

# Liposomi s kalceinom: odabir optimalne metode pripreve

---

Mandić, Nina; Vanić, Željka; Filipović-Grčić, Jelena

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2012, 68, 697 - 708**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:930783>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-08**



Repository / Repozitorij:

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



# Liposomi s kalceinom: odabir optimalne metode priprave

NINA MANDIĆ, ŽELJKA VANIĆ, JELENA FILIPOVIĆ-GRČIĆ

Zavod za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
Sveučilišta u Zagrebu

## Liposomes with calcein: choice of preparation method

*Abstract – The aim of our study was to develop a liposomal drug carrier system able to provide appropriate trapping efficiency of hydrophilic substance. Since majority of hydrophilic drugs are of low molecular weight, calcein was chosen as a model compound. To optimize the preparation of liposomes with regard to size and entrapment efficiency, liposomes containing calcein were prepared by different methods: conventional and modified film methods as well as proliposome method. Additionally, a dehydration-rehydration procedure was applied on the liposomes prepared by the both film methods. All preparations were extruded through polycarbonate membrane filters to achieve liposomes with homogenous size distribution. Regardless of the preparation method, all extruded liposomes were of mean diameter between 240 and 280 nm. However, encapsulation of calcein in liposomes differed for various preparation methods. Liposomes prepared by the modified film method could entrap more of the hydrophilic marker than those prepared by the conventional hydration method. Although the dehydration-rehydration procedure could slightly enhance the trapping of calcein into liposomes prepared by conventional film method, the extremely high encapsulation of calcein was achieved into proliposomes (> 40 %). Therefore, the proliposome method would be the right choice of preparation procedure for entrapment of hydrophilic substances.*

*(Department of Pharmaceutical technology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb)*

## UVOD

Liposomi su sferične fosfolipidne vezikule promjera od 20-ak nm do 10-ak i više μm, u kojima je unutarnja vodena faza obavijena s jednom ili više koncentričnih položenih fosfolipidnih dvoslojeva. Nastaju spontano, hidratacijom fosfolipida u vodenom

mediju kako bi se minimalizirale nepovoljne interakcije između hidrofobnog dijela molekula fosfolipida i vode. Upravo zbog svoje sličnosti s biološkim membranama, netoksičnosti, neimunogenosti i biorazgradljivosti, u potpunosti su fiziološki prihvatljivi, te se mogu primjenjivati kao nosači lijekova u različitim terapijskim područjima (1). Uklapanjem lijeka u liposome mogu se promijeniti njegova farmakokinetička svojstva, poboljšati apsorpcija, bioraspoloživost, povećati koncentracija na željenom mjestu djelovanja, a smanjiti nuspojave i toksičnost, te osigurati produženo ili kontrolirano oslobađanje što ovisi o svojstvima oblikovanih vezikula. Strukturna svojstva liposoma omogućuju uklapanje (ugradnju) lijekova različite veličine molekule i fizičko kemijskih svojstava. Dok se lipofilni ugrađuju relativno lako, tj. u visokom postotku u ovojnici liposoma (slično vrijedi i za amfifilne zbog afiniteta prema fosfolipidnom dvosloju), kod hidrofilnih lijekova javljaju se poteškoće. Naime, većina metoda pripreve liposoma rezultira relativno niskim vrijednostima za uklopljeni sadržaj (2). Slabo uklapanje, koje je uglavnom posljedica malog volumena unutarnje vodene faze, može ograničiti primjenu liposoma kao nosača hidrofilnih lijekova. Budući da je terapijski učinak ovisan o postignutoj koncentraciji lijeka na željenom mjestu djelovanja, jedan od prvih ciljeva koji se postavlja u razvoju terapijskog sustava baziranog na liposomima je izbor optimalne metode pripreve koja će rezultirati vezikulama odgovarajuće veličine, morfoloških svojstava i dostatnog uklapanja lijeka.

S obzirom da su brojni postojeći, ali i potencijalni novi lijekovi hidrofilne naravi, cilj ovog rada bio je pronaći optimalnu metodu i uvjete pripreve liposoma za uklapanje hidrofilnih lijekova. Kao modelna hidrofilna tvar poslužio je fluorescentni marker kalcein ( $M_r = 622.5$ ).

