

In vitro ispitivanja biokompatibilnosti liposoma različitog (fosfo)lipidnog sastava sa stanicama fibroblasta

Kocić, Ida

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:163:353408>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-24**



Repository / Repozitorij:

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



Ida Kocić

***In vitro* ispitivanja biokompatibilnosti liposoma
različitog (fosfo)lipidnog sastava sa stanicama
fibroblasta**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Oblikovanje lijekova, Sveučilišta u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju, pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Željke Vanić.

Od srca zahvaljujem dragoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Željki Vanić i asistentici Zori Rukavina, mag. pharm. na ukazanom povjerenju, razumijevanju, stručnosti, mudrim savjetima te entuzijastičnoj radnoj atmosferi.

Zahvaljujem ostalim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju na pomoći i ugodnom društvu.

Hvala i svim ostalim ljudima i mentorima koji su me motivirali, bodrili i nesebično dijelili svoje znanje i entuzijazam.

Veliko hvala prijateljima koji su me trpili sve ove godine i loše dane učinili boljima, a dobre najboljima.

Najveće hvala mojoj obitelji na svojoj ljubavi, podršci i razumijevanju koje mi pružaju cijeli život.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Topikalni pripravci | 1 |
| 1.1.1. Transport lijeka kroz kožu | 1 |
| 1.2. Liposomi | 2 |
| 1.2.1. Struktura i svojstva | 2 |
| 1.2.2. Priprava liposoma metodom hidratacije suhog fosfolipidnog sloja (film metoda) | 3 |
| 1.2.3. Klasifikacija liposoma | 5 |
| 1.2.4. Vrste liposoma | 5 |
| 1.2.4.1. Konvencionalni (klasični) liposomi | 5 |
| 1.2.4.2. Deformabilni liposomi | 6 |
| 1.2.4.3. Propilenglikol liposomi | 7 |
| 1.2.4.4. Kationski liposomi | 7 |
| 1.2.5. Istraživanja liposoma u topikalnoj antimikrobnoj terapiji | 8 |
| 1.3. <i>In vitro</i> ispitivanje citotoksičnosti na fibroblastima MJ90hTERT | 9 |
| 1.3.1. MTT test | 9 |
| 1.4. Azitromicin | 10 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 12 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 13 |
| 3.1. Materijali | 13 |
| 3.2. Metode | 14 |
| 3.2.1. Priprema liposoma | 14 |
| 3.2.2. Određivanje veličine liposoma i indeksa polidisperznosti | 14 |
| 3.2.3. Određivanje zeta potencijala liposoma | 15 |
| 3.2.5. <i>In vitro</i> ispitivanja citotoksičnosti liposoma na fibroblastima | 16 |
| 3.2.6. Test redukcije tetrazolijeve soli (MTT test) | 16 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 17 |
| 4.1. Fizikalno–kemijska svojstva liposoma | 17 |
| 4.1.1. Zeta potencijal | 18 |
| 4.2. Uklapanje azitromicina u liposome | 19 |
| 4.3. Ispitivanja citotoksičnosti liposoma s azitromicinom na MJ90hTERT fibroblastima | 20 |
| 4.4. <i>In vitro</i> ispitivanje citotoksičnosti liposoma bez uklopljenog azitromicina („prazni“ liposomi) na MJ90hTERT fibroblastima | 22 |

| | | |
|----|---|----|
| 5. | ZAKLJUČCI | 25 |
| 6. | LITERATURA | 26 |
| 7. | SAŽETAK | 30 |
| | SUMMARY | 31 |
| 8. | PRILOZI | |
| 9. | TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD | |

1. UVOD

1.1. Topikalni pripravci

Topikalni pripravci su ljekoviti oblici koji se primjenjuju lokalno na kožu. S obzirom na mjesto djelovanja lijeka mogu se podijeliti u dvije skupine; pripravke s lokalnim učinkom na kožu te pripravke sa sistemskim učinkom. Lokalni učinak uključuje djelovanje lijeka na površini kože, u rožnatom sloju, epidermisu i/ili dermisu, dok se sistemski učinak postiže penetracijom lijeka kroz kožu i apsorpcijom u sistemsku cirkulaciju korištenjem transdermalnih flastera, odnosno transdermalnih terapijskih sustava (Ueda i sur., 2009).

Topikalni pripravci su dostupni kao otopine, emulzije (losioni), suspenzije, aerosoli, prašci (puderi) te polučvrsti oblici (gelovi, pjene, masti, paste, kreme). Polučvrsti pripravci se najčešće koriste u dermatološkoj terapiji zbog prikladne konzistencije koja dodatno doprinosi duljem zadržavanju djelatne tvari na mjestu primjene/djelovanja (Gibson, 2009).

1.1.1. Transport lijeka kroz kožu

Dermalnim putem primjene nastoji se osigurati lokalni učinak lijeka u koži njegovim zadržavanjem u epidermisu ili dermisu, dok je prolazak lijeka u sistemsku cirkulaciju minimaliziran. Na taj se način smanjuju nepoželjne sistemske nuspojave i eventualni toksični učinci lijeka. Prednosti ovog puta primjene lijekova uključuju visok stupanj suradljivosti pacijenata, lako ukidanje terapije u slučaju potrebe u bilo kojem trenutku liječenja, ciljano i lokalizirano djelovanje na oboljelom mjestu te bezbolnu primjenu (Okyar i sur., 2012). Dermalna primjena lijekova, zbog navedenih posebnosti, spada u ugodnije i sigurnije puteve primjene, a brojna istraživanja su pokazala da liposomske formulacije namijenjene topikalnoj primjeni značajno reduciraju stupanj iritacije kože koje nerijetko bivaju izazivane djelatnim tvarima kao što su primjerice retinoidi (Vanić, 2015).

Rožnati sloj kože, kojeg čine odumrle stanice keratinocita okružene visokoorganiziranim lipidnim matriksom, odgovoran je za nisku permeabilnost većine lijekova. Djelatne tvari koje se primjenjuju na kožu moraju proći rožnati sloj do ciljnih stanica u dubljim slojevima epidermisa ili u dermisu. Parametri koji utječu na učinkovitost dermatoterapije topikalnim putem primjene lijekova uključuju: molekulsku masu lijeka (djelatne tvari), stupanj lipofilnosti (log P), tip formulacije (ljekoviti oblik), prisustvo pomoćnih tvari u formulaciji

(promotori penetracije lijeka u kožu, sredstva za povećanje viskoznosti, površinski aktivne tvari) te fizičko stanje rožnatog sloja kože (Vanić, 2015).

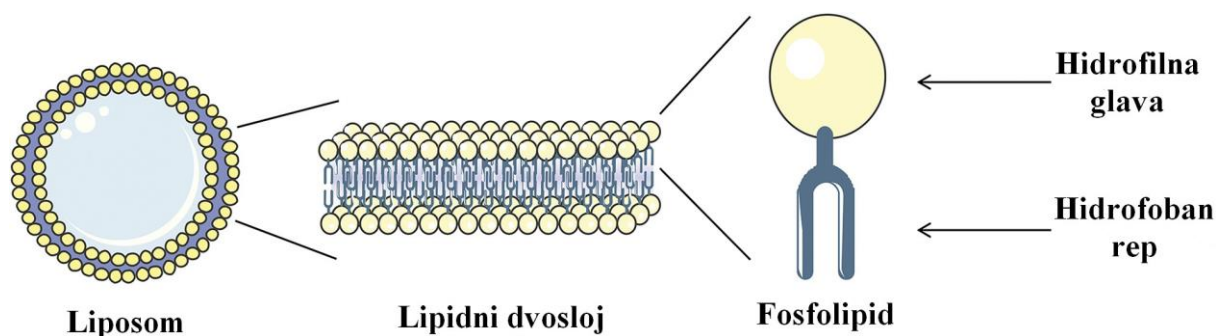
Kako bi se pospješila penetracija djelatne tvari u kožu mogu se koristiti kemijski promotori penetracije, primjerice, sulfoksidi poput dimetilsulfoksida (DMSO), urea, alkoholi (etanol, propilenglikol), pirolidoni (2-pirolidon), terpeni i masne kiseline (oleinska kiselina) ili pak fizikalne metode kao što su ionoforeza, sonoforeza, elektroporacija i mikro-igle (Escobar-Chávez i sur., 2012). Drugi pristup temelji se na upotrebi nanočestica s uklopljenom djelatnom tvari koje mogu povećati penetraciju hidrofilnih tvari kroz kožu i omogućiti kontrolirano oslobađanje lipofilnih lijekova i njihovo nakupljanje na mjestu djelovanja (Vanić, 2015). Među brojnim istraživanim nanonosačima lijekova poput mikrokapsula, mikrosfera, nanosfera, micela, polimernih prolijekova, virosoma, kubosoma, nanofibrila, lipidnih nanočestica i niosoma istaknuto mjesto zauzimaju liposomi (Vanić, 2012a).

1.2. Liposomi

1.2.1. Struktura i svojstva

Liposomi su sferične fosfolipidne vezikule u kojima je unutarnja, vodena faza obavijena s jednom ili više koncentrično položenih fosfolipidnih membrana. Promjer im se može kretati od 20-ak nm do 10-ak μm . Fosfolipidi su amfipatske molekule cilindričnog oblika građene od hidrofilnih „glava“ i hidrofobnih „repova“ koje čine lanci masnih kiselina (Slika 1). Hidrofobni, nepolarni dijelovi molekula fosfolipida („repovi“) usmjereni su prema unutrašnjoj, dok su polarne „glave“ fosfolipida orijentirane prema vanjskoj strani sferične lamelarne strukture (Vanić, 2012a).

Strukturalna svojstva liposoma omogućuju uklapanje lijekova različitih fizičko-kemijskih svojstava, kao i makromolekula poput peptida, proteina i nukleinskih kiselina. Ovisno o polarnosti, djelatne tvari biti će smještene u vodenoj fazi ili u nepolarnom dijelu ovojnice, odnosno na granici ovih dviju regija (amfipatske molekule). Hidrofilne i lipofilne tvari uklapaju se u liposome bez njihova kemijskog vezanja ili prethodne kemijske modifikacije, a uz postizanje relativno velikog omjera lijek-lipidi (Jalšenjak i sur., 1998).



