

Ispitivanje membranske elastičnosti liposoma s azitromicinom i diltiazemkloridom

Pavić, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:163:378688>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

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



Matea Pavić

**Ispitivanje membranske elastičnosti liposoma s
azitromicinom i diltiazemkloridom**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

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

Zahvala

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Vanić na profesionalnom vođenju kroz cijeli put izrade diplomskog rada, na strpljenju i pomoći.

Zahvaljujem mag. pharm. Zori Palac na podršci, pomoći i na ugodnoj radnoj atmosferi tijekom dugih dana u laboratoriju.

Zahvaljujem svojim roditeljima koji su mi pružili sve kako bih mogla postići svoje ciljeve, na ljubavi i podršci kroz sve ove godine te prijateljima koji su poput obitelji bili uz mene cijelim putem.

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1. Liposomi.....	1
1.1.1. Konvencionalni liposomi.....	3
1.1.2. Deformabilni (elastični) liposomi.....	3
1.1.3. Propilenglikol liposomi.....	4
1.1.4. Kationski liposomi.....	4
1.2. Elastičnost liposomskih dvoslojeva.....	5
1.3. Koža.....	6
1.3.1. Epidermis.....	7
1.3.2. Dermis.....	8
1.3.3. Hipodermis.....	8
1.4. Liposomi kao terapijski sustavi za topikalnu primjenu.....	8
1.5. Azitromicin.....	9
1.6. Diltiazemklorid.....	10
2. Obrazloženje teme.....	11
3. Materijali i metode.....	12
3.1. Materijali.....	12
3.2. Metode.....	13
3.2.1. Priprava liposoma.....	13
3.2.1.1. Priprava liposoma s azitromicinom.....	13
3.2.1.2. Priprava propilenglikol liposoma s diltiazemkloridom.....	14
3.2.1.3. Priprava konvencionalnih liposoma s diltiazemkloridom.....	14
3.2.2. Mjerenje veličine i indeksa polidisperznosti liposoma.....	15
3.2.3. Mjerenje zeta potencijala.....	15
3.2.4. Mjerenje membranske elastičnosti liposoma.....	15
4. Rezultati i rasprava.....	17
4.1. Srednji promjeri i indeksi polidisperznosti liposoma s azitromicinom i diltiazemkloridom.....	17
4.2. Zeta potencijali liposoma s azitromicinom i diltiazemkloridom.....	19
4.3. Elastičnost (fosfo)lipidnih dvoslojeva liposoma.....	20
5. Zaključci.....	23
6. Literatura.....	24

7. Sažetak.....	29
-----------------	----

1.UVOD

1.1. Liposomi

Liposomi (Slika 1) su mikroskopske i submikroskopske vezikule, veličine od 10-ak nm sve do 20-ak μm . Građeni su od jednog, ili više fosfolipidnih dvoslojeva koji okružuju unutarnji vodeni odjeljak (odjeljke). Nastaju kao posljedica hidratacije fosfolipida koji spontano stvaraju fosfolipidne sfere koje okružuju vodeni medij. Velika razlika u slobodnoj energiji između vodenog i hidrofobnog okruženja dovodi do formiranja dvosloja kako bi se postigla najniža slobodna energija (Kulkarni i sur., 1995).

Fosfolipidi su amfipatske molekule te imaju hidrofilnu „glavu“ i hidrofobne „repove“. Hidrofobni „repovi“ se u vodenom okruženju orijentiraju jedan prema drugome, dok se hidrofilne „glave“ okreću prema unutarnjoj i vanjskoj vodenoj fazi, formirajući tako fosfolipidni dvosloj. Po kemijskom sastavu fosfolipidi su diesteri fosfatne kiseline koji su s jedne strane esterificirani etanolaminom, glicerolom, inozitolom, kolinom, ili serinom, a s druge su esterificirani derivatom sfingozina, ili glicerola (Vanić, 2012a).

Ovisno o broju fosfolipidnih dvoslojeva koji se formiraju i promjeru vezikula, liposomi se bazično dijele na male unilamelarne (SUV, jedan dvosloj, veličine 10-100 nm), velike unilamelarne (LUV, jedan dvosloj, veličine 100-1000 nm), multilamelarne (MLV, više dvoslojeva, veličine 100 nm-20 μm) i multivezikularne vezikule (MVV, veličine 1-50 μm) (Kulkarni i sur., 1995).

Za pripravu liposoma najčešće se koristi lecitin koji je smjesa fosfolipida (s najvećim udjelom fosfatidilkolina), a dobiva se ekstrakcijom i pročišćavanjem iz jaja i soje. Lanci masnih kiselina fosfolipida lecitina različite su duljine i stupnja zasićenosti, ali su sintetski fosfolipidi znatno kvalitetniji zbog točno definiranog sastava (Vanić, 2012a).

Zbog amfipatskih svojstava, liposomi mogu biti nosači lijekova s različitim koeficijentima razdjeljenja (lipofilnosti). Hidrofilni lijekovi uklapaju se u vodeni odjeljak, hidrofobni u fosfolipidni dvosloj, a amfipatski se smještaju između te dvije regije (Slika 1). Svojstva liposoma ovise o (fosfo)lipidnom sastavu, veličini čestica, lamelarnosti (morfologija), membranskoj rigidnosti/elastičnosti i površinskom naboju (Vanić i sur., 2015).

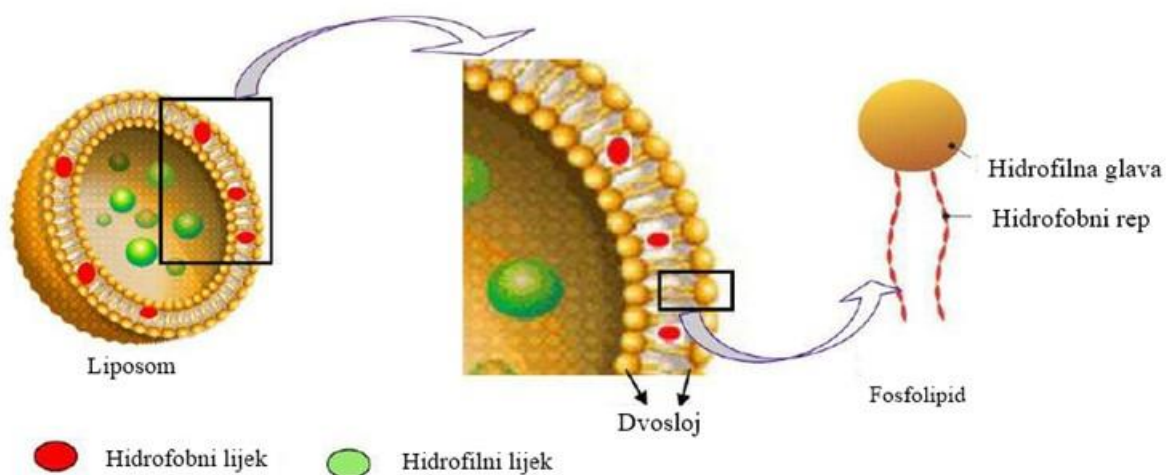
Sličnost liposoma s biološkim membrana i neimunogenost čini ih fiziološki prihvatljivim nanočesticama. Varijacijom površine liposoma i njihovog sastava omogućava se produljeno i/ili kontrolirano oslobađanje lijeka na ciljanom mjestu djelovanja zbog utjecaja na farmakokinetiku i bioraspodivnost uklopljene djelatne tvari (Giacometti i sur., 2017).

Uklapanjem u liposome može se poboljšati stabilnost nestabilnih djelatnih tvari (lijekova) i/ili smanjiti njihovi neželjeni učinci. Naime, uklopljena tvar zaštićena je od kemijske inaktivacije, enzimske razgradnje i imunološke neutralizacije. Na taj način liposomi sprječavaju metabolizam lijeka prije no što on stigne na svoj cilj, a istodobno je zdravo tkivo zaštićeno od izravne izloženosti lijeka tijekom cirkulacije liposoma kroz krv (Azanza i sur., 2015).

Negativne strane uključuju mogućnost gubitka početno uklopljenog sadržaja lijeka iz liposoma tijekom skladištenja, sporo oslobađanje te slabu apsorpciju zbog koje lijek može početi djelovati s odgodom. Problem predstavljaju i varijacije u proizvedenim serijama te poteškoće u proizvodnji velikih količina liposomskih formulacija (eng. *large scale manufacturing*) (Kulkarni i sur., 1995).

Zanimljivo je spomenuti da enzimi uklopljeni u liposome pokazuju pojačanu aktivnost i stabilnost *in vivo*, ali i *in vitro* što je važno kod npr. proizvodnje prehrambenih namirnica. Liposomi se najviše primjenjuju intravenski jer tijekom oralne primjene može doći do razgradnje nosača što rezultira slabijom bioraspodivošću lijeka. Istražuju se u genskoj terapiji kao sustavi za dostavu oligonukleotida, DNA i siRNA. Primjerice, liposomi s uklopljenom siRNA istraživali su se za utišavanje PCSK9, gena zbog kojeg dolazi do smanjenja LDL-a u cirkulaciji (Panahi i sur., 2017).

Posljednjih nekoliko desetljeća uvelike se istražuje mogućnost primjene fosfolipidnih vezikula u dermalnoj i transdermalnoj terapiji. Zbog svog specifičnog sastava i svojstava, liposomi olakšavaju transport uklopljene tvari u/kroz kožu te su se ispitivali i za transkutanu imunizaciju (Vanić, 2012b).



Slika 1. Struktura liposoma (Sandeep i sur., 2013)

1.1.1. Konvencionalni liposomi

Konvencionalni liposomi mogu biti građeni od neutralnih, ili kombinacije neutralnih i negativno nabijenih fosfolipida prirodnog ili sintetskog podrijetla, a mogu sadržavati i kolesterol. U literaturi se označavaju i kao prva generacija liposoma. Primjenu liposoma na kožu prvi su predložili Mezei i Gulasekharam (1980), a pokazalo se da liposomske formulacije pojačavaju efikasnost liječenja čak i kod koncentracija aktivnih supstancija nižih od onih u klasičnim formulacijama (farmaceutskim oblicima). Primjenom liposomskih pripravaka smanjena je i iritacija kože (npr. dermalna primjena retinoida) (Schäfer-Korting i sur., 1994), a pokazalo se da konvencionalni liposomi pojačavaju dermalnu dopremu vitamina D3 i ditranola u terapiji psorijaze (Körbel i sur., 2001).

