

Lipidne vezikule za (trans)dermalnu primjenu lijekova

Banović, Josip; Bego, Margareta; Cuković, Nikolina; Vanić, Željka

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2011, 67, 229 - 244**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:370483>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-30**



Repository / Repozitorij:

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



Lipidne vezikule za (trans)dermalnu primjenu lijekova

JOSIP BANOVIĆ, MARGARETA BEGO, NIKOLINA CUKOVIĆ, ŽELJKA VANIĆ

Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

UVOD

Većina se lijekova primjenjuje na koži radi postizanja lokalnog terapijskog učinka. Takvom dermalnom primjenom mogu se osigurati dostatno visoke koncentracije lijeka u koži i pritom smanjiti njegova razina u sistemskoj cirkulaciji, čime se izbjegavaju neželjene nuspojave. Zadnjih se desetak godina koža sve više istražuje i kao alternativni put sistemske primjene lijekova. Riječ je o transdermalnoj primjeni, koja u usporedbi s oralnim putem primjene lijekova, nudi brojne prednosti. Prije svega, onemogućen je utjecaj varijabli koje potiču gastrointestinalnu apsorpciju: različit pH, prisutnost hrane i motilitet crijeva. Zaobilazanjem prvoga prolaska lijeka kroz jetru spriječena je njegova metabolička razgradnja, što je posebice važno za lijekove male bioraspoloživosti. Nadalje, kontinuiranim i kontroliranim otpuštanjem lijeka kroz kožu izbjegavaju se fluktuacije koncentracije lijeka u plazmi, što je osobito značajno kod lijekova uske terapijske širine. Osim toga, primjena je jednostavna i prihvatljiva pacijentu.

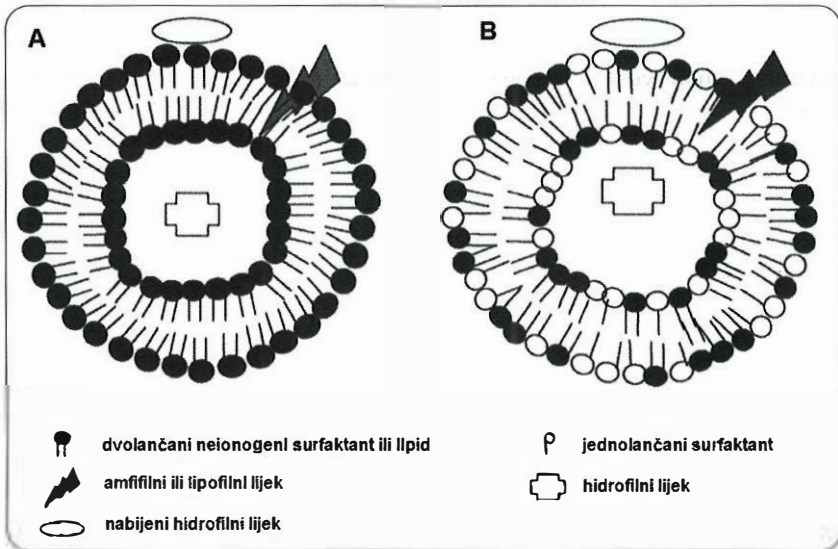
Usprkos tim prednostima, barijerna priroda kože značajna je prepreka transdermalnoj primjeni ljekovitih tvari. Naime, rožnati sloj kože, kojeg čine odumrle stanice keratinocita okružene visokoorganiziranim lipidnim matriksom, odgovoran je za nisku permeabilnost većine lijekova. To je razlog što je na tržištu prisutno samo desetak lijekova u transdermalnim terapijskim sustavima: klonidin, estradiol, nitroglicerol, fentanil, testosteron, skopolamin, nikotin i dr. (1).

Da bi se povećalo transdermalnu dopremu ljekovitih tvari, posljednjih se desetljeća velika pozornost posvećuje razvoju novih terapijskih sustava temeljenih na nanočesticama, kojima bi se nadvladali nedostaci postojećih klasičnih sustava. Među njima posebno mjesto zauzimaju lipidne vezikule koje svojim specifičnim sastavom i svojstvima olakšavaju transport uklopljene ljekovite tvari. Ovim smo radom željeli pružiti osvrt na različite vrste lipidnih vezikula, od konvencionalnih (klasičnih) liposoma, preko elastičnih vezikula (deformabilnih liposoma) do etosoma, upoznati njihovu građu, specifičnosti, interakcije s kožom te pružiti pregled provedenih istraživanja u (trans)dermalnoj primjeni.

KONVENCIONALNI (KLASIČNI) LIPOSOMI

Liposomi su sferične, zatvorene tvorevine u kojima je unutar faza vodena obavijena jednom ili više koncentrično položenih dvoslojeva fosfolipidnih membrana. Veličina im

se kreće od dvadesetak nanometara do nekoliko mikrona. Osnovnu građevnu jedinicu liposoma čine molekule fosfolipida. Riječ je o amfilinim molekulama, koje su u ovojnici liposoma složene u obliku dvosloja pri čemu su polarne, hidrofilne *glave* orijentirane prema vanjskoj i unutarnjoj vodenoj fazi, zaklanjajući nepolarne, lipofilne *repeve* (lanci masnih kiselina) jednog prema drugome (slika 1 A). Zbog fizičko-kemijskih svojstava fosfolipida, liposomi mogu uklopiti mnogo ljekovitih tvari, različite veličine molekule i fizičko-kemijskih svojstava. Osim fosfolipida, često se u ovojnici liposoma nađe i kolesterol, koji pospješuje karakteristike fosfolipidnoga dvosloja tako da povećava njegovu mikroviskoznoću, rigidnoću te smanjuje propusnost membrane prema molekulama topljivim u vodi. Opisane su brojne metode pripreme liposoma, od kojih se najčešće primjenjuje metoda hidratacije tankoga fosfolipidnoga sloja, tzv. film metoda (2).



Slika 1. Shematski prikaz konvencionalnog (A) i deformabilnog (B) liposoma (1).

Nabijene hidrofilne, amfililne ili lipofilne molekule vežu se za/u ovojnicu liposoma, dok se hidrofilne molekule uklapaju u unutarnju vodenu fazu. Konvencionalni liposomi većinom se sastoje od fosfolipida i kolesterola. Ovojnica deformabilnih liposoma sastoji se od fosfolipida i jednonančanog surfaktanta u odgovarajućem omjeru.

