

# In vitro ispitivanje oslobađanja azitromicina iz liposoma uklopljenih u kitozanski hidrogel

---

Jug, Marina

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:588396>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

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



**Marina Jug**

***In vitro* ispitivanje oslobađanja azitromicina iz  
liposoma uklopljenih u kitozanski hidrogel**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Oblikovanje lijekova 2, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Željke Vanić.

**Zahvala:**

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Željki Vanić i asistentici Zori Rukavina mag.pharm na strpljenju, trudu i podršci tijekom izrade ovog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji, posebno sestri Emanuely i bratu Josipu koji su mi najveća potpora u životu i uvijek uz mene.

Hvala i mojim prijateljicama Nikolini i Ani što su uvijek vjerovalle u mene i bile velika utjeha kad mi je bilo najteže.

# SADRŽAJ

<b>1.UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. ANATOMSKO-FIZIOLOŠKA SVOJSTVA KOŽE.....	1
1.2. BAKTERIJSKE INFEKCIJE KOŽE .....	3
1.2.1. Bakterijske infekcije rana i opekline.....	5
1.3. LIPOSOMI.....	6
1.3.1. Struktura i svojstva liposoma .....	6
1.3.2. Klasifikacija liposoma.....	8
1.3.3. Deformabilni liposomi .....	11
1.4. METODE PRIPRAVE LIPOSOMA .....	12
1.4.1. Metoda hidratacije suhog fosfolipidnog sloja (tzv. film metoda) .....	13
1.4.2. Soniciranje.....	14
1.5. LIPOSOMI ZA (TRANS)DERMALNU PRIMJENU LIJEKOVA .....	14
1.6. <i>IN VITRO</i> ISPITIVANJE OSLOBAĐANJA LIJEKA PRIMJENOM FRANZ-DIFUZIJSKE ČELIJE.....	15
1.6.1. Određivanje koncentracije lijeka u uzorku.....	16
1.7. AZITROMICIN .....	18
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME .....</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>23</b>
3.1. MATERIJALI .....	24
3.2. METODE .....	25
3.2.1. Priprava kitozanskog hidrogela.....	25
3.2.2. Priprava liposoma.....	25
3.2.3. Određivanje srednjeg promjera liposoma i indeksa polidisperznosti.....	27
3.2.4. Određivanje zeta potencijala .....	28
3.2.5. Odjeljivanje liposomske frakcije lijeka od neuklopljene frakcije .....	28
3.2.6. <i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja azitromicina iz liposoma uklopljenih u kitozanski hidrogel.....	28
3.2.7. Izrada kalibracijskog pravca za azitromicin.....	29
3.2.8. Određivanje sadržaja azitromicina oslobođenog iz liposoma tijekom <i>in vitro</i> ispitivanja .....	30

<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>31</b>
4.1. KARAKTERIZACIJA LIPOSOMA.....	32
4.1.1. Srednji promjer liposoma i indeks polidisperznosti.....	32
4.1.2. Zeta potencijal .....	33
4.2. OSLOBAĐANJE AZITROMICIMA IZ LIPOSOMA UKLOPLJENIH U KITIZANSKI GEL .....	34
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>38</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>39</b>
<b>7. SAŽETAK .....</b>	<b>42</b>

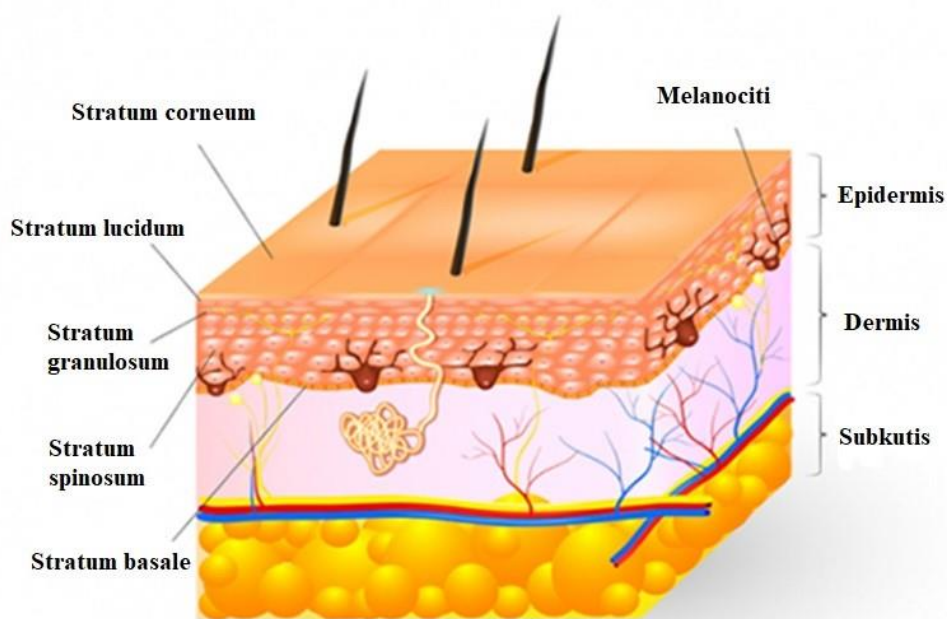
# 1.UVOD

## 1.1. ANATOMSKO-FIZIOLOŠKA SVOJSTVA KOŽE

Koža je najveći organ tijela i obavlja brojne funkcije važne za cijeli organizam. Djeluje kao barijera koja, s jedne strane, sprječava gubitak vode i elektrolita, a s druge brani ulazak nepoželjnih i štetnih molekula iz okoline. Koža štiti tijelo od mehaničkih, fizikalnih, kemijskih i mikrobioloških utjecaja, sudjeluje u regulaciji tjelesne temperature, medijator je osjeta te mjesto gdje se odvijaju imunološki procesi i sinteza vitamina D. Zbog sposobnosti da sudjeluje u izmjeni tvari, njena su svojstva bitna za učinak dermatoterapijskih i kozmetičkih preparata te se zbivanja u organizmu mogu očitovati na koži, ali isto tako promjene kože mogu izazvati cijeli niz poremećaja u organizmu (Čajkovac, 2000).

Koža je vrlo složen i heterogen organ koji je građen od dva osnovna sloja; epidermisa i dermisa koji se razlikuju po sastavu, debljini i funkciji. Na njoj se površini nalazi tanki hidrolipidni film koji štiti od gubitka vlage i prodora stranih tvari, osobito mikroorganizama. Masne tvari u hidrolipidnom sloju potječu uglavnom iz žlijezda lojnica, a manji dio od epidermalnih stanica. Hidrofilne tvari potječu iz žlijezda znojnice te međustaničnih prostora (Čajkovac, 2000).

Ispod kože nalazi se potkožno tkivo (*subcutis*) koje je građeno uglavnom od masnog tkiva. Čine ga nakupine masnih stanica koje su uklopljene u mrežu vezivnih stanica. U rahlom potkožnom tkivu nalaze se krvne i limfne žile, mišići, živci, receptori za pritisak i za duboki senzibilitet, te korijeni vlasi i dijelovi velikih žlijezda znojnice (Čajkovac, 2000). Debljina subkutisa ovisi o spolu, dobi, hormonalnim i živčanim čimbenicima te prehrani. Služi kao toplinski izolator i ublažava mehaničke podražaje (Igarashi i sur, 2005).



**Slika 1.** Građa kože (<http://canacopegd.com/>)

Epidermis je orožnjeli pločasti epitel koji se sastoji od pet slojeva – *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* i *stratum corneum*. *Stratum basale* je temeljni zametni sloj koji se sastoji od jednog reda cilindričnih stanica povezanih s dezmosomima u bazalnom sloju. *Stratum spinosum* je nazubljen ili trnasti sloj koji sadrži 4-8 redova poligonalnih stanica koje su međusobno povezane s dezmosomima. Sadrži i trnaste nastavke-tonofibrile koji presijecaju međustanični prostor i tako održavaju vezu među stanicama. *Stratum granulosum* je zrnasti sloj koji se sastoji od jednog do dva reda pločastih stanica koji u citoplazmi sadrže zrnca keratohijalina važnog u sintezi keratina. *Stratum lucidum* je svijetli sloj prisutan samo na dlanovima i tabanima. *Stratum corneum* je rožnati sloj kože koji se neprestano troši u obliku sitnog ljuštenja, a sastoji se od rožnatih stanica koje nemaju jezgru. Svi slojevi sadrže keratinocite, stanice koje sudjeluju u stvaranju keratina, a epidermis još sadrži i melanocite, Langerhansove te Merkelove stanice (Lipozenčić, 2008).

Keratinociti su najbrojnije stanice kože. Imaju velike ovalne jezgre i dijele se za razliku od ostalih stanica. Melanociti su stanice koje stvaraju pigment, ne dijele se (u usporedbi s keratinocitima) i imaju manje jezgre. Karakteriziraju ih dendritički nastavci koji održavaju udaljenost prema susjednim stanicama. Pigment kože melanin nastaje unutar sitnih organela – melanosoma. Nakon završetka sinteze melanina, melanosomi se putem dendrita ubrizgavaju u keratinocite koji se zovu melanofore ili kromatofore.

Merkelove stanice su morfološki slične melanocitima, ali ne stvaraju pigment nego služe kao receptori dodira i nalaze se u blizini završetaka živčanih vlakana. Langerhansove stanice su dendritičke, pokretne stanice koje se mogu seliti iz epidermisa u dermis i dio su imunološkog sustava (Čajkovac, 2000).

Dermis se nalazi ispod epidermisa i mnogo je deblji od njega. Sadrži manje stanica i puno više vlakana, a njegove su glavne komponente kolagenska i elastinska vlakna. Dermis se sastoji od 2 sloja: papilarnog i retikularnog. Papilarni sloj je utisnut u epidermis i osim vezivnog tkiva sadrži i veliku količinu živčanih vlakana, kapilara, vode i stanica (npr. fibroblaste). Dobro je prokrvljen te sudjeluje u regulaciji tlaka i temperature. Donji dio dermisa je retikularni sloj koji za razliku od papilarnog, sadrži guste i debele slojeve kolagenskih vlakana, te manje živčanih vlakana i kapilara. Dermis osigurava koži čvrstoću i žilavost (Čajkovac, 2000).

## 1.2. BAKTERIJSKE INFEKCIJE KOŽE

Kolonizacija kože bakterijama vrlo je dinamičan proces koji ovisi o uvjetima okoliša. Dio stalne bakterijske flore kože su *Staphylococcus epidermidis*, neke vrste roda *Propionibacterium*, *Corynebacterium* i *Acinetobacter* te one najčešće ne uzrokuju bolesti. Najčešći uzročnici bakterijskih bolesti su bakterije koje se inače ne razmnožavaju i ne rastu na koži čovjeka pa čine prolaznu floru. Takve su bakterije na koagulazu pozitivan *Staphylococcus aureus*,  $\beta$ -hemolitički streptokok grupe A i *Escherichia coli* T-fagotip. Uzrok bakterijskih gnojnih infekcija može biti oštećena i vlažna koža, otežana perspiracija, dugotrajna primjena antibiotika, kortikosteroida ili citostatika, AIDS ili loši higijenski uvjeti (Lipozenčić, 2008).

Dermalna mikroflora različita je na različitim mjestima pa tako razlikujemo 3 različita područje kože: (i) pazuh, međica i koža između nožnih prstiju (ii) dlanovi, lice i trup te (iii) ruke i noge. Koža na djelomično zatvorenim područjima (npr. koža između nožnih prstiju i pazuha) sadrži veće količine bakterija od ostalih dijelova tijela što je posljedica veće vlage, veće tjelesne temperature i više koncentracije površinskih lipida. Broj bakterija na koži je relativno konstantan iako je djelomično ovisan o urođenoj i specifičnoj bakterijskoj aktivnosti u koži, a djelomično i o izloženosti kože u određenom okolišu, pa tako Gram-negativni bacili češće koloniziraju na području pazuha i kože nožnih prstiju nego na sušim područjima kože.



Većina bakterija živi na površinskim dijelovima rožnatog sloja epidermisa i u gornjem dijelu dlake, ali ima i onih koje se nalaze u dubljim područjima folikula dlake i izvan dosega običnih postupaka dezinfekcije. Glavni stanovnik kože je *S. epidermidis* koji u nekim područjima čini i 90 % aerobne flore. Na koži stidnice prevladava *S. aureus* (67%), a nalazi se i na međici te sluznici nosa (10-40%) (Baron, 1996).

*Streptococcus pyogenes* je  $\beta$ -hemolitički streptokok serološke skupine A. Spada u najvažnije uzročnike bolesti kod ljudi, a najčešće izaziva kliničke i supkliničke infekcije kože i gornjeg dišnog sustava (Kalenić i sur, 2001). Stafilokoki i streptokoki uzrokuju bakterijske infekcije kože koje karakterizira gnojna upala. Takve se dermatoze nazivaju pioderme, a dijele se na tri skupine: epidermalne pioderme, pioderme vezane uz folikul dlake i pioderme žlijezda znojnice (Kansky i sur, 1984).

