

Ispitivanje biokompatibilnosti deformabilnih liposoma s azitromicinom uklopljenih u kitozanski i karbopolski gel

Hulak, Sara

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:745741>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



Repository / Repozitorij:

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



Sara Hulak

**Ispitivanje biokompatibilnosti deformabilnih
liposoma s azitromicinom uklopljenih u kitozanski i
karbopolski gel**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

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

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Zori Rukavini na stručnom vodstvu prilikom izrade diplomskog rada, na strpljenju i ukazanom povjerenju.

Zahvaljujem djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju na korisnim savjetima i pomoći prilikom rada u laboratoriju.

Najviše zahvaljujem svim članovima svoje uže i šire obitelji koji su mi omogućili bezbrižno studiranje i bili najveća potpora tijekom studentskih dana.

Posebno zahvaljujem prijateljicama koje su svojom podrškom učinile studiranje manje stresnim i uvijek bile tu za mene te svim kolegicama, kolegama i prijateljima na divnim uspomename.

Sadržaj

1.	Uvod	1
1.1.	Liposomi	1
1.1.1.	Građa i svojstva liposoma	1
1.1.2.	Priprava liposoma.....	2
1.1.3.	Deformabilni liposomi.....	3
1.2.	Građa kože i njezina barijerna funkcija.....	4
1.3.	Bakterijske kožne infekcije i njihova terapija.....	6
1.4.	Primjena liposoma u liječenju kožnih infekcija	7
1.5.	Hidrogelovi kao podloga za uklapanje liposoma.....	8
1.5.1.	Kitozanski gelovi.....	8
1.5.2.	Karbopolski gelovi.....	10
1.6.	Biokompatibilnost	11
1.6.1.	Ispitivanja biokompatibilnosti <i>in vitro</i>	11
1.6.2.	HaCaT stanice.....	12
1.6.3.	<i>In vitro</i> testovi vijabilnosti stanica.....	12
2.	Obrazloženje teme	14
3.	Materijali i metode	15
3.1.	Materijali	15
3.2.	Metode.....	15
3.2.1.	Priprema deformabilnih liposoma i fizikalno-kemijska karakterizacija.....	15
3.2.2.	Izrada kitozanskog gela (2,5 %)	16
3.2.3.	Izrada karbopolskog gela	17
3.2.4.	Određivanje biokompatibilnosti <i>in vitro</i>	17
3.2.4.1.	Uzgoj HaCaT stanica	17
3.2.4.2.	Priprema uzoraka za rad na stanicama	18
3.2.4.3.	MTT test	19
3.2.5.	Statistička obrada podataka	19
4.	Rezultati i rasprava	20

4.1.	Fizikalno-kemijska karakterizacija deformabilnih liposoma	20
4.2.	Biokompatibilnost s HaCaT stanicama.....	22
5.	Zaključci	27
6.	Popis kratica, oznaka i simbola	28
7.	Literatura	29
8.	Sažetak/Summary	36
	Temeljna dokumentacijska kartica/ Basic documentation card	

1. Uvod

1.1. Liposomi

1.1.1. Građa i svojstva liposoma

Liposomi su otkriveni 60-ih godina prošlog stoljeća, kada je uočeno da fosfolipidi pri dispergiranju u vodenom mediju spontano formiraju sferične vezikule. Od otkrića liposoma do danas, proučavane su njihove karakteristike i ispitivana brojna svojstva te je uočen potencijal primjene liposoma kao terapijskih sustava. Jedan od razloga zašto su liposomi prepoznati kao potentni terapijski sustavi jest činjenica da fosfolipidni dvosloj uvelike slični staničnoj membrani sisavaca, što onda posljedično omogućava liposomima uspješan unos uklopljenog sadržaja u stanicu.

Ovojnica liposoma čine fosfolipidi, amfipatske molekule koje imaju hidrofilnu glavu i hidrofobne repove. Pri dispergiranju u vodenim medijima, zbog svoje amfipatske prirode, imaju sklonost formiranju membrana. Polarne glave fosfolipida okreću se vodenoj okolini, dok dugi nepolarni repovi ulaze u interakciju jedni s drugima te se formira lipidni dvosloj. Nekoliko različitih interakcija stoji iza ovakve organizacije i stabilizira spomenuti dvosloj. Hidrofobne interakcije zaslužne su za stvaranje lipidnog dvosloja, van der Waalsove sile drže duge ugljikovodične lance zajedno. Vodikove veze i polarne interakcije između molekula vode u vodenom mediju i polarnih glava fosfolipida dodatno stabiliziraju cijelu formaciju. Dodatak kolesterola u lipidni dvosloj liposoma smanjuje njihovu permeabilnost te povećava *in vitro* i *in vivo* stabilnost, iz razloga što kolesterol osigurava gusto slaganje fosfolipida. Kolesterol se ujedno može koristiti za sidrenje drugih molekula u liposomsku ovojnica, poput polietilenglikola ili molekula deoksiribonukleinske kiseline. Odabir fosfatidilkolina s lancima zasićenih masnih kiselina i konstituenta koji povisuju temperaturu faznog prijelaza fosfolipidne membrane na temperature iznad 37 °C, osigurava veću fizičko-kemijsku stabilnost liposoma. Kako bi se produljilo *in vivo* cirkulirajuće vrijeme liposoma, u sastav se uključuju hidrofilni ugljikohidrati ili polimeri, poput polietilenglikola (Bozzuto i Molinari, 2015).

Zbog svoje jedinstvene građe, liposomi omogućuju uklapanje molekula različitih fizikalno-kemijskih svojstava. Hidrofilne molekule smještaju se u unutrašnju vodenu jezgru, hidrofobne u lipidni dvosloj, a amfipatske na granici vodene faze i lipidnog dvosloja. Upravo

ta mogućnost uklapanja širokog spektra različitih molekula, kao i netoksičnost, neimunogenost, biorazgradljivost, te već ranije spomenuta sličnost s biološkim membranama, razlozi su zašto su liposomi prepoznati kao inovativni sustavi za dopremu lijekova. Također, liposomski uklopljeni lijek je zaštićen od prerane razgradnje ili inaktivacije. Istovremeno, zdravo tkivo zaštićeno je od nepotrebnog izlaganja lijeku te je manja vjerojatnost za razvoj nuspojava. Liposomi su, kao nosači lijekova, pronašli svoje mjesto u terapiji tumora, terapiji boli, antifungalnoj terapiji, kao cjepiva te u liječenju kožnih oboljenja (Ferreira i sur., 2021; Guimarães i sur., 2021).

Unatoč jasnim terapijskim prednostima koje liposomi posjeduju, njihova primjena je ograničena. To je tako zbog relativno komplicirane proizvodnje, odobrenja od strane regulatornih tijela i intelektualnog vlasništva. Iako su postignuti značajni napredci u razvoju liposoma kao sustava za dostavu lijekova, trenutno na tržištu nema mnogo registriranih liposomskih lijekova (Guimarães i sur., 2021).

1.1.2. Metode priprave liposoma

Postoji mnogo različitih metoda za pripravu liposoma: metoda dehidracije-rehidracije, metoda smrzavanja-taljenja, metoda priprave liposoma visokotlačnom homogenizacijom, metoda etanolnog ili eternog injiciranja, metoda priprave liposoma uparavanjem V/U ili V/U/V emulzija, metoda solubilizacije fosfolipida detergensima itd. Odabir metode ovisi o nekoliko faktora, a neki od njih su: fizikalno-kemijske karakteristike komponenata liposoma i molekula koje se u njih uklapaju, koncentracija tvari koja se želi uklopiti, vrsta medija u kojem su liposomi dispergirani.

Liposomi se najčešće pripravljaju hidratacijom tankog fosfolipidnog sloja tj. filma, pa se stoga ova metoda naziva još film metoda. Provodi se tako da se najprije lipidne komponente pomiješaju u tikvici okruglog dna i otope u organskom otapalu, nakon čega se organsko otapalo uklanja vakuum-uparivačem, čime se dobiva tanki fosfolipidni film na dnu tikvice. Hidratacijom navedenog filma vodenom otopinom i miješanjem, formiraju se sferične vezikule. Liposomi dobiveni ovom metodom su veliki i nehomogeni multilamelarni liposomi te ih je ekstruzijom potrebno prevesti u homogene, male unilamelarne liposome (Zhang, 2016). Unilamelarni liposomi su poželjniji kao terapijski sustavi jer su ujednačeniji veličinom, što je važno za predvidljivost kinetike oslobađanja (Mui i sur., 2003). Veličina liposoma može biti od

nekoliko nanometara do nekoliko mikrometara. Međutim, kada je riječ o medicinskoj primjeni, najčešće se koriste liposomi veličine od 50 nm do 450 nm.

Neovisno o odabranoj metodi pripreme liposoma, nakon pripreme je potrebno pristupiti procesu obrade liposoma kako bi se postigla željena veličina, lamelarnost i homogenost vezikula. Najčešće korištene metode su soniciranje, ekstruzija te homogenizacija pod visokim tlakom. Soniciranje se vrši primjenom ultrazvučnog zračenja na suspenzije multilamelarnih liposoma. Nastali mali unilamelarni liposomi se dalje pročišćavaju ultracentrifugiranjem. Metodom membranske ekstruzije veličina liposoma smanjuje se njihovim prolaskom kroz membranski filter s definiranom veličinom pora. Homogenizacija visokim tlakom, kao što i samo ime govori, koristi visoki tlak za smanjenje veličine čestica (Bozzuto i Molinari, 2015).

1.1.3. Deformabilni liposomi

U 90-im godinama prošlog stoljeća znanstvenici Cevc i Blume modificirali su klasične liposome dodatkom rubnih aktivatora, kako bi postali elastičniji. Nastali liposomi nazvani su deformabilni liposomi, a poznati su još pod nazivima: fleksibilni liposomi, elastični liposomi, ultradeformabilni i ultrafleksibilni liposomi (Nayak i Tippavajhala, 2021). Rubni aktivator je jednolančani surfaktant koji destabilizira lipidni dvosloj i time povećava njegovu deformabilnost. Najčešće korišteni rubni aktivatori su natrijev kolat, deoksikolat, Span 80, Tween 80 (Elsayed i sur., 2006). Ukoliko je količina rubnog aktivatora (surfaktanta) premala, vezikule ne pokazuju svojstva elastičnosti, dok u prevelikoj količini dolazi do preobrazbe lipidnih vezikula u micelle, zbog čega je kod pripreme deformabilnih vezikula potrebno pažljivo optimizirati omjer fosfolipida i surfaktanata u liposomskoj formulaciji (Banović i sur., 2011).

Nekoliko studija potvrdilo je da deformabilni liposomi *in vitro* značajno poboljšavaju dostavu lijekova dermalnim putem (Trotta i sur., 2004; Boinpally i sur., 2003; Trotta i sur., 2002, itd.), pri čemu je učinak bio usporediv sa supkutanim primjenom, a predložena su dva mehanizma kojima deformabilni liposomi poboljšavaju prijenos lijeka kroz kožu: prolaz intaktnih vezikula i poticanje prolaska lijeka kroz kožu (Banović i sur., 2011). Prolaz intaktnih vezikula kroz kožu vezan je uz osmotski gradijent između vanjskih i unutrašnjih slojeva rožnatog sloja kože, koji omogućava deformabilnim liposomima spontani prolazak kroz kožu (Gillet i sur., 2009). Bitnu ulogu u interakciji liposoma s kožom pritom ima i način primjene. Naime, iako je transport većine molekula uklopljenih u liposome povećan pri aplikaciji u okluzivnim uvjetima (koža je izložena zraku pa dolazi do isparavanja vode), za elastične je

vezikule uočeno da su učinkovitije u neokluzivnim uvjetima (pokrivanje kože da se spriječi isparavanje vode), u kojima uslijed razlike u koncentraciji vode na površini i u dubljim slojevima kože nastaje transepidermalni osmotski gradijent vode koji služi kao pokretačka sila za prodor deformabilnih vezikula u hidratiziranije dublje dijelove epidermisa i dermisa, dok im svojstvo elastičnosti membrane omogućuje da intaktni prođu između stanica rožnatoga sloja i kao takvi stignu u dublje slojeve kože (El Maghraby i sur., 2018).

