

# In vitro ispitivanje oslobađanja azitromicina iz elastičnih liposoma

---

**Novosel, Matea**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2015**

*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:163:791334>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-28**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Matea Novosel**

***In vitro* ispitivanje oslobađanja azitromicina  
iz elastičnih liposoma**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015

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

# SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD .....  | 1  |
| 1.1. ANATOMSKA I FIZIOLOŠKA OBILJEŽJA KOŽE .....   | 1  |
| 1.2. DERMALNA PRIMJENA LIJEKOVA .....  | 3  |
| 1.2.1. Transport lijeka kroz kožu .....  | 3  |
| 1.3. LIPOSOMI .....  | 4  |
| 1.3.1. Strukturna obilježja i svojstva liposoma .....  | 4  |
| 1.3.2. Klasifikacija liposoma.....   | 5  |
| 1.3.3. Metode pripreme liposoma .....  | 6  |
| 1.3.4. Deformabilni liposomi (Transferosomi®, elastični, ultrafleksibilni) .....                             | 7  |
| 1.3.5. Propilenglikol liposomi (PG-liposomi).....  | 8  |
| 1.3.6. Zeta potencijal.....  | 8  |
| 1.4. IN VITRO ISPITIVANJE OSLOBAĐANJA LIJEKA PRIMJENOM FRANZ<br>DIFUZIJSKE ČELIJE .....                      | 10 |
| 1.4.1. Određivanje koncentracije oslobođenog lijeka .....  | 11 |
| 1.5. AZITROMICIN .....   | 13 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME .....   | 15 |
| 3. MATERIJALI I METODE .....   | 16 |
| 3.1. MATERIJALI.....   | 16 |
| 3.2. METODE.....   | 17 |
| 3.2.1. Priprema liposoma .....   | 17 |
| 3.2.2. Određivanje srednjeg promjera liposoma i indeksa polidisperznosti .....                               | 19 |
| 3.2.3. Određivanje zeta potencijala .....  | 19 |
| 3.2.4. Izrada baždarnog dijagrama .....  | 20 |
| 3.2.5. Određivanje sadržaja lijeka u liposomskim preparacijama.....  | 21 |
| 3.2.6. Optimizacija sastava receptorskog medija.....   | 21 |
| 3.2.6. Ispitivanje <i>in vitro</i> oslobađanja azitromicina iz liposomskih preparacija.....                  | 22 |
| 3.2.7. Određivanje sadržaja azitromicina oslobođenog iz liposoma tijekom <i>in vitro</i><br>ispitivanja..... | 23 |
| 3.2.8. Statistička obrada podataka.....  | 23 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA .....  | 24 |
| 4.1. FIZIKALNO-KEMIJSKA KARAKTERIZACIJA LIPOSOMA .....   | 24 |

|  |    |
|--|----|
| 4.1.1. Srednji promjer liposoma i indeks polidisperznosti..... | 24 |
| 4.1.2. Zeta potencijal.....                                    | 25 |
| 4.2. <i>IN VITRO</i> OSLOBAĐANJE AZITROMICINA IZ LIPOSOMA..... | 26 |
| 5. ZAKLJUČCI.....  | 33 |
| 6. LITERATURA.....   | 34 |
| 7. SAŽETAK/SUMMARY.....  | 36 |

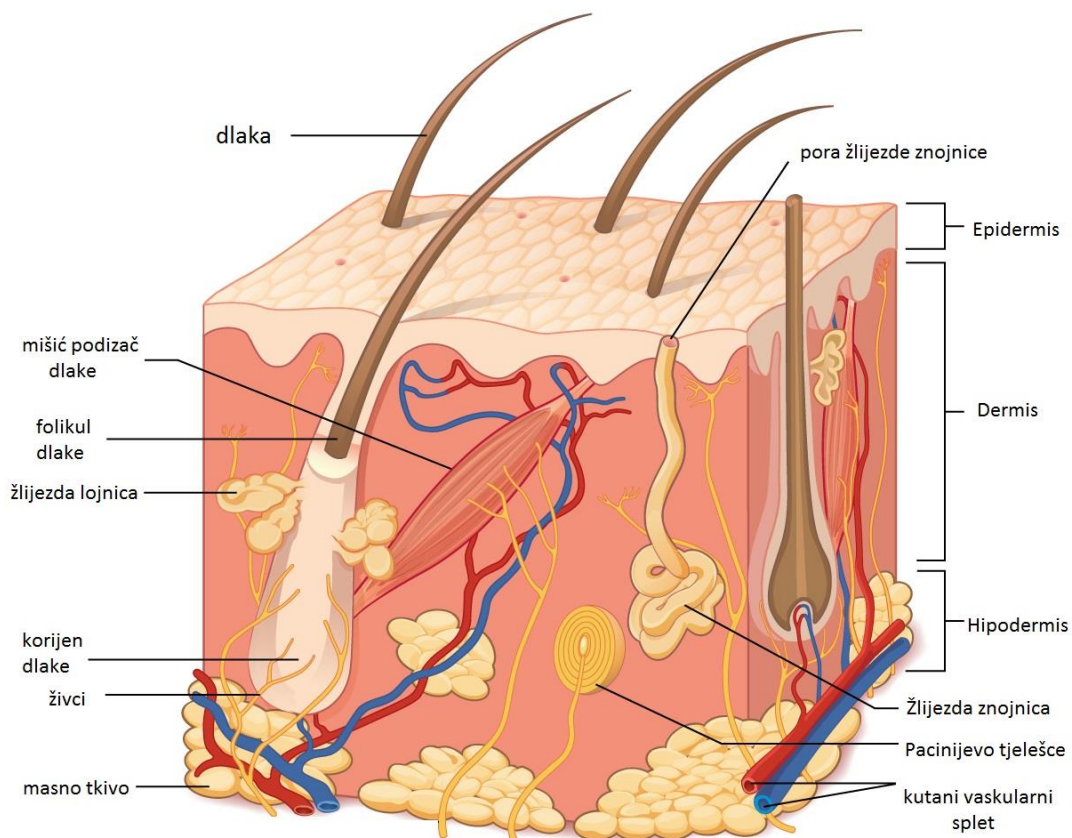
# 1. UVOD

## 1.1. ANATOMSKA I FIZIOLOŠKA OBILJEŽJA KOŽE

Koža je najveći organ ljudskog tijela, površine 1,8 – 2,0 m<sup>2</sup>. Osim što predstavlja prvu liniju obrane organizma od štetnih vanjskih utjecaja (UV zračenje, mikroorganizmi, kemikalije), koža ima važnu ulogu u regulaciji gubitka topline i vode, sintezi melanina, keratina, vitamina D, lipida i proteina, vrlo je važan osjetilni organ (dodir, bol, temperatura, pritisak) te ima sposobnost izmjene tvari. Strukturno se sastoji od dva osnovna dijela – epidermisa i dermisa. Ispod dermisa nalazi se supkutani sloj, tzv. hipodermis (slika 1).

Epidermis je vanjski, avaskularni sloj, čija debljina varira ovisno o veličini stanica te o broju slojeva stanica, a kreće se od 0,8 mm na dlanovima i stopalima do 0,06 mm na kopcima i podlakticama. Epidermis se, ovisno o debljini kože, sastoji od 4 do 5 tipičnih slojeva stanica: rožnati sloj (*stratum corneum*), svijetli sloj (*stratum lucidum*), zrnati sloj (*stratum granulosum*), trnasti sloj (*stratum spinosum*) i bazalni sloj (*stratum basale*). *Stratum spinosum* i *stratum basale* zajedno čine *stratum germinativum* koji sadrži bazalne stanice s jezgrom, promjera oko 6 µm. Neprekidnom mitozom bazalnih stanica te njihovom diferencijacijom i pomicanjem prema višim slojevima epidermis se konstantno obnavlja. Naime, tijekom diferencijacije bazalne stanice se mijenjaju morfološki i histokemijski, postaju spljoštene te gube jezgru, a deskvamacija gornjeg odumrlog rožnatog sloja omogućuje održavanje stalne debljine epidermisa. Kod zdrave kože, jedan ciklus obnove epidermisa traje 28 dana. Bazalni sloj sadrži i melanocyte koji proizvode i distribuiraju granule melanina keratinocitima. U zrnatom sloju stanice su već izgubile jezgru te postaju prepoznatljive po stvaranju tamnih nakupina citoplazmatskog materijala. *Stratum lucidum* nalazi se samo na dijelovima tijela gdje je koža deblja i izložena trenju, a djeluje kao zaštita od štetnog UV zračenja te sprječava nastanak opekline tijekom izlaganja suncu (Igarashi i sur., 2005).

Rožnati sloj, *stratum corneum*, sastoji se od 10 – 20 slojeva spljoštenih, mrtvih, orožnjelih stanica uklopljenih u visokoorganizirani lipidni matriks po principu „opeka-cement“. Zbog svoje specifične građe ima odlučujuću ulogu u kontroli percutane apsorpcije molekula lijeka i predstavlja glavnu barijeru kod dermalne primjene lijekova (Vanić, 2015).



**Slika 1.** Građa ljudske kože ([http://cnx.org/contents/471cb008-6900-476c-8a65-539fdc592b75@5/Layers\\_of\\_the\\_Skin](http://cnx.org/contents/471cb008-6900-476c-8a65-539fdc592b75@5/Layers_of_the_Skin))

Dermis zauzima mnogo veću površinu od epidermisa, a debljine je 3 do 5 mm te se smatra glavnim dijelom kože. Građen je od vezivnog tkiva koje služi kao potpora epidermisu od kojeg ga odjeljuje bazalna membrana. Sadrži bogatu mrežu krvnih i limfnih žila, folikule dlaka, žlijezde znojnice i žlijezde lojnice te slobodne živčane završetke i osjetilne organe, a sastoji se od dva sloja – papilarnog i retikularnog. Papilarni sloj sadrži mnogo elastičnih vlakana kolagena i elastina, izrazito je dobro prokrvljen, zbog čega sudjeluje u regulaciji temperature i tlaka, dostavi hranjivih tvari epidermisu te koži daje ružičastu boju. Tu se također nalaze i dermalne papile koje grade papilarne linije na jagodicama prstiju, dlanovima i stopalima, Meissnerova tjelešca za dodir te slobodni živčani završeci za osjet boli, toplinu, hladnoću i peckanje. Retikularni sloj se nalazi ispod papilarnog sloja, a čine ga gusto vezivno tkivo, stanice fibroblasta te ekstracelularni matriks s glikozaminoglikanima (hijaluronska kiselina i dermatan sulfat) i vlaknastim proteinima (kolagen, elastin, laminin, fibronektin), krvne i limfne žlijezde te živci. Kroz cjelokupni dermis protežu se mjestimično folikuli s dlakama, pripadajuće žlijezde lojnice i mišići podizači dlaka (Čajkovac, 2000).

Potkožno tkivo (hipodermis, subcutis) se nalazi ispod dermisa te služi kao spremište masti, a njegova debljina ovisi o dobi, spolu te endokrinom i nutritivnom statusu organizma svake osobe. Također djeluje kao toplinski izolator te ublažava mehaničke podražaje (Igarashi i sur., 2005).

## **1.2. DERMALNA PRIMJENA LIJEKOVA**

Dva su osnovna puta primjene lijekova na/u kožu – dermalni i transdermalni. Kod dermalnog puta primjene osigurano je zadržavanje lijeka u koži (u epidermisu ili dermisu) čime se osigurava isključivo lokalno djelovanje, dok je prolazak lijeka u sistemsku cirkulaciju minimaliziran. Na taj se način smanjuju nepoželjne sistemske nuspojave i eventualni toksični učinci lijeka. Prednosti dermalnog načina primjene lijekova uključuju bezbolnu aplikaciju, ciljano i lokalizirano djelovanje na oboljela mjesta, kontrolirano oslobađanje, eliminiranje učinka prvog prolaska kroz jetru (*first-pass effect*), lako ukidanje terapije u slučaju potrebe u bilo kojem trenutku liječenja te visok stupanj suradljivosti pacijenata što je od iznimne važnosti za konačni ishod liječenja (Okyar i sur., 2012). Dermalna primjena lijekova, zbog navedenih posebnosti, spada u ugodnije i sigurnije puteve primjene, a brojna istraživanja su pokazala da liposomske formulacije namijenjene topikalnoj primjeni značajno reduciraju stupanj iritacije kože koje nerijetko bivaju izazivane lijekovitim supstancije kao što su primjerice retinoidi (Vanić, 2015).

