

# Razvoj novih fosfolipidnih terapijskih sustava za topikalnu antimikrobnu terapiju

---

Rukavina, Zora

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:358813>

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

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



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Zora Rukavina

**RAZVOJ NOVIH FOSFOLIPIDNIH  
TERAPIJSKIH SUSTAVA ZA  
TOPIKALNU ANTIMIKROBNU TERAPIJU**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Zora Rukavina

**RAZVOJ NOVIH FOSFOLIPIDNIH  
TERAPIJSKIH SUSTAVA ZA  
TOPIKALNU ANTIMIKROBNU TERAPIJU**

DOKTORSKI RAD

Mentor: izv. prof. dr. sc. Željka Vanić

Zagreb, 2019.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Zora Rukavina

**DEVELOPMENT OF NOVEL  
PHOSPHOLIPID DRUG DELIVERY  
SYSTEMS FOR TOPICAL  
ANTIMICROBIAL THERAPY**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Assoc. Prof. Željka Vanić, Ph.D.

Zagreb, 2019

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Dio eksperimenata proveden je u Zavodu za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u *Department of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, University of Tromsø* (Norveška) i u PLIVA Hrvatska d.o.o., Istraživanje i razvoj.

# ZAHVALE / ACKNOWLEDGEMENTS

*Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Željki Vanić na znanju i vještinama koje mi je strpljivo i nesebično prenijela te svesrdnoj pomoći i podršci tijekom izrade doktorskog rada.*

*Hvala profesorici Jeleni Filipović-Grčić i svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju FBF-a na znanstvenoj, stručnoj i prijateljskoj podršci. Svatko od njih na svoj mi je jedinstven način pomogao da rastem kao znanstvenica i kao osoba. Posebno hvala Marini, mojoj prijateljici i kolegici, što me uvijek strpljivo slušala, mudro savjetovala i istinski suosjećala, bodreći me kad je bilo najteže. Dodatno hvala mojoj ekipi iz asistentske sobe i dobrom duhu Zavoda, gđi Mariji Zori Ivček - uz vas je mnogo veselije i ljepše raditi.*

*Prof. dr. sc. Maji Šegvić Klarić, koja me usmjeravala na mojim prvim istraživačkim koracima još za diplomskog studija, veliko hvala za savjete i pomoć pri izvođenju mikrobioloških ispitivanja. Hvala i ostalim djelatnicima Zavoda za mikrobiologiju FBF-a što su me tako srdačno prihvatili.*

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Nataši Škalko-Basnet i članovima njezinog istraživačkog tima na dugogodišnjoj suradnji i velikodušnoj pomoći kad god je trebalo, te Dunji Božić i Petri Golji Gašparović iz PLIVA Hrvatska na pomoći s reološkom karakterizacijom uzoraka.*

*Najveće hvala mojim roditeljima, jer sam zbog njih ono što jesam i tu gdje jesam. Hvala vam na bezuvjetnoj ljubavi i neprekidnoj podršci tijekom cijelog mog života i školovanja. Hvala što ste me naučili da vjerujem u Boga, u sebe i u svoje snove. Hvala što ste mi pokazali vrijednost znanja i otvorili svijet beskrajnih mogućnosti. Hvala na svemu.*

*Hvala mojoj sestri i mom bratu, za koje sam iskreno zahvalna što ih imam. Hvala što ste moji odani saveznici i veliki oslonac u životu. Bez vas to ne bi bilo to.*

*Neizmjerno hvala mom suprugu Tinu, mojoj ljubavi i utočištu, što je vjerovao u mene kad ja sama nisam, što me motivirao i podupirao s ljubavlju i nadljudskim strpljenjem, te što me inspirira svaki dan da budem bolja verzija sebe. Hvala i mojim kćerkicama, Riti i Mari, što su tako divne i što su stoički podnijele sve propuštene zajedničke trenutke. Vi ste moja radost, moj smisao i moje sve.*

*Svoj ostaloj rodbini, prijateljima i kolegama koji su bili uz mene na ovom putu također od srca zahvaljujem! Za kraj, hvala dragom Bogu što mi je davao snagu da idem naprijed kad je bilo teško i što me svojom beskrajnom milošću doveo do ovog trenutka.*

