012a).

Ekstruzija liposoma posljednji je korak u procesu izrade liposoma. Kroz polikarbonske membrane definiranih veličina protiskuju se multilamelarni liposomi s ciljem dobivanja manjih, unilamelarnih liposoma pri čemu nastaje homogeni sustav glede veličine liposoma. Kako bi se spriječilo oštećenje membrane i gubitak lipida, postupak se prvo provodi pomoću membrane veće veličine pora, a nakon toga se liposomi protiskuju kroz membranu željenih veličina pora, odnosno željene veličine konačnih liposoma. Ekstruziju je bitno provoditi iznad temperature faznog prijelaz ( $T_c$ ) korištenih fosfolipida s obzirom da zbog rigidnosti liposomi ne bi mogli proći kroz pore membrane pri nižim temperaturama (Lombardo i Kiselev, 2022).

### 1.3. Hidrogelovi

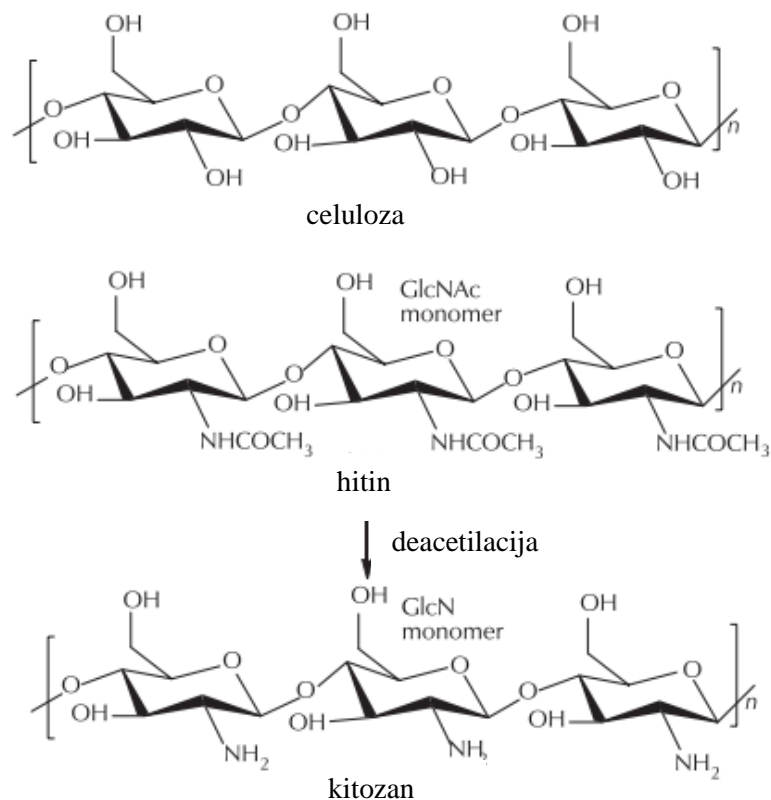
Hidrogelovi su trodimenzionalne umrežene polimerne strukture koje mogu apsorbirati i zadržati veliku količinu vode (Wang i sur., 2020). Sastavljeni su od krute komponente koju čini trodimenzionalna mreža povezanih molekula ili agregata koja imobilizira tekućinu u kontinuiranoj fazi. Spadaju u polukrute farmaceutsko-tehnološke oblike, a nastaju bubrenjem hidrofилnih polimera u vodi (derivati celuloze) ili bubrenjem i umrežavanjem hidrofилnih polimera u vodi (kitozan, derivati poliakrilne kiseline, alginat i dr.).

Polimeri koji tvore hidrogel u svojoj strukturi imaju hidrofилne funkcionalne skupine kao što su: amino ( $-NH_2$ ), hidroksilna ( $-OH$ ), amidna ( $-CONH-$ ,  $-CONH_2$ ) i sulfatna skupina ( $-SO_3H$ ). Hidrofилne skupine omogućuju hidrogelu da apsorbira vodu što rezultira širenjem hidrogela i zauzimanjem većeg volumena, a što je poznato kao proces bubrenja ili geliranja. Tijekom bubrenja, umrežena struktura hidrogelova sprječava otapanje i uništavanje poprečnih veza. Pod utjecajem fizičkih i kemijskih čimbenika (sastav otapala, pH i dr.), hidrogelovi mogu mijenjati svoj volumen (Ahmadi i sur., 2015).

Hidrogelovi se klasificiraju prema izvoru polimernog materijala, sastavu polimera, konfiguraciji, načinu umrežavanja polimernih lanaca i ukupnom naboju na lancima polimera (Ahmed, 2015). Ovisno o vrsti polimera dijele se na prirodne i sintetske. Prirodni hidrogelovi najčešće sadržavaju polisaharidne ili proteinske lance. Polisaharadni lanci mogu biti sastavljeni od polisaharida poput alginata, celuloze, hitina, kitozana, dekstrana, hijaluronske kiseline, pektina, škroba ili ksantan gume. Proteinski lanci u prirodnim hidrogelovima sadrže proteine kolagena, svile, keratina, elastina, rezilina i želatine. Sintetski hidrogelovi mogu biti sastavljeni od polivinil alkohola, poliakril amida, polietilen oksida i polietilen glikola. Prirodne polimerne mreže u usporedbi sa sintetskim imaju veću biokompatibilnost s obzirom da podliježu

enzimskoj biorazgradnji čime nastaju biokompatibilni međuprodukti. S druge strane, sintetski su polimeri stabilniji od prirodnih zbog manje podložnosti hidrolizi i sporije brzine razgradnje (Ahmadi i sur., 2015).

Hitin je, odmah nakon celuloze, najrasprostranjeniji polisaharid u prirodi. Sastoji se od jedinica glukozamina vezanih  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glikozidnom vezom, uz visoki stupanj N-acetilacije. Struktura hitina slična je celulozi, no za razliku od hidroksilne skupine koja je prisutna u molekulama celuloze, molekule hitina sadrže amino skupine (Slika 4). Hitin je žilav, neelastičan i netopljiv u vodenom mediju zbog velikog broja vodikovih veza koje nastaju među acetamidnim skupinama susjednih polimernih lanaca. Hitin je primarna sirovina za proizvodnju komercijalno značajnijeg kitozana (Skendrović i sur., 2023).



**Slika 4.** Kemijska struktura celuloze, hitina i kitozana (preuzeto i prilagođeno prema Skendrović i sur., 2023)

### 1.3.1. Kitozanski hidrogelovi

Kitozan je prirodni linearni polimer koji se dobiva djelomičnom alkalnom deacetilacijom netopljivog hitina, a polisaharidna struktura kitozana sastoji se od  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glukozamina i N-acetil-D-glukozamina povezanih beta-1,4-glikozidnom vezom.

Kitozan postoji u različitim molekularnim masama i stupnjevima acetilacije, pri čemu prosječna molekularna masa kitozana iznosi između 50 i 2000 kD. Kitozan je jedini kationski polimer prirodnog porijekla koji je biorazgradiv, biokompatibilan i netoksičan što ga čini pogodnim za primjenu u oblikovanju farmaceutskih i kozmetičkih pripravaka (Ahmadi i sur., 2015).

Tijekom deacetilacije hitina, neke molekule N-acetilglukozamina prelaze u jedinice glukozamina. Zbog velike količine protoniranih amino skupina u kitozanskoj strukturi, pKa vrijednost kitozana iznosi otprilike 6,5, što znači da je pozitivno nabijen u kiselim i neutralnim otopinama. Kada je otprilike 50 % amino skupina protonirano, kitozan postaje topljiv. Kitozan je topljiv u organskim kiselinama uz pH manji od 6, dok je u vodi, alkalnom mediju i organskim otapalima netopljiv. Topljivost kitozana ovisi o različitim čimbenicima poput molekularne mase polimera, stupnju acetilacije, pH, temperaturi i polimorfnoj strukturi (Aranaz i sur., 2021). Kitozan je radi nabijenih amino skupina podložan kemijskim modifikacijama pa je tako moguće kovalentno vezanje različitih funkcionalnih skupina na kitozanski skelet, čime se može utjecati na ograničenu topljivost kitozana u vodi (Nilsen-Nygaard i sur., 2015).

Kitozanski hidrogelovi građeni su od prepoznatljive trodimenzionalne hidrofilne polimerne mreže polimernih lanaca kitozana, koja može apsorbirati velike količine vodenih i bioloških tekućina bez otapanja (Wang i sur., 2012). Postoji više metoda dobivanja kitozanskih gelova, a uglavnom uključuju fizičko (nekovalentno) umrežavanje kitozanskih polimera ili kemijsko (kovalentno) poprečno povezivanje (eng. *cross linking*). Kovalentnim poprečnim povezivanjem nastaju podloge jačih mehaničkih svojstava i bolje kemijske stabilnosti, dok fizički umreženi gelovi kitozani pokazuju niži stupanj robusnosti (Thirupathi i sur., 2022).

Kitozanske podloge, uključujući kitozanske hidrogelove, koriste se kao sustavi za dermalnu, oralnu, okularnu, nazalnu, bukalnu, vaginalnu i rektalnu primjenu lijekova (Gupta i sur., 2002). Zahvaljujući izvjesnom bakteriostatskom i hemostatskom djelovanju, zaštitnom učinku na kožu te svojstvima bioadhezivnosti, biorazgradljivosti, biokompatibilnosti, najčešće se primjenjuju kao nosači za dermalnu dostavu lijekova (Elviri i sur., 2010; Bhattarai i sur., 2010). Kitozanske podloge namijenjene topikalnoj primjeni na kožu pokazali su povoljan učinak na zacjeljivanje rana i smanjenje upale budući da se vezanjem N-acetil-D-glukozamina na receptore povećava aktivnost makrofaga te aktivira sustav komplementa (Ahmadi i sur., 2015). Antimikrobna aktivnost kitozanskih podloga ovisi o temperaturi, pH i vremenu skladištenja (Goy i sur., 2009). Primjerice, u lužnatom mediju, kitozan je slabo topljiv i njegove amino skupine tada nisu nabijene. Stoga je inhibitorno djelovanje kitozana na bakterije i gljivice

izraženije u kiselom pH području (Kong i sur., 2010). Na biološki učinak kitozana utječu njegova molekularna masa i stupanj deacetilacije. Pokazano je da kitozan niske molekularne mase i manjeg stupnja deacetilacije ima veći učinak na redukciju rasta i replikacije mikroorganizama, dok kitozan visoke molekularne mase i većeg stupnja deacetilacije bolje djeluje na zacjeljivanje rana (Alsarra, 2009).

### **1.3.2. Liposomi uklopljeni u hidrogelove**

Liposomi u svom izvornom obliku tekuće disperzije mogu biti neprikladni za primjenu na kožu radi kratkog vremena zadržavanja na mjestu primjene. Iz tog razloga, liposomi se mogu uklopiti u prikladnu podlogu koja mora biti kompatibilna sa sastavom liposoma i putem primjene. Uklapanjem liposoma u podlogu utječe se na profil oslobađanja uklopljene djelatne tvari iz liposoma što utječe na bioraspoloživost liposomskog lijeka, a naposljetku i na terapijski učinak samog lijeka, odnosno djelatne tvari (Hurler i sur., 2013).

Iako i hidrogelovi kao podloge često pokazuju brzo otpuštanje lijeka iz matriksa gela, kombinacija hidrogela s lipidnim nosačima djelatne tvari, kao što su liposomi, mogla bi spriječiti takvo brzo oslobađanje lijeka (Peers i sur., 2020). Dosadašnja istraživanja pokazuju znatno sporije oslobađanje djelatne tvari iz liposoma uklopljenih u hidrogelove u usporedbi s običnim hidrogelovima koji sadrže analognu koncentraciju slobodnog neliposomskog lijeka (Jøraholmen i sur., 2019). No, uklapanje nosača lijekova u polučvrste farmaceutske oblike, kao što su hidrogelovi, predstavlja izazov u topikalnoj terapiji. Potencijal liposomskih vezikula da dostave lijek na/u kožu, kao i njihova mobilnost, ovise o interakciji liposoma s podlogom. Pretpostavlja se da liposomi povećavaju makroviskoznošću te mijenjaju reološka i strukturna svojstva hidrogela (Hurler i sur., 2012), što znači da formulacije liposomi-u-hidrogelu pokazuju različita svojstva od izvornog hidrogela.

## **1.4. Reologija**

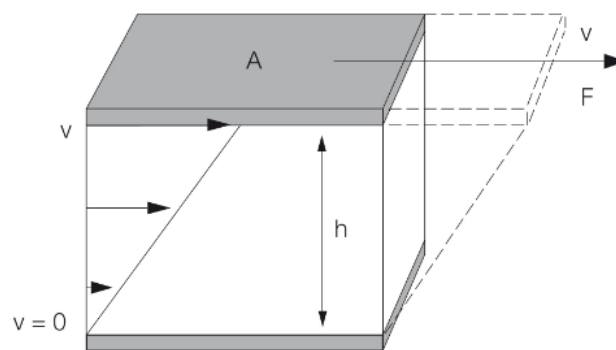
Reologija predstavlja znanstvenu disciplinu koja proučava tečenje materijala i/ili njegovu deformaciju pri djelovanju neke vanjske sile. Ispitivanjem reoloških svojstava dobiva se uvid u strukturu materijala, provjerava se kontrola i prihvatljivost sirovina i konačnih produkata u procesu proizvodnje. S obzirom da promjena nekog parametra može promijeniti reologiju cijelog sustava, bitno je da svaki farmaceutski oblik bude formuliran na način da primjereno podržava uobičajene manipulacije, a da se pritom reološki ne promijeni (Budai i sur., 2023).



Za definiranje reoloških parametara potrebnih za karakterizaciju svojstva tečenja koristi se model dviju ploča (Slika 5). Smicanje se primjenjuje na uzorak između dviju ploča od kojih je donja, nepomična ploča postavljena na kruti nosač, a gornja se ploča pomiče paralelno s donjom.



**Slika 5.** Model dviju ploča (preuzeto iz <https://www.anton-paar.com>)



**Slika 6.** Izračun smičnih naprezanja i brzine smicanja korištenjem modela dviju ploča s površinom smicanja  $A$ , širinom razmaka  $h$ , silom smicanja  $F$  i brzinom  $v$  (preuzeto iz <https://www.anton-paar.com>)

Kako bi se pomoću prikazanih modela mogla izračunati viskoznost, potrebno je definirati pojmove koji opisuju smično tečenje (eng. *shear flow*), odnosno tečenje fluida (jednostavnih tekućina i razrijeđenih otopina) pri laminarnom strujanju. Sila  $F$  (eng. *shear force*) djeluje na sloj površine  $A$ , tako da se on na udaljenosti  $h$  od nepomičnog sloja giba brzinom  $v$  (Slika 6). Iz toga proizlazi smično naprezanje  $\tau$  (eng. *shear stress*) koje se računa prema formuli:

$$\tau = \frac{F}{A}$$

u kojoj je  $F$  sila smicanja (eng. *shear force*). Reometar bilježi silu smicanja preko zakretnog momenta na svakoj mjernoj točki. Brzina smicanja  $D$  (eng. *shear rate*) definirana je jednadžbom:

$$D = \frac{v}{h}$$

pri čemu je reometar mjeri kao brzinu vrtnje u svakoj mjernoj točki. Viskoznost  $\eta$  se definira trenjem između slojeva fluida, a prikazuje se kao omjer smičnog naprezanja i brzine smicanja:

$$\eta = \frac{\tau}{D}$$

Parametri smično naprezanje, brzina smicanja i viskoznost mogu se precizno mjeriti samo iz preduvjet postojanja laminarnog i jednolikog strujanja, što znači da u slučaju turbulentnog strujanja s vrtlozima, mjerenje istih nije moguće (Macosko, 1994).