Liposomi su pripravljeni različitim metodama: hidratacijom suhog fosfolipidnog sloja (klasična film metoda), modificiranom film i proliposomskom metodom, na koje je dodatno primjenjivan postupak dehidratacije-rehidratacije (DRV), te su međusobno uspoređivani u pogledu veličine i sadržaja uklopljenog hidrofilnog markera.

## MATERIJALI I METODE

### Materijali

Za pripremu liposoma upotrijebljeni su: fosfatidilkolin (EPC), fosfatidilglicerolnatrij (EPG-Na) proizvođača Lipoid (Ludwigshafen, Germany) i kalcein (Sigma, St. Louis, USA).

10 % (w/w) otopina Tritona X-100 (Sigma, St. Louis, USA) korištena je za razaranje liposomske ovojnice pri ispitivanju uklapanja kalceina.

Fosfatni pufer, pH 7,4 pripremljen je otapanjem 8 g NaCl, 0,19 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,38 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  i 0,37 g etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) u demineraliziranoj vodi, u odmjernoj tikvici od 1000 mL i podešavanjem pH s 0,1 M HCl.

Ove, kao i sve ostale upotrebljene tvari u ispitivanjima bile su analitičkog stupnja čistoće.

## Metode

### *Priprava liposoma*

Da bi se pronašla optimalna metoda i uvjeti pripreve liposoma s kalceinom primjenjeni su različiti postupci: klasična i modificirana film metoda (3), proliposomska metoda (4), te DRV postupak (5). Koncentracija fosfolipida (26 mM) i fosfolipidni sastav (EPC/EPG-Na = 9/1, molarni omjer) bili su jednaki za sve preparacije, a koncentracija kalceina u 10 mL liposomske suspenzije iznosila je 10 mmol.

### *Hidratacija suhog fosfolipidnog sloja (klasična film metoda)*

EPC (180 mg) i EPG-Na (20 mg) su otopljeni u tikvici okruglog dna u koncentriranom etanolu (3 mL). Nakon otparavanja organskog otapala na rotacijskom vakuum uparivaču (Büchi Rotavapor R-200, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland), transparentnom fosfolipidnom filmu dodano je 10 mL otopine kalceina (10 mmol) u fosfatnom puferu, pH 7,4. Disperzija je ručno protresivana (mučkana) tijekom 30 minuta i ostavljena hidratizirati tijekom noći (20 h, 4 °C) prije karakterizacije.

### *Modificirana film metoda*

Nakon otparavanja organskog otapala na rotacijskom vakuum uparivaču, suhom fosfolipidnom filmu dodano je 0,5 mL 20 mM otopine kalceina i 1,5 mL fosfatnog pufera (pH 7,4). Smjesa je mučkana i ostavljena preko noći radi potpune hidratacije fosfolipida, nakon čega je razrijeđena s puferom do ukupnog volumena pripravka (10 mL).

### *Proliposomska metoda*

Fosfolipidne komponente (180 mg EPC i 20 mg EPG-Na) su otopljene u koncentriranom etanolu (160 mg) uz zagrijavanje i miješanje magnetskom mješalicom. Potom je dodano 0,5 mL 20 mM otopine kalceina i smjesa je nastavljena miješati pri 60 °C tijekom nekoliko minuta. Pritom je formirana primarna proliposomska mikstura koja je, nakon ohlađenja na sobnu temperaturu, uz neprekidno miješanje magnetskom mješalicom (600 okr/min), postepeno razrjeđivana, kap po kap, s 10 mL fosfatnog pufera, pH 7,4 (60 min).

### *Metoda dehidratacije-rehidratacije (DRV)*

DRV postupak primjenjen je na liposome pripravljene klasičnom i modificiranom film metodom. Ukratko, liposomske suspenzije (5 mL), prethodno zamrznute na -18 °C, prenešene su u liofilizator (Freeze dryer Alpha 1-4, Martin Christ, Osterode am Harz, Germany) i podvrgnute sušenju na -50 °C tijekom 24 sata pod sniženim tlakom korištenjem vakuum pumpe (Vacuubrand, Wertheim, Germany). Nakon

toga je provedena kontrolirana rehidracija dodatkom male količine demineralizirane vode (0,5 mL) uz lagano miješanje. 30 minuta kasnije dodan je 0,5 mL pufera, pH 7,4, te je nakon toga pripravak razrijeđen puferom na početni volumen suspenzije (5 mL).