# SAŽETAK

Učinkovita topikalna terapija infekcija kože te prevencija stvaranja biofilmova i razvoja rezistencije mikroorganizama od velikog su medicinskog značaja. Cilj ovog rada bio je razviti biorazgradljiv, djelotvoran i siguran terapijski sustav za topikalnu antimikrobnu terapiju, zasnovan na fosfolipidnim vezikulama (liposomima) uklopljenima u kitozansku podlogu. U tu svrhu pripravljeno je i evaluirano nekoliko tipova liposoma s uklopljenim azitromicinom (AZT) različitog naboja na površini i čvrstoće/elastičnosti fosfolipidnih dvoslojeva: konvencionalni liposomi (CL), deformabilni liposomi (DL), propilenglikol liposomi (PGL) i kationski liposomi (CATL). Čvrstoća/elastičnost fosfolipidnih dvoslojeva AZT-liposoma utjecala je na fizičku stabilnost, profil oslobađanja AZT-a i lokalizaciju antibiotika u koži. Najsporije oslobađanje AZT-a, te odlaganje na površini kože, postignuto je CATL-om, karakteriziranim čvrstim dvoslojevima. Elastični liposomi (DL i PGL) pokazali su brže oslobađanje te nakupljanje AZT-a u unutrašnjosti kože. Svi AZT-liposomi pokazali su antibakterijski učinak na MRSA kliničke izolate, pri čemu su minimalne biofilm inhibitorne koncentracije bile i do 32 puta manje od onih utvrđenih za AZT-otopinu. Najjači anti-MRSA učinak imali su CATL, potom slijede DL, PGL i CL. Svi AZT-liposomi bili su biokompatibilni s keratinocitima i fibroblastima, čak i pri značajno većim koncentracijama AZT-a od pripadajućih minimalnih inhibitornih koncentracija i minimalnih biofilm inhibitornih koncentracija. Uklapanjem AZT-liposoma u kitozansku podlogu produljeno je oslobađanje AZT-a i postignuta prikladna viskoznost za topikalnu primjenu na kožu. Anti-MRSA učinak svih formulacija liposomi-u-podlozi bio je znatno veći od onog postignutog s kontrolom. Teksturna analiza ispitivanih formulacija liposomi-u-podlozi pokazala je prikladnu čvrstoću, kohezivnost i adhezivnost formulacija, posebice PGL-u-podlozi, a koje su direktno povezane s njihovom primjenom i zadržavanjem na koži. Uzimajući u obzir rezultate svih provedenih ispitivanja, formulacija CATL-u-podlozi bila bi prikladna za liječenje MRSA-om uzrokovanih infekcija kod kojih je potrebna lokalizacija antibiotika u površinskim slojevima kože, dok bi formulacija PGL-u-podlozi omogućila bolju dostavu antibiotika u dublje slojeve kože. Međutim, potrebno je provesti *in vivo* animalna ispitivanja terapijske učinkovitosti kako bi se te pretpostavke i potvrdile.

**Ključne riječi:** deformabilni liposomi, propilenglikol liposomi, kationski liposomi, azitromicin, kitozan, podloga, topikalna primjena, koža, meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA)

# SUMMARY

**Introduction:** Treatment of complicated skin infections relies on the oral or parenteral administration of antimicrobials, commonly antibiotics, which comprise enhanced risk of microbial resistance development, undesired drugs' side effects and lower patient compliance. As an alternative, antibiotics can be applied topically; however, their effectiveness is often reduced due to an insufficient local drug concentration achieved, antibiotic-resistant infectants, biofilm formation and/or inability of the drug to reach the site of action. The use of biodegradable and biocompatible nanopharmaceuticals, such as phospholipid vesicles (liposomes), presents a promising strategy for the efficient topical delivery of antibiotics and improvement of their antibacterial/antibiofilm activity. In addition to altering antibiotics' pharmacokinetics, the specific bilayer architecture of liposomes enables them to release the encapsulated antibiotic in the close proximity of bacteria or to fuse with bacterial membranes, allowing higher drug concentrations at the site of action.

Azithromycin (AZT) is a broad-spectrum macrolide antibiotic, used for the treatment of a number of bacterial infections, including skin and soft tissue infections. It is currently available in dosage forms for intravenous, oral or ophthalmic administration, while no topical AZT formulation for skin application has been registered so far. Considering numerous benefits of local antibiotic administration, development of the novel phospholipid-based delivery system for topical AZT application could offer a promise for more effective and safer antibacterial therapy