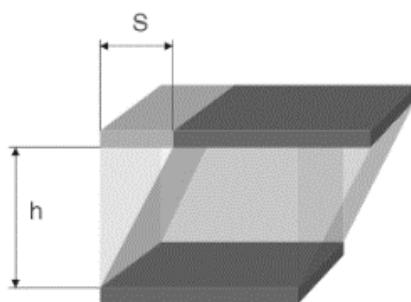
#### 1.4.1. Rotacijski i oscilacijski testovi

U mjerenju reoloških svojstava koriste se različiti tipovi instrumenata poput viskozimetara i reometara, koji rade na različitim principima. Rotacijski reometar omogućuje odabir između nekoliko principa rada, uz mogućnost prilagodbe sile smicanja i brzine smicanja pri mjerenjima. Kao takvi, rotacijski reometri pogodni su za materijale čija je brzina smicanja ovisna o vremenu, npr. tiksotropni materijali (Barnes, 2000).

Reološka karakterizacija može biti ispitana pomoću rotacijskih testova gdje se mjerenjem momenta sile i brzine rotacije dobivaju podaci o smičnom naprezanju i brzini smicanja. Pritom nastaje krivulja tečenja (reogram) koji pokazuje ovisnost smičnog naprezanja o brzini smicanja, ili krivulja koja opisuje ovisnost viskoznosti o brzini smicanja.

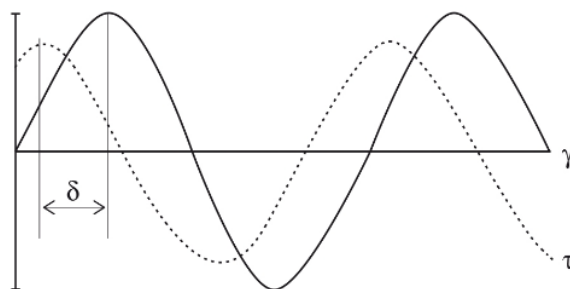
Ponašanje viskoelastičnih sustava okarakterizirano je viskozim protokom i elastičnom deformacijom pri smicanju. Za takve sustave koriste se oscilacijski testovi. U oscilacijske testove ubrajaju se test promjene amplitude (eng. *amplitude sweep*), test promjene frekvencije (eng. *frequency sweep*), test promjene temperature (eng. *temperature sweep*) i vremenski test (eng. *time sweep*). Test promjene amplitude koristi se za utvrđivanje ponašanja uzorka pri uvjetima u kojima nije narušena struktura te za utvrđivanje linearnog viskoelastičnog područja (eng. *linear viscoelastic range, LVR*) (Willenbacher i Georgieva, 2013).

Model dviju ploča za oscilacijske testove uključuje šipku montiranu na pogonski kotač koja pomiče gornju ploču naprijed i natrag, paralelno s donjom pločom, sve dok se okreće kotač. Pri konstantnoj brzini vrtnje, takav model radi na odgovarajućoj konstantnoj frekvenciji osciliranja. Duljina otklona gornje, pomične ploče (Slika 7) mjeri se reološki i procjenjuje kao parametar smična deformacija  $\gamma$  (eng. *shear deformation*) opisana jednadžbom:  $\gamma=S/h$ .



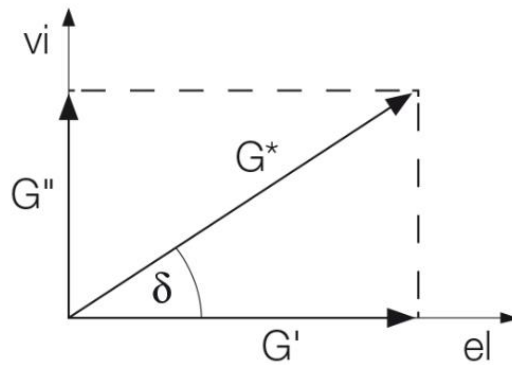
**Slika 7.** Prikaz modela s dvije ploče za definiranje smične deformacije pri čemu je  $S$  duljina otklona, a  $h$  širinom razmaka (preuzeto iz <https://www.anton-paar.com>)

Pomicanjem pogonskog kotača, deformacija prikazana u odnosu na vrijeme rezultira sinusoidom s amplitudom deformacije. Stoga su parametri za oscilacijske testove obično unaprijed postavljeni u obliku sinusoidne krivulje. Ona je određena svojom amplitudom, tj. maksimalnim otklonom i periodom oscilacije, a frekvencija titranja recipročna je vrijednosti perioda oscilacije (Slika 8).



**Slika 8.** Oscilacijski test za viskoelastično ponašanja, prikazan kao sinusoida u odnosu na vrijeme. S prisutnom deformacijom  $\gamma$  i rezultirajućim smičnim naprezanjem  $\tau$ , uz fazni pomak  $\delta$  (preuzeto iz <https://www.anton-paar.com>)

U oscilacijskim testovima definiran je modul smicanja  $G$  (eng. *shear modulus*):  $G = \tau/\gamma$ . Iz faznog pomaka  $\delta$  određena je oscilacija za svaku mjernu točku te je u tom kutu, koji je uvijek između  $0^\circ$  i  $90^\circ$ , smješten kompleksni modul smicanja  $G^*$ . Ovaj parametar opisuje ukupno viskoelastično ponašanje uzorka. Dio vrijednosti kompleksnog modula smicanja koji se proteže duž x-osi predstavlja elastični dio viskoelastičnog ponašanja modul pohrane  $G'$ , dok dio vektora  $G^*$  projiciranog na y-os prikazuje viskozni dio, odnosno modul gubitka  $G''$  (Slika 9).

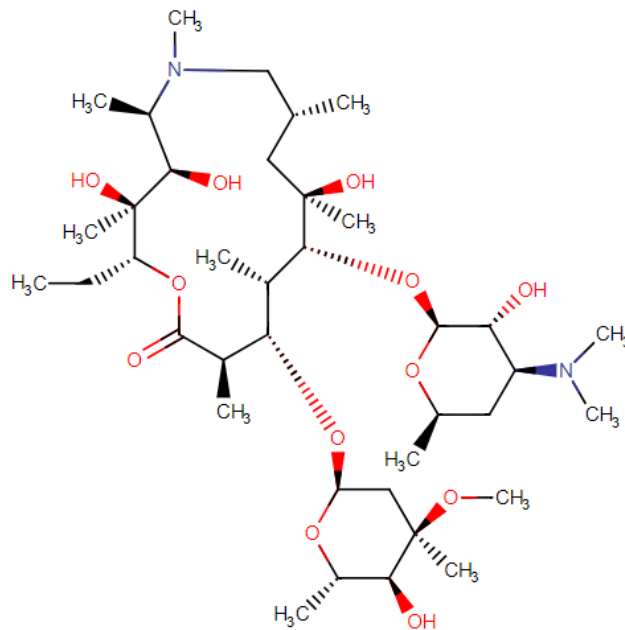


**Slika 9.** Vektorski prikaz odnosa kompleksnog modula smicanja  $G^*$ , modula pohrane  $G'$  i modula gubitka  $G''$  uz fazni pomak  $\delta$  (preuzeto iz <https://www.anton-paar.com>)

Faktor gubitka ili faktor prigušenja  $\tan(\delta)$  predstavlja omjer modula gubitka  $G''$  i modula pohrane  $G'$ . U slučaju idealnog elastičnog ponašanja,  $\delta = 0^\circ$  i nema viskozno dijela, dok je pri idealnom viskoznom ponašanju  $\delta = 90^\circ$ .

### 1.5. Azitromicin

Azitromicin je polusintetski makrolidni antibiotik širokog spektra koji spada u skupinu azalida. To je bijeli amorfni prah, gorkog okus, bez mirisa i slabe topljivosti u vodi. Kemijsko ime azitromicina je 9-deoksi-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A (Slika 10). Azitromicin je sintetiziran uvođenjem atoma dušika na laktonski prsten eritromicina A, koji se naknadno metilira. Mehanizam djelovanja azitromicina uključuje supresiju sinteze bakterijskih proteina vezanjem na 50S podjedinicu ribosoma i inhibiciju translokacije peptida. Veže se na isti receptor kao i eritromicin, no afinitet vezanja je veći kod azitromicina (Heidary i sur., 2022)



**Slika 10.** Struktura azitromicina (preuzeto iz <https://go.drugbank.com/>)

Azitromicin posjeduje jedinstvena farmakokinetička svojstva. Za azitromicin karakteristična je niska koncentracija lijeka u plazmi, a visoka i dugotrajna koncentracija u tkivima. Nakon peroralne primjene, apsorpcija je brza, ali nepotpuna pa stoga bioraspodjeljivost iznosi otprilike 37 %. Vršne koncentracije lijeka u plazmi postižu se kroz 2 do 3 sata nakon primjene lijeka. Oralno primijenjen lijek brzo se raspodjeljuje u sva tkiva i snažno se veže na njih. Koncentrira se unutar fagocita što omogućava visoke koncentracije lijeka na mjestu infekciju. U usporedbi s ostalim makrolidima, azitromicin ne inhibira i ne stimulira citokrom P-450 te ne stupa u interakcije s lijekovima koji se metaboliziraju citokromima. Metabolizira se gotovo nepromijenjen, stolicom, a manji dio (oko 10 %) mokraćom. Taj podatak omogućuje primjenu azitromicina i kod pacijenata s bubrežnom insuficijencijom. Metabolizmom azitromicina, reakcijama N-demetilacije, O-demetilacije i hidrolize nastaje 10 metabolita za koje nije poznato da imaju antibakterijski učinak. Azitromicin se iz organizma eliminira sporo s poluvremenom eliminacije od 70 h, radi čega je primjena azitromicina ograničena na 3 dana po 500 mg/dan. U takvom se režimu doziranja postiže terapijski učinak jednak onome kod primjene penicilina kroz 10 dana (Francetić, 2015).

Osim izravnog antibakterijskog, azitromicin djeluje protuupalno i imunomodulatorno na imunski sustav organizma pri čemu dolazi do smanjenja lokalnog upalnog odgovora. Azitromicin postiže povoljan efekt kliničkog izlječenja i smanjenja komplikacija djelovanjem neutrofila i kemokina te mehaničkim utjecajem na razrjeđenje sluzi, adherenciju bakterija i

stvaranje biofilma, osobito pri infekcijama uzrokovanim *Pseudomonas aeruginosa* (Kuzman, 2018).

Indiciran je u liječenju infekcija gornjih dišnih putova (faringitis, tonzilitis, *otitis media* i sinusitis), donjih dišnih putova (akutna egzacerbacija kroničnog bronhitisa, izvanbolnički stečena pneumonija), infekcije kože i potkožnog tkiva, kao i za bolesti uzrokovane spolno-prenosivim bakterijama poput *Chlamydia trachomatis* i *Neisseria gonorrhoeae*. Azitromicin je dostupan u oblicima za oralnu, oftalmičku i parenteralnu primjenu. Unatoč indiciranosti azitromicina u oralnoj terapiji kožnih infekcija, na hrvatskom tržištu dosada nije registriran nijedan topikalni pripravak azitromicina za lokalnu primjenu na kožu.

Primjena liposomski inkapsuliranih antibiotika predstavlja obećavajući način za poboljšanu dostavu lijeka do bakterijskih stanica i biofilмова. Zahvaljujući fosfolipidnom sastavu te mogućnosti podešavanja fizikalno-kemijskih svojstava liposoma, kao što su sastav dvoslojeva, fluidnost, veličina i površinski naboj, moguć je razvoj liposoma s uklopljenom djelatnom tvari za lokalnu terapiju (Škalko-Basnet i Vanić, 2017). Azitromicin je dostupan u obliku dihidrata, a karakterizira ga ograničena topljivost u vodi. Uklapanje azitromicina u liposome povećava njegovu topljivost te omogućava produljeno oslobađanje azitromicina, a posljedično i veću lokalnu koncentraciju lijeka (Vanić i sur., 2019).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Sistemske antibiotici učinkovito liječe kožne infekcije, ali s većim brojem i učestalošću nuspojava te sve češćom pojavom antibiotske rezistencije. Lokalnom primjenom antibiotika omogućeno je postizanje visoke koncentracije djelatne tvari izravno na zahvaćenom području, uz manje nuspojava. Posljednjih se desetljeća sve veća pozornost posvećuje razvoju novih terapijskih sustava koji se temelje na nanočesticama, a čijom bi se primjenom savladali nedostaci klasičnih terapijskih sustava. Među novim terapijskim sustavima ističu se liposomi, (fosfo)lipidne vezikule koje se smatraju biokompatibilnim, biorazgradivim, netoksičnim i neimunogenim nanočesticama s obećavajućim svojstvima poput kontroliranog oslobađanja djelatne tvari, zaštite lijeka u biološkom okruženju te postizanja ciljanog djelovanja. U ovom je radu antibiotik azitromicin uklopljen u različite lipidne vezikule koje su potom umiješane u kitozanski hidrogel, s ciljem postizanja prikladnije viskoznosti pripravka za lokalnu primjenu na kožu, što se potencijalno može pozitivno odraziti na bolje zadržavanje pripravka na mjestu primjene, kontrolirano oslobađanje lijeka te unaprjeđenje antimikrobnog učinka lijeka. Budući da dodatak tekuće liposomske disperzije može bitno utjecati na reološka svojstva izvornog kitozanskog gela, kao i njegov pH, provedena je reološka karakterizacija i ispitivanje pH dobivenih formulacija liposomi-u gelu, a u svrhu procjene prikladnosti formulacija za topikalnu primjenu na kožu te procjenu njihove stabilnosti tijekom skladištenja.



### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Materijali

Prilikom izrade liposoma korištene su sljedeće tvari:

- Lipoid S75, sojin lecitin sa 75 % fosfatidilkolina (Lipoid GmbH, Njemačka)
- Dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC) (Lipoid GmbH, Njemačka)
- dimetildioktadecilamonijev bromid (DODAB) (Sigma-Aldrich, Sjedinjene Američke Države)
- natrijev deoksikolat (SDCh) (Sigma-Aldrich, Sjedinjene Američke Države)
- propilenglikol (Kemig, Hrvatska)
- azitromicin dihidrat (PLIVA Hrvatska Ltd, Hrvatska)
- kitozan visoke molekularne mase (eng. *high molecular weight*, HMW) (Fluka, Njemačka)
- koncentrirani etanol (Kemika, Hrvatska)
- fosfatni pufer (0,01 M, pH 7,5) pripremljen otapanjem 1,3609 g kalijevog dihidrogenfosfata (Kemika, Hrvatska) u 1000 mL pročišćene vode i podešavanjem pH do 7,5 s 10 M kalijevim hidroksidom, nakon čega je filtriran kroz celuloza-nitratni filter veličine pora 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech, Njemačka)
- pročišćena voda

Za pripremu liposoma upotrijebljeni su sljedeći pribor i instrumenti:

- celuloza-acetatne membrane 0,2 µm (Sartorius, Njemačka)
- filteri veličine pora 0,22 µm Minisart (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Njemačka)
- filteri veličine pora 0,45 µm Minisart (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Njemačka)
- rotirajući vakuum uparivač Büchi Rotavapor R-200 (Büchi Labortechnik AG, Švicarska)
- Zetasizer 3000 HS Malvern (Malvern Instruments, Velika Britanija)
- pH metar (Mettler-Toledo, Švicarska)
- ručni mini-ekstruder (LiposoFast, Kanada)
- ultracentrifuga Beckman Optima LE-80K Ultracentrifuge (Beckman Coulter Inc., Sjedinjene Američke Države)
- modularni reometar Physica MCR 102 (Anton Paar, Austrija)

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Izrada liposoma

Sve liposomske formulacije s uklopljenim azitromicinom (AZT-liposomi): konvencionalni (CL), deformabilni (DL), propilenglikol liposomi (PGL) i kationski liposomi (CATL), pripremljeni su metodom hidratacije suhog fosfolipidnog sloja, tzv. film metodom (Vanić, 2012b).

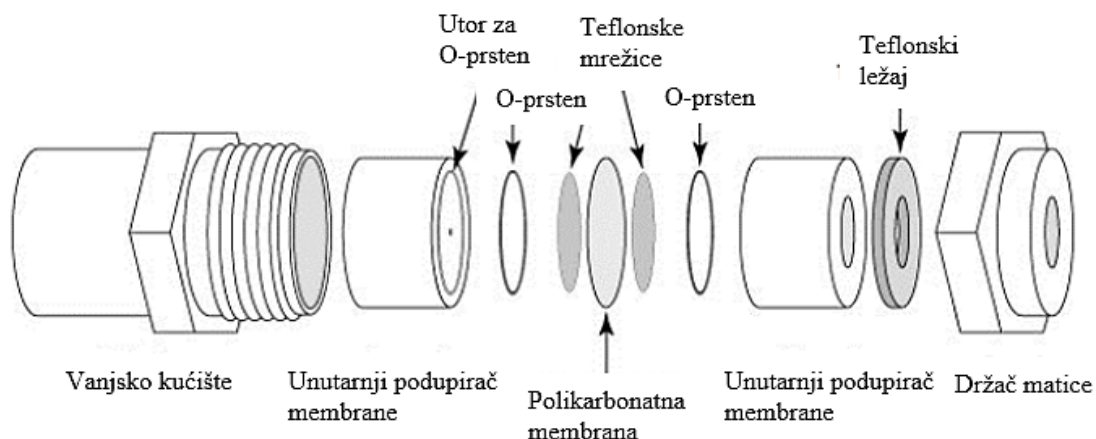
Odgovarajuće mase lipida i azitromicina (Tablica 1) otopljene su u tikvici okruglog dna dodatkom 5 ml koncentriranog etanola. Etanol je potom uklonjen uparavanjem pomoću rotacijskog vakuumskeg uparivača uz vodenu kupelj termostatiranu na 40 °C, odnosno 60 °C za formulaciju CATL. Vakuum pumpom postepeno je smanjivan tlak u sustavu do potpunog uklanjanja etanola radi dobivanja suhog, tankog lipidnog filma. Lipidni film je hidratiziran pomoću 5 ml fosfatnog pufera, uz snažno protresivanje kako bi došlo do spontanog nastajanja multilamelarnih liposoma. Za izradu PGL-a u fosfatni je pufer dodano 10 % (m/m) propilenglikola.

**Tablica 1.** Sastav liposomskih formulacija s azitromicinom

Liposomska formulacija	S75 (mg)	SDCh (mg)	PG (mg)	DPPC (mg)	DODAB (mg)	AZT (mg)
CL	100	/	/	/	/	15
DL	85	15	/	/	/	15
PGL	100	/	500	/	/	15
CATL	/	/	/	73	27	15

AZT, azitromicin; CATL, kationski liposomi; CL, konvencionalni liposomi; DL, deformabilni liposomi; DODAB, dimetildioktadecilamonijev bromid; DPPC, dipalmitoilfosfatidilkolin; PG, propilenglikol; PGL, propilenglikol liposomi; S75, sojin lecitin; SDCh, natrijev deoksikolat

Dobivene liposomske formulacije ekstrudirane su jednom kroz polikarbonatne membrane promjera 400 nm i tri puta kroz polikarbonatne membrane promjera 200 nm pomoću ručnog mini-ekstrudera (Slika 11). Pritom je ekstruzija CATL-a izvođena pri 55 °C prethodnim zagrijavanjem liposomske disperzije i ručnog mini-ekstrudera u vodenoj kupelji.



**Slika 11.** Shematski prikaz ručnog ekstrudera  
(preuzeto i prilagođeno prema [www.funakoshi.co.jp](http://www.funakoshi.co.jp))

### 3.2.2. Određivanje srednjeg promjera i indeksa polidisperznosti liposoma

Liposomske formulacije s uklopljenim azitromicinom analizirane su na instrumentu Zetasizer Ultra (Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo) metodom fotonske korelacijske spektroskopije. U jednokratne kivete DTS1070 (Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo) dodano je po dvije kapi uzorka liposoma, a potom razrijeđeno s 1 mM otopinom NaCl, koja je prethodno filtrirana kroz membranski filter veličine pora 0,22  $\mu\text{m}$  radi uklanjanja mogućih onečišćenja i čestica. Uzorci su mjereni pri kutu detekcije od 90 ° i temperaturi od 25 °C. Uzorci su izmjereni u triplicatima te je izračunata srednja vrijednost i standardna devijacija. Mjerenja su provedena prije i nakon postupka ekstruzije.

### 3.2.3. Izrada kitozanskog gela i formulacija liposomi-u-gelu

Kitozanski gel izrađen je dispergiranjem 2,5 g kitozana visoke molekulske mase (eng. *high molecular weight*, HMW) u 10 g propilenglikola i 37,5 g 3,5%-tne otopine mliječne kiseline uz intenzivno miješanje staklenim štapićem. Kitozanska disperzija potom je soniciran na ultrazvučnoj kupelji Branson 1210 (Branson Ultrasonics, Sjedinjene Američke Države) tijekom 60 minuta. Nakon toga dodana je pročišćena voda do ukupne mase od 100 g te je kitozanska disperzija pokrivena parafilmom i ostavljena na sobnoj temperaturi kako bi potpuno izbubrla u idućih 48 sati formirajući kitozanski hidrogel.

U izbubreni kitozanski gel umiješani su AZT-liposomi u koncentraciji 30 % (m/m; liposomi/gel), a na isti način pripremljena je i kontrola u koju je umjesto AZT-liposoma uklopljena otopina azitromicina (AZT-otopina) u istoj koncentraciji i masenom udjelu kao i kod AZT-liposoma u gelu (30 %, m/m). Nakon pripreme formulacija lipoosmi-u-gelu, isti su prije daljnjih ispitivanja centrifugirani (3000 okr/min, 3 min) s ciljem uklanjanja uklopljenog zraka. U reološkim ispitivanjima i pH mjerenjima analizirani su i kitozanski gel bez uklopljenih liposoma (izvorni gel) te kitozanski gel s uklopljenom AZT-otopinom (kontrola).

#### **3.2.4. Reološka karakterizacija formulacija**

Reološka karakterizacija formulacija liposomi-u-gelu provedena je na modularnom reometru MCR 102 (Anton Paar, Austrija), pomoću mjernog tijela PP25 (*Parallel Plate 25*) i temperaturne ploče P-PTD200. Udaljenost između mjernog tijela i temperaturne ploče u svim je mjerenjima postavljena na 1 mm. Na ovaj način provedena su mjerenja svih liposomskih formulacija, kao i mjerenja za izvorni kitozanski gel i kontrolu (AZT-otopina uklopljena u kitozanski gel). Za reološku karakterizaciju navedenih formulacija provedeni su rotacijski testovi kojima je ispitan profil viskoznosti (eng. *flow curves*) te oscilacijski testovi, točnije test promjene amplitude (eng. *amplitude sweep*).

Rotacijska ispitivanja provedena su u rasponu brzine smicanja od 0,1 do 1000 s<sup>-1</sup> uz 15 mjernih točaka te logaritamski postavljeno trajanje u svakoj točki od 100 do 1 s. Oscilacijski testovi promjene amplitude provedeni su primjenom kutne frekvencije od 10 s<sup>-1</sup> u rasponu smičnih deformacija od 0,1–1000 %, kroz 25 mjernih točaka. Sva su mjerenja provedena u triplicatu, pri temperaturama 25 °C i 34 °C. Podaci su dokumentirani i analizirani softverom za reometar RheoCompass TM Light (Anton Paar GmbH).

#### **3.2.5. Ispitivanje pH formulacija**

Ispitivanje pH formulacija liposomi-u-gelu, izvornog kitozanskog gela i kontrole provedeno je na pH-metru (Mettler Toledo, Švicarska) uz korištenje elektrode za polukrute pripreme. Prije mjerenja, pH-metar je kalibriran na 25 °C korištenjem standardnih puferских otopina (pH 4,0, pH 7,0 i pH 9,0). Provedena su tri uzastopna mjerenja za svaki uzorak pri temperaturi od 25 °C.

### **3.2.6. Ispitivanje stabilnosti formulacija tijekom skladištenja**

Pripremljene formulacije liposomi-u-gelu, kao i izvorni kitozanski gel te kontrola, pohranjeni su u hladnjak pri 4 °C te im je nakon 30 dana provedeno ispitivanje pH i reološka karakterizacija na način opisan u poglavljima 3.2.4. i 3.2.5.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1. Veličina i polidisperznost AZT-liposoma

Fizikalno-kemijska svojstva liposoma (veličina, polidisperznost, zeta potencijal) imaju velik utjecaj na učinkovitost i dopremu djelatne tvari (Vanić i sur., 2021). U eksperimentalnom dijelu ovog rada izmjereni su srednji promjer i indeks polidisperznosti za sve formulacije AZT-liposoma (CL, DL, PGL i CATL). Metodom fotonske korelacijske spektroskopije izmjereni su srednji promjer i indeks polidisperznosti 24 sata nakon izrade liposoma, prije i nakon postupka ekstruzije. Rezultati provedenih mjerenja prikazani su u Tablici 2.

**Tablica 2.** Fizikalno-kemijska karakterizacija AZT-liposoma

Liposomska formulacija	Srednji promjer (nm)		Indeks polidisperznosti	
	Prije ekstruzije	Nakon ekstruzije	Prije ekstruzije	Nakon ekstruzije
CL	985 ± 75	184 ± 11	0,905 ± 0,071	0,148 ± 0,011
DL	894 ± 28	178 ± 45	0,992 ± 0,134	0,123 ± 0,111
PGL	1028 ± 12	109 ± 1	0,679 ± 0,051	0,136 ± 0,011
CATL	1821 ± 9	238 ± 17	0,808 ± 0,106	0,371 ± 0,121

CATL, kationski liposomi; CL, konvencionalni liposomi; DL, deformabilni liposomi; PGL, propilenglikol liposomi. Mjerenja su provedena u triplicatu. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju (S.D.).

Pripravom liposoma metodom hidratacije fosfolipidnog sloja nastaju veliki multilamelarni liposomi visokog indeksa polidisperznosti (Torchilin i Weissig, 2003). Stoga su liposomske formulacije prije ekstruzije bile većeg srednjeg promjera uz širok raspon veličina među različitim formulacijama. CL i DL pokazale su nešto manji srednji promjer neekstrudiranih formulacija od približno 900 nm. PGL su pokazali nešto veći srednji promjer neekstrudiranih liposoma (1028 nm), dok su CATL bili najveći sa srednjim promjerom od 1821 nm. Indeksi polidisperznosti izvorno pripremljenih AZT-liposoma bili su visoki za sve formulacije (> 0,679) potvrđujući značajnu heterogenost pripremljenih vezikula.



Postupkom ekstruzije značajno su smanjene vrijednosti srednjih promjera i indeksa polidisperznosti svih formulacija liposoma. Srednji promjeri ekstrudiranih PGL bili su najmanji (109 nm), CL i DL bili su u rasponu od 178 do 183 nm. Najveći su srednji promjer imali CATL (238 nm) što je bilo i očekivano s obzirom na sastav u kojem se nalaze DPPC i DODAB, koji utječu na višu  $T_c$  lipidnih dvoslojeva (Ulrich, 2002) u odnosu na S75 koji korišten u izradi ostalih liposomskih formulacija s azitromicinom. Optimiziranjem veličine liposoma moguće je postići ravnotežu između količine lijeka koja se može uklopiti u liposome i veličine liposomskih vezikula. Pritom, spomenute vrijednosti trebaju biti u skladu s ciljanim putem primjene i dostave lijeka. U dosadašnjim istraživanjima, pokazano je da su liposomi srednjeg promjera do 300 nm optimalni za dermalnu primjenu lijeka (Hurler i sur., 2012), iz čega proizlazi da je srednji promjer svih formulacija AZT-liposoma nakon postupka ekstruzije bio u prikladnom rasponu veličina za dermalnu primjenu lijeka (do 300 nm). Također, liposomi čiji je raspon srednjih promjera unutar navedenog pokazuju povoljnije zadržavanje u višim slojevima kože (Rukavina i sur., 2019).

Indeks polidisperznosti nakon ekstruzije za CATL (0,371) bio je veći u usporedbi s ostalim AZT-liposomima (od 0,123 do 0,248). Iako je srednji promjer deformabilnih liposoma bio manji u odnosu na konvencionalne liposome, indeks polidisperznosti nije bio veći kao u dostupnoj literaturi unatoč prisutnosti rubnog aktivatora u fosfolipidnom dvosloju deformabilnih liposoma, a čija je funkcija povećanje fleksibilnosti membrane (Palac i sur., 2014).