Konvencionalni liposomi kao nosači lijekova za (trans)dermalnu primjenu

Potencijalnu vrijednost liposoma kao nosača lijekova prvi su uočili Mezei i Gulasekharom početkom osamdesetih godina prošloga stoljeća. Pokazali su da se uporabom losiona koji je sadržavao triamcinolonacetomid uklopljen u liposome postiže značajno veća koncentracija lijeka u dermisu i epidermisu uz malu sistemsku apsorpciju, u odnosu na primjenu klasičnog losiona (3). Slične su rezultate dobili i s pripravcima gelova koji su sadržavali liposomski uklopljen triamcinolon-acetonid (4) te za progesteron i ekonazol (5).

Daljnja ispitivanja s hidrokortizonom (6), tretinoinom (7), lidokainom (8) i ciklosporinom (9) pokazala su prikladnost konvencionalnih liposoma u dermalnoj (topičkoj), ali ne i u transdermalnoj primjeni.

Kakav će biti terapijski učinak lijeka iz 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 vezikula (10). Bolji unos lijeka u kožu postignut je s liposomima koji su u sastavu uključivali lipide kože (9) te kad je membrana liposoma bila u sol-, a ne gel-stanju (11). 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 (1).

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 (12).

Iako su neki znanstvenici predlagali upotrebu konvencionalnih liposoma kao prikladnih nosača za transdermalnu primjenu (13), najčešće je dokazano da klasični liposomi ne prodiru u dublje slojeve kože, već se zadržavaju u površinskom, rožnatom sloju. Potvrđuju to i rezultati konfokalne mikroskopije, kojom je dokazano da intaktni liposomi ne mogu prodrijeti u zrnati sloj epidermisa (14).

Interakcije konvencionalnih liposoma s kožom

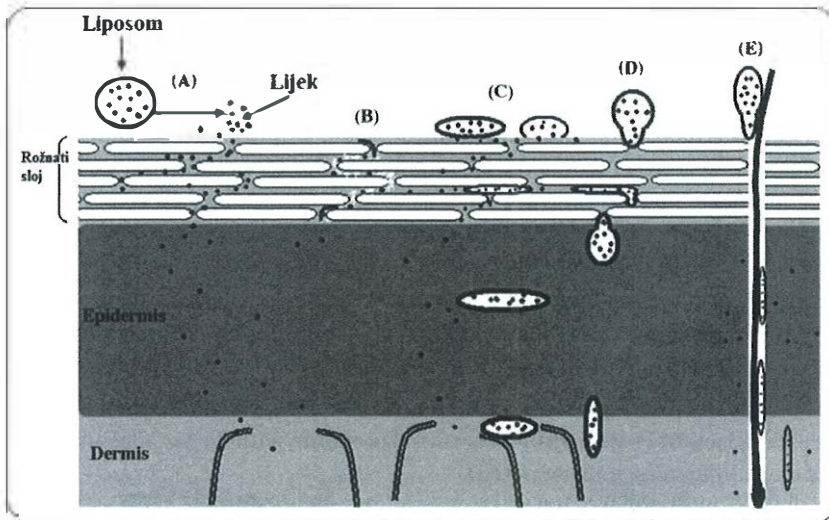
Unatoč intenzivnom istraživanju i velikom zanimanju farmaceutske i kozmetičke industrije, nije u potpunosti jasno kako vezikule transportiraju lijek u kožu. Predloženo je više mogućih mehanizama (slika 2.) koji uključuju: prolaz slobodnog lijeka, poticanje prolaska lijeka kroz kožu, adsorpcijski učinak, prolaz intaktnih liposoma i prolaz liposoma putem kožnih privjesaka (dlačnih folikula) (15, 16).

Prolaz slobodnog lijeka (slika 2A)

Prema tom mehanizmu, lijek samostalno prodire kroz kožu nakon oslobađanja iz liposoma na površini kože. Smatra se da je uloga toa procesa u dostavi lijeka u kožu zanemarljiva (16).

Poticanje prolaska lijeka kroz kožu (slika 2B)

Smanjenjem prirodne barijere kože, koju čine gusto pakirane keratinizirane stanice rožnatoga sloja epidermisa uronjene u lipidni matiks, omogućava se transport ljekovitih tvari u kožu. Još su 1987. Kato i suradnici pokazali da lecitin potiče prolazak tvari u kožu mijenjajući strukturu intercelularnih lipida (17). U kasnijoj studiji Zellmer i suradnici (18) kalorimetrijskim su ispitivanjima potvrdili interakciju hidrofilnoga dijela molekule fosfolipida iz liposoma s lipidima rožnatoga sloja epidermisa. Istraživanja s fluorescentnim lipidnim markerom pokazala su da se lipidne komponente liposoma stapaju i/ili miješaju s lipidima kože te da destabiliziraju njihovu strukturu, čime se otvara put prolaska ljekovite tvari u kožu (19). Kolika će biti jačina interakcije između lipidnih vezikula i kož



Slika 2. Interakcije liposoma i kože: prolaz oslobođenog lijeka iz liposoma (A), poticanje prolaska lijeka kroz kožu (B), adsorpcija i/ili fuzija liposoma (C), prolazak intaktnih vezikula (D) i prolazak liposoma uz dlačne folikule (E) (16).

ovisi o sastavu liposoma. Dokazano je da liposomi građeni od lipida kože bolje potiču prolazak lijeka u dublje slojeve kože nego klasične fosfolipidne vezikule (18, 20).

Adsorpcijski učinak (slika 2C)

Adsorpcija i/ili fuzija liposoma na površini kože rezultira stvaranjem lamela i nepravilnih struktura na površini odumrlih keratinocita, što jača silu koja nosi oslobođene molekule lijeka iz vezikula u kožu. No, raspad liposoma na površini kože ponekad može stvoriti i dodatnu prepreku pogotovo kod hidrofilnih lijekova uklopljenih u unutarnju, vodenu jezgru vezikula. Pokazalo se da taj mehanizam nije prihvatljiv za vezikularnu dostavu makromolekula u kožu (15).

Prolaz intaktnih vezikula (slika 2D)

Mogućnost da lipidne vezikule prolaze intaktne kroz rožnati sloj i prodiru sve do prokrvljenih dijelova dermisa predložena je još u ranim istraživanjima liposoma kao dermalnih terapijskih sustava (3, 4). Budući da se radilo o multilamelarnim liposomima, teško je bilo pojmiti na koji način velike lipidne vezikule prolaze rožnatu barijeru. Ispitivanjem kojeg su proveli Foldvari i suradnici (8), aplikacijom multilamelarnih liposoma s uklopljenim koloidnim željezom na kožu, dokazana je prisutnost unilamelarnih liposoma u dermisu, što se objašnjava gubitkom vanjskih ovojnica multilamelarnih vezikula pri prolasku kroz epidermis. U daljnjim istraživanjima s radioaktivnim inulinom kao hidrofilnim (21) i tokoferol acetatom kao lipofilnim markerom (22), potvrđena je ovisnost prolaska lijeka kroz kožu o veličini liposoma te se i time podupire koncept prolaska intaktnih liposoma kao mogućeg mehanizam isporuke ljekovite tvari u kožu (15).