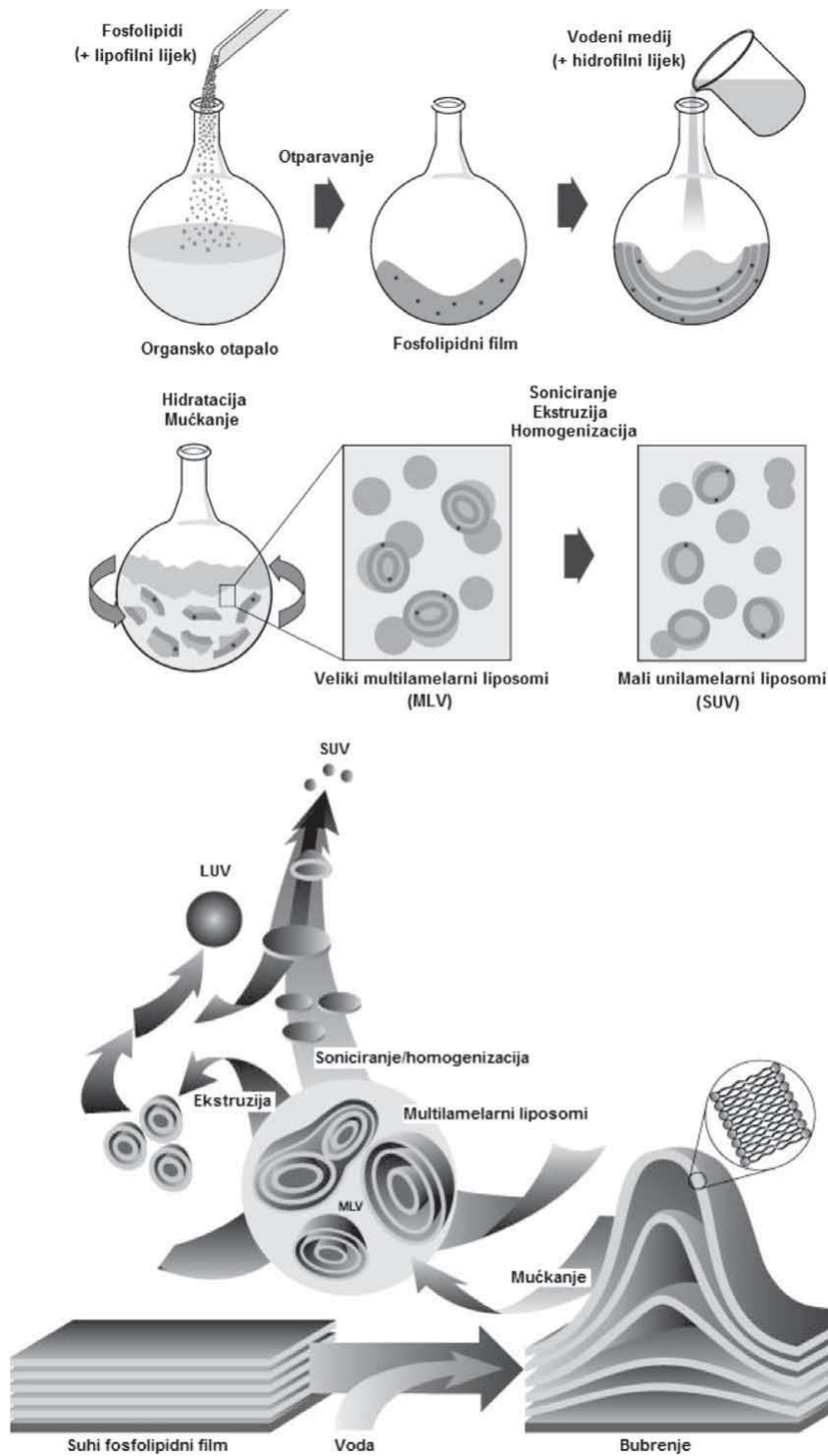
Slika 1. Struktura liposoma i fosfolipidnog dvosloja (preuzeto i prilagođeno iz Lee i Thompson (2017) uz dozvolu John Wiley and Sons)

Zbog svoje sličnosti s biološkim membranama, neimunogenosti i biorazgradljivosti, liposomi su fiziološki prihvatljivi što im osigurava primjenu u različitim terapijskim područjima: infektivna oboljenja (virusna, bakterijska, gljivična, parazitska), dijagnostika, hormonska terapija, onkologija, stimulacija imunološkog odgovora, vakcinacija, itd. (Vanić, 2012a).

1.2.2. Priprava liposoma metodom hidratacije suhog fosfolipidnog sloja (film metoda)

Metoda hidratacije suhog fosfolipidnog sloja, tzv. film metoda najčešći je postupak priprave liposoma u laboratorijskim uvjetima. Prikazan je na Slici 2. Temelji se na pripremi tankog fosfolipidnog sloja te dodatku vodenog medija uz snažno protresivanje. Postupak se provodi u okruglim tikvicama većeg volumena, da bi nakon otparavanja organskog otapala, na stijenkama tikvice nastao suhi fosfolipidni film velike površine. Dodatkom vodenog medija dolazi do hidratacije fosfolipida i spontanog formiranja liposoma. Pozornost valja obratiti na temperaturu koja tijekom priprave liposoma mora biti iznad temperature faznog prijelaza (T_c) korištenih fosfolipida. Nastali liposomi su multilamelarne strukture i zbog toga su prikladni za uklapanje lipofilnih lijekova. Ako se za izradu upotrebljavaju samo neutralni fosfolipidi dobivaju se multilamelarni liposomi (MLV-i) gusto pakiranih dvoslojeva s veoma malim vodenim odjeljcima. Dodatkom negativno nabijenih fosfolipida, zbog odbojnih interakcija između pojedinih ovojnica unutar MLV-a, povećavaju se unutarnji vodeni prostori što je važno ako se uklapaju hidrofilni lijekovi. S obzirom da su film metodom pripremljeni MLV-i prilično veliki (do 10-ak μm) i visokog indeksa polidisperznosti, koja upućuje na heterogenost sustava, neophodna je daljnja obrada. Homogenizacija MLV-a se provodi ekstruzijom kroz polikarbonatne membrane određene veličine pora ili soniciranjem

(ultrazvučna kupelj, sonda), pri čemu se dobivaju homogene preparacije oligolamelarnih (OLV) ili unilamelarnih (LUV, SUV) liposoma. Važno je napomenuti da reduciranje veličine MLV-a nerijetko rezultira značajnim gubitkom u sadržaju početno uklopljenog hidrofilnog lijeka (Vanić, 2012b).



Slika 2. Priprava liposoma metodom hidratacije suhog fosfolipidnog sloja (preuzeto iz Vanić (2012b), uz dozvolu Hrvatskog farmaceutskog društva)

1.2.3. Klasifikacija liposoma

Liposomi se mogu klasificirati prema veličini i broju fosfolipidnih dvosloja te prema strukturnim svojstvima i načinu oslobađanja uklopljenog sadržaja.

Unilamelarni liposomi (eng. *unilamellar vesicles*, UV) sadrže jednu fosfolipidnu ovojnicu, a prema veličini se dijele na: male unilamelarne liposome (eng. *small unilamellar vesicles*, SUV), srednje velike unilamelarne liposome (eng. *medium sized unilamellar vesicles*, MUV), velike unilamelarne liposome (eng. *large unilamellar vesicles*, LUV) te veoma velike unilamelarne liposome (eng. *giant unilamellar vesicles*, GUV). Oligolamelarni liposomi (eng. *oligolamellar vesicles*, OLV-i) sadrže nekoliko koncentrično položenih fosfolipidnih dvoslojeva između kojih su vodeni prostori, dok multilamelarne liposome (eng. *multilamellar vesicles*, MLV-e) karakterizira postojanje velikog broja koncentrično postavljenih fosfolipidnih dvoslojeva. Multivezikularni liposomi (eng. *multivesicular liposomes*, MVL) sadrže nekonzentrično položene fosfolipidne dvoslojeve, s mnoštvo vodenih odjeljaka. Promjer MLV-a obično se kreće između 20 i 100 μm (Vanić, 2012a).

Liposomi se mogu klasificirati i s obzirom na sastav, pri čemu fosfolipidni dvosloj, osim samih fosfolipida, može sadržavati molekule surfaktanata, etanola, promotora apsorpcije i polietilenglikola. U tom smislu razlikujemo konvencionalne liposome, deformabilne liposome, etosome, sterički stabilizirane (eng. *stealth*) liposome, imunoliposome i polimorfne liposome (Vanić, 2012a). Jedan od novije razvijenih tipova liposoma su i propilenglikol liposomi (Vanić, 2015).

1.2.4. Vrste liposoma

1.2.4.1. Konvencionalni (klasični) liposomi

Konvencionalni (klasični) liposomi su građeni od fosfolipida bez ili s prisutnim kolesterolom koji stabilizira fosfolipidni dvosloj. Konvencionalni liposomi mogu varirati u svojim fizikalnim svojstvima poput veličine, fosfolipidnog sastava, površinskog naboja, lamelarnosti te fluidnosti (elastičnosti/rigidnosti) fosfolipidnih dvoslojeva (membrane liposoma). Kakav će biti terapijski učinak lijeka korištenjem liposomskih pripravaka ovisi o interakciji liposoma sa stanicama kože, a na to utječe fosfolipidni sastav i termodinamičko stanje dvosloja (sol- ili gel-stanje) te metoda pripreme liposoma. Bolji unos lijeka u kožu postignut je s liposomima koji su u sastavu uključivali lipide kože te kad je membrana liposoma bila u sol-stanju (stanje tekućih kristala). Smanjenje udjela kolesterola u

fosfolipidnom dvosloju liposoma, čime se povećava njegova fluidnost, rezultiralo je boljim prolaskom lijeka kroz rožnati sloj. Pokazalo se da i drugi fizičko-kemijski parametri, kao što su veličina liposoma, naboj na površini te lamelarnost mogu utjecati na isporuku lijeka u kožu. Osim u (trans)dermalnoj primjeni, konvencionalni su liposomi nerijetko istraživani i kao nosači za ciljani unos ljekovitih tvari pilosebacealnim jedinicama, dlačnim folikulima s pridruženim žlijezdama lojnicama. Iako su neki znanstvenici predlagali upotrebu konvencionalnih liposoma kao prikladnih nosača za transdermalnu primjenu, u većini slučajeva je dokazano da klasični liposomi ne prodiru u dublje slojeve kože, već se zadržavaju u površinskom, rožnatom sloju (Banović i sur., 2011).