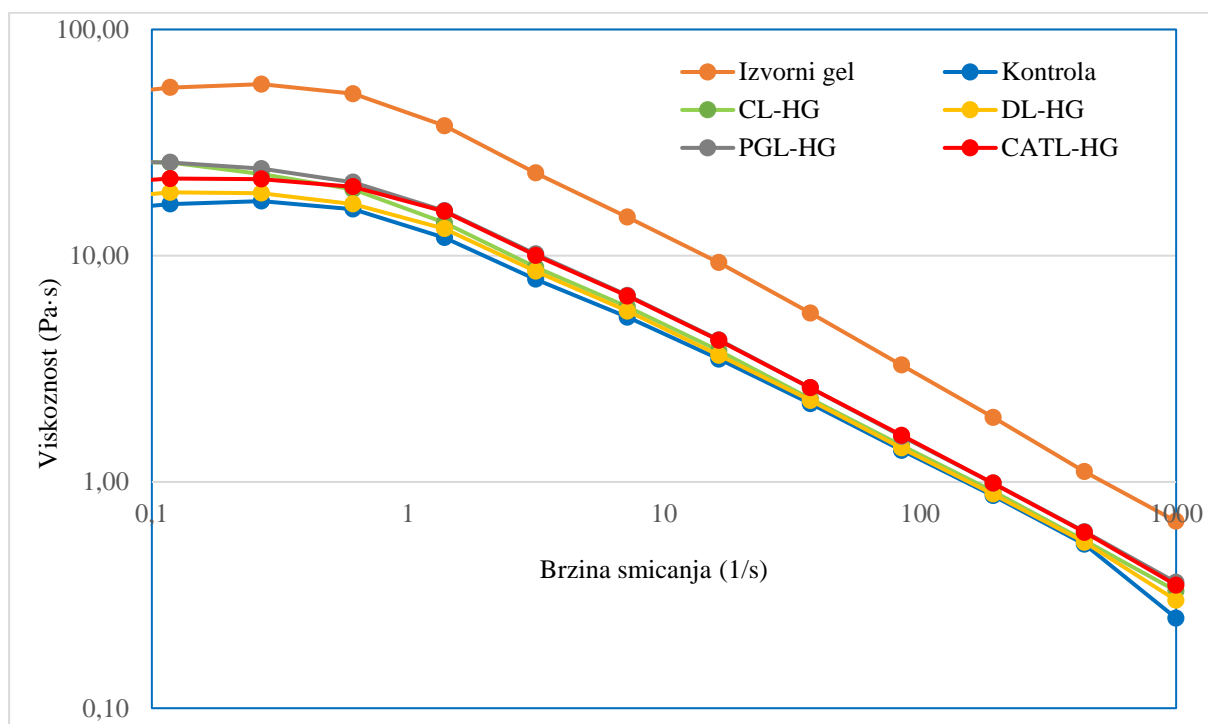
## 4.2. Reološka karakterizacija formulacije liposomi-u-gelu

Reološka karakterizacija formulacija liposomi-u-gelu, kao i kitozanskog gela bez uklopljenih liposoma (izvorni gel) te kitozanskog gela s uklopljenom AZT-otopinom (kontrola) provedena je mjerenjem profila viskoznosti (eng. *flow curve*) i oscilacijskim testovima (eng. *amplitude sweep*) kojima su utvrđena viskoelastična svojstva formulacija.

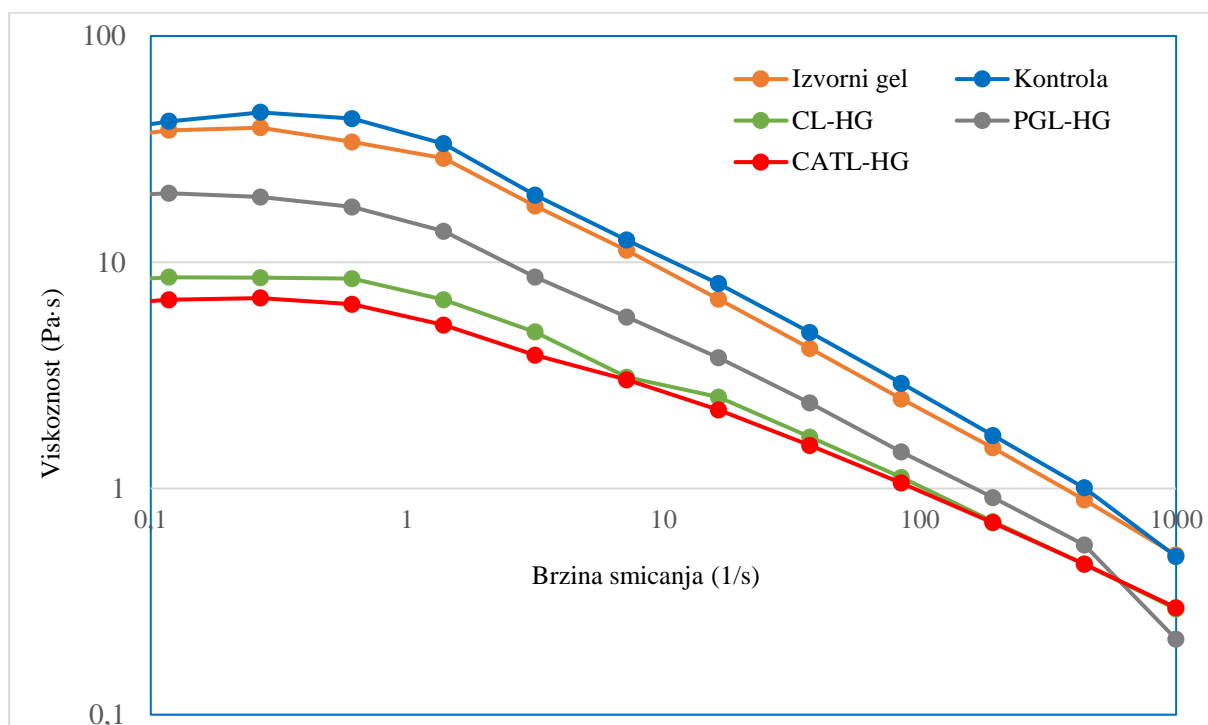
### 4.2.1. Rotacijski testovi

Ispitivanje viskoznosti kitozanskih hidrogelova (HG) s uklopljenim liposomima provedeno je na dvije različite temperature: 25 °C koja imitira tipičnu temperaturu skladištenja (Slika 12) i 34 °C koja odgovara vršnim fiziološkim uvjetima temperature kože (Slika 13). Pritom su dobiveni rezultati za uzorke: CL-u-gelu (CL-HG), DL-u-gelu (DL-HG), PGL-u-gelu (PGL-HG), CATL-u-gelu (CATL-HG), i to neposredno nakon izrade formulacije (Slika 12a, Slika 13a) i nakon 30 dana skladištenja (Slika 12b, Slika 13b). Na dobivenim krivuljama viskoznosti viskoznost je prikazana u odnosu na brzinu smicanja, pri čemu se povećanjem brzine smicanja viskoznost smanjivala. Pri manjim brzinama smicanja pseudoplastični sustavi imaju konstantnu viskoznost s obzirom na postojanje brojnih međumolekulskih interakcija, pri čemu su lanci polimera međusobno umreženi. Povećanjem vanjske sile, smanjuje se viskoznost sustava te u trenu kada je postignuta kritična vrijednost brzine smicanja ili smičnog naprezanja dolazi do naglog pada viskoznosti. Takvo je ponašanje rezultat destrukturiranja molekula ili čestica što uključuje raskid međumolekulskih interakcija te preslagivanje lanaca polimera u paralelne snopove. Svi uzorci pokazali su očekivano pseudoplastično ponašanje (eng. *shear thinning behavior*) u kojem uslijed djelovanja sila dolazi do strukturnih promjena, odnosno promjena viskoznosti. Takvo je pseudoplastično tečenje karakteristično za hidrogelove (Chen i sur., 2017) te je i poželjno budući da omogućuje razmazivanje podloge po površini primjenom vanjske sile, dok se prestankom djelovanja sile formulacija zadržava na mjestu primjene (das Neves i Bahia, 2006). Prednost pseudoplastičnih sustava očituje se u olakšanoj primjeni uslijed smanjenja viskoznosti pripravka što je posljedica smičnog naprezanja tijekom nanošenja.

a)

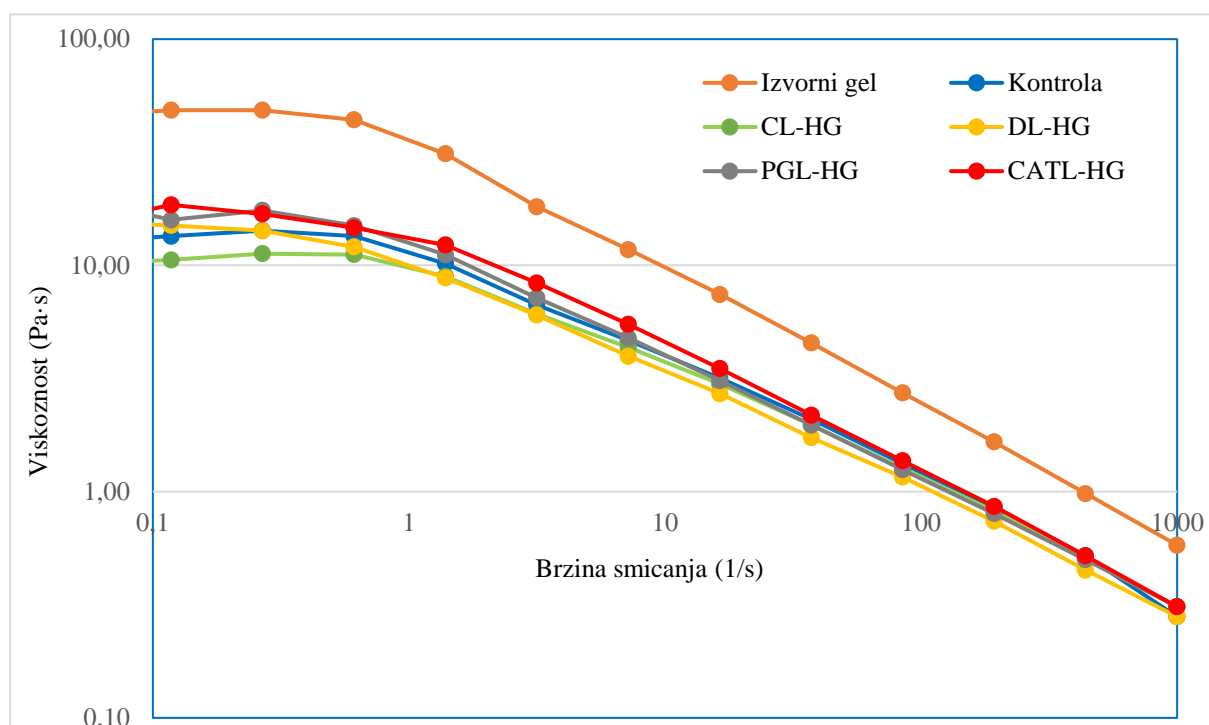


b)

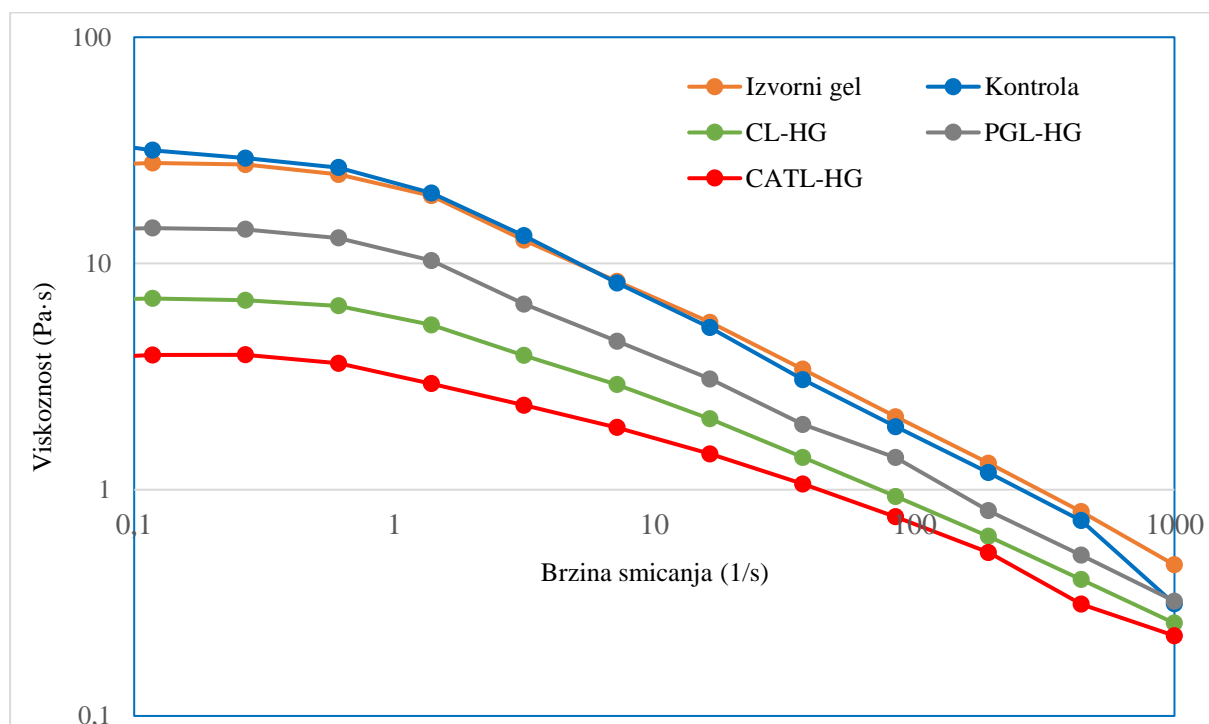


**Slika 12.** Krivulja viskoznosti za formulacije liposomi-u-gelu, izvorni kitozanski gel i kitozanski gel s AZT-otopinom (kontrola) pri 25 °C: a) neposredno nakon izrade uzoraka i b) nakon 30 dana skladištenja. \*Uzorak DL-HG je tijekom 30-dnevnog skladištenja promijenio konzistenciju radi čega daljnja reološka ispitivanja nije bilo moguće provesti za tu formulaciju.

a)



b)



**Slika 13.** Krivulja viskoznosti za formulacije liposomi-u-gelu, izvorni kitozanski gel i kitozanski gel s AZT-otopinom (kontrola) pri 34 °C: a) neposredno nakon izrade uzoraka i b) nakon 30 dana skladištenja. \*Uzorak DL-HG je tijekom 30-dnevnog skladištenja promijenio konzistenciju radi čega daljnja reološka ispitivanja nije bilo moguće provesti za tu formulaciju.