Mehanizam poticanja prolaska lijeka kroz kožu kod primjene deformabilnih liposoma označava zapravo modifikaciju intercelularnih lipida kože uslijed interakcije s lipidima iz ovojnice liposoma, čime se „fluidizira“ intercelularni matriks rožnatog sloja kože i posljedično olakšava prolaz oslobođenim molekulama lijeka iz liposoma kroz kožu. Naime, postoje istraživanja koja su utvrdila učinkovitiju dopremu hidrofilnih lijekova/markera u kožu kad se lijek nalazi izvan vezikula, nego kad je uklopljen u njih (Elsayed i sur., 2007; Verma i sur., 2003). Na osnovi tih i drugih dostupnih istraživanja interakcije deformabilnih liposoma i kože, čini se da će se djelatna tvar unijeti u kožu mehanizmom prolaska intaktnih vezikula, interakcijom lipida liposoma i kože ili kombinacijom ovih mehanizama. Koji će mehanizam prevladavati ovisi o fizičko-kemijskim svojstvima uklopljene ljekovite tvari. Hidrofilni lijekovi ne moraju biti uklopljeni u vezikule, štoviše, njihovo uklapanje u deformabilne liposome može dovesti do stvaranja još jedne dodatne membrane koja im priječi dublju penetraciju kroz kožu. S druge strane, za lipofilne je ljekovite tvari unos mehanizmom intaktnih vezikula prikladniji, jer zbog visoke topljivosti u lipidima liposomska ovojnica ne čini zapreku permeaciji kroz kožu. Dubina penetracije/permeacije lijeka kroz kožu, ovisi i o oslobađanju lijeka iz vezikula, na što utječe afinitet vezanja lijeka za vezikule i topljivost lijeka u lipidima kože (Banović i sur., 2011).

1.2. Građa kože i njezina barijerna funkcija

Koža je s prosječnim udjelom od 10 % ukupne tjelesne mase, najteži organ ljudskog tijela. Ona je svojevrsna granica između tijela i okoline. Osim funkcije barijere, koža ima važnu ulogu i u povezivanju s okolinom kroz izmjenu tvari. Koža se sastoji od epidermisa i dermisa, a ispod dermisa nalazi se potkožno masno tkivo, još zvano i hipodermis, povezano s mišićnim slojem. Epidermis se može podijeliti na rožnati sloj (*stratum corneum*), svijetli sloj (*stratum lucidum*), zrnati (*stratum granulosum*), trnasti (*stratum spinosum*) i bazalni sloj (*stratum basale*). Svijetli sloj može se uočiti samo na dijelovima tijela sa zadebljanom kožom. Razlog

zbog kojeg je transdermalni način primjene lijekova slabije zastupljen od, primjerice, oralne primjene jest slabija apsorpcija zahvaljujući upravo rožnom sloju kože. Rožnati sloj gornji je sloj epidermisa i obično je debljine 10 – 20 μm . Metabolički je neaktivno tkivo koje se sastoji od plosnatih, mrtvih keratinocita, koje nazivamo korneocitima, međustaničnih lipida i međustaničnih proteina, koji se zovu korneodezmosomi. Korneociti nemaju jezgru ni citoplazmatske organele te su ispunjeni keratinskim filamentima (Ng i Lau, 2015). Unutarstanični prostor korneocita velike je gustoće te se stoga smatra kemijski neprobojnim. Lipidi rožnatog sloja čine 10 – 15 % mase i uglavnom su to ceramidi, kolesterol, kolesterol sulfat i slobodne masne kiseline. Organizirani su u slojeve, odnosno lamele. Smatra se da većina tvari kroz kožu prodire upravo putem ekstracelularnih lipida, a njihova zavojita priroda mogla bi biti jedan od razloga zašto je apsorpcija lijekova ovim putem tako loša. Znanstvenici konstantno rade na tehnikama koje bi premostile ovu prepreku. Razvijene su metode koje se fokusiraju na formulaciju samog lijeka, one koje modificiraju rožnati sloj kemijskim putem ili pak elektroporacija ili iontoforeza (Higaki i sur., 2003). Ostali slojevi epidermisa sadrže stanice s jezgrom te se s toga nazivaju vijabilnim dijelom epidermisa. Ovaj dio debljine je 50 – 100 μm i primarno se sastoji od keratinocita, dok ostatak čine Langerhansove stanice, melanociti i Merkelove stanice. Keratinociti od bazalnog sloja do površine kože prolaze kroz diferencijaciju. Pod pojmom diferencijacije misli se na povećanu keratinizaciju, odnosno tvorbu intracelularne mreže keratinskih vlakana, tvorbu lamelarnih tjelešaca koji izlučuju lipide te gubitak organela i jezgre. Naposljetku, potpuno diferencirani keratinociti (korneociti) ljušte se s površine kože u procesu poznatom kao deskvamacija (Ng i Lau, 2015).

Dermis, koji je u prosjeku debljine oko 1 mm, odgovoran je za elastičnost i snagu kože. Građen je od fibroblasta uklopljenih u ekstracelularni matriks od strukturnih proteina (uglavnom kolagena i elastina). Kao i epidermis, i dermis se može podijeliti u manje strukturalne komponente - gornji papilarni sloj i donji retikularni sloj, koji se mikroskopski mogu razlikovati prema tanjim i rjeđe posloženim kolagenskim vlaknima u papilarnom sloju. Dermis sadrži folikule dlaka, znojne žlijezde, sebacealne žlijezde, živčane završetke, limfne žile i krvne kapilare. Važan dio dermisa su i imunostanice, uključujući makrofage i dendritičke stanice. Hipodermis je unutarnji sloj kože i građen je uglavnom od masnog tkiva. U ovom sloju kože smještene su veće limfne i krvne žile (Ng i Lau, 2015).

1.3. Bakterijske kožne infekcije i njihova terapija

Bakterijske kožne infekcije često su prisutan problem zbog kojeg se pacijenti javljaju svojim liječnicima opće prakse kao i na hitni prijem. Postoje kožne infekcije za koje terapija antibioticima nije potrebna, zatim nekomplikirane bakterijske infekcije koje se liječe kratkotrajnom terapijom antibioticima, u trajanju od nekoliko dana, te infekcije uzrokovane vrstom *Staphylococcus aureus* rezistentnom na meticilin (MRSA) za koje je pronalazak adekvatne terapije nešto zahtjevniji (Sukumaran i Senanayake, 2016). Prema studiji koju je objavio američki NHNS (National Healthcare Safety Network), *S. aureus* je bio najbrojniji mikroorganizam izoliran iz inficiranih stanica kože (Stefani i Goglio, 2010). *S. aureus* može uzrokovati razne promjene na koži, od folikulitisa i furunkula do apcesa i celulitisa. Liječenje se najčešće provodi oralnom terapijom tetraciklinima, rifampicinom, linkozamidima, makrolidima i dr. Moguće je i uvođenje intravenske terapije, koja onda uključuje daptomicin, tigeciklin, linezolid i ceftobiprol (Gould, 2009).

Makrolidni antibiotici dokazano su djelotvorni kod raznih kožnih infekcija. Makrolidi inhibiraju sintezu proteina vezanjem na 23S ribosomsku RNA u 50S podjedinici. Dodatno, makrolidi inhibiraju sintezu proteina poticanjem odvajanja peptidil-tRNA s ribosoma. Iako se smatraju bakteriostatskim lijekovima, moguće je postizanje baktericidne aktivnosti. Hoće li lijek pokazati bakteriostatsko ili baktericidno djelovanje, ovisi o vrsti organizma, koncentraciji lijeka i veličini inokuluma. Također postoje određene naznake da pH na mjestu infekcije može utjecati na aktivnost makrolida, s obzirom da bolje prodiru kroz membranu u alkalnom okruženju. Prvi predstavnik makrolida bio je eritromicin koji je smatran alternativom penicilinu zbog svoje aktivnosti protiv Gram-pozitivnih mikroorganizama. Eritromicin je izoliran iz metaboličkih produkata soja *Streptomyces erytherus* 1952. godine. Eritromicin je zbog nekih loših karakteristika, poput uskog spektra djelovanja, loših farmakokinetičkih svojstava i brojnih interakcija u koje stupa s drugim lijekovima, zamijenjen novijim predstavnicima iste skupine. Jedan od njih je azitromicin, lijek koji pokazuje bolju antibakterijsku aktivnost prema Gram-negativnim bakterijama i netipičnim patogenima te bolji prodor u tkiva. Azitromicin je pokazao bolju *in vitro* aktivnost protiv *Moraxella catarrhalis*, *Legionella spp.*, *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Pasteurella multocida*, *Chlamydia spp.*, *Campylobacter spp.*, i *Neisseria gonorrhoeae*, u usporedbi s eritromicinom. Jedna studija pokazala je da je prilikom oralne primjene azitromicina u dnevnoj dozi od 300 mg u trajanju od 5 dana, *S. aureus* eradiciran u

89 % ispitanih pacijenata. Problem koji se javlja kod primjene makrolida je razvoj rezistencije (Parsad i sur., 2003).

Budući da nekomplikirane kožne infekcije čine velik dio razloga posjeta liječnika te da se za njihovo liječenje izdvajaju velike svote novca, terapijska rješenja se kontinuirano razvijaju i stalno se istražuju nove mogućnosti liječenja, pri čemu je jedan od mogućih pristupa razvoj topikalne terapije. Razlozi zbog kojih se topikalni način primjene lijeka proučava su mogućnost postizanja visoke koncentracije lijeka na mjestu infekcije, niska vjerojatnost izazivanja sustavnih nuspojava, ekonomičnija cijena i poboljšana suradljivost pacijenata. Danas postoje brojne antibakterijske masti, kreme i gelovi s uklopljenim mupirocinom, gentamicinom i tirotricinom. Osim pozitivnih strana lokalne terapije, postoje i neki potencijalni problemi kod takvog načina primjene. Moguća je pojava lokalne alergijske reakcije, a sve veći je problem i razvoj antimikrobne rezistencije. Također, puno pozornosti mora se posvetiti razvoju formulacije ovakvih proizvoda, zbog lošeg prodiranja u kožu (Pangilinan i sur., 2009).

1.4. Primjena liposoma u liječenju kožnih infekcija

Jedan od načina rješavanja problema lošeg prodiranja lijeka kroz kožu, jest razvoj naprednih (nano)formulacija. Nanofarmaceutici su se pokazali kao potencijalno rješenje problema. Zbog ranije navedenih pozitivnih karakteristika liposoma kao mogućih novih sustava za dostavu lijekova, javila su se razmišljanja da bi upravo oni mogli poslužiti kao nosači lijekova. Također, zbog mogućnosti manipulacije fizikalnih svojstava liposoma poput veličine vezikula, površinskog naboja ili pak samog sastava, odnosno vrste lipida koji se koriste u njihovoj pripravi, moguće je prilagoditi farmakokinetiku i farmakodinamiku lijeka. Zbog uspjeha u liječenju infekcija sa *S. aureus*, te općenito širokog spektra antimikrobnog djelovanja, azitromicin se pokazao kao moguća opcija za uklapanje u liposome (Rukavina i sur., 2018).

Svi liposomi nisu isti kada se govori o njihovim svojstvima i djelotvornosti po pitanju različitih vrsta kožnih oboljenja. Konvencionalni liposomi obično poboljšavaju odlaganje lijeka u slojevima kože, bez utjecaja na transdermalno prodiranje. Pokazalo se da noviji liposomi, poput deformabilnih ili propilenglikol liposoma, povećavaju prodiranje kroz rožnati sloj kože, a čak i omogućuju transdermalnu dostavu lijekova (Palac i sur., 2014).

1.5. Hidrogelovi kao podloga za uklapanje liposoma

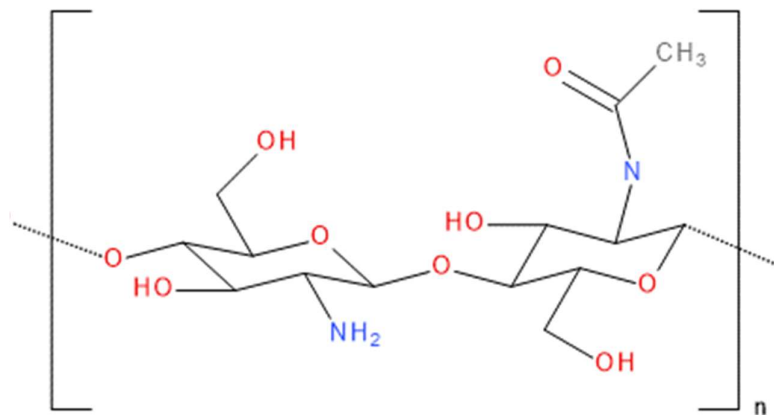
Iako liposomi imaju brojne prednosti i odlične mogućnosti za topikalnu primjenu lijekova, tekuća priroda liposomskih disperzija utječe na ograničenu sposobnost zadržavanja formulacije na mjestu primjene. Jedan od mogućih pristupa kojima se nastoji pospješiti zadržavanje formulacije na mjestu primjene jest uklapanje liposoma u polučvrstu podlogu. Osim spomenutog zadržavanja na mjestu primjene, odnosno osiguravanja određene viskoznosti, podloga utječe i na stabilnost formulacije, ali i bioraspoloživost samog lijeka. Kao podloga za uklapanje liposoma uglavnom se koriste hidrogelovi i kreme (Palac i sur., 2014).