1.2.4.2. Deformabilni liposomi

Deformabilni liposomi su lipidne elastične vezikule čija je membrana građena od fosfolipida i rubnog aktivatora (jednolančani surfaktant). On narušava strukturu dvosloja smanjujući mu stabilnost te na taj način povećava deformabilnost ovojnice. Optimalnim molarnim omjerom fosfolipida i surfaktanta, postižu se željena elastična svojstva liposoma. Ako je količina surfaktanta premala, dvoslojevi liposoma su manje elastični, više dominiraju rigidna svojstva, dok se kod prevelike količine liposomi transformiraju u micelle. Kao rubni aktivatori najčešće se primjenjuju: natrijev kolat, natrijev deoksikolat, Span 60, Span 65, Span 80, Tween 20, Tween 60, Tween 80 i dikalijev glicirizinat.

Brojna su istraživanja potvrdila sposobnost prolaska deformabilnih liposoma s uklopljenim lijekom u dublje slojeve kože, pri čemu se učinak mogao usporediti sa supkutanom primjenom. Međutim, kod nekih se lijekova pokazalo da deformabilni liposomi samo povećavaju odlaganje lijeka u kožu, ali ne i prolaz u dublje slojeve, što je pogodno za lokalnu primjenu. Opisana su dva mehanizma kojima deformabilni liposomi poboljšavaju prolazak lijeka kroz kožu. Prvi mehanizam sastoji se od prolaska intaktnih vezikula u neokluzivnim uvjetima. Naime, u takvim uvjetima primijenjena disperzija liposoma isparava na površini kože, a vezikule postaju djelomično dehidrirane. One tada počinju slijediti lokalni hidratacijski gradijent, a upravo im elastičnost membrane omogućava da intaktni prođu između stanica rožnatog sloja. Drugi mehanizam je poticanje prolaska lijeka kroz kožu pri

čemu lipidi iz ovojnice liposoma modificiraju intercelularne lipide rožnatog sloja, čime se olakšava prolaz oslobođenim molekulama lijeka kroz kožu (Banović i sur., 2011).

1.2.4.3. Propilenglikol liposomi

Propilenglikol liposomi se sastoje od fosfolipida, propilenglikola i vode, a karakterizira ih visoka sposobnost uklapanja slabije topljivih djelatnih tvari. Poboljšana isporuka uklopljenih lijekova korištenjem propilenglikol liposoma u kožu posljedica je zajedničkog djelovanja promotora penetracije prisutnih u liposomima, fosfolipida i propilenglikola. Propilenglikol je poznat kao suotapalo i humektans u topikalnim pripravcima te povećava topljivost uklopljene ljevovite tvari. Prisutnost propilenglikola ili drugih promotora penetracije u fosfolipidnom dvosloju značajno povećava elastičnost liposoma.

Propilenglikol liposomi se mogu pripremiti korištenjem propilenglikola za otapanje fosfolipida i lipofilnog lijeka, ili se propilenglikol dodaje kao dio vodene faze tijekom hidratacije fosfolipida (film metoda). Preliminarne *in vitro* studije na životinjskim modelima kože pokazuju da su propilenglikol liposomi omogućili bolju penetraciju lokalnog anestetika cinhokaina u odnosu na deformabilne liposome i etosome (Elsayed i sur., 2007)).

1.2.4.4. Kationski liposomi

Kationski liposomi se najčešće koriste kao ne-viralni vektori u genskoj terapiji. Zbog njihovog pozitivnog naboja, dolazi do elektrostatskih interakcija s negativno nabijenom DNK i membranama stanica (Carmona-Ribeiro i Carrasco, 2013). Kationski liposomi u interakciji s nukleinskim kiselinama mijenjaju svoju strukturu, nastaju lipid-DNK kompleksi (lipopleksi) koji fuzijom s plazmatskom membranom ulaze u stanicu (Vanić, 2012a).

Prilikom priprave kationskih liposoma jedna od najčešće korištenih sastavnica je dioktadecildimetilamonijev bromid (DODAB). DODAB je kationski sintetski lipid koji tvori dvoslojeve visoke stabilnosti. U strukturi ima zasićene ugljikovodične lance i stabilnu kvarternu amonijevu skupinu. Vežanjem kationskih liposoma s DODAB-om dolazi do promjene naboja na površini bakterije iz negativnog u pozitivni, što dovodi do smrti bakterije. *In vitro* ispitivanja su pokazala citotoksičan učinak DODAB-a naspram stanica sisavaca, no

ona je bila znatno niža od toksičnosti prema prokariotskim, odnosno kvašćevim stanicama i ovisila je o primijenjenoj koncentraciji lipida. Uklapanjem različitih antibiotika u pozitivno nabijene liposome mogao bi se povećati antimikrobni učinak lijeka zbog antimikrobnog učinka kationskog lipida. Kationski liposomi su istraživani kao nosači lipofilnog baktericida triklozana ili hidrofилnih antibiotika (vankomicin, benzilpenicilin) za tretiranje bakterijskih biofilmova (Mamizuka i Carmona-Ribeiro, 2007).

1.2.5. Istraživanja liposoma u topikalnoj antimikrobnoj terapiji

Liposomske formulacije istraživane su za poboljšanu dermalnu primjenu lijekova što je prikazano brojnim preglednim radovima (Elsayed i sur., 2007; Ibaraki i sur., 2019; Van Tran i sur., 2019). U većini istraživanja potvrđena je superiornost liposoma u odnosu na uobičajene topikalne pripravke koja se očitovala kroz smanjenje iritacija kože, nuspojava i inkompatibilnosti koje mogu nastati zbog neželjeno visoke sistemske apsorpcije lijeka te značajno veće akumulacije lijeka na mjestu primjene (Egbaria i Weiner, 1990). Jedno od značajnih područja topikalne primjene liposoma je antimikrobna terapija. Pritom je čak prvi registrirani pripravak liposoma sadržavao uklopljeni ekonazol (Pevaryl® Lipogel) i bio namijenjen lokalnoj terapiji dermatomikoza (Naeff, 1996). Provedena su brojna istraživanja s uklopljenim antimikrobnim lijekovima u različite tipove liposoma: konvencionalne i elastične (deformabilne, propilenglikol liposome i etosome). Primjerice, liječenje akni s liposomima koji sadrže antimikrobne lijekove se pokazalo boljim i učinkovitijim nego liječenje konvencionalnim pripravcima. Nadalje, benzilpenicilin (penicilin G) je uspješno uklopljen u kationske liposome te je pokazao snažno djelovanje protiv biofilma bakterije *Staphylococcus aureus* (Kim i Jones, 2004). Slično ispitivanje je provedeno i s vankomicinom. Pritom se vankomicin polagano oslobađao iz kationskih liposoma adsorbiranih na površinu biofilma *Staphylococcus epidermidis* čime je postignut produljeni i jači antibakterijski učinak u usporedbi s kontrolnim pripravkom (Sanderson i Jones, 1996). Istraživanje koje su proveli Elmoslemany i suradnici (2012) s propilenglikol liposomima s uklopljenim mikonazol-nitratom, pokazalo je da propilenglikol liposomi imaju veću antifungalnu aktivnost u usporedbi sa konvencionalnim (klasičnim) liposomima.

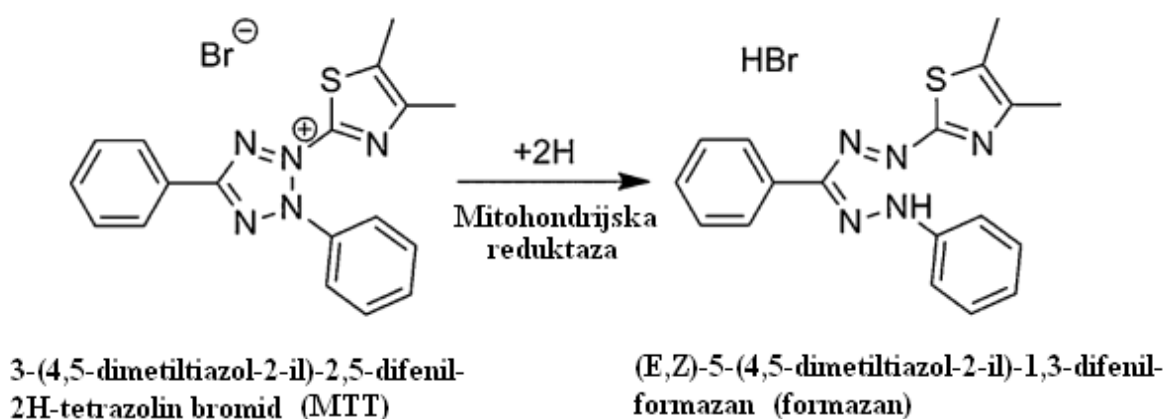
1.3. *In vitro* ispitivanje citotoksičnosti na fibroblastima MJ90hTERT

Fibroblasti su najbrojnije stanice dermisa kože, odgovorne za biosintezu kolagena, elastina i drugih proteina izvanstaničnog matriksa. MJ90hTERT su fibroblasti imortalizirani telomerazom koja im omogućava produžavanje telomera, ali koji imaju fenotip i kontrolu rasta jednaku normalnim fibroblastima (Stančić, 2017).