Prolaz liposoma putem kožnih privjesaka (slika 3E)

Premda su neki znanstvenici pridali tom mehanizmu važnu ulogu u transdermalnoj primjeni lijekova, novija istraživanja pokazuju da prolaz liposoma putem kožnih privjesaka samo povećava dopremu lijeka u dlačne folikule, ali ne i u sistemsku cirkulaciju (15, 16).

DEFORMABILNI (ELASTIČNI, ULTRAFLEKSIBILNI) LIPOSOMI

Intenzivna istraživanja posljednjih petnaestak godina na području transdermalnih terapijskih sustava rezultirala su razvojem nove klase lipidnih vezikula. Riječ je o deformabilnim liposomima koji se u literaturi pronalaze pod različitim nazivima: elastični, fleksibilni, ultrafleksibilni liposomi, Transferosomi®. I dok se konvencionalni liposomi uglavnom rabe kao spremišni sustavi radi postizanja lokalnog učinka, za deformabilne je liposome zabilježeno da mogu intaktni proći kroz kožu prenoseći terapijske koncentracije lijeka (19).

Deformabilni liposomi lipidne su elastične vezikule čija je membrana građena od fosfolipida i rubnog aktivatora (slika 1 B). Taj rubni aktivator zapravo je jednolančani surfaktant s velikim radijusom zaobljenosti, čime se smanjuje stabilnost dvosloja, narušava njegova struktura tj. povećava deformabilnost ovojnice. Optimalnim omjerom fosfolipida i surfaktanta postižu se željena elastična svojstva vezikula. Ako je količina rubnog aktivatora (surfaktanta) premala, vezikule su krute, dok u prevelikoj količini dolazi do transformacije lipidnih vezikula u micelle. Kao rubni aktivatori uglavnom se primjenjuju: natrijev kolat, natrijev deoksikolat, Span 60, Span 65, Span 80, Tween 20, Tween 60, Tween 80 i dikalijev glicirizinat. Provedena su brojna ispitivanja o utjecaju pojedinog surfaktanta na fizičko-kemijska svojstva liposoma (veličina, uspješnost uklapanja lijeka, zeta potencijal).

Postupak pripreme deformabilnih liposoma veoma je sličan pripremi konvencionalnih liposoma, s tim da se ponekad u postupku hidratacije tankoga fosfolipidnoga sloja vodeni mediji može zamijeniti 7%-tnim etanolom (15, 23).

Deformabilni liposomi kao nosači lijekova za transdermalnu primjenu

Brojna su istraživanja potvrdila sposobnost prolaska deformabilnih liposoma s uklopljenim ljekovitim tvarima u dublje slojeve kože, pri čemu se učinak mogao uspoređivati sa supkutanom primjenom (tablice 1. i 2.). Pritom je uočeno da je ponekad transport istoga

Tablica 1. Pregled *in vivo* ispitivanja učinkovitosti transdermalne primjene deformabilnih liposoma

| Lijek (marker) | Model | Parametar određivanja | Rezultati |
|----------------------------------|-------------------|-----------------------|---|
| Radiooznačeni lipid (19) | Animalni (miševi) | Transport lipida | 30±10% lipida pronađeno u hipodermisu, a 6-8% u krvi. |
| Humani serumski albumin (28, 29) | Animalni (miševi) | Imuni odgovor | Proteini uklopljeni u deformabilne liposome izazvali su imuni odgovor (titar antitijela bio je sličan ili veći od titra izazvanog subkutanom injekcijom humanog serumskog albumina). Konvencionalni liposomi su se pokazali neučinkoviti. |

Tablica 1. nastavak

| Lijek (marker) | Model | Parametar određivanja | Rezultati |
|--|------------------------------------|--|---|
| Ciklosporin A (30) | Animalni (miševi) | Koncentracija lijeka u serumu | Deformabilnim liposomima postignuta je koncentracija od 53.43 ± 9.24 ng/ml nakon 2h te 154.37 ± 27.15 ng/ml nakon 8h. Konvencionalni liposomi nisu uspjeli dostaviti mjerljivu koncentraciju lijeka u krv. |
| Inzulin (31) | Animalni (miševi) i humani | Transport radiooznačenog inzulina, hipoglikemijska reakcija | Nastala je hipoglikemijska reakcija s učinkom usporedivim (najmanje 50%) sa subkutanom injekcijom, ali s odgodom od 45-145min. Mješavina micela i konvencionalnih liposoma nije bila učinkovita. |
| Diklofenak (32) | Animalni (miševi, štakori, svinje) | Biodistribucija radiooznačenog lijeka | Deformabilni liposomi proizveli su značajno veći učinak u odnosu na komercijalni gel. Zabilježene su 10x veće koncentracije lijeka subkutano i prolaz u meko tkivo. Postignute su terapijske koncentracije lijeka na mjestu djelovanja i u kivi, što nije utvrđeno sa standardnim pripravkom. |
| Proultrafleksibilni liposomi s levonorgestrelom (33) | Animalni (ženke štakora) | Težina endometrija, debljina mukoznog sloja Inhibicija luteinizacije Koncentracija lijeka u serumu | Nakon 9 dana, proultrafleksibilni liposomi su značajno povećali težinu endometrija (2.8 i 2.2 puta) te debljinu mukoznog sloja (4.3 i 2.5 puta). Nakon 9 dana kod tretiranih štakora postotak inhibicije iznosio je $85.7 \pm 5.2\%$ za proultrafleksibilne liposome, 45.2 ± 2.8 za proliposome te 14.3 ± 1.6 za otopinu lijeka. U odnosu na otopinu lijeka, proultrafleksibilnim liposomima postignuta je 8x veća koncentracija lijeka za samo 4h i održala se više od 48h. AUC (0-24h) bio je 4x veći nakon primjene proultrafleksibilnih liposoma nego nakon primjene proliposoma te 18x veći nakon primjene otopine lijeka. |
| Etinilestradiol (34) | Animalni (ženke albino miševa) | Antiovuacijska aktivnost | Primjenom ultrafleksibilnih liposoma postignuta je značajno veća antiovuacijska aktivnost u odnosu na konvencionalne liposome i druge lijekove primjenjene per os i lokalno. |
| Zidovudin (35) | Animalni (štakori) | Farmakokinetika | AUC (0-24h) za elastične liposome bio je 12x veći nego za kontrolni pripravak. Liposomi su se značajno više nakupljali u organima RES-a. |