### **1.2.1. Transport lijeka kroz kožu**

Zbog svoje specifične anatomije i fiziologije, koža se ponaša kao selektivna barijera kroz koju je moguća penetracija, ali i eliminacija širokog raspona različitih tvari. Perkutana, tj. dermalna apsorpcija je proces kojim se opisuje prolazak različitih tvari kroz kožu, a sastoji se od tri koraka – penetracije koja označava ulazak supstancije u određeni sloj kože, najčešće *stratum corneum*; permeacije koja označava prolazak tvari kroz slojeve kože koji su strukturno i funkcionalno različiti od prvog sloja; te resorpcije koja označava prolazak tvari u sistemsku cirkulaciju.

Transport lijeka kroz kožu može se odvijati trima različitim mehanizmima tijekom kojih se zapravo događa apsorpcija. To su transcelularni (lijek prolazi kroz stanice), intercelularni (lijek prolazi između stanica) i apendagealni (lijek prolazi uz folikul dlaka ili uz izvodni kanal žlijezde znojnice ili lojnice) put transporta. Permeacija lijeka kroz lipofilni



*stratum corneum* (SC) se temelji na procesu pasivne difuzije. To je sloj s najvećom rezistencijom prema difuziji, ali i hidrofilni epidermis i dermis mogu ograničavati apsorpciju lijekova, naročito onih vrlo lipofilnih. Permeacija lijekova također ovisi i o njihovoj molekulskoj masi. Općenito vrijedi da supstancije molekulske mase veće od 500 Da ne mogu penetrirati u kožu. Lošu predispoziciju apsorpcije imaju i ionizirane supstancije (Bartosova i Bajgar, 2012). Primjenom okluzivnih formulacija smanjuje se mogućnost evaporacije lijeka s površine kože te se povećava hidratacija SC-a što može imati pozitivan utjecaj na apsorpciju (Bartosova i Bajgar, 2012).

Postoji nekoliko fizikalnih i kemijskih pristupa koji se koriste za poboljšanje apsorpcije dermalno i transdermalno primijenjenih lijekova. Najčešće korištena fizikalna metoda je ionoforeza. Ionoforeza povećava sposobnost penetracije ioniziranih lijekova primjenom niskih vrijednosti istosmjernje struje (0,5 mA/cm<sup>2</sup>). Najčešće korišteni kemijski pristup jest primjena tzv. kemijskih promotora penetracije koji djeluju tako što reverzibilno mijenjaju strukturnu kompaktnost kože te na taj način unaprjeđuju tok lijeka kroz kožu. Mehanizam djelovanja ovih promotora objašnjen je tzv. *Lipid-Protein-Partition* (LPP) teorijom. Prema ovoj teoriji, kemijski promotori narušavaju lipidnu strukturu u intercelularnoj domeni rožnatog sloja, denaturiraju ili mijenjaju konformaciju keratina u intracelularnoj domeni te povećavaju raspodjelu lijeka u *stratum corneum* koji na taj način postaje spremište (rezervoar) lijeka. Suotapala kao što su alkoholi, propilenglikol, dietilenglikol, monoetileter te spojevi poput dimetilsulfoksida (DMSO), uree, terpena, surfaktanata (SDS) i masnih kiselina (oleinska kiselina), često su uključeni u dermalne/transdermalne formulacije kao promotori penetracije (Tran, 2013; Okyar i sur., 2012). Svi promotori penetracije i permeacije moraju biti biorazgradivi, niske toksičnosti te ne smiju izazivati iritacije niti imati farmakološki učinak (Bartosova i Bajgar, 2012).

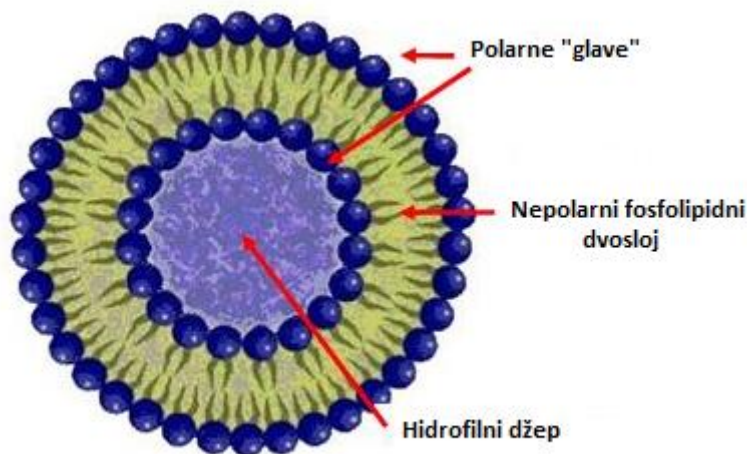
## **1.3. LIPOSOMI**

### **1.3.1. Strukturna obilježja i svojstva liposoma**

Liposomi su sferične fosfolipidne tvorevine u kojima je unutarnja vodena faza obavijena s jednom ili više koncentrično položenih fosfolipidnih membrana (slika 2). U ovojnici liposoma fosfolipidi su složeni u obliku dvosloja pri čemu su polarne, hidrofilne „glave“ orijentirane prema vanjskoj i unutarnjoj vodenoj fazi zaklanjajući pritom nepolarne,

hidrofobne „repove“ (lance masnih kiselina) jedan prema drugome. U neutralnom pH području fosfolipidi mogu biti u obliku „zwitter“ iona (fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin) ili su negativno nabijeni (fosfatidilglicerol, fosfatidilserin, fosfatidilinozitol i fosfatidna kiselina).

Ovisno o temperaturi, fosfolipidne membrane postoje u različitim fazama – visokoorganiziranoj, čvrstoj ili gel fazi te u fazi tekućih kristala. Temperatura na kojoj se odvija prijelaz iz gel faze u fazu tekućih kristala naziva se temperaturom faznog prijelaza ( $T_c$ ). Što je  $T_c$  niža, fluidnost membrane je veća i ona je permeabilnija za uklopljeni sadržaj, čime je smanjena stabilnost liposoma, kako fizička, tako i ona nakon *in vivo* primjene. Strukturna svojstva liposoma omogućuju uklapanje lijekova različitih fizikalno-kemijskih svojstava, kao i makromolekula poput proteina. Liposomi su strukturno slični biološkim membranama, neimunogeni su i biorazgradivi, zbog čega su u potpunosti fiziološki prihvatljivi nanoterapijski sustavi (Vanić, 2012a).



Slika 2. Struktura liposoma ([www.horiba.com](http://www.horiba.com))

### 1.3.2. Klasifikacija liposoma

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

Unilamelarni liposomi (*unilamellar vesicles*, UV) sadrže jednu fosfolipidnu ovojnica, a prema veličini se dijele na: male unilamelarne (*small unilamellar vesicles*, SUV), srednje velike unilamelarne (*medium sized unilamellar vesicles*, MUV), velike unilamelarne (*large*

*unilamellar vesicles*, LUV) te veoma velike unilamelarne liposome (*giant unilamellar vesicles*, GUV). Oligolamelarni liposomi (*oligolamellar vesicles*, OLV) sadrže nekoliko koncentrično položenih fosfolipidnih dvoslojeva između kojih su vodeni prostori, dok multilamelarne liposome (*multilamellar vesicles*, MUV) karakterizira postojanje velikog broja koncentrično postavljenih fosfolipidnih dvoslojeva. Multivezikularne liposome (*multivesicular liposomes*, MVL) čini mnogo manjih vezikula nasumično uklopljenih unutar velikog liposoma. (Vanić, 2012a). Dokazano je da najpovoljniji profil prolaska u kožu imaju liposomi srednjeg promjera manjeg od 180 nm, optimalno oko 120 nm (Verma i sur., 2003).

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

### **1.3.3. Metode pripreme liposoma**

Odabirom odgovarajuće metode moguće je pripremiti liposome određene veličine, lamelarnosti i sadržaja uklopljenog lijeka. Gotovo sve metode pripreme liposoma uključuju tri ili četiri osnovne faze, a to su: uklanjanje organskog otapala u kojem su fosfolipidi otopljeni, dispergiranje fosfolipida u vodenom mediju, homogenizacija nastale liposomske suspenzije i analiza konačnog produkta. Za sve postupke pripreme liposoma vrijedi pravilo da se lipofilni lijekovi dodaju zajedno s fosfolipidima otopljenim u organskom otapalu dok se hidrofilni dodaju otopljeni u vodenoj fazi. Metode pripreme liposoma se mogu podijeliti u tri velike skupine: metode fizičkog dispergiranja, dvofaznog dispergiranja i solubilizacije pomoću detergensa (Vanić, 2012b).

#### **1.3.3.1. Metoda hidratacije suhog fosfolipidnog sloja, tzv. film metoda**

Film metoda je metoda pripreme liposoma fizičkim dispergiranjem fosfolipida te je najčešći postupak pripreme liposoma u laboratorijskim uvjetima. Temelji se na pripravi tankog fosfolipidnog sloja te dodatku vodenog medija uz snažno protresivanje (*hand shaking method*). Postupak se provodi u tikvicama okruglog dna, a nakon otparavanja organskog otapala na stijenkama tikvice nastaje suhi fosfolipidni film velike površine. Dodatkom

vodenog medija dolazi do hidratacije fosfolipida i spontanog formiranja liposoma. Temperatura tijekom pripreme liposoma mora biti iznad temperature faznog prijelaza ( $T_c$ ) korištenih fosfolipida. Nastali liposomi su multilamelarni (MLV) i prilično veliki (oko 10  $\mu\text{m}$ ) te visokog indeksa polidisperznosti pa je stoga potrebna njihova daljnja obrada kako bi se optimizirala njihova veličina i homogenost. Homogenizacija MLV provodi se ekstruzijom kroz polikarbonatne membrane određene veličine pora ili soniciranjem. Na taj način nastaje homogena preparacija oligolamelarnih (OLV) ili unilamelarnih (LUV, SUV) liposoma određene veličine. Nedostatak ekstruzije je što redukcija veličine MLV-a često može rezultirati značajnim gubitkom sadržaja uklopljenog hidrofilnog lijeka (Vanić, 2012b).

#### **1.3.4. Deformabilni liposomi (Transferosomi®, elastični, ultrafleksibilni)**

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

Brojna su istraživanja potvrdila sposobnost prolaska deformabilnih liposoma s uklopljenim lijekom u dublje slojeve kože, pri čemu se učinak mogao usporediti sa supkutanom primjenom. Međutim, kod nekih se lijekova pokazalo da deformabilni liposomi samo povećavaju odlaganje lijeka u kožu, ali ne i prolaz u dublje slojeve, što je pogodno za lokalnu primjenu. Opisana su dva mehanizma kojima deformabilni liposomi poboljšavaju prolazak lijeka kroz kožu. Prvi mehanizam sastoji se od prolaska intaktnih vezikula u neokluzivnim uvjetima. Naime, u takvim uvjetima primijenjena suspenzija liposoma isparava na površini kože, a vezikule postaju djelomično dehidrirane. One tada počinju slijediti lokalni hidratacijski gradijent, a upravo im elastičnost membrane omogućava djelomično intaktni prolaz između stanica rožnatog sloja. Drugi mehanizam je poticanje prolaska lijeka kroz kožu pri čemu lipidi iz ovojnice liposoma modificiraju intercelularne lipide rožnatog sloja, čime se olakšava prolaz oslobođenim molekulama lijeka kroz kožu (Banović i sur., 2011).

### 1.3.5. Propilenglikol liposomi (PG-liposomi)

Propilenglikol liposomi (PG-liposomi) novi su tip fosfolipidnih vezikula predloženih od strane Elsayeda i suradnika, a razvijeni su u svrhu postizanja učinkovitije dostave djelatnih tvari u kožu. Građeni su od fosfolipida, propilenglikola i vode, a karakterizira ih velika sposobnost uklapanja ljekovitih supstancija. Preliminarne *in vivo* studije na životinjskim modelima pokazale se značajno bolji učinak PG-liposoma kod dermalne dostave lokalnog anestetika cinhokaina u usporedbi s konvencionalnim i deformabilnim liposomima (Elsayed i sur., 2007). Za potrebe liječenja kožnih gljivičnih infekcija, Elmoslemany i suradnici pripremili su i ispitali učinkovitost PG-liposoma s uklopljenim mikonazolom ((Elmoslemany i sur., 2012). U usporedbi s konvencionalnim liposomima, PG-liposomi su pokazali veću sposobnost enkapsulacije aktivne tvari, veću stabilnost te bolju antifungalnu aktivnost i odlaganje u koži. Ugrađujući se u fosfolipidni dvosloj liposoma, propilenglikol povećava elastičnost vezikula, a istodobno djeluje i kao humektans i promotor penetracije, čime se osigurava poboljšana dostava lijeka u kožu (Vanić, 2015).