Istraživanja su pokazala da konvencionalni liposomi slabo penetriraju kroz rožnati sloj te su prikladni za dostavu lijeka u površinske slojeve kože i usporavanje penetracije dobro permeabilnih lijekova kroz kožu (npr. kortikosteroidi) (Vanić i sur., 2015).

1.1.2. Deformabilni (elastični) liposomi

Deformabilni liposomi u dvosloju osim fosfolipida sadrže i jednolančane surfaktante poput kolata, deoksikolata, Tween-a 80, ili Span-a 80 koji destabiliziraju lipidne dvoslojeve čineći ih elastičnim (Tsai i sur., 2015). Ultradeformabilnost i elastičnost dvoslojeva omogućava deformabilnim liposomima prolaz kroz mikrolamelarne prostore između keratinocita koji obično čine samo desetinu promjera cijele vezikule. Naime, primjenom na kožu u nekluzivnim uvjetima, dolazi do isparavanja vode iz liposomske disperzije zbog čega elastični liposomi dehidriraju, a budući da su hidrofilni bivaju privučeni područjima bogatim vodom (dublji slojevi epidermisa i dermis). Takav transepidermalni osmotski gradijent omogućava liposomima da penetriraju kroz intercelularne prostore rožnatog sloja i prenose uklopljeni sadržaj u niže slojeve epidermisa (Nava i sur., 2011). Pretpostavlja se da bi se elastični liposomi zbog svoje elastičnosti i bolje penetracije antigena u kožu te mogućnosti kontroliranog oslobađanja antigena u budućnosti mogli istraživati u svrhu stvaranja terapijski učinkovitih transdermalnih vakcina (Tyagi i sur., 2016).

Elastični liposomi pokazali su se učinkovitima u terapiji reumatskih bolesti zbog bolje transdermalne dostave uklopljene djelatne tvari u odnosu na konvencionalne ljekovite oblike poput gelova i masti (Singh i sur., 2016).

U znanstvenoj zajednici se poprilično raspravlja o mehanizmima dostave uklopljene djelatne tvari u kožu deformabilnim liposomima; penetriraju li deformabilni liposomi zaista inaktivni

kroz *stratum corneum* ili djeluju kao pojačivači penetracije uklopljene djelatne tvari u kožu? Taj drugi mehanizam (pospješivanje penetracije) uključuje interakciju fosfolipida i surfaktanata iz dvosloja liposoma s intercelularnim lipidima rožnatog sloja čime se olakšava prolaz oslobođene djelatne tvari iz liposoma u/kroz kožu (Vanić i sur., 2015).

Uklapanje hidrofilnih lijekova u deformabilne liposome može dodatno smanjiti njihov prolaz kroz kožu zbog dodatnog lipidnog sloja pa je za takve djelatne tvari važniji mehanizam pospješivanja penetracije u kožu interakcijom fosfolipida i surfaktanta iz liposoma s intercelularnim lipidima kože. Lipofilnim lijekovima odgovara unos mehanizmom prolaska intaktnih vezikula, budući da im zbog topljivosti u lipidima liposomska ovojnica ne smeta pri oslobađanju (Banović i sur., 2011).

Osim za primjenu na kožu, deformabilni liposomi su istraživani i za primjenu na sluznice nosa, oka, bronha, rodnice i dr. (Vanić i Škalko-Basnet, 2014).

1.1.3. Propilenglikol liposomi

Propilenglikol liposomi su načinjeni od fosfolipida, vode i propilenglikola. Pokazali su veliku efikasnost uklapanja djelatnih tvari ograničene topljivosti u vodi i relativno veću stabilnost od drugih tipova liposoma. Pokazano je da prisustvo propilenglikola u formulaciji liposoma doprinosi poboljšanom prolazu uklopljene djelatne tvari kroz mukozne membrane. Wei-Ze i suradnici su istražili mogućnost vaginalne primjene fibrauretina u štakora. Korištenjem propilenglikol liposoma s uklopljenim fibrauretinom povećana je permeacija djelatne tvari kroz vaginalnu sluznicu *in vivo*, poboljšan je lokalni učinak, a nuspojave su smanjene (Wei-Ze i sur., 2016). Propilenglikol liposomi su se pokazali efikasnim nanosustavom za dermalnu primjenu kurkumina. U usporedbi s etosomima i konvencionalnim liposomima, propilenglikol liposomi su imali najveći i najduži antiinflamatorni učinak (Kianvash i sur., 2017).

1.1.4. Kationski liposomi

Kationski liposomi, kako im samo ime govori, u strukturi sadrže pozitivno nabijene lipide. Prema nekim istraživanjima kationski liposomi su učinkovitiji u dostavi uklopljenog sadržaja u kožu od neutralnih i anionskih liposoma jer stupaju u interakciju s negativno nabijenom površinom stanica (Jain i sur., 2016) te ispuštaju svoj sadržaj direktno u citosol, čime je efikasnost transfekcije kationskih liposoma veća u odnosu na anionske liposome (Tomori i sur., 2018). S druge pak strane, Gillet i suradnici su pokazali da negativno nabijeni liposomi

poboljšavaju permeaciju lijeka (betametazon) kroz epidermis u usporedbi s neutralnim i pozitivno nabijenim liposomima (Gillet i sur., 2011).

Kako je interes znanstvene zajednice za kationske liposome sve veći, provode se i istraživanja vezana za njihovu citotoksičnost. Naime, zbog pozitivnog površinskog naboja i male veličine čestica (liposoma), može doći do njihovog nakupljanja u organima. Pokazano je da negativno nabijeni proteini plazme poput glikozaminoglikana, apolipoproteina i glikoproteina mogu stvoriti micelarne agregate s kationskim liposomima i tako uzrokovati citotoksičnost (Li i sur., 2018).

1.2. Elastičnost liposomskih dvoslojeva

Elastičnost (fleksibilnost, deformabilnost) fosfolipidnih dvoslojeva omogućava deformabilnim liposomima da intaktni prolaze kroz slojeve rožnatog sloja i bolje prenose uklopljeni sadržaj u niže slojeve epidermisa i dermis. Stoga je ispitivanje membranske elastičnosti od velikog značaja u fizikalnoj karakterizaciji liposoma namijenjenih primjeni na kožu, ali i na sluznice.

Ispitivanje membranske elastičnosti provodi se kontinuiranom ekstruzijom liposoma odgovarajuće veličine kroz polikarbonatne membrane pri konstantnom tlaku tijekom određenog vremenskog perioda. Parametri koji su pritom uzimaju u obzir su: masa ekstrudiranih liposoma (J), veličina pora membrane kroz koju se liposomska disperzija protiskuje (r_p), te veličina liposoma nakon provedenog ispitivanja (r_v). Stupanj membranske elastičnosti (E) računa se prema ovom izrazu (Palac i sur., 2014):

$$E = J \cdot (r_v/r_p)^2$$

Pregledom literature utvrđene su varijabilnosti u samom eksperimentalnom dizajnu provođenja ispitivanja elastičnosti (Tablica 1).

Tablica 1. Uvjeti provođenja ispitivanja membranske elastičnosti liposoma

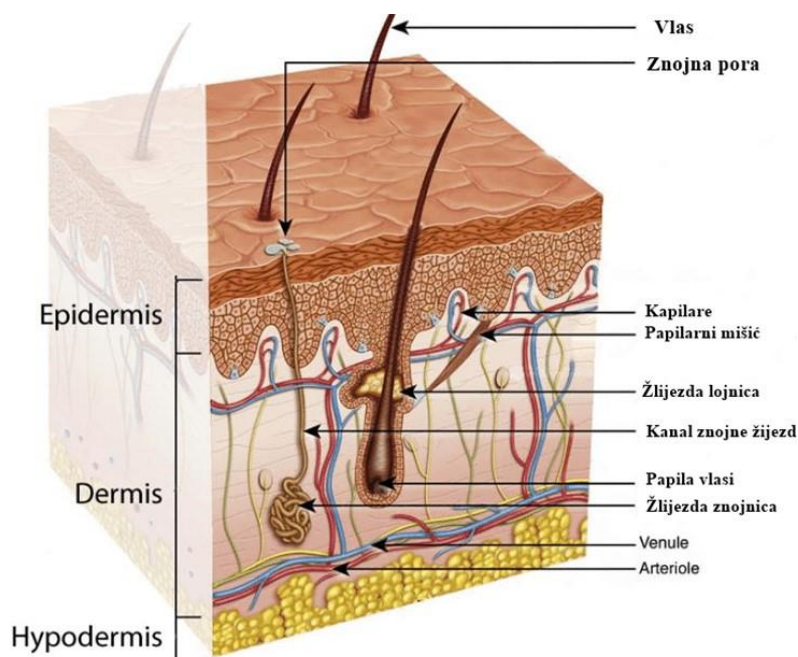
Tip liposoma (lipidni sastav)	Djelatna tvar	t (min)	Tlak	Promjer pora membrane (nm)	Literatura
Elastični liposomi (SPC, kolesterol, Span)	propranolol hidroklorid	5	2.5 bar	50-200	Mishra i sur., 2007
Transferosomi (SPC, Tween 80, Span 80)	sildenafil	15	1.2 MPa	100	Ahmed, 2014
Fleksosomi (Lipoid S75, natrij deoksikolat)	sertakonazol nitrat	5	2.5 bar	100	Mandlik i sur., 2017
Ultradeformabilni (SPC, kolesterol, stearilamin, dicetilfosfat, Tween 20)	imperatorin	5	0.2 MPa	50	Lin i sur., 2018
Transferosomi (EPC, kolesterol, natrij deoksikolat, Tween 20)	timolol	10	600 psi	800	González-Rodríguez i sur., 2016

EPC, fosfatidilkolin iz žumanjaka jaja; SPC, sojin fosfatidilkolin; t, vrijeme.