U provedenim ispitivanjima viskoznosti pri 25 °C (Slika 12a) i pri 34 °C (Slika 13a) najveća viskoznost utvrđena je za izvorni kitozanski gel, što je i očekivano s obzirom da sustav nije razrjeđivan dodatkom AZT-liposoma ili AZT-otopine te je koncentracija kitozana u takvom sustavu veća. Formulacije liposomi-u-gelu pokazale su sličan profil viskoznosti kao izvorni gel, ali uz blago niže vrijednosti izmjerene viskoznosti od izvornog gela na obje temperature, što je vjerojatno rezultat ponajprije dodatka tekuće faze (tekuće disperzije liposoma) u kitozanski hidrogel te posljedičnog razrjeđivanja gela. Naime, ovakav efekt dodatka liposoma u kitozanski gel opažen je i u nedavnom istraživanju Čačić i suradnika (2023), kao i u ranijem istraživanju Kaplan i suradnika (2018), koji su također pokazali da dodatak liposoma u izvorni kitozanski gel utječe na smanjenje njegove viskoznosti. S druge strane, Hemmingsen i suradnici (2021) su nakon dodatka liposomskih formulacija u gel uočili gotovo nepromijenjenu viskoznost u odnosu na izvorni kitozanski gel. Međutim, važno je naglasiti kako je u istraživanju Hemmingsen i suradnika (2021) kitozanski hidrogel izvorno sadržavao značajni veći udio kitozana (4,5 %, m/m), a udio liposomske disperzije uklopljene u gel bio je 3 puta manji (10 %, m/m) što može bitno objašnjava nepostojanje razlike u viskoznosti između izvornog hidrogela s i bez uklopljenih liposoma u navedenom istraživanju.

Usporedbom mjerenja provedenih na 25 °C i 34 °C, može se uočiti kako je kod svih formulacija viskoznost sustava nešto manja pri višoj temperaturi. Nakon 30 dana skladištenja sve su formulacije na obje ispitivane temperature (Slika 12b i Slika 13b) pokazale blagi (izvorni gel, PGL-HG) ili nešto izraženiji pad viskoznosti (CL-HG, CATL-HG), izuzevši kontrole, koja je iznenađujuće pokazala porast viskoznosti nakon 30 dana skladištenja. Naime, nakon 30 dana skladištenja profil viskoznosti kontrole bio je najbliži onome izvornog kitozanskog gela mjerenog pri istim uvjetima temperature. Među liposomskim formulacijama, najveću promjenu u viskoznosti nakon 30 dana pokazala je formulacija CATL-HG na obje temperature, pokazujući značajno smanjenje viskoznosti formulacije tijekom skladištenja. Dakle, mjerenjem profila viskoznosti formulacija nakon 30 dana skladištenja u svrhu ispitivanja stabilnosti formulacije, uočeno je da je viskoznost svih pripravaka izuzev kontrole manja od početne, no i dalje prikladna za topikalnu primjenu, pri čemu od svih formulacija liposomi-u-gelu PGL-HG najmanje mijenja viskoznost. Jedina formulacija koja nakon 30 dana skladištenja nije pokazivala konzistenciju prikladnu za topikalnu primjenu bila je formulacija DL-HG. Štoviše, ova je formulacija toliko promijenila konzistenciju tijekom skladištenja da nije bilo moguće provesti mjerenja viskoznosti nakon 30 dana. Može se pretpostaviti da postoji određena inkompatibilnost između DL i kitozanskog gela u koji su uklopljeni liposomi, koja dolazi do

izražaja tijekom skladištenja formulacije, ali navedeno bi bilo potrebno potvrditi dodatnim ispitivanjima koja nisu dio ovog diplomskog rada.

U prethodnim istraživanjima reoloških svojstava viskoelastičnih podloga, Mourtas i suradnici (2008) utvrdili su da fosfolipidni sastav liposoma, odnosno stupanj rigidnosti liposomske membrane, utječe na viskoznost sustava liposomi-u-gelu. Međutim, ovdje dobiveni rezultati, koji su prikazani na Slici 12a i Slici 13a, nisu pokazali značajnije razlike u viskoznosti formulacija liposomi-u-gelu ovisno o vrsti uklopljenih AZT-liposoma, tj. nije utvrđena značajna razlika u viskoznosti gela nakon uklapanja elastičnih liposoma (DL i PGL) u odnosu na rigidne liposome (CL i CATL). No, valja naglasiti da su u spomenutoj studiji (Mourtas i sur., 2008) korišteni karbopolski i hidroksicelulozni gel kao podloga za uklapanje liposoma, za razliku od kitozanskog gela korištenog ovdje te je udio uklopljenih liposoma u podlogu bio za 10 % niži nego u ovom ispitivanju (20 %, m/m), zbog čega je upitno koliko su navedeni sustavi liposomi-u-gelu usporedivi.

S obzirom na dobivene profile viskoznosti u ovom istraživanju (Slika 12, Slika 13), čini se da na viskoznost formulacije liposomi-u-gelu dominantno utječe koncentracija kitozana u izvornom gelu u odnosu na konačnu koncentraciju kitozana u formulacijama, tj. količina liposoma uklopljenih u kitozanski hidrogel (omjer liposomi/hidrogel), dok fosfolipidni sastav i elastičnost liposoma, ne pokazuje značajan utjecaj pri ovako visokoj koncentraciji liposoma uklopljenih u kitozanski gel (30 %, m/m).

#### **4.2.2. Oscilacijski testovi**

Viskoelastičnost je svojstvo tvari koje imaju karakteristike i elastičnih krutina i viskoznih tekućina. Viskoelastična svojstva u korelaciji su s fizičkim izgledom hidrogelova i terapijskom učinkovitošću polukrutih formulacija (Zhang i sur., 2020). S obzirom da oscilacijski testovi daju uvid u viskoelastični karakter polučvrstih formulacija, oni imaju prednost u reološkoj karakterizaciji hidrogelova (Simões i sur., 2020). Testovima promjene amplitude prati se ponašanje uzoraka u nedestruktivnom deformacijskom rasponu te se utvrđuje gornja granica raspona, a sve u svrhu procjene čvrstoće i stabilnosti pripravljene formulacije. U oscilacijskim testovima praćene su vrijednosti modula skladištenja ( $G'$ ) i modula gubitka ( $G''$ ) pri rastućem oscilacijskom naprežanju. Navedena su mjerenja provedena na 25 °C i 34 °C i ponovljena su nakon 30 dana skladištenja pri 4 °C, a dobiveni rezultati prikazani su na slikama 14-19. Tijekom ovih ispitivanja, sve ispitivane formulacije liposomi-u-gelu pokazale su

linearnu viskoelastičnu regiju (LVR), odnosno konstantni plato gdje vrijednosti modula skladištenja ( $G'$ ) i modula gubitka ( $G''$ ) ne ovise o deformaciji i koreliraju samo s molekularnom strukturom. Taj je podatak značajan budući da se uzorci sa širokim LVR smatraju dobro dispergiranim i stabilnim (Zhang i sur., 2020). Isto je zapaženo u istraživanju Čačić i suradnika (2023.) gdje su, kao i ovdje, svi ispitivani liposomski gelovi pokazali veći modul skladištenja ( $G'$ ) što potvrđuje dominantno elastičnu prirodu uzoraka. Kada materijal pokazuje viskoznije ponašanje, opaža se tendencija  $G' < G''$  te obrnuto, kada prevladavaju elastična svojstva materijala,  $G' > G''$  (Barnes, 2000), što potvrđuje strukturu gela za formulacije viskoelastičnih svojstava. Naime, karakteristične vrijednosti  $G' > G''$  kod viskoelastičnih krutina poput hidrogelova mogu se pripisati postojanju kemijskih veza ili fizikalno kemijskih interakcija.

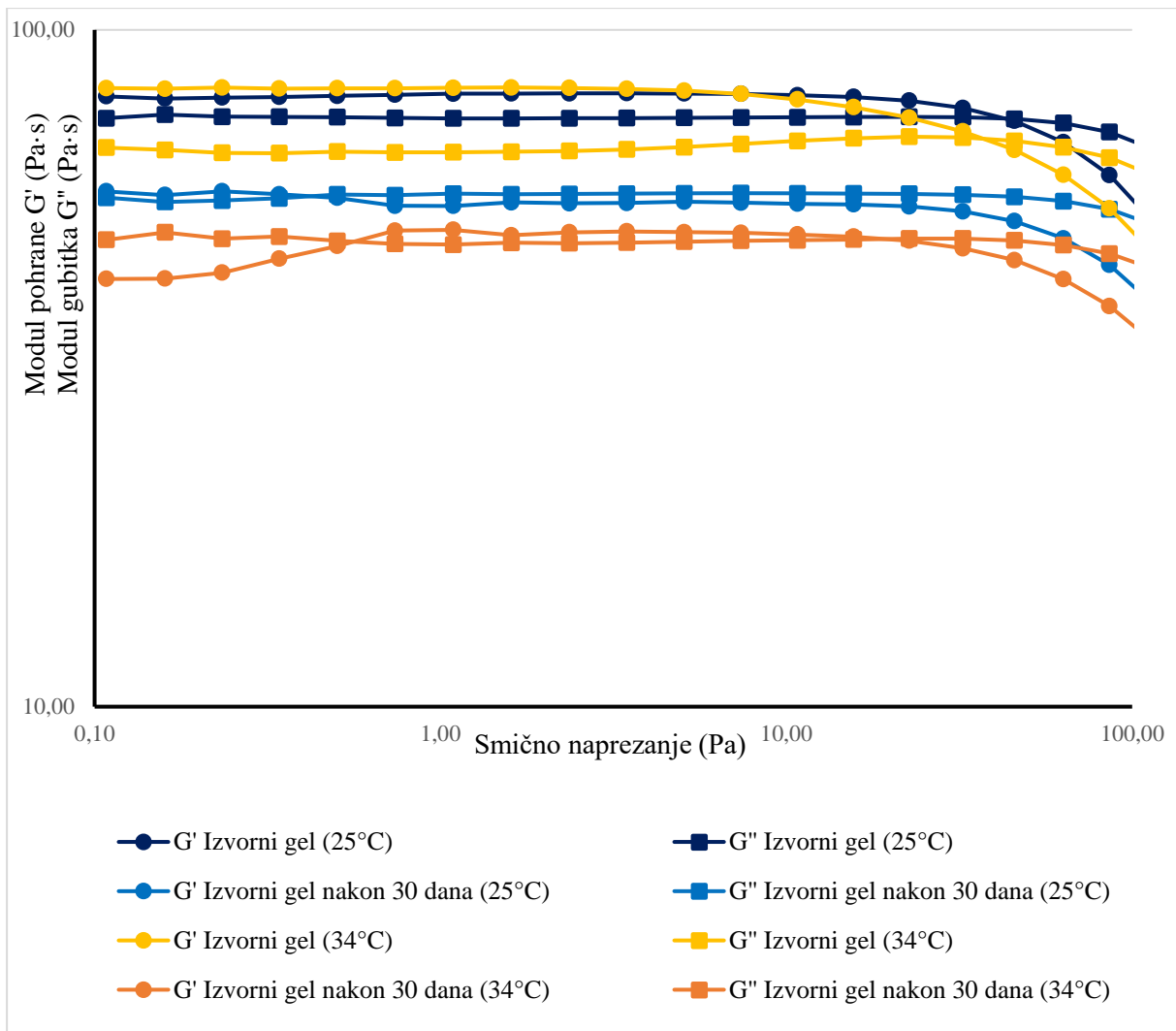
Pokazano je da se odstupanje između  $G'$  i  $G''$  smanjuje iznad utvrđenih vrijednosti LVR čemu uzrok može biti intenzivno rastezanje polimernih lanaca i djelomično kidanje vodikovih veza unutar strukture hidrogela, a vrijednost pri kojoj se  $G'$  i  $G''$  izjednačuju, nakon čega je  $G' < G''$ , smatra se točkom nakon koje se sustav počinje ponašati kao viskozna tekućina. Smatra se da je sustav robusniji što se izjednačavanje vrijednosti  $G'$  i  $G''$  postiže pri većim vrijednostima smičnog napreznja (Zhang i sur., 2020). Prema dobivenim rezultatima prikazanim na slikama 14-19, najrobusniji uzorak neposredno nakon izrade pri mjerenjima na 25 °C bio je izvorni kitozanski gel, dok su formulacije liposomi-u-podlozi također pokazale ponašanje karakteristično za gelove ( $G' > G''$  u LVR regiji), ali uz nešto veću podložnost deformacijama, odnosno manju robusnost u odnosu na izvorni gel, pri čemu se formulacija DL-HG pokazala najmanje robusnom. Pri mjerenjima na temperaturi od 34 °C neposredno nakon izrade uzoraka također je izvorni gel pokazao veći stupanj robusnosti u odnosu na formulacije liposomi-u gelu, izuzevši formulacije DL-HG koja je iznenađujuće pri 34 °C pokazala najveću otpornost prema mehaničkim napreznjima, odnosno zadržala je strukturu gela u čitavom mjernom rasponu, što se eventualno može objasniti ranije spomenutim interakcijama između DL i kitozanskog gela u određenim okolnostima (povišena temperatura, dulje skladištenje), ali bi navedeno bilo potrebno dodatno istražiti daljnjim ispitivanjima.

Rezultati prikazuju da je u gotovo svim ispitivanim uzorcima nakon 30 dana skladištenja modul pohrane  $G'$  bio veći od modula gubitka  $G''$  što dokazuje da je u ispitivanim formulacijama dominantna elastična komponenta koja može poslužiti kao mjera stabilnosti sustava. Takva struktura omogućuje produljeno zadržavanje na mjestu primjene, kao i produljeno oslobađanje lijeka (Nižić i sur., 2019). Odstupanje od ovog generalnog zaključka za ispitane formulacije