Od kožnih bolesti bitno je spomenuti i tuberkulozu kože te lepru. Tuberkuloza kože skup je promjena na koži uzrokovanih bakterijom *Mycobacterium tuberculosis*, a javlja se samo na koži ili uz istodobnu infekciju pluća i bubrega. Pronalaskom tuberkulostatika, obaveznim cijepljenjem i porastom životnog standard danas se javlja znatno rjeđe. Lepra je kronična bolest koja zahvaća uglavnom kožu, periferne živce te sluznicu gornjeg dišnog sustava i usne šupljine, a uzrokuje ju bakterija *Mycobacterium leprae*. Učestala je u tropskom području, osobito u Srednjoj Africi i Aziji, dok se u Europi javlja rijetko (Lipozenčić, 2008).

Od ostalih bakterija na koži možemo naći anarobne predstavnike roda *Corynebacterium* te gram-negativne bacile (*E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*) koji se javljaju rjeđe i to uglavnom u području pazuha i na koži između nožnih prstiju (Baron, 1996).

Sažeti pregled najčešćih bakterijskih infekcija kože i njezinih uzročnika prikazan je Tablicom 1.

Bakterijske infekcije kože liječe se uglavnom sistemskom terapijom s različitim  $\beta$ -laktamima, makrolidima i klindamicinom. Prekomjerna dostupnost antibiotika i njihova neselektivna upotreba dovele su do pojave rezistencije. Blage, lokalizirane pioderme mogu se liječiti topikalnom primjenom mupirocina, dok se teži oblici liječe kloksacilinom i cefaleksinom. *S. aureus* pokazuje visoki stupanj otpornosti na  $\beta$ -laktamske antibiotike, a ponekad i na eritromicin, pa se u tom slučaju koriste klindamicin, kombinacija trimetoprima i sulfametoksazola. Kod teških bolničkih infekcija uzrokovanih meticilin-rezistentnim *S.*

*aureusom* (MRSA) upotrebljava se kombinacija vankomicina, rifampicina i aminoglikozida (Palit i Inamadara, 2010).

**Tablica 1.** Najčešće bakterijske kožne bolesti i njihovi uzročnici (Kansky i sur., 1984)

<u>Bolesti</u>	<u>Uzročnik</u>
Impetigo	Staphylococcus aureus, β-hemolitički streptokok grupe A
Morbus ritter	Staphylococcus aureus
Žvale	β-hemolitički streptokok grupe A
Folikularne pioderme	
Stafilokokni folikulitis	Staphylococcus aureus
Gram-negativni folikulitis	Klebsiella pneumoniae, E.coli, Proteus mirabilis
Propionibacterium acnes folikulitis	Propionibacterium acnes
Duboki folikulitis	
Furunkul	Staphylococcus aureus
Karbunkul	Staphylococcus aureus
Erizipel	β-hemolitički streptokok grupe A
Ektima	β-hemolitički streptokok grupe A
Erizipeloid	Erysipelothrix insidiosa
Eritrazma	Corynebacterium minutissimum
Antraks	Bacillus anthracis
Tularemija	Francisella tularensis
Tuberkuloza	Mycobacterium tuberculosis
Lepra	Mycobacterium leprae

### 1.2.1. Bakterijske infekcije rana i opekline

Opeklinae su ozljede kože, potkožja, sluznica i dubokih struktura, nastale štetnim djelovanjem patogene količine topline, kemikalija, elektriciteta ili zračenja na površinu tijela. Neposredno nakon ozljede opečena je površina sterilna. Kolonizacija mikroorganizmima i endogena infekcija rane nastupaju nakon 24-48 sati, a nakon toga slijedi infekcija egzogenim mikroorganizmima. Patološki slijed lokalne infekcije je bakterijemija, sepsa i višestruko otkazivanje organa (eng. *multi-organ failure*, MOF). Klinički znakovi infekcije su promjene u izgledu opekline, razvoj paralitičkog ileusa i promjene svijesti (Lončar i sur., 2005). Čak i kod malih opekline, infekcija je česti uzrok sepse i smrtnosti, kao i lokalnih komplikacija. Oštećeni obrambeni sustav domaćina i nekroza tkiva omogućuju invaziju i rast bakterija. Pregled uzročnika infekcije opekline i antibiotika za njihovo liječenje prikazan je u Tablici 2. U prvih nekoliko dana uzročnici su streptokoki i stafilokoki, a nakon 5-7 dana Gram-negativne bakterije (<http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik>).

**Tablica 2.** *Uzročnici bakterijskih infekcija opekline i liječenje (Lončar i sur., 2005)*

<b>NAJČEŠĆI UZROČNICI</b>	<b>ANTIBIOTIK</b>
<b>GRAM POZITIVNE BAKTERIJE</b> <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilin rezistentni <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) <i>Enterococcus faecalis</i>	Vankomicin Teikoplanin
<b>GRAM NEGATIVNE BAKTERIJE</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Acinetobacter baumani</i> <i>Klebsiella pneumonia</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	Karbapenemi Cefalosporini

Uzročnici infekcije rana su Gram-pozitivni koki *S. aureus*, *S. pyogenes* i Gram-negativni štapić *Pseudomonas aeruginosa*. Infekcija je uzrokovana miješovitom mikroflorom, do tri vrste, uz sinergističko djelovanje aeroba i anaeroba, pa se za liječenje koristi kombinirana terapija antibiotika. Ovisno o ozbiljnosti rane terapija uključuje široko spektralne peniciline uz inhibitore  $\beta$ -laktamaza, cefalosporine 1. i 3. generacije i karbapeneme uz pridruženi klindamicin i vankomicin (Kučišec-Tepeš i Antolić, 2014).

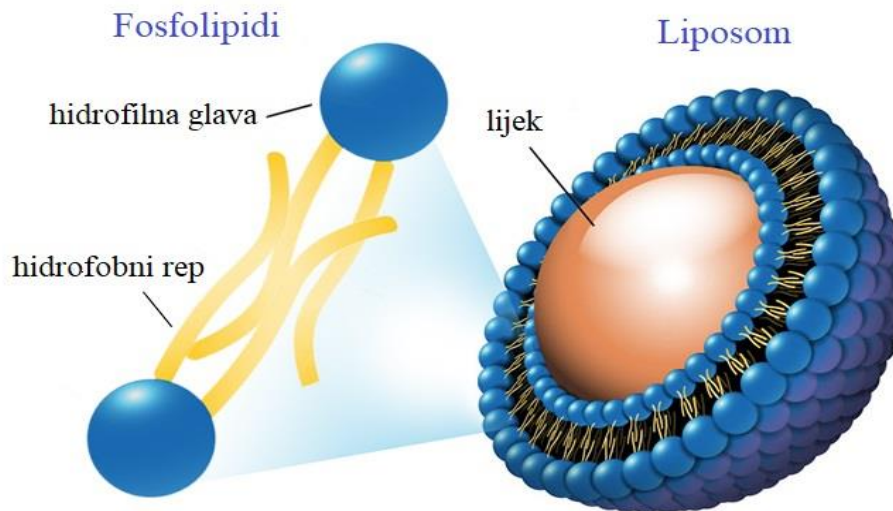
### **1.3. LIPOSOMI**

#### **1.3.1. Struktura i svojstva liposoma**

Liposomi su vezikule nanometarskih dimenzija građene od fosfolipidnih molekula koje u obliku dvosloja okružuju interni prostor ispunjen vodenom fazom (Pepić i sur., 2012).

Osnovna građevna jedinica liposoma su fosfolipidi, amfipatske molekule koje su s jedne strane esterificirane derivatom sfingozina ili glicerola, a s druge kolinom, etanolaminom, inozitolom ili glicerolom. Fosfolipidi se sastoje od hidrofilne, polarne „glave” te hidrofobnog, nepolarnog „repa” građenog od ugljikovodičnih lanaca. U ovojnici liposoma orijentiraju se tako da su hidrofobni nepolarni dijelovi usmjereni prema unutrašnjosti, a polarne glave prema vanjskoj strani sferične lamelarne strukture (Slika 2). Za pripremu liposoma najčešće se upotrebljava lecitin, smjesa fosfolipida s najvećim udjelom fosfatidilkolina koji u vodi poprima planarnu dvoslojnu strukturu da bi se izbjegle neželjene interakcije između vodene faze i hidrofobnih repova (Vanić, 2012a).

Osim fosfolipida ovojnica liposoma sadrži i kolesterol koji pospješuje karakteristike lipidnog dvosloja povećavajući njegovu mikroviskoznost i rigidnost, uz istodobno smanjivanje propusnosti membrane za molekule topljive u vodi (Banović i sur., 2011).



**Slika 2.** Građa liposoma (<http://www.integratedhealthblog.com/>)

Fosfolipidne molekule ovisno o temperaturi postoje u različitim fazama: visokoorganiziranoj, čvrstoj ili gel fazi i fazi tekućih kristala. Temperatura na kojoj se odvija prijelaz gel faze u fazu tekućih kristala zove se temperatura faznog prijelaza ( $T_c$ ), a ovisi o duljini i stupnju zasićenosti lanaca masnih kiselina u fosfolipidima. Povećanjem duljine lanaca masnih kiselina te stupnja njihove zasićenosti raste i temperatura faznog prijelaza. Kolesterol u malim količinama nema utjecaja, ali ako je njegov udio u membrane 50 mol % može prekriti  $T_c$ . Važna je i fluidnost ili rigidnost koja utječe na permeabilnost, fuziju, agregaciju i vezanje liposoma za proteine plazme, a time i na stabilnost samih liposoma te njihovo ponašanje u biološkim sustavima. Što je  $T_c$  niža, fluidnost membrane je viša i ona je permeabilnija, čime je stabilnost liposoma smanjena (Vanić, 2012a).

Ako je u liposomu prisutna ljekovita (djelatna) tvar, ona je ovisno o polarnosti smještena u vodenoj fazi ili u nepolarnom dijelu ovojnice, a ugrađuje se bez kemijskog vezanja na liposome ili prethodne modifikacije. Uspješnost uklapanja lijeka varira i o fizičko-kemijskim svojstvima lijeka pa se tako lipofilni lijekovi jako dobro uklapaju, a hidrofilni slabo. Upravo ta sposobnost zaštite lijeka unutar liposoma te sličnost s biološkim membranama omogućili su da se liposomi danas koriste kao nosači djelatnih tvari u različitim terapijskim područjima. Najčešće se primjenjuju intravenski, ali moguća je i intraarterijska,

supkutana, intramuskularna, oralna, rektalna, vaginalna te topikalna primjena. Liposome iz krvotoka uklanjaju stanice retikuloendotelnog sustava i to procesom fagocitoze (Jalšenjak, 1998).

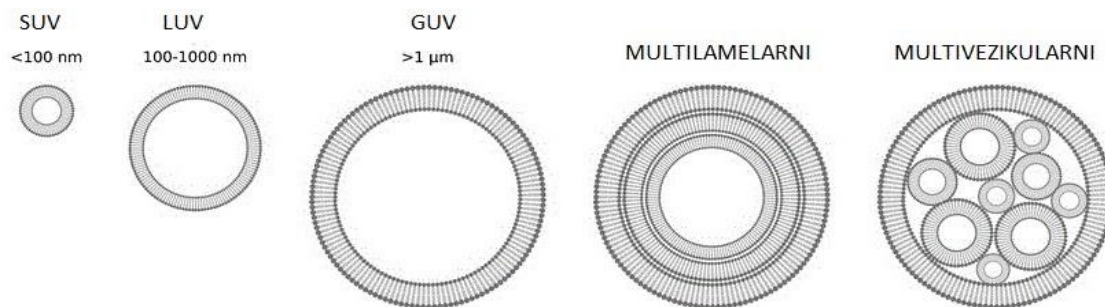
U kliničkim studijama liposomi pokazuju poboljšanu farmakokinetiku i biodistribuciju, pa time i minimalnu toksičnost u ciljnom tkivu, što im omogućuje primjenu kod infektivnih oboljenja, u hormonskoj terapiji, onkologiji, genskoj terapiji te dijagnostici (Chang i Yeh, 2012). Ugradnjom lijeka u liposome smanjuje se metabolizam i inaktivacija labilnih lijekova u plazmi ili tkivima, produljuje se vrijeme polueliminacije smanjenjem klirensa (uklanjanje lijeka iz krvi), a smanjuje distribucija lijeka u zdravo tkivo (Ait-Oudhia i sur., 2014).

Glavne prednosti liposoma su njihova neimunogenost, biorazgradljivost i fiziološka prihvatljivost, a nedostatak njihova fizička i kemijska nestabilnost. Fizičku stabilnost moguće je povećati oblaganjem liposoma polietilenglikolom. Glavni uzroci kemijske nestabilnosti su mogućnost okidacije i hidrolize fosfolipida. Dodatak antioksidansa sprječava oksidaciju fosfolipida, a održavanjem pH u području 6-7 sprječava se hidroliza (Pepić i sur., 2012).