Tablica 2. Deformabilni liposomi-pregled *in vitro* ispitivanja transdermalne permeabilnosti i zadržavanja lijeka u koži

| Lijek (marker) | Sastav liposoma (w/w) | Model | Transdermalna permeabilnost ^b | Zadržavanje u koži ^b | Napomena |
|-------------------------|-----------------------|--|--|---|---|
| Estradiol (36) | SPC:SCh (86:14%) | Humani (epidermis) | 17 (2.1 ^c) | 9.4 (1.1 ^c) | Liposomi su sadržavali 7% etanola |
| | SPC:S80 (86.7:13.3%) | | 17 (2.1 ^c) | 9.2 (1.1 ^c) | |
| | SPC:T80 (84.5:15.5%) | | 14 (1.7 ^c) | 11 (1.3 ^c) | |
| Ciklosporin A (30) | SPC:SCh (1:0.28) | Animalni (miševi-koža s abdomena) | 1.16±0.26µg/cm ² , nakon 8h i 1.88±0.06µg/cm ² , nakon 24h; konvencionalni liposomi neučinkoviti | 16.1 (2.5 ^c) | Receptorska faza je sadržavala 20% etanola izotonziranog s 0.9% NaCl |
| 5-fluorouracil (24) | SPC:SCh (84:16%) | Humani (epidermis) | Izostanak učinka | 10.2 (8.5 ^c) (12h) 8.2 (6.2 ^c) (36h) | Liposomi su sadržavali 7% etanola |
| Metotreksat (37) | PC:KG (2:1) | Animalni (svinja uho) | 5.2 (8.5 ^c) | 3.3 (3.5 ^c) | |
| | PC:KG (4:1) | | 2.9 (4.8 ^c) | 2.7 (2.9 ^c) | |
| | HPC:KG (2:1) | | 5.9 (5.9 ^c) | 3.4 (3.2 ^c) | |
| | HPC:KG (4:1) | | 4.1 (4.1 ^c) | 2.9 (2.7 ^c) | |
| Levonorgestrel (33) | SPC:SCh (85:15%) | Animalni (ženke štakorakoža s abdomena) | 353.7 (1.9 ^c) | Nije određivano | PC+Surfaktant:etanol: vodena faza (5:4:5, w/w/w) |
| | SPC:SDCh (85:15%) | | 494.4 (2.7 ^c) | Nije određivano | |
| Etinilestradiol (34) | SPC:SDCh (85:15%) | Animalni (ženke štakora-koža s abdomena) | 15.19 (1.79 ^c) | Nije određivano | |
| | SPC:T60 (85:15%) | | 14.94 (1.76 ^c) | Nije određivano | |
| | SPC:S60 (85:15%) | | 17.24 (2.03 ^c) | Nije određivano | |
| | SPC:S65 (85:15%) | | 17.90 (2.11 ^c) | Nije određivano | |
| Melatonin (38) | SPC:SDCh (86:14%) | Humani (obrađena koža s ljudskog trupla) | 12.19 (4.70 ^c) | 4.17 (2.22 ^c) | |

Tablica 2. nastavak

| Lijek (marker) | Sastav liposoma (w/w) | Model | Transdermalna permeabilnost ^b | Zadržavanje u koži ^c | Napomena |
|-------------------------------|------------------------|---------------------------------|--|---------------------------------|-----------------------------------|
| Niskomolekularni heparin (39) | DOTAP:T20 (87:13%) | Animalni (miševi-obrijana koža) | 400 | Nije određivano | |
| | EPC:T20 (87:13%) | | 43 | Nije određivano | |
| | EPC:DCP:T20 (83:4:13%) | | 30 | Nije određivano | |
| Kerotifen (23) | SPC:T80 (84.5:15.5%) | Animalni (zečevi-koža uha) | 1.6 (1.7 ^a) | 2.2 (1.2 ^a) | Liposomi su sadržavali 7% etanola |

^a DOTAP, 1,2-dioleil-3-trimetilamonij-propan (kationski lipid); EPC, fosfatidilkolini (iz soje); SPC, fosfatidilkolini (iz jajeta); HPC, hidrogenirani fosfatidilkolini; DCP, diacetil-fosfat; Ch, kolesterol; SCh, natrij-kolat; SDCh, natrij-deoksikolat; KG, dikalij-glicerizinat; S, Span; T, Tween.

^b U odnosu na otopinju lijeka ili suspenziju, ako nije drugačije propisano

^c U odnosu na konvencionalne liposome

lijeka bio bolji pri *in vivo* nego *in vitro* ispitivanju. S druge pak strane, kod nekih lijekova, poput ketotifena (23), 5-fluorouracila (24) i dikalijevog glicerizinata (25), pokazalo se da deformabilni liposomi samo povećavaju odlaganje lijeka u kožu, ali ne i prolaz u dublje slojeve, čime su pogodni jedino za lokalnu primjenu.

Učinkoviti prijenos uklopljenih makromolekula i proteina u kožu, uveo je deformabilne liposome kao potencijalne transportne sustave u genskoj terapiji i imunizaciji. Kim i suradnici (26) prateći ekspresiju zelenoga fluorescentnoga proteina otkrili su obećavajuća svojstva deformabilnih liposoma za neinvazivnu gensku terapiju. Nadalje, potvrđeno je i da je imuni odgovor organizma nakon primjene deformabilnih liposoma s tetanus toksoidom, bio isti kao i nakon intramuskularne imunizacije, čime su se opravdala daljnja istraživanja deformabilnih liposoma za lokalnu imunizaciju (27).

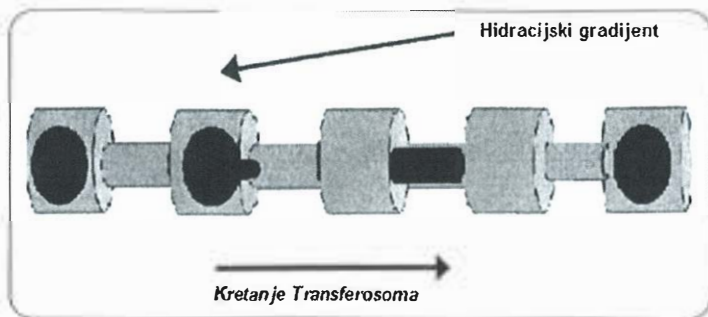
Interakcije deformabilnih liposoma s kožom

Predložena su dva mehanizma kojima deformabilni liposomi poboljšavaju prijenos lijeka kroz kožu: prolaz intaktnih vezikula i poticanje prolaska lijeka kroz kožu (15, 16).