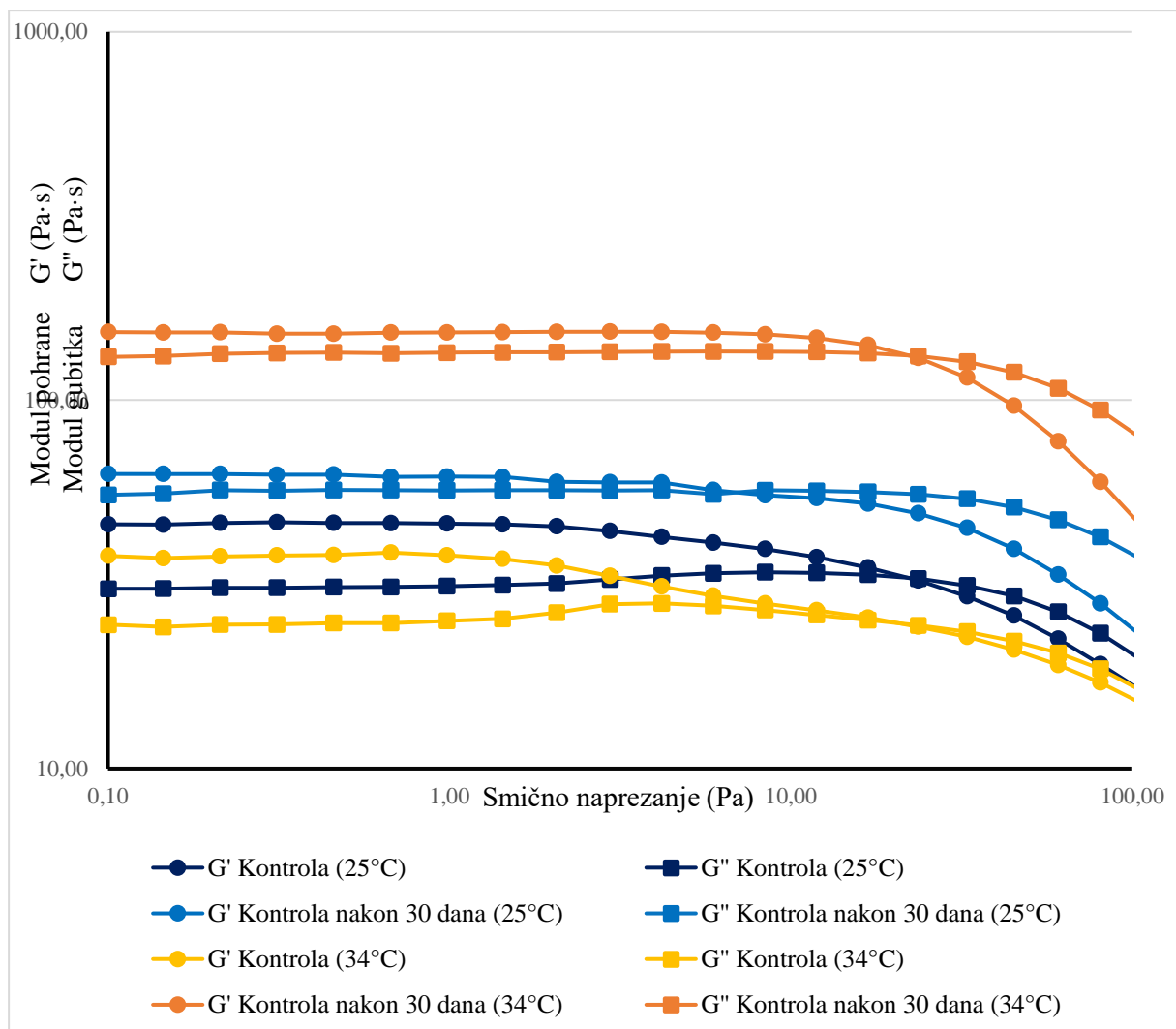
primijećeno je samo u slučaju izvornog gela, jer je nakon 30 dana skladištenja pripadajući  $G''$  bio veći ili gotovo jednak  $G'$  što govori o značajnoj promjeni strukture gela tijekom skladištenja, tj. da izvorni gel stajanjem vjerojatno gubi svojstva gela, i poprima polako svojstva viskozne tekućine (Slika 14). U tom smislu, čini se da dodatak liposoma u kitozanski gel, iako smanjuje viskoznost gela, pozitivno utječe na stabilnost gela, odnosno na zadržavanje strukture i svojstava karakterističnih za gelove. Najznačajnije promjene u krivuljama dobivenim oscilacijskim testovima promjene amplitude za uzorke liposomi-u-gelu nakon 30 dana skladištenja uočene su za formulaciju CATL-HG, izuzevši uzorak DL-HG. Naime, formulacija DL-CHG je skladištenjem toliko promijenila konzistenciju da nije bilo moguće ponoviti mjerenja nakon 30 dana, što svjedoči o nestabilnosti te formulacije tijekom skladištenja.

Također, zanimljivo je uočiti da su oscilacijski testovi promjene amplitude za kontrolu potvrdili da nakon 30 dana viskoznost formulacije raste na obje ispitivane temperature, što je u skladu s rezultatima rotacijskih testova nakon 30 dana skladištenja kako je opisano u poglavlju 4.2.1.

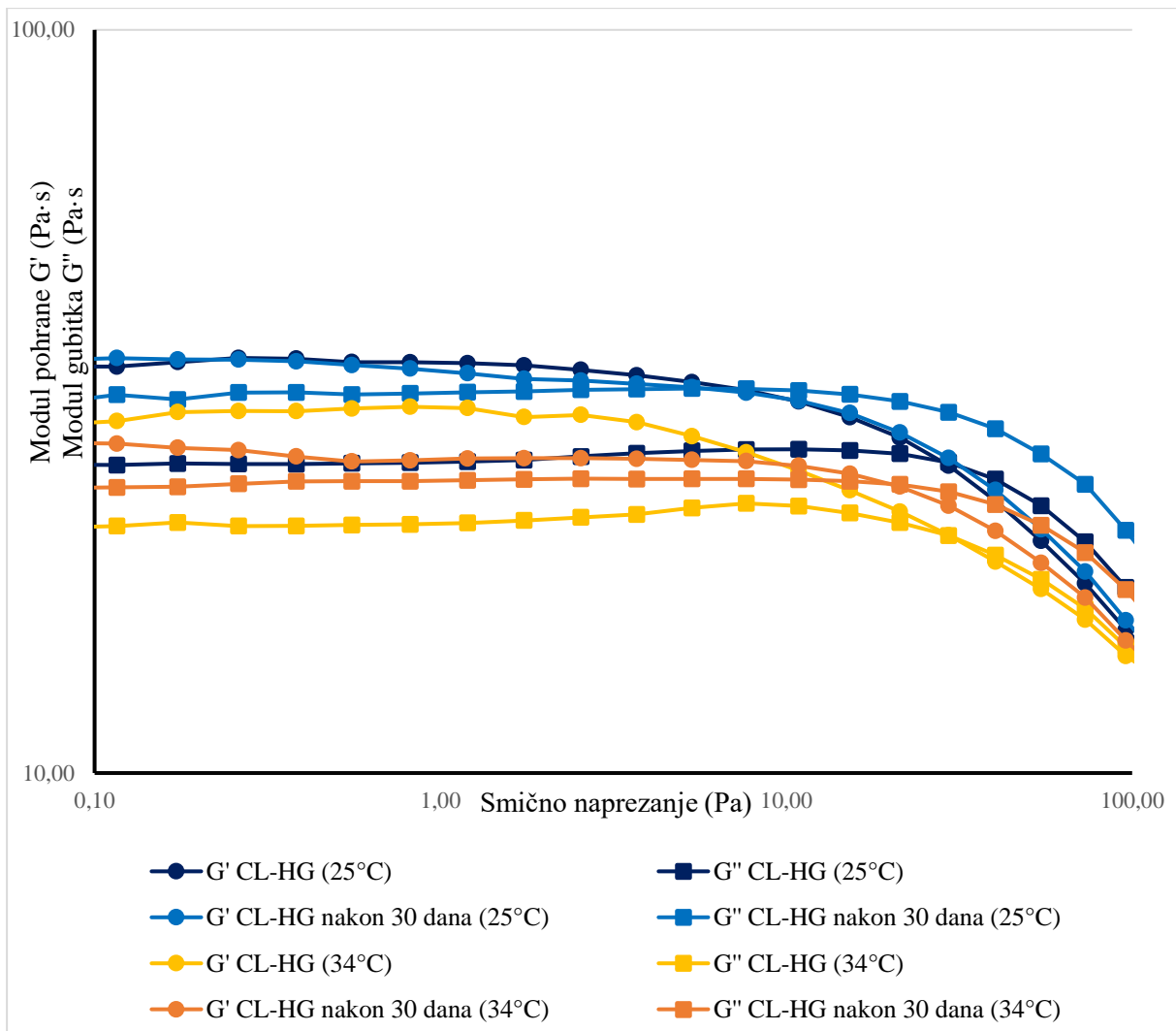




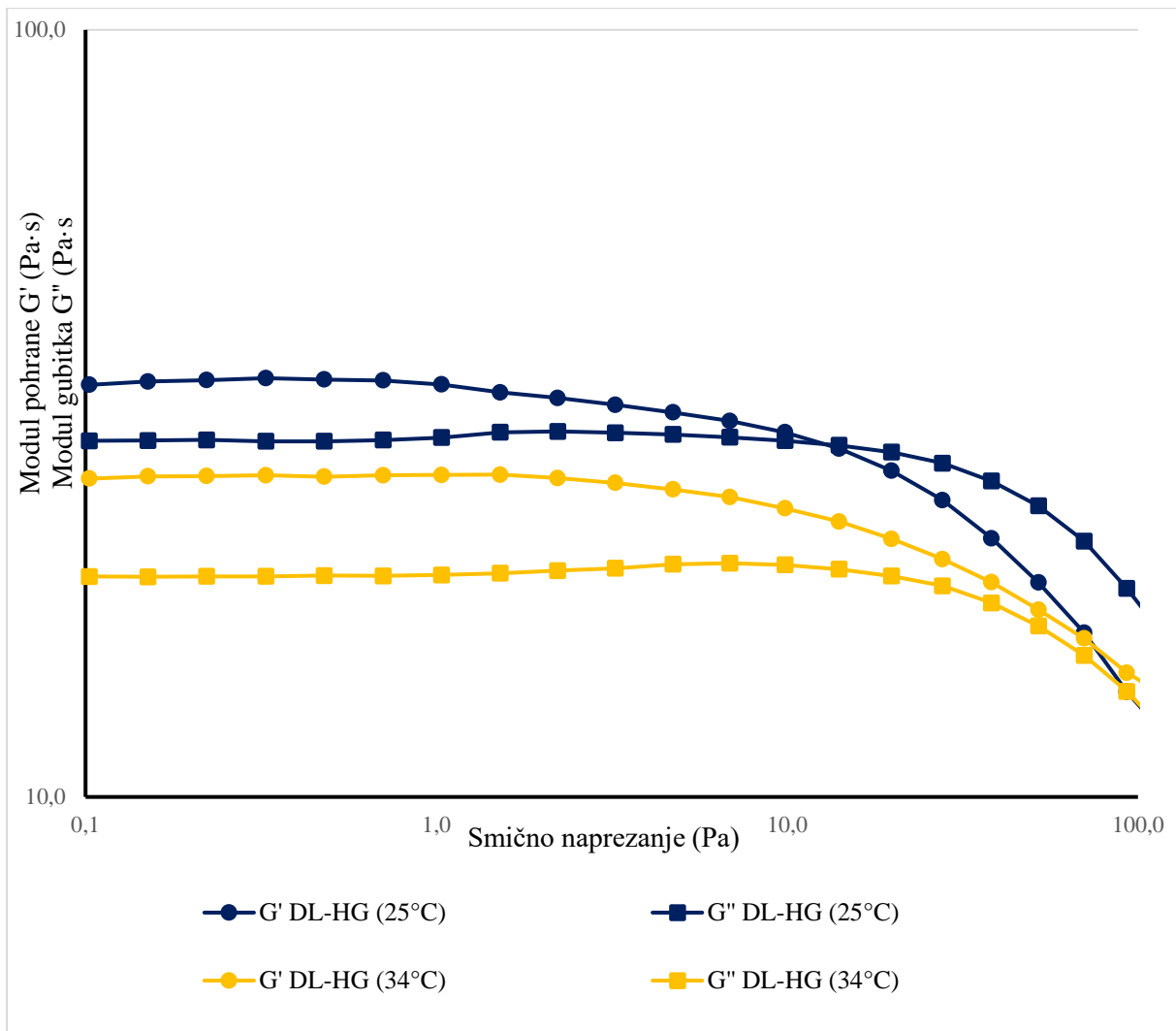
**Slika 14.** Grafički prikaz ovisnosti modula pohrane  $G'$  i modula gubitka  $G''$  o smičnom naprezanju za izvorni gel na 25 °C i 34 °C neposredno nakon izrade formulacije te nakon 30 dana skladištenja.



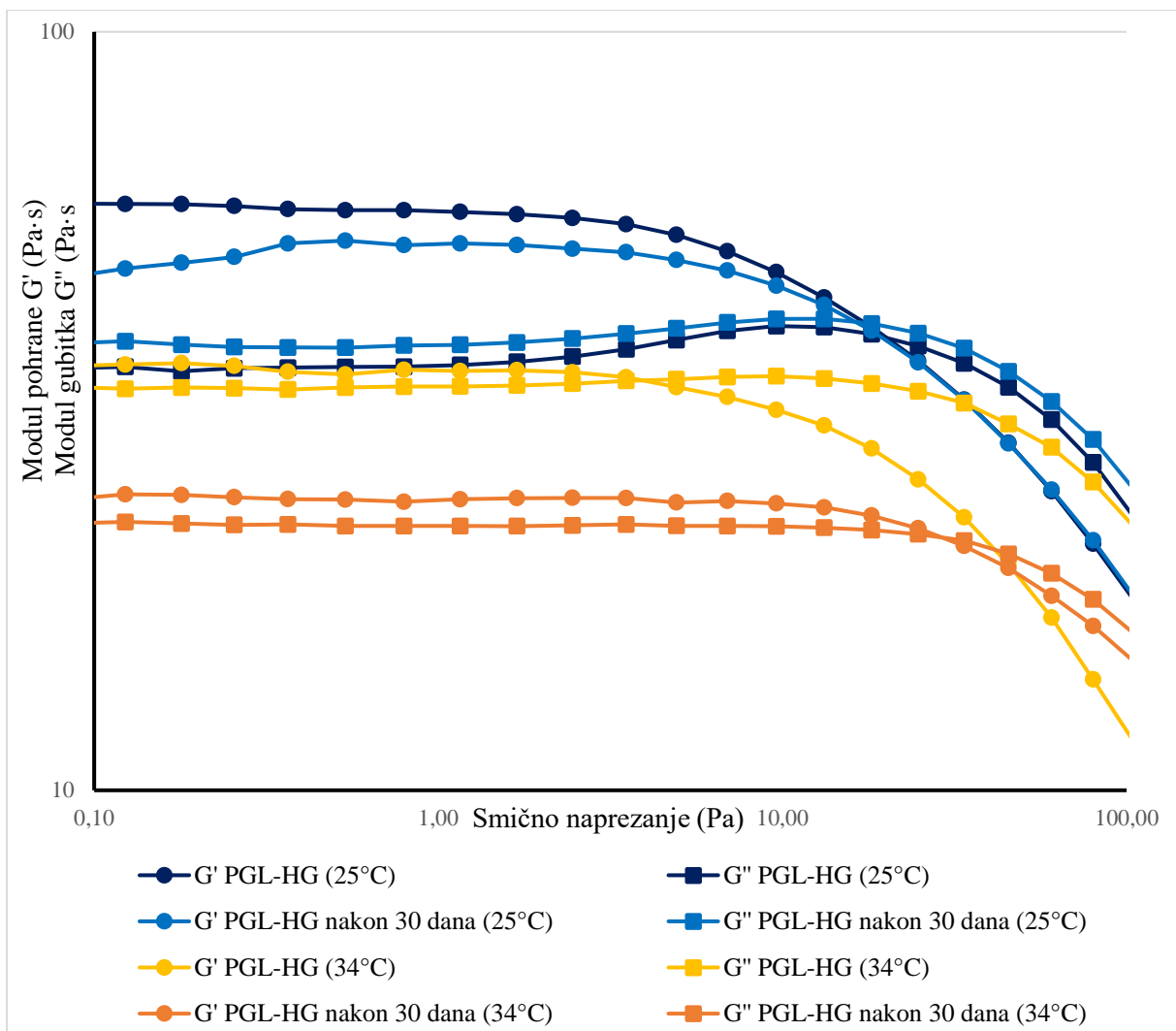
**Slika 15.** Grafički prikaz ovisnosti modula pohrane  $G'$  i modula gubitka  $G''$  o smičnom naprežanju za kontrolu na 25 °C i 34 °C neposredno nakon izrade formulacije te nakon 30 dana skladištenja.