Određivanje biološke aktivnosti prirodnih spojeva iz biljaka, kao i novosintetiziranih kemikalija, provodi se izvođenjem niza testova na pokusnim životinjama *in vivo* ili na kulturama životinjskih stanica *in vitro* kako bi se na temelju tih ispitivanja mogao procijeniti njihov učinak na ljude. Prilikom provođenja *in vitro* testova toksičnosti, najčešće se određuje bazalna citotoksičnost koja se definira kao učinak nastao međudjelovanjem ispitivane tvari i/ili procesa neophodnih za preživljavanje, proliferaciju ili funkcije zajedničke svim stanicama u organizmu. Prednosti uporabe *in vitro* testova toksičnosti su niža cijena u odnosu na *in vivo* testove, visok stupanj standardizacije, reproducibilnost i brzina izvođenja pri čemu nastaje manja količina toksičnog otpada. Nedostaci primjene *in vitro* testova su nepotpuna ili u potpunosti odsutna metabolička aktivacija ispitivane tvari u staničnim sustavima, budući da te stanice ipak imaju izmijenjena svojstva u odnosu na ishodne *in vivo* stanice te mogućnost interakcije ispitivane djelatne i pomoćnih tvari ispitivane formulacije sa sastojcima medija za uzgoj. Najčešće korišten *in vitro* test za određivanje citotoksičnosti kemikalija primjenom kultura stanica je test redukcije tetrazolijeve soli (MTT) (Radojčić Redovniković i sur., 2016).

1.3.1. MTT test

MTT test je kolorimetrijska metoda, koja se bazira na određivanju metaboličke aktivnosti mitohondrija mjerenjem redukcije topljive žute MTT tetrazolijeve soli u modri netopljivi formazan (Slika 3). Očitana apsorbancija proporcionalna je broju živih stanica u uzorku, pri čemu se preživljenje stanica izražava kao postotak omjera apsorbancije tretiranih i netretiranih (kontrolnih) stanica (Radojčić Redovniković i sur., 2016).



Slika 3. Enzimaska redukcija MTT-a do formazana (preuzeto i prilagođeno iz Grela i sur. (2018), uz dozvolu Elseviera)

1.4. Azitromicin

Azitromicin je makrolidni antibiotik iz skupine azalida, a razvijen je ugradnjom metiliranog dušika (N-CH₃) u 14-eročlani laktoski prsten molekule eritromicina na poziciju 9a pri čemu nastaje 15-eročlani prsten (Tambić, 2008). Struktura azitromicina je prikazana na Slici 4.

Primjenjuje se oralno, parenteralno i topikalno u oftalmologiji te zasad nije registrirana topikalna formulacija azitromicina za dermalnu primjenu. Azitromicin je uglavnom dostupan u obliku dihidrata (MW 785, log P = 3,98) i karakterizira ga ograničena topljivost u vodi (McFarland i sur., 1997; Mandić, 2014). Očekuje se da će uklapanje azitromicina u liposome povećati topljivost lijeka, omogućujući produljeno oslobađanje lijeka i pojačanu antimikrobnu aktivnost. Konvencionalni liposomi koji sadrže uklopljeni azitromicin pokazali su potencijal za moguće liječenje plućnih infekcija uzrokovanih *Mycobacterium avium* i *Pseudomonas aeruginosa*. Istraživanja koja su proveli Liu i sur. (2016) pokazala su da se uklapanjem azitromicina u liposome, koji su u membrani dodatno sadržavali kationski antibakterijski peptid, postiže bolji učinak lijeka na meticilin-rezistentni *S. aureus* (Liu i sur., 2016).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Azitromicin je antibiotik širokog spektra djelovanja, koji trenutno ne postoji u farmaceutskom obliku prikladnom za topikalno liječenje kompliciranih bakterijskih infekcija kože (<http://new.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/>). Uklapanjem azitromicina u liposome mogla bi se lokalizirati njegova prisutnost na mjestu infekcije i smanjiti neželjena sistemska apsorpcija.

Cilj ovog rada bio je provesti *in vitro* ispitivanje biokompatibilnosti liposoma s uklopljenim azitromicinom sa stanicama fibroblasta te utvrditi utjecaj fosfolipidnog sastava liposoma i samog azitromicina na citotoksičnost. U tu svrhu pripravljena su četiri različita tipa liposoma s uklopljenim azitromicinom koji su se razlikovali po površinskom naboju, fosfolipidnom sastavu i elastičnosti/rigidnosti dvoslojeva liposoma: konvencionalni, deformabilni, propilenglikol i kationski liposomi.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

U izradi eksperimentalnog dijela rada korištene su slijedeće tvari, otapala i puferi:

- Azitromicin dihidrat (PLIVA d.o.o, Zagreb, Hrvatska)
- Acetonitril (BDH Prolabo, Lutterworth, Velika Britanija)
- Aposolutni etanol i metanol (BDH Prolabo, Lutterworth, Velika Britanija)
- Dimetildioktadecilamonijev bromid (DODAB) (Sigma-Aldrich Company, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)
- Dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC) (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Njemačka)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, Thermo, Paisley, Velika Britanija)
- Fibroblasti soja MJ90hTERT (Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev deoksikolat (SDCh, Sepadex G-50) (Sigma-Aldrich Company, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid (MTT) (Sigma-Aldrich Company, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)
- Propilenglikol (Kemika, Zagreb)
- Sojin fosfatidilkolin (Lipoid S75) (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Njemačka)
- Fosfatni pufer (PBS 0,01 M) je pripremljen otapanjem 1,3609 g KH_2PO_4 u destiliranoj vodi, u tikvici od 1000 ml i podešavanjem pH s 10 M KOH
- 10 %-tnog fetalnog goveđeg seruma (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Sjedinjene Američke Države)
- mješavina penicilina, streptomocina i amfotericina B (Lonza, Basel, Švicarska).

3.2. Metode

3.2.1. Priprema liposoma

Metodom hidratacije suhog fosfolipidnog sloja, tzv. film metodom (Vanić, 2012b) pripremljene su različite formulacije liposoma korištene u ovom istraživanju: konvencionalni liposomi, deformabilni, propilenglikol i kationski liposomi.

(Fosfo)lipidne komponente i lijek su otopljeni u 3 ml koncentriranog etanola u tikvici okruglog dna (250 ml). Pomoću rotirajućeg vakuum uparivača (Büchi Rotavapor R-200, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švicarska) potpuno je uklonjen etanol na temperaturi od 40 °C za konvencionalne, deformabilne i propilenglikol liposome, odnosno 50 °C za kationske liposome. Suhi, lipidni sloj (film) koji je nastao nakon potpunog otparavanja etanola, hidratiziran je dodatkom 5 ml fosfatnog pufera, na sobnoj temperaturi za pripremu konvencionalnih i deformabilnih liposoma te pri temperaturi od 50 °C za pripremu kationskih liposoma, dok je za pripremu propilenglikol liposoma dodana 30%-tna (v/v) otopina propilenglikola u fosfatnom puferu.

Sve su disperzije liposoma ekstrudirane kroz polikarbonatne membrane veličine pora 400 nm (3 puta), te jedanput kroz 200 nm (Lipofast, Avestin, Kanada) na sobnoj temperaturi. Jedini izuzetak bili su kationski liposomi kod kojih je postupak proveden na blago povišenoj temperaturi (oko 55 °C).

Na isti (gore opisani) način su pripremljeni liposomi bez azitromicina (tzv. „prazni“ liposomi) te su služili kao kontrola u ispitivanjima citotoksičnosti.

3.2.2. Određivanje veličine liposoma i indeksa polidisperznosti

Srednji promjer i indeks polidisperznosti različitih vrsta liposoma određeni su metodom fotonske korelacijske spektroskopije (eng. *photon correlation spectroscopy*) pri čemu je korišten uređaj Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija). Mjerenje se izvodilo 24h nakon pripreme liposoma, pod kutem raspršenja od 90° i temperaturi od 25 °C. Uzorci liposoma su razrijeđeni fosfatnim puferom, koji je prethodni filtriran kroz Minisart filtere veličine pora 200 nm te zatim sonicirani 10 sekundi u ultrazvučnoj kupelji (Branson 1210, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, SAD). Mjerenje veličine liposoma izvodilo se prije i nakon ekstruzije liposomskih disperzija.

3.2.3. Određivanje zeta potencijala liposoma

Mjerenje zeta potencijala liposoma izvršeno je pomoću Zetasizer 3000 HS uređaja (Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija) koristeći protočnu kivetu s optičkim modulatorom u radnom području od 1000 Hz. Kako bi mjerenje bilo valjano, uređaj je prethodno kalibriran korištenjem standarda zeta potencijala od -50 ± 5 mV (Malvern Zeta Potential Transfer Standard, Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija). Uzorci liposoma su pripremljeni razrijeđivanjem male količine uzorka liposoma (nekoliko kapi) s 1 mM otopinom NaCl-a (5-6 ml). Mjerenja su provedena na temperaturi od 25 °C.