Gelovi su građeni od velike količine otapala zarobljene između trodimenzionalne mreže. Kada je otapalo voda, riječ je o hidrogelovima (Peers i sur., 2020). Korištenje hidrogelova povoljno je zbog dobre suradljivosti pacijenata, zadovoljavajućeg oslobađanja aktivne tvari, povoljnih reoloških svojstava, kompatibilnosti s kožom i s većinom aktivnih tvari, lakoće nanošenja ali i uklanjanja s kože (Ortan i sur., 2011). U više znanstvenih studija hidrogelovi su korišteni kao podloga za uklapanje liposoma, pri čemu su se pokazali prikladnima po pitanju profila otpuštanja lijeka i po svom protektivnom učinku prema uklopljenim liposomima (Binaymotlagh i sur., 2024; Ibrahim i sur., 2017; Palac i sur., 2014).

1.5.1. Kitozanski gelovi

Kitozan je kationski polimer koji se dobiva deacetilacijom hitina u alkalnim ili kiselim uvjetima. Hitin je najšire rasprostranjen biopolimer u prirodi, nakon celuloze. Može se pronaći u mnogim eukariotskim vrstama, poput insekata, gljiva i rakova (Kou i sur., 2018). Kitozan je linearni kopolimer koje se sastoji od dvije podjedinice, D-glukozamina i N-acetil-D-glukozamina koji su povezani β (1 \rightarrow 4) glikozidnom vezom (Peers i sur., 2020). Kitozan se može pripremiti kemijskim i biološkim metodama. Kemijska priprava ima više prednosti, zbog jednostavnosti i brzine, a pokazalo se i da produkti imaju veću bioaktivnost. Biološke metode zahtijevaju posebnu opremu, kompleksne procese pročišćavanja te rafiniranje u posljednjem koraku kako bi se postigla optimalna kvaliteta (Kou i sur., 2018). Kitozan je topljiv u kiselim vodenim medijima, za razliku od hitina koji je netopljiv. Kitozan ima brojna pozitivna svojstva koja ga čine odličnim za biomedicinsku upotrebu. Naime, biokompatibilan je, biorazgradiv, pokazuje izvjesna antimikrobna svojstva te je mukoadhezivan (Peers i sur., 2020). Razlikuje se kitozan velike molekulske mase (eng. *high molecular weight*, HMW),

srednje (eng. *medium molecular weight*, MMW) i male molekulske mase (eng. *low molecular weight*, LMW). Kitozan velike molekulske mase formira relativno robusne hidrogelove. Osim toga, on se pokazao učinkovitijim u promoviranju zarastanja kože (Rukavina i sur., 2023).



Slika 1. Kemijska struktura kitozana. Izrađeno pomoću programa BIOVIA Draw 2017.

Kitozanski hidrogelovi mogu se kategorizirati na osnovu vrste unakrsnog povezivanja. Jedna vrsta je kovalentno povezivanje. Kovalentno povezani kitozanski hidrogelovi nastaju kovalentnim povezivanjem kitozanskih makromera. Za interakcije su zaslužne amino i hidroksilne skupine na kitozanskim lancima a povezivanje je ireverzibilno. Kovalentno povezivanje može se odviti uz pomoć poveziča poput glutaraldehida ili akrilne kiseline, ili fotopolimerizacijom. Fotopolimerizacija je metoda u kojoj UV ili vidljiva svjetlost u reakciji s molekulama koje se nazivaju fotoinicijatori proizvodi slobodne radikale koji iniciraju polimerizaciju. Hidrogelovi nastali kovalentnim povezivanjem otporni su i stabilni, no potrebni su dodatni postupci pročišćavanja kako bi se uklonili poveziča koji nisu izreagirali, a koji mogu biti toksični za biomedicinsku primjenu (Ahmadi i sur., 2015).

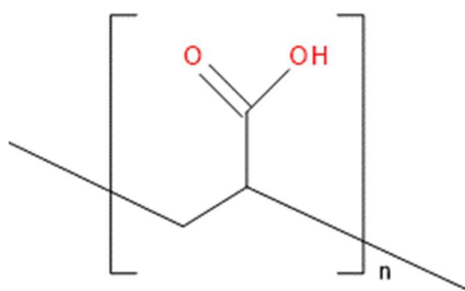
Druga vrsta unakrsnog povezivanja je nekovalentno povezivanje. S obzirom da je kitozan kationski polimer s amino skupinama, anioni se često koriste kao poveziča. Ovakav način unakrsnog povezivanja, koji se često naziva i ionsko geliranje kitozana, najčešće se koristi za smještaj lijekova niske molekulske mase. Ionske interakcije mogu nastati i između suprotno nabijenih polimera. Negativno nabijeni polimeri, poput alginata, pektina, hijaluronske kiseline i drugih, u otopini spontano stvaraju komplekse s pozitivno nabijenim kitozanom. Hidrogelovi

nastali ovakvim povezivanjem pokazuju bolju biokompatibilnost u odnosu na kemijski povezane kitozanske hidrogelove, no manje su mehanički stabilni i potencijalno mogu reagirati na okolišne faktore poput pH ili temperature (Ahmadi i sur., 2015).

Budući da se za kitozanske hidrogelove pokazalo da mogu osigurati odgovarajuća viskoelastična i teksturalna svojstva formulacije, produljeno zadržavanje liposomalne formulacije te produljeno oslobađanje lijeka na mjestu primjene, kao i unaprjeđenje terapijskog učinka uklopljenog lijeka, pokazali su se kao obećavajuća podloga za uklapanje liposoma (Rukavina i sur., 2023; Hemmingsen i sur., 2021; Jøraholmen i sur., 2019).

1.5.2. Karbopolski gelovi

Karbopoli su sintetski karboksivinilni polimeri, polimeri poli(akrilne kiseline) koji se koriste u raznim područjima: kozmetičkoj industriji, farmaceutskoj industriji za stabilizaciju, poboljšanje reoloških svojstava, za kontrolirano oslobađanje lijekova ili kao zgušnjivači. U vodenim otopinama tvore umrežene strukture mikrogela s intersticijskim prostorima koje omogućuju uklopljenim česticama da ostanu stabilne duže vrijeme (Kim i sur., 2003). U novije vrijeme, koriste se zbog svojih mukoadhezivnih svojstava. Upravo zbog njih, karbopol je pronašao primjenu u oftalmičkim, rektalnim, nazalnim, intestinalnim, vaginalnim i topikalnim pripravcima (Bonacucina i sur., 2004).



Slika 2. Kemijska struktura poli(akrilne kiseline). Izrađeno pomoću programa BIOVIA Draw 2017.

Za lokalnu upotrebu koriste se karbopolski gelovi u koncentraciji od 0,5 do 2 %. Za karbopolske gelove pokazalo se da su čak i pri niskim koncentracijama visoko viskozni, što im omogućuje odgovarajuću stabilnost i čini ih otpornijim prema invazijama mikroba i rastu

gljivica. Osim toga, kompatibilni su s većinom aktivnih tvari, imaju dobra bioadhezivna svojstva i toplinski su stabilni (Ortan i sur., 2011). Još jedna prednost korištenja karbopola kao gelirajućeg agensa jest da se geliranje može odvijati u vodi sobne temperature, za razliku od primjerice hidroksipropil metilceluloze koja zahtijeva vruću vodu. Postoji više vrsta karbopola, a označavaju se brojevima. Neki od najčešće korištenih su karbopol 940, 980, 934 i 981. Ovisno o uporabi i željenim karakteristikama, odabiru se različite vrste karbopola. Primjerice, karbopol 940 ima nešto višu viskoznost, a karbopol 980 zbog sadržaja bez benzena ima bolji toksikološki profil i bolje odgovara farmaceutskim standardima (Safitri i sur., 2021). Ranije je već pokazano da su liposomi kompatibilni s polimerima akrilne kiseline (Ortan i sur., 2011).

1.6. Biokompatibilnost

1.6.1. Ispitivanja biokompatibilnosti *in vitro*

Biokompatibilnost se može definirati kao kompatibilnost između tvari i biološkog sustava. To je sposobnost tvari da obavlja svoju funkciju bez izazivanja štetnih učinaka na biološki sustav. Vrlo je važno utvrditi biokompatibilnost za farmaceutske formulacije kako bi se osigurala sigurnost za organizam te dokazalo da formulacija neće uzrokovati štetne reakcije u tijelu. Farmaceutske formulacije ne smiju izazivati toksične, alergijske ili upalne odgovore. Dokazom biokompatibilnosti minimizira se rizik razvoja nuspojava te se osigurava sigurnost liječenja pacijenata. Osim sigurnosti, važno je i da je lijek djelotvoran. Kako bi bio djelotvoran, lijek mora na odgovarajući način stupati u interakcije s tijelom. Procjena biokompatibilnosti regulirana je standardima koje u SAD-u određuje FDA (eng. *Food and Drug Administration*), a za Europu ISO (eng. *International Organization for Standardization*). Ispitivanje biokompatibilnosti uključuje procjenu citotoksičnosti koja može biti provedena *in vitro* i *in vivo* (Peters i sur., 2021).

Dostupni su brojni modeli stanica i tkiva za ispitivanja biokompatibilnosti farmaceutskih formulacija *in vitro*, ovisno o namjeni i odabranom putu primjene formulacije. Postoje dvije vrste stanica koje se mogu kultivirati, primarne stanice koje su direktno izolirane iz tkiva sisavaca ili besmrtnne stanične linije koje su dobivene iz primarnih genetskom transformacijom. Primarne stanice su heterogene i to svojstvo može imati negativan utjecaj na reproducibilnost rezultata. Također, primarne stanice se mogu održati *in vitro* samo ograničeno vrijeme. Besmrtnne stanične linije ne pokazuju problem heterogenosti te imaju neograničen

potencijal proliferacije. Stanice dostupne za ispitivanja su fibroblasti (iz ljudske kože, bukalne mukoze, pluća embrija), HeLa stanice, Caco-2, HaCaT, Huh-7, mišje stanične linije (C3H-L, Balb/c, 3T3, L929) i druge (www.sigmaldrich.com; Peters i sur., 2021; Wiegand i sur., 2009).

1.6.2. HaCaT stanice

Ljudska koža građena je od keratinocita, melanocita i fibroblasta (López-García i sur., 2014). Najbrojniji tip stanica u epidermisu su keratinociti. Ime su dobili prema proteinu keratinu, koji proizvode. Nastaju u bazalnom sloju te se prolaskom kroz slojeve epidermisa do rožnatog sloja diferenciraju u korneocite. Ondje formiraju barijeru koja tijelo štiti od stranih tijela i dehidracije. Važna je i njihova uloga u imunološkom odgovoru i upalnim procesima, zbog proizvodnje brojnih citokina, faktora rasta i faktora komplementa. Keratinociti se mogu izolirati putem biopsije kože enzimskim tretmanom epidermisa. Međutim, primarne stanične linije ne mogu se neograničeno održavati u kulturi. Nakon nekoliko pasaža, stanice gube svoj proliferacijski kapacitet te je vremenski okvir u kojem se testovi moraju provesti poprilično kratak. Kao rješenje tog problema, koriste se tzv. HaCaT stanice.

HaCaT stanice su besmrtna stanična linija ljudskih keratinocita i potiču iz izolata periferije melanoma na leđima 62-godišnjeg muškog pacijenta. One su praktički besmrtni i moguće ih je kultivirati za više od 140 pasaža. HaCaT stanice koriste se stoga kao model za proliferirajuće keratinocite u velikom broju testova citotoksičnosti (Wiegand i Hipler, 2009). Njihova široka upotreba opravdana je njihovom sposobnošću da zadrže kapacitet diferencijacije, njihov fenotip usporediv je s normalnim ljudskim keratinocitima, također su vrlo dostupne i lako se nabavljaju, nezahtjevne su kada se govori o uvjetima kultiviranja, brzo se udvostručuju te daju ujednačen odgovor na testnu tvar (Rusanov et al., 2017).

1.6.3. *In vitro* testovi vijabilnosti stanica

Ključan parametar koji preliminarno pokazuje negativne učinke *in vitro* testirane tvari na ljudske stanice/tkiva jest smanjenje vijabilnosti tretiranih stanica. Postoje brojne metode za procjenu vijabilnosti tretiranih stanica, a jedna od njih je promatranje promjena u aktivnosti staničnih oksidoreduktaza. Kako bi se vijabilnost mogla odrediti, potrebno je na jasno vidljiv način dokazati da su stanične oksidoreduktaze unutar stanice aktivne (Supino, 1995).