Sve liposomske suspenzije (prije i nakon DRV postupka) podvrgnute su ekstruziji (3 puta) kroz polikarbonatne membranske filtre, promjera pora 400 nm (Liposo-Fast, Avestin, Canada).

#### *Određivanje morfoloških svojstava i veličine liposoma*

Primjenjena je metoda analize slike (*image analysis*) na Optomax V (Ai Cambridge Ltd., Cambridge, UK) priključenom na Olympus BH 2 mikroskop. Obrada podataka provedena je pomoću računala povezanog s uređajem za analizu slike. Razdioba veličine osnivala se na određivanju broja liposoma određenog promjera na reprezentativnom uzorku od približno 10000 čestica (6).

Srednji promjer, indeks polidisperznosti i zeta potencijal liposoma s kalceinom određivani su primjenom fotonske korelacijske spektroskopije (*photon correlation spectroscopy*, PCS) na uređaju Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Malvern, UK) (7).

#### *Određivanje uspješnosti uklapanja kalceina*

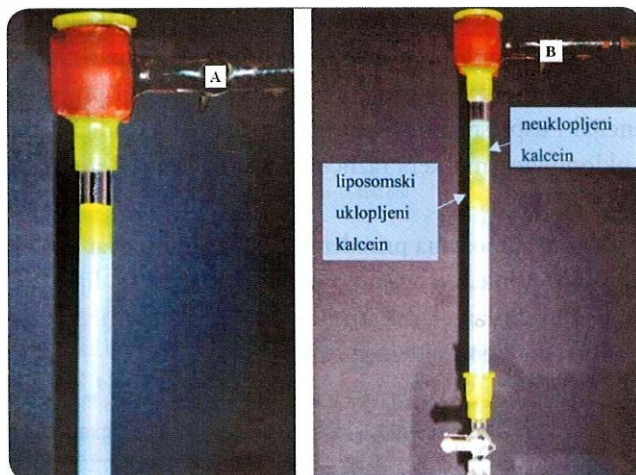
Određivanju sadržaja kalceina uklopljenog u liposome prethodilo je odjeljivanje neuklopljenog (slobodnog) od liposomskog (uklopljenog) hidrofilnog markera. U tu svrhu korištene su dvije metode; dijaliza i gel filtracija (8).

#### *Dijaliza*

Liposomske suspenzije (0,5 mL) dijalizirane su kroz polupropusnu membranu (Dialysis Tubing, Mw cut off 12–14000 Da) u 200 mL fosfatnog pufera, pH 7,4 tijekom 2 sata. Nakon toga dijalizacijski medij je zamijenjen sa svježih 200 mL pufera i uzorci nastavljeno dijalizirati slijedeća 22 sata. Sadržaj iz dijalizacijske vrećice prenešen je kvantitativno u odmjernu tikvicu od 10 mL. Kako bi se oslobodio uklopljeni kalcein iz liposoma, dodano je 0,5 mL 10 % Tritona X-100 (w/w), nakon čega su tikvice nadopunjene s puferom, pH 7,4 do oznake.

#### *Gel filtracija*

Kolona dužine 13 cm i promjera 0,5 cm napunjena je Sepharosom CL-4B (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Po 200  $\mu$ L liposomskih suspenzija stavljano je na kolonu i eluirano fosfatnim puferom, pH 7,4 (slika 1.). Brzina protoka iznosila je 48 kapi/min, a skupljeno je 14 frakcija volumena 0,5 mL. Liposomskim frakcijama dodano je 0,5 mL 10 % Tritona X-100 (detergens) za otapanje fosfolipidnih ovojnica, a nakon toga su sve frakcije prenešene u odmjerne tikvice od 10 mL i nadopunjene puferom, pH 7,4 do oznake.



**Slika 1.** Odjeljivanje proliposoma s kalceinom postupkom gel filtracije. A-ekstrudirani liposomi priređeni proliposomskom metodom stavljeni su na kolonu punjenu Sepharosom CL-4B i eluirani puferom (pH 7,4), B-razdvajanje liposomske frakcije (uklopljeni kalcein) od slobodne frakcije (neuklopljeni kalcein).