3.2.4. Odjeljivanje neuklopljenog azitromicina i određivanje uspješnosti uklapanja

Postupak centrifugiranja minikolona korišten je za odjeljivanje neuklopljenog od liposomski uklopljenog azitromicina. Minikolonama (plastične štrcaljke od 2 ml kojima je uklonjen klip) je na dno stavljena staklena vuna te su napunjene izdubrenim Sephadexom G-50 (Sigma, Deisenhofen, Njemačka). Centrifugiranjem na 2000 okretaja tijekom 3 minute uklonjena je voda iz sustava, a na tako pripravljene suhe gel kolone pažljivo je stavljena (kap po kap) suspenzija liposoma (0,4 ml) pazeći pritom da uzorak ne kapa niz stijenke minikolona. Minikolone su stavljene u epruvete te su centrifugirane na 2000 okretaja/min (3 minute). Eluati koji su sadržavali liposome s uklopljenim azitromicinom su odvojeni za ispitivanje sadržaja ili daljnje analize. Na vrh svake kolone potom je nanoseno po 0,5 ml fosfatnog pufera te su ponovno centrifugirane, a eluati odvajani za daljnja ispitivanja. Postupak je ponavljan toliko puta dok se sav neuklopljeni azitromicin nije uklonio s kolone (Vanić i sur., 2013). Količina slobodnog i uklopljenog lijeka određena je pomoću HPLC-a. Količina azitromicina koji je uklopljen u liposomima određena je nakon otapanja fosfolipida u metanolu. Uspješnost uklapanja lijeka i analitički prinos (eng. *recovery*) izraženi su pomoću izraza:

$$\text{Uspješnost uklapanja (\%)} = \frac{\text{lijeak u liposomima (LL)}}{\text{lijeak u liposomima (LL)} + \text{slobodan lijek (SL)}} \cdot 100$$

$$\text{Analitički prinos (\%)} = \frac{\text{lijeak u liposomima (LL)} + \text{slobodan lijek (SL)}}{\text{ukupna količina lijeka u disperziji liposoma (UK)}} \cdot 100.$$

Ukupna količina lijeka u liposomskoj disperziji sadržavala je uklopljeni i neuklopljeni azitromicin, a određena je tako da je liposomskoj disperziji dodan metanol za otapanje

lipidnih komponenti i oslobađanje uklopljenog azitromicina. Analitički prinos iznosio je od 75,2 do 89,4 % za sve uzorke.

3.2.5. *In vitro* ispitivanja citotoksičnosti liposoma na fibroblastima

Humani fibroblasti stanične linije MJ90hTERT (Cell Line Services, Njemačka) su kultivirani u DMEM-u uz dodatak 10 %-tnog fetalnog goveđeg seruma i mješavinu penicilina, streptomicina i amfotericina B. Stanice su nasade na ploče s 96 jažica, gustoće od 10^4 odnosno $1,5 \times 10^4$ stanica po jažici. Tako priređene stanice inkubirane su 48 sati kako bi se postigla potpuna prekrivenost dna jažice stanicama (100%-tna konfluentnost). Liposomi s uklopljenim azitromicinom suspendirani su u DMEM-u u koncentracijama azitromicina od 0,25, 1, 16, 64 i 256 $\mu\text{g/ml}$. Fibroblastima iz jažica je potom uklonjen hranidbeni medij te su oprezno isprane s fosfatnim puferom. Potom su na stanice dodane disperzije liposoma s uklopljenim azitromicinom ili etanolno-vodena otopina azitromicina (6/4, v/v) u koncentraciji ekvivalentnoj onoj u liposomima. Tako tretirane stanice su inkubirane na 37 °C tijekom naredna 24 sata. Nakon toga stanicama su uklonjeni ispitivani uzorci te je mjerena *in vitro* citotoksičnost koristeći test redukcije tetrazolijeve soli (MTT test).

Na isti gore opisani način provedena su ispitivanja s tzv. „praznim“ liposomima i vodeno-etanolnom smjesom otapala kako bi se utvrdio učinak sastavnica liposoma i otapala korištenog za otapanje azitromicina na citotoksičnost.

3.2.6. Test redukcije tetrazolijeve soli (MTT test)

MTT test je korišten kako bi se utvrdila metabolička aktivnost stanica fibroblasta nakon izlaganja različitim tipovima liposoma s azitromicinom i otopini slobodnog lijeka (kontrola). Nakon tretiranja stanica s ispitivanim uzorcima (24 sata), uzorci su odstranjeni, stanice dva puta isprane fosfatnim puferom te inkubirane sa svježim DMEM-om obogaćenim 10%-tnim fetalnim goveđim serumom i mješavinom antibiotika. Nakon 24 sata u svaku pojedinu jažicu je dodano 10 μl MTT otopine i fibroblasti su inkubirani 30 minuta na 37 °C. Nakon toga stanični medij je uklonjen, a istaloženi modri formazan ekstrahiran dodatkom 100 μl kiselog izopropanola u svaku od jažica. Količina nastalog formazana određena je spektrofotometrijski na valnoj duljini od 570 nm (Victor, PerkinElmer, Sjedinjene Američke Države). Mitohondrijska aktivnost tretiranih stanica izražena je naspram netretiranih stanica, odnosno onih koje su sadržavale hranidbeni medij.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Fizikalno–kemijska svojstva liposoma

Sastav liposoma određuje njihova fizikalno-kemijska svojstva: promjer, indeks polidisperznosti, elastičnost/rigidnost fosfolipidnih dvoslojeva, naboj na površini liposoma i uspješnost uklapanja lijeka. Ta su ispitivanja od velike važnosti jer se reflektiraju na profil oslobađanja uklopljenog lijeka, permeabilnost lijeka u/kroz kožu, antimikrobni učinak i biokompatibilnost sa stanicama (tkivima) na koja se liposomi primjenjuju (Škalko-Basnet i Vanić, 2017).

Rezultati prikazani Tablicom 1 pokazuju da film metodom nastaju liposomi velikog srednjeg promjera (>1000 nm) i visokog indeksa polidisperznosti ($PDI > 0,95$), koji upućuje na prisutnost liposoma različitog srednjeg promjera i distribucije veličina. Ekstruzijom je značajno povećana homogenost liposomskih disperzija, pri čemu se indeks polidisperznosti kretao u rasponu 0,09-0,14 za deformabilne, konvencionalne i propilenglikol liposome, dok je za kationske bio značajno veći (0,43). Najmanji srednji promjer imali su deformabilni liposomi (132 nm), potom slijede propilenglikol liposomi (143 nm), konvencionalni liposomi (165 nm) te kationski liposomi (217 nm). Razlog većem srednjem promjeru kationskih od ostalih ispitivanih liposoma vjerojatno leži u rigidnosti membrane, koja je posljedica lipidnog sastava kationskih liposoma. Građeni su od dipalmitoilfosfatidilkolina (DPPC) i dioktadecildimetilamonijev bromida (DODAB) koji doprinose višoj temperaturi faznog prijelaza (T_c) u usporedbi s ostalim liposomskim preparacijama (New, 1990). S druge pak strane, propilenglikol i deformabilni liposomi su bili nižeg srednjeg promjera karakterističnog za elastične liposome.

Tablica 1. Srednji promjeri i indeksi polidisperznosti liposoma s azitromicinom

| Tip liposoma | Srednji promjer liposoma (nm) | | Indeks polidisperznosti (PDI) | |
|--------------------------------|-------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| | Prije ekstruzije | Nakon ekstruzije | Prije ekstruzije | Nakon ekstruzije |
| Konvencionalni liposomi | 1135 ± 62 | 165 ± 3 | 1,00 ± 0,00 | 0,12 ± 0,02 |
| Deformabilni liposomi | 972 ± 20 | 132 ± 2 | 0,96 ± 0,12 | 0,14 ± 0,02 |
| Propilenglikol liposomi | 1089 ± 8 | 143 ± 1 | 1,00 ± 0,00 | 0,09 ± 0,01 |
| Kationski liposomi | 1628 ± 35 | 217 ± 2 | 1,00 ± 0,00 | 0,43 ± 0,10 |

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D. (n=3).

4.1.1. Zeta potencijal

Zeta potencijali liposoma s azitromicinom (Tablica 2) bili su u skladu sa svojstvima (fosfo)lipida koji su se koristili za njihovu pripravu. Konvencionalni, deformabilni i propilenglikol liposomi pripremljeni su iz sojinog lecitina sa 75% fosfatidilkolina te su se vrijednosti zeta potencijala kretale između -40 mV i -50 mV, dok su kationski sadržavali 30% DODAB-a koji je doprinio izrazito visokom, pozitivnom, zeta potencijalu (oko +62 mV). Budući da su sve ispitivane formulacije liposoma bila karakterizirane vrijednostima zeta potencijala oko ± 50 mV, za pretpostaviti je da će ostati fizički stabilne tijekom uskladištenja. Osim na fizičku stabilnost, naboj na površini liposoma doprinosi njihovim interakcijama s mikroorganizmima i stanicama/tkivima na koja se primjenjuju. Premda se očekuje jača interakcija kationskih liposoma s negativno nabijenim stanicama kože, istraživanja su pokazala bolju penetraciju negativno nabijenih liposoma u kožu za razliku od neutralnih i pozitivno nabijenih liposoma (Gillet i sur., 2011). S druge pak strane, za kationske liposome je dokazano da imaju izraženiji antibakterijski učinak za razliku od neutralnih i negativno nabijenih liposoma iste veličine (Dong et al., 2015; Drulis-Kawa i sur., 2009; Robinson i sur., 2001).

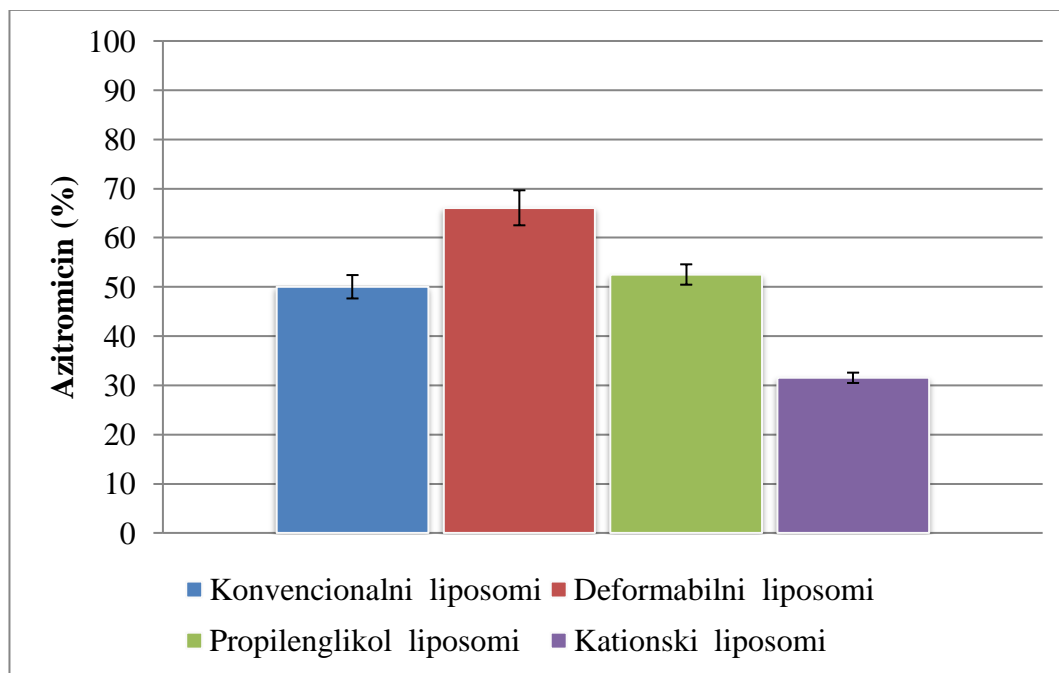
Tablica 2. Zeta potencijal različitih vrsta liposoma

| Vrsta liposoma | Zeta potencijal (mV) |
|-------------------------|----------------------|
| Konvencionalni liposomi | -43,9 ± 0,7 |
| Deformabilni liposomi | -45,8 ± 0,5 |
| Propilenglikol liposomi | -48,4 ± 1,9 |
| Kationski liposomi | +62,2 ± 1,1 |

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D. (n=3).