### **1.3.2. Klasifikacija liposoma**

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

Prema veličini i broju fosfolipidnih dvoslojeva razlikuju se unilamelarni, multilamelarni, oligolamelarni i multivezikularni liposomi (Slika 3). Unilamelarni sadrže samo jednu fosfolipidnu ovojnica, a prema veličini se dijele na: male (eng. *small unilamellar vesicles*, SUV), srednje velike (eng. *medium sized unilamellar vesicles*, MUV), velike (eng. *large unilamellar vesicles*, LUV) i veoma velike unilamelarne liposome (eng. *giant unilamellar vesicles*, GUV). Multilamelarne liposome (eng. *multilamellar vesicles*, MLV) karakterizira veliki broj koncentričnih fosfolipidnih dvoslojeva, dok oligomerni (eng. *oligolamellar vesicles*, OLV) sadrže nekoliko koncentričnih fosfolipidnih dvoslojeva između kojih su vodeni prostori. Multivezikularni liposomi (eng. *multivesicular liposomes*, MLV) građeni su od nekoncentrično položenih fosfolipidnih dvoslojeva pri čemu formiraju strukture nalik na pjenu (Vanić, 2012a).



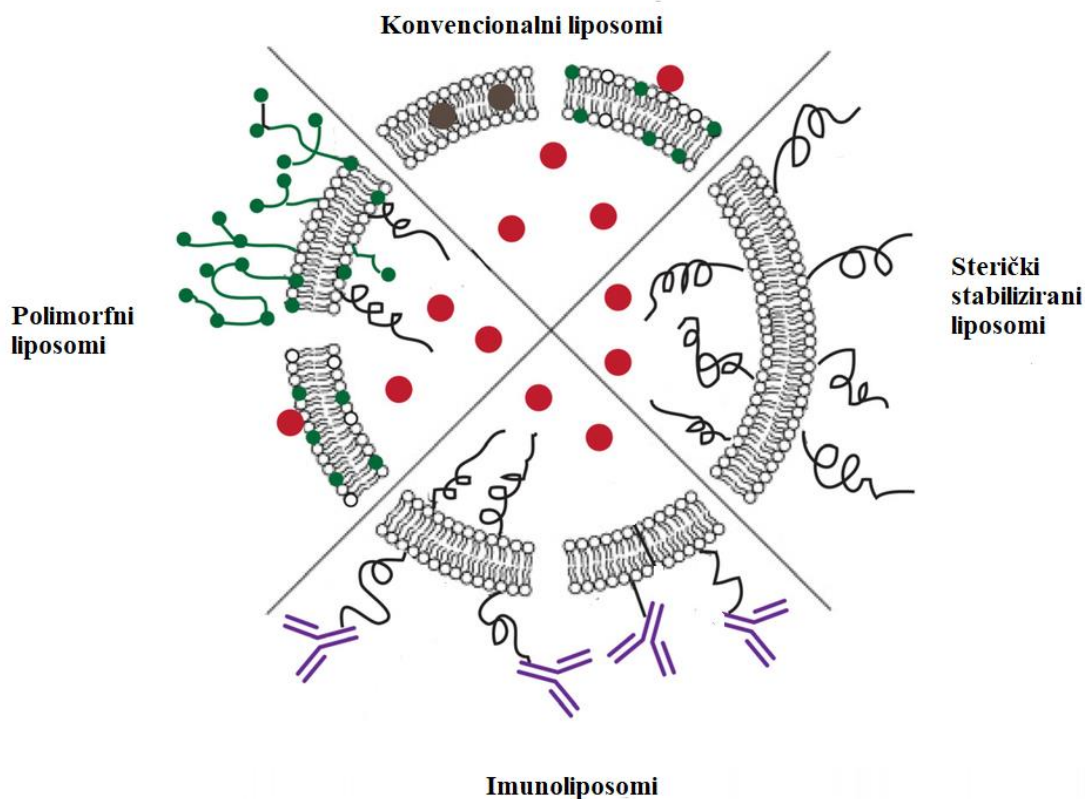
**Slika 3.** Podjela liposoma prema veličini i broju fosfolipidnih dvoslojeva  
(<http://pubs.rsc.org/>)

Fizikalno-kemijska svojstva liposoma, odnosno lipidni sastav utječe na farmakokinetičke parametre uklopljenog lijeka kao što su vrijeme polueliminacije, biodistribucija, propusnost membrane i brzina oslobađanja lijeka. Biodistribucija se isto tako može mijenjati modifikacijom vanjske površine liposoma. S obzirom na površinska svojstva liposomi se mogu podijeliti u skupine konvencionalnih, sterički stabiliziranih, polimorfnih liposoma i imunoliposoma (Ait-Oudhia i sur., 2014).

Konvencionalni liposomi su građeni od fosfolipida s negativnim ili neutralnim nabojem na površini, a karakterizira ih nespecifična reaktivnost prema okruženju u kojem se nalaze. Kratkotrajno se zadržavaju u cirkulaciji i većinom se koriste kao nosači lijekova u terapijskim sustavima za lokalnu primjenu. Sterički stabilizirani liposomi imaju za fosfolipidnu membranu vezane hidrofilne polimere (najčešće polietilenglikol) zbog čega ih teže prepoznaju makrofagi i stanice retikuloendotelnog sustava. U odnosu na konvencionalne, sterički stabilizirani liposomi su inertni u okruženju u kojem se nalaze i dugo se zadržavaju u cirkulaciji što je preduvjet za isporuku lijeka na željeno mjesto djelovanja (Vanić, 2012a). Imunoliposomi su zapravo konvencionalni ili sterički stabilizirani liposomi koji na ovojnici imaju vezana specifična antitijela koja prepoznaju odgovarajuće stanice što im omogućuje vezanje za ciljane/specifične antigene na stanicama. Najčešće se koriste IgG imunoglobulini i njihovi fragmenti (Agarwal i sur, 2014).

Polimorfni liposomi su novija generacija liposoma kod kojih je iskorišteno svojstvo lipidnog polimorfizma, pa tako različiti podražaji iz okoline u kojoj se liposomi nalaze, uzrokuju promjene molekuskog oblika fosfolipida tj. destabilizaciju ovojnice i oslobađanje lijeka na željenom mjestu djelovanja. Dije se na pH-osjetljive, temperaturno osjetljive i kationske liposome (Vanić, 2012a).

pH-osjetljivi liposomi kod pada pH u endosomima stanica podliježu agregaciji, fuziji i destabilizaciji, te oslobađaju uklopljeni sadržaj u citoplazmu prije kontakta endosoma s lizosomom. Temperaturno osjetljivi liposomi oslobađaju sadržaj kod porasta temperature, dok kationski liposomi u interakciji s nukleinskim kiselinama mijenjaju svoju strukturu i nastaju lipid-DNA kompleksi koji fuzijom s plazmatskom membranom ulaze u stanicu (Vanić, 2012a).

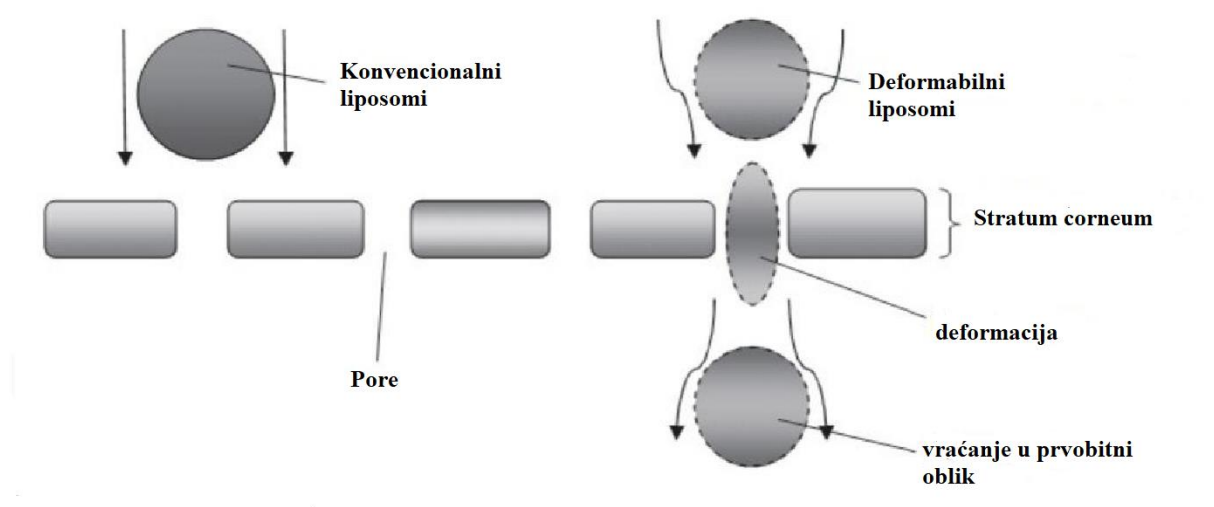


**Slika 4.** Klasifikacija liposoma prema strukturnim svojstvima i načinu oslobađanja uklopljenog sadržaja (Ait-Oudhia i sur., 2014)

### 1.3.3. Deformabilni liposomi

Deformabilni ili elastični liposomi su fosfolipidne vezikule koje su karakterizirane prisutnošću rubnog aktivatora u fosfolipidnom dvosloju. Rubni aktivator je jednolančani surfaktant koji se interkalira u fosfolipidni dvosloj čime se smanjuje stabilnost dvosloja liposoma i narušava njegova čvrstoća, a povećava deformabilnost (elastičnost) ovojnice. Upravo zbog takve elastične stukture i narušene strukture membrane ovi liposomi imaju sposobnost prolaska kroz pore manje od njihovog promjera. Kao rubni aktivatori koriste se površinski aktivne tvari poput natrijevog kolata, natrijevog deoksikolata, Span 60, Span 80 i Tween 80 (Hussain i sur., 2017).

Deformabilni liposomi omogućuju isporuku veće količine lijeka dublje u kožu od konvencionalnih liposoma, a željena se elastičnost ovojnice postiže mijenjanjem omjera fosfolipida i surfaktanta. Ako je količina rubnog aktivatora premala vezikule su krute, dok u prevelikoj količini dolazi do transformacije lipidnih vezikula u micelle (Banović i sur., 2011). Budući da su deformabilni liposomi građeni od hidrofilnih i hidrofobnih dijelova mogu primiti molekule lijeka sa širokim rasponom topljivosti, a uz to su i biokompatibilni i biorazgradivi. Također štite uklopljeni lijek od nepovoljnih utjecaja iz okruženja u kojem se nalaze, djeluju kao depo i mogu usporiti oslobađanje lijeka, pa su upravo zbog toga često korišteni kao nosači za proteine, citostatike, antifungalne lijekove, inzulin, analgetike, antibiotike, kortikosteroide itd. Glavni nedostatak im je sklonost oksidaciji i visoka cijena (Rajan, 2011; Dastagiri Reddy, 2015; Ferreira i sur., 2015).



**Slika 5.** Prolazak deformabilnih liposoma u kožu (Premchandani, 2015)



#### 1.4. METODE PRIPRAVE LIPOSOMA

Metode pripreme liposoma su mnogobrojne, a njihov odabir ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima lijeka, ciljanoj veličini i tipu liposoma, te ekonomskim parametrima, budući da su određene metode tehnološki izrazito zahtjevne što u konačnosti značajno podiže cijenu gotove liposomske formulacije (Bozzuto i sur., 2015). Odabirom odgovarajuće metode moguće je pripremiti liposome određene veličine, lamelarnosti i sadržaja uklopljenog lijeka. Važno je voditi računa i o vrsti fosfolipida te organskim otapalima za otapanje lipidnih komponenti. Optimalna metoda bila bi ona koja je jednostavna i reproducibilna, omogućuje pripremu liposoma visoke uspješnosti uklapanja lijeka, a da je pritom izbjegnuta upotreba štetnih organskih otapala.

Odabir fosfolipida ovisi o putu primjene liposoma. Najčešće se za liposome namijenjene topikalnoj primjeni koriste nezasićeni fosfolipidi: fosfatidilkolin (lecitin) iz soje i žumanjka jajeta, te zasićeni hidrogenirani fosfolipidi, dok se sintetski fosfolipidi visoke  $T_c$  koriste u izradi liposoma namijenjenih parenteraloj primjeni. Ako se želi postići negativan naboj na površini dodaju se negativno nabijeni lipidi (5-10%) poput fosfatidilglicerola u fosfolipidni dvosloj liposoma. Pozitivan naboj na površini liposoma postiže se dodatkom kationskih lipida, npr. stearilamina, dok se čvrstoća dvoslojeva povećava dodatkom kolesterola (Vanić, 2012b).