1.3. Koža

Koža je najveći organ čovjeka s prosječnom masom od 4 kg i površinom od 2 m² (odrasla osoba). Ima važnu ulogu u ljudskom tijelu: čini zaštitnu barijeru prema okolišu, sprječava gubitak vode te ulazak infektivnih mikroorganizama i štetnih kemikalija (Weller i sur., 2015). Koža štiti organizam od infekcija proizvodeći antimikrobne peptide, ali i neuropeptide, hormone i citokine koji osim što djeluju lokalno, čine to i sistemski (Hamblin i sur., 2016). U koži se odvija proizvodnja melanina i vitamina D te sudjeluje u regulaciji tjelesne temperature (Soutor i Hordinsky, 2013).

Histološki, koža se sastoji od tri sloja – vanjskog sloja epidermisa čvrsto povezanog s vezivnim tkivom dermisa koji mu čini potporu. Ispod dermisa nalazi se rahlo vezivno tkivo – *subcutis* ili hipodermis (Weller i sur., 2015).



Slika 2. Struktura kože (Kummer, 2016)

1.3.1. Epidermis

Epidermis (Slika 2) čini vanjski sloj kože, a njegova debljina varira od 0,5 mm (očni kapak) pa sve do 1,5 mm (tabani i dlanovi) (Hamblin i sur., 2016). Epidermis je slojeviti skvamozni epitel koji je vezan za dermis na području bazalne membrane gdje se silazne projekcije (epidermalni grebeni) spajaju s uzlaznim projekcijama dermisa (dermalne papile). Epidermis ne sadrži krvne žile i živce (Weller i sur., 2015). Sastoji se uglavnom od keratinocita i melanocita, ali postoje i druge vrste stanica poput Langerhansovih i Merkelovih stanica. Epidermis je tkivo koje se neprestano obnavlja sa stanicama koje neprestano podilaze terminalnoj diferencijaciji i umiru, a cijeli proces regeneracije traje oko dva mjeseca (Hamblin i sur., 2016). Iako se mrtve površinske stanice neprestano ljušte, debljina kože ostaje konstantna zbog dijeljenja stanica u bazalnom sloju (Weller i sur., 2015).

Epidermis je organiziran u četiri sloja od kojih je najdonji, bazalni, naslonjen na bazalnu membranu, a djelomično je stvoren od stanica koje brzo proliferiraju. Sljedeći sloj je *stratum spinosum*, sloj u koji neke od prethodno spomenutih stanica prelaze kako bi se diferencirale, dok neke podliježu apoptozi koja je intrinzično programirana, ili je posljedica disbalansa signalnih molekula. *Stratum granulosum* je sljedeći vanjski sloj, a ujedno i zadnji koji sadrži žive stanice. Na kraju diferencijacije dolazi do prelaska keratinocita u mrtve korneocite (bez jezgre) koje čine površinski sloj kože. Taj rožnati sloj kože (*stratum corneum*) ujedno ima glavnu barijernu funkciju (Hamblin i sur., 2016).

1.3.2. Dermis

Dermis (Slika 2) je visoko prokrvljeni sloj kože koji sadrži kolagen i elastična vlakna i limfne žile i pruža dobru mehaničku potporu. Sadrži brojne stanice među kojima su fibroblasti koji su odgovorni za sintezu i obnovu ekstracelularnog matriksa i makrofage koji doprinose uklanjanju dijelova tkiva oštećenih raznim udarcima te eliminaciji štetnog materijala. Mjesto je gdje se nalaze žlijezde lojnice i folikuli vlasi (Baroni i sur., 2012).

Dermis se sastoji od dva sloja; površinskog tankog, papilarnog i debljeg retikularnog sloja. Papilarni dermis se nalazi ispod dermoepidermalne spojnice i u njemu se nalaze rahlo raspoređena vlakna kolagena. Retikularni dermis čine deblji svežnjevi kolagena koji se pružaju paralelno prema površini kože (Hamblin i sur., 2016).

1.3.3. Hipodermis

Unutarnji sloj kože, hipodermis (Slika 2), spremište je supkutanog masnog tkiva koje je aktivno u energetske metabolizmu i pohrani. Služi za zaštitu od mehaničkih udaraca te izolira tijelo od vanjske hladnoće i topline (Baroni i sur., 2012). Hipodermis se primarno sastoji od adipocita organiziranih u lobule. Živci, limfne žile i krv nalaze se u septi, fibroznom vezivnom tkivu. U supkutanom tkivu odvija se pretvorba androstendiona u estron djelovanjem aromataze, zbog čega ga se smatra endokrinim organom. Adipociti proizvode hormon leptin koji regulira tjelesnu težinu (Hamblin i sur., 2016).

1.4. Liposomi kao terapijski sustavi za topikalnu primjenu

Topikalna primjena lijeka podrazumijeva primjenu lijeka direktno na željeno mjesto djelovanja, u ovom slučaju na površinu kože. Učinkovitim topikalnom primjenom osigurava se viša koncentracija lijeka na mjestu djelovanja, a smanjuje sistemska apsorpcija i neželjene nuspojave (Jain i sur., 2016).

Uklapanjem slabo topljivog i slabo bioraspoloživog resveratrola (namijenjenog topikalnoj primjeni) u liposome poboljšana je njegova topljivost i pojačana su antioksidativna i antiinflamatorna svojstva resveratrola. Pokazano je da bi kitozanom obloženi liposomi s resveratrolom zbog dobrih mukoadhezivnih svojstava bili prikladni za vaginalnu primjenu (Jøraholmen i sur., 2015). Kao nosači djelatnih tvari liposomi su ispitivani i za primjenu fotosenzibilizatora u fotodinamičkoj terapiji. Uklapanjem u liposome poboljšana je topljivost fotosenzibilizatora te olakšana njegova penetracija u kožu (Dragicevic-Curic i Fahr, 2012).

Liposomska formulacija azitromicina za topikalnu primjenu istraživana je u svrhu liječenja kožne lišmanijaze s ciljem da bi lijek uklopljen u liposome mogao bolje prodrijeti do dermisa i djelovati protiv parazita u dermalnim makrofagima. Terapija se pokazala uspješnom pogotovo u papularnim lezijama te se preporučilo daljnje istraživanje ovakvog tipa formulacije (Rajabi i sur., 2016).

Izosorbidmononitrat uklopljen u liposome istraživan je topikalno u svrhu djelovanja na *Staphylococcus aureus* biofilm. Pokazalo se da izosorbidmononitrat ima jaki učinak protiv biofilma *S. aureusa*, a najbolji je učinak postignut većim udjelom lipida u unilamelarnim i multilamelarnim anionskim liposomima (Jardeleza i sur., 2014).

1.5. Azitromicin

Azitromicin (9-deoksi-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A) (Slika 3) je makrolid druge generacije i antibakterijski lijek širokog spektra. Mehanizam djelovanja je inhibicija sinteze bakterijskih proteina vezanjem na 50S veliku ribosomsku podjedinicu i interferencija s njenim stvaranjem te rastom polipeptidnog lanca. Iako ima jednaki mehanizam djelovanja kao i ostali makrolidi, značajno se više akumulira u fagocitima od ostalih makrolida i postiže visoke koncentracije na mjestu infekcije (Parnham i sur., 2014).

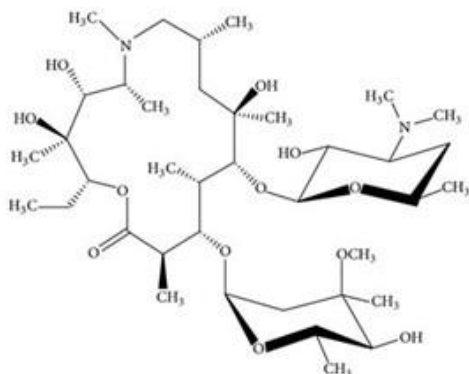
Bazičnost azitromicina razlog je boljem učinku protiv Gram-negativnih bakterija jer bolje penetrira kroz vanjsku membranu i ulazi u bakterije (Dinos i sur., 2011). Istraživanja su pokazala da azitromicin inhibira bakterijski oblik međustanične komunikacije, takozvani *quorum sensing* (Tateda i sur., 2011) te smanjuje stvaranje mukusa i biofilma (Hoffmann i sur., 2007). Indiciran je u liječenju respiratornih, kožnih, urogenitalnih i drugih bakterijskih infekcija i pokazuje imunomodulatorni učinak u kroničnim upalnim poremećajima.

Njegova povezanost s kardiovaskularnim događajima puno je istraživana, no pokazalo se da je rizik za kardiovaskularne nuspojave kod zdravih pojedinaca relativno mali, ali je povećan kod skupina koje su rizične (pacijenti s produljenim QT intervalom) pa ga se tada i u slučaju politerapije treba uzimati s oprezom (Parnham i sur., 2014).

Praktički je netopljiv u vodi, dobro topljiv u bezvodnom etanolu i metilenkloridu (Ph. Eur. 8.0, 2014).

Na tržištu u Republici Hrvatskoj jedini dostupan oblik za lokalnu primjenu su kapi za oči (Azyter® 15mg/g, Laboratoires Thea, Clermont-Ferrand, Francuska; Laboratoire Unither, Coutances Cedex, Francuska). Ostali dostupni pripravci su prašci za oralnu suspenziju,

filmom obložene tablete, tvrde kapsule, prašak za koncentrat za otopinu za infuziju i tablete za oralnu suspenziju (<http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/>).