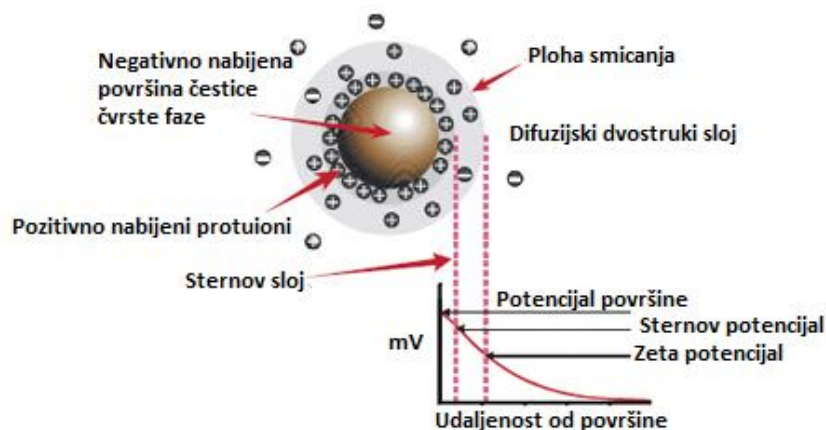
### 1.3.6. Zeta potencijal

Zeta potencijal se opisuje kao fizikalno svojstvo koje se pojavljuje na površini bilo koje čestici koloidnih sustava, makromolekula ili materijala. Uobičajeno se koristi za optimizaciju formulacija emulzija, suspenzija i otopina proteina te kako bi se predvidjele interakcije sa željenom površinom. Također, može se koristiti u predviđanju dugoročne stabilnosti formulacija ([www.malvern.com](http://www.malvern.com)).

Površina čestica dispergirane faze može biti električki nabijena zbog suviška iona, što je prouzročeno adsorpcijom nekog iona u otopini ili disocijacijom površinskih skupina. Ukoliko je površina čestice negativno nabijena, uz nju se nalaze pozitivno nabijeni ioni u otopini, tako da ih je uz samu površinu čestice najviše, a zatim se, s udaljenošću od čestice prema „dubini“ otopine, broj pozitivnih i negativnih iona izjednačava (slika 3). Opisana pojava naziva se dvostrukim električnim slojem. Pojednostavljeno, dvostruki električni sloj sastoji se od tri dijela. U ovom slučaju, prvi sloj čine adsorbirani negativni ioni na površini čestice. Neposredno uz njih, nalaze se pozitivni ioni koji čine drugi sloj, tzv. Sternov sloj kojeg je debljina reda veličine iona. Treći dio čini Gouy-Chapmanov sloj (difuzijski dio dvostrukog sloja). Debljina difuzijskog sloja,  $\delta$ , dana je recipročnom vrijednošću Debye-Hückelova parametra,  $\chi$ :  $\delta = 1/\chi$ .

Iz izraza proistječe da se debljina sloja smanjuje s koncentracijom elektrolita u sustavu. Dvostruki električni sloj može se predočiti kao električni kondenzator od dviju suprotno nabijenih površina. Potencijal na površini čestice,  $\psi$ , maksimalan je, potom naglo opada (Sternov sloj), a zatim opada i eksponencijalno (Gouy-Chapmanov sloj).

Nabijene dispergirane čestice putuju u električnom polju prema elektrodi suprotnog predznaka, a ta se pojava naziva elektroforetskom pokretljivošću. Zajedno s česticama, giba se i Sternov sloj te dio „vezanih“ molekula otapala. Može se zamisliti da se zajedno s česticom giba mali volumen medija odijeljen od ostalih molekula vode, tzv. plohom smicanja. Potencijal na udaljenosti te plohe smicanja naziva se elektrokinetički ( $\zeta$ ) zeta potencijal. On je važan jer se može relativno lako odrediti iz elektroforetske gibljivosti čestica, a o njemu i naboju na površini dispergirane faze ovisi stabilnost pripremljenih disperzija (Jalšenjak i sur., 1998).



*Slika 3. Shematski prikaz zeta potencijala (www.pharmaceuticalonline.com)*

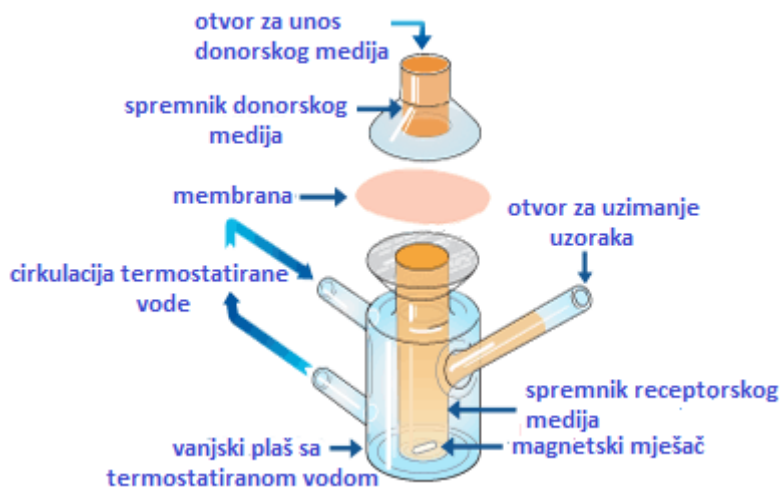
Ako čestice koloidnog sustava imaju niske vrijednosti zeta potencijala, tada ne postoji sila koja bi spriječila agregaciju i flokulaciju čestica. Međutim, ako čestice imaju veliku pozitivnu ili negativnu vrijednost zeta potencijala, one će težiti međusobnom odbijanju pa neće doći do spajanja čestica. Kao razdjelna granica između stabilnih i nestabilnih sustava, uzeto je +30 mV ili -30 mV. Dakle, čestice sa zeta potencijalom pozitivnijim od +30 mV ili negativnijim od -30 mV smatraju se stabilnima ([www.malvern.com](http://www.malvern.com)).

Zeta potencijal može imati utjecaj na farmakokinetička svojstva nanosustava u organizmu te na fagocitozu i unos nanočestica s lijekom u stanicu. Također, ima važnu ulogu

u vezanju nanočestica na membranu stanica. Istraživanja su pokazala da nanočestice zeta potencijala oko -43 mV imaju najveći afinitet ulaska u stanicu u usporedbi s česticama koje imaju pozitivniji ili negativniji zeta potencijal (Honary i Zahir, 2013).

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

*In vitro* metode dizajnirane su kako bi omogućile predviđanje i mjerenje opsega penetracije lijekova u ljudsku kožu. Takvi eksperimenti nude brojne prednosti pred životinjskim i ljudskim modelima, uključujući bolju reproducibilnost rezultata, uštedu vremena i novca, smanjenu varijabilnost zadanih parametara, mogućnost ponavljanja mjerenja na istom modelu pri istim uvjetima itd. Najčešće korištena *in vitro* metoda za ispitivanje oslobađanja lijekova je Franz difuzijska ćelija (Bartosova i Bajgar, 2012). Slika 4 prikazuje osnovne dijelove Franz difuzijske ćelije.



Slika 4. Franz difuzijska ćelija ([www.permegear.com](http://www.permegear.com))

Membrana je smještena između donorskog i receptorskog medija te predstavlja imitaciju biološke barijere (kože). Kao eksperimentalne membrane, mogu se *ex vivo* koristiti kožna tkiva malih životinja (miš, štakor, zec), velikih životinja (majmun, pas i svinja), te uzorci ljudske kože. Zbog kompleksnosti bioloških tkiva, inter- i intraindividualne varijabilnosti te etičkih pitanja vezanih uz animalne, a posebice humane uzorke kože, danas se u laboratorijskim ispitivanjima te ranim fazama istraživanja i razvoja topikalnih formulacija

najčešće koriste komercijalno dostupne sintetske polimerne membrane (polisulfonske, celuloza-acetatne/nitratne) veličine pora 0,45 μm.

Spremnik donorskog medija sadrži formulaciju lijeka od interesa, a koja ovisno o formulaciji i tipu primjene može biti u obliku otopine, suspenzije, kreme, gela, losiona, paste, pudera ili adhezivnog flastera ([www.permegear.com](http://www.permegear.com)). Prije odabira receptorskog medija potrebno je ispitati topljivost lijeka u nekoliko otapala, počevši od vodenih otopina pufera pa sve do vodeno-alkoholnih otopina, kako bi se postigli uvjeti osigurane topljivosti i spriječilo eventualno taloženje lijeka. Prema Europskoj farmakopeji, uvjeti osigurane topljivosti postignuti su u slučaju kada je volumen otapala takav da će maksimalna postignuta koncentracija u receptorskom mediju biti barem tri puta manja od koncentracije zasićene otopine lijeka. Receptorski medij prvog izbora za hidrofilne lijekove je fosfatni pufer (*phosphate buffer solution*, PBS), dok je prvi izbor za lipofilne lijekove mješavina PBS-a i alkohola (izopropanola, etanola i sl.) ([www.particlesciences.com](http://www.particlesciences.com)). Izmjerena vrijednost pH receptorskog medija trebala bi odgovarati fiziološkom, a tijekom cijelog eksperimenta receptorski medij bi trebao biti kontinuirano miješan, a sustav termostatiran na  $32 \pm 1^\circ \text{C}$  kako bi se osigurali uvjeti što sličniji onima *in vivo*. Također, stabilnost lijeka u receptorskom mediju mora biti osigurana tijekom eksperimenta i kasnijih mjerenja (Bartosova i Bajgar, 2012). Duljina trajanja eksperimenta, vremenski intervali i frekvencija uzorkovanja te volumen alikvota uzorka ovise o tome što se eksperimentom želi pratiti ([www.permegear.com](http://www.permegear.com)). Volumen alikvota uzorka koji se uzima iz receptorskog odjeljka tijekom uzorkovanja obično iznosi između 200 i 400 μL, a nakon svakog uzimanja alikvota potrebno je u odjeljku nadomjestiti medij ekvivalentnim volumenom svježeg termostatiranog receptorskog medija ([www.particlesciences.com](http://www.particlesciences.com)).

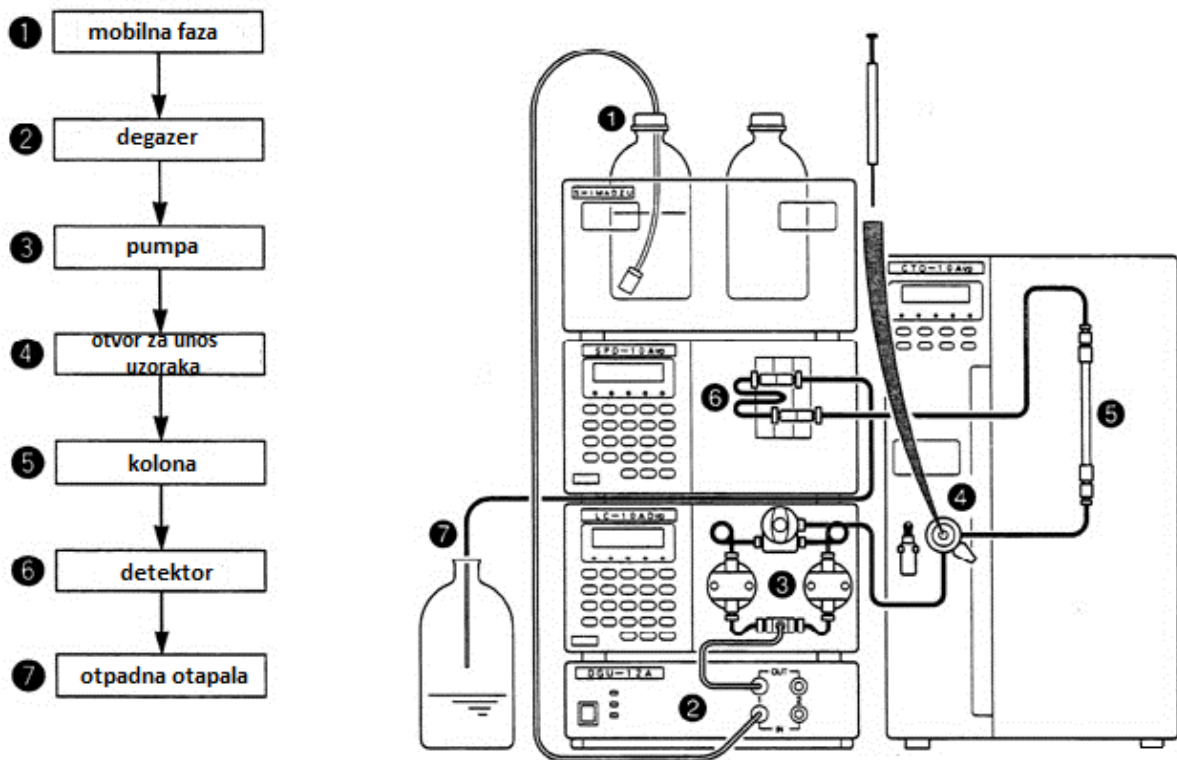
#### **1.4.1. Određivanje koncentracije oslobođenog lijeka**

Analitička metoda kvantitativnog određivanja analita oslobođenog u receptorski medij ovisit će o fizikalno-kemijskim karakteristikama molekule. Radioaktivno označene supstancije mogu se lako detektirati čak i u malim koncentracijama unatoč velikom volumenu receptorskog medija. Takve analize su obično brze i točne. Međutim, većina farmaceutika se zbog visoke cijene sinteze i eventualne nestabilnosti u donorskom mediju ne može radioaktivno označiti. Za određivanje koncentracije takvih lijekova koriste se osjetljivije metode kao što su HPLC, ELISA testovi i fluorimetrija. Te su metode relativno lako

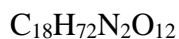


primjenjive i mogu se koristiti za određivanje širokog spektra različitih supstancija ([www.permeagear.com](http://www.permeagear.com)).