Koncentracija neuklopljenog kalceina i onog uklopljenog u liposome određivana je spektrofotometrijski (RF-5301 PC spektrofotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan) pri ekscitaciji od 496 nm i emisiji od 516 nm. Utjecaj detergensa na intenzitet fluorescencije izbjegnuto je korištenjem slijepih proba (0,5 % Triton-X 100 u puferu, pH 7,4).

Uspješnost uklapanja kalceina u liposome (%) određena je kao udio uklopljenog kalceina u odnosu na ukupni kalcein u suspenziji (zbroy masa uklopljenog i neuklopljenog kalceina).

Za sve uzorke određivan je *recovery* (%), udio eksperimentalno utvrđenog prema upotrijebljenom kalceinu i iznosio je od 94–103 %.

## REZULTATI I RASPRAVA

Odabirom odgovarajuće metode mogu se pripraviti liposomi odgovarajuće veličine i morfoloških svojstava, no problem koji se gotovo redovito javlja u praksi vezan je za nisko uklapanje hidrofilnih lijekova. S obzirom da slabo uklapanje može ograničiti primjenu liposoma kao terapijskog sustava, odabir metode pripreve koja će rezultirati dostatnim uklapanjem hidrofilnog lijeka od velikog je značenja.

Izbor optimalne metode i uvjeta pripreve za uklapanje hidrofilnih lijekova u liposome, proveden je korištenjem kalceina-hidrofilnog fluorescentnog markera. Liposomi su pripremljeni trima različitim metodama: klasičnom i modificiranom film, te proliposomskom metodom. Dodatno je na liposome pripravljene film metodama primjenjen DRV postupak.

Određeni volumen svih liposomskih suspenzija podvrgnut je ekstruziji kroz polikarbonatne membrane u svrhu homogenizacije. Sve su preparacije liposoma potom analizirane i međusobno uspoređivane s obzirom na srednji promjer, razdiobu veličina, zeta potencijal i uspješnost uklapanja kalceina nakon odjeljivanja neuklopljenog od liposomski uklopljenog markera različitim postupcima. Rezultati su prikazani tablicama 1 i 2, te slikama 2–4.

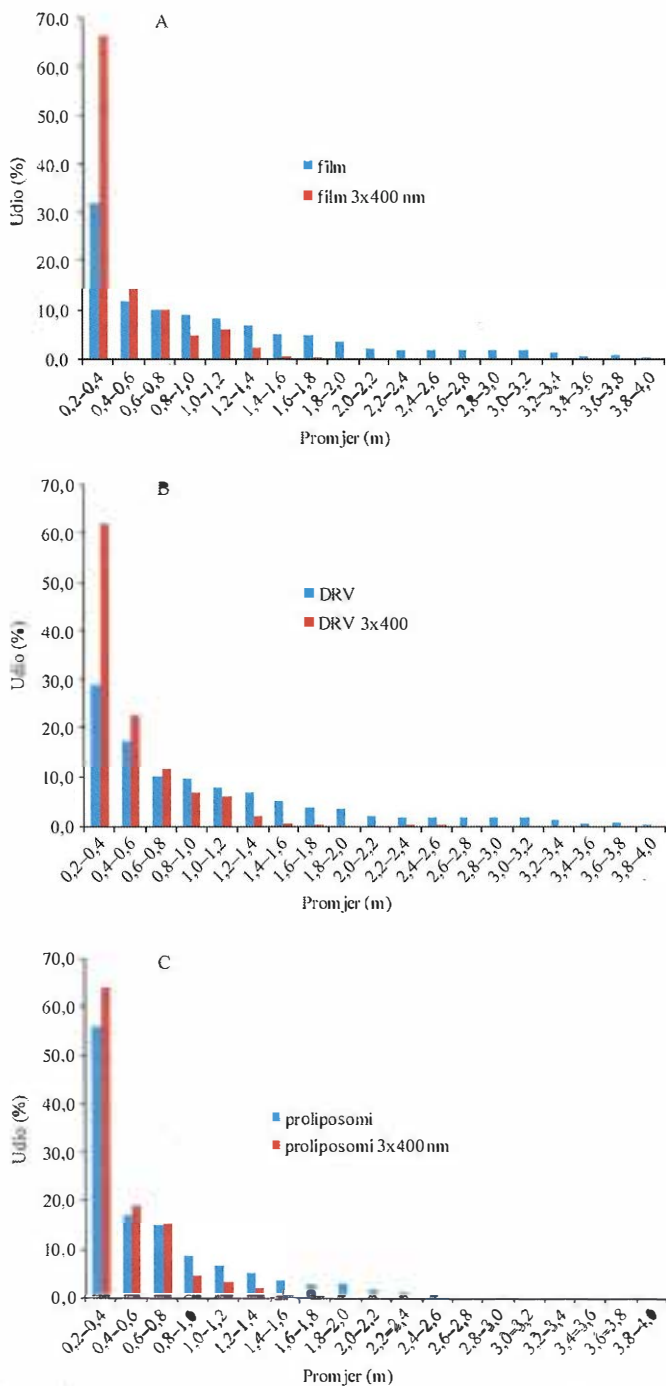
Morfološka svojstva liposoma priređenih različitim metodama određivana su korištenjem metode analize slike. Neovisno o postupku pripreve, liposomi su bili pravilnog sferičnog oblika, multilamelarne strukture, a kod onih priređenih film metodom uočena je manja količina neizreagiranih fosfolipida.