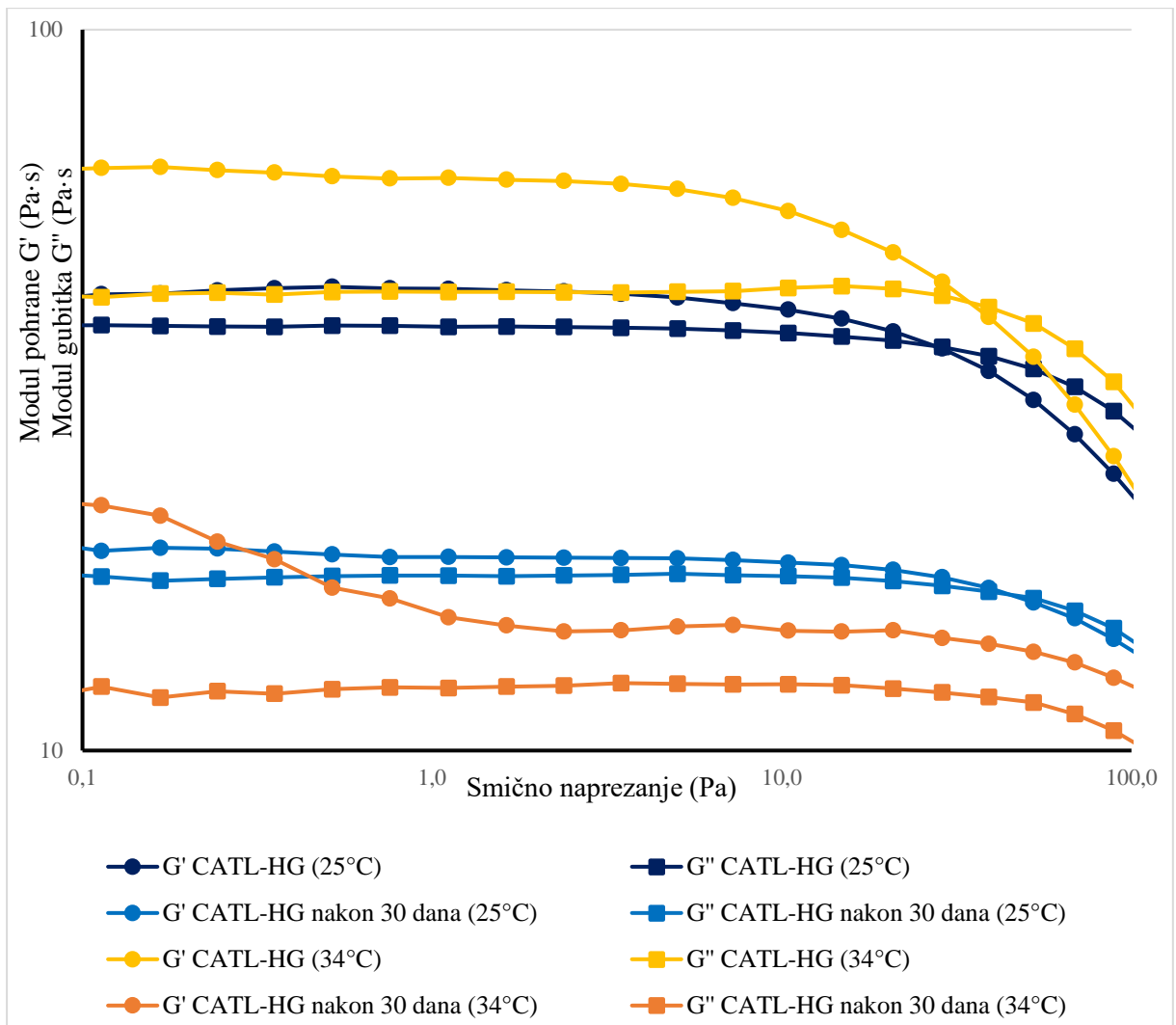
**Slika 16.** Grafički prikaz ovisnosti modula pohrane  $G'$  i modula gubitka  $G''$  o smičnom naprezanju za uzorak CL-HG na 25 °C i 34 °C neposredno nakon izrade formulacije te nakon 30 dana skladištenja.



**Slika 17.** Grafički prikaz ovisnosti modula pohrane  $G'$  i modula gubitka  $G''$  o smičnom napreznju za uzorak DL-HG na 25 °C i 34 °C neposredno nakon izrade formulacije. \*Uzorak DL-HG je tijekom 30-dnevnog skladištenja promijenio konzistenciju radi čega daljnja reološka ispitivanja nije bilo moguće provesti za tu formulaciju.



**Slika 18.** Grafički prikaz ovisnosti modula pohrane  $G'$  i modula gubitka  $G''$  o smičnom naprezanju za uzorak PGL-HG na 25 °C i 34 °C neposredno nakon izrade formulacije te nakon 30 dana skladištenja.



**Slika 19.** Grafički prikaz ovisnosti modula pohrane  $G'$  i modula gubitka  $G''$  o smičnom naprežanju za CATL-HG na 25 °C i 34 °C provedene nakon izrade formulacije te nakon 30 dana skladištenja.

### 4.3. pH formulacija

Ispitivanja pH provedena su za sve formulacije liposomi-u-gelu, izvorni gel i kontrolu nakon izrade te nakon 30 dana skladištenja kako bi se ispitala stabilnost pripravaka budući da pH može utjecati na oslobađanje lijeka, kao i na raspodjelu te zadržavanje hidrogela na koži (Vanić i sur., 2021). Budući da se u strukturi kitozana nalaze amino skupine koje se mogu protonirati ili deprotonirati ovisno o pH okoliša, pH kitozana mijenja se ovisno o pH okoliša i uklopljenim tvarima. Promjena pH vrijednosti kitozanske podloge može utjecati na profile viskoznosti, pri čemu se veća viskoznost opaža u uvjetima kiselog pH.

Uzorak	pH neposredno nakon izrade	pH nakon 30 dana
Izvorni gel	4,80 ± 0,02	4,74 ± 0,01
Kontrola	4,98 ± 0,02	4,77 ± 0,03
CL-HG	4,86 ± 0,03	4,76 ± 0,02
DL-HG*	4,89 ± 0,05	n.o.*
PGL-HG	4,87 ± 0,02	4,62 ± 0,02
CATL-HG	4,84 ± 0,01	4,60 ± 0,02

**Tablica 3.** pH vrijednosti uzoraka neposredno nakon izrade i nakon 30 dana skladištenja pri 4 °C. Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± S.D. (n = 3). \* n.o. = nije određeno (uzorak DL-HG je tijekom 30-dnevnog skladištenja promijenio konzistenciju radi čega daljnja pH ispitivanja nije bilo moguće provesti za tu formulaciju).

Prema izmjerenim vrijednostima neposredno nakon izrade uzoraka prikazanim u Tablici 3, početni pH bio je gotovo jednak za sve uzorke liposomi-u-gelu, neovisno o sastavu liposoma kao i elastičnosti istih. Sve su formulacije bile blago kiselog pH, pri čemu je uzorku izvornog gela izmjerena najniža pH vrijednost (4,80), a kontroli najviša vrijednost pH (4,98). U sličnom ispitivanju provedenom od Čačić i suradnika (2023), liposomske formulacije i kontrola također su pokazale viši pH u odnosu na izvorni gel. Naime, kao i u ovom ispitivanju, uklapanje liposoma u kitozanski gel rezultiralo je povišenjem vrijednosti pH budući da su u oba ispitivanja liposomi pripremljeni u fosfatnom puferu čiji je pH iznosio 7,5 te se smatra da je to glavni uzrok zamijećenog povišenja pH. Niže vrijednosti pH ovdje ispitanih uzoraka u odnosu na analogne uzorke u spomenutom istraživanju Čačić i suradnika (2023) moguće je pripisati činjenici da iako je kitozanski hidrogel u oba istraživanja pripremljen sličnom metodom, Čačić

i suradnici (2023) su koristili kitozan srednje molekularne mase (eng. *medium molecular weight*, MMW) koji je manjeg stupnja deacetilacije u odnosu na HMW korišten u ovom istraživanju te je korištena različita koncentracija kitozana i mliječne kiseline za pripravu izvornog gela. Usporedno s tim, sastav samih liposoma u navedenoj studiji razlikuje se od ovdje korištenih AZT-liposoma, kao i udio uklopljenog azitromicina, što sve može utjecati na konačni pH formulacije.

Površina kože ima različite vrijednosti pH koje variraju od 4,1 do 7,2 ovisno o predjelu tijela, no najveći dio kože tijela ima blago kiselu pH vrijednost (5,5). Kitozanski gelovi s uklopljenim AZT-liposomima, s pH vrijednostima u rasponu od 4,84 do 4,89, mogu se smatrati prikladnima za primjenu na kožu. Štoviše, za formulacije namijenjene za liječenje bakterijskih infekcija kože čak je i poželjno da su blago kisele, jer se pokazalo da pH inficirane kože postaje bazičniji u odnosu na fiziološki pH kože (Wallace i sur., 2019).

U mjerenjima ponovljenima nakon 30 dana zabilježen je pad pH za sve uzorke koji je bio < 6 %, ali statistički značajan (t-test,  $p < 0,05$ ). Iako je tijekom skladištenja došlo do značajne promjene pH formulacija, pH svih uzoraka nakon 30 dana i dalje je bio prikladan za dermalnu primjenu.



## **5. ZAKLJUČAK**

Liposomi različitog (fosfo)lipidnog sastava (CL, DL, PGL i CATL) su pripremljeni film metodom, nakon čega su homogenizirani postupkom ekstruzije i uklopljeni u kitozanski gel. Izvornom kitozanskom gelu i konačnim formulacijama liposomi-u-gelu ispitana su reološka svojstva i pH te su mjerenja ponovljena nakon 30 dana u svrhu procjene stabilnosti i prikladnosti za topikalnu primjenu na kožu.

Reološkom karakterizacijom utvrđeno je pseudoplastično ponašanje formulacija liposomi-u-gelu, što je poželjno za ciljanu topikalnu primjenu na kožu. Dodatak AZT-liposoma ili AZT-otopine u kitozanski gel (kontrola) rezultirao je blagim smanjenjem njegove viskoznosti, no profil viskoznosti svih ispitanih formulacija ostao je prikladan za primjenu na kožu. Iz dobivenih rezultata može se pretpostaviti da na viskoznost konačne formulacije dominantno utječe značajan udio uklopljene tekuće liposomske disperzije (30 %, m/m), a ne fosfolipidni sastav AZT-liposoma uklopljenih u kitozanski hidrogel, budući da među različitim formulacijama liposomi-u-gelu nisu zabilježene značajne razlike u krivuljama viskoznosti pri odgovarajućoj temperaturi.

Tijekom oscilacijskih testova promjene amplitude, formulacije liposomi-u-gelu pokazale su širok linearno visko-elastični raspon s modulom skladištenja ( $G'$ ) većim od modula gubitka ( $G''$ ) što potvrđuje viskoelastično ponašanje karakteristično za gelove. Takva struktura omogućuje produljeno zadržavanje na mjestu primjene, kao i produljeno oslobađanje lijeka. Također, takvi uzorci mogu se smatrati dobro dispergiranim i stabilnim. Formulacije liposomi-u-gelu i kontrola su pokazale manju robusnost u odnosu na izvorni kitozanski gel, što je najvjerojatnije posljedica razrjeđivanja gela dodatkom tekuće faze.

Reološka karakterizacija formulacija nakon 30 dana skladištenja pokazala je da je viskoznost svih pripravaka izuzev kontrole manja od početne. Usprkos blagom smanjenju viskoznosti, sve su formulacije liposomi-u-podlozi zadržale pseudoplastična svojstva, jedino je formulacija DL-HG nakon 30 dana skladištenja pokazala značajnu promjenu u konzistenciji zbog čega nije moguće provesti njenu naknadnu reološku analizu, zbog čega se smatra nestabilnom tijekom skladištenja. Nadalje, za razliku od izvornog gela, za sve formulacije liposomi-u-gelu nakon 30 dana skladištenja modul pohrane  $G'$  bio je veći od modula gubitka  $G''$  što dokazuje da je zadržana struktura gela koja može poslužiti kao mjera stabilnosti sustava. U tom smislu, čini se da dodatak liposoma u kitozanski gel, iako blago smanjuje viskoznost gela, pozitivno utječe na njegovu stabilnost, odnosno na zadržavanje strukture i svojstava karakterističnih za gelove.

pH gelova s uklopljenim AZT-liposomima (4,87–4,89) i AZT-otopinom (4,98) bio je viši od pH izvornog gela (4,80). Nakon 30 dana skladištenja uočen je manji, ali statistički značajan pad pH vrijednosti svih formulacija, uključujući izvorni gel, ali su izmjerene vrijednosti i dalje bile unutar raspona prikladnog za primjenu na kožu (pH 4–7).

## **6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA**

$A$  – površina smicanja u modelu dviju ploča

AZT – azitromicin

CATL – kationski liposomi s azitromicinom

CL – konvencionalni liposomi s azitromicinom

$D$  – brzina smicanja

$\delta$  – fazni pomak

DL – deformabilni liposomi s azitromicinom

DODAB – dimetildioktadecilamonijev bromid

DPPC – dipalmitoilfosfatidilkolin

$\eta$  – viskoznost

$F$  – sila smicanja u modelu dviju ploča

$G'$  – modul pohrane

$G''$  – modul gubitka

$G^*$  – kompleksni modul smicanja

$\gamma$  – smična deformacija

GUV – golemi unilamelarni liposomi

$h$  – širina razmaka u modelu dviju ploča

HG – hidrogel

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

LUV – veliki unilamelarni liposomi

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

MLV – multilamelarni liposomi

MMW – srednja molekulska masa (eng. *medium molecular weight*)

MVV – multivezikularni liposomi

OLV – oligolamelarni liposomi

PBS – fosfatni pufer

PC – fosfatidilkolin

PGL – propilenglikol liposomi s azitromicinom

$S$  – duljina otklona

S75 – sojin lecitin

SDCh – natrijev deoksikolat

SUV – mali unilamelarni liposom

$\tau$  – smično naprezanje

$T_c$  – temperatura faznog prijelaza

$v$  – brzina u modelu dviju ploča

## **7. LITERATURA**

Ahmadi F, Oveisi Z, Mohammadi Samani S, Amoozgar Z. Chitosan-based hydrogel: 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

Alhariri M, Azghani A, Omri A. Liposomal antibiotics for the treatment of infectious diseases. *Expert Opin Drug Delivery*, 2013, 10, 1515–1532

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

Anton Paar, 2023. Basics of Rheology. <https://www.anton-paar.com/corp-en/> (pristupljeno 2.1.2024.)