MTT kolorimetrijski test je dobro utvrđena metoda za određivanje broja vijabilnih stanica. Metoda se zasniva na promjeni boje prilikom redukcije MTT-a (3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolium bromid) u formazan. Otapanjem MTT-a u vodi dobiva se žuta vodena otopina te MTT pod utjecajem reducirajućeg djelovanja metabolički aktivnih stanica, prelazi u ljubičasto obojeni formazan (Sylvester, 2011). Metoda se provodi na način da se stanicama kojima se želi ispitati vijabilnost, doda MTT dispergirani u PBS-u, stanice se potom inkubiraju oko 30 – 60 minuta. Budući da u reakciji nastaje netopljivi formazan, važan dio ovog testa je otapanje kristala formazana u odgovarajućem otapalu, kako bi nastala bistra otopina formazana kojoj će se onda mjeriti apsorbancija. U tu svrhu, nakon inkubacije stanica, dodaje se kiseli izopropanol (Nga i sur., 2020). Mjerenje apsorbancije provodi se na spektrofotometru posebno dizajniranom za očitavanje ploča. Količina nastalog formazana izravno je proporcionalna broju vijabilnih stanica (Sylvester, 2011). U slučaju da stanica izgubi metaboličku aktivnost, više neće biti aktivnosti staničnih oksidoreduktaza, te posljedično nema redukcije MTT-a i ljubičastog obojenja. Male promjene u metaboličkoj aktivnosti mogu uzrokovati velike promjene redukcije MTT-a, što omogućuje detekciju negativne stanične promjene, koja ne mora nužno biti direktna stanična smrt (Kumar i sur., 2018; Supino, 1995). Budući da je MTT test brz, ekonomičan i jednostavan, vrlo je popularna metoda kvantifikacije vijabilnih stanica (Sylvester, 2011).

2. Obrazloženje teme

Bakterijske kožne infekcije nerijetko zahtijevaju liječenje antibioticima, a jedan od lijekova izbora je azitromicin, koji se primjenjuje sistemski, oralnim putem primjene (Parsad i sur., 2013). Alternativu oralnoj sistemskoj terapiji u liječenju kožnih infekcija predstavlja korištenje topikalnih ljekovitih oblika, s ciljem postizanja visoke lokalne koncentracije lijeka na mjestu primjene, manje vjerojatnosti izazivanja sustavnih nuspojava i razvoja bakterijske rezistencije. No, usprkos brojnim prednostima topikalne lokalne primjene lijekova na kožu, razvoj topikalnih dermalnih formulacija je poseban izazov zbog barijerne funkcije rožnatog sloja ljudske kože (Pangilinan i sur., 2009). Kao iznimno vrijedna strategija za postizanje veće učinkovitosti dermalno primijenjenih lijekova, pokazali su se terapijski nanosustavi, posebice liposomi. Klasične liposomske formulacije su zapravo disperzije vezikula u vodenom mediju, a takva tekuća konzistencija može predstavljati ograničenje u topikalnoj primjeni liposoma. Iz tog razloga razvijani su kombinirani terapijski sustavi koji se sastoje od liposoma uklopljenih u polučvrstu podlogu, najčešće gel, a koji pokazuju prikladniju viskoznost formulacije, bolje zadržavanje na mjestu primjene te produljeno i kontrolirano oslobađanje lijeka (Palac i sur., 2014). Prilikom razvoja takvih kombiniranih formulacija liposomi-u-podlozi, potrebno je voditi računa ne samo o učinkovitosti i biofarmaceutskim karakteristikama formulacije, već i o biokompatibilnosti s odabranim staničnim kulturama (ovisno o ciljanom putu primjene), kao prvi korak u procjeni sigurnosti formulacije *in vitro*.

U ovom diplomskom radu, deformabilni liposomi s uklopljenim azitromicinom uklopljeni su u 2 različite podloge, kitozanski gel i karbopolski gel, kako bi se ispitala i usporedila biokompatibilnost dobivenih formulacija na HaCaT stanicama *in vitro*. Naime, u prethodećoj studiji (Rukavina i sur., 2023) pokazalo se da od nekoliko različitih vrsta liposoma s azitromicinom uklopljenih u kitozanski hidrogel, deformabilni liposomi uklopljeni u kitozanski hidrogel pri većim koncentracijama uzrokuju značajan pad stanične vijabilnosti, dok su se ostali tipovi liposoma-u-gelu u ispitanom rasponu koncentracija azitromicina pokazali biokompatibilnima s HaCaT stanicama *in vitro*. Budući da za deformabilne liposome s azitromicinom koji nisu uklopljeni u kitozanski gel nije utvrđen citotoksični učinak u istom rasponu koncentracija (Rukavina i sur., 2018), cilj ovog rada bio je dodatno istražiti na koji način utječe uklapanje deformabilnih liposoma u gel na njihovu biokompatibilnost te utječe li vrsta hidrogela u koju se uklapaju deformabilni liposomi na biokompatibilnost ukupne formulacije liposomi-u-gelu.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

Sojin lecitin (Lipoid S75) i 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfokolin (DPPC) proizvedeni su od strane Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Njemačka. Natrijev deoksikolat, dimetildioktadecilamonijev bromid (DODAB), kitozan visoke molekulske mase (HMW), kitozan srednje molekulske mase (MMW), 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazol bromid (MTT), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kupljeni su od Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Azitromicin (AZT) je ljubazno donirala PLIVA d.o.o., Zagreb, Hrvatska. Carbopol 940, propilenglikol (PG) i trietanolamin kupljeni su od Kemig d.o.o. (Hrvatska). Mliječna kiselina kupljena je od Carlo Erba Reagents (Francuska).

Za pripremu liposoma korišten je fosfatni pufer koncentracije 0,01 mol/L i pH =7,5 koji je izrađen otapanjem 1,3609 grama KH_2PO_4 u 1000 mL vode, a željeni pH podešen je dodatkom otopine kalijevog hidroksida (KOH) koncentracije 1 mol/L. Otopina fosfatnog pufera je naposljetku filtrirana pomoću celuloza-nitratnog filtera veličine pora 0,45 μm . Za MTT test korišten je komercijalno dostupan fosfatni pufer (PBS 0,01 M, pH = 7,4) (Santa Cruz Technology, Texas, Sjedinjene Američke Države).

3.2. Metode

3.2.1. Priprema deformabilnih liposoma i fizikalno-kemijska karakterizacija

Film-metodom pripremljeni su deformabilni liposomi (DL). Pripremljeni su na način da je u tikvicu okruglog dna i zapremnine 100 mL, odvagano 85 mg Lipoid S75, 15 mg natrijevog deoksikolata te 15 mg AZT. Navedene komponente u tikvici otopljene su u 5 mL 96 %-tnog etanola. Potom je pomoću rotacijskog vakuum-uparivača (Büchi Rotavapor R-200, Büchi, Labortechnik AG, Švicarska) uklonjen etanol. Dobiveni tanki fosfolipidni film na dnu tikvice rehidriran je otopinom fosfatnog pufera. Na isti način pripremljeni su i prazni DL, jedina razlika je što su u tom slučaju u tikvicu odvagani Lipoid S75 i natrijev deoksikolat bez AZT-a. Liposomi su nakon izrade ekstrudirani kroz polikarbonatne membrane promjera 19 mm (Avestin Inc., Kanada). Uzorak je protisnut tri puta kroz polikarbonatnu membranu veličine pora 400 nm. Potom je polovica od ukupnog volumena uzorka protisnuta još tri puta kroz membranu veličine pora 100 nm. Nakon postupaka ekstruzije, izmjereni su veličina čestica, indeks polidisperznosti i zeta potencijal na uređaju Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical,

Malvern, UK). Kapljica uzorka stavljena je u kivetu i razrijeđena PBS-om. Kako bi mjerenje bilo uspješno, pripremljen je blago opalescentan uzorak. Mjerenja su provedena na 25 °C u trajanju od 120 sekundi. Mjereni su veličina čestica, indeks polidisperznosti i zeta potencijal za deformabilne liposome s AZT-om koji su ekstrudirani kroz filter veličine pora 400 nm, te za one koji su ekstrudirani i kroz filter pora 400 nm a potom i filter pora 100 nm. Također su iste karakteristike izmjerene i deformabilnim liposomima bez AZT-a. Sadržaj AZT-a u liposomima određen je pomoću HPLC-a prema metodi opisanoj u radu Rukavine i suradnika (2018).

3.2.2. Izrada kitozanskog gela

Najprije se u malu staklenu čašu odvaže 0,25 grama HMW kitozana. Zatim je dodan 1 gram propilenglikola te je smjesa miješana staklenim štapićem 5 minuta. Potom je dodano 3,75 grama 3,5 %-tne mliječne kiseline (pripremljena iz 88 %-tne mliječne kiseline razrjeđivanjem pročišćenom vodom) te je smjesa ponovno miješana staklenim štapićem 5 minuta te sonicirana 15 minuta na ultrazvučnoj kupelji. Nakon 15 minuta, dodana je voda u obrocima do 10 grama. Smjesa je degazirana i gel je ostavljen da bubri na sobnoj temperaturi 48 sati, nakon čega mu je izmjeren pH pomoću pH metra opremljenog elektrodom za polučvrste uzorke (S47 SevenMulti, Mettler-Toledo, Švicarska).

U cilju dobivanja optimalno izbubrenog gela uz postizanje što prikladnijeg pH gela, pripremljeni su gelovi s različitim udjelom mliječne kiseline/vode u pripravku (Tablica 1). U konačnici je odabrana formulacija CHG8 koja je pokazala odgovarajuće bubrenje i konzistenciju nakon 48 sati, uz najveću pH vrijednost postignutu pri potpunom bubrenju (neke formulacije su imale i veći pH, ali nisu adekvatno izbubile nakon 48 sati).

Tablica 1. Sastav kitozanskih gelova s različitim udjelom mliječne kiseline

ŠIFRA FORMULACIJE	HMW KITOZAN (g)	PG (g)	3,5 % MK (g)	VODA (g)	pH
CHG1	0,25	1	3,50	5,25	4,15
CHG2	0,25	1	3,25	5,50	4,04
CHG3	0,25	1	3,00	5,75	4,27
CHG4	0,25	1	2,75	6,00	4,37
CHG5	0,25	1	2,50	6,25	4,88
CHG6	0,25	1	2,25	6,50	5,03
CHG7	0,25	1	2,00	6,75	5,69
CHG8	0,25	1	3,75	5,00	4,03
CHG9	0,25	1	3,90	4,85	3,79
CHG10	0,25	1	4,00	4,75	3,72
CHG11	0,25	1	4,10	4,65	3,67

HMW KITOZAN – kitozan velike molekulske mase, MK – mliječna kiselina, PG – propilenglikol, CHG – kitozanski hidrogel

3.2.3. Izrada karbopolskog gela

Carbopol 940, Kemig izvagan je u staklenu čašu. Masa je iznosila 0,5 g. Dodano je 88,5 g demineralizirane vode i smjesa je miješana 60 minuta na magnetskoj mješalici pri 700 rpm. Nakon isteka 60 minuta, dodano je 10 g propilenglikola. Smjesa je potom neutralizirana 50 %-tnim trietanolaminom do formiranja gela, s ciljem postizanja pH oko 5 (pH =5,2).

3.2.4. Određivanje biokompatibilnosti *in vitro*

3.2.4.1. Uzgoj HaCaT stanica

Stanice su uzgojene u sterilnoj laboratorijskoj boci za uzgoj stanica u mediju DMEM s dodatkom 10 %-tnog fetalnog govedeg seruma i 1 %-tne mješavine penicilina, streptomicina i amfotericina B pri 37 °C u inkubatoru (HERAcell vios 160i CO2 Incubator, Thermo Scientific, Njemačka). Stanicama je redovito mijenjan medij te je rast stanica praćen svjetlosnim mikroskopom (Primovert microscope, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Njemačka). Kada je

postignuta odgovarajuća konfluentnost (80 – 90 %), nasadene su na sterilne mikrotitarske ploče s 96 jažica (Nunclon Surface, Thermo Fisher Scientific, Sjedinjene Američke Države).

Postupak nasadivanja stanica na mikrotitarske ploče započet je zagrijavanjem medija DMEM i PBS-a na 37 °C. Pripremljena je otopina koja se sastoji od 0,5 ml tripsina i 9,5 ml PBS-a. Najprije je odsisan stari medij i stanice su isprane s 2 ml PBS-a. Potom je dodana EDTA u volumenu od 1 ml te su stanice inkubirane 3 minute na 37 °C, nakon kojih je EDTA odsisana. Dodan je 1,5 ml pripremljene otopine tripsina i PBS-a te su stanice ostavljene 3 minute u otopini u inkubatoru, pri 37 °C, kako bi se odvojile od podloge. Stanice su pogledane pod mikroskopom, protresene i kada je ustanovljeno da su stanice odvojene od podloge dodano je 4 ml medija za inaktivaciju tripsina. Stanice su nasadene na mikrotitarske ploče od 96 jažica u koncentraciji od 10⁴ stanica/jažici i inkubirane su naredna 24 sata.