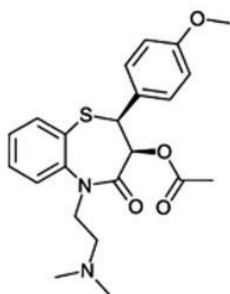


Slika 3. Struktura azitromicina (Rivulgo i sur., 2013)

1.6. Diltiazemklorid

Diltiazemklorid je blokator kalcijevih kanala koji se koristi u liječenju *angine pectoris* i hipertenzije (Desai i Rohera, 2014). Blokatori kalcijevih kanala propisuju se i za liječenje aritmije, a mehanizam djelovanja im je blokada kalcijevih kanala tipa L u srčanom i vaskularnom mišićnom tkivu pa djeluju negativno inotropno, dromotropno, kronotropno i smanjuju žilni tonus. Diltiazem (Slika 4) spada u skupinu benzotiazepina (Mann, 2014). Diltiazem se topikalno koristi za liječenje analne fisure, ulkusa lociranog u mukozi nižeg dijela analnog kanala. Najčešće se koristi 2%-tna mast koja se nanosi dva puta dnevno na oboljelo područje kroz razdoblje od 6 do 8 tjedana. Pokazalo se da je topikalna terapija učinkovitija i podnošljivija od oralne terapije. Nuspojave uključuju glavobolju i svrbež u području anusa (Higuero, 2015).

Na tržištu u Republici Hrvatskoj nisu dostupni pripravci za lokalnu primjenu. Dostupni oblici su tablete od 60 mg i 90 mg (Aldizem®, Alkaloid - int d.o.o., Ljubljana, Slovenija) (<http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/>).



Slika 4. Struktura diltiazema (Shah i sur., 2012)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Fizikalno-kemijska svojstva liposoma (promjer, indeks polidisperznosti, površinski naboj, elastičnost/rigidnost membrane) značajno doprinose profilu oslobađanja uklopljenog lijeka, stabilnosti liposoma tijekom uskladištenja i u biološkom okruženju, penetraciji kroz epidermalne/mukozne barijere te interakcijama sa stanicama i mikroorganizmima. Stoga je fizikalno-kemijska karakterizacija neophodna u razvoju svake liposomske formulacije lijeka jer posredno određuje i terapijsku učinkovitost nove formulacije.

Ispitivanje membranske elastičnosti od posebnog je interesa u razvoju liposomskih formulacija namijenjenih primjeni na kožu i sluznice.

Cilj ovog rada bio je provesti fizikalnu karakterizaciju liposomskih formulacija s uklopljenim lipofilnim ili hidrofilnim lijekom (azitromicin ili diltiazemklorid) različitog (fosfo)lipidnog sastava. Poseban naglasak stavljen je na ispitivanje membranske elastičnosti budući da su formulacije namijenjene primjeni na kožu i sluznicu. Željelo se utvrditi kako fosfolipidni sastav liposoma, prisustvo surfaktanta ili suotapala u liposomima utječe na fizikalna svojstva liposoma: veličinu, naboj na površini te elastičnost/rigidnost njihovih dvoslojeva.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

Kemikalije i pribor:

- Fosfatidilkolin (Lipoid S75) (Lipoid GmbH, Njemačka)
- Phospholipon H (Lipoid GmbH, Njemačka)
- Natrijev deoksikolat (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Dimetildioktadecilamonijev bromid (DODAB) (Lipoid GmbH, Njemačka)
- Dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC) (Lipoid GmbH, Njemačka)
- Azitromicin (u obliku dihidrata) (PLIVA d.o.o., Hrvatska)
- Propilenglikol (Alkaloid, Makedonija)
- Diltiazemklorid (Fagron, Barsbüttel, Belgija)
- 96 vol% etanol (Kemika, Hrvatska)
- Fosfatni pufer pH 7.5
- Fosfatni pufer pH 6.8
- Ultrazvučna kupelj (Branson 1210, Emerson, Sjedinjene Američke Države)
- Ručni mini-ekstruder (LipsoFast Basic®, Avestin Inc., Kanada)
- Polikarbonatne membrane veličine pora 400 i 100 nm (Liposofast, Avestin, Canada)
- Filteri veličine pora 0.45 μm (Minisart, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Njemačka)
- Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija)
- Vakuumski rotacijski uparivač (Buchi Rotavapor R-200, Büchi Labortechnik AG, Švicarska)

Fosfatni pufer pH 7,5 (0,01 M) pripremljen je otapanjem 1,3609 g KH_2PO_4 u demineraliziranoj vodi do 1000 ml. Za podešavanje pH vrijednosti korišten je 10 M KOH.

Fosfatni pufer pH 6,8 pripremljen je otapanjem 1g KH_2PO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvatska), 2,0 g K_2HPO_4 i 8,5 g NaCl u demineraliziranoj vodi do 1000 ml. Izmjereni pH iznosio je 6,8 te nije bilo potrebno podešavanje pH vrijednosti.

3.2. Metode

3.2.1. Priprava liposoma

3.2.1.1. Priprava liposoma s azitromicinom

Liposomi s azitromicinom pripremljeni su metodom hidratacije suhog fosfolipidnog sloja (film metoda) (Vanić, 2012b).

Za pripravu konvencionalnih, deformabilnih, propilenglikol i kationskih liposoma s azitromicinom odvagane su odgovarajuće količine (fosfo)lipida, surfaktanta i azitromicina (Tablica 2) u čašici od 25 ml. Krutine su otopljene u 2 ml apsolutnog etanola (96 vol%) uz soniciranje na ultrazvučnoj kupelji te potom, kvantitativno, uz ispiranje s (2 ml etanola) prenesene u tikvicu okruglog dna (100 ml). Etanol je uparen na vakuumskom rotacijskom uparivaču pri 40 °C (za konvencionalne, deformabilne i propilenglikolske liposome), odnosno 60 °C (za kationske liposome) do stvaranja tankog filma lipida na stijenci tikvice. Tanki lipidni sloj je zatim hidratiziran s 5 ml fosfatnog pufera pH 7,5 (konvencionalni, deformabilni i kationski liposomi), odnosno 5 ml 30%-tnog propilenglikola u fosfatnom puferu pH 7,5 (propilenglikol liposomi), protresivanjem tikvice na sobnoj temperaturi. Za pripravu kationskih liposoma, korišteno je 5 ml pufera, pH 7,5 prethodno zagrijanog na 60 °C. Postupak hidratacije proveden je na protresivanjem filma na 60 °C.

Tablica 2. Sastav liposoma s azitromicinom

Liposomi	SPC (mg)	SDCh (mg)	DODAB (mg)	DPPC (mg)	Azitromicin (mg)
Konvencionalni	100	-	-	-	15
Deformabilni	85	15	-	-	15
Propilenglikol	85	-	-	-	15
Kationski	-	-	27	73	15

DODAB, dimetildioctadecilamonij bromid; DPPC, dipalmitoilfosfatidilkolin;

SDCh, natrijev deoksikolat; SPC, sojin fosfatidilkolin (Lipoid S75).

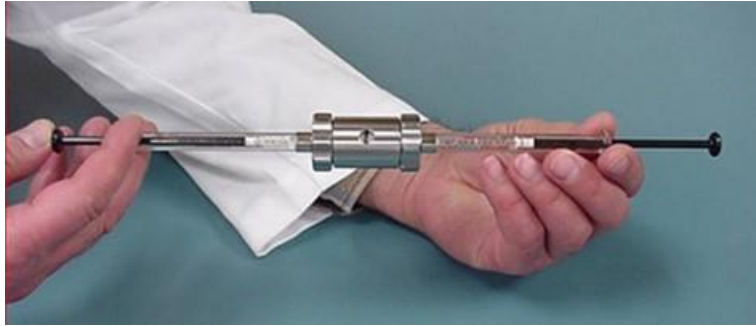
3.2.1.2. Priprava propilenglikol liposoma s diltiazemkloridom

Propilenglikol liposomi s diltiazemkloridom pripremljeni su metodom razrjeđenja poliola (Pavelić i sur., 2001). Fosfatidilkolin (125 mg) je otopljen u 0,5 g propilenglikola miješanjem na magnetskoj mješalici uz blago zagrijavanje (50 °C). Zatim je dodano 2,5 ml prethodno pripremljene otopine diltiazemklorida (0,5g/5ml, odmjerna tikvica) uz intenzivno miješanje (600 okretaja/min). Nastala homogena viskozna disperzija je potom razrjeđivana polaganim dodavanjem fosfatnog pufera (pH 6,8) uz neprekidno miješanje na magnetskoj mješalici tijekom 30-ak minuta, a zatim ostavljena još 3 sata na sobnoj temperaturu da se u potpunosti hidratizira. Ukupan volumen liposomske disperzije iznosio je 5 ml (prilagođeno prema Pepić, 2017).

3.2.1.3. Priprava konvencionalnih liposoma s diltiazemkloridom

Konvencionalni liposomi s diltiazemkloridom pripremljeni su proliposomskom metodom (Pavelić i sur., 2001). Fosfatidilkolin (110 mg) i Phospholipon H (15 mg) su otopljeni u 0,3 g 96 vol% etanola miješanjem na magnetnoj mješalici uz blago zagrijavanje do 50 °C. Zatim je naglo dodano 0,5 ml prethodno pripremljene otopine diltiazemklorida (0,5g/5ml, odmjerna tikvica) uz intenzivno miješanje (600 okretaja/minuta). Proliposomska disperzija ohlađena je na sobnu temperaturu i postepeno razrjeđivana na magnetnoj mješalici (600 okretaja/minuta) dokapavanjem fosfatnog pufera (pH 6,8) do ukupno 5 ml. Liposomska disperzija miješana je tijekom narednih 45 minuta na mješalici, a zatim ostavljena još 3 sata na sobnoj temperaturi da se u potpunosti hidratizira (prilagođeno prema Pepić, 2017).

Sve su liposomske disperzije (azitromicin i diltiazemklorid) homogenizirane korištenjem ručnog mini-ekstrudera (Slika 5). Ekstruzija je provedena tri puta kroz polikarbonatne membranske filtere promjera pora 400 nm (liposomi s diltiazemkloridom i azitromicinom). Liposomi s azitromicinom su dodatno ekstrudirani (jedanput) kroz filtere promjera pora 100 nm.



Slika 5. Ručni mini ekstruder (<http://www.avestin.com/>)

Liposomske disperzije su pohranjene u hladnjak (4 °C). Prije ispitivanja su termostatirane na sobnoj temperaturi, a kationski liposomi su dodatno zagrijani na temperaturu 50-60 °C.