Bangham AD, Horne RQ. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J Mol Biol*, 194, 8, 660-668

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

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

Benson HAE. Transfersomes for transdermal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 2006, 3, 727-737

Budai L, Budai M, Fülöpné Pápay Z, Vilimi Z, Antal I. Rheological Considerations of Pharmaceutical Formulations: Focus on Viscoelasticity. *Gels*, 2023, 9(6), 469

Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal formulations in clinical use: an updated review. *Pharmaceutics*, 2017, 9 (2)



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

Cevc G, Blume G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1104, 226–32

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

Cook MT, Brown MB. Polymeric gels for intravaginal drug delivery. *J. Control. Release* 2018, 270, 145-157

Čačić A, Amidžić Klarić D, Keser S, Radiković M, Rukavina Z, Wenche Jøraholmen M, Uzelac L, Kralj M, Škalko-Basnet N, Šegvić Klarić M, Vanić Ž. A Novel Approach for the Treatment of Aerobic Vaginitis: Azithromycin Liposomes-in-Chitosan Hydrogel. *Pharmaceutics*, 2023, 15, 1356

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

DrugBank, 2019. Azithromycin. <https://go.drugbank.com/> (pristupljeno 11.4.2024.)

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

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

Francetić I i suradnici. Farmakoterapijski priručnik, 7. Izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 2015, 411-412

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

Guimarães D, Cavaco-Paulo A, Nogueira E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. *Int J Pharm*, 2021, 601

Gupta P, Vermani K, Garg S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *DDT*, 2002, 7, 569-579

Heidary M, Ebrahimi Samnangani A, Kargari A, Nejad AK, Yashimi I, Motahar M, Taki E, Khoshnood S. Mechanism of action, resistance, synergism, and clinical implications of azithromycin. *J Clin Lab Anal*, 2022, 36(6)

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

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

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

Jøraholmen MW, Basnet P, Tostrup MJ, Moueffaq S, Škalko-Basnet N. Localized therapy of vaginal infections and inflammation: liposomes-in-hydrogel delivery system for polyphenols. *Pharmaceutics*, 2019, 11(2), 27

Lombardo D, Kiselev MA. Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application. *Pharmaceutics*, 2022, 14(3), 543

Lopes S, Giuberti C, Rocha T, Ferreira D, Oliveira M. Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs, *INTECH*, 2013, 94-96

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

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

Kotla MG, Chandrasekar B, Rooney Peadar, Sivaraman G, Larranaga A, Vijaya Krishna K, Pandit A, Rochev Y. Biomimetic lipid-based nanosystems for enhanced dermal delivery of drugs and bioactive agents. *ACS Biomater Sci Eng*, 2017, 3(7), 1262-1272

Kuzman I. Azitromicin: i nadalje nezaobilazan antibiotik u liječenju respiratornih infekcija. *Medicus*, 2018, 27(2), 127-133

Macosko, C.W.: Rheology, principles, measurements, and applications. Wiley, New York, 1994.

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

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

Nsairat H, Khater D, Sayed U, Odeh F, Al Bawab A, Alshaer W. Liposomes: structure, composition, types and clinical applications. *Heliyon*, 2022, 8 (5)

Pachau L. Recent development sin novel drug delivery systems for wound healing. *Expert Opin Drug Deliv*, 2015, 12, 1895-1909

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 novelin vitro stratum corneum model in formulation development. *J Liposome Res*, 2014, 24(4), 313–322

Peers S, Montembaul A, Ladavière. Chitosan hydrogels for sustained drug delivery. *J Controlled Release*, 2020, 326, 150-163

Pepić I, Vujičić M, Lovrić J, Filipović-Grčić J. Nanočestice u dermatokozmetičkim pripravcima: liposomi, mikroemulzije i polimerne micle. *Farm Glas*, 2012, 68, 763-772

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

Skendrović D, Terihaj L, Rezić T, Vrsalović Presečki A. Biopolimeri hitin i hitozan – svojstva i priprava. *Kem Ind*, 2023, 72, 103-112

Škalko-Basnet N, Vanić Ž. Lipid-based nanopharmaceuticals in antimicrobial therapy. U: Boukherroub R, Szunerits S, Drider D (ur.) *Functionalized Nanomaterials for the Management of Microbial Infection, A Strategy to Address Microbial Drug Resistance*. 2017, Elsevier, Amsterdam, 111-152

Tabbakhian M, Tavakoli N, Jaafari MR, Daneshamouz S. Enhancement of follicular delivery of finasteride by liposomes and niosomes. *In vitro* permeation and *in vivo* deposition studies using hamster flank and ear models. *Int J Pharm*, 2006, 323(1-2), 1-10

Thirupathi K, Raorane CJ, Ramkumar V, Ulagesan S, Santhamoorthy M, Raj V, Krishnakumar GS, Vy Phan TT, Kim SC. Update on Chitosan-Based Hydrogels: Preparation, Characterization, and Its Antimicrobial and Antibiofilm Applications. *Gels* 2023, 2022, 9, 19-22

Ulrich AS. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Biosci Rep*, 2002, 22, 129-150

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

Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: strukturna svojstva i Klasifikacija. *Farm Glas*, 2012a, 68, 391-400

Vanić Ž, Hafner A, Bego M, Škalko-Basnet N. Characterization of various deformable liposomes with metronidazole. *Drug Dev Ind Pharm*, 2013, 39, 481-488

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

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

Vanić Ž. Phospholipid Vesicles for Enhanced Drug Delivery in Dermatology. *J Drug Discovery, Development and Delivery*, 2015, 2(1), 1010

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

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

Wang W, Narain R, Zeng H. Hydrogels. *Polym Sci Nanotechnol*, 2020, 203-244

Wang Q., Hou R., Cheng Y, Fu J. Super-tough double-network hydrogels reinforced by covalently compositing with silica-nanoparticles. *Soft Matter*. 2012, 8, 6048–6056

Willenbacher N, Georgieva K. Rheology of disperse systems. *Wiley*, 2013

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

Zhang H. Thin-Film Hydration Followed by Extrusion Method for Liposome Preparation. *Methods Mol Biol*, 2017, 1522, 17-22

## **8. SAŽETAK / SUMMARY**

Različite vrste liposoma s azitromicinom (AZT): konvencionalni liposomi (CL), deformabilni liposomi (DL), propilenglikol liposomi (PGL) i kationski liposomi (CATL) uklopljeni su u hidrogel na bazi kitozana s ciljem postizanja prikladne viskoznosti za topikalnu primjenu na kožu. Dobivene formulacije liposomi-u-gelu (CL-HG, DL-HG, PGL-HG, CATL-HG) reološki su okarakterizirane rotacijskim i oscilacijskim testovima te im je ispitan pH. Dodatkom AZT-liposoma ili AZT-otopine (kontrola) u kitozanski gel (30 %, m/m) dolazi do blagog smanjenja viskoznosti gela, no formulacije i dalje zadržavaju viskoznost prikladnu za dermalnu primjenu te strukturu i ponašanje viskoelastičnih krutina (gelova). Nadalje, sve ispitivane formulacije liposomi-u-gelu pokazale su linearnu viskoelastičnu regiju (LVR), iz čega proizlazi da se ispitani uzorci neposredno nakon primjene mogu smatrati dobro dispergiranim i stabilnim. Reološka mjerenja su ponovljena nakon 30 dana skladištenja pri 4 °C, pri čemu je utvrđeno da formulacije liposomi-u-gelu nakon skladištenja pokazuju manju viskoznost u odnosu na viskoznost formulacije neposredno nakon izrade, ali uz zadržavanje viskoelastičnog ponašanja svojstvenog gelovima. Dodatak liposoma i AZT-otopine u izvorni gel uzrokovao je blago povišenje pH formulacija. Iako je nakon 30 dana skladištenja zabilježen statistički značajan pad pH svih formulacija, izmjerene vrijednosti i dalje su bile prikladne za dermalnu primjenu. Većina formulacija liposomi-u-gelu pokazala je zadovoljavajuću razinu stabilnosti tijekom 30-dnevnog skladištenja. Izuzetak je formulacija DL-HG koja je tijekom skladištenja toliko primijenila konzistenciju da nije bilo moguće provesti mjerenja nakon 30 dana, što upućuje na postojanje inkompatibilnosti između DL i kitozanskog gela, koju je potrebno potvrditi daljnjim ispitivanjima.

Different types of azithromycin (AZT)-loaded liposomes: conventional liposomes (CL), deformable liposomes (DL), propylene glycol liposomes (PGL), and cationic liposomes (CATL) were embedded into a chitosan-based hydrogel to achieve suitable viscosity for topical application onto the skin. The obtained liposome-in-gel formulations (CL-HG, DL-HG, PGL-HG, CATL-HG) were rheologically characterized by rotational and oscillatory tests, and their pH was examined. Although the addition of AZT-liposomes or AZT-solution (control) into chitosan gel (30%, w/w) caused a slight decrease in gel viscosity, the formulations still retained viscosity suitable for dermal application and the structure and behavior of viscoelastic solids (gels). Furthermore, all tested liposome-in-gel formulations showed a linear viscoelastic region (LVR), indicating that the tested samples could be considered well-dispersed and stable immediately after preparation. Rheological measurements were repeated after 30 days of storage at 4 °C, revealing that liposome-in-gel formulations exhibited lower viscosity after storage compared to the viscosity of formulations immediately after preparation, while retaining viscoelastic behavior characteristic for gels. Liposomes and AZT-solution embedded into the chitosan gel caused a slight increase in the pH of the gel. Although a statistically significant decrease in pH was observed for all formulations after 30 days of storage, the measured values were still suitable for dermal application. Majority of liposome-in-gel formulations showed satisfactory stability during the 30-day storage. An exception was the DL-HG formulation, which underwent such a change in consistency during storage that measurements after 30 days were not possible, suggesting certain incompatibility between DL and chitosan gel, which needs to be confirmed by further research.



**9. TEMELJNA IDENTIFIKACIJSKA KARTICA / BASIC  
DOCUMENTATION CARD**

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za Farmaceutsku tehnologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### REOLOŠKA KARAKTERIZACIJA I ISPITIVANJE STABILNOSTI FORMULACIJA LIPOSOMI-U-KITIZANSKOM GELU

Ivana Frankol

#### SAŽETAK

Različite vrste liposoma s azitromicinom (AZT): konvencionalni liposomi (CL), deformabilni liposomi (DL), propilenglikol liposomi (PGL) i kationski liposomi (CATL) uklopljeni su u hidrogel na bazi kitozana s ciljem postizanja prikladne viskoznosti za topikalnu primjenu na kožu. Dobivene formulacije liposomi-u-gelu (CL-HG, DL-HG, PGL-HG, CATL-HG) reološki su okarakterizirane rotacijskim i oscilacijskim testovima te im je ispitan pH. Dodatkom AZT-liposoma ili AZT-otopine (kontrola) u kitozanski gel (30 %, m/m) dolazi do blagog smanjenja viskoznosti gela, no formulacije i dalje zadržavaju viskoznost prikladnu za dermalnu primjenu te strukturu i ponašanje viskoelastičnih krutina (gelova). Nadalje, sve ispitivane formulacije liposomi-u-gelu pokazale su linearnu viskoelastičnu regiju (LVR), iz čega proizlazi da se ispitani uzorci neposredno nakon primjene mogu smatrati dobro dispergiranim i stabilnim. Reološka mjerenja su ponovljena nakon 30 dana skladištenja pri 4 °C, pri čemu je utvrđeno da formulacije liposomi-u-gelu nakon skladištenja pokazuju manju viskoznost u odnosu na viskoznost formulacije neposredno nakon izrade, ali uz zadržavanje viskoelastičnog ponašanja svojstvenog gelovima. Dodatak liposoma i AZT-otopine u izvorni gel uzrokovao je blago povišenje pH formulacija. Iako je nakon 30 dana skladištenja zabilježen statistički značajan pad pH svih formulacija, izmjerene vrijednosti i dalje su bile prikladne za dermalnu primjenu. Većina formulacija liposomi-u-gelu pokazala je zadovoljavajuću razinu stabilnosti tijekom 30-dnevnog skladištenja. Izuzetak je formulacija DL-HG koja je tijekom skladištenja toliko primijenila konzistenciju da nije bilo moguće provesti mjerenja nakon 30 dana, što upućuje na postojanje inkompatibilnosti između DL i kitozanskog gela, koju je potrebno potvrditi daljnjim ispitivanjima.

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

Rad sadrži: 60 stranica, 19 grafičkih prikaza, 3 tablice i 62 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: liposomi-u-gelu, kitozan, azitromicin, reologija, stabilnost

Mentor: **Dr. sc. Zora Rukavina**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Zora Rukavina**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Željka Vanić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Emerik Galić**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: travanj 2024.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### RHEOLOGICAL CHARACTERIZATION AND STORAGE STABILITY OF LIPOSOMES EMBEDDED INTO CHITOSAN HYDROGEL

Ivana Frankol

#### SUMMARY

Different types of azithromycin (AZT)-loaded liposomes: conventional liposomes (CL), deformable liposomes (DL), propylene glycol liposomes (PGL), and cationic liposomes (CATL) were embedded into a chitosan-based hydrogel to achieve suitable viscosity for topical application onto the skin. The obtained liposome-in-gel formulations (CL-HG, DL-HG, PGL-HG, CATL-HG) were rheologically characterized by rotational and oscillatory tests, and their pH was examined. Although the addition of AZT-liposomes or AZT-solution (control) into chitosan gel (30%, w/w) caused a slight decrease in gel viscosity, the formulations still retained viscosity suitable for dermal application and the structure and behavior of viscoelastic solids (gels). Furthermore, all tested liposome-in-gel formulations showed a linear viscoelastic region (LVR), indicating that the tested samples could be considered well-dispersed and stable immediately after preparation. Rheological measurements were repeated after 30 days of storage at 4 °C, revealing that liposome-in-gel formulations exhibited lower viscosity after storage compared to the viscosity of formulations immediately after preparation, while retaining viscoelastic behavior characteristic for gels. Liposomes and AZT-solution embedded into the chitosan gel caused a slight increase in the pH of the gel. Although a statistically significant decrease in pH was observed for all formulations after 30 days of storage, the measured values were still suitable for dermal application. Majority of liposome-in-gel formulations showed satisfactory stability during the 30-day storage. An exception was the DL-HG formulation, which underwent such a change in consistency during storage that measurements after 30 days were not possible, suggesting certain incompatibility between DL and chitosan gel, which needs to be confirmed by further research.

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

Thesis includes: 60 pages, 19 figures, 3 tables and 62 references. Original is in Croatian language.

Keywords: liposomes-in-gel, azithromycin, chitosan, rheology, stability

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

Reviewers: **Zora Rukavina, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Željka Vanić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Emerik Galić, Ph.D.** Senior Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April 2024.