Kromatografija je analitička tehnika koja se zasniva na separaciji molekula na temelju razlika u njihovoj strukturi ili sastavu. Općenito, kromatografija uključuje kretanje uzorka nošenog mobilnom fazom kroz sustav preko stacionarne faze, a različit afinitet molekula uzorka prema stacionarnoj fazi u konačnici dovodi do njihovog razdvajanja. HPLC (*high performance liquid chromatography*) je vrsta tekućinske kromatografije koja sadrži čvrstu stacionarnu fazu, a koristi se za razdvajanje i kvantifikaciju tvari otopljenih u pogodnom otapalu. Vrijeme zadržavanja pojedine supstancije na koloni ovisi o njenom afinitetu prema stacionarnoj fazi, tj. što je taj afinitet veći, to će vrijeme zadržavanja biti duže. Osnovni dijelovi HPLC instrumenta su spremnik mobilne faze, pumpa, injektor, kolona i detektor (slika 5). Odabir sastava mobilne faze utječe na separaciju i vrijeme zadržavanja analita na koloni, a s obzirom na polarlost stacionarne tj. mobilne faze razlikujemo tekućinsku kromatografiju normalnih i obrnutih faza. Sva otapala koja se koriste kao sastavnice mobilne faze moraju zadovoljavati kriterije najviše čistoće te moraju biti degazirana. Elucija pri kojoj se sastav mobilne faze ne mijenja tijekom analize naziva se izokratna elucija, dok je gradijentna elucija ona kod koje se sastav mobilne faze mijenja tijekom procesa separacije.







**Slika 6.** Strukturna i molekulska formula azitromicina ([www.enciklopedija.hr](http://www.enciklopedija.hr))

Bioraspoloživost azitromicina nakon oralne primjene je oko 37%. Vršne koncentracije u plazmi postižu se 2 do 3 sata nakon uzimanja lijeka. Oralno primijenjeni azitromicin brzo prelazi iz plazme u tkiva i organe, pri čemu koncentracija u tkivima može biti i do 50 puta veća nego i plazmi. Vezanje za proteine plazme ovisi o njihovoj koncentraciji, a kreće se od 12% do 52%. Srednja vrijednost volumena raspodjele azitromicina iznosi 31 l/kg. Poluvrijeme eliminacije lijeka iz tkiva iznosi 2 do 4 dana. Oko 12% *i.v.* primijenjenog lijeka izlučuje se urinom nepromijenjeno tijekom sljedeća 3 dana. Visoke koncentracije nepromijenjenog azitromicina prisutne su u žuči, kao i deset različitih metabolita nastalih N- i O-demetilacijom. Mikrobiološka aktivnost metabolita dosad nije nađena.

Utvrđeno je da se veće koncentracije azitromicina oslobađaju za vrijeme aktivne fagocitoze nego za vrijeme inaktivne fagocitoze ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)). Upravo sposobnost prodiranja u stanice omogućuje azitromicinu djelotvornost na intracelularne patogene, kao i nakupljanje u neutrofilnim granulocitima, monocitima i makrofagima, koji ga procesom kemotaksije usmjeravaju na mjesto upale (Zorc i Butula, 1995). Azitromicin je indiciran za liječenje infekcija uzrokovanih mikrobima osjetljivim ili moguće osjetljivim na azitromicin: infekcije gornjih dišnih sustava (faringitis, sinusitis), infekcije donjih dišnih puteva (akutna egzacerbacija kroničnog bronhitisa, izvanbolnički stečena pneumonija), otitis media, infekcije kože i potkožnog tkiva (umjereni oblik *acne vulgaris*, *erythema migrans*, erizipel, impetigo, piodermija), nekomplikirani uretritis/cervicitis uzrokovan bakterijom *Chlamydia trachomatis*, infekcije želuca i dvanaesnika uzrokovane bakterijom *Helicobacter pylori* ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Azitromicin danas na tržištu postoji u ljekovitim oblicima namijenjenima za peroralnu, oftalmičku i intravensku primjenu ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)) te se javlja potreba za razvojem formulacija i za druge puteve primjene, naročito zbog širokog spektra terapijskih indikacija za primjenu ovog lijeka. Neke od indikacija odnose se na infekcije kože i potkožnog tkiva (umjereni oblik *acne vulgaris*, *erythema migrans*, erizipel, impetigo, piodermija) pa stoga postoji interes za razvojem dermalnih pripravaka azitromicina kojima bi se postiglo ciljano lokalno djelovanje lijeka na oboljelom mjestu, te ujedno smanjila pojavnost sistemskih nuspojava i izbjegao prvi prolazak kroz jetru.

Za topikalnu dermalnu primjenu azitromicina potrebno je razviti prikladan terapijski sustav koji bi omogućio produženo i kontrolirano oslobađanje lijeka. Posljednjih desetljeća velika se pozornost posvećuje razvoju novih terapijskih sustava temeljenih na nanočesticama kojima bi se nadvladali nedostaci postojećih klasičnih terapijskih sustava. Posebno mjesto među nanosustavima za poboljšanu dostavu lijekova u kožu zauzimaju liposomi. Budući da su građeni od koži srodnih lipida te ne izazivaju toksične i imunološke reakcije, liposomi su se pokazali prihvatljivim i obećavajućim nanosustavima u području dermatologije. Također, za razliku od fizikalnih metoda kao što su mikroigle i elektroporacija, primjer su neinvazivnog pristupa u promociji prolaska lijeka u ili kroz kožu, budući da ne izazivaju oštećenja dermalnih slojeva i struktura (Desai i sur., 2010). Tijekom 3 desetljeća istraživanja liposoma kao nosača za poboljšanu dostavu lijekova u kožu su, uz klasične liposome, razvijene nove klase vezikula s povećom membranskom elastičnošću, uključujući deformabilne liposome i liposome s propilenglikolom (PG liposomi). Zahvaljujući elastičnosti lipidnog dvosloja i povećanoj sposobnosti penetracije kroz kožu, čini se kako ove nove klase liposoma učinkovitije transportiraju lijek kroz *stratum corneum*, u dublje slojeve kože.

Cilj ovog istraživanja bio je prirediti tri različite vrste liposomskih formulacija (konvencionalnih, propilenglikol i deformabilnih liposoma) s uklopljenim azitromicinom te ispitati i usporediti njihova fizikalno-kemijska svojstva i profil oslobađanja uklopljenog lijeka. Obradom dobivenih rezultata, moglo bi se zaključiti koja bi od odabranih i ispitanih liposomskih formulacija, s obzirom na ispitana svojstva, bila prikladna za daljnja ispitivanja u cilju razvoja formulacije za lokalnu terapiju azitromicinom kod kožnih oboljenja.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. MATERIJALI

Instrumenti i pribor:

- rotirajući vakuum uparivač (Büchi Rotavapor R-200, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švicarska)
- Franz difuzijska ćelija (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- pumpa (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- HPLC instrument (Shimadzu LC-10AD, Kyoto, Japan)
- kolona za HPLC (Kinetex, Phenomenex, SAD)
- ekstruder (LiposoFast, Avestin, Kanada)
- polikarbonatne membrane veličine pora 400 nm i 100 nm (LiposoFast, Avestin, Kanada)
- zetasizer (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments, Malvern, Velika Britanija)
- filteri veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  (Minisart, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Njemačka)
- filteri veličine pora 0,22  $\mu\text{m}$  (Minisart, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Njemačka)
- celuloza-acetatne membrane 0,2  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Göttingen, Njemačka)

Kemikalije:

- azitromicin (PLIVA Hrvatska Ltd., Zagreb, Hrvatska)
- sojin fosfatidilkolin S 75 (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Njemačka)
- natrijev deoksikolat (Sigma-Aldrich Company, St. Louis, MO)
- propilenglikol (Kemig, Zagreb, Hrvatska)
- apsolutni etanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- metanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- acetonitril (Avantor Performance Materials B.V., Nizozemska)
- otopina NaCl (10 mM)
- fosfatni pufer (0,01 M, pH=7,5)

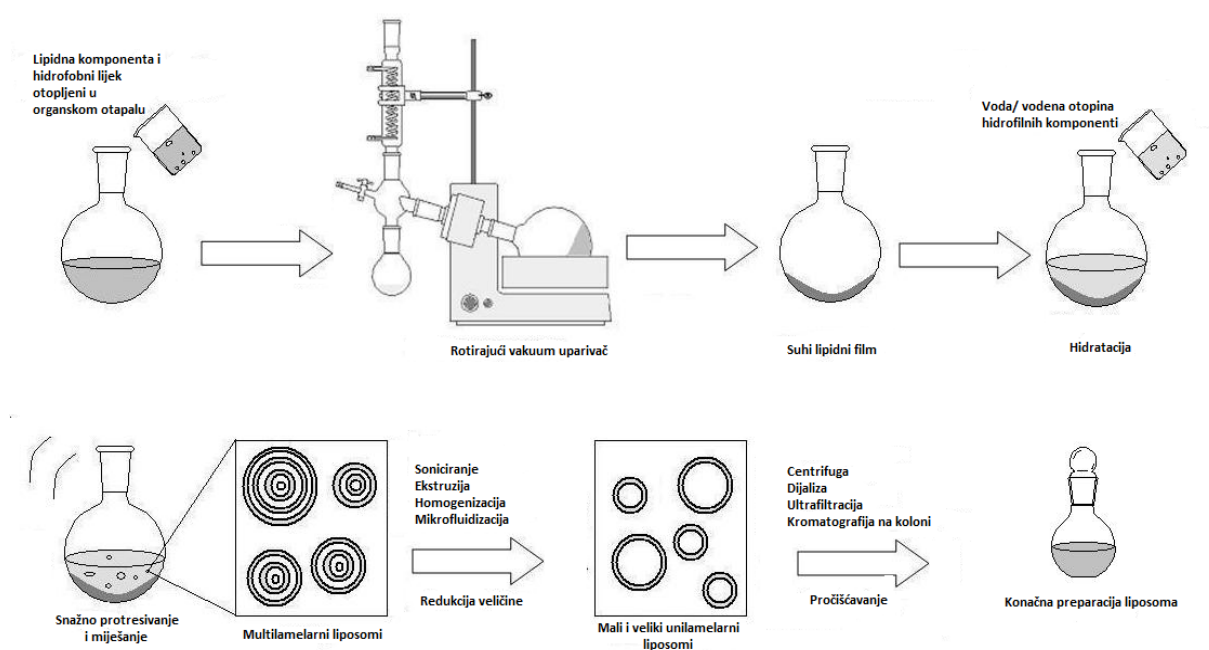
Fosfatni pufer (0,01 mol/l) pripremljen je otapanjem 1,3609 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  u destiliranoj vodi, u tikvici od 1000 mL. pH otopine podešen je na 7,5 pažljivom titracijom s 10M KOH.

Sve korištene kemikalije odgovarale su farmakopejskim zahtjevima čistoće.

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Priprema liposoma

Sve preparacije liposoma koje su izrađene tijekom ovog istraživanja (konvencionalni, deformabilni i propilenglikol liposomi) pripremljene su metodom hidratacije suhog fosfolipidnog sloja, tzv. film metodom (slika 7) (Vanić, 2012b).