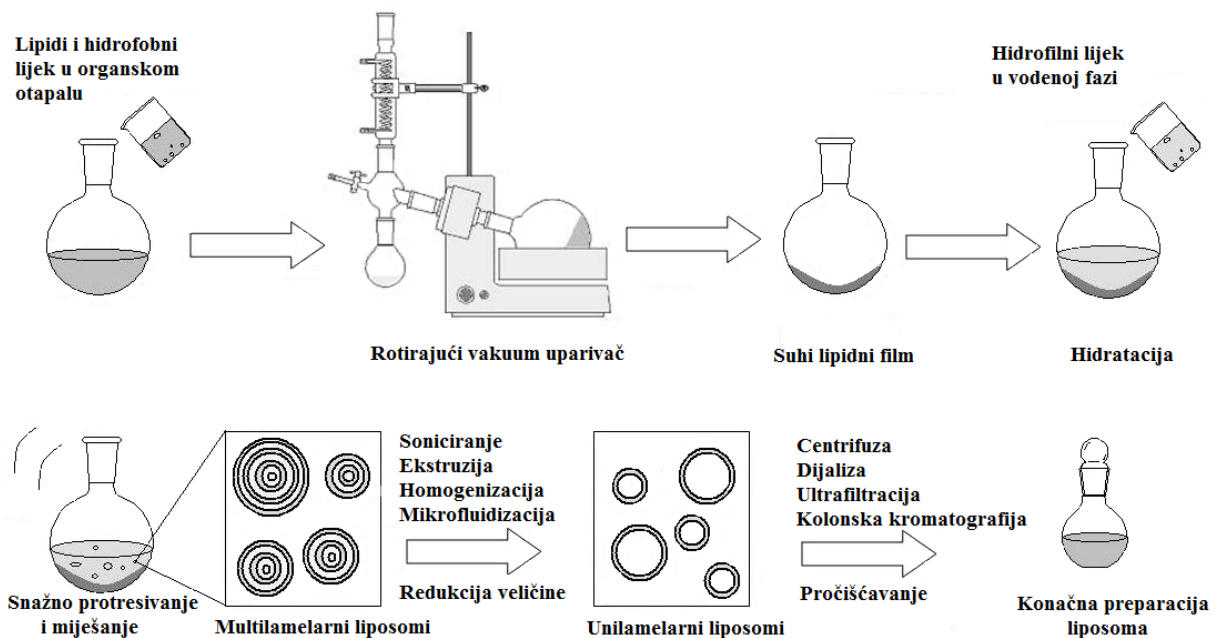
Metode pripreme liposoma uključuju tri do četiri osnovne faze: uklanjanje organskog otapala u kojem su otopljeni fosfolipidi, dispergiranje fosfolipida u vodenom mediju, homogenizaciju nastale suspenzije te analizu konačnog produkta. S obzirom na način dispergiranja fosfolipida razlikujemo postupke fizičkog dispergiranja, dvofaznog dispergiranja i solubilizacije pomoću detergensa (Vanić, 2012b).

U ovom radu liposomi su pripremljeni metodom hidratacije fosfolipidnog sloja, tzv. film metodom koja se ubraja u metode pripreme liposoma fizičkim dispergiranjem fosfolipida.

### 1.4.1. Metoda hidratacije suhog fosfolipidnog sloja (tzv. film metoda)

Film metoda najčešći je postupak pripreme liposoma u laboratorijskim uvjetima, a uključuje otapanje lipida u organskom otapalu, uparavanje otapala i dispergiranje dobivenog lipidnog filma u vodenom mediju pri čemu dolazi do spontanog formiranja velikih multilamelarnih liposoma (Bozzuto i sur., 2015). Ako se za pripremu upotrebljavaju samo neutralni fosfolipidi dobivaju se liposomi s gusto pakiranim dvoslojevima i s vrlo malim vodenim odjeljcima, dok se dodatkom negativno nabijenih fosfolipida povećavaju vodeni odjeljci što je bitno za uklapanje hidrofilnih lijekova. Budući da su pripremljeni MLV-i poprilično veliki, heterogeni i imaju visok indeks polidisperznosti potrebna je daljnja obrada (homogenizacija).

Homogenizacija se provodi ekstruzijom kroz polikarbonske membrane određenih veličina pora ili soniciranjem pomoću ultrazvučne sonde pri čemu nastaju homogene preparacije oligolamelarnih i unilamelarnih liposoma. U tom procesu može doći i do gubitka početno uklopljenog hidrofilnog lijeka (Vanić, 2012b).



Slika 6. Shematski prikaz pripreme liposoma film metodom (Lopes i sur., 2013)

### 1.4.2. Soniciranje

Soniciranjem suspenzija multilamelarnih liposoma mogu se pripremiti unilamelarni ili oligolamelarni liposomi. Postupak se provodi u ultrazvučnoj kupelji ili primjenom ultrazvučne sonde. Tijekom procesa može doći do razgradnje fosfolipida zbog visoke energije u sustavu i mogućnosti pregrijavanja, pa se postupak provodi u posudi s ledom. Pri soniciranju dolazi do otpuštanja čestica titana iz sonde i potrebno ih je ukloniti naknadnim centrifugiranjem uzorka. Za pripravke manjih koncentracija fosfolipida preporuča se upotreba ultrazvučnih kupelji čime je izbjegnuto otpuštanje titana u pripravak, a zbog mogućnosti termostatiranja izbjegnuto je i pregrijavanje uzorka. Nedostatak je što se zbog manje snage valova nego u sustavima sa sondom ne mogu dobiti homogene disperzije SUV-a (Vanić, 2012b).

### 1.5. LIPOSOMI ZA (TRANS)DERMALNU PRIMJENU LIJEKOVA

Lijekovi koji se primjenjuju na koži dijele se u dvije skupine – na lijekove koji ostvaruju lokalni učinak i na one kojima se postiže sistemski učinak. Lokalni učinak podrazumijeva djelovanje na površini kože tj. u *stratum corneumu*, epidermisu i dermisu. (Ueda i sur., 2009). Voda i u vodi topljive tvari teško prodiru u kožu, dok tvari topljive u lipidima lakše. Najlakše penetriraju male amfipatske molekule i plinovi te organska otapala poput kloroforma, etera i etanola (Čajkovac, 2005).

Transdermalna primjena podrazumijeva apsorpciju lijekova kroz kožu i postizanje učinka na mjestu udaljenom od mjesta primjene. Ovakva primjena lijekova ima brojne prednosti pred oralnim putem primjene: na nju ne utječe različit pH, prisutnost hrane ni motilitet crijeva, izbjegnuto je prvi prolazak kroz jetru, a time i metabolička razgradnja. Primjena je jednostavna i prihvatljiva pacijentu, a oslobađanje lijeka kontinuirano i kontrolirano. Nedostatak transdermalne primjene je slaba permeabilnost većine lijekova kroz rožnati sloj kože, pa se zbog toga istražuju novi pristupi dostave lijekova, nanonosaci poput liposoma koji zbog svojih svojstava i sastava olakšavaju transport uklopljenih djelatnih tvari. Terapijski učinak liposomskih pripravaka ovisi o interakciji liposoma sa stanicama kože, fosfolipidnom sastavu i termodinamičkom stanju dvosloja, metodi pripreme vezikula te udjelu kolesterola. Bolji unos lijeka postignut je korištenjem lipida kože i smanjenjem udjela kolesterola u fosfolipidnom dvosloju, čime je povećana njegova fluidnost (Banović i sur., 2011).

Učinkovitost (trans)dermalne primjene lijeka ovisi o odabiru odgovarajućeg lijeka, ali i svojstvima nosača. Liposomi utječu na farmakokinetička svojstva uklopljenog lijeka kontroliranjem njegovog oslobađanja, utječu na penetraciju kroz rožnati sloj i permeaciju u kožu, pa je tako konačan terapijski učinak rezultat interakcija između kože, liposoma i lijeka (Palac i sur., 2014).

Konvencionalni liposomi nisu se pokazali dobrim nosačima lijekova za transdermalnu primjenu jer ne prodiru u dublje slojeve kože, već se zadržavaju u rožnatom sloju. Deformabilni liposomi prodiru u dublje slojeve kože pri čemu je učinak bio sličan onome postignutom supkutanom primjenom lijekova. Zanimljivo je spomenuti da se istražuje mogućnost njihove transdermalne primjene u genskoj terapiji i imunizaciji (Banović i sur., 2011).

## **1.6. IN VITRO ISPITIVANJE OSLOBAĐANJA LIJEKA PRIMJENOM FRANZ-DIFUZIJSKE ČELIJE**

*In vitro* ispitivanje oslobađanja lijeka jedno je od temeljnih ispitivanja koje se provodi u razvoju novih formulacija i kontroli kvalitete postojećih farmaceutskih oblika (Shiow-Fern i sur., 2010). Ispitivanje se najčešće provodi korištenjem Franz-difuzijske ćelije (Slika 7) koja se sastoji od receptorskog i donorskog odjeljka između kojih je polupropusna membrana. Ispitivani uzorak nanosi se na inertnu, polupropusnu membranu, koja odvaja uzorak od receptorskog medija. Ispitivana tvar mora biti dobro topljiva u receptorskom mediju, a sve ostale sastavnice netopljive. Tijekom postavljanja membrane treba paziti da membrana dobro prijanja uz receptorski medij kako se ne bi pojavili mjehurići zraka na donjoj strani membrane koji sprječavaju kontakt s receptorskim medijem. Najčešće se koriste sintetičke membrane od miješanih estera celuloznog acetata i nitrata te one od polisulfona i politetrafluoretilena. U određenim vremenskim razmacima od postavljanja ispitivanog uzorka u donorski odjeljak uzimaju se uzorci receptorskog medija, te se neposredno nakon uzorkovanja receptorski odjeljak nadopunjuje ekvivalentnim volumenom svježeg termostatiranog receptorskog medija. Receptorski medij mora imati fiziološki pH te temperaturu 34-37 °C, kako bi se na površini membrani postigla temperatura od  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  koja odgovara temperaturi površine kože. Na taj se način oponašaju *in vivo* uvjeti. Receptorski medij za lipofilne lijekove je obično vodeni medij (pufer) uz dodatak tvari za povećanje topljivosti (npr. etanola, surfaktanata), dok se za hidrofilne lijekove koriste samo puferi. Ova se metoda koristi za ispitivanje oslobađanja djelatne

tvori iz formulacija namijenjenih primjeni na kožu, ali i ostalim putevima primjene (vaginalna, rektalna, bukalna, nazalna itd.) (Kanfer i sur., 2017).



**Slika 7.** Franz difuzijska ćelija (<http://www.particlesciences.com>)

### 1.6.1. Određivanje koncentracije lijeka u uzorku

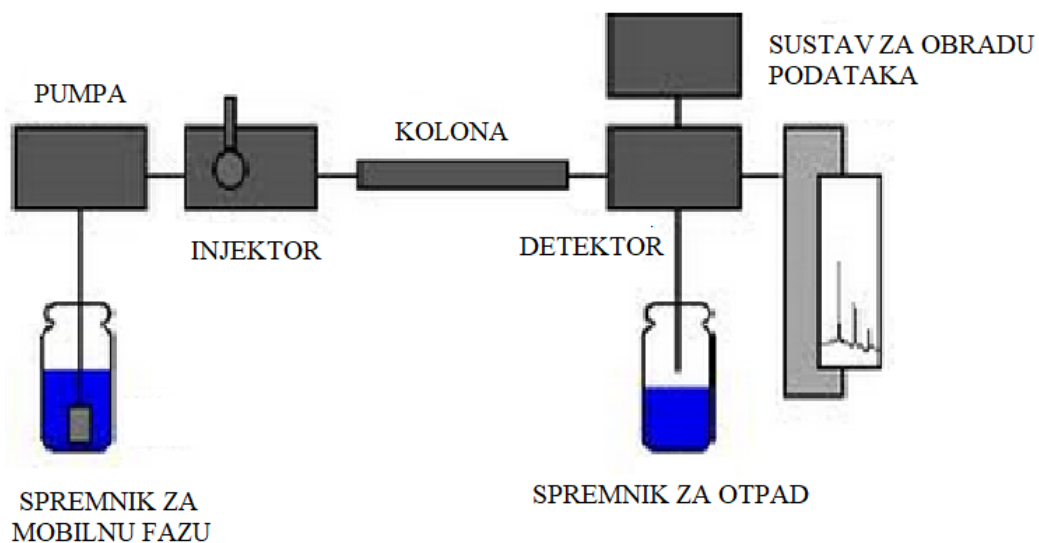
Nakon završetka ispitivanja oslobađanja lijeka potrebno je kvantitativno odrediti količinu lijeka prisutnog u sakupljenim uzorcima. Najčešće metode za kvantifikaciju lijeka su UV/Vis spektrofotometrija i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC, *high performance liquid chromatography*). Zavisno od djelatne tvari koja se određuje mogu se koristiti imunološke i spektrofluorimetrijske metode.

Kromatografija je fizikalna metoda separacije u kojoj se sastavnice raspodjeljuju između dviju faza, pokretne i nepokretne. Uključuje adsorpciju supstancija na nepokretnu fazu, odjeljivanje protokom pokretne faze, sakupljanje odvojenih supstancija te kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Kromatografija se temelji na pojavama adsorpcije, razdjeljenja, ionske izmjene i isključenja koje omogućuju odjeljivanje sastojaka u smjesi.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je visoko efikasna razdjelna kromatografija koja se koristi za razdvajanje komponenti iz smjese na osnovi kemijskih interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze u stupcu (Luterotti, 2011).