3.2.2. Mjerenje veličine i indeksa polidisperznosti liposoma

Srednji promjer i indeks polidisperznosti liposoma izmjereni su metodom fotonske korelacijske spektroskopije (PCS). Mjerenje je izvršeno na 25 °C na uređaju Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija). Uzorak je pripremljen u kiveti razrjeđivanjem 80 µl liposomske disperzije s 1 mM otopinom NaCl prethodno profiltriranom kroz Minisart filter veličine pora 0,45 µm kako bi se spriječilo mjerenje potencijalnih onečišćenja iz otopine NaCl-a ili vanjske vodene faze liposoma. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 3 uzastopna mjerenja.

3.2.3. Mjerenje zeta potencijala

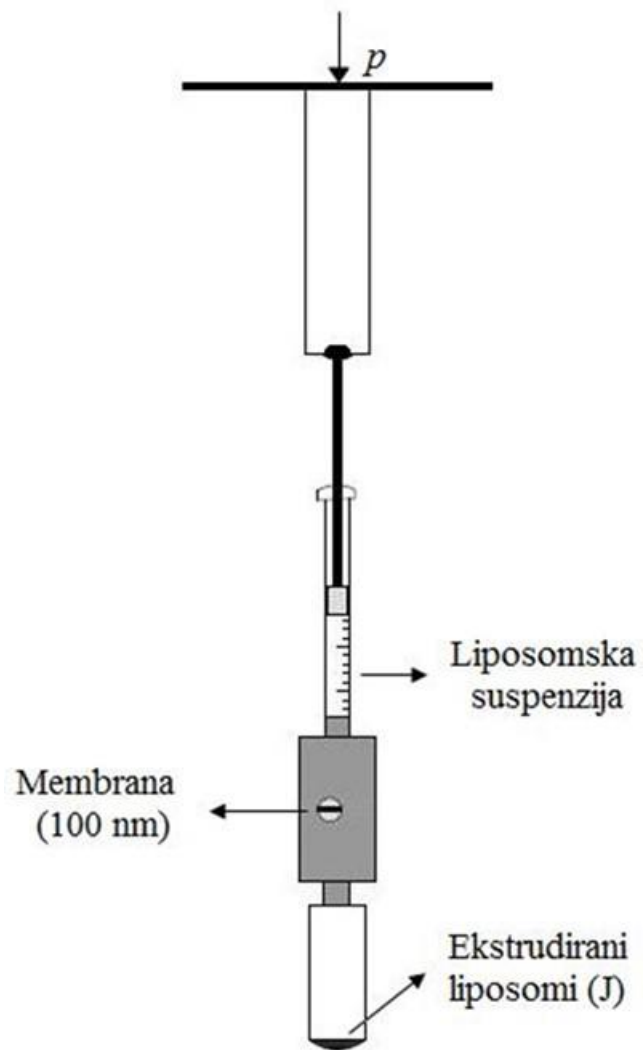
Zeta potencijal liposoma različitog lipidnog sastava i uklopljene djelatne tvari izmjeren je na uređaju Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija). Prije mjerenja provedena je kalibracija uređaja mjerenjem zeta potencijala standarda (Malvern, Zeta Potential Standard $-42 \pm 4,2$ mV). Mjerenje je izvršeno pri sobnoj temperaturi, a uzorak je pripremljen razrjeđivanjem liposomske disperzije s 1 mM otopinom NaCl u čašici od 10 ml. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 6 uzastopnih mjerenja.

3.2.4. Mjerenje membranske elastičnosti liposoma

Ispitivanja membranske elastičnosti konvencionalnih, deformabilnih, propilenglikolskih i kationskih liposoma s azitromicinom te konvencionalnih i propilenglikolskih liposoma s diltiazemkloridom provedena su kontinuiranom ekstruzijom liposomskih disperzija kroz

polikarbonatne membrane promjera pora 100 nm tijekom 5 minuta pri konstantnom tlaku od 2,5 bara. Shematski prikaz uređaja prikazan je Slikom 6.

Kationski liposomi su prije ispitivanja termostimirani na 60 °C.



Slika 6. Shematski prikaz uređaja za mjerenje membranske elastičnosti (Đivanović, 2013)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Srednji promjeri i indeksi polidisperznosti liposoma s azitromicinom i diltiazemkloridom

Srednji promjeri različitih tipova liposoma s azitromicinom i diltiazemkloridom prikazani su Tablicom 3 dok su indeksi polidisperznosti prikazani Tablicom 4.

Tablica 3. Srednji promjeri različitih tipova liposoma s azitromicinom i diltiazemkloridom, prije i nakon ekstruzije

Djelatna tvar	Srednji promjer (nm)		
	Tip liposoma	Prije ekstruzije	Nakon ekstruzije
Azitromicin	Konvencionalni	635 ± 62	137 ± 2
	Deformabilni	472 ± 20	113 ± 1
	Propilenglikol	699 ± 8	142 ± 3
	Kationski	1628 ± 33	319 ± 63
Diltiazemklorid	Konvencionalni	712,3 ± 18,5	233,4 ± 0,8
	Propilenglikol	653,5 ± 6,2	207,4 ± 1,8

Liposomi s azitromicinom pripremljeni su film metodom dok su liposomi s diltiazemkloridom pripremljeni proliposomskom i metodom razrjeđenja poliola. Rezultati prikazani Tablicom 3 pokazuju da je srednji promjer za sve liposome, neovisno o uklopljenoj djelatnoj tvari, bio u rasponu 470 do 712 nm. Jedini izuzetak predstavljaju kationski liposomi s azitromicinom čiji je srednji promjer bio značajno najveći od svih ispitivanih uzoraka (1628 nm).

Film metoda karakteristična je po stvaranju izrazito velikih multilamelarnih liposoma (do 20-ak μm) heterogene distribucije veličina (Vanić, 2012b). Premda usporedba srednjih promjera liposoma, pripremljenih različitim metodama, ne ukazuje na značajne razlike u veličini liposoma, neophodno je sagledati pripadajuće vrijednosti indeksa polidisperznosti (Tablica 4) koji su mjera homogenosti, odnosno heterogenosti disperzija čestica.

Tablica 4. Indeksi polidisperznosti različitih tipova liposoma s azitromicinom i diltiazemkloridom, prije i nakon ekstruzije

Indeks polidisperznosti			
Djelatna tvar	Tip liposoma	Prije ekstruzije	Nakon ekstruzije
Azitromicin	Konvencionalni	0,91 ± 0,08	0,10 ± 0,01
	Deformabilni	0,81 ± 0,11	0,13 ± 0,04
	Propilenglikol	1,00 ± 0,00	0,19 ± 0,03
	Kationski	1,00 ± 0,00	0,43 ± 0,10
Diltiazemklorid	Konvencionalni	0,569 ± 0,073	0,275 ± 0,014
	Propilenglikol	0,473 ± 0,082	0,235 ± 0,025

Rezultati prikazani Tablicom 4 jasno pokazuju izrazito visoke vrijednosti indeksa polidisperznosti liposoma s azitromicinom (0,81-1), dok su obje preparacije liposoma s diltiazemkloridom imale značajno niži indeks polidisperznosti (< 0,57). Stoga je očito da se o veličini liposoma ne može raspravljati jedino na osnovu izmjerenih vrijednosti srednjih promjera već se u obzir moraju uzeti i pripadajući indeksi polidisperznosti.

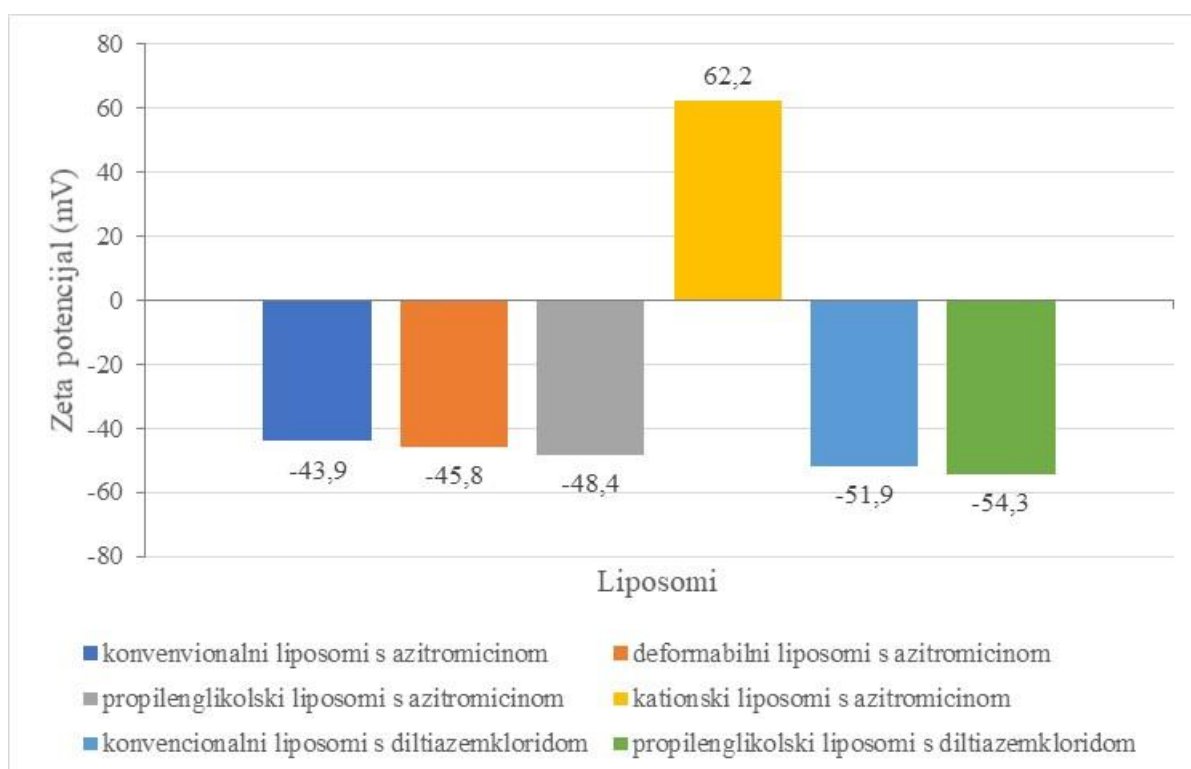
Provedena homogenizacija svih liposomskih disperzija (obje djelatne tvari) rezultirala je značajno nižim srednjim promjerima (Tablica 3) i indeksima polidisperznosti (Tablica 4). Budući su liposomi s azitromicinom bili dodatno ekstrudirani kroz membrane od 100 nm (za razliku od liposoma s diltiazemkloridom), njihovi srednji promjeri su bili očekivano niži od srednjih promjera liposoma s diltiazemkloridom (Tablica 3).