**Slika 7.** Shematski prikaz pripreme liposoma film metodom ([www.pulung.ga](http://www.pulung.ga))

Za pripremu konvencionalnih i propilenglikol liposoma u tikvicu okruglog dna odvagano je 200 mg fosfolipida (sojinog fosfatidilkolina) i 30 mg azitromicina te otopljeno u 2 mL apsolutnog etanola. Kod pripreme deformabilnih liposoma lipidna faza se sastojala od 170 mg sojinog fosfatidilkolina, 30 mg natrijeva deoksikolata i 30 mg azitromicina, koji su također otopljeni u koncentriranom etanolu. Tako priređene etanolne otopine lipida i lipofilnog lijeka uparavane su pomoću rotirajućeg vakuum uparivača do potpunog otparavanja

etanola. Tijekom uparavanja preparacije su termostatirane u vodenoj kupelji na 40 °C kako bi se osigurala temperatura viša od temperature faznog prijelaza ( $T_c$ ) sojinog fosfatidilkolina.

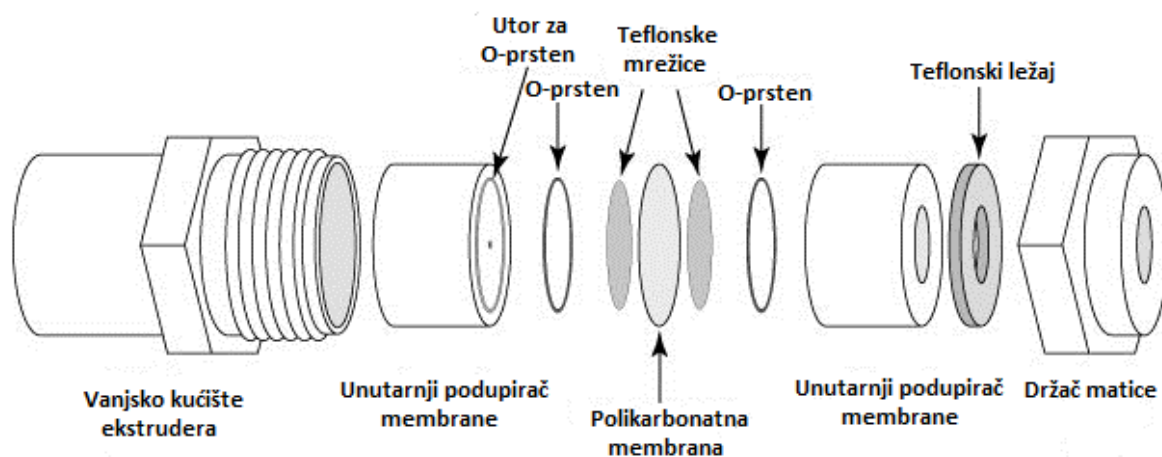
Nastali suhi, tanki fosfolipidni film se uz snažno miješanje rehidrira dodatkom 10 ml redestilirane vode za pripremu konvencionalnih i deformabilnih liposoma, odnosno dodatkom 10 ml 20%-tne (v/v) vodene otopine propilenglikola za pripremu propilenglikol liposoma. Detaljan sastav pojedinih liposomskih preparacija prikazan je u Tablici 1.

**Tablica 1.** Sastav liposomskih preparacija s uklopljenim azitromicinom

| <b>Liposomska preparacija</b> | <b>SPC (mg)</b> | <b>AZI (mg)</b> | <b>SDCh (mg)</b> | <b>PG (ml)</b> | <b>Voda (ml)</b> |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|------------------|
| DEFORMABILNI LIPOSOMI         | 170             | 30              | 30               | -              | 10               |
| PROPILENGLIKOL LIPOSOMI       | 200             | 30              | -                | 2              | 8                |
| KONVENCIONALNI LIPOSOMI       | 200             | 30              | -                | -              | 10               |

*SPC – sojin fosfatidilkolin; AZI – azitromicin; SDCh – natrijev deoksikolat; PG – propilenglikol*

Nastale liposomske suspenzije su pomoću ekstrudera tri puta protiskivane kroz polikarbonatne membrane veličine pora 400 nm, a zatim još tri puta kroz membrane veličine pora 100 nm. Na taj način prvotno nastali veliki, multilamelarni liposomi postaju manji, oligolamelarni i unilamelarni, tj. dolazi do homogenizacije populacije liposoma, što se očituje kroz smanjenje indeksa polidisperznosti ([www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com)). Shematski prikaz ekstrudera nalazi se na slici 8.



*Slika 8. Shematski prikaz ekstrudera ([www.funakoshi.co.jp](http://www.funakoshi.co.jp))*

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

Srednji promjer vezikula i indeks polidisperznosti izmjereni su pomoću uređaja Zetasizer 3000HS (slika 9) metodom fotonske korelacijske spektroskopije (*photon correlation spectroscopy, PCS*). Mjerenje je provedeno pod kutem raspršenja od  $90^\circ$  i pri temperaturi od  $25^\circ\text{C}$ . U kivetu za mjerenje veličine čestica stavljena je jedna kap uzorka liposoma ( $10\ \mu\text{l}$ ) te razrijeđena sa  $3,5\ \text{ml}$   $10\ \text{mM}$  NaCl. Otopina  $10\ \text{mM}$  NaCl prethodno je filtrirana kroz Minisart filtre veličine pora  $0,45\ \mu\text{m}$  kako bi se uklonila eventualna onečišćenja. Mjerenje veličine liposoma provedeno je prije i poslije ekstruzije liposoma. Svi ispitivani uzorci su također pregledani pomoću optičkog mikroskopa (Olympus BH-2, Olympus optical Co. Ltd, Tokio, Japan) pri povećanju  $40\times$  te je vizualno ustanovljena multilamelarnost i širok raspon veličina liposoma prije ekstruzije.

### 3.2.3. Određivanje zeta potencijala

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



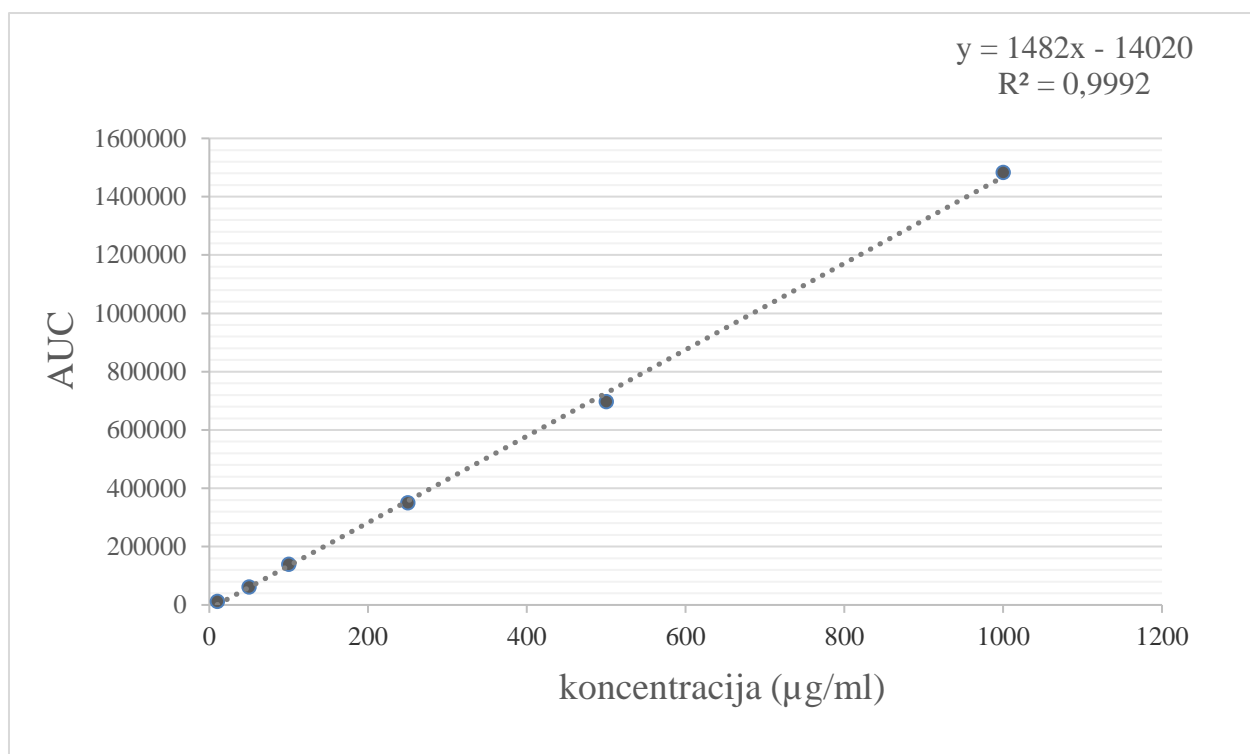
Uzorci liposoma su za mjerenje zeta potencijala pripremljeni razrjeđivanjem nekoliko kapi liposomske suspenzije s adekvatnom količinom 10 mM otopine NaCl. Otopina NaCl prethodno je filtrirana kroz Minisart filtere veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$ . Mjerenja su provedena pri temperaturi od 25°C.



*Slika 9. Zetasizer 3000HS (www.nwu.ac.za)*

### **3.2.4. Izrada baždarnog dijagrama**

U metanolu je pripremljeno šest otopina azitromicina različitih koncentracija, redom: 10, 50, 100, 250, 500 i 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Za svaku je otopinu kromatografski određena površina ispod krivulje (AUC) u triplicatu pri valnoj duljini od 210 nm. Pomoću korelacijske analize srednjih aritmetičkih vrijednosti AUC u ovisnosti o koncentraciji lijeka izrađen je kalibracijski pravac (slika 10;  $y = \text{AUC}$ , površina ispod krivulje;  $x = c$  ( $\mu\text{g/ml}$ ), koncentracija lijeka). Dobivena je jednačba kalibracijskog pravca pomoću koje su na osnovu dobivenih vrijednosti AUC tijekom kvantitativne analize izračunavane koncentracije azitromicina oslobođenog u receptorski medij tijekom *in vitro* ispitivanja oslobađanja. Linearnost metode izražena je koeficijentom korelacije ( $R = 0,9992$ ).



**Slika 10.** Kalibracijski pravac (otopina azitromicina u metanolu)

### 3.2.5. Određivanje sadržaja lijeka u liposomskim preparacijama

Prije ispitivanja *in vitro* oslobađanja azitromicina iz liposoma, bilo je potrebno odrediti sadržaj uklopljenog lijeka u pojedinoj liposomskoj preparaciji.

To je učinjeno na način da je po 100 µl uzorka svake formulacije (konvencionalnih, propilenglikol i deformabilnih liposoma) preneseno u tikvicu od 10 ml te nadopunjeno metanolom do oznake. Uloga metanola je razaranje lipidnog dvosloja liposoma čime se postiže oslobađanje lijeka što omogućava njegovu daljnju kromatografsku detekciju i kvantifikaciju. Iz dobivenih površina ispod krivulje i jednadžbe kalibracijskog pravca izračunate su koncentracije lijeka u svakoj liposomskoj preparaciji.

### 3.2.6. Optimizacija sastava receptorskog medija

Kao što je prethodno opisano (poglavlje 1.4.1), receptorski medij prvog izbora za lipofilne lijekove poput azitromicina je mješavina fosfatnog pufera (PBS) i alkohola, najčešće etanola ([www.particlesciences.com](http://www.particlesciences.com)). Važno je da receptorski medij pruža uvjete osigurane topljivosti, tj. da u radnom volumenu medija nikada nije postignuta granična koncentracija

topljivosti lijeka. Ti uvjeti topljivosti imaju prednosti i nedostataka: s jedne strane uvjeti osigurane topljivosti čine se prikladnijima zato što sama topljivost ne uvjetuje vrednovanje ljekovitog oblika, a s druge pak strane ne postoji sigurnost da je volumen okolnog medija u *in vivo* situaciji takav da osigura te uvjete, već može biti bliži uvjetima neosigurane topljivosti (Jalšenjak i sur., 1998).