**Tablica 1.** Srednji promjeri, indeksi polidisperznosti i zeta potencijali liposoma pripremljenih različitim metodama

Metoda pripreve	Srednji promjer (nm)		Indeks polidisperznosti	Zeta potencijal (mV)
	Metoda analize slike	PCS		
Klasična film	1620 ± 689	2250 ± 1500	1.000	-53.1 ± 2.0
	269 ± 36*	275 ± 4*	0.359 ± 0.007*	
DRV (klasična film)	1998 ± 858	2195 ± 718	1.000	-52.7 ± 1.8
	279 ± 16*	272 ± 3*	0.289 ± 0.012*	
Modificirana film	1703 ± 517	2236 ± 875	1.000	-53.7 ± 0.8
	258 ± 27*	281 ± 11*	0.327 ± 0.010*	
DRV (modificirana film)	2186 ± 702	2105 ± 1128	1.000	-54.0 ± 1.3
	263 ± 21*	273 ± 13*	0.278 ± 0.008*	
Proliposomska	283 ± 87	427 ± 6	0.614 ± 0.047	-53.4 ± 0.9
	237 ± 10*	244 ± 3*	0.199 ± 0.021*	

Srednji promjeri liposoma priređenih različitim metodama određivani su metodom analize slike i fotonskom korelacijskom spektroskopijom (PCS). Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost ± S.D. (n=3). PCS metodom određen je i zeta potencijal (n=5). \*Liposomske suspenzije su ekstrudirane 3 puta kroz polikarbonatne membranske filtre (400 nm).

Film metodom formirani liposomi su izrazito veliki (promjera čak do 10 μm), heterogene razdiobe veličine (3), što je potvrđeno i u ovom istraživanju (tablica 1.). Srednji promjer određen metodom analize slike i PCS-om iznosio je od 1600 do 2200 nm, neovisno o tome da li su priređeni klasičnom ili modificiranom film metodom. Visoki indeksi polidisperznosti izmjereni PCS tehnikom ukazuju na izrazito heterogenu distribuciju veličine, koja je potvrđena i metodom analize slike (slika 2.A). Primjena DRV postupka na liposome priređene klasičnom film metodom rezultirala je dodatnim porastom promjera liposoma s 1620 na gotovo 2000 nm (obje metode određivanja veličine čestica). S druge pak strane, proliposomskom metodom pripremljeni liposomi (proliposomi) bili su značajno manjeg promjera (280–430 nm). Premda je i kod njih uočeno postojanje populacije liposoma većih od 1000 nm (slika 2.C),



**Slika 2.** Utjecaj ekstruzije na razidobu veličine liposoma s kalceinom priređenih različitim metodama. A–klasična film metoda, B–DRV postupak (primjenjen na liposome pripravljene klasičnom film metodom), C–proliposomska metoda.



indeks polidisperznosti bio je manje izražen (oko 0,6) nego kod film i DRV metode (tablica 1.).