Usporedba različitih tipova liposoma s azitromicinom pokazuje najmanji promjer deformabilnih liposoma, što je u skladu s postojećom literaturom (Elsayed i sur., 2007; Vanić i sur., 2013). Najveći među ispitivanim liposomima s azitromicinom su bili kationski liposomi, što je vjerojatno posljedica temperature na kojoj su provedena mjerenja srednjeg promjera i indeksa polidisperznosti (25 °C). Konvencionalni liposomi su bili sličnog srednjeg promjera (137 nm) kao i propilenglikol liposomi (142 nm).

Među liposomima s diltiazemkloridom, elastični propilenglikol liposomi su bili manjeg srednjeg promjera (207 nm) i indeksa polidisperznosti (0,233) od konvencionalnih liposoma (233 nm; 0,285).

4.2. Zeta potencijali liposoma s azitromicinom i diltiazemkloridom

Zeta potencijali različitih tipova liposoma (Slika 7) u skladu su s njihovim fosfolipidnim sastavom. Anionski liposomi s azitromicinom bili su sličnog zeta potencijala (-44 do -48 mV), dok su neznatno niže vrijednosti imali liposomi s diltiazemkloridom (-52 do -54 mV). Kationski liposomi s azitromicinom karakterizirani su izrazito visokim zeta potencijalom (+62 mV) koji je posljedica prisutnog kationskog lipida (DODAB) u membrani liposoma.



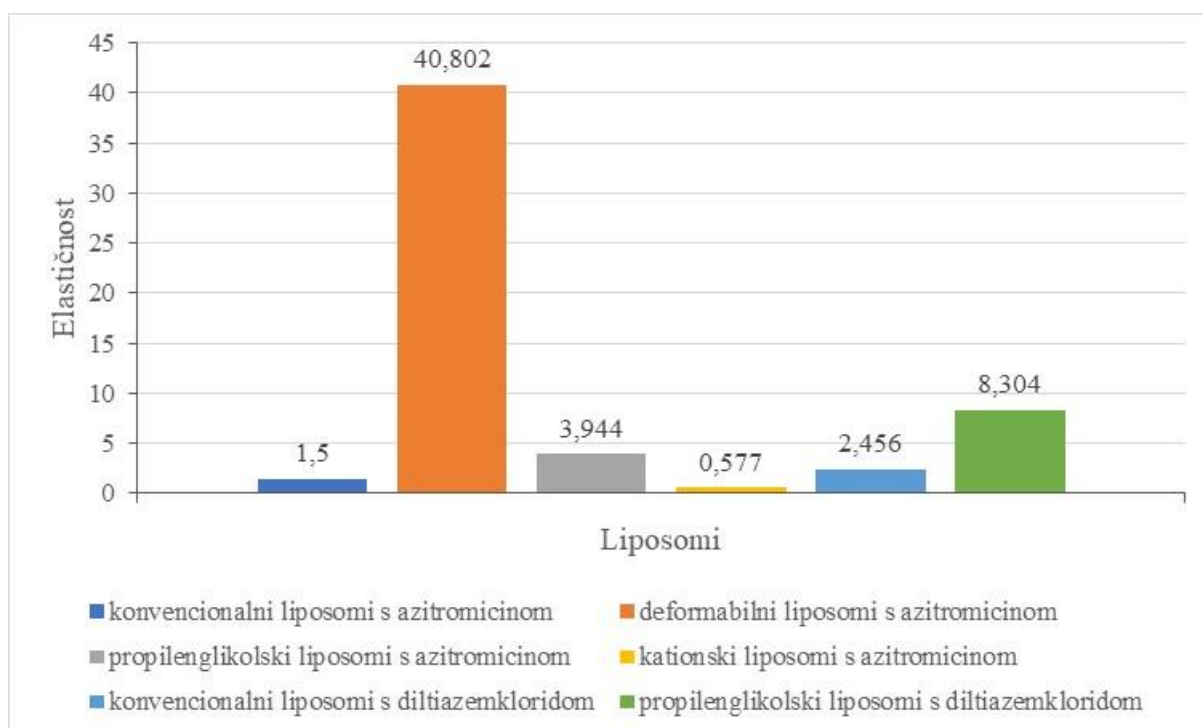
Slika 7. Zeta potencijal različitih liposomskih preparacija

Imajući u vidu odnos zeta potencijala i stabilnosti suspenzija, dobiveni rezultati (Slika 7) ukazuju na formiranje fizički stabilnih anionskih i kationskih liposoma.

Viskoznost, pH, ionska jakost otopine/disperzije, temperatura, pa čak i najmanje promjene u površini liposoma mogu utjecati na vrijednosti zeta potencijala (Smith i sur., 2017). Stoga bi, imajući u vidu put primjene i svojstva površine (tkiva) na koju bi se liposomi primjenjivali, bilo zanimljivo provesti daljnja ispitivanja/mjerenja zeta potencijala u različitim uvjetima kako bi se moglo predvidjeti ponašanje čestica u *in vivo* uvjetima.

4.3. Elastičnost (fosfo)lipidnih dvoslojeva liposoma

Ispitivanja membranske elastičnosti različitih tipova elastičnih i konvencionalnih liposoma s različitim djelatnim tvarima provedena su na način detaljno opisan u poglavlju 3.2.4., a rezultati provedenih ispitivanja prikazani su Slikom 8 i Tablicom 5.



Slika 8. Elastičnost različitih tipova liposoma s azitromicinom i diltiazemkloridom

Rezultati prikazani Slikom 8 i Tablicom 5 pokazuju najveću elastičnost deformabilnih liposoma s azitromicinom, koja je gotovo 40 puta veća od izmjerene vrijednosti membranske elastičnosti konvencionalnih liposoma s azitromicinom.

Najmanje su bili elastični kationski liposomi, gotovo 80 puta manje u odnosu na deformabilne.

Usporedba konvencionalnih i propilenglikolskih liposoma s azitromicinom i onih s diltiazemkloridom pokazuje da su liposomi s diltiazemkloridom elastičniji od liposoma s azitromicinom istog lipidnog sastava, propilenglikolski čak dvostruko više (Slika 8). Stoga je očito da lipofilnost uklopljenog lijeka utječe na elastičnost liposoma.

Tablica 5. Ispitivani parametri membranske elastičnosti različitih tipova liposoma

		Prije ispitivanja elastičnosti		Nakon ispitivanja elastičnosti			
Djelatna tvar	Tip liposoma	Srednji promjer (nm)	Indeks polidisperznosti (PDI)	Srednji promjer (nm)	Indeks polidisperznosti (PDI)	J (g)	E
Azitromicin	Konvencionalni	174,7 ± 2,3	0,199 ± 0,052	140,5 ± 0,6	0,125 ± 0,015	0,76	1,5
	Deformabilni	166,1 ± 1,4	0,090 ± 0,053	132,5 ± 0,9	0,048 ± 0,017	18,63	40,802
	Propilenglikolski	141,6 ± 0,8	0,132 ± 0,018	122,7 ± 0,4	0,104 ± 0,011	3,56	3,944
	Kationski	856,6 ± 267,1	1,000 ± 0,000	238,6 ± 189,7	1,000 ± 0,000	0,03	0,577
Diltiazemklorid	Konvencionalni	247,6 ± 2,6	0,201 ± 0,016	178,6 ± 2,3	0,091 ± 0,012	0,77	2,456
	Propilenglikolski	226,7 ± 4,8	0,228 ± 0,13	170,7 ± 2,4	0,121 ± 0,017	2,85	8,304

E, stupanj membranske elastičnosti liposoma; J, količina ekstrudiranih liposoma; n=3.

Ispitivanja provedena s propilenglikolskim liposomima pokazala su da propilenglikol značajno doprinosi elastičnosti liposoma, u usporedbi s konvencionalnim liposomima istog fosfolipidnog sastava. Premda bi bilo za očekivati da će povećanjem udjela propilenglikola elastičnost rasti, naprotiv, povećanjem udjela propilenglikola u formulaciji liposoma elastičnost liposoma opada (Palac i sur., 2014). Stoga je veći udio propilenglikola (30%) u liposomima s azitromicinom dodatni razlog manjoj elastičnosti u usporedbi s liposomima s diltiazemkloridom (10% propilenglikola).

Analiza izmjerenih parametara elastičnosti (Tablica 5) pokazuje da je stupanj membranske elastičnosti liposoma (E) veći, što je masa ekstrudiranih liposoma (J) veća. Takvu ovisnost moguće je objasniti samim time što će liposomi koji su elastičniji lakše proći kroz membranu određene dimenzije pora u zadanom vremenu jer će zbog deformacije membrane pod utjecajem tlaka brže prolaziti kroz membranu za ispitivanje.

Osim mase ekstrudiranih liposoma (J), na elastičnost značajno utječe i srednji promjer liposoma (r_v) nakon protiskivanja ispitivane liposomske disperzije kroz membranu odgovarajuće veličine pora (r_p). Međutim, provedena ispitivanja pokazala su manju ovisnost E o r_v , te je elastičnost najvećim dijelom bila ovisna o masi ekstrudiranih liposoma (J).