Tijekom ovog istraživanja, a prije odabira konačnog receptorskog medija, ispitana je topljivost azitromicina u nekoliko različitih smjesa otapala s namjerom da se identificira optimalni sastav receptorskog medija koji će pružiti uvjete osigurane topljivosti. U tri tikvice volumena 10 mL odvagnuto je po 10 mg azitromicina. U prvu tikvicu dodana je smjesa etanola i vode u omjeru 40:60, u drugu tikvicu smjesa propilenglikola i vode u omjeru 40:60 te u treću tikvicu smjesa PBS-a i etanola također u omjeru 40:60, a tikvice su nadopunjene do oznake. Otapanje lijeka pokazalo se najuspješnijim u smjesi etanola i PBS-a. Budući da je prilikom *in vitro* ispitivanja oslobađanja lijeka, zbog održavanja integriteta eksperimentalnih membrana, poželjno svesti razinu organskog otapala (u ovom slučaju etanola) na minimalnu razinu, ali da je pritom osigurana topljivost, odabrana otopina azitromicina u smjesi PBS-a i etanola razrjeđivana je sukcesivno PBS-om u tikvicama od 10 mL tako da su dobivene otopine s 20%, 10%, 5% i 2,5% volumnog udjela etanola u PBS-u. Usporedbom nastalih otopina ustanovljeno je da je najmanji volumni udio etanola u smjesi s PBS-om pri kojem je topljivost azitromicina zadovoljavajuća 5% (v/v) te je stoga navedena smjesa odabrana kao receptorski medij za ispitivanje oslobađanja.

### **3.2.6. Ispitivanje *in vitro* oslobađanja azitromicina iz liposomskih preparacija**

*In vitro* oslobađanje ljekovite tvari iz liposomskih preparacija ispitivano je pomoću Franz difuzijske ćelije (poglavlje 1.4.) u uvjetima osigurane topljivosti, primjenom celulozno-acetatnih membrana veličine pora 0,2  $\mu\text{m}$ .

Akceptorski odjeljak, volumena 16 mL, sadržavao je 5%-tnu (v/v) smjesu etanola i fosfatnog pufera (0,01 M, pH = 7,5). U spremnik donorskog medija, na prethodno nakvašenu i termostatiranu membranu, nanošeno je 500  $\mu\text{l}$  liposomskih preparacija. Uzorci su iz akceptorskog odjeljka tijekom prvih 6 sati uzimani u vremenskim razmacima od 30 minuta, a posljednji je uzorak uzet 24 sata nakon postavljanja eksperimenta. Volumen svakog uzetog alikvota uzorka (500  $\mu\text{L}$ ) nadomještan je ekvivalentnim volumenom svježeg termostatiranog receptorskog medijem. Sustav je tijekom eksperimenta bio konstantno temperiran na 37 °C

kako bi se na površini membrane osigurala temperatura od 32 °C. Receptorski medij kontinuirano je miješan tijekom eksperimenta pomoću magnetskog mješača (50 rpm).

Pri identičnim eksperimentalnim uvjetima ispitano je oslobađanje lijeka iz kontrolnih uzoraka (otopina azitromicina u smjesi etanola i demineralizirane vode u omjeru 40:60, koncentracije 3 mg/mL).

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

U svim uzorcima receptorskog medija prikupljenima tijekom eksperimenata sukladno načinu opisanom u prethodnom poglavlju 3.2.6., provedeno je određivanje sadržaja oslobođenog azitromicina pomoću HPLC instrumenta. Zadani parametri metode bili su:

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

Uzorci su prije injektiranja u instrument filtrirani kroz filtere veličine pora 0,22 µm, a sastavnice mobilne faze degazirane kako bi se otklonila svaka mogućnost onečišćenja kromatografske kolone. Pomoću izmjerenih površina ispod krivulje i prethodno dobivene jednadžbe kalibracijskog pravca, izračunate su koncentracije oslobođenog lijeka iz svake pojedine liposomske preparacije i kontrolnih uzoraka.

### **3.2.8. Statistička obrada podataka**

Statistička analiza dobivenih rezultata provedena je upotrebom t-testa (za usporedbu 2 skupine rezultata), odnosno ANOVA testa (za usporedbu više skupina rezultata). Razina značajnosti iznosi 0,05 (5%) pa ukoliko je p vrijednost manja od 0,05 zaključuje se da postoji statistički značajna razlika između skupina, odnosno ukoliko je p vrijednost veća od 0,05 zaključuje se da ne postoji statistički značajna razlika između skupina. Razine značajnosti t-testom i ANOVA testom izračunate su u programu Microsoft Excel 2010.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. FIZIKALNO-KEMIJSKA KARAKTERIZACIJA LIPOSOMA

#### 4.1.1. Srednji promjer liposoma i indeks polidisperznosti

Suspencije neekstrudiranih liposoma pregledane su pomoću optičkog mikroskopa (Olympus BH2, Olympus optical Co. Ltd, Tokio, Japan), a pomoću PCS metode provedeno je određivanje srednjeg promjera i indeksa polidisperznosti ekstrudiranih i neekstrudiranih liposoma (postupci su detaljno opisani u poglavlju 3.2.2).

Sve liposomske suspencije pripremljene su film metodom za koju je poznato da rezultira nastankom velikih, multilamelarnih vezikula visokog indeksa polidisperznosti, što je potvrđeno i ovim istraživanjem. Mikroskopskim pregledom preparacija u vidnom polju su uočeni liposomi velikog srednjeg promjera te izrazita heterogenost priređenih liposomskih disperzija. Liposomske su preparacije međusobno uspoređivane s obzirom na srednji promjer i indeks polidisperznosti prije i poslije ekstruzije. Rezultati su prikazani u Tablici 2.

*Tablica 2. Srednji promjer vezikula i indeks polidisperznost liposomskih preparacija*

| Uzorak                  | Srednji promjer liposoma (nm) |                  | Indeks polidisperznosti (PI) |                  |
|-------------------------|-------------------------------|------------------|------------------------------|------------------|
|                         | Prije ekstruzije              | Nakon ekstruzije | Prije ekstruzije             | Nakon ekstruzije |
| DEFORMABILNI LIPOSOMI   | 472 ± 20,3                    | 112,8 ± 0,6*     | 0,806 ± 0,168                | 0,138 ± 0,043*   |
| PROPILENGLIKOL LIPOSOMI | 698,8 ± 8,1                   | 110,8 ± 1,9*     | 1,0 ± 0                      | 0,130 ± 0,009*   |
| KONVENCIONALNI LIPOSOMI | 635,1 ± 62,2                  | 137,6 ± 1,9*     | 0,905 ± 0,085                | 0,098 ± 0,008*   |

*SPC – sojin fosfatidilkolin; SDCh – natrijev deoksikolat; PG – propilenglikol. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D. (n=3). \* Liposomske suspencije ekstrudirane su po 3 puta kroz polikarbonatne membrane veličine pora 400 nm i 100 nm.*

Iz rezultata je vidljivo da su veličine neekstrudiranih konvencionalnih (CL) i propilenglikol liposoma (PGL) vrlo slične, a promjer im se kreće između 630 nm (CL) i 700 nm (PGL). Raspon indeksa polidisperznosti između 0,905 i 1,0 ukazuje na izrazito široku raspodjelu srednjih promjera vezikula. Srednji promjer deformabilnih liposoma (DL), u rasponu od 450 do 490 nm se pokazao statistički značajno manjim (t-test,  $p < 0,05$ ) u odnosu na CL i PGL. Manji srednji promjer DL u odnosu na CL i PGL može se objasniti prisutnošću rubnog aktivatora natrijevog deoksikolata u fosfolipidnom dvosloju DL koji povećava fleksibilnost membrane te reducira napetost na površini vezikula (Palac i sur., 2014).

Kao što je ranije navedeno u poglavlju 1.3.2., uz optimalni srednji promjer od oko 120 nm, vrlo je važno postići i uski raspon veličine vezikula u uzorku kako bi se osigurala što bolja dostava lijeka i penetracija liposoma u kožu. Iz tog razloga provedena je ekstruzija liposomskih disperzija kroz polikarbonatne membrane veličine pora 400 nm i 100 nm. Kao rezultat ovog postupka, dobiveni su liposomi znatno manjeg srednjeg promjera (110-113 nm za DL i PG; 137 nm za CL) i homogenije distribucije veličina što se očituje u padu vrijednosti indeksa polidisperznosti (0,138 za DL, 0,130 za PG te 0,098 za CL) (tablica 2). Nešto veći indeks polidisperznosti kod DL u odnosu na PGL i CL nakon ekstruzije, tj manji pad vrijednosti PI prije i nakon ekstruzije, posljedica je prisutnosti rubnog aktivatora (SDCh) u sastavu DL, koji uzrokuje veću deformabilnosti vezikula, tj. elastičniji lipidni dvosloj, što omogućava prolazak šireg raspona veličina liposoma kroz polikarbonatne membrane sa porama od 100 nm (Palac i sur., 2014).

#### **4.1.2. Zeta potencijal**

Vrijednosti zeta potencijala liposomskih suspenzija ovise o karakteristikama sirovina korištenih za njihovu izradu, u ovom slučaju prvenstveno o negativno nabijenom sojinom fosfatidilkolinu (SPC). Budući da zeta potencijal pokazuje ovisnost isključivo o sastavu uzorka, ali ne i o veličini čestica, mjerenja su provedena na ekstrudiranim uzorcima. Rezultati su predloženi tablicom 3.

Negativne vrijednosti izmjerenih potencijala, koje se kreću između - 35 i - 46 mV, pokazuju da su sve ispitivane liposomske disperzije fizički stabilne, uslijed odbojnih interakcija između pojedinih liposoma uzrokovanih izrazito negativnim nabojem njihove površine.

**Tablica 3. Zeta potencijali ispitivanih liposoma**

| <b>Uzorak</b>           | <b>Zeta potencijal (mV)</b> |
|-------------------------|-----------------------------|
| DEFORMABILNI LIPOSOMI   | $-45,8 \pm 0,5$             |
| PROPILENGLIKOL LIPOSOMI | $-36,5 \pm 2,5$             |
| KONVENCIONALNI LIPOSOMI | $-43,3 \pm 0,8$             |

*SPC – sojin fosfatidilkolin; SDCh – natrijev deoksikolat; PG – propilenglikol. \* Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D. (n=5).*

Nedavna su istraživanja pokazala kako negativan naboj na površini liposoma doprinosi uspješnijoj dermalnoj dostavi ljekovitih supstancija u usporedbi s pozitivno nabijenim ili neutralnim vezikulama (Palac i sur., 2014). Prema tome, može se zaključiti da pripremljeni liposomi odgovaraju kriterijima koje moraju zadovoljiti nosači djelatnih tvari namijenjeni primjeni na kožu.

## **4.2. IN VITRO OSLOBAĐANJE AZITROMICINA IZ LIPOSOMA**

*In vitro* ispitivanje oslobađanja azitromicina iz liposoma provedeno je pomoću Franz difuzijske ćelije prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.6. Svi prikupljeni uzorci filtrirani su kroz filtere veličine pora 0,22  $\mu$ m kako bi se uklonila potencijalna onečišćenja koja bi mogla zagaditi kromatografsku kolonu. Analiza tako pripremljenih uzoraka provedena je pomoću HPLC metode. Dobivene površine ispod krivulje i jednadžba kalibracijskog pravca iskorišteni su za izračun koncentracije (c) i kumulativnog udjela (%) azitromicina oslobođenog tijekom eksperimenata. Rezultati oslobađanja ljekovite supstancije iz različitih preparacija liposoma predloženi su tablicama 4, 5 i 6. Profili oslobađanja ljekovite tvari iz različitih liposomskih formulacija uspoređivani su s kontrolnim uzorkom (etanolno-vodena otopina azitromicina odgovarajuće koncentracije). Rezultati oslobađanja azitromicina iz kontrole prikazani su tablicom 7.

**Tablica 4.** *In vitro* slobađanje azitromicina iz deformabilnih liposoma

| <b>t (min)</b> | <b>A</b> | <b>c (µg/mL)</b> | <b>Δ (µg)</b> | <b>Q (µg)</b> | <b>%</b>     | <b>V (mL)</b> |
|----------------|----------|------------------|---------------|---------------|--------------|---------------|
| 0,0            | 0        | 0,00             | 0             | 0,00          | <b>0,00</b>  | 16            |
| 0,5            | 20 274   | 23,14            | 11,57         | 370,24        | <b>30,02</b> | 16            |
| 1,0            | 30 964   | 30,35            | 15,18         | 497,22        | <b>40,31</b> | 16            |
| 1,5            | 41 324   | 37,34            | 18,67         | 624,25        | <b>50,61</b> | 16            |
| 2,0            | 47 599   | 41,58            | 20,79         | 710,67        | <b>57,61</b> | 16            |
| 2,5            | 50 802   | 43,74            | 21,87         | 766,04        | <b>62,10</b> | 16            |
| 3,0            | 52 919   | 45,17            | 22,58         | 799,19        | <b>64,79</b> | 16            |
| 3,5            | 54 707   | 46,37            | 23,19         | 825,91        | <b>66,96</b> | 16            |
| 4,0            | 56 414   | 47,53            | 23,76         | 848,85        | <b>68,82</b> | 16            |
| 4,5            | 57 239   | 48,08            | 24,04         | 860,73        | <b>69,78</b> | 16            |
| 5,0            | 58 161   | 48,71            | 24,35         | 872,85        | <b>70,76</b> | 16            |
| 5,5            | 59 007   | 49,28            | 24,64         | 883,76        | <b>71,65</b> | 16            |
| 6,0            | 59 352   | 49,51            | 24,75         | 888,93        | <b>72,07</b> | 16            |
| 24             | 63 060   | 52,01            | 26,01         | 929,95        | <b>75,39</b> | 16            |

*t (h)* – vrijeme uzorkovanja od postavljanja eksperimenta; *A* – kromatografski izmjerena površina ispod krivulje; *c (µg/ml)* – koncentracija azitromicina u receptorskom mediju; *Δ (µg)* – količina lijeka u alikvotu uzorka (0,5 ml); *Q (µg)* – kumulativna količina oslobođenog lijeka tijekom određenog vremenskog perioda; *%* – kumulativni udio oslobođenog lijeka tijekom određenog vremenskog perioda; *V (ml)* – volumen receptorskog medija. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (*n=3*).