Prolaz intaktnih vezikula

Prema tom mehanizmu (slika 2D), liposomi s uklopljenom ljekovitom tvari prolaze intaktni u kožu. Osim fizičko-kemijskih svojstava vezikula, važnu ulogu u interakciji liposoma s kožom ima i način aplikacije; okluzivni (pokrivanje kože flasterom da se spriječi isparavanje vode) i neokluzivni (koža je izložena zraku pa dolazi do isparavanja vode). Iako je transport većine molekula povećan pri aplikaciji u okluzivnim uvjetima, uočeno je da su elastične vezikule učinkovitije u neokluzivnim. Naime, u neokluzivnim uvjetima

postoji transepidermalni osmotski gradijent koji nastaje uslijed razlike u koncentraciji vode na površini i u dubljim slojevima kože. Suspenzija deformabilnih liposoma primijenjena u takvim uvjetima isparava na kožu, a vezikule bivaju djelomično dehidrirane. Da bi zadržale svoj oblik i ostale hidratizirane, prisiljene su slijediti lokalni hidrationski gradijent (slika 3.) koji ih nosi do dubljih, više hidratiziranih dijelova epidermisa i dermisa, dok im svojstvo elastičnosti membrane omogućuje da intaktni prođu između stanica rožnatoga sloja i dođu u dublje slojeve kože (16).



Slika 3. Kretanje ultradeformabilnih liposoma kroz rožnati sloj (16)

Nekoliko istraživanja potvrdilo je postojanje tog transportnog mehanizma (36, 40). No, nedavno je dokazano da hidrationski gradijent kroz kožu nije uvijek linearan te da je sadržaj vode u središnjem dijelu *stratum corneum*a veći nego u donjim slojevima, bliže živog epidermisa (10). Stoga bi se vezikule, umjesto prolaska do dermisa, mogle odlagati u epidermisu i otkuda bi oslobođeni lijek mogao doprijeti do sistemske cirkulacije (41).

Poticanje prolaska lijeka kroz kožu

Taj mehanizam pretpostavlja da pri interakciji deformabilnih liposoma s kožom, lipidi iz ovojnice liposoma modificiraju intercelularne lipide rožnatoga sloja, čime se olakšava prolaz oslobođenim molekulama lijeka iz liposoma kroz kožu (slika 2B). U prilog toj tezi ide ispitivanje Elsayeda i suradnika (23) koje je pokazalo veću učinkovitost dopreme ketotifena u kožu kad se lijek nalazi izvan vezikula, nego kad je uklopljen u njih. Slično su pokazali Verma i suradnici (40). Unos karboksifluoresceina kroz rožnati sloj u dublje slojeve kože bio je jednako učinkovit bez obzira je li bio primijenjen uklopljen u vezikule ili je sadržan izvan vezikula, što su objasnili interakcijom lipida liposoma s intercelularnim lipidima kože. No, bitno je da su sve studije koje podupiru mehanizam poticanja prolaska lijeka kroz kožu uključivale hidrofilne lijekove, odnosno hidrofilne fluorescentne markere.

Na osnovi ispitivanja interakcija deformabilnih liposoma i kože vidljivo je da će se ljevakovita tvar unijeti u kožu bilo mehanizmom prolaska intaktnih vezikula bilo interakcijom lipida liposoma i kože. Koji će mehanizam prevladati ovisi o fizičko-kemijskim svojstvima uklopljene ljevakovite tvari. Hidrofilni lijekovi ne moraju biti uklopljeni u vezikule, nego naprotiv, njihovo uklapanje u deformabilne liposome može dovesti do stvaranja još jedne

lipidne barijere smanjujući njihov prolaz kroz kožu. Za njih je stoga važnija interakcija fosfolipida liposoma i kože, nego prolaz intaktnih liposoma. S druge pak strane, za lipo-filne ljekovite tvari prikladan je unos mehanizmom intaktnih vezikula, jer im zbog visoke topljivosti u lipidima liposomska ovojnica ne čini zapreku. Hoće li se lijek odlagati u gornjim slojevima kože ili će prolaziti i u dublje slojeve, ovisi i o oslobađanju lijeka iz vezikula, a na njega utječe afinitet vezanja lijeka za vezikul i topljivost lijeka u lipidima kože. Zato će liposomi iz kojih se lijek slabo oslobađa, djelovati poput spremišnih sustava koji polako ispuštaju uklopljeni sadržaj u kožu (15, 41).

ETOSOMI

Etosomi su novija generacija lipidnih vezikula sastavljenih od fosfolipida, vode i etanola. Upravo etanol daje posebna svojstva tim vezikulima, a njegov je udio od 20 do 40%. Pripremaju se otapanjem smjese lipida i lijeka u etanolu kojoj se postepeno dodaje vode-na faza uz neprekidno miješanje. Provedena su brojna istraživanja o utjecaju etanola na

Tablica 3. Pregled *in vivo* ispitivanja učinkovitosti (trans)dermalne primjene etosoma

| Lijek | Parametar određivanja | Model | Rezultati |
|--------------------------|---|--------------------|--|
| Aciklovir (44) | Klinička učinkovitost u liječenju recidivirajućeg herpesa labialis | Humani | Vrijeme stvaranja i gubitka kraste bilo je kraće nakon primjene etosoma s uklopljenim aciklovirom, nego nakon primjene komercijalne kreme (Zovirax®). |
| Testosteron (42) | Farmakokinetika | Animalni (zečevi) | Nakon 5 dana (svakodnevno je stavljan novi flaster), AUC je bio 125% veći nakon primjene flastera s etosomima, za razliku od komercijalnog flastera. |
| Testosteron (45) | Farmakokinetika | Animalni (štakori) | AUC je bio 64% veći primjenom etosoma nego komercijalnog pripravka gela. |
| Kanabidiol (46) | Smanjenje aseptičkog edema na šapi izazvanog karagenom (protuupalna reakcija) | Animalni (miševi) | Razvoj edema potpuno je spriječen samo kod grupe miševa na kojoj su prethodno primjenjeni etosomi. Nakon sat vremena od primjene injekcije karagena postojala je razlika u debljini šape prethodno tretiranih miševa naspram netretiranih. Razlika se zadržala sve do kraja upalnog procesa. |
| Eritromicin (47) | Antibakterijski učinak (<i>in vivo</i>) | Animalni (miševi) | Upotreba etosoma s uklopljenim eritromicinom potpuno je spriječila infekciju, dok je vodeno-etanolna otopina eritromicina izazvala nakon 5 dana uporabe duboke kožne i supkutane apscese. |
| Amonij-glicirizinat (48) | Potiskivanje kemijski izazvanog eritema (protuupalna reakcija) | Humani | Etosomi su značajno brže ublažili eritem u odnosu na otopinu lijeka. Također su pokazali produženi učinak. |