Imajući u vidu terapijsku primjenu liposoma kao nosača lijekova, široka razdioba veličina može predstavljati poteškoću, te je stoga nužna homogenizacija pripravaka, odnosno smanjivanje veličine liposoma bilo postupkom soniciranja u ultrazvučnoj kupelji ili uporabom ultrazvučnih sonda, bilo postupkom ekstrudiranja (2, 3). U ovom istraživanju provedena je ekstruzija svih liposomskih suspenzija 3 puta kroz polikarbonatne membranske filtre (400 nm). Kao što je bilo i za očekivati, srednji promjeri liposoma priređenih klasičnom i modificiranom film metodom, te DRV postupkom izrazito su se smanjili i iznosili su oko 270 nm neovisno o korištenoj metodi pripreve (tablica 1.). Također je uočen veliki porast populacije liposoma u razredu veličine 0,2–0,4  $\mu\text{m}$  (slika 2.A i 2.B), uz smanjenje ili gotovo gubitak populacija liposoma u razredima većim od 1  $\mu\text{m}$ . Homogenizacija liposomskih suspenzija ogleda se i u smanjenju indeksa polidisperznosti određenog PCS tehnikom, koja je s početne 1,00 pala na vrijednosti indeksa polidisperznosti 0,25–0,35, ovisno o metodi pripreve liposoma. Premda je utjecaj ekstruzije na srednji promjer i razdiobu veličina uočljiv i kod proliposoma, manje je izražen nego kod liposoma priređenih film i DRV metodom. Razlika u srednjem promjeru neekstrudiranih i ekstrudiranih liposoma pripremljenih proliposomskom metodom iznosila je svega oko 50 nm, metodom analize slike. Međutim, PCS-om provedena mjerenja hidrodinamičkog promjera proliposoma upućuju na razliku od gotovo 200 nm (prije i nakon ekstruzije) (tablica 1.). S obzirom da je uređaj na kojem je provedeno određivanje veličine i indeksa polidisperznosti PCS metodom prikladan za čestice manje od 1000 nm, ovo bi ispitivanje bilo pouzdanije od metode analize slike koja je prihvatljivija tehnika za čestice veće od 1000 nm.

Mjerenja zeta potencijala pokazuju da su, neovisno o korištenoj metodi pripreve, sve suspenzije liposoma bile stabilne. Zeta potencijal iznosio je oko  $-53$  mV (tablica 1.). Posljedica je to prisutnosti negativno nabijenog fosfolipida (EPG-Na) u dvosloju koji pridonosi odbojnim interakcijama između pojedinih vezikula, čineći na taj način liposomsku suspenziju stabilnom.

Rezultati uspješnosti uklapanja kalceina u liposome priređene različitim metodama i odijeljene različitim načinima prikazani su u tablici 2. Postupak gel filtracije (slika 3.) primjenjivan je samo za odijeljivanje ekstrudiranih liposoma, budući da se dio velikih neekstrudiranih liposoma taložio na vrhu kolone. Metoda odijeljivanja dijalizom kroz polupropusne membrane provedena je i za ekstrudirane i za neekstrudirane liposome (tablica 2.).

Klasičan postupak pripreve liposoma film metodom rezultirao je uklapanjem od samo 8 %. Modifikacijom postupka, tj. dodatkom male količine koncentriranije otopine hidrofilnog markera u prvoj fazi hidratacije suhog fosfolipidnog filma i naknadno razrjeđivanje s puferom na propisani ukupni volumen suspenzije rezultirao je

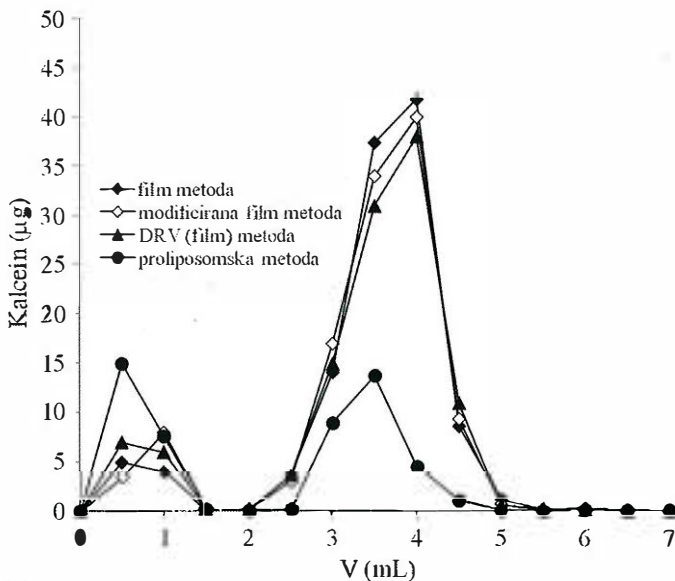
**Tablica 2.** Uspješnost uklapanja kalceina (%) u liposome priredene različitim metodama