**Tablica 5.** *In vitro* slobađanje azitromicina iz propilenglikol liposoma

| <b>t (min)</b> | <b>A</b> | <b>c (µg/mL)</b> | <b>Δ (µg)</b> | <b>Q (µg)</b> | <b>%</b>     | <b>V (mL)</b> |
|----------------|----------|------------------|---------------|---------------|--------------|---------------|
| 0,0            | 0        | 0,00             | 0             | 0,00          | <b>0,00</b>  | 16            |
| 0,5            | 18 120   | 21,69            | 10,84         | 346,99        | <b>32,16</b> | 16            |
| 1,0            | 23 993   | 25,65            | 12,82         | 421,24        | <b>39,04</b> | 16            |
| 1,5            | 29 313   | 29,24            | 14,62         | 491,50        | <b>45,55</b> | 16            |
| 2,0            | 35 981   | 33,74            | 16,87         | 578,11        | <b>53,58</b> | 16            |
| 2,5            | 38 927   | 35,73            | 17,86         | 626,78        | <b>58,09</b> | 16            |
| 3,0            | 40 819   | 37,00            | 18,50         | 654,23        | <b>60,63</b> | 16            |
| 3,5            | 40 462   | 36,76            | 18,38         | 656,05        | <b>60,80</b> | 16            |
| 4,0            | 41 347   | 37,36            | 18,68         | 669,37        | <b>62,04</b> | 16            |
| 4,5            | 42 510   | 38,14            | 19,07         | 683,73        | <b>63,37</b> | 16            |
| 5,0            | 43 657   | 38,92            | 19,46         | 697,32        | <b>64,63</b> | 16            |
| 5,5            | 45 369   | 40,07            | 20,04         | 716,76        | <b>66,43</b> | 16            |
| 6,0            | 44 230   | 39,30            | 19,65         | 706,12        | <b>65,44</b> | 16            |
| 24             | 46 558   | 40,88            | 20,44         | 732,23        | <b>67,86</b> | 16            |

*t (h)* – vrijeme uzorkovanja od postavljanja eksperimenta; *A* – kromatografski izmjerena površina ispod krivulje; *c (µg/ml)* – koncentracija azitromicina u receptorskom mediju; *Δ (µg)* – količina lijeka u alikvotu uzorka (0,5 ml); *Q (µg)* – kumulativna količina oslobođenog lijeka tijekom određenog vremenskog perioda; *%* – kumulativni udio oslobođenog lijeka tijekom određenog vremenskog perioda; *V (ml)* – volumen receptorskog medija. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (*n=3*).

**Tablica 6.** *In vitro* slobađanje azitromicina iz konvencionalnih liposoma

| <b>t (min)</b> | <b>A</b> | <b>c (µg/mL)</b> | <b>Δ (µg)</b> | <b>Q (µg)</b> | <b>%</b>     | <b>V (mL)</b> |
|----------------|----------|------------------|---------------|---------------|--------------|---------------|
| 0,0            | 0        | 0,00             | 0             | 0,00          | <b>0,00</b>  | 16            |
| 0,5            | 13360    | 18,48            | 9,24          | 295,60        | <b>20,69</b> | 16            |
| 1,0            | 23878    | 25,57            | 12,79         | 418,39        | <b>29,28</b> | 16            |
| 1,5            | 28545    | 28,72            | 14,36         | 481,56        | <b>33,70</b> | 16            |
| 2,0            | 30105    | 29,77            | 14,89         | 512,76        | <b>35,88</b> | 16            |
| 2,5            | 33358    | 31,97            | 15,98         | 562,77        | <b>39,38</b> | 16            |
| 3,0            | 36085    | 33,81            | 16,90         | 598,96        | <b>41,91</b> | 16            |
| 3,5            | 38876    | 35,69            | 17,85         | 633,21        | <b>44,31</b> | 16            |
| 4,0            | 41061    | 37,17            | 18,58         | 660,28        | <b>46,21</b> | 16            |
| 4,5            | 41780    | 37,65            | 18,83         | 671,74        | <b>47,01</b> | 16            |
| 5,0            | 45416    | 40,11            | 20,05         | 713,84        | <b>49,95</b> | 16            |
| 5,5            | 46422    | 40,78            | 20,39         | 727,85        | <b>50,93</b> | 16            |
| 6,0            | 48504    | 42,19            | 21,09         | 752,87        | <b>52,69</b> | 16            |
| 24             | 50812    | 43,75            | 21,87         | 780,30        | <b>54,61</b> | 16            |

*t (h)* – vrijeme uzorkovanja od postavljanja eksperimenta; *A* – kromatografski izmjerena površina ispod krivulje; *c (µg/ml)* – koncentracija azitromicina u receptorskom mediju;  $\Delta$  ( $\mu\text{g}$ ) – količina lijeka u alikvotu uzorka (0,5 ml); *Q (µg)* – kumulativna količina oslobođenog lijeka tijekom određenog vremenskog perioda; % – kumulativni udio oslobođenog lijeka tijekom određenog vremenskog perioda; *V (ml)* – volumen receptorskog medija. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ( $n=3$ ).

**Tablica 7.** *In vitro* oslobađanje azitromicina iz kontrolnog uzorka (otopine)

| <b>t (min)</b> | <b>A</b> | <b>c (µg/mL)</b> | <b>Δ (µg)</b> | <b>Q (µg)</b> | <b>%</b>     | <b>V (mL)</b> |
|----------------|----------|------------------|---------------|---------------|--------------|---------------|
| 0,0            | 0        | 0,00             | 0             | 0,00          | <b>0,00</b>  | 16            |
| 0,5            | 14 037   | 18,93            | 9,47          | 302,91        | <b>20,30</b> | 16            |
| 1,0            | 38 946   | 35,74            | 17,87         | 581,29        | <b>38,95</b> | 16            |
| 1,5            | 55 218   | 46,72            | 23,36         | 774,84        | <b>51,92</b> | 16            |
| 2,0            | 62 966   | 51,95            | 25,97         | 881,85        | <b>59,09</b> | 16            |
| 2,5            | 71 287   | 57,56            | 28,78         | 997,66        | <b>66,85</b> | 16            |
| 3,0            | 75 213   | 60,21            | 30,11         | 1059,36       | <b>70,98</b> | 16            |
| 3,5            | 75 318   | 60,28            | 30,14         | 1072,73       | <b>71,87</b> | 16            |
| 4,0            | 79 584   | 63,16            | 31,58         | 1125,57       | <b>75,42</b> | 16            |
| 4,5            | 82 397   | 65,06            | 32,53         | 1161,54       | <b>77,83</b> | 16            |
| 5,0            | 85 122   | 66,90            | 33,45         | 1194,71       | <b>80,05</b> | 16            |
| 5,5            | 88 520   | 69,19            | 34,60         | 1234,74       | <b>82,73</b> | 16            |
| 6,0            | 91 325   | 71,08            | 35,54         | 1269,48       | <b>85,06</b> | 16            |
| 24             | 98 556   | 75,96            | 37,98         | 1351,51       | <b>90,55</b> | 16            |

*t (h)* – vrijeme uzorkovanja od postavljanja eksperimenta; *A* – kromatografski izmjerena površina ispod krivulje; *c (µg/ml)* – koncentracija azitromicina u receptorskom mediju; *Δ (µg)* – količina lijeka u alikvotu uzorka (0,5 ml); *Q (µg)* – kumulativna količina oslobođenog lijeka tijekom određenog vremenskog perioda; *%* – kumulativni udio oslobođenog lijeka tijekom određenog vremenskog perioda; *V (ml)* – volumen receptorskog medija. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (*n=3*).

Važna svojstva koja bi liposomi kao nosači djelatnih tvari za dermalnu primjenu trebali imati su predvidljivo, kontrolirano i produženo oslobađanje uklopljenog sadržaja. Razlika između liposoma i otopine lijeka očituje se prije svega u načinu dostave same djelatne supstancije u kožu – da bi došlo do terapijskog učinka, liposomi prvo moraju penetrirati kroz

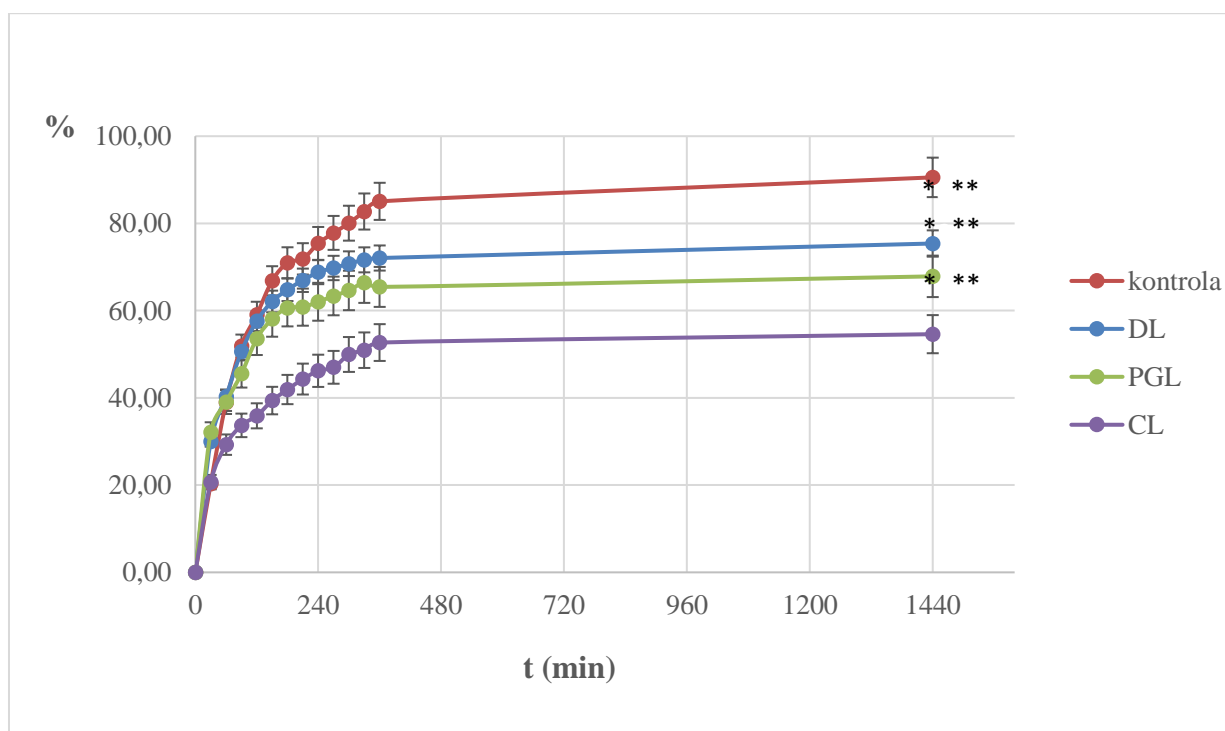
*stratum corneum*, a zatim i osloboditi uklopljeni lijek, dok u slučaju otopine ne postoji korak oslobađanja, već ljekovita tvar slobodno difundira u kožu. U skladu s navedenom tvrdnjom su eksperimentalno dobiveni rezultati *in vitro* oslobađanja (tablica 7), koji pokazuju da velika količina azitromicina iz otopine vrlo brzo difundira kroz membranu (20% već nakon prvih 30 min) dosežući čak 90% ukupne količine lijeka u uzorku nakon 24h. To ukazuje na nepostojanje kontroliranog i produženog oslobađanja lijeka iz otopine.