4.2. Uklapanje azitromicina u liposome

Uspješnost uklapanja azitromicina u različite tipove liposoma iznosila je od 30 do 66% (Slika 5). Najbolje uklapanje postignuto je s deformabilnim liposomima (66%) zbog prisutnosti natrijevog deoksikolata u membrani za kojeg se pretpostavlja da potpomaže solubilizaciju azitromicina u ovojnici liposoma. Uklapanje azitromicina je bilo podjednako dobro kako za propilenglikol liposome tako i za konvencionalne liposome (oko 50%), dok je najlošije bilo u kationskim liposomima (32%).



Slika 5. Uspješnost uklapanja azitromicina

4.3. Ispitivanja citotoksičnosti liposoma s azitromicinom na MJ90hTERT fibroblastima

Biokompatibilnost različitih tipova liposoma s MJ90hTERT fibroblastima procijenjena je na temelju provedenih ispitivanja citotoksičnosti korištenjem MTT testa, odnosno mjerenjem stanične metaboličke aktivnosti nakon tretiranja stanica s ispitivanim uzorcima liposoma. Stanična linija bila je izložena liposomima s uklopljenim azitromicinom ili otopini azitromicina u koncentraciji azitromicina od 0,25 do 256 µg/ml. Raspon koncentracija bio je daleko veći od minimalne biofilm inhibitorne koncentracije azitromicina za *S. aureus* ATCC 29213 i MRSA kliničke izolate: MRSA 10674, MRSA 10676, MRSA 10677, MRSA 10679 i MRSA 10680 (Rukavina i sur., 2018).

Rezultati provedenih ispitivanja citotoksičnosti/biokompatibilnosti prikazani su u Tablici 3. Pri koncentracijama azitromicina 0,25–4 µg/ml svi su liposomi s azitromicinom bili kompatibilni s fibroblastima budući da je vijabilnost stanica bila iznad 80%. Pri koncentraciji azitromicina od 16 µg/ml, vijabilnost veću od 80% imali su jedino konvencionalni liposomi s azitromicinom. Kod deformabilnih i propilenglikol liposoma vijabilnost fibroblasta kretala se oko 70%, dok je za kationske preparacije bila neznatno manja od 70%. Pri visokim testiranim koncentracijama azitromicina (64 i 256 µg/ml) vijabilnost MJ90hTERT fibroblasta se značajno smanjila za sve ispitivane uzorke liposoma te je bila manja od 60%. Koncentracija ispitivanog uzorka pri kojoj je vijabilnost stanica manja od 70% smatra se citotoksičnom koncentracijom (ISO10993-5, 1992).

Za razliku od liposomskih formulacija azitromicina, otopina azitromicina je pokazala značajnu citotoksičnost već pri koncentraciji od 16 µg/ml. Vijabilnost fibroblasta iznosila je 49%, a pri najvišoj testiranoj koncentraciji (256 µg/ml) pala je na 36%. Dakle, uklapanjem azitromicina u liposome značajno se smanjuje njegova citotoksičnost. Nadalje, (fosfo)lipidni sastav liposoma i prisustvo suotapala (propilenglikol) također utječu na kompatibilnost liposoma s fibroblastima, za koje je poznato da su osjetljiviji na mikro- i nano-čestice s uklopljenim lijekovima u odnosu na druge tipove stanica, npr. keratinocite (Duvnjak Romić i sur., 2016; Hafner i sur., 2011).

Tablica 3. Vijabilnost MJ90hTERT fibroblasta (%) nakon 24 sata inkubacije s različitim tipovima liposoma ili otopinom azitromicina.

| Koncentracija azitromicina u liposomima ($\mu\text{g/ml}$) | Vijabilnost MJ90hTERT fibroblasta (%) | | | | |
|--|---------------------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------|-------------------------|
| | Konvencionalni liposomi | Deformabilni liposomi | Propilenglikol liposomi | Kationski liposomi | Otopina azitromicina |
| 0,25 | $89,82 \pm 10,75$ | $82,43 \pm 9,87$ | $95,95 \pm 14,72$ | $90,21 \pm 2,46$ | $83,36 \pm 6,31$ |
| 1 | $104,26 \pm 6,36$ | $88,95 \pm 5,84$ | $102,66 \pm 12,85$ | $89,98 \pm 3,95$ | $86,13 \pm 8,67$ |
| 4 | $96,43 \pm 13,82$ | $88,50 \pm 12,68$ | $96,88 \pm 12,91$ | $91,80 \pm 16,63$ | $71,99 \pm 4,56$ |
| 16 | $84,68 \pm 7,39$ | $77,72 \pm 6,78$ | $72,83 \pm 7,31$ | $66,29 \pm 2,05$ * | $49,41 \pm 1,63$ * |
| 64 | $52,62 \pm 5,31$ * | $48,29 \pm 4,87$ * | $53,41 \pm 3,86$ * | $36,22 \pm 2,98$ * | $53,69 \pm 9,56$ * |
| 256 | $45,52 \pm 8,47$ * | $41,48 \pm 7,77$ * | $57,21 \pm 8,22$ * | $37,66 \pm 2,26$ * | $36,58 \pm 7,10$ * |

*Vijabilnost stanica manja od 70%

4.4. *In vitro* ispitivanje citotoksičnosti liposoma bez uklopljenog azitromicina („prazni“ liposomi) na MJ90hTERT fibroblastima

Osim ispitivanja potencijalnog citotoksičnog učinka liposoma s uklopljenim azitromicinom i otopine azitromicina, paralelno su, pod istim uvjetima, provedena ispitivanja „praznih“ liposoma (bez uklopljenog azitromicina) i otapala korištenog za izradu otopine azitromicina. Raspon koncentracija lipida korištenih za pripremu liposoma odgovarao je onima korištenim u ispitivanjima liposoma s uklopljenim azitromicinom i iznosio je od 0,83 µg/ml do 853,2 µg/ml. Svrha ovog ispitivanja bila je eliminirati potencijalan citotoksični učinak sirovina korištenih za pripremu liposoma i otopine azitromicina.

Rezultati ispitivanja prikazani Tablicom 4 pokazuju da su sve liposomske preparacije bez uklopljenog lijeka bile biokompatibilne s fibroblastima čak i u koncentraciji lipida od 213 µg/ml. Vijabilnost fibroblasta bila je veća od 70%. Jedina iznimka bili su kationski liposomi koji su pri toj koncentraciji pokazali citotoksične učinke. Naime, vijabilnost fibroblasta tretiranih praznim kationskim liposomima iznosila je samo 37%. Pri najvišoj testiranoj koncentraciji lipida (853 µg/ml, koja odgovara najvišoj testiranoj koncentraciji liposoma s azitromicinom) vijabilnost kationskih liposoma neznatno je pala (na 33%). Zanimljivo je spomenuti da su pri toj koncentraciji (853 µg/ml) konvencionalni i deformabilni liposomi pokazali tek blagi citotoksični učinak (vijabilnost 55-60%). Nasuprot tome, propilenglikol liposomi su bili biokompatibilni, pri čemu je vijabilnost fibroblasta iznosila čak 75%. S druge strane, otapalo korišteno za izradu otopine azitromicina bilo je citotoksično tek pri najvećoj testiranoj koncentraciji (Tablica 4), što znači da je citotoksičnost otopine azitromicina (Tablica 3) uzrokovana samim azitromicinom, a ne otapalom korištenim za izradu otopine lijeka.

Provedena ispitivanja citotoksičnosti različitih tipova liposoma s azitromicinom na fibroblastima pokazuju citotoksični učinak kationskih liposoma, ali tek pri visokim koncentracijama lipida (213 i 853 µg/ml). Razlog tome je prisutni kationski lipid DODAB u ovojnici liposoma. Naime, kationski lipidi s kvaternim dušikom u svojoj molekularnoj strukturi djeluju antibakterijski, ali je poznato i da uzrokuju citotoksične učinke (Manosroi i sur., 2008; Ragioto i sur., 2014; Soenen i sur., 2009). Tome u prilog idu i istraživanja koja su proveli Carmonna-Ribeiro i sur. (1997), a koja su pokazala da je 0,5 mM DODAB toksičan za 50% fibroblasta u kulturi stanica.

Premda rezultati provedenih ispitivanja upućuju na toksičnost kationskih liposoma s azitromicinom, valja naglasiti da su ispitivane koncentracije pri kojima su kationski liposomi pokazali citotoksičnost bile poprilično visoke. Naime minimalne biofilm inhibitorne koncentracije (MBIK) na MRSA kliničke izolate postignute primjenom kationskih liposoma bile su izrazito niske (0,5-1 $\mu\text{g/ml}$) (Rukavina i sur., 2018) te su pri navedenim koncentracijama kationski liposomi bili biokompatibilni s fibroblastima (vijabilnost stanica iznosila je 90%).