Metoda pripreve	Uspješnost uklapanja kalceina (%)	
	Dijaliza	Gel filtracija
Klasična film	8.6 ± 1.9 5.8 ± 1.2*	— 4.9 ± 0.8*
DRV (klasična film)	12.3 ± 1.5 8.17*	— 6.0 ± 0.7*
Modificirana film	8.9 ± 0.7 6.8 ± 0.6*	— 8.2 ± 0.6*
DRV (modificirana film)	8.8 ± 1.0 5.6 ± 0.8*	— 4.5 ± 0.8*
Proliposomska	61.0 ± 3.4 43.6 ± 1.1*	— 45.4 ± 2.4*

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

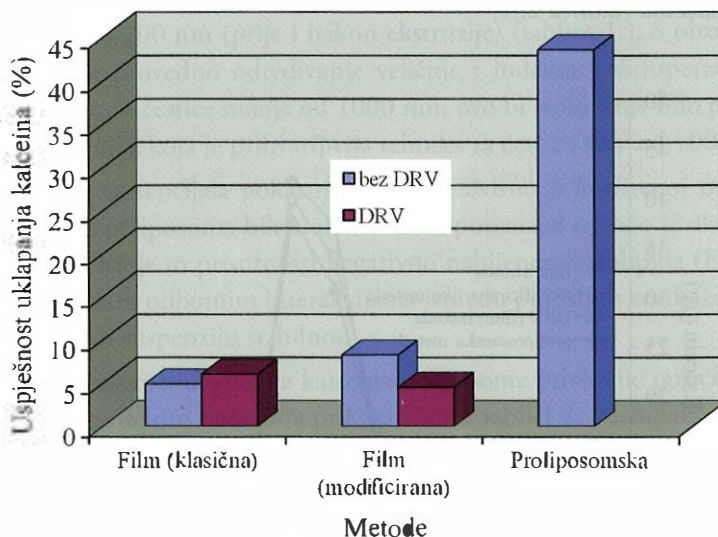
\*Liposomske suspenzije su ekstrudirane 3 puta kroz polikarbonatne membranske filtre promjera pora 400 nm.

tek blagim porastom uklapanja (na 9 %). Premda je ekstruzija rezultirala značajno homogenijim preparacijama liposoma srednjeg promjera manjeg od 300 nm (tablica 1., slika 2.), uspješnost uklapanja se smanjila, ali je u liposomima još uvijek bilo više od 6,5 % kalceina (tablica 2.).



**Slika 3.** Odjeđivanje ekstrudiranih liposoma s kalceinom, priređenih različitim metodama, postupkom gel filtracije na koloni punjenoj Sepharosom CL-4B.

Temeljni pristup poboljšanja uklapanja hidrofilnih lijekova u liposome je priprava manjeg broja većih iz mnogo liposoma malog promjera, jer se na taj način povećava volumen unutarnjeg vodenog prostora (2). To je moguće postići postupkom smrzavanja i taljenja (3) ili postupkom dehidracije-rehidracije prethodno pripremljenih liposomskih disperzija (5). U tom je istraživanju primjenjen DRV postupak na ekstrudirane liposome pripremljene klasičnom i film metodom. Načelo DRV metode je u maksimalnoj izloženosti fosfolipida visokim koncentracijama lijeka prije ponovnog formiranja vezikula u postupku rehidracije. Fuzijom manjih liposoma u fazi kontrolirane rehidracije nastaju veliki oligo- ili multi-lamelarni liposomi, veći od početno pripremljenih liposoma film metodom (2). Tako veliki DRV liposomi mogli su uklopiti nešto više od 12 % kalceina (tablica 2.) što je značajno više od početno uklopljenih 8 % (film metoda). Nakon provedene ekstruzije, DRV liposomi su bili podjednakog promjera kao i ekstrudirani liposomi pripremljeni film metodom (270–280 nm), te su sadržavali nešto više kalceina (7–8 %) od ekstrudiranih priređenih klasičnom film metodom (5–6 %). Međutim, primjena DRV postupka na liposome pripremljene modificiranom film metodom nije rezultirala poboljšanim uklapanjem hidrofilnog markera (oko 9 % prije i nakon DRV), te je nakon provedene ekstruzije uklapanje palo na 5 %.