HPLC uređaj (Slika 8) sastoji se od rezervoara za otapala pokretne faze, sustava za obradu otapala koji uklanja otopljene plinove, komore za miješanje otapala, crpke, sustava za unošenje uzorka, predkolone koja služi kao zaštita od onečišćenja u uzorku, kolone za odjeljivanje i detektora koji daje analitički zapis. Najvažniji dijelovi su kolona i detektor. Kolona je cijev izrađena od nehrđajućeg čelika punjena česticama stacionarne faze. Korištenje ispravne duljine kolone i vrste stacionarne faze u kombinaciji s odgovarajućom mobilnom

fazom omogućuje učinkovito razdvajanje sastavnica uzoraka. Idealni detektor osjetljiv je na niske koncentracije nekog analita, osigurava linearan odgovor, ne uzrokuje širenje pikova, nije osjetljiv na promjenu temperature i sastav mobilne faze. Najčešće se koriste UV/Vis detektor, detektor indeksa loma, fluorescencijski i maseni detektor. Vrlo su dobri i detektori s diodnim nizom (HPLC-DAD sustavi) koji omogućuju snimanje cijelog UV spektra svakog pika u kromatogramu (Luterotti, 2011; Kupiec, 2004).



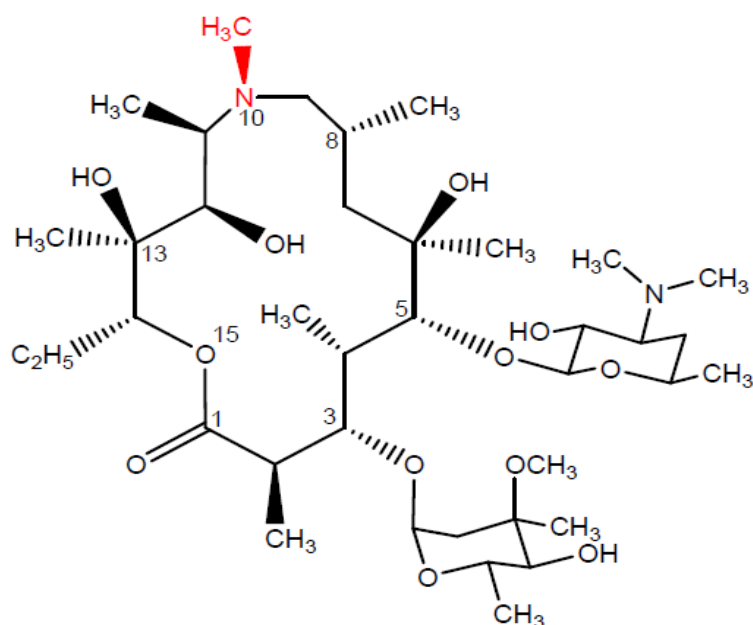
**Slika 8.** Shematski prikaz HPLC instrumenta

(<https://www.pharmaguideline.com/2013/07/principle-of-hplc-liquid-chromatography.html>)

HPLC je točna i precizna metoda koja se koristi za kvantitativnu analizu farmaceutskih tvari i gotovih proizvoda, praćenje stabilnosti čistih ljekovitih tvari i dozirnih oblika, odjeljivanje i određivanje polarnih i nepolarnih spojeva, lipida, steroida, šećera i lipofilnih vitamina. Važna je i primjena HPLC-a u ispitivanjima hrane, zraka i otpadnih tekućina na prisutstvo štetnih supstancija npr. pesticida (Luterotti, 2011).

## 1.7. AZITROMICIN

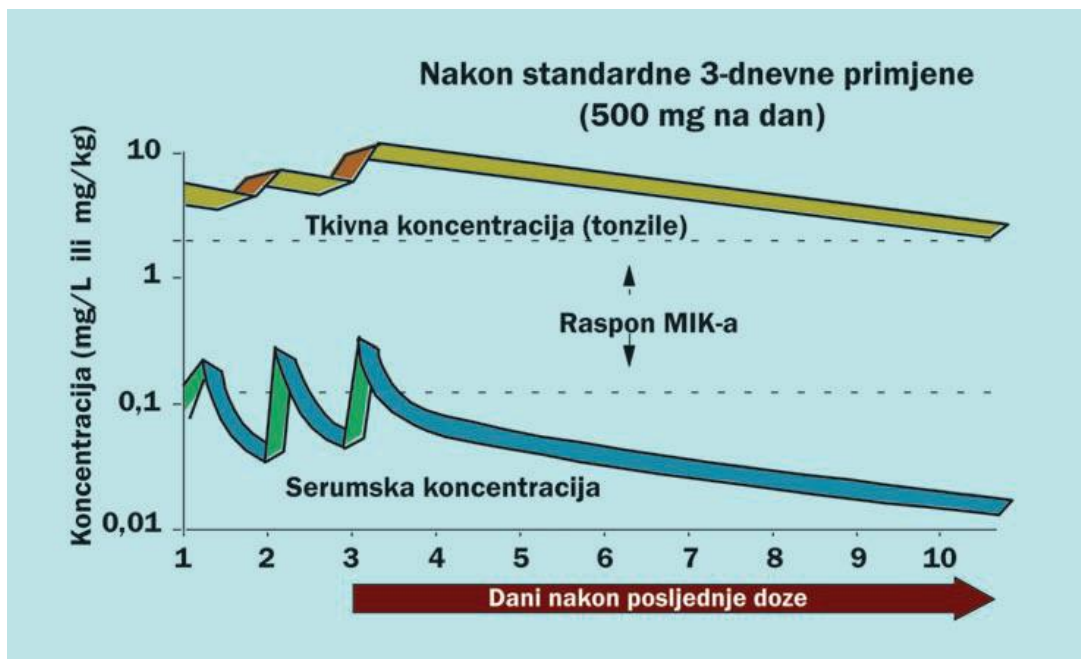
Azitromicin je polusintetski makrolidni antibiotik iz skupine azalida. Bijeli je amorfni prah, gorkog okusa i bez mirisa, slabo topljiv u vodi . Nastao je transformacijom eritromicina A uvođenjem dušika u 14-eročlani prsten te naknadnom metilacijom uvedenog dušika. Kemijsko ime azitromicina je 9-deoksi-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A, a molekulska masa 749,0. Mehanizam djelovanja temelji se na supresiji sinteze bakterijskih proteina vezanjem na 50S podjedinicu ribosoma i inhibiciji translokacije peptida. Azitromicin se veže na isti receptor kao i eritromicin, ali s većim afinitetom vezanja (Zorc i Butula, 1995).



**Slika 9.** *Struktura azitromicina* (<http://www.pharmacy-and-drugs.com/reviews/Azithromycin.html>)

Farmakokinetiku azitromicina karakterizira niska koncentracija u plazmi, a visoka i trajna koncentracija u tkivima. Apsorpcija iz gastrointestinalnog trakta nakon peroralne primjene je brza, ali nepotpuna, pa bioživost iznosi 35-52%. Maksimalna koncentracija u plazmi postiže se za oko 2 sata nakon peroralne primjene. Hrana ne utječe na sveukupnu apsorpciju azitromicina, no istovremeno uzimanje hrane i lijeka povisuje vršnu koncentraciju i do 40%. Azitromicin se raspodjeljuje u gotovo sva tkiva i tjelesne tekućine, a zbog bazičnosti nakuplja se intracelularno, u kiselom mediju lizosoma. Kako raste kiselost pojedinih staničnih prostora tako je koncentracija azitromicina viša te dolazi do „ion trapping“ fenomena s konačno najvišom koncentracijom u lizosomima (Francetić, 2008).

Za klinički učinak najvažnija je koncentracija u fagocitima uključujući polimorfonukleare, monocite, makrofage i fibroblaste. Pri kontaktu fagocita i uzročnika infekcije dolazi do ubrzanog otpuštanja azitromicina iz fagocita, dok fibroblasti služe kao rezervoar iz kojeg se aziromicin otpušta postupno i transportira fagocitima na mjesto upale. Kao posljedica brze tkivne raspodjele i intracelularne kumulacije, koncentracija u pojedinim tkivima je 10-100 puta viša nego u plazmi (Slika 10). Za razliku od makrolida, azitromicin ne inhibira niti stimulira citokrom P-450 i ne stupa u ineteracije s lijekovima koji se metaboliziraju pomoću citokroma. Poznato je 10 metabolita koji nastaju N-demetilacijom, O-demetilacijom i hidrolizom azitromicina, ali niti jedan od njih nema antibakterijski učinak. Azitromicin se metabolizira uglavnom nepromijenjen stolicom, a tek 10% mokraćom što omogućuje primjenu i kod renalne insuficijencije (Francetić, 2008).



**Slika 10.** Serumske i tkivne koncentracije azitromicina nakon trodnevne primjene (Francetić, 2008)

Azitromicin je indiciran za liječenje infekcija gornjeg dišnog sustava (faringitis i sinusitis), infekcije donjih dišnih puteva (akutni, kronični bronhitis i izvanbolnički stečena pneumonija) te infekcija kože i potkožnih tkiva (erizipel, impetigo, pioderme). Koristi se i kod spolno prenosivih bolesti uzrokovanih *Chlamydom trachomatis*, uropatogenim mikoplazmama i *N. gonorrhoeae* (jednokratna doza od 1g) te kod ulkusne bolesti i atipičnih mikobakterioza u HIV-pozitivnih bolesnika.



Azitromicin se vrlo sporo eliminira iz organizma ( $t_{1/2}=70$  h) zbog čega je primjena skraćena na 3 dana po 500 mg/dan, a pritom se postiže terapijski učinak kao kod primjene penicilina tijekom 10 dana ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr); Francetić, 2015).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Azitromicin je na hrvatskom tržištu dostupan u ljekovitim oblicima za oralnu (filmom obložene tablete, kapsule i prašak za oralnu suspenziju), intravensku (koncentrat za otopinu za infuziju) i oftalmičku primjenu (kapi za oko) (Francetić i sur., 2015), dok registrirani oblik za lokalnu primjenu na kožu za sada ne postoji.

Cilj ovog rada bio je pripremiti polučvrsti topikalni pripravak azitromicina namijenjen lokalnoj primjeni baziran na korištenju liposoma i kitozanskog gela. Azitromicin je uklopljen u deformabilne i konvencionalne liposome pripremljene film metodom koji su potom umiješavani u kitozanski gel. Provedena je karakterizacija liposoma bazirana na mjerenju srednjeg promjera liposoma, indeksa polidisperznosti i zeta potencijala. *In vitro* oslobađanje lijeka iz liposomskih gelova i kontrolnog gela (otopina azitromicina u kitozanskom gelu) ispitano je primjenom Franz-difuzijske ćelije.

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

### 3.1. MATERIJALI

#### Instrumenti i pribor:

- \* celuloza-acetatne membrane 0,2  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- \* ekstruder (LiposoFast, Avestin, Kanada)
- \* filteri veličine pora 0,22  $\mu\text{m}$  (Minisart, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Njemačka)
- \* filteri veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  (Minisart, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Njemačka)
- \* Franz difuzijska ćelija (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- \* HPLC instrument (Shimadzu LC-10AD, Kyoto, Japan)
- \* kolona za HPLC (Kinetex, Phenomenex, SAD)
- \* optički mikroskop (Olympus BH2, Olympus optical Co. Ltd, Tokio, Japan)
- \* polikarbonatne membrane veličine pora 400 nm i 100 nm (LiposoFast, Avestin, Kanada)
- \* pH metar (Mettler-Toledo, Greifensee, Švicarska)
- \* rotirajući vakuum uparivač (Büchi Rotavapor R-200, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švicarska)
- \* ultracentrifuga (Beckman Optima LE-80K Ultracentrifuge, Beckman Coulter Inc., Fullerton, SAD)
- \* Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija)

#### Kemikalije:

- \* acetonitril (Avantor Performance Materials B.V., Deventer, Nizozemska)
- \* apsolutni etanol i metanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- \* azitromicin (PLIVA Hrvatska Ltd., Zagreb, Hrvatska)
- \* fosfatni puffer 0,01 M, pH 7,5
- \* glicerol (T.T.T.d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- \* kitozan, *high molecular weight*, HMW (Fluka, SAD)
- \* ledena octena kiselina (Alkaloid, Skopje)

- \* LIPOID S 75, sojin lecitin sa 75% fosfatidilkolina (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Njemačka)
- \* natrijev deoksikolat (Sigma-Aldrich Company, St. Louis, MO)
- \* trietanolamin 50% (w/w) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- \* 10 mM otopina NaCl

Fosfatni pufer (0,01 M) pripremljen je otapanjem 1,3609 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska) u destiliranoj vodi, u tikvici od 1000 ml. pH otopine podešen je na 7,5 pažljivom titracijom s 10M KOH (Kemika, Zagreb, Hrvatska).

Octena kiselina koncentracije 2,5% pripremljena je miješanjem 12,5 ml ledene octene kiseline s destiliranom vodom u tikvici od 500 ml.