Tablica 4. Vijabilnost MJ90hTERT fibroblasta (%) nakon 24 sata inkubacije s različitim liposomima bez uklopljenog azitromicina i otapalom korištenim za izradu otopine azitromicina.

| Koncentracija lipida u liposomima ($\mu\text{g/ml}$) | Vijabilnost MJ90hTERT fibroblasta (%) | | | | |
|--|---------------------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|
| | Konvencionalni liposomi | Deformabilni liposomi | Propilenglikol liposomi | Kationski liposomi | Otapalo |
| 0,83 | 84,68 \pm 12,42 | 93,44 \pm 16,18 | 86,94 \pm 11,94 | 104,33 \pm 5,31 | 88,51 \pm 1,26 |
| 3,3 | 90,31 \pm 5,14 | 88,05 \pm 4,38 | 103,82 \pm 7,64 | 92,03 \pm 11,07 | 92,50 \pm 4,83 |
| 13,3 | 98,38 \pm 6,36 | 90,75 \pm 7,21 | 87,17 \pm 9,24 | 89,07 \pm 10,44 | 85,56 \pm 5,68 |
| 53,3 | 95,94 \pm 4,78 | 78,39 \pm 4,38 | 86,47 \pm 4,00 | 70,16 \pm 5,52 | 75,49 \pm 1,88 |
| 213,3 | 70,83 \pm 18,84 | 72,78 \pm 14,69 | 74,91 \pm 3,02 | 36,90 \pm 7,70 * | 72,52 \pm 4,40 |
| 853,2 | 59,72 \pm 13,32 * | 54,81 \pm 12,23 * | 75,37 \pm 3,42 | 33,22 \pm 5,27 * | 61,93 \pm 3,09 * |

*Vijabilnost stanica manja od 70%.

5. ZAKLJUČCI

Korištenjem film metode i naknadnom ekstruzijom pripremljeni su liposomi s azitromicinom različitog naboja na površini i elastičnosti/rigidnosti fosfolipidnih dvoslojeva.

Srednji promjeri svih ispitivanih liposoma iznosili su oko 150 nm te su bili niskog indeksa polidisperznosti (do 0,14) izuzev kationskih liposoma (217 nm; 0,43).

Sastav liposoma odrazio se i na uspješnost uklapanja azitromicina; najbolje je postignuto s deformabilnim, a najslabije s kationskim liposomima.

Sve ispitivane liposomske formulacije imale su izrazito negativne (konvencionalni, deformabilni i propilenglikol liposomi) ili pozitivne (kationski liposomi) vrijednosti zeta potencijala koje ukazuju na fizičku stabilnost liposomskih disperzija.

In vitro ispitivanja biokompatibilnosti na fibroblastima soja MJ90hTERT tijekom 24 sata inkubacije, pokazala su na najbolju kompatibilnost propilenglikol liposoma pri koncentracijama fosfolipida i lijeka koje su bile čak 64 puta veće od minimalne biofilm inhibitorne koncentracije za MRSA kliničke izolate.

Najveći citotoksični učinak postignut je s kationskim liposomima zbog prisutnog kationskog lipida u membrani liposoma. Međutim, te rezultate treba uzeti s oprezom budući da su kationski liposomi u koncentracijama azitromicina čak 4 puta većim od minimalnih biofilm inhibitornih koncentracija kationskih liposoma na MRSA izolate, bili kompatibilni s fibroblastima (vijabilnost 90%).

6. LITERATURA

Azithromycin, <http://daily.med.nlm.nih.gov/>, pristupljeno 16.01.2019.

Azitromicin, Halmed, <http://new.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/>, pristupljeno 30.06.2019.

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

Basnet P, Škalko-Basnet N. Nanodelivery systems for improved antimicrobial therapy. *Curr Pharm Des*, 2013, 19, 7237-7243.

Carmona-Ribeiro AM, Carrasco LDM. Cationic antimicrobial polymers and their assemblies. *Int J Mol Sci*, 2013, 14, 9906-9946.

Dong, D, Thomas N, Thierry B, Vreugde S, Clive A, Prestidge CA, Wormald PJ. Distribution and inhibition of liposomes on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *PLoS One*, 2015, 10, e0131806.

Drulis-Kawa Z, Dorotkiewicz-Jach A, Gubernator J, Gula G, Bocer T, Doroszkiewicz W. The interaction between *Pseudomonas aeruginosa* cells and cationic PC:Chol:DOTAP liposomal vesicles versus outer-membrane structure and envelope properties of bacterial cell. *Int J Pharm Sci Res*, 2009, 367, 211–219.

Duvnjak Romić M, Klarić Šegvić M, Lovrić J, Pepić I, Cetina-Čižmek B, Filipović-Grčić J, Hafner A. Melatonin-loaded chitosan/Pluronic® F127 microspheres as in situ forming hydrogel: an innovative antimicrobial wound dressing. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 107, 67–79.

Egbaria K and Weiner N. Liposomes as a topical drug delivery system. U: *Advanced Drug Delivery Reviews* 5. Ghandehari H, urednik, Elsevier, 1990, str. 287-300.

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

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

Escobar-Chávez JJ, Rodríguez-Cruz MI, Domínguez-Delgado LC. Chemical and Physical Enhancers for Transdermal Drug Delivery. U: *Pharmacology*. Luca Gallelli, urednik, IntechOpen, 2012, 19, str. 398-420.

- Gibson M. Pharmaceutical Preformulation and Formulation. Informa Healthcare USA, Inc, 2009, 491-499.
- Gillet A, Compere P, Lecomte F. Liposome surface charge influence on skin penetration behavior. *Int J Pharm*, 2011, 411, 223–231.
- Grela E, Kozłowska J, Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria. *Acta Histochem*, 2018, 4, 303-311.
- Hafner A, Lovrić J, Pepić I, Filipović-Grčić J. Lecithin/chitosan nanoparticles for transdermal delivery of melatonin. *J Microencapsul*, 2011, 28, 807–815.
- Ibaraki H, Kanazawa T, Oogi C, Takashima Y, Seta Y. Effects of surface charge and flexibility of liposomes on dermal drug delivery. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2019, 50, 155-162.
- ISO10993-5. Biological Evaluation of Medical Devices-Part 5: Tests for Cytotoxicity: *In Vitro* Methods, 1992.
- Jalšenjak I, Jalšenjak V, Filipović-Grčić J. Farmaceutika. Zagreb, Školska knjiga, 1998, 2930, str. 129-130.
- Kim H, Jones MN. The Delivery of Benzyl Penicillin to *Staphylococcus aureus* biofilms by use of liposomes. *J Liposome Res*, 2004, 14, 123–139.
- Lee Y, Thompson DH. Stimuli-responsive liposomes for drug delivery. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2017, 9, 1-40.
- Liu X, Li Z, Wang X, Chen Y, Wu F, Men K, Xu T, Luo Y, Yang L. Novel antimicrobial peptide-modified azithromycin-loaded liposomes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11, 6781–6794.
- Mamizuka EM, Carmona-Ribeiro AM. Cationic liposomes as antimicrobial agents. U: Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. Mendez-Vilas A, urednik, Bajadoz, Formatex, 2007, str. 636-647.
- Manosroi A, Thathang K, Werner RG, Schubert R, Peschka-Süss R, Manosroi J. Development of highly stable and low toxic cationic liposomes for gene therapy. *Arzneimittelforschung*, 2008, 58, 485–492.
- McFarland JW, Berger CM, Froshauer SA, Hayash SF, Hecker SJ, Jaynes BH, Jefson MR, Kamicker BJ, Lipinski CA, Lundy KM, Reese CP, Vu CB. Quantitative structure-activity

relationships among macrolide antibacterial agents: *in vitro* and *in vivo* potency against *Pasteurella multocida*. *J Med Chem*, 1997, 40, 1340–1346.

New RRC. Liposomes: A practical approach. Oxford, IRL Press, 1990.

Naeff R. Feasibility of topical liposome drugs produced on an industrial scale. *Adv Drug Del Rev*, 1996, 18, 343-347.

Okyar A, Özsoy Y, Güngör S. Novel Formulation Approaches for Dermal and Transdermal Delivery of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, 2012, <http://www.intechopen.com>, pristupljeno 16.05.2019.

Radojčić Redovniković I, Bubalo MC, Gaurina Srček M, Radošević KI. Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 2016, 11, 169-175.

Ragioto DAMT, Carrasco LDM, Carmona-Ribeiro AM. Novel gramicidin formulations in cationic lipid as broad-spectrum microbicidal agents. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9, 3183–3192.

Robinson AM, Bannister M, Creeth JE, Jones MN. The interaction of phospholipid liposomes with mixed bacterial biofilms and their use in the delivery of bactericide. *Colloids Surf A*, 2001, 186, 43–53.

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

Sanderson NM, Jones MN. Encapsulation of vancomycin and gentamicin within cationic liposomes for inhibition of growth of *Staphylococcus epidermidis*. *J Drug Target*, 1996, 4, 181-189.

Soenen SJ, Brisson AR, De Cuyper M. Addressing the problem of cationic lipid-mediated toxicity: the magnetoliposome model. *Biomaterials*, 2009, 30, 3691–3701.

Stančić V. Diplomski rad: Kvantitativna analiza telomera u ljudskim stanicama MJ-90hTERT. Sveučilište u Zagrebu Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb 2017.

Škalko-Basnet N, 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.

Ueda CT, Shah VP, Derdzinski K, Ewing G, Flynn G, Maibach H, Marques M, Rytting H, Shaw S, Thakker K, Yacobi A. Topical and transdermal drug products. *PF*, 2009, 35, 750-764.

Tambić T. Prva istraživanja koja su vodila u otkriće azitromicina. Medicus, Kolumbić Lakoš A, urednik, Pliva Hrvatska, Zagreb, 2008, str 113-115.

Van Tran V, Moon J, Lee Y. Liposomes for delivery of antioxidants in cosmeceuticals: Challenges and development strategies. *J Control Release*, 2019, 300, 114-140.

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. Phospholipid Vesicles for Enhanced Drug Delivery in Dermatology. *J Drug Discov Develop and Deliv*, 2015, 8, 1-9.