Slika 4. Uspješnost uklapanja kalceina (%) u ekstrudirane liposome priređene različitim postupcima.

Za razliku od obje film metode (klasične i modificirane), proliposomska metoda je rezultirala izrazito visokim uklapanjem kalceina (tablica 2., Slika 4.). Ako se uzme u obzir da su proliposomi bili značajno manji (430 nm) od liposoma pripremljenih film metodom (>2000 nm), tada je uklapanje od 61 % itekako značajno. Čak i nakon provedene ekstruzije proliposomi, koji su u usporedbi s liposomima pripremljenim drugim metodama bili najmanji (240 nm), sadržavali su više od 40 % uklopljenog kalceina.

Prema tome, iz svega navedenog slijedi, da bi proliposomska metoda bila metoda izbora za uklapanje hidrofilnih tvari. Njome se mogu dobiti liposomi homogenije distribucije veličine nego film i DRV metodom, a postupak je brz, jednostavan i prikladan za moguću prenošenje iz laboratorijskih u industrijske uvjete proizvodnje (4).

## ZAKLJUČAK

Pripremljeni su i karakterizirani liposomi s hidrofilnim fluorescentnim markerom, kalceinom, u svrhu odabira metode pripreve liposoma koja bi bila prikladna za uklapanje hidrofilnih lijekova. Liposomi su pripremljeni klasičnom i modificiranom film metodom na koje je dodatno primjenjen DRV postupak, te proliposomskom metodom.

Sve metode pripreve rezultiraju stabilnim suspenzijama liposoma. Mjerenja srednjeg promjera i indeksa polidisperznosti liposoma priređenih različitim postupcima ukazuju na izrazito heterogenu razdiobu veličina liposoma pripremljenih film i DRV metodom, dok su proliposomi bili manje heterogeni. Neovisno o postupku pripreve, ekstruzijom su dobivene homogene suspenzije liposoma srednjeg promjera 240–280 nm. Premda je DRV metodom poboljšano uklapanje kalceina u liposome priređene klasičnom film metodom, metoda izbora za uklapanje hidrofilnih tvari bila bi proliposomska jer rezultira uklapanjem kalceina većim od 40 %.

1. Torchilin V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4:145–160.
2. Kirby C, Gregoriadis G. Liposomes In: Mathiowith E. (Ed.) *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery.* New York-Chiester-Weinheim-Brisbane-Singapore-Toronto: Wiley, 1999:461–492.
3. New R.R.C. *Liposomes: a practical approach.* Oxford-New York-Tokyo: IRL Press, 1989.
4. Perrett S, Golding M, Williams P. A simple method for preparation of liposomes for pharmaceutical applications: characterization of the liposomes. *J Pharm Pharmacol.* 1991; 43:154–161.
5. Kirby C, Gregoriadis G. Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Biotechnol.* 1984; 2:979–984.

6. Pavelić Ž, Škalko-Basnet N, Filipović-Grčić J, Martinac A, Jalšenjak I. Development and in vitro evaluation of a liposomal vaginal delivery system for acyclovir. *J Control Release*. 2005; 106:34–43.
7. Vanić Ž, Barnert S, Süß R, Schubert R. Fusogenic activity of PEGylated pH sensitive liposomes. *J Liposome Res*. 2012; 22:148–157.
8. Pavelić Ž, Škalko-Basnet N, Jalšenjak I. Liposomal gels for vaginal drug delivery. *Int J Pharm*. 2001; 219:139–149.

*Primljeno 1. lipnja 2012.*