Otopina NaCl (10 mM), pripremljena otapanjem 0,5844 g NaCl u 1000 ml demineralizirane vode.

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Priprava kitozanskog hidrogela

Kitozanski hidrogel je pripremljen dispergiranjem 0,15 g kitozana visoke molekulske mase (*high molecular weight*, HMW) u 4,425 g 2,5% octene kiseline uz neprestano miješanje staklenim štapićem kako bi se pospješilo otapanje kitozana te je dodano 4,425 g demineralizirane vode i 1 g glicerola. Konačna koncentracija kitozana u gelu iznosila je 1,5%. Nakon dodatka svih sastojaka gel je 30 min soniciran, a zatim još 30 min degaziran u ultrazvučnoj kupelji te ostavljen poklopljen parafilmom na sobnoj temperaturi tijekom 20 sati kako bi u potpunosti izbubrio. Idućeg dana podešen je pH gela na 5,5-6 dodatkom trietanolamina uz intenzivno miješanje.

### 3.2.2. Priprava liposoma

Konvencionalni i deformabilni liposomi pripremljeni su metodom hidratacije suhog fosfolipidnog sloja tzv. film metodom. Odgovarajuće mase lipida i azitromicina (Tablica 3) odvagane su u tikvicu s okruglim dnom te je dodan koncentrirani etanol u količini potrebnoj da se krutine potpuno otope (3-4 ml). Tikvica je priključena na rotirajući vakuum uparivač, čija je vodena kupelj termostatorana na 40 °C te je postepenim sniženjem tlaka uklonjeno otapalo (etanol) pri čemu je nastao tanki, suhi fosfolipidni film. Hidratacija je provedena

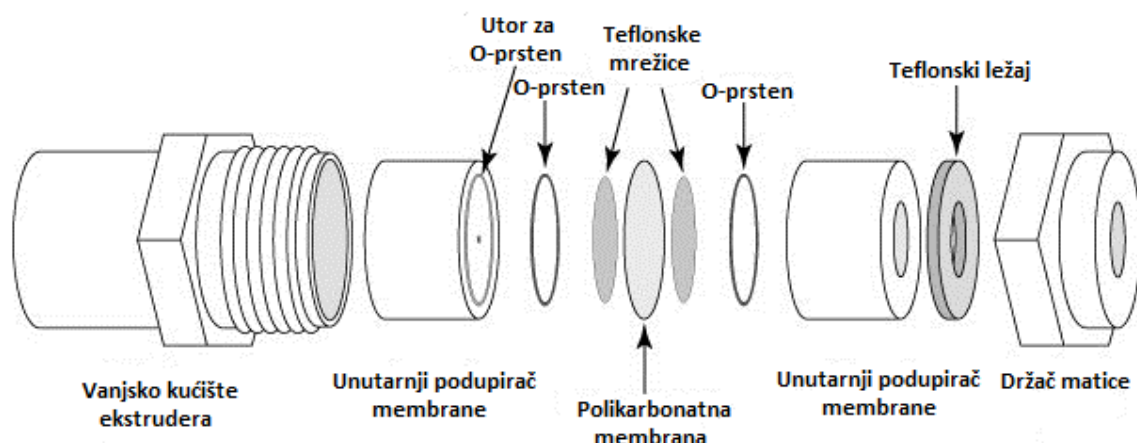
dodatkom 5 ml fosfatnog pufera (pH 7,5) uz snažno protresivanje (miješanje) pri čemu je došlo do spontanog stvaranja multilamelarnih liposoma.

**Tablica 3.** *Sastav liposomskih disperzija s uklopljenim azitromicinom*

Liposomska preparacija	SPC (mg)	SDCh (mg)	AZI (mg)	Pufer, pH 7,5 (ml)
Konvencionalni liposomi (CL)	100		15	5
Deformabilni liposomi (DL)	85	15	15	5

*AZI-azitromicin; SDCh-natrijev deoksikolat; SPC- sojin fosfatidilkolin*

Homogenizacija nastalih heterogenih preparacija multilamelarnih liposoma s azitromicinom provodena je ekstrudiranjem (Slika 11) tri puta kroz polikarbonatnu membranu veličine pora 400 nm, a zatim još tri puta kroz membranu veličine pora 200 nm. Na taj se način od multilamelarnih liposoma dobivaju manji oligolamelarni i unilamelarni liposomi, a pritom se smanjuje i indeks polidisperznosti.



**Slika 11.** *Shematski prikaz ekstrudera ([www.funakoshi.co.jp](http://www.funakoshi.co.jp))*

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

Srednji promjeri i indeksi polidisperznosti liposoma izmjereni su na uređaju Zetasizer 3000HS (Slika 12) metodom fotonske korelacijske spektroskopije (*photon correlation spectroscopy, PCS*). Mjerenje je provedeno pod kutem raspršenja od 90° i pri temperaturi od 25°C. U kivetu za mjerenje veličine čestica stavljene su dvije kapi uzorka liposoma koje su potom razrijeđene s 1 mM otopinom NaCl. Otopina NaCl prethodno je filtrirana kroz Minisart filtere veličine pora 0,45 μm kako bi se uklonila eventualna onečišćenja. Mjerenje veličine liposoma provedeno je prije i poslije ekstruzije. Izvorni uzorci liposoma (prije ekstruzije) su također pregledani pomoću optičkog mikroskopa (Olympus BH-2, Olympus optical Co. Ltd, Tokio, Japan) pri povećanju 40x te je ustanovljena heterogenost preparacije te širok raspon veličina liposoma.



Slika 12. Zetasizer 3000HS ( <http://www.chemeng.tsinghua.edu.cn> )



### **3.2.4. Određivanje zeta potencijala**

Zeta potencijal svih preparacija liposoma određen je na uređaju Zetasizer 3000HS PCS metodom. Korištena je protočna kiveta s optičkim modulatorom čije se radno područje nalazi na 1000 Hz. Da bi se osigurala valjanost mjerenja, instrument je prethodno kalibriran standardom (Zeta Potential Transfer Standard, Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija) čiji zeta potencijal iznosi  $-42 \text{ mV} \pm 4,2 \text{ mV}$ .

Uzorci liposoma kojima je mjeren zeta potencijal pripremljeni su razrjeđivanjem nekoliko kapi liposomske suspenzije s adekvatnom količinom 1 mM otopine NaCl. Mjerenja su provedena pri temperaturi od 25 °C.

### **3.2.5. Odjeljivanje liposoma s uklopljenim lijekom**

Prije uklapanja liposoma u kitozanske gelove provedeno je odjeljivanje lijeka uklopljenog u liposome od neuklopljene frakcije pri čemu je korištena metoda ultracentrifuge. 1 ml liposomske suspenzije razrijeđen je dvostrukim volumenom fosfatnog pufera i ultracentrifugiran 1 sat na 120 000 x g pri 20 °C (Beckman Optima LE-80K Ultracentrifuge, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA). Nakon postupka ultracentrifugiranja uklonjen je supernatant, a zaostali pelet razrijeđen na početni volumen od 1 ml.

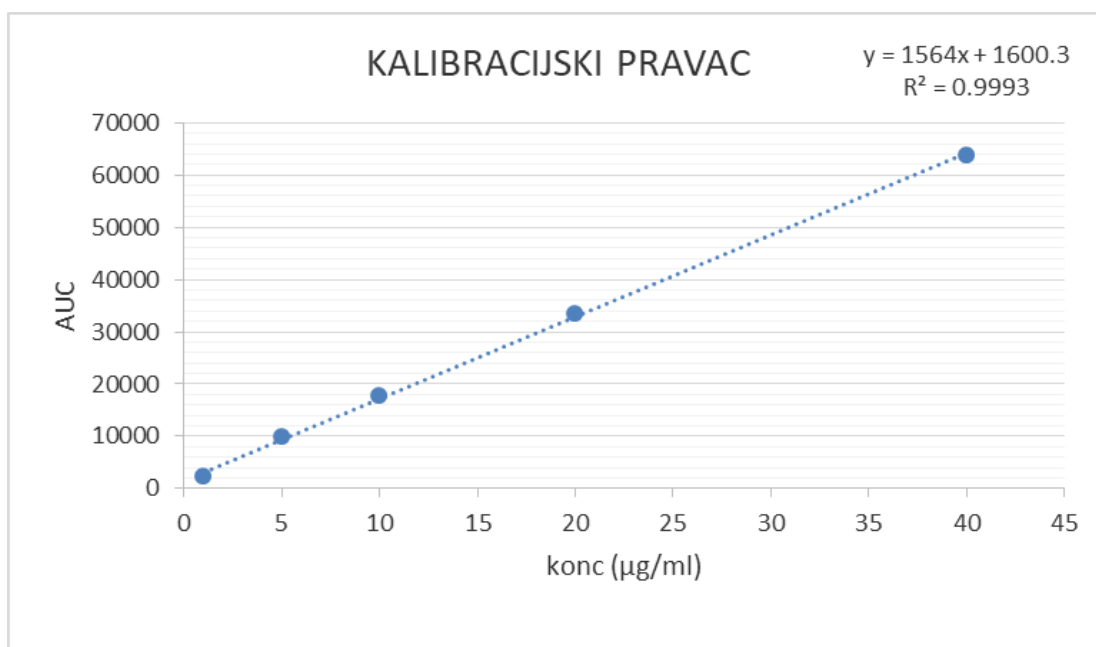
### **3.2.6. *In vitro* ispitivanje oslobađanja azitromicina iz liposoma uklopljenih u kitozanski hidrogel**

*In vitro* ispitivanje oslobađanja azitromicina iz liposoma uklopljenih u kitozanski gel provedeno je korištenjem Franz-difuzijske ćelije. Kitozanski hidrogel s lijekom izrađen je vaganjem 1,4 g gela u kojeg je umiješano 0,6 g liposoma.

Na prethodno nakvašenu i termostatiranu celuloza-nitratnu membranu nanoseno je oko 1 g prethodno pripremljenog gela s liposomima. Receptorski medij činila je 5%-tna (v/v) otopina etanola u 0,01 M fosfatnom puferu (pH=7,5), volumena 16 ml. Tijekom cijelog eksperimenta medij je miješan magnetskim mješačem (150 rpm). Sustav je termostatiran na 37 °C kako bi temperatura na površini membrani bila oko 32 °C kolika je otprilike temperatura na površini kože. Alikvoti od 0,5 ml receptorskog medija uzorkovani su tijekom prvih 6 sati svakih 30 minuta, a zadnje je uzorkovanje provedeno nakon 24 sata. Nakon svakog uzorkovanja receptorski medij je nadopunjen s 0,5 ml svježeg termostatiranog medija.

### 3.2.7. Izrada kalibracijskog pravca za azitromicin

Pripremljeno je šest otopina azitromicina različite koncentracije (1, 5, 10, 20, 40, 100 µg/ml) u metanolu. Za svaku otopinu je tri puta kromatografski pomoću HPLC-a određena površina ispod krivulje AUC. Kalibracijski pravac (Slika 13) prikazuje ovisnost dobivenih srednjih vrijednosti AUC (y) o poznatoj koncentraciji azitromicina (x). Linearnost metode izražena je koeficijentom koleracije ( $R^2 = 0,9993$ ). Dobivena je jednadžba kalibracijskog pravca pomoću koje su na osnovu dobivenih AUC izračunate koncentracije azitromicina koji se oslobodio u receptorski medij tijekom *in vitro* ispitivanja.



**Slika 13.** Kalibracijski pravac azitromicina

### 3.2.8. Određivanje sadržaja azitromicina oslobođenog iz liposoma tijekom *in vitro* ispitivanja

Sadržaj oslobođenog azitromicina određen je HPLC metodom iz poznate jednadžbe pravca. Uzorci su prije injektiranja u instrument bili filtrirani kroz filter veličine pora 0,22  $\mu\text{m}$ , a sastavnice mobilne faze degazirane kako bi se otklonila mogućnost onečišćenja i oštećenja kromatografske kolone.

Zadani parametri kromatografske analize bili su:

- \* mobilna faza: acetonitril i fosfatni pufer (0,01 M, pH=7,5) u omjeru 70:30 (v/v)
- \* brzina protoka mobilne faze: 1,2 ml/min
- \* kolona: C18, reverzno fazna
- \* radna temperatura kolone: 40 °C
- \* valna duljina detekcije: 210 nm
- \* vrijeme analize: 15 min

Iz kromatografski dobivenih vrijednosti površina ispod krivulje (AUC) i kalibracijskog pravca izračunata je koncentracija azitromicina u svakom uzorku. Količina azitromicina u alikvotu uzorka dobivena je množenjem koncentracije azitromicina i volumena uzorka (0,5 ml). Količina azitromicina u cijelom receptorskom mediju jednaka je umnošku koncentracije azitromicina u 0,5 ml uzorka i ukupnog volumena receptorskog medija (16 ml). Nakon toga je izračunata kumulativna količina oslobođenog azitromicina u receptorskom mediju (Q). Kumulativni udio (%) oslobođenog azitromicina dobiven je iz omjera kumulativne količine (Q) azitromicina u receptorskom mediju i sadržaja azitromicina u liposomskim preparacijama.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

## 4.1. KARAKTERIZACIJA LIPOSOMA

### 4.1.1. Srednji promjer liposoma i indeks polidisperznosti

Liposomske su preparacije pripravljene film metodom korištenjem postupka opisanog u poglavlju 3.2.2. te su pregledane optičkim mikroskopom. Uočene su heterogene multilamelarne vezikule velikog srednjeg promjera ( $>5 \mu\text{m}$ ). Metodom fotonske korelacijske spektroskopije (PCS) određen im je srednji promjer i indeks polidisperznosti. PCS metoda je potvrdila veliki srednji promjer i visok indeks polidisperznosti (1.000) kao što je bilo i očekivano s obzirom na metodu pripreme. Provedena je homogenizacija liposomskih disperzija pri čemu su dobiveni liposomi promjera od 120 do 140 nm i uskog raspona veličina (malog indeksa polidisperznosti). Rezultati provedenih mjerenja su prikazani Tablicom 4.