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

7. SAŽETAK

Svrha ovog rada bila je ispitati biokompatibilnost/citotoksičnost različitih tipova liposoma s azitromicinom na MJ90hTERT fibroblastima. Konvencionalni, deformabilni, propilenglikol i kationski liposomi s azitromicinom međusobno su se razlikovali po (fosfo)lipidnom sastavu i prisustvu suotapala (propilenglikol). Liposomi su pripremljeni tzv. film metodom, a primjenom ekstruzije postignuta je prikladna veličina liposoma za topikalnu primjenu. Sastav liposoma utjecao je na fizikalna svojstva liposoma, posebice naboj na površini i uspješnost uklapanja azitromicina. Provedena *in vitro* ispitivanja citotoksičnosti pokazala su biokompatibilnost svih ispitivanih liposoma s fibroblastima u koncentracijama azitromicina s kojima se postiže adekvatan antimikrobni učinak liposomskih formulacija. Usporedba različitih tipova liposoma pokazala je najbolju kompatibilnost propilenglikol liposoma, a najmanju kationskih liposoma koja je posljedica prisutnosti kationskog lipida (DODAB-a) u fosfolipidnom dvosloju.

SUMMARY

The aim of this study was to investigate the biocompatibility/cytotoxicity of the different types of azithromycin-loaded liposomes on the MJ90hTERT fibroblasts. Conventional, deformable, propylene glycol and cationic liposomes encapsulating azithromycin, and differing in (phospho)lipid composition and the presence of co-solvent (propylene glycol), were prepared using the film hydration method. The suitable size of the liposomes for topical application was achieved by their extrusion through the membranes of 400 and 200 nm. The composition of liposomes has proven to influence the physical properties of liposomes, particularly the surface charge and the entrapment efficiency of azithromycin. All the azithromycin-loaded liposomes were biocompatible with the fibroblasts at azithromycin concentrations showing appropriate antibacterial effect. The comparison of the different types of liposomes demonstrated the highest level of compatibility with the MJ90hTERT cells for propylene glycol liposomes and the lowest for cationic liposomes, due to the presence of the cationic lipid (DODAB) in the (phospho)lipid bilayers.

8. PRILOZI

Prilog 1. Dozvola Elseviera za preuzimanje i prilagodbu slike iz Lee i Thompson (2017)

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jul 04, 2019

This Agreement between Ida Kocić ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

| | |
|--|---|
| License Number | 4621551491218 |
| License date | Jul 03, 2019 |
| Licensed Content Publisher | Elsevier |
| Licensed Content Publication | Acta Histochemica |
| Licensed Content Title | Current methodology of MTT assay in bacteria – A review |
| Licensed Content Author | Ewa Grela, Joanna Kozłowska, Agnieszka Grabowiecka |
| Licensed Content Date | May 1, 2018 |
| Licensed Content Volume | 120 |
| Licensed Content Issue | 4 |
| Licensed Content Pages | 9 |
| Start Page | 303 |
| End Page | 311 |
| Type of Use | reuse in a thesis/dissertation |
| Intended publisher of new work | other |
| Portion | figures/tables/illustrations |
| Number of figures/tables/illustrations | 1 |
| Format | both print and electronic |
| Are you the author of this Elsevier article? | No |
| Will you be translating? | Yes, without English rights |
| Number of languages | 1 |
| Languages | Croatian |
| Original figure numbers | Figure 2 |

Title of your thesis/dissertation In vitro ispitivanja biokompatibilnosti liposoma različitog
(fosfo)lipidnog sastava sa stanicama fibroblasta

Expected completion date Jul 2019

Estimated size (number of pages) 30

Requestor Location Ida Kocić
Ida Kocić
Zagreb, other
Croatia

Publisher Tax ID GB 494 6272 12

Total 0.00 USD

Terms and Conditions

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.
3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows: "Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."
4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. **Altering/Modifying Material: Not Permitted.** However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.
6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.
7. **Reservation of Rights:** Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
8. **License Contingent Upon Payment:** While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.
9. **Warranties:** Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.
10. **Indemnity:** You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.
11. **No Transfer of License:** This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.
12. **No Amendment Except in Writing:** This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com> . All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. For journal authors: the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
 - via their non-commercial person homepage or blog
 - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
 - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group

- directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
- for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
 - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
 - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. Other Conditions:

v1.9

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Prilog 2. Dozvola Hrvatskog farmaceutskog društva za preuzimanje slike iz Vanić (2012b)

From: hfd <hfd-fg-ap@zg.t-com.hr>

Date: Wed, 19 June 2019, 11:58

Subject: RE: Molba za korištenje slike iz Farmaceutskog glasnika u diplomskom radu

To: Ida Kocić <kocic.ida@gmail.com>

Poštovana,

Sliku možete koristiti uz navod od kuda je prenesena.

Lp, Maja Jakševac Mikša

Dr. sc. Maja Jakševac Mikša, mag. pharm.

Izvršna direktorica

HRVATSKO FARMACEUTSKO DRUŠTVO

Masarykova 2

10000 Zagreb

Croatia

Phone | +385 1 48 72 849

Fax | +385 1 48 72 853

Web | <http://www.farmaceut.org>

Mail | hfd-fg-ap@zg.t-com.hr

Facebook | [Hrvatsko farmaceutsko društvo](#)

**Prilog 3. Dozvola John Wiley and Sons za preuzimanje i prilagodbu slike iz Grela i sur.
(2018)**

**JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jul 04, 2019

This Agreement between Ida Kocić ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

| | |
|------------------------------|--|
| License Number | 4621550764094 |
| License date | Jul 03, 2019 |
| Licensed Content Publisher | John Wiley and Sons |
| Licensed Content Publication | Wiley Interdisciplinary Reviews - Nanomedicine and Nanobiotechnology |
| Licensed Content Title | Stimuli-responsive liposomes for drug delivery |
| Licensed Content Author | Y. Lee, D.H. Thompson |
| Licensed Content Date | Feb 15, 2017 |
| Licensed Content Volume | 9 |
| Licensed Content Issue | 5 |
| Licensed Content Pages | 40 |
| Type of use | Dissertation/Thesis |
| Requestor type | University/Academic |
| Format | Print and electronic |
| Portion | Figure/table |
| Number of figures/tables | 1 |

| | |
|---------------------------------------|--|
| Original Wiley figure/table number(s) | Figure 1 |
| Will you be translating? | Yes, without English rights |
| Number of languages | 1 |
| Languages | Croatian |
| Title of your thesis / dissertation | In vitro ispitivanja biokompatibilnosti liposoma različitog (fosfo)lipidnog sastava sa stanicama fibroblasta |
| Expected completion date | Jul 2019 |
| Expected size (number of pages) | 30 |
| Requestor Location | Ida Kocić Ida Kocić Zagreb, other Croatia |
| Publisher Tax ID | EU826007151 |
| Total | 0.00 EUR |
| Terms and Conditions | |

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts**, You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the

Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.

- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.
- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.

- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days

from receipt by the CCC.

- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish

open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC) License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online

Library <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

IN VITRO ISPITIVANJA BIOKOMPATIBILNOSTI LIPOSOMA RAZLIČITOG (FOSFO)LIPIDNOG SASTAVA SA STANICAMA FIBROBLASTA

Ida Kocić

SAŽETAK

Svrha ovog rada bila je ispitati biokompatibilnost/citotoksičnost različitih tipova liposoma s azitromicinom na MJ90hTERT fibroblastima. Konvencionalni, deformabilni, propilenglikol i kationski liposomi s azitromicinom međusobno su se razlikovali po (fosfo)lipidnom sastavu i prisustvu suotapala (propilenglikol). Liposomi su pripremljeni tzv. film metodom, a primjenom ekstruzije postignuta je prikladna veličina liposoma za topikalnu primjenu. Sastav liposoma utjecao je na fizikalna svojstva liposoma, posebice naboj na površini i uspješnost uklapanja azitromicina. Provedena *in vitro* ispitivanja citotoksičnosti pokazala su biokompatibilnost svih ispitivanih liposoma s fibroblastima u koncentracijama azitromicina s kojima se postiže adekvatan antimikrobni učinak liposomskih formulacija. Usporedba različitih tipova liposoma pokazala je najbolju kompatibilnost propilenglikol liposoma, a najmanju kationskih liposoma koja je posljedica prisutnosti kationskog lipida (DODAB-a) u fosfolipidnom dvosloju.

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

Rad sadrži: 30 stranica, 5 grafičkih prikaza, 4 tablice i 42 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Liposomi, azitromicin, propilenglikol, kationski lipidi, elastičnost, fibroblasti, biokompatibilnost

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Željka Vanić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Anita Hafner, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2019.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

IN VITRO BIOCOMPATIBILITY STUDY OF LIPOSOMES DIFFERING IN (PHOSPHO)LIPID COMPOSITION WITH THE FIBROBLAST CELLS

Ida Kocić

SUMMARY

The aim of this study was to investigate the biocompatibility/cytotoxicity of the different types of azithromycin-loaded liposomes on the MJ90hTERT fibroblasts. Conventional, deformable, propylene glycol and cationic liposomes encapsulating azithromycin, and differing in (phospho)lipid composition and the presence of co-solvent (propylene glycol), were prepared using the film hydration method. The suitable size of the liposomes for topical application was achieved by their extrusion through the membranes of 400 and 200 nm. The composition of liposomes has proven to influence the physical properties of liposomes, particularly the surface charge and the entrapment efficiency of azithromycin. All the azithromycin-loaded liposomes were biocompatible with the fibroblasts at azithromycin concentrations showing appropriate antibacterial effect. The comparison of the different types of liposomes demonstrated the highest level of compatibility with the MJ90hTERT cells for propylene glycol liposomes and the lowest for cationic liposomes, due to the presence of the cationic lipid (DODAB) in the (phospho)lipid bilayers.

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

Thesis includes: 30 pages, 5 figures, 4 tables and 42 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Liposomes, azithromycin, propylene glycol, cationic lipids, elasticity, fibroblasts, biocompatibility

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

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

Anita Hafner, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Dubravka Vitali Čepo, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2019