svojstva etosoma. Utvrđeno je da su zbog visokog udjela etanola, etosomi značajno manji od konvencionalnih liposoma istog fosfolipidnog sastava. Naime, etanol uzrokuje negativan naboj na površini, što smanjuje veličinu vezikula. Ako bi se koncentracija etanola smanjila, porasla bi veličina. Osim etanola, i fosfolipidni sastav etosoma utječe na njihovu veličinu. Budući da terapijski učinak ovisi o uspješnosti uklapanja lijeka u etosome, važno je naglasiti da etosomi posjeduju visoku uspješnost uklapanja, pogotovo za lipofilne lijekove, što se objašnjava multilamelarnom građom vezikula i prisutnosti etanola, koji povećava topljivost većine lijekova (42).

Etosomi kao nosači lijekova za (trans)dermalnu primjenu

Ispitivanja s etosomima kao potencijalnim nosačima lijekova upućuju na mogućnost transdermalne isporuke lijeka. Toutitou i suradnici (42) utvrdili su konfokalnom mikroskopijom da se primjenom etosoma postižu i do 18 puta veće koncentracije ispitivanog markera u dubljim slojevima kože, nego nakon primjene vodeno-etanolne otopine, dok su konvencionalni liposomi mogli dostaviti marker samo u gornje slojeve kože.

Brojna *in vivo* (tablica 3.) i *in vitro* (tablica 4.) ispitivanja pokazala su da se etosomima poboljšava (trans)dermalna isporuka lijeka. Za razliku od deformabilnih liposoma, etosomi su bili jednako učinkoviti primijenjeni u okluzivnim i u neokluzivnim uvjetima (15).

Tablica 4. Etosomi-pregled *in vitro* ispitivanja transdermalne permeabilnosti i zadržavanja lijeka u koži

| Lijek | Model | Transdermalna permeabilnost ^a | Zadržavanje u koži |
|------------------------|--|--|--|
| Sotalol (14) | Humani (epidcrmis) | 7.1 ^c | Nije određivano |
| Testosteron (42) | Animalni (zečevi-koža s uha) | 30 (U odnosu na komercijalni pripravak-flaster) | 7 (U odnosu na komercijalni flaster) |
| Minoxidil (42) | Animalni (miševikoža s abdomena) | 45 ^c , 35 ^d , 10 ^e | 7 ^e , 5 ^d , 2 ^c |
| Testosteron (45) | Humani (obrađena koža s ljudskog trupla) | 6.4 (U odnosu na komercijalni pripravak-gel) | Nije određivano |
| Azelatna kiselina (49) | Umjetna (sintetička) membrana | Otpuštanje lijeka iz etosoma bilo je veće nego iz liposoma. Etosomi s većom koncentracijom etanola brže su oslobodili lijek. | Nije određivano |
| Zidovudin (50) | Animalni (koža štakora) | 15.1 ^c , 10.9 ^d , 7.7 ^c , 12.9 ^f | Nije određivano |
| Ketotifen (23) | Animalni (zečevi-koža s uha) | 1.2 ^b , 1.4 ^c , 1.2 ^f | 3.3 ^b , 6.2 ^c , 1.7 ^f |

^a Izračunato na kraju eksperimenta na osnovu ukupne količine lijeka koja je prošla kroz kožu

^b U odnosu na vodenu otopinu

^c U odnosu na vodeno-etanolnu otopinu

^d U odnosu na apsolutni etanol

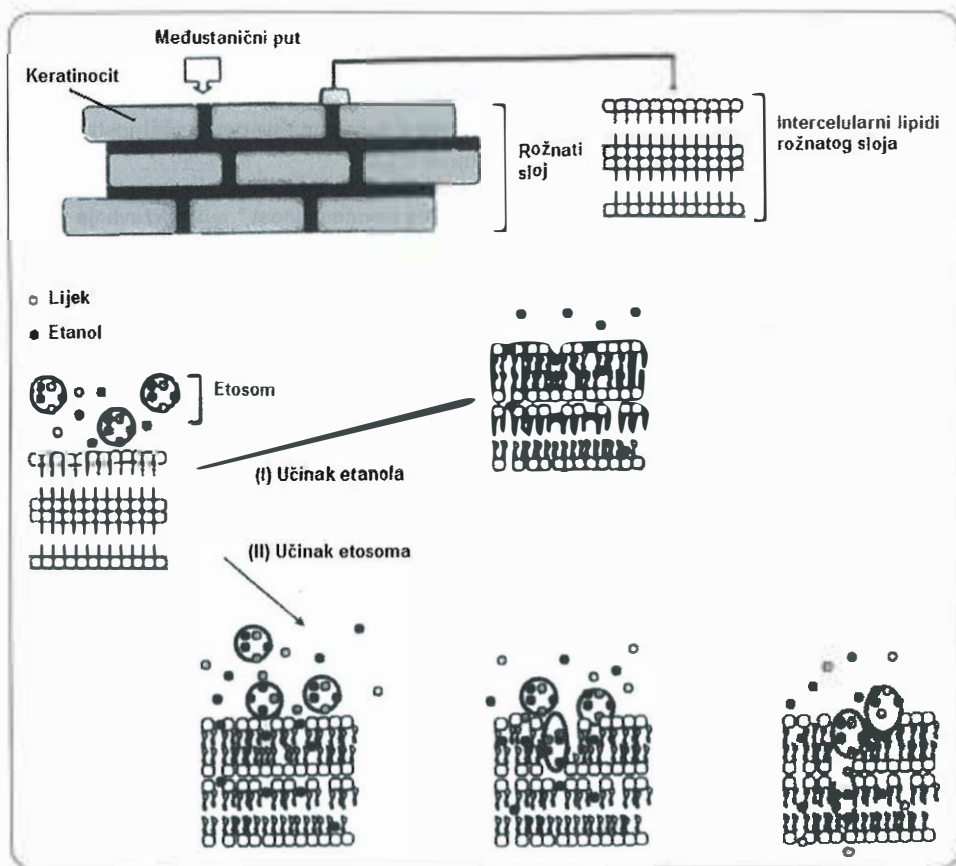
^e U odnosu na etanolnu otopinu lipida

^f U odnosu na konvencionalne liposome

Interakcije etosoma s kožom

Točan mehanizam kojim etosomi dostavljaju lijek u kožu nije u potpunosti razjašnjen. Zapravo je riječ o kombinaciji procesa koji zajedno pridonose transdermalnom učinku – sinergizam etanola, etosoma i lipida kože (42). Zanimljivo je da je za transdermalni učinak važno da lijek bude prisutan u etosomima, a ne izvan vezikula (43). Na slici 4. prikazan je hipotetski model iz kojeg se vide mogući mehanizmi unosa lijeka uklopljenog u etosome u kožu.