Elastični liposomi imaju bolju sposobnost dopreme lijeka u niže dijelove epidermisa i u dermis u odnosu na konvencionalne liposome (Vanić i sur., 2015). Stoga bi deformabilni liposomi bili prikladni za daljnja istraživanja u svrhu primjene formulacije za dostavu uklopljene djelatne tvari u dublje slojeve kože ili sluznice, dok bi konvencionalni bili prikladni za dostavu u površinske slojeve kože, tj. sluznice.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu provedenih ispitivanja i analize dobivenih rezultata, donose se slijedeći zaključci:

- metoda pripreme i fosfolipidni sastav liposoma značajno utječu na fizikalna svojstva liposoma
- film metodom dobiveni su liposomi značajno većeg indeksa polidisperznosti od liposoma pripremljenih proliposomskom i metodom razrjeđenja poliola
- provedena ekstruzija različitih tipova liposoma s uklopljenim azitromicinom i diltiazemkloridom rezultirala je značajno nižim srednjim promjerima i indeksima polidisperznosti
- zeta potencijali ispitivanih anionskih i kationskih liposoma ukazuju na formiranje fizički stabilnih liposomskih disperzija
- stupanj membranske elastičnosti liposoma određen je fosfolipidnim sastavom liposoma te prisustvom surfaktanta ili suotapala
- najveći stupanj membranske elastičnosti pokazali su deformabilni liposomi s azitromicinom, dok su kationski liposomi karakterizirani izrazito čvrstim (rigidnim) membranama
- lipofilnost uklopljenog lijeka i udio suotapala značajno doprinose elastičnosti liposoma (propilenglikol liposomi s azitromicinom i većim udjelom propilenglikola su bili manje elastični od propilenglikol liposoma s diltiazemkloridom i manjim udjelom propilenglikola).
- stupanj membranske elastičnosti liposoma je bio najvećim dijelom ovisan o masi ekstrudiranih liposoma, a manjim o promjeru ekstrudiranih liposoma.

Rezultati provedenih ispitivanja pružaju dobru osnovu za daljnja *in vitro* ispitivanja: oslobađanje uklopljene djelatne tvari, stabilnosti formulacija tijekom uskladištenja, permeabilnosti kroz epidemalne barijere i interakcije s komponentama iz biološkog okruženja.

6. Literatura

Ahmed TA. Preparation of transfersomes encapsulating sildenafil aimed for transdermal drug delivery: Plackett–Burman design and characterization. *J Liposome Res*, 2015, 25, 1-10.

Azanza JR, Sádaba B, Reis J. Liposomal formulations of amphotericin B: differences according to the scientific evidence. *Rev Esp Quim*, 2015, 28, 275-281.

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

Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol*, 2012, 30, 257–262.

Baza lijekova, dostupno na <http://www.halmed.hr/>, pristup 24.07.2018.

Desai SR, Rohera BD. Formulation, in vitro evaluation and study of variables on tri-layered gastro-retentive delivery system of diltiazem HCl. *Drug Dev Ind Pharm.*, 2014, 40, 380-389.

Dinos GP, Michelinaki M, Kalpaxis DL. Insights into the mechanism of azithromycin interaction with an Escherichia coli functional ribosomal complex. *Mol Pharmacol*, 2001, 59, 1441–1445.

Dragicevic-Curic N, Fahr A. Liposomes in topical photodynamic therapy. *Expert Opin Drug Del*, 2012, 9, 1015-1032.

Đivanović M. Ispitivanje membranske elastičnosti fosfolipidnih vezikula s klotrimazolom, diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2013, str. 1-14

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

European Pharmacopoeia 8.0. Strasbourg, Council of Europe, 2014., str. 1610

Giacometti G, Marini M, Papadopoulos K, Ferreri C, Chatgialloglu C. trans-Double Bond-Containing Liposomes as Potential Carriers for Drug Delivery. *Molecules*, 2017, 22, 2082.

Gillet A, Compère P, Lecomte F, Hubert P, Ducata E, Evrarda B, Piel G. Liposome surface charge influence on skin penetration behaviour, *Int J Pharm*, 2011, 411, 223–231.

González-Rodríguez ML, Arroyo CM, Cózar-Bernal MJ, González-R PL, León JM, Calle M, Canca D, Rabasco AM. Deformability properties of timolol-loaded transfersomes based on the extrusion mechanism. Statistical optimization of the process. *Drug Dev Ind Pharm*, 2016, 42, 1683-1694.

Hamblin MR, Avci P, Prow TW. *Nanoscience in Dermatology*, Elsevier, 2016, str. 1-8

Higuero T. Update on the management of anal fissure. *J Visc Surg*, 2015, 152, 37-43.

Hoffmann N, Lee B, Hentzer M, Rasmussen TB, Song Z, Johansen HK, Givskov M, Høiby N. Azithromycin blocks quorum sensing and alginate polymer formation and increases the sensitivity to serum and stationary-growth-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa* and attenuates chronic *P. aeruginosa* lung infection in Cfr(-/-) mice. *Antimicrob Agents Ch*, 2007, 51, 3677–3687.

Jain S, Patel N, Shah MK, Khatri P, Vora N. Recent Advances in Lipid-Based Vesicles and Particulate Carriers for Topical and Transdermal Application. *J Pharm Sci*, 2017, 106, 423-445.

Jardeleza C, Rao S, Thierry B, Gajjar P, Vreugde S, Prestidge CA, Wormald PJ. Liposome-Encapsulated ISMN: A Novel Nitric Oxide-Based Therapeutic Agent against *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLoS ONE*, 2014, 9, e92117.

Jøraholmen MW, Škalko-Basnet N, Acharya G, Basnet P. Resveratrol-loaded liposomes for topical treatment of the vaginal inflammation and infections. *Eur J Pharm Sci*, 2015, 79, 112-121.

Kianvash N, Bahador A, Pourhajibagher M, Ghafari H, Nikoui V, Rezayat SM, Dehpour AR, Partoazar A. Evaluation of propylene glycol nanoliposomes containing curcumin on burn wound model in rat: biocompatibility, wound healing, and anti-bacterial effects. *Drug Deliv Transl Re*, 2017, 7, 654-663.

Körbel JN, Sebok B, Kerényi M, Mahrle G. Enhancement of the antiparakeratotic potency of calcitriol and tacalcitol in liposomal preparations in the mouse tail test. *Skin Pharmacol Appl*, 2001, 14, 291-295.

Kulkarni SB, Betageri GV, Singht M. Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes. *J Microencapsul*, 1995, 12, 229-246.

Kummer N. Alternative sampling strategies to monitor alcohol consumption in case of driver's licence regranting, Doctoral Dissertation, University of Lausanne, 2016, str. 26

Li Y, Cui XL, Chen QS, Yu J, Zhang H, Gao J, Sun DX, Zhang GQ. Cationic liposomes induce cytotoxicity in HepG2 via regulation of lipid metabolism based on whole-transcriptome sequencing analysis. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2018, 19, 43.

Lin H, Xie Q, Huang X, Ban J, Wang B, Wei X, Chen Y, Lu Z. Increased skin permeation efficiency of imperatorin via charged ultradeformable lipid vesicles for transdermal delivery. *Int J Nanomed*, 2018, 13, 831–842.

LiposoFast-Basic, <http://www.avestin.com>, pristupljeno 04.08.2018.

Mandlik SK, Siras SS, Birajdar KR. Optimization and characterization of sertaconazole nitrate flexisomes embedded in hydrogel for improved antifungal activity. *J Liposome Res*, 2017, 4, 1-11.

Mann S. Management of calcium channel blocker overdose. *Emerg Nurse*, 2014, 21, 36-39.

Mezei M, Gulasekharam V. Liposomes--a selective drug delivery system for the topical route of administration. Lotion dosage form. *Life Sci*, 1980, 26, 1473-1477.

Mishra D, Garg M, Dubey V, Jain S, Jain NK. Elastic Liposomes Mediated Transdermal Delivery of an Anti-Hypertensive Agent: Propranolol Hydrochloride. *J Pharm Sci*, 2007, 96, 145-155.

Nava G, Piñón E, Mendoza L, Mendoza N, Quintanar D, Ganem A. Formulation and in Vitro, ex Vivo and in Vivo Evaluation of Elastic Liposomes for Transdermal Delivery of Ketorolac Tromethamine. *Pharmaceutics*, 2011, 3, 954-970.

Palac Z, Engesland A, Flaten GE, Škalko-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. *J Liposome Res*, 2014, 24, 313-322.

- Panahi Y, Farshbaf M, Mohammadhosseini M, Mirahadi M, Khalilov R, Saghfi S, Akbarzadeh A. Recent advances on liposomal nanoparticles: synthesis, characterization and biomedical applications. *Artif Cell Nanomed B*, 2017, 45, 788-799.
- Parnham MJ, Erakovic Haber V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Perletti G, Verleden GM, Vos R. Azithromycin: Mechanisms of action and their relevance for clinical applications. *Pharmacol Therapeut*, 2014, 143, 225–245.
- Pavelić Ž, Škalko-Basnet N, Schubert R. Liposomal gels for vaginal drug delivery. *Int J Pharm*, 2001, 219, 139–149.
- Pepić I. In vitro ispitivanja oslobađanja diltiazemklorida iz liposomskih gelova, diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2017, str. 1-29.
- Rajabi O, Layegh P, Hashemzadeh S, Khoddami M. Topical liposomal azithromycin in the treatment of acute cutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther*, 2016, 29, 358–363.
- Rivulgo V, Sparo M, Ceci M, Fumuso E, Confalonieri A, Delpech G, Bruni S. Comparative Plasma Exposure and Lung Distribution of Two Human Use Commercial Azithromycin Formulations Assessed in Murine Model: A Preclinical Study. *Biomed Res Int*, 2013, 1-5.
- Sandeep K, Sunilkumar KT, Sudheer B, Mohanvarma M. Liposomal drug delivery system - A Comprehensive Review. *Int J Drug Dev & Res*, 2013, 5, 62-75.
- Schäfer-Korting M, Korting HC, Ponce-Poschl E. Liposomal tretinoin for uncomplicated acne vulgaris. *J Clin Invest*, 1994, 72, 1086-1091.
- Shah KU, Khan GM, Shah SU, Asim.ur R, Arshad K. Controlled Release Drug Delivery Systems Containing Diltiazem HCl: Effect of Polymer Concentration on In Vitro Drug Release Profiles. *Lat Am J Pharm*, 2012, 31, 1399-1405.
- Singh S, Vardhan H, Kotla NG, Maddiboyina B, Sharma D, Webster TJ. The role of surfactants in the formulation of elastic liposomal gels containing a synthetic opioid analgesic. *Int J Nanomed*, 2016, 11, 1475–1482.
- Smith MC, Crist RM, Clogston JD, McNeil SE. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409, 5779-5787.

Soutor C, Hordinsky M. *Clinical Dermatology*, Lange, 2013, str. 1

Tateda K, Comte R, Pechere JC, Kohler T, Yamaguchi K, Van Delden C. Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Ch*, 2001, 45, 1930–1933.

Tomori Y, Iijima N, Hinuma S, Ishii H, Takumi K, Takai S, Ozawa H. Morphological Analysis of Trafficking and Processing of Anionic and Cationic Liposomes in Cultured Cells. *Acta Histochem Cytoc*, 2018, 51, 81–92.

Tsai MJ, Huang YB, Fang JW, Fu YS, Wu PC. Preparation and Characterization of Naringenin-Loaded Elastic Liposomes for Topical Application. *PLoS ONE*, 2015, 10, e0131026.

Tyagi RK, Garg NK, Dalai SK, Awasthi A. Transdermal immunization of *P. falciparum* surface antigen (MSP-119) via elastic liposomes confers robust immunogenicity. *Hum Vacc Immunother*, 2016, 12, 990-992.

Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: metode priprave. *Farm Glasnik*, 2012, 68, 457-466.

Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: strukturna svojstva i klasifikacija. *Farm Glasnik*, 2012, 68, 391-400.

Vanić Ž, Holsæter AM, Škalko-Basnet N. (Phospho)lipid-based nanosystems for skin administration. *Curr Pharm Design*, 2015, 21, 4174-4192.

Vanić Ž, Škalko-Basnet N. Mucosal nanosystems for improved topical drug delivery: vaginal route of administration. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2014, 24, 435-444.

Wei-Ze L, Xu-Liang H, Ning Z, Wen-Xia H, Xi-Feng Z, Qian Z, Yu-E W, Yong-Qiang Z, Yu-Chuan C, Yong-Hua Y, Li-Na F, Ji-Lei Z, Hong-Yu W, Chun-Jing D. Propylene glycol-embodied deformable liposomes as a novel drug delivery carrier for vaginal fibraurette delivery applications. *J Control Release*, 2016, 226, 107-114.

Weller R, Hunter H, Mann M. *Clinical Dermatology Fifth Edition*, Wiley Blackwell, 2015, str. 1,7

7. Sažetak

Svrha ovog rada bila je provesti fizikalnu karakterizaciju različitih tipova liposoma s uklopljenim lipofilnim ili hidrofilnim lijekom (azitromicin ili diltiazemklorid). Poseban naglasak stavljen je na ispitivanje membranske elastičnosti budući da su formulacije namijenjene primjeni na kožu i sluznicu. Ispitivanjem se željelo utvrditi kako fosfolipidni sastav, prisustvo surfaktanta (natrijev deoksikolat) ili suotapala (propilenglikol) u liposomima utječe na fizikalna svojstva liposoma: veličinu, naboj na površini te elastičnost/rigidnost njihovih dvoslojeva. Liposomi s azitromicinom pripremljeni su film metodom, dok su liposomi s diltiazemkloridom pripremljeni proliposomskom i metodom razrjeđenja poliola. Pokazano je da metoda pripreme i fosfolipidni sastav značajno doprinose fizikalnim svojstvima liposoma. Film metodom dobivene su izrazito heterogene disperzije liposoma, a provedena ekstruzija rezultirala je liposomima značajno manjeg srednjeg promjera i niskog indeksa polidisperznosti. Ispitivanja membranske elastičnosti pokazala su najveću elastičnost deformabilnih liposoma s azitromicinom. Elastičnost propilenglikol liposoma s azitromicinom je bila manja od deformabilnih liposoma, ali značajno veća od anionskih, konvencionalnih, te pogotovo kationskih liposoma. Potvrđeno je da fosfolipidni sastav liposoma, prisustvo surfaktanta ili suotapala te lipofilnost uklopljene djelatne tvari značajno utječu na stupanj membranske elastičnosti liposoma.

Summary

The main objective of this study was physical characterization of the different types of liposomes loaded with either a lipophilic or hydrophilic drug (azithromycin or diltiazem chloride). The focus was placed on determination of membrane (liposome bilayer's) elasticity, because the investigated nanoformulations are destined for skin and mucosal drug delivery. The specific aims were to determine influence of the phospholipid composition, surfactant (sodium deoxycholate) or co-solvent (propylene glycol) on liposomal physical characteristics: size, surface charge and bilayer's elasticity. Liposomes containing azithromycin were prepared by the film method, while liposomes with diltiazem chloride were prepared by proliposome and polyol dilution method. The results have shown that the phospholipid composition and method used for the preparation of liposomes significantly influence physical characteristics of the liposomes. Liposomes prepared by the film method were significantly more heterogenic than liposomes prepared by proliposome and polyol dilution method, respectively. Extrusion of the originally prepared liposomes resulted in the liposomes of significantly smaller mean diameters and polydispersity indexes. Deformable liposomes with azithromycin were characterized with the most elastic bilayers. Propylene glycol liposomes had less elastic bilayers than deformable liposomes, but significantly more elastic bilayers than anionic, conventional and cationic liposomes encapsulating azithromycin. On the contrary, propylene glycol liposomes with diltiazem chloride were more elastic than propylene glycol liposomes encapsulating azithromycin.

This study confirmed that phospholipid composition, presence of surfactant and co-solvent, as well as the lipophilicity of the drug have a significant impact on liposome membrane elasticity.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ISPITIVANJE MEMBRANSKE ELASTIČNOSTI LIPOSOMA S AZITROMICINOM I DILTIAZEMKLORIDOM

Matea Pavić

SAŽETAK

Svrha ovog rada bila je provesti fizikalnu karakterizaciju različitih tipova liposoma s uklopljenim lipofilnim ili hidrofilnim lijekom (azitromicin ili diltiazemklorid). Poseban naglasak stavljen je na ispitivanje membranske elastičnosti budući da su formulacije namijenjene primjeni na kožu i sluznicu. Ispitivanjem se željelo utvrditi kako fosfolipidni sastav, prisustvo surfaktanta (natrijev deoksikolat) ili suotapala (propilenglikol) u liposomima utječe na fizikalna svojstva liposoma: veličinu, naboj na površini te elastičnost/rigidnost njihovih dvoslojeva. Liposomi s azitromicinom pripremljeni su film metodom, dok su liposomi s diltiazemkloridom pripremljeni proliposomskom i metodom razrjeđenja poliola. Pokazano je da metoda pripreme i fosfolipidni sastav značajno doprinose fizikalnim svojstvima liposoma. Film metodom dobivene su izrazito heterogene disperzije liposoma, a provedena ekstruzija rezultirala je liposomima značajno manjeg srednjeg promjera i niskog indeksa polidisperznosti. Ispitivanja membranske elastičnosti pokazala su najveću elastičnost deformabilnih liposoma s azitromicinom. Elastičnost propilenglikol liposoma s azitromicinom je bila manja od deformabilnih liposoma, ali značajno veća od anionskih, konvencionalnih, te pogotovo kationskih liposoma. Potvrđeno je da fosfolipidni sastav liposoma, prisustvo surfaktanta ili suotapala te lipofilnost uklopljene djelatne tvari značajno utječu na stupanj membranske elastičnosti liposoma.

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

Rad sadrži: 30 stranica, 8 grafičkih prikaza, 5 tablica i 55 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: liposomi, azitromicin, diltiazemklorid, membranska elastičnost

Mentor: **Dr. sc. Željka Vanić**, *izvanredna profesorica, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Željka Vanić**, *izvanredna profesorica, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.*

Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, *izvanredna profesorica, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.*

Dr. sc. Višnja Drinovac Vlah, *poslijedoktorandica, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.*

Rad prihvaćen: rujan 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Technology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

MEASUREMENT OF MEMBRANE ELASTICITY OF AZITHROMYCIN AND DILTIAZEM CHLORIDE LOADED LIPOSOMES

Matea Pavić

SUMMARY

The main objective of this study was physical characterization of the different types of liposomes loaded with either a lipophilic or hydrophilic drug (azithromycin or diltiazem chloride). The focus was placed on determination of membrane (liposome bilayer's) elasticity, because the investigated nanoformulations are destined for skin and mucosal drug delivery. The specific aims were to determine influence of the phospholipid composition, surfactant (sodium deoxycholate) or co-solvent (propylene glycol) on liposomal physical characteristics: size, surface charge and bilayer's elasticity. Liposomes containing azithromycin were prepared by the film method, while liposomes with diltiazem chloride were prepared by proliposome and polyol dilution method. The results have shown that the phospholipid composition and method used for the preparation of liposomes significantly influence physical characteristics of the liposomes. Liposomes prepared by the film method were significantly more heterogenic than liposomes prepared by proliposome and polyol dilution method, respectively. Extrusion of the originally prepared liposomes resulted in the liposomes of significantly smaller mean diameters and polydispersity indexes. Deformable liposomes with azithromycin were characterized with the most elastic bilayers. Propylene glycol liposomes had less elastic bilayers than deformable liposomes, but significantly more elastic bilayers than anionic, conventional and cationic liposomes encapsulating azithromycin. On the contrary, propylene glycol liposomes with diltiazem chloride were more elastic than propylene glycol liposomes encapsulating azithromycin. This study confirmed that phospholipid composition, presence of surfactant and co-solvent, as well as the lipophilicity of the drug have a significant impact on liposome membrane elasticity.

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

Thesis includes: 30 pages, 8 figures, 5 tables and 55 references. Original is in Croatian language.

Keywords: liposomes, azithromycin, diltiazem chloride, membrane elasticity

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
Dubravka Vitali Čepo, Ph.D., Associate Professor, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Višnja Drinovac Vlah, Ph.D., Postdoctoral researcher, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2018.