3.2.4.2. Priprema uzoraka za tretiranje stanica

Uzorci gela pripremljeni su na način da je u malu čašu izvagan gel (kitozanski/karbopolski) te je zapisana odvaga. Od izvagane mase gela izračunato je 30 % mase (m/m) te je tako određena masa liposoma/otopine AZT koja je dodana u gel. Pripremljeni su: kitozanski gel s uklopljenim DL (DL-CHG), kitozanski gel s uklopljenim DL* bez AZT (DL*-CHG), karbopolski gel s uklopljenim DL s AZT (DL-CAG), karbopolski gel s uklopljenim praznim DL* bez AZT (DL*-CAG), kitozanski gel s uklopljenom otopinom AZT (AZT-CHG) i karbopolski gel s otopinom AZT (AZT-CAG). Otopina AZT prethodno je izrađena otapanjem odgovarajuće mase AZT u smjesi voda/etanol (6/4, v/v), pri čemu je konačna koncentracija AZT u otopini odgovarala koncentraciji AZT u liposomskoj formulaciji (DL).

Zamišljeno je da početna koncentracija AZT u uzorcima koji će biti nanoseni na ploče sa stanicama iznosi 128 µg/mL, a uzorak treba biti volumena 1 ml. Kako bi taj uvjet bio zadovoljen, uzorci su razrijeđeni s DMEM bez dodatka seruma. Za svaki pojedini uzorak pripremljen je koncentracijski niz na način da je u svaku sljedeću epruvetu dodano 500 µl uzorka iz prethodne epruvete i 500 µl medija DMEM bez dodatka seruma. Time je dobiven koncentracijski niz raspona od 128 do 0,25 µg/mL.

3.2.4.3. MTT test

Mikrotitarske ploče sa stanicama izvađene su iz inkubatora i medij je odsisan pomoću pumpe za odsisavanje. Odmah nakon odsisavanja, dodano je 100 µl uzorka u triplikatu iz pripremljenih epruveta s uzorcima. Postupak je ponavljan za sve jažice, prema protokolu. Kao negativna kontrola, u odgovarajuće jažice je umjesto uzorka dodan DMEM. Ploče su potom ostavljene 2 sata u inkubatoru, nakon čega je uzorak odsisan i u svaku jažicu odmah dodano 100 µl PBS-a za ispiranje jažica. PBS je odsisan i dodan je medij sa serumom. Ploče su tijekom iduća 24 sata ostavljene u inkubatoru.

Nakon 24 sata, pripravljena je otopina MTT-a u PBS-u koncentracije 5 mg/mL. Ploče su izvađene iz inkubatora te je u svaku jažicu dodano 10 µl otopine MTT-a, ploče su ostavljene 30 minuta u inkubatoru, nakon čega je medij odsisan iz jažica te je u svaku dodano 100 µl kiselog izopropanola (4 % 1 M HCl-a u izopropanolu, V/V). Ploče su zaštićene aluminijskom folijom i stavljene na tresilicu kako bi se nastali kristali formazana otopili (10 – 15 minuta). Mjerenje apsorbancije provedeno je pri valnoj duljini od 570 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Victor3, PerkinElmer, Sjedinjene Američke Države). Metabolička aktivnost stanica izražena je u odnosu na negativnu kontrolu (jažice inkubirane samo s DMEM). Sva mjerenja provedena su u triplikatu. Vijabilnost manja od 70%, interpretirana je kao citotoksični učinak na stanice sukladno standardu ISO 10993-5 (www.iso.org).

3.2.5. Statistička obrada podataka

Rezultati dobiveni ispitivanjem biokompatibilnosti pripremljenih uzoraka na HaCaT staničnoj liniji statistički su analizirani pomoću Studentovog t-testa (za usporedbu 2 grupa podataka) te one-way ANOVA testa i Tukey's multiple comparison testa (za usporedbu 3 ili više grupa podataka). Razina značajnosti (α) postavljena je na 5 %, odnosno 0,05. Obrada podataka i razine značajnosti određene su pomoću softverskog programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, Sjedinjene Američke Države).

4. Rezultati i rasprava

4.1. Fizikalno-kemijska karakterizacija deformabilnih liposoma

Sastav liposoma određuje njihova fizikalno-kemijska svojstva, uključujući veličinu čestica, indeks polidisperznosti i naboj na površini liposoma, tj. zeta potencijal. Navedena svojstva se mogu odraziti na biokompatibilnost sa stanicama (tkivima) na koja se liposomi primjenjuju (Škalko-Basnet i Vanić, 2017).

Neposredno nakon pripreme liposoma i nakon postupaka ekstruzije izmjereni su veličina čestica i indeks polidisperznosti. Sukladno očekivanjima, liposomi su prije primjene ekstruzije pokazali veći srednji promjer (DL - 823 nm, DL* - 963 nm) uz visok indeks polidisperznosti (DL - 0,327, DL* - 0,306). Nakon ekstruzije 3 puta kroz polikarbonatne membrane veličine pora 400 nm, promjer vezikula se značajno smanjio kao i pripadajući indeks polidisperznosti. Postupkom ekstruzije kroz polikarbonatne membrane veličine pora 400 nm (3x) i 100 nm (3x) dobiveni su najmanji liposomi (DL - 134 nm, DL* - 128 nm), koji se smatraju prikladnima za dermalnu primjenu (< 200 nm). Indeks polidisperznosti kao mjera širine distribucije veličine čestica u uzorku, daje informacije o homogenosti uzorka. Iz izmjerenih vrijednosti potvrđeno je da se ekstruzijom značajno povećava homogenost liposomskih disperzija što je upravo jedan od ciljeva naknadne obrade liposomskih formulacija ekstruzijom.

Sve ispitivane formulacije liposoma bile su karakterizirane vrijednostima zeta potencijala oko - 40 mV, pa je za pretpostaviti da će biti fizički stabilne tijekom uskladištenja. Također, negativni naboj liposoma može biti poželjan u kontekstu dermalne primjene, budući da neka istraživanja pokazuju bolju penetraciju negativno nabijenih liposoma u kožu za razliku od neutralnih i pozitivno nabijenih liposoma (Gillet i sur., 2011). Također, naboj na površini liposoma potencijalno može utjecati na njihovu interakciju s lancima polimera u gelu prilikom pripreme ili skladištenja formulacija liposomi-u-gelu (Binaymotlagh i sur., 2024).

Tablica 2. Srednji promjer vezikula, indeks polidisperznosti i zeta potencijal DL (s AZT-om)

UZORAK	SREDNJI PROMJER VEZIKULA (nm)	INDEKS POLIDISPERZNOSTI	ZETA POTENCIJAL (mV)
DL (bez ekstruzije)	823,1 ± 133,5	0,327 ± 0,151	- 43,7 ± 0,9
DL (400)	143,1 ± 0,9	0,061 ± 0,036	- 42,8 ± 0,5
DL (400/100)	133,8 ± 2,2	0,051 ± 0,022	- 42,1 ± 0,6

DL(bez ekstruzije), deformabilni liposomi koji nisu ekstrudirani; DL(400), deformabilni liposomi ekstrudirani kroz filter veličine pora 400 nm (3x); DL(400/100), deformabilni liposomi ekstrudirani kroz filtere veličine pora 400 nm (3x) i 100 nm (3x).

Tablica 3. Srednji promjer vezikula, indeks polidisperznosti i zeta potencijal DL* (bez AZT-a)

UZORAK	SREDNJI PROMJER VEZIKULA (nm)	INDEKS POLIDISPERZNOSTI	ZETA POTENCIJAL (mV)
DL*(bez ekstruzije)	963,2 ± 40,8	0,306 ± 0,159	- 38,0 ± 0,7
DL*(400)	190,7 ± 3,8	0,261 ± 0,013	- 37,4 ± 1,5
DL*(400/100)	127,9 ± 2,0	0,114 ± 0,016	- 37,9 ± 0,8

DL(bez ekstruzije), deformabilni liposomi koji nisu ekstrudirani; DL*(400), deformabilni liposomi ekstrudirani kroz filter veličine pora 400 nm (3x); DL*(400/100), deformabilni liposomi ekstrudirani kroz filtere veličine pora 400 nm (3x) i 100 nm (3x).*

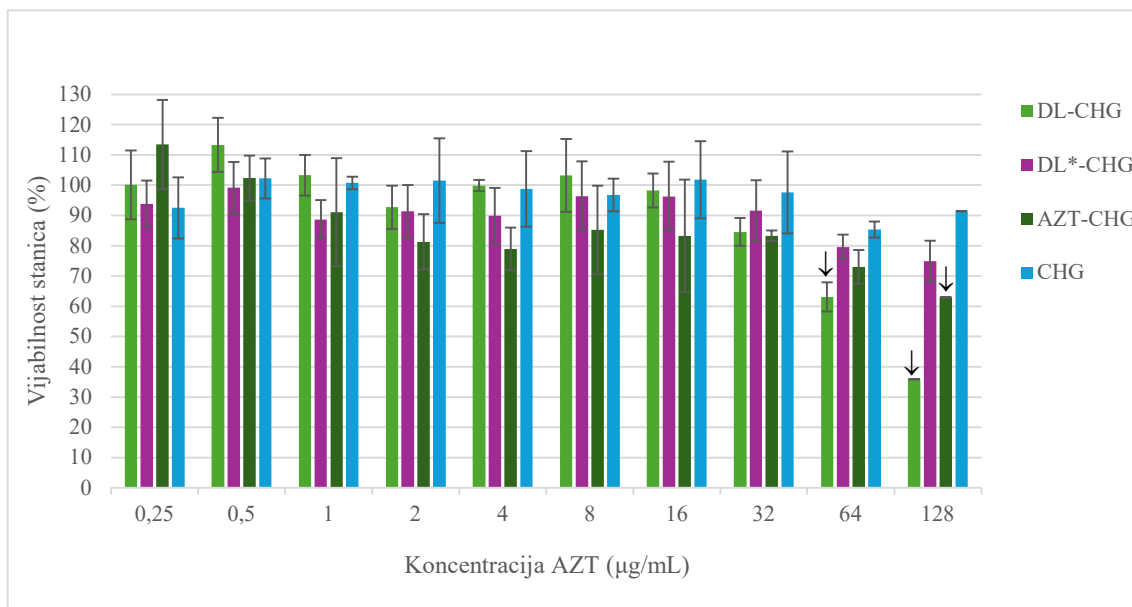
4.2. Biokompatibilnost s HaCaT stanicama

Prilikom razvoja novog lijeka, važno mu je odrediti djelotvornost, provesti biofarmaceutsku karakterizaciju formulacije, farmaceutski oblik mora biti pogodan za primjenu i prihvatljiv od strane pacijenata, a vrlo važno je utvrditi da lijek nije toksičan i da je siguran za primjenu. Za ispitivanje toksičnosti lijeka, koriste se *in vitro* i *in vivo* metode. Rano otkrivanje citotoksičnosti na staničnim kulturama *in vitro*, sprječava ugrozu ljudskog zdravlja i života, ali i financijske gubitke koji se mogu javiti tijekom daljnjeg istraživanja lijeka (Bácskay i sur., 2017).

U prethodećoj studiji (Rukavina i sur., 2023) se pokazalo da su različiti tipovi AZT-liposoma (konvencionalni liposomi, propilenglikol liposomi, kationski liposomi) uklopljeni u kitozanski gel biokompatibilni s HaCaT stanicama *in vitro* u testiranom rasponu koncentracija AZT-a (0,25 – 64 µg/ml). U spomenutoj studiji za DL u kitozanskom gelu također je utvrđena biokompatibilnost s HaCaT stanicama *in vitro* u rasponu koncentracija AZT-a 0,25 – 32 µg/ml. Međutim, pri najvećoj testiranoj koncentraciji AZT-a (64 µg/ml), ova je formulacija uzrokovala pad vijabilnosti tretiranih stanica na < 20 %, te je sukladno tome zaključeno da pri toj koncentraciji DL u kitozanskom gelu pokazuju značajnu citotoksičnost. Budući da u ranijoj studiji (Rukavina i sur., 2018) liposomska disperzija DL nije pokazala citotoksičnost pri odgovarajućoj koncentraciji AZT-a, postavljena je hipoteza da pri većim koncentracijama AZT-a dolazi do nepovoljne interakcije, potencijalno elektrostatske prirode, između DL i kitozanskog gela, što rezultira povećanom citotoksičnošću formulacije DL-u-gelu u odnosu na analognu liposomsku disperziju DL. Kako bi se provjerila navedena hipoteza, u ovom su radu ispitani citotoksični učinci formulacije DL-CHG u nešto širem rasponu koncentracija: 0,25 – 128 µg/ml. Također, DL su uklopljeni u istoj koncentraciji u karbopolski gel (DL-CAG), kako bi se ispitalo utječe li vrsta gela u koji su uklopljeni liposomi na biokompatibilnost formulacija liposomi-u-gelu.