**Tablica 4.** Srednji promjeri i indeksi polidisperznosti liposomskih preparacija

Uzorak	Srednji promjer liposoma (nm)		Indeks polidisperznosti	
	Prije ekstruzije	Nakon ekstruzije*	Prije ekstruzije	Nakon ekstruzije*
<b>Konvencionalni liposomi</b>	$626,24 \pm 22,5$	$139,5 \pm 0,9$	$0,679 \pm 0,040$	$0,098 \pm 0,011$
<b>Deformabilni liposomi</b>	$412,7 \pm 24,3$	$119,0 \pm 2,4$	$0,923 \pm 0,133$	$0,179 \pm 0,017$

\* liposomske suspenzije ekstrudirane su pomoću ekstrudera tri puta kroz polikarbonatne membrane veličine pora 400 nm, a zatim još tri puta kroz membrane veličine pora 100 nm

Iz dobivenih rezultata je vidljivo da je srednji promjer neekstrudiranih deformabilnih liposoma bio manji (412 nm) od srednjeg promjera konvencionalnih liposoma (626 nm). Međutim indeks polidisperznosti za deformabilne liposome bio je značajno veći (0,9) u usporedbi s konvencionalnim liposomima (0,6). Ekstruzijom kroz polikarbonatne membrane značajno je smanjen promjer oba tipa liposoma kao i indeksi polidisperznosti. Trend manjeg promjera deformabilnih liposoma u odnosu na konvencionalne liposome, te većeg indeksa polidisperznosti posljedica je prisutnosti rubnog aktivatora u fosfolipidnom dvosloju deformabilnih liposoma koji povećava fleksibilnost membrane (Palac i sur., 2014).

#### 4.1.2. Zeta potencijal

Zeta potencijal pokazatelj je fizičke stabilnosti tekućih disperzija. Ako je njegova vrijednost niska dolazi do agregacije i flokulacije čestica, a ako je zeta potencijal jako pozitivan ili negativan čestice će se međusobno odbijati i neće doći do njihovog spajanja. Kao razdjelna granica između stabilnih i nestabilnih sustava uzeto je +30 mV ili -30 mV tj. stabilne su čestice sa zeta potencijalom pozitivnijim od +30 mV ili negativnijim od -30 mV ([www.malvern.com](http://www.malvern.com)).

Na vrijednost zeta potencijala ne utječe veličina liposoma, nego samo sastav fosfolipidnog dvosloja liposoma, pa su mjerenja provedena prije ekstrudiranja. Rezultati su prikazani u Tablici 5.

**Tablica 5.** Zeta potencijal liposomskih preparacija ( $n=5$ )

<b>Uzorak</b>	<b>Zeta potencijal (mV)</b>
<b>Konvencionalni liposomi</b>	$-43,9 \pm 0,7$
<b>Deformabilni liposomi</b>	$-46,1 \pm 0,9$

Izmjereni zeta potencijali liposomskih preparacija bili su niži od -30 mV (-43 i -46 mV) te ukazuju na dobru fizičku stabilnost liposomskih disperzija s azitromicinom. Negativni zeta potencijali posljedica su korištenja sojinog lecitina sa 75% fosfatidilkolina (LIPOID S 75) za pripremu oba tipa liposoma. Valja naglasiti da negativan naboj na površini liposoma povoljno utječe na efikasnost dermalne dostave djelatnih tvari (lijekova) u kožu (Palac i sur., 2014), te se pretpostavlja da bi ispitivani liposomi, s obzirom na izmjereni zeta potencijal, bili prikladni za dermalnu primjenu azitromcina.

## 4.2. OSLOBADANJE AZITROMICIMA IZ LIPOSOMA UKLOPLJENIH U KITOZANSKI GEL

*In vitro* ispitivanje oslobađanja azitromicina iz liposoma uklopljenih u kitozanski hidrogel provedeno je korištenjem Franz-difuzijske ćelije prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.6. Uzorci su prikupljeni tijekom 24 sata, a sadržaj azitromicina određen je kromatografski HPLC metodom. Pomoću dobivenih površina ispod krivulje (AUC) i jednadžbe kalibracijskog pravca izračunata je koncentracija i kumulativni udio oslobođenog azitromicina u određenom vremenu. Ispitivanja su provedena s oba tipa liposomskih gelova te kontrolnim gelom (otopina azitromcina u gelu). Udio liposoma u gelu iznosio je 30% (liposomi/gel, w/w). Rezultati provedenih ispitivanja prikazani su Tablicama 6-8 te Slikom 14.

**Tablica 6.** *Oslobađanje azitromicina iz konvencionalnih liposoma u kitozanskom gelu*

t (min)	c (µg/mLml)	Δ (µg)	Q (µg)	%	SD
0	0,00	0,00	0,00	<b>0,00</b>	0,00
30	2,73	1,37	43,71	<b>4,15</b>	0,15
60	5,76	2,88	93,48	<b>8,89</b>	0,82
90	9,03	4,51	148,66	<b>14,14</b>	1,30
120	11,71	5,86	196,16	<b>18,71</b>	2,94
150	15,13	7,56	256,61	<b>24,32</b>	0,40
180	16,81	8,41	291,14	<b>27,78</b>	4,78
210	17,97	8,98	318,03	<b>30,19</b>	1,58
240	18,88	9,44	341,60	<b>32,49</b>	3,25
270	19,04	9,52	353,63	<b>33,64</b>	3,48
300	18,76	9,38	358,67	<b>34,22</b>	5,69
330	18,25	9,12	359,86	<b>34,32</b>	5,43
360	17,96	8,98	364,37	<b>34,76</b>	5,76
1440	17,93	8,96	372,87	<b>35,52</b>	4,73

*t(h)*-vremenski intervali uzorkovanja; *c(µg/ml)*- koncentracija azitromicina oslobođena u određenom vremenskom intervalu; *Δ(µg)*-količina lijeka u 0,5ml uzorka; *Q(µg)*-kumulativna količina oslobođenog

lijeka tijekom određenog vremenskog perioda; %-postotak oslobođenog lijeka tijekom određenog vremenskog perioda; SD (%)- standardna devijacija . Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 3 nezavisna ispitivanja.

**Tablica 7.** Oslobođanje azitromicina iz deformabilnih liposoma u kitozanskom gelu

<b>t (min)</b>	<b>c (µg/ml)</b>	<b>Δ (µg)</b>	<b>Q (µg)</b>	<b>%</b>	<b>SD</b>
<b>0</b>	0,00	0,00	0,00	<b>0,00</b>	0,00
<b>30</b>	3,47	1,73	55,51	<b>6,40</b>	0,10
<b>60</b>	7,74	3,87	125,65	<b>14,49</b>	1,84
<b>90</b>	11,46	5,73	188,90	<b>21,78</b>	2,27
<b>120</b>	12,75	6,38	215,41	<b>24,84</b>	2,57
<b>150</b>	14,19	7,09	244,75	<b>28,22</b>	2,05
<b>180</b>	16,36	8,18	286,58	<b>33,05</b>	5,17
<b>210</b>	18,57	9,28	330,10	<b>38,06</b>	0,09
<b>240</b>	18,74	9,37	342,05	<b>39,44</b>	0,07
<b>270</b>	18,95	9,47	354,83	<b>40,92</b>	1,21
<b>300</b>	18,16	9,08	351,68	<b>40,55</b>	0,90
<b>330</b>	18,82	9,41	371,34	<b>42,82</b>	0,38
<b>360</b>	18,17	9,09	370,38	<b>42,71</b>	0,79
<b>1440</b>	18,44	9,22	383,75	<b>44,25</b>	0,12

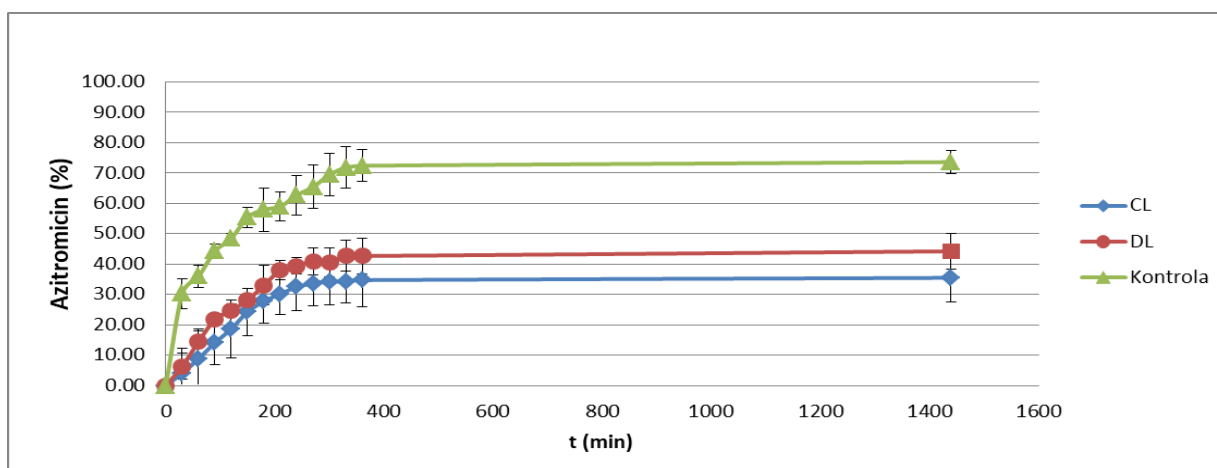
*t(h)*-vremenski intervali uzorkovanja; *c(µg/ml)*- koncentracija azitromicina oslobođena u određenom vremenskom intervalu; *Δ(µg)*-količina lijeka u 0,5ml uzorka; *Q(µg)*-kumulativna količina oslobođenog lijeka tijekom određenog vremenskog perioda; %-postotak oslobođenog lijeka tijekom određenog vremenskog perioda; SD (%)- standardna devijacija . Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 3 nezavisna ispitivanja.



**Tablica 8.** *Oslobađanje azitromicina iz kontrolnog kitozanskog gela (otopina azitromicina u gelu)*

<b>t (min)</b>	<b>c (µg/ml)</b>	<b>Δ (µg)</b>	<b>Q (µg)</b>	<b>%</b>	<b>SD</b>
<b>0</b>	0,00	0,00	0,00	<b>0,00</b>	0,00
<b>30</b>	19,69	9,84	315,02	<b>30,33</b>	7,40
<b>60</b>	22,49	11,25	369,76	<b>35,98</b>	6,18
<b>90</b>	27,25	13,63	457,12	<b>44,29</b>	8,87
<b>120</b>	28,82	14,41	495,86	<b>48,50</b>	6,62
<b>150</b>	32,57	16,29	570,28	<b>55,45</b>	9,79
<b>180</b>	33,39	16,70	599,69	<b>57,92</b>	12,82
<b>210</b>	32,98	16,49	609,74	<b>59,03</b>	12,17
<b>240</b>	34,13	17,07	644,75	<b>62,71</b>	10,92
<b>270</b>	34,53	17,26	668,08	<b>65,44</b>	8,32
<b>300</b>	35,63	17,82	703,05	<b>69,43</b>	5,04
<b>330</b>	36,17	18,08	729,41	<b>71,85</b>	6,40
<b>360</b>	35,28	17,64	733,36	<b>72,42</b>	5,26
<b>1440</b>	35,00	17,50	746,50	<b>73,64</b>	5,83

*t(h)*-vremenski intervali uzorkovanja; *c(µg/ml)*- koncentracija azitromicina oslobođena u određenom vremenskom intervalu; *Δ(µg)*-količina lijeka u 0,5ml uzorka; *Q(µg)*-kumulativna količina oslobođenog lijeka tijekom određenog vremenskog perioda; *%*-postotak oslobođenog lijeka tijekom određenog vremenskog perioda; *SD (%)*- standardna devijacija . Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 3 nezavisna ispitivanja.