Lipidi rožnatog sloja pri fiziološkoj su temperaturi veoma gusto pakirani i konformacijski posloženi. U kontaktu s lipidima, etanol smanjuje temperaturu faznoga prijelaza lipida te tako povećava njihovu fluidnost, što u konačnosti rezultira porastom propusnosti rožnatoga sloja kože. Osim toga, etanol ima učinak i na etosome tako da povećava fleksibilnost ovojnice. Stoga će takve elastične vezikule lakše prolaziti kroz kožu narušene strukture. Oslobođanje ljekovite tvari iz etosoma u dubljim slojevima kože te apsorpcija u sistemsku cirkulaciju bit će posljedica fuzije etosoma s lipidima kože (slika 4.) (15).



Slika 4. Shematski prikaz mogućih interakcija etosoma i kože (15)

BUDUĆNOST TRANSDERMALNE PRIMJENE LIPIDNIH VEZIKULA

Nastavljaju se istraživanja lipidnih vezikula kao terapijskih sustava za transdermalnu primjenu. Neki od pripravaka deformabilnih liposoma namijenjenih lokalnoj primjeni u fazi su kliničkih ispitivanja i očekuje se njihova registracija. Osobito je zanimljiva uloga lipidnih vezikula u transportu proteina i drugih makromolekula te mogućnost njihove primjene u genskoj terapiji i transkutanoj imunizaciji. Vezano uz transdermalnu primjenu, neki autori upućuju na to da bi se pomoću iontoforeze mogao značajno poboljšati prolaz lipidnih vezikula u dublje slojeve kože. No, razvijaju se i nove vrste lipidnih vezikula koje u svom sastavu uključuju propilen-glikol. Riječ je o tzv. PG-liposomima za koje je karakteristično da su stabilniji od konvencionalnih i deformabilnih liposoma te etosoma (15).

Istraživanje lipidnih vezikula kao terapijskih sustava koji će omogućiti kontinuirano oslobađanje lijeka ili ciljano djelovanje na oboljelom mjestu veoma je važno za farmaciju te za medicinu. Njihovom primjenom poboljšala bi se farmakokinetička svojstva lijeka, promijenio njegov terapijski indeks i osigurala konstantna, željena koncentracija lijeka u krvi ili na mjestu djelovanja dulje vrijeme. Time bi se značajno smanjila štetna nusdjelovanja, toksičnost i učestalost doziranja, čime bi pripravak bio prikladniji za pacijenta, što bi u konačnosti olakšalo liječenje mnogih bolesti.

Lipid vesicles for (trans)dermal drug delivery

by J. Banović, M. Bego, N. Cuković, Ž. Vanić

A b s t r a c t

Since liposomes were first shown to be of potential value for topical therapy by Mezei and Gulasekharan in 1980, studies continued towards further investigation and development of lipid vesicles as carriers for skin delivery of drugs. Despite this long history of intensive research, lipid vesicles are still considered as a controversial class of dermal and transdermal carriers. Accordingly, this article provides an overview of the development of lipid vesicles for skin delivery of drugs with special emphasis on recent advances in this field, including development of deformable liposomes and ethosomes.

Literatura - References

1. Honeywell-Nguyen PL, Bouwstra JA. Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. *Drug Discov. Today: Technol.* 2005; 2:67-74.
2. New RRC. *Liposomes a practical approach*, Oxford: IRL Press, 1990.
3. Mezei M, Gulasekharan V. Liposomes-a selective drug delivery system for the topical route of administration. Lotion dosage form. *Life Sci.* 1980; 26:1473-1477.
4. Mezei M, Gulasekharan VJ. Liposomes-a selective drug delivery system for the topical route of administration: gel dosage form. *J. Pharm. Pharmacol.* 1982; 34:473-474.
5. Mezei M. Liposomes as a skin drug delivery system. In: Breimer DD, Speiser P (Eds.) *Topics in Pharmaceutical Sciences*. Amsterdam: Elsevier, 1985. 345-358.

6. Wohlrab W, Lasch J. Penetration kinetics of liposomal hydrocortisone in human skin. *Dermatologica*. 1987; 174:18-22.
7. Masini V, Bonte F, Meybeck A, Wepierre J. Cutaneous bioavailability in hairless rats of tretinoin in liposomes or gel. *J. Pharm. Sci.* 1993; 82:17-21.
8. Foldvari M, Gesztes A, Mezei M. Dermal drug delivery by liposome encapsulation: clinical and electron microscopic studies. *J. Microencapsul.* 1990; 7:479-489.
9. Egbaria K, Ramachandran C, Weincr N. Topical delivery of cyclosporin: evaluation of various formulations using in vitro diffusion studies in hairless mouse skin. *Skin Pharmacol.* 1990; 3:21-28.
10. Bouwstra JA, Honeywell-Nguyen PL. Skin structure and mode of action of vesicles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54:S41-S55.
11. Van Kuijk Meuwissen MEMJ, Junginger HE, Bouwstra JA. Interactions between liposomes and human skin in vitro, a confocal laser scanning microscopy study. *Biochim. Biophys. Acta* 1998; 1371:31-39
12. Lauer AC, Ramachandran C, Leib LM, Niemic S, Weincr ND. Targeted delivery of the pilosebaceous unit via liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1996; 18:311-324.
13. Deo MR, Sant VP, Parekh SR, Khopade AJ, Banakar UV. Liposomebased transdermal delivery of levonorgestrel. *J. Biomater. Appl.* 1997; 12:77-88.
14. Kirjavainen M, Urtti A, Jaaskelainen I, Suhonen TM, Paronen P, Valjakka Koskela R, Kiesvaara J, Monkkonen J. Interactions of liposomes with human skin in vitro: the influence of lipid composition and structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1996; 1304:179-189.
15. Elsayed MM, Abdallah OY, Naggar VF, Khalafallah NM. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research. *Int. J. Pharm.* 2007; 332:1-16.
16. El Maghraby GM, Barry BW, Williams AC. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2008; 34:203-222.
17. Kato A, Ishibashi Y, Miyake Y. Effect of egg yolk lecithin on transdermal delivery of bunazosin hydrochloride. *J. Pharm. Pharmacol.* 1987; 39:399-400.
18. Zellmer S, Pfeil W, Lasch J. Interaction of phosphatidylcholine liposomes with the human stratum corneum. *Biochim. Biophys. Acta* 1995; 1237:176-182.
19. Cevc G, Blume G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim. Biophys. Acta* 1992; 1104:226-232.
20. Korting HC, Stolz W, Schmid MH, Maierhofer G. Interaction of liposomes with human epidermis reconstructed in vitro. *Br. J. Dermatol.* 1995; 132:571-579.
21. Fresta M, Puglisi G. Application of liposomes as potential cutaneous drug delivery systems. In vitro and in vivo investigation with radioactively labelled vesicles. *J. Drug Target.* 4 1996; 95-101.
22. Natsuki R, Morita Y, Osawa S, Takeda Y. Effects of liposome size on penetration of tocopherol acetate into skin. *Biol. Pharm. Bull.* 1996; 19:758-761.
23. Elsayed MM, Abdallah OY, Naggar VF, Khalafallah NM. Deformable liposomes and ethosomes as carriers for skin delivery of ketotifen. *Pharmazie* 2007; 62:133-137.