Rezultati MTT-testa za formulacije koje uključuju CHG kao podlogu prikazani su na Slici 3, pri čemu je vijabilnosti tretiranih stanica izražena kao postotak apsorbancije u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane stanice). CHG je pokazao biokompatibilnost s HaCaT stanicama u cijelom rasponu odabranih koncentracija (vijabilnost stanica > 85 %). Formulacija DL-CHG je u rasponu koncentracija 0,25 – 32 µg/ml također potvrdila biokompatibilnost s HaCaT stanicama (vijabilnost stanica > 85 %), dok je za istu formulaciju pri koncentraciji

64 µg/ml utvrđena vijabilnost $63,1 \pm 4,6$ % što se smatra potvrdom citotoksičnosti, budući da je vijabilnost < 70 % odabrana kao kriterij citotoksičnosti (standard ISO 10993-5, *Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods*). Pri koncentraciji 128 µg/ml vijabilnost stanica tretiranih formulacijom DL-CHG bila je još niža ($35,9 \pm 0,1$ %), potvrđujući citotoksičnost navedene formulacije pri koncentraciji AZT-a ≥ 64 µg/ml.



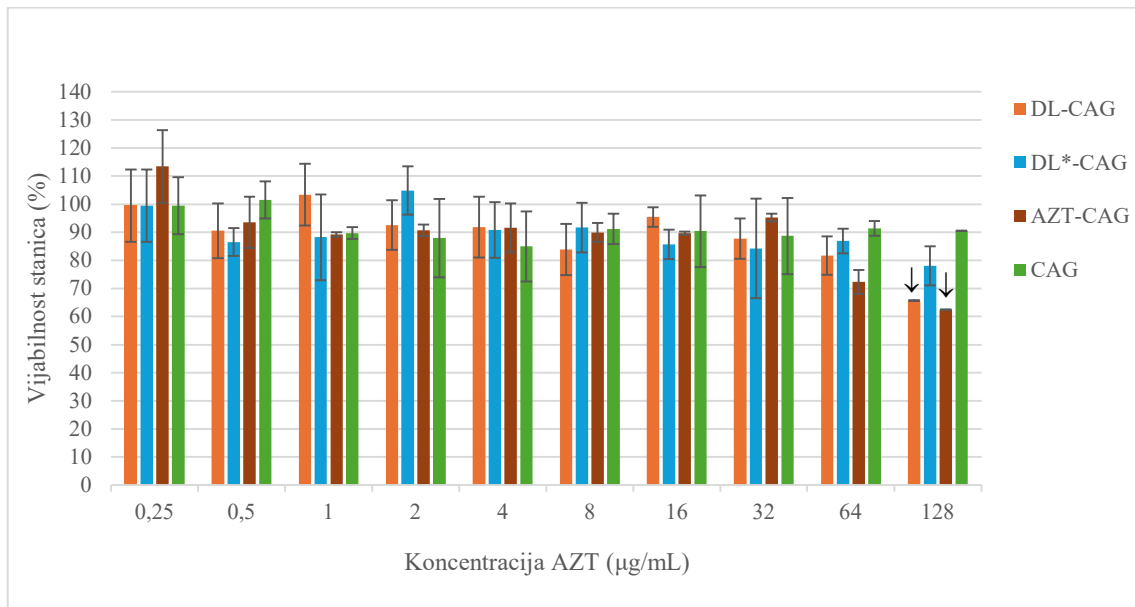
Slika 3. Vijabilnost HaCaT stanica (%) nakon 2-satne inkubacije s CHG formulacijama, pri 37 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm S.D. (n=3). ↓ Vijabilnost manja od 70 %. AZT-CHG, otopina AZT u kitozanskom gelu; CHG, kitozanski gel; DL-CHG, deformabilni liposomi s AZT-om u kitozanskom gelu; DL*-CHG, deformabilni liposomi bez AZT-a u kitozanskom gelu.

Za razliku od DL-CHG, formulacija DL*-CHG (bez AZT-a) pokazala je biokompatibilnost s HaCaT stanicama u cijelom rasponu koncentracija (0,25 – 128 µg/ml) budući da je vijabilnost stanica bila > 70 %. Pritom valja istaknuti da je pri najvećoj koncentraciji vijabilnost stanica bila i dalje iznad praga citotoksičnosti (79,6 %), ali značajno manja u odnosu na uzorak CHG ($p < 0,05$), što može sugerirati da sama formulacija DL, neovisno o prisutnom AZT-u, barem djelomično uzrokuje pad vijabilnosti cjelokupne formulacije pri visokim koncentracijama. Promatranjem rezultata dobivenih za formulaciju AZT-CHG proizlazi da se uočeni citotoksični učinak formulacije DL-CHG može, barem

djelomično, pripisati i samom lijeku (AZT). Naime, AZT-CHG formulacija, koja sadrži slobodni neliposomski lijek, pokazala je citotoksičnost pri koncentraciji 128 µg/ml (vijabilnost < 70 %). Pri koncentraciji 64 µg/ml AZT-CHG se može smatrati rubno biokompatibilnom s HaCaT stanicama (vijabilnost $73,0 \pm 5,6$ %), ali je vijabilnost stanica značajno niža u odnosu na CHG ($p < 0,05$).

Rezultati ispitivanja biokompatibilnosti za formulacije koje uključuju CAG kao podlogu prikazani su na Slici 4. Kao i CHG, CAG je pokazao biokompatibilnost s HaCaT stanicama u cijelom rasponu odabranih koncentracija (vijabilnost stanica > 85 %). Formulacija DL-CAG se pokazala biokompatibilnom u rasponu koncentracija 0,25 – 64 µg/ml (vijabilnost stanica > 80 %), samo je pri najvišoj koncentraciji (128 µg/ml) utvrđen citotoksični učinak (vijabilnost stanica < 70 %). U usporedbi s formulacijom DL-CHG, DL-CAG pokazuje biokompatibilnost u širem rasponu koncentracija (0,25 – 32 µg/ml vs. 0,25 – 64 µg/ml), a iako pri najvišoj testiranoj koncentraciji također pokazuje citotoksični učinak, vijabilnost tretiranih stanica ipak je bila značajno veća ($p < 0,05$) u odnosu na formulaciju DL-CHG pri istoj koncentraciji ($65,7 \pm 0,1$ % vs. $35,9 \pm 0,1$ %).

Nadalje, formulacija DL*-CAG (bez AZT) je pokazala biokompatibilnost s tretiranim stanicama u cijelom rasponu koncentracija (0,25 – 128 µg/ml). Pri najvećoj koncentraciji formulacije vijabilnost stanica iznosila je > 70 %, ali je bila manja u odnosu na uzorak CAG ($p < 0,05$). AZT-CAG formulacija pokazala je citotoksičnost pri najvećoj testiranoj koncentraciji uzorka (128 µg/ml) budući da je izmjerena vijabilnost stanica < 70 %. Pri koncentraciji 64 µg/ml AZT-CAG je, kao i AZT-CHG formulacija, granično biokompatibilna s HaCaT stanicama (vijabilnost $72,3 \pm 4,9$ %). Istovremeno, utvrđena vijabilnost stanica pri navedenoj je koncentraciji bila značajno niža u odnosu na CAG ($p < 0,05$), što upućuje na zaključak da AZT doprinosi citotoksičnosti formulacija pri višim koncentracijama. U studiji iz 2023. (Rukavina i suradnici), kao i u ovdje prezentiranim rezultatima, nije utvrđen citotoksični učinak formulacije AZT-CHG pri koncentraciji 64 µg/ml, ali je vijabilnost stanica bila također niža u odnosu na „prazni“ gel. U spomenutoj studiji maksimalna testirana koncentracija iznosila je 64 µg/ml, pa rezultate citotoksičnosti za koncentraciju AZT-a 128 µg/ml nije moguće usporediti.

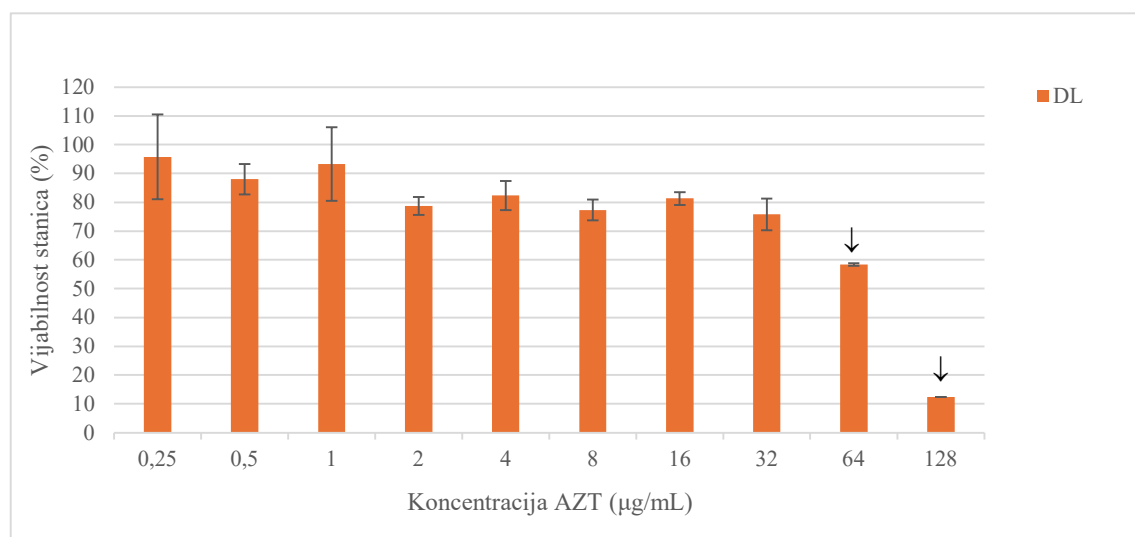


Slika 4. Vijabilnost HaCaT stanica (%) nakon 2-satne inkubacije s CAG formulacijama, pri 37 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D. (n=3). ↓ Vijabilnost manja od 70 %. AZT-CAG, otopina AZT u karbopolskom gelu; CAG, karbopolski gel; DL-CAG, deformabilni liposomi s AZT-om u karbopolskom gelu; DL*-CAG, deformabilni liposomi bez AZT-a u karbopolskom gelu.

Sumarno se može zaključiti da CHG i CAG bez uklopljenog slobodnog ili liposomskog AZT-a pokazuju potpunu biokompatibilnost s HaCaT stanicama. Karbomeri su i inače prepoznati od strane regulatornih tijela kao što je FDA i CIR (eng. *Cosmetic Ingredient Review*) kao načelno sigurni za primjenu u dermalnim formulacijama, s niskim rizikom nuspojava i iritacije. Kitozanski gelovi također se smatraju biorazgradljivima i biokompatibilnima (Mohite i sur., 2023). Kada se u CHG i CAG podlogu dodaju DL ili otopina AZT-a, formulacije ostaju biokompatibilne za koncentraciju ≤ 64 µg/ml, izuzevši formulaciju DL-CHG koja je pokazala nešto niži prag citotoksičnosti, te se biokompatibilnom može smatrati za koncentraciju ≤ 32 µg/ml. Drugim riječima, DL uklopljeni u CAG pokazali su nešto bolju biokompatibilnost od DL uklopljenih u CHG. Jedno od mogućih obrazloženja uočenog efekta je interakcija pozitivno nabijenih kitozanskih molekula s negativno nabijenim fosfolipidima liposoma, koja može destabilizirati liposome i uzrokovati prerano otpuštanje lijeka (Laye i sur., 2008). Također, moguće je da interakcija pozitivno nabijenog kitozana s negativno nabijenim fosfolipidima formulacije DL utječe na bubrenje kitozana i smanjuje ga (Angellotti i sur., 2021), a to može

uzrokovati poremećaj u ravnomjernosti matriksa gela, što se reflektira na otpuštanje lijeka iz formulacije (Varshosaz i Hajian, 2004), te postaje uočljivo pri višim koncentracijama AZT-a.

DL* formulacije, neovisno o korištenoj gel podlozi (CHG ili CAG), pokazale su se biokompatibilnima u čitavom testiranih rasponu koncentracija (vijabilnost > 70%), iako su pri najvećoj koncentraciji pokazale značajno smanjenje vijabilnosti u odnosu na „prazne“ gelove. Navedeni rezultat, upućuje na zaključak da citotoksičnost formulacija DL-CHG i DL-CAG pri najvišim koncentracijama proizlazi ponajprije iz prisutnosti AZT u formulaciji, a u manjoj mjeri je odgovoran sastav liposomske formulacije DL.