Kada se analizira oslobađanje azitromicina iz testiranih liposomskih disperzija, eksperimentalni podaci pokazuju da se lijek najsporije oslobađa iz konvencionalnih liposoma. Naime, u receptorski se medij nakon 24 h oslobodilo svega 54 % ljekovite tvari iz uzorka CL nanesenog na membranu. U odnosu na CL, propilenglikol liposomi (PGL) su pokazali sposobnost nešto bržeg oslobađanja lijeka (ukupno 68 % nakon 24 h) što je najvjerojatnije posljedica interkaliranja propilenglikola u fosfolipidni dvosloj, što u konačnici dovodi do smanjenja rigidnosti vezikula, pa uslijed veće fluidnosti lipidnog dvosloja dolazi do bržeg oslobađanja uklopljenog sadržaja. Od svih ispitanih liposomskih preparacija, djelatna tvar se najbrže oslobađala iz deformabilnih vezikula (ukupno 75 % nakon 24 h). Takav je rezultat očekivan s obzirom da je poznato kako prisutstvo rubnog aktivatora u dvosloju destabilizira membrane liposoma koje tada postaju propusnije za uklopljeni lijek pa i oslobađanje na ciljnom mjestu postaje brže (Palac i sur., 2014). Utvrđena je statistički značajna razlika (t-test, Microsoft Excel 2010) u količini oslobođenog (difundiranog) lijeka iz kontrolne otopine u usporedbi s konvencionalnim, deformabilnim i propilenglikol liposomima ( $p < 0,05$ ) u vremenskom razdoblju od 6 h do 24 h nakon postavljanja eksperimenta, što pokazuje da u odnosu na kontrolu liposomske preparacije ostvaruju produljeno i kontrolirano oslobađanje uklopljenog lijeka.

Na slici 11 prikazane su krivulje *in vitro* oslobađanja azitromicina iz liposomskih formulacija zajedno s kontrolnim uzorkom. U zadanom eksperimentalnom vremenu utvrđeno je postojanje značajne razlike (ANOVA test; Microsoft Excel 2010) u količini oslobođenog lijeka između svih ispitanih uzoraka ( $p < 0,05$ ). Kod svih je liposomskih preparacija otprilike 2,5 do 3 h nakon postavljanja eksperimenta uočena pojava platoa koji se održao sve do završetka ispitivanja (24 h). Mogući razlozi ovog fenomena mogu biti zasićenje membrane te uspostava dinamičke ravnoteže između donorskog i receptorskog medija.

Iz svega navedenog, očito je kako kod kontrolne otopine lijeka ne postoji kontrolirano i produženo oslobađanje, već se cijeli proces temelji isključivo na slobodnoj difuziji

azitromicina kroz membranu niz koncentracijski gradijent, zbog čega se nakon 24 h u receptorskom mediju može detektirati čak 90 % otopljene djelatne tvari. Za razliku od otopine lijeka, iz liposomskih se preparacija u vremenskom razdoblju od 24 h oslobodi manja količina ljekovite supstancije, a oslobađanje lijeka je sporije. Na temelju ovih rezultata, može se zaključiti kako bi u daljnjem razvoju dermalnih formulacija uklapanje azitromicina u različite vrste liposoma imalo pozitivan utjecaj na produženo i kontrolirano terapijsko djelovanje tog lijeka. Također, na temelju provedenog istraživanja vidljivo je kako sastav liposoma i njihova fizičko-kemijska svojstva utječu na brzinu oslobađanja lipofilnog lijeka, pri čemu prisutnost surfaktanta i propilenglikola u elastičnim vezikulama (deformabilni i propilenglikol liposomi) povećava propusnost membrane i povećava brzinu oslobađanja azitromicina.



**Slika 11.** *In vitro* oslobađanje azitromicina iz liposoma.

% - kumulativni udio oslobođenog azitromicina iz različitih liposomskih preparacija i kontrole; kontrola – vodeno-etanolna (60:40) otopina azitromicina; DL – deformabilni liposomi; PGL – propilenglikol liposomi; CL – konvencionalni liposomi.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). \* Statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolom (ANOVA,  $p<0,05$ ; Microsoft Excel 2010). \*\* Statistički značajna razlika u usporedbi s CL (ANOVA,  $p<0,05$ ; Microsoft Excel 2010).

## 5. ZAKLJUČCI

Temeljem svih provedenih ispitivanja i obradom dobivenih rezultata, iz ovog je istraživanja moguće izvesti sljedeće zaključke:

- Sve preparacije deformabilnih, konvencionalnih i propilenglikol liposoma priređene su film metodom. Srednji promjeri nastalih vezikula kretali su se od 450 nm do 700 nm, a distribucija veličina čestica bila je vrlo heterogena (PI približno 1,0).
- Ekstruzijom kroz polikarbonatne membrane, veličine pora 400 nm i 100 nm, smanjuje se veličina vezikula i heterogenost uzoraka, na što ukazuju srednji promjeri vezikula u rasponu od 113 nm do 140 nm te PI u iznosu od 0,100 do 0,138 nakon ekstruzije.
- Izmjereni zeta potencijali svih preparacija liposoma zadržali su se u uskom rasponu (između -36 mV i -45 mV) što je i očekivano s obzirom da je osnovni lipidni sastojak svih vezikula bio isti (negativno nabijeni sojin fosfatidilkolin), a razlikovale su se s obzirom na dodatak propilenglikola (propilenglikol liposomi) tj. natrijevog deoksikolata (deformabilni liposomi).
- *In vitro* ispitivanje oslobađanja azitromicina iz različitih liposomskih preparacija, pokazalo je da je brzina oslobađanja lijeka najmanja za konvencionalne, a najveća za deformabilne liposome.
- Budući da su elastične vezikule, propilenglikol liposomi i deformabilni liposomi, pokazali nešto brže oslobađanje lijeka od konvencionalnih liposoma, čini se da upravo prisustvo surfaktanta (natrijev deoksikolat) tj. promotora penetracije (propilenglikol) u sastavu vezikula povećava fluidnost lipidinog dvosloja i omogućava brže oslobađanje uklopljenog sadržaja.
- Nakon 3 h od postavljanja eksperimenta, uočeno je postepeno uspostavljanje platoa koji ukazuje na zasićenje membrane i na postizanje ravnotežnog stanja između donorskog i receptorskog medija.
- Sve liposomske preparacije su u usporedbi s kontrolnom otopinom pokazale potencijal postizanja kontroliranog i produženog oslobađanja azitromicina, što bi predstavljalo korisno svojstvo u potencijalnom razvoju dermalnih liposomskih formulacija tog lijeka.

## 6. LITERATURA

Azithromycin. <http://www.drugbank.ca>, pristupljeno 21.05.2015.

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

Bartosova L, Bajgar J. Transdermal Drug Delivery *In Vitro* Using Diffusion Cells. *Current Medicinal Chemistry*, 2012, 19, 4671-4677.

Čajkovac M. Kozmetologija. Jastrebarsko, Naklada Slap, 2000, str. 25-31.

Desai P, Patlolla RR, Singh M. Interaction of nanoparticles nad cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery. *Mol Membr Biol*, 2010, 27(7), 247-259.

Development and Validation of *In Vitro* Release Testing Methods for Semisolid Formulations, 2009., <http://www.particlesciences.com>, pristupljeno 15.05.2015.

Diffusion Testing Fundamentals, 2012., <http://www.permegear.com>, pristupljeno 17.05.2015.

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

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

Honary S, Zahir F. Effect of Zeta potential on the Properties of Nano – Drug Delivery Systems – A Review (Part 1). *Trop J Pharm Res*, 2013, 12(2), 255-264.

Igarashi T, Nishino K, Nayar KS. The Appearance of Human Skin, Technical report: CUCS-024-05, Columbia University, New York, 2005.

Jalšenjak I, Jalšenjak V, Filipović-Grčić J. Farmaceutika. Zagreb, Školska knjiga, 1998, str. 29-30, 50.

Kupiec T. Quality – Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 2004, 8(3), 223-227.

- Okyar A, Özsoy Y, Güngör S. Novel Formulation Approaches for Dermal and Transdermal Delivery of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, 2012., dostupno na <http://www.intechopen.com>, pristupljeno 18.05.2015.
- 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. *J Liposome Res*, 2014; 24(4): 313-322
- Preparation of Liposomes. <http://www.avantilipids.com>, pristupljeno 18.05.2015.
- Sumamed 500 mg tablete. Sažetak opisa svojstava lijeka, 2015. <http://www.hamled.hr>, pristupljeno 14.05.2015.
- Tran T. Cutaneous Drug Delivery: An update, *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* (2013) 16, S67-S69
- Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: strukturna svojstva i klasifikacija, *Farmaceutski glasnik*, 2012a, 68, 391-400
- Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: metode pripreme, *Farmaceutski glasnik*, 2012b, 68, 7-8/2012, 457-466
- Vanić Ž. Phospholipid Vesicles for Enhanced Drug Delivery in Dermatology, *J Drug Discov Develop and Deliv*, 2015; 2(1):1010, 1-9
- Verma DD, Verma S, Blume G, Fahr A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *Int J Pharm*, 2003, 258:141-51
- Zeta potential measurement using laser Doppler electrophoresis (LDE), 2012., <http://www.malvern.com>, pristupljeno 15.05.2015.
- Zorc B, Butula I. Vježbe iz farmaceutske kemije, 1995., str. 12-16



## 7. SAŽETAK

Konvencionalni, deformabilni i propilenglikol liposomi s uklopljenim azitromicinom pripremljeni su metodom hidratacije suhog fosfolipidnog sloja, tzv. film metodom. Kako bi se postigla homogenost uzoraka i veličina vezikula optimalna za dermalnu primjenu, dobivene preparacije liposoma su ekstrudirane kroz polikarbonatne membrane veličine pora 400 nm i 100 nm. Nakon ekstruzije utvrđen je srednji promjer vezikula u rasponu od 113 nm do 140 nm i niski indeksi polidisperznosti (0,100 – 0,138). Svim je preparacijama određen zeta potencijali, a izmjerene negativne vrijednosti zeta potencijala za sve liposomske preparacije (od -36 mV do -45 mV) upućuju na formiranje fizički stabilnih liposomskih disperzija. *In vitro* ispitivanje oslobađanja azitromicina iz liposoma provedeno je na Franz difuzijskoj ćeliji tijekom 24 h, pri čemu je provedeno i ispitivanje oslobađanja lijeka iz kontrole (otopina lijeka). Sadržaj oslobođenog lijeka u sakupljenim uzorcima određen je kromatografski (HPLC). Dobiveni rezultati ukazuju na sporije oslobađanje azitromicina iz svih vrsta liposoma u usporedbi s kontrolom. Lijek se brže oslobađao iz elastičnih liposoma (deformabilni liposomi, propilenglikol liposomi) u odnosu na konvencionalne liposome, pri čemu je brzina oslobađanja bila najveća za deformabilne liposome. Može se zaključiti kako oslobađanje azitromicina iz fosfolipidnih vezikula ovisi o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima te o prisutnosti promotora penetracije ili rubnog aktivatora u sastavu. Elastični liposomi su se pokazali kao prikladni nosači azitromicina za dermalnu primjenu kojima bi se moglo postići produženo i kontrolirano oslobađanje.

## 8. SUMMARY

Conventional, deformable and propylene glycol liposomes encapsulating azythromicin were prepared by the film hydration method. In order to obtain homogenous liposomal dispersions and optimize vesicle size for dermal application, liposomal preparations were extruded through polycarbonate membranes with pore size of 400 nm and 100 nm. Resulting vesicles were in the mean diameter range of 113 to 140 nm, with low values of polydispersity index measured (0,100 – 0,138). Negative values of zeta potential for all liposomal preparations (between -36 mV and -45 mV) indicated the formation of physically stable liposomal dispersions. *In vitro* release studies were performed during 24 h using Franz diffusion cell system. The release of azythromicin from different liposomes and control (azithromycin in 40% ethanol solution) was tested. The amount of the released azithromycin was determined chromatographically (HPLC). All of the liposomal formulations were characterized by the slower release rates and sustained release profiles as compared to the control (solution of the drug). Among the investigated liposomes, the release rates were higher for elastic vesicles (deformable and propylene glycol liposomes) than conventional liposome and the highest release rate was observed for deformable liposomes. It could be concluded that the azithromycin release from the phospholipid vesicles depends on their physicochemical properties and the presence of the penetration enhancer or edge activator in their composition. Elastic liposomes have been shown to be suitable as azithromycin carrier systems for dermal application which could possibly achieve prolonged and controlled release of the drug.