24. El Maghraby GM, Williams AC, Barry BW. Skin delivery of 5 fluorouracil from ultradeformable and standard liposomes in vitro. *J. Pharm. Pharmacol.* 2001; 53:1069-1077.
25. Trotta M, Peira E, Debernardi F, Gallarate M. Elastic liposomes for skin delivery of dipotassium glycyrrhizinate. *Int. J. Pharm.* 2002; 241:319-327.
26. Kim A, Lee EH, Choi SH, Kim CK. In vitro and in vivo transfection efficiency of a novel ultradeformable cationic liposome. *Biomaterials* 2004; 25:305-313.
27. Gupta PN, Mishra V, Singh P, Rawat A, Dubey P, Mahor S, Vyas SP. Tetanus toxoid-loaded transferosomes for topical immunization. *J. Pharm. Pharmacol.* 2005; 57:295-301.
28. Paul A, Cevc G, Bachhawat BK. Transdermal immunization with large proteins by means of ultradeformable drug carriers. *Eur. J. Immunol.* 1995; 25:3521-3524.
29. Paul A, Cevc G, Bachhawat BK. Transdermal immunization with an integral membrane component, gap junction protein, by means of ultradeformable drug carriers, transferosomes. *Vaccine.* 1998; 16:188-195.
30. Guo J, Ping Q, Sun G, Jiao C. Lecithin vesicular carriers for transdermal delivery of cyclosporin A. *Int. J. Pharm.* 2000; 194:201-207.
31. Cevc G. Transdermal drug delivery of insulin with ultradeformable carriers. *Clin. Pharmacokinet.* 2003; 42:461-474.
32. Cevc G, Blume G. New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, Transferosomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2001; 1514:191-205.
33. Jain S, Sapre R, Tiwary AK, Jain NK. Proultraflexible lipid vesicles for effective transdermal delivery of levonorgestrel: development, characterization and performance evaluation. *AAPS PharmSciTech.* 2005; 6:E513-E522.
34. Garg M, Mishra D, Agashe H, Jain NK. Ethinylestradiol-loaded ultraflexible liposomes: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J. Pharm. Pharmacol.* 2006; 58:459-468.
35. Jain S, Tiwary AK, Jain NK. Sustained and targeted delivery of anti-HIV agent using elastic liposomal formulation: mechanism of action. *Curr. Drug Deliv.* 2006; 3:157-166.
36. El Maghraby GM, Williams AC, Barry BW. Skin delivery of oestradiol from deformable and traditional liposomes: mechanistic studies. *J. Pharm. Pharmacol.* 1999; 51:1123-1134.
37. Trotta M, Peira E, Carlotti ME, Gallarate M. Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate. *Int. J. Pharm.* 2004; 270:119-125.
38. Dubey V, Mishra D, Asthana A, Jain NK. Transdermal delivery of a pineal hormone: melatonin via elastic liposomes. *Biomaterials* 2006; 27:3491-3496.
39. Song YK, Kim CK. Topical delivery of low-molecular weight heparin with surface charged flexible liposomes. *Biomaterials.* 2006; 27:271-280.
40. Verma DD, Verma S, Blume G, Fahr A. Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2003; 55:271-277.

41. Honeywell-Nguyen PL, Bouwstra JA. The in vitro transport of pergolide from surfactant-based elastic vesicles through human skin: a suggested mechanism of action. *J. Control. Release* 2003; 86:145-156.
42. Touitou E, Dayan N, Bergelson L, Godin B, Eliaz M. Ethosomes-novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *J. Control. Release* 2000; 65:403-418.
43. Elsayed MM, Abdallah OY, Naggat VF, Khalafallah NM. Deformable liposomes and ethosomes: mechanism of enhanced skin delivery. *Int. J. Pharm.* 2006; 322:60-66.
44. Horwitz E, Pisanty S, Czerninski R, Helser M, Eliv E, Touitou E. A clinical evaluation of a novel liposomal carrier for acyclovir in the topical treatment of recurrent herpes labialis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 1999; 87:700-705.
45. Ainbinder D, Touitou E. Testosterone ethosomes for enhanced transdermal delivery. *Drug Deliv.* 2005; 12:297-303.
46. Lodzki M, Godin B, Rakou L, Mechoulam R, Gallily R, Touitou E. Cannabidiol-transdermal delivery of anti-inflammatory effect in a murine model. *J. Control. Release* 2003; 93:377-387.
47. Godin B, Touitou E. Erythromycin ethosomal systems: physicochemical characterization and enhanced antibacterial activity. *Curr. Drug Deliv.* 2005; 2:269-275.
48. Paolino D, Lucania G, Mardente D, Alhaique F, Fresta M. Ethosomes for skin delivery of ammonium glycyrrhizinate: in vitro percutaneous permeation through human skin and in vivo anti-inflammatory activity on human volunteers. *J. Control. Release* 2005; 106:99-110.
49. Esposito E, Menegatti E, Cortesi R. Ethosomes and liposomes as topical vehicles for azelaic acid: a preformulation study. *J. Cosmet. Sci.* 2004; 55:253-264.
50. Jain S, Umamaheshwari R, Bhadra D, Jain N. Ethosomes: a novel vesicular carriers for enhanced transdermal delivery of an anti HIV agent. *Indian J. Pharm. Sci.* 2004; 66:72-81.

Primljeno 13. prosinca 2010.