Slika 5. Vijabilnost HaCaT stanica (%) nakon inkubacije s DL u trajanju od 2 sata, pri 37 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D. (n=3). ↓ Vijabilnost manja od 70 %.

U ovom radu provedeno je i ispitivanje citotoksičnosti liposomske disperzije DL, prije uklapanja u gel (Slika 5). Pri najvišoj koncentraciji (128 µg/ml), vijabilnost stanica bila je iznimno niska i iznosila je svega 12 % što je definitivno dokaz citotoksičnosti ove liposomske formulacije pri višim koncentracijama. Pri koncentraciji od 64 µg/ml, također je utvrđena citotoksičnost formulacije (vijabilnost stanica 60 %), dok je pri koncentraciji ≤ 32 µg/ml, formulacija bila biokompatibilna s HaCaT stanicama (vijabilnost stanica ≥ 76 %). Ovaj rezultat djelomično se slaže s prethodnom studijom (Rukavina i sur., 2018) u kojoj je pokazana biokompatibilnost deformabilnih liposoma s uklopljenim AZT pri koncentraciji ≤ 64 µg/ml.

5. Zaključci

- Primjenom film metode pripremljeni su DL (s AZT-om) srednjeg promjera 823 nm i indeksa polidisperznosti 0,327, te DL* (bez AZT-a) srednjeg promjera 963 nm i indeksa polidisperznosti 0,306. Ekstruzijom izvorno pripremljenih vezikula kroz polikarbonatne membrane dobiveni su liposomi manji od 200 nm, koji su prikladni za dermalnu primjenu, te značajno manjeg indeksa polidisperznosti, odnosno veće homogenosti.
- Liposomske formulacije imale su izrazito negativne vrijednosti zeta potencijala koje ukazuju na fizičku stabilnost liposomskih disperzija.
- CHG i CAG su pokazali biokompatibilnost s HaCaT stanicama u cijelom rasponu odabranih koncentracija (vijabilnost stanica > 85 %). Štoviše, utvrđeno je povećanje biokompatibilnosti DL formulacija nakon uklapanja u CHG ili CAG podlogu.
- Pri koncentraciji $\geq 64 \mu\text{g/ml}$, DL su se pokazali citotoksičnima za HaCaT stanice. Pri najvišoj koncentraciji (128 $\mu\text{g/ml}$), vijabilnost stanica bila je iznimno niska i iznosila je svega 12 % što upućuje na citotoksičnost ove liposomske formulacije pri višim koncentracijama.
- Za formulaciju DL-CHG je u rasponu koncentracija 0,25 – 32 $\mu\text{g/ml}$ utvrđena biokompatibilnost s HaCaT stanicama, dok je pri koncentraciji $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ vijabilnost stanica bila < 70 % te se može smatrati citotoksičnom za HaCaT stanice.
- U usporedbi s formulacijom DL-CHG, DL-CAG pokazuje biokompatibilnost u širem rasponu koncentracija (0,25 – 64 $\mu\text{g/ml}$), a iako pri najvišoj testiranoj koncentraciji također pokazuje citotoksični učinak, vijabilnost tretiranih stanica ipak je veća u odnosu na formulaciju DL-CHG pri istoj koncentraciji, zbog čega se CAG može smatrati prikladnijom podlogom za uklapanje DL od CHG.
- DL*-CHG i DL*-CAG formulacije pokazale su se biokompatibilnima u čitavom rasponu testiranih koncentracija, iako su pri najvećoj koncentraciji pokazale značajno smanjenje vijabilnosti u odnosu na „prazne“ gelove.
- Budući da su se gelovi s uklopljenim neliposomskim AZT-om (AZT-CHG, AZT-CAG) pokazali citotoksičnima pri visokim koncentracijama AZT-a, čini se da citotoksičnost formulacija DL-u-gelu pri koncentraciji $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ proizlazi djelomično iz prisutnosti samog AZT-a u formulaciji, a djelomično je odgovoran sastav liposomske formulacije DL.

6. Popis kratica, oznaka i simbola

AZT	azitromicin
CAG	karbopolski gel
CHG	kitozanski gel
DL	deformabilni liposomi
DL*	deformabilni liposomi bez azitromicina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DODAB	dimetildioktadecilamonijev bromid
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfokolin
HaCaT stanice	besmrtna stanična linija ljudskih keratinocita
HMW kitozan	kitozan visoke molekulske mase
LMW kitozan	kitozan niske molekulske mase
MMW kitozan	kitozan srednje molekulske mase
MK	mliječna kiselina
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazol bromid
PBS	otopina fosfatnog pufera
PG	propilenglikol

7. Literatura

Ahmadi F, Oveisi Z, Samani SM i Amoozgar Z. Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. *Res Pharm Sci*, 2015, 10(1), 1-16.

Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M i Nejati-Koshki K. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett*, 2013, 8, 102. doi: 10.1186/1556-276X-8-102

Alhariri M, Azghani A i Omri A. Liposomal antibiotics for the treatment of infectious diseases. *Expert Opin Drug Delivery*, 2013, 10(11), 1515–1532. doi: 10.1517/17425247.2013.822860

Angellotti G, Presentato A, Murgia D, Di Prima G, D'Agostino F, Scarpaci AG, D'Oca MC, Alduina R, Campisi G i De Caro V. Lipid Nanocarriers-Loaded Nanocomposite as a Suitable Platform to Release Antibacterial and Antioxidant Agents for Immediate Dental Implant Placement Restorative Treatment. *Pharmaceutic*, 2021, 13, 2072. doi: 10.3390/pharmaceutics13122072

Bácskay I, Nemes D, Fenyvesi F, Váradi J, Vasvári G, Fehér P, Vecsernyés M i Ujhelyi Z. Role of Cytotoxicity Experiments in Pharmaceutical Development [Internet]. U: Cytotoxicity. Çelik TA, urednica, London, InTech, 2018, str. 131-133. doi: 10.5772/intechopen.69919

Banović J, Bego M, Cuković N i Vanić Ž. Lipidne vezikule za (trans)dermalnu primjenu lijekova. *Farmaceutski glasnik*, 2011, 67(4), 229–244.

Bhowmick M i Sengodan T. Mechanisms, kinetics and mathematical modelling of transdermal permeation-an updated review. *Pharm Globale*, 2013, 4(6), 1.

Binaymotlagh R, Hajareh Haghighi F, Chronopoulou L i Palocci C. Liposome-Hydrogel Composites for Controlled Drug Delivery Applications. *Gels*. 2024, 10(4), 284. doi: 10.3390/gels10040284

Boinpally RR, Zhou SL, Poondru S, Devraj G i Jasti BR. Lecithin vesicles for topical delivery of diclofenac. *Eur J Pharm Biopharm*, 2003, 56(3), 389-392. doi: 10.1016/S0939-6411(03)00143-7

Bonacucina G, Martelli S i Palmieri GF. Rheological, mucoadhesive and release properties of Carbopol gels in hydrophilic cosolvents. *Int J Pharm*, 2004, 282(1-2), 115-130. doi: 10.1016/j.ijpharm.2004.06.012

Bozzuto G i Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomed*, 2015, 10, 975-999. doi: 10.2147/IJN.S68861

Cell Lines & Specialty Cell Culture,

https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/sigma/cb_01042712, pristupljeno 30. 8. 2024.

Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, Khorasani S i Mozafari MR. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 2018, 10(2), 57. doi: 10.3390/pharmaceutics10020057

El Maghraby GM, Barry BW, Williams AC. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *Eur J Pharm Sci*, 2008, 34:203-222. doi:10.1016/j.ejps.2008.05.002

Elsayed MMA, Abdallah OY, Naggar VF i Khalafallah NM. Deformable liposomes and ethosomes: Mechanism of enhanced skin delivery. *Int J Pharm*, 2006, 322(1-2), 60-66. doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.05.027

Elsayed MM, Abdallah OY, Naggar VF i Khalafallah NM. Deformable liposomes and ethosomes as carriers for skin delivery of ketotifen. *Pharmazie*, 2007, 62, 133-137.

Ferreira M, Ogren M, Dias JNR, Silva M, Gil S, Tavares L, Aires-da-Silva F, Gaspar MM i Aguiar SI. Liposomes as Antibiotic Delivery Systems: A Promising Nanotechnological Strategy against Antimicrobial Resistance. *Molecules*, 2021, 26(7), 2047. doi: 10.3390/molecules26072047

- Gillet A, Compère P, Lecomte F, Hubert P, Ducat E, Evrard B i Piel G. Liposome surface charge influence on skin penetration behavior. *Int J Pharm*, 2011, 411, 223–231. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.03.049
- Gillet A, Grammenos A, Compère P, Evrard B i Piel G. Development of a new topical system: drug-in-cyclodextrin-in-deformable liposome. *Int J Pharm*, 2009, 380(1-2), 174-180. doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.06.027
- Gould IM. Antibiotics, skin and soft tissue infection and meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: cause and effect. *Int J Antimicrob Agents*, 2009, 34, 8–11. doi: 10.1016/S0924-8579(09)70542-4
- Guimarães D, Cavaco-Paulo A i Nogueira E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. *Int J Pharm*, 2021, 601. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120571
- Hemningsen LM, Giordani B, Pettersen AK, Vitali B, Basnet P i Škalko-Basnet N. Liposomes-in-chitosan hydrogel boosts potential of chlorhexidine in biofilm eradication in vitro. *Carbohydr Polym*, 2021, 262, 117939. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.117939
- Higaki K, Amnuaikit C i Kimura T. Strategies for Overcoming the Stratum Corneum. *Am J Drug Delivery*, 2003, 1(3), 187–214. doi: 10.2165/00137696-200301030-00004
- Ibrahim MM, Nair AB, Aldhubiab BE i Shehata TM. Hydrogels and Their Combination with Liposomes, Niosomes, or Transfersomes for Dermal and Transdermal Drug Delivery [Internet]. U: Liposomes. Catala A, urednik, London, InTech, 2017. doi: 10.5772/intechopen.68158
- ISO10993-5, 2009. Biological Evaluation of Medical Devices-Part 5: Tests for Cytotoxicity: In Vitro Methods. <https://www.iso.org/home.html>, pristupljeno 4. 8. 2024.
- Jørholm MW, Basnet P, Tostrup MJ, Moueffaq S i Škalko-Basnet N. Localized Therapy of Vaginal Infections and Inflammation: Liposomes-In-Hydrogel Delivery System for Polyphenols. *Pharmaceutics*, 2019, 11(2), 53. doi: 10.3390/pharmaceutics11020053

Kim JY, Song JY, Lee EJ i Park SK. Rheological properties and microstructures of Carbopol gel network system. *Colloid Polym Sci*, 2003, 281, 614–623. doi:10.1007/s00396-002-0808-7

Kou S, Peters LM i Mucalo MR. Chitosan: A review of sources and preparation methods. *Int J Biol Macromol*, 2018. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.005

Kumar P, Nagarajan A i Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay [Internet]. U: Cold Spring Harbor Protocols. Green MR, Sambrook J, urednici, Woodbury, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2018. doi: 10.1101/pdb.prot095505

Laye C, McClements DJ i Weiss J. Formation of Biopolymer-Coated Liposomes by Electrostatic Deposition of Chitosan. *J Food Sci*, 2008, 73(5), 7–15. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00747.x

López-García J, Lehocký M, Humpolíček P i Sáha P. HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. *J Funct Biomater*, 2014, 5, 43-57. doi: 10.3390/jfb5020043

Mohite P, Rahayu P, Munde S, Ade N, Chidrawar VR, Singh S, Jayeoye TJ, Prajapati BG, Bhattacharya S i Patel RJ. Chitosan-Based Hydrogel in the Management of Dermal Infections: A Review. *Gels*, 2023, 9(7), 594. doi: 10.3390/gels9070594

Mui B, Chow L i Hope MJ. Extrusion Technique to Generate Liposomes of Defined Size [Internet]. U: Methods in Enzymology. Duzgunes N, urednici, Cambridge, Academic Press, 2003, str. 3-14. doi: 10.1016/S0076-6879(03)67001-1

Nayak D i Tippavajhala VK. A comprehensive review on preparation, evaluation and applications of deformable liposomes. *Iran J Pharm Res*, 2021, 20(1), 186. doi: 10.22037/ijpr.2020.112878.13997

Nga NTH, Ngoc TTB, Trinh NTM, Thuoc TL i Thao DTP. Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells. *Anal Biochem*, 2020, 610, 113937. doi: 10.1016/j.ab.2020.113937

Ng KW i Lau WM. Skin Deep: The Basics of Human Skin Structure and Drug Penetration [Internet]. U: Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement. Dragicevic N, Maibach H, urednici, Heidelberg, Springer, 2015. doi: 10.1007/978-3-662-45013-0_1

Ortan A, Parvu CD, Ghica MV, Popescu LM i Ionita L. Rheological study of a liposomal hydrogel based on carbopol. *Rom Biotechnol Lett*, 2011, 16(1), 47-54.

Palac Z, Hurler J, Škalko-Basnet N, Filipović-Grčić J i Vanić Ž. Elastic liposomes-in-vehicle formulations destined for skin therapy: the synergy between type of liposomes and vehicle. *Drug Dev Ind Pharm*, 2014, 41(8), 1247–1253. doi: 10.3109/03639045.2014.938658

Pangilinan R, Tice A i Tillotson G. Topical antibiotic treatment for uncomplicated skin and skin structure infections: review of the literature. *Expert Rev Anti-Infect Ther*, 2009, 7(8), 957–965. doi: 10.1586/eri.09.74

Parsad D, Pandhi R i Dogra S. A Guide to Selection and Appropriate Use of Macrolides in Skin Infections. *Am J Clin Dermatol*, 2003, 4(6), 389–397. doi: 10.2165/00128071-200304060-00003

Patil Y i Jadhav S. Novel methods for liposome preparation. *Chem Phys Lipids*, 2014, 177, 10. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2013.10.011

Peers S, Montembault A i Ladavière C. Chitosan hydrogels for sustained drug delivery. *J Controlled Release*, 2020. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.06.012

Peters K, Unger RE i Kirkpatrick CJ. Biocompatibility Testing [Internet]. U: Biomedical Materials. Narayan R, urednik, Cham, Springer, 2021. doi: 10.1007/978-3-030-49206-9

Rodríguez R, Alvarez-Lorenzo C i Concheiro A. Rheological Evaluation of the Interactions between Cationic Celluloses and Carbopol 974P in Water. *Biomacromolecules*, 2001, 2(3), 886–893. doi: 10.1021/bm010049c

Rukavina Z, Jøraholmen MW, Božić D, Frankol I, Gašparović PG, Škalko-Basnet N, Klarić MŠ i Vanić Ž. Azithromycin-loaded liposomal hydrogel: a step forward for enhanced treatment of MRSA-related skin infections. *Acta Pharm*, 2023, 73(4), 559-579. doi: 10.2478/acph-2023-0042

Rukavina Z, Šegvić Klarić M, Filipović-Grčić J, Lovrić J i Vanić Ž. Azithromycin-loaded liposomes for enhanced topical treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. *Int J Pharm*, 2018. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.10.024

Rusanov AL, Luzgina NG i Lisitsa AV. Sodium Dodecyl Sulfate Cytotoxicity towards HaCaT Keratinocytes: Comparative Analysis of Methods for Evaluation of Cell Viability. *Bull Exp Biol Med*, 2017, 163(2), 284–288. doi: 10.1007/s10517-017-3785-z

Safitri FI, Nawangsari D i Febrina D. Overview: Application of carbopol 940 in gel. International Conference on Health and Medical Sciences, Yogyakarta, 2021, 34, 80-84. doi: 10.2991/ahsr.k.210127.018

Stefani S i Goglio A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance. *Int J Infect Dis*, 2010, 14, 19–22. doi: 10.1016/j.ijid.2010.05.009

Sukumaran V i Senanayake S. Bacterial skin and soft tissue infections. *Aust Prescr*, 2016, 39(5), 159-163. doi: 10.18773/austprescr.2016.058

Supino R. MTT Assays. U: In Vitro Toxicity Testing Protocols. *Methods in Molecular Biology™*, vol 43. O'Hare S, Atterwill CK, urednici, Totowa, Humana Press, 1995, str. 137–149. doi: 10.1385/0-89603-282-5:137

Sylvester PW. Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability. U: Drug Design and Discovery. *Methods in Molecular Biology*, vol 716. Satyanarayanajois S, urednik, Monroe, Humana Press, 2011. doi: 10.1007/978-1-61779-012-6_9

Škalko-Basnet N i Vanić Ž. Lipid-based nanopharmaceuticals in antimicrobial therapy. U: *Functionalized Nanomaterials for the Management of Microbial Infection, A Strategy to Address Microbial Drug Resistance*. Boukherroub R, Szunerits S, Drider D, urednici, Amsterdam, Elsevier, 2017, str. 111–152. doi: 10.1016/B978-0-323-41625-2.00005-3

Trotta M, Peira E, Carlotti ME i Gallarate M. Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate. *Int J Pharm*, 2004, 270, 119-125. doi: 10.1016/j.ijpharm.2003.10.006

Trotta M, Peira E, Debernardi F i Gallarate M. Elastic liposomes for skin delivery of dipotassium glycyrrhizinate. *Int J Pharm*, 2002, 241, 319–327. doi: 10.1016/s0378-5173(02)00266-1

Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: metode priprave. *Farm Glas*, 2012, 68(7-8), 457-466.

Varshosaz J i Hajian M. Characterization of Drug Release and Diffusion Mechanism Through Hydroxyethylmethacrylate/Methacrylic Acid pH-Sensitive Hydrogel. *Drug Delivery*, 2004, 11(1), 53–58. doi: 10.1080/10717540490265298

Verma DD, Verma S, Blume G, Fahr A. Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study. *Eur J Pharm Biopharm*, 2003, 55, 271–277. doi: 10.1016/s0939-6411(03)00021-3

Wiegand C i Hipler UC. Evaluation of Biocompatibility and Cytotoxicity Using Keratinocyte and Fibroblast Cultures. *Skin Pharmacol Physiol*, 2009, 22(2), 74–82. doi: 10.1159/000178866

Zhang H. Thin-Film Hydration Followed by Extrusion Method for Liposome Preparation. U: *Liposomes*. D'Souza G, urednik, New York, Humana Press, 2016, str. 17-22. doi: 10.1007/978-1-4939-6591-5_2

8. Sažetak

Prilikom razvoja hibridnih formulacija liposomi-u-gelu, potrebno je voditi računa ne samo o učinkovitosti i biofarmaceutskim karakteristikama formulacije, već i o biokompatibilnosti s odabranim staničnim kulturama. U sklopu ovog istraživanja deformabilni liposomi s AZT-om (DL) uklopljeni su u 2 različita gela: kitozanski gel (CHG) i karbopolski gel (CAG), s ciljem ispitivanja i usporedbe biokompatibilnosti dobivenih formulacija liposomi-u-gelu *in vitro* na HaCaT staničnoj liniji. Formulacija DL-CHG je u rasponu koncentracija $\leq 32 \mu\text{g/ml}$ biokompatibilna s HaCaT stanicama, dok je pri koncentraciji $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ vijabilnost stanica bila $< 70 \%$ te se može smatrati citotoksičnom za HaCaT stanice. U usporedbi s formulacijom DL-CHG, DL-CAG pokazuje biokompatibilnost u širem rasponu koncentracija (0,25 – 64 $\mu\text{g/ml}$), te je pri najvišoj testiranoj koncentraciji vijabilnost tretiranih stanica veća u odnosu na formulaciju DL-CHG pri istoj koncentraciji, zbog čega se CAG može smatrati prikladnijom podlogom za uklapanje DL od CHG. Budući da su se gelovi s uklopljenim neliposomskim lijekom također pokazali citotoksičnima pri visokim koncentracijama AZT-a, čini se da citotoksičnost formulacija DL-u-gelu pri koncentraciji $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ proizlazi djelomično iz prisutnosti samog AZT-a u formulaciji, a djelomično je odgovoran sastav liposomske formulacije DL.

Summary

During the development of hybrid liposome-in-gel formulations, it is essential to consider not only the efficacy and biopharmaceutical characteristics of the formulation but also biocompatibility with selected cell cultures. In this study, AZT-loaded deformable liposomes (DL) were incorporated into two different gels: chitosan gel (CHG) and carbopol gel (CAG), with the aim of testing and comparing the biocompatibility of the obtained liposome-in-gel formulations *in vitro* on the HaCaT cell line. The DL-CHG formulation was biocompatible with HaCaT cells at a concentration $\leq 32 \mu\text{g/ml}$, while at a concentration $\geq 64 \mu\text{g/ml}$, cell viability was $< 70\%$, which can be considered cytotoxic. Compared with the DL-CHG formulation, DL-CAG displays biocompatibility over a wider range of concentrations (0.25 – 64 $\mu\text{g/ml}$). Moreover, at the highest tested concentration, the viability of treated cells was greater compared to the DL-CHG formulation, making CAG a more suitable vehicle for incorporating DL from a biocompatibility standpoint. Since gels with incorporated non-liposomal AZT also exhibited cytotoxicity at high concentrations of AZT, it seems that the cytotoxicity of the DL-in-gel formulations at concentrations $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ arises partly from the presence of AZT itself in the formulation, and partly from the composition of the DL liposome formulation.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko- biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Farmaceutsku tehnologiju
Ul. kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ISPITIVANJE BIOKOMPATIBILNOSTI DEFORMABILNIH LIPOSOMA S AZITROMICINOM UKLOPLJENIH U KITOZANSKI I KARBOPOLSKI GEL

Sara Hulak

SAŽETAK

Prilikom razvoja hibridnih formulacija liposomi-u-gelu, potrebno je voditi računa ne samo o učinkovitosti i biofarmaceutskim karakteristikama formulacije, već i o biokompatibilnosti s odabranim staničnim kulturama. U sklopu ovog istraživanja deformabilni liposomi s AZT-om (DL) uklopljeni su u 2 različita gela: kitozanski gel (CHG) i karbopolski gel (CAG), s ciljem ispitivanja i usporedbe biokompatibilnosti dobivenih formulacija liposomi-u-gelu *in vitro* na HaCaT staničnoj liniji. Formulacija DL-CHG je u rasponu koncentracija $\leq 32 \mu\text{g/ml}$ biokompatibilna s HaCaT stanicama, dok je pri koncentraciji $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ vijabilnost stanica bila $< 70 \%$ te se može smatrati citotoksičnom za HaCaT stanice. U usporedbi s formulacijom DL-CHG, DL-CAG pokazuje biokompatibilnost u širem rasponu koncentracija (0,25 – 64 $\mu\text{g/ml}$), te je pri najvišoj testiranoj koncentraciji vijabilnost tretiranih stanica veća u odnosu na formulaciju DL-CHG pri istoj koncentraciji, zbog čega se CAG može smatrati prikladnijom podlogom za uklapanje DL od CHG. Budući da su se gelovi s uklopljenim neliposomskim lijekom također pokazali citotoksičnima pri visokim koncentracijama AZT-a, čini se da citotoksičnost formulacija DL-u-gelu pri koncentraciji $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ proizlazi djelomično iz prisutnosti samog AZT-a u formulaciji, a djelomično je odgovoran sastav liposomske formulacije DL.

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

Rad sadrži: 37 stranica, 5 grafičkih prikaza, 3 tablice i 61 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Deformabilni liposomi, azitromicin, karbopolski gel, kitozanski gel, Biokompatibilnost, HaCaT stanice

Mentor: **Doc. dr. sc. Zora Rukavina**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Doc. dr. sc. Zora Rukavina**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Laura Nižić Nodilo, *viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Emerik Galić, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: Kolovoz 2024.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Technology
Ul. kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

BIOCOMPATIBILITY STUDY OF AZITHROMYCIN-LOADED DEFORMABLE LIPOSOMES INCORPORATED INTO CHITOSAN AND CARBOPOL GEL

Sara Hulak

SUMMARY

During the development of hybrid liposome-in-gel formulations, it is essential to consider not only the efficacy and biopharmaceutical characteristics of the formulation but also biocompatibility with selected cell cultures. In this study, AZT-loaded deformable liposomes (DL) were incorporated into two different gels: chitosan gel (CHG) and carbopol gel (CAG), with the aim of testing and comparing the biocompatibility of the obtained liposome-in-gel formulations *in vitro* on the HaCaT cell line. The DL-CHG formulation was biocompatible with HaCaT cells at a concentration ≤ 32 $\mu\text{g/ml}$, while at a concentration ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$, cell viability was $< 70\%$, which can be considered cytotoxic. Compared with the DL-CHG formulation, DL-CAG shows biocompatibility over a wider range of concentrations (0.25 – 64 $\mu\text{g/ml}$). Moreover, at the highest tested concentration, the viability of treated cells was greater compared to the DL-CHG formulation, making CAG a more suitable vehicle for incorporating DL from a biocompatibility standpoint. Since gels with incorporated non-liposomal AZT also exhibited cytotoxicity at high concentrations, it seems that the cytotoxicity of the DL-in-gel formulations at concentrations ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ arises partly from the presence of AZT itself in the formulation, and partly from the composition of the DL liposome formulation.

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

Thesis includes: 37 pages, 5 figures, 3 tables and 61 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Deformable liposomes, azithromycin, carbopol gel, chitosan gel, biocompatibility, HaCaT cells

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
Laura Nižić Nodilo, Ph.D. Senior Assistant, 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: August 2024