**Slika 14.** Kumulativni udio azitromicina (%) oslobođen iz konvencionalnih i deformabilnih liposoma uklopljenih u 1,5% kitozanski hidrogel (kontrola –otopina azitromicina u gelu; CL- konvencionalni liposom s azitromicinom; DL- deformabilni liposomi s azitromicinom)

Rezultati provedenih ispitivanja pokazuju da se uklapanjem u liposome usporava oslobađanje azitromicina iz kitozanskog gela. Tako je primjerice nakon 24 sata iz liposomskih gelova oslobođeno 35-44% azitromicina u usporedbi sa 74% koliko je oslobođeno iz kontrolnog gela (otopina azitromicina u kitozanskom gelu). Usporedba dvaju različitih tipova liposoma, deformabilnih i konvencionalnih, pokazuje nešto sporije oslobađanje iz konvencionalnih liposoma što je posljedica različitog lipidnog sastava dvosloja. Naime, deformabilni liposomi u membrani sadrže 15% natrijevog deoksikolata koji dvosloj čini elastičnijim, ali i propusnijim za uklopljeni lijek (azitromicin) u usporedbi s konvencionalnim liposomima. Kod oba uzorka liposomskih gelova uočeno je brže oslobađanje azitromicina u prvih 210 minuta ispitivanja (3,5 sata) nakon čega dolazi do usporavanja oslobađanja i stvaranja plato-a. Takav profil može biti pogodan u terapiji jer se time postiže brži početak djelovanja formulacije, nakon čega se oslobađanje usporava.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih ispitivanja te obradom i analizom dobivenih rezultata moguće je izvesti sljedeće zaključke:

- \* konvencionalni i deformabilni liposomi s azitromicinom prikladnih fizičkih svojstava za dermalnu primjenu pripremljeni su film metodom uz naknadnu ekstruziju
- \* deformabilni liposomi bili su manjeg srednjeg promjera, ali nešto većeg indeksa polidisperznosti od konvencionalnih liposoma
- \* konvencionalni i deformabilni liposomi imali su negativan zeta potencijal (oko -40 mV) koji ukazuje na formiranje fizički stabilnih liposomskih disperzija
- \* kitozanski gelovi pripremljeni su korištenjem visokomolekularnog kitozana, a udio liposoma u gelu iznosio je 30% (w/w)
- \* pH 1,5 % kitozanskog gela iznosio je između 5.5 i 6, što ga čini prikladnom podlogom za dermalnu primjenu i uklapanje liposoma
- \* uklapanjem liposoma u gel postignuto je produljeno oslobađanje azitromicina
- \* sastav fosfolipidnog dvosloja liposoma utječe na oslobađanje azitromicina iz gela; sporije oslobađanje je postignuto iz konvencionalnih liposoma dok je oslobađanje iz deformabilnih liposoma bilo nešto brže, ali značajno sporije u odnosu na kontrolni gel.

## 6. LITERATURA

Ait-Oudhia S, Mager D, Straubinger R. Application of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Analysis to the Development of Liposomal Formulations for Oncology, *Pharmaceutics*, 2014, 137-174.

Agarwal R, Iezhitsa I, Agarwal P, Nasir N, Razali N, Alyautdin R. Liposomes in topical ophthalmic drug delivery: an update, *Drug Delivery*, 2014, 1075-1091.

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

Baza lijekova: Lijekovi s azitromicinom, <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 22.04.2018.

Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices, *International Journal of Nanomedicine*, 2015, 975-999.

Chang HI, Yeh MK. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy, *International Journal of Nanomedicine*, 2012, 49-60.

Čajkovac M. *Kozmetologija*, Jastrebarsko, Naklada Slap, 2000, 25-67,

Dastagiri Reddy Y, Sravani A. B, Ravisankar V, Prakash Ravi P, Reddy Rami Y, Bhaskar Vijaya. Transferosomes A Novel Vesicular Carrier for Transdermal Drug Delivery System, *Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences*, 2015, 193-208.

Davis C, Normal flora. U: *Medical Microbiology*, 4th edition, Baron S (ur.), University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996, 653-684.

Dostupno online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7617/>

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

Francetić I. *Farmakokinetika azitromicina*, *Medicus*, 2008, 9-14.

Ferreira H, Ribeiro A, Silva R, Paulo A. Deformable Liposomes for the Transdermal delivery of Piroxicam, *Journal of Pharmaceutics and Drug Delivery Research*, 2015, 1-6.

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

Igarashi T, Nishino K, Nayar KS. *The Appearance of Human Skin*, Columbia University, New York, 2005, 11-21.

Jalšenjak I, Jalšenjak V, Filipović-Grčić J. *Farmaceutika*, Zagreb, Školska knjiga, 1998, 129-130.

Kalenić S, Mlinarić-Missoni E. *Medicinska bakteriologija i mikologija*, Zagreb, Merkur A.B.D, 2001, 143-146.

Kansky A i suradnici. *Kožne i spolne bolesti*, Zagreb, JUMENA, 1984, 15-21, 57-72.

Kanfer I, Rath S, Purazi P, Mudyahoto N. *In Vitro Release Testing of Semi-Solid Dosage Forms*, *Dissolution Technologies*, 2017, 52-60.

Kučišec-Tepeš N, Antolić S. *Prepoznavanje i liječenje infekcije kronične rane*, *Acta Medica Croatica*, 2014, 51-57.

Kupiec T. *Quality – Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography*, *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 2004, 223-227.

Lipozenčić J. *Dermatovenerologija*, Zagreb, Medicinska naklada, 2008, 5-115.

Lončar Z, Fumić-Dunkić I, Beker T. *Liječenje i izvođenje anestezije kod opečenih bolesnika* U: *Klinička anesteziologija*, Zagreb, Medicinska naklada, 2005, 176-181.

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

Luterotti S. *Temelji kromatografskih odjeljivanja-kolonske tekućinske kromatografije*, U: *Uvod u kemijsku analizu*, Zagreb, 2011, 223-224.

MSD priručnik dijagnostike i terapije <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik>, pristupljeno 04.05.2018.

Palac Z, Engesland A, Flaten Eide G, Šalko-Basnet N, Filipović-Grčić J, Vanić Ž. Liposomes for (trans)dermal drug delivery: the skin-PVPA as a novel *in vitro stratum corneum* model in formulation development, *Journal of Liposome Research*, 2014, 313-322.

Palit A, Inamadar A. Current concepts in the management of bacterial skin infections in children, *Indian Journal of Dermatology Venereology and Leprology*, 2010, 476-488.

Pepić I, Vujičić M, Lovrić J, Filipović-Grčić J. Nanočestice u dermatokozmetičkim pripravcima: liposomi, mikroemulzije i polimerne micelle, *Farmaceutski glasnik*, 2012, 763-772.

Rajan R, Jose S, Mukund Biju V, Vasudevan D. Transferosomes- A vesicular transdermal delivery system for enhanced drug permeation, *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2011, 138-143.

Shiow-Fern N, Rouse J, Sanderson F, Meidan V, Eccleston G. Validation of a Static Franz Diffusion Cell – System for *In Vitro* Permeation Studies, *American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech*, 2010, 1432-1441.

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, *Pharmaceutical Forum*, 2009, 750-764.

Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: strukturna svojstva i klasifikacija, *Farmaceutski glasnik*, 2012a, 391-400.

Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: metode pripreme, *Farmaceutski glasnik*, 2012b, 457-466.

<https://www.malvernpanalytical.com>, pristupljeno 15.15.2018.

Zorc B, Butula I. Vježbe iz farmaceutske kemije, Sveučilište u Zagrebu, 1995, 12-16.

## 7. SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je provesti *in vitro* ispitivanje oslobađanja azitromicina iz konvencionalnih i deformabilnih liposoma uklopljenih u kitozanski gel, inovativne formulacije namijenjene lokalnoj primjeni na kožu. Liposomi su pripremljeni metodom hidratacije suhog fosfolipidnog sloja uz ekstruziju kroz polikarbonatne membrane od 400 i 200 nm, dok je gel izrađen iz kitozana velike molekulske mase. Deformabilni liposomi bili su manjeg srednjeg promjera, ali nešto većeg indeksa polidisperznosti od konvencionalnih liposoma, što je posljedica veće elastičnosti fosfolipidnih dvoslojeva. Oba tipa liposoma imali su negativni zeta potencijal kao preduvjet fizičke stabilnosti liposomskih disperzija. Liposomi, odijeljeni od neuklopljene frakcije azitromicina, umiješani su u 1.5% kitozanski gel u koncentraciji 30% (w/w). *In vitro* ispitivanja oslobađanja azitromicina iz liposoma uklopljenih u kitozanski gel potvrdila su produljeno oslobađanje antibiotika u usporedbi s kontrolnim gelom (otopina azitromicina u gelu). Usporedba profila oslobađanja antibiotika iz različitih tipova liposoma-u-gelu pokazala je sporije oslobađanje iz konvencionalnih liposoma zbog manje propusnosti membrane za ukloljeni azitromicin u odnosu na deformabilne liposome.

## 8. SUMMARY

The aim of this study was to evaluate *in vitro* release of azithromycin from conventional and deformable liposomes incorporated into chitosan gel. Liposomes were prepared by film hydration method and extrusion through polycarbonate membranes of 400 and 200 nm, while the gel was prepared using high molecular weight chitosan. Deformable liposomes were of smaller size, but somewhat higher polydispersity index than conventional liposomes. Both types of liposomes had negative zeta potentials as a precondition for physical stability of liposomal dispersions. Liposomes, separated from untrapped azithromycin, were mixed into 1.5% chitosan gel at a concentration of 30% (w/w, liposomes/gel). *In vitro* assessment of azithromycin release from the different liposomes incorporated into chitosan gel have confirmed prolonged release of the drug from the both types of liposomes compared to control gel (azithromycin solution incorporated in gel). Comparison of the release profiles of azithromycin from the different types of liposomal gels showed slower release from conventional liposomes.



## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Zavod za farmaceutsku tehnologiju  
Domagojeva 2, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### **IN VITRO ISPITIVANJE OSLOBAĐANJA AZITROMICINA IZ LIPOSOMA UKLOPLJENIH U KITOZANSKI HIDROGEL**

**Marina Jug**

#### **SAŽETAK**

Cilj ovog rada bio je provesti *in vitro* ispitivanje oslobađanja azitromicina iz konvencionalnih i deformabilnih liposoma uklopljenih u kitozanski gel, inovativne formulacije namijenjene lokalnoj primjeni na kožu. Liposomi su pripremljeni metodom hidratacije suhog fosfolipidnog sloja uz ekstruziju kroz polikarbonatne membrane od 400 i 200 nm, dok je gel izrađen iz kitozana velike molekulske mase. Deformabilni liposomi bili su manjeg srednjeg promjera, ali nešto većeg indeksa polidisperznosti od konvencionalnih liposoma, što je posljedica veće elastičnosti fosfolipidnih dvoslojeva. Oba tipa liposoma imali su negativni zeta potencijal kao preduvjet fizičke stabilnosti liposomskih disperzija. Liposomi, odijeljeni od neuklopljene frakcije azitromicina, umiješani su u 1.5% kitozanski gel u koncentraciji 30% (w/w). *In vitro* ispitivanja oslobađanja azitromicina iz liposoma uklopljenih u kitozanski gel potvrdila su produljeno oslobađanje antibiotika u usporedbi s kontrolnim gelom (otopina azitromicina u gelu). Usporedba profila oslobađanja antibiotika iz različitih tipova liposoma-u-gelu pokazala je sporije oslobađanje iz konvencionalnih liposoma zbog manje propusnosti membrane za ukloljeni azitromicin u odnosu na deformabilne liposome.

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

Rad sadrži: 43 stranice, 14 grafičkih prikaza, 8 tablica i 35 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Azitromicin, deformabilni liposomi, *in vitro* oslobađanje, dermalna primjena, kitozan

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. Lidija Bach Rojecky**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: veljača 2019 .

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of pharmaceutical technology  
Domagojeva 2, 10 000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### **IN VITRO RELEASE STUDY OF AZITHROMYCIN FROM DEFORMABLE LIPOSOMES INCORPORATED INTO CHITOSAN GEL**

**Marina Jug**

#### **SUMMARY**

The aim of this study was to evaluate *in vitro* release of azithromycin from conventional and deformable liposomes incorporated into chitosan gel. Liposomes were prepared by film hydration method and extrusion through polycarbonate membranes of 400 and 200 nm, while the gel was prepared using high molecular weight chitosan. Deformable liposomes were of smaller size, but somewhat higher polydispersity index than conventional liposomes. Both types of liposomes had negative zeta potentials as a precondition for physical stability of liposomal dispersions. Liposomes, separated from untrapped azithromycin, were mixed into 1.5% chitosan gel at a concentration of 30% (w/w, liposomes/gel). *In vitro* assessment of azithromycin release from the different liposomes incorporated into chitosan gel have confirmed prolonged release of the drug from the both types of liposomes compared to control gel (azithromycin solution incorporated in gel). Comparison of the release profiles of azithromycin from the different types of liposomal gels showed slower release from conventional liposomes.

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

Thesis includes: 43 pages, 14 figures, 8 tables and 35 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Azithromycin, deformable liposomes, *in vitro* release, chitosan

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  
**Lidija Bach Rojceky, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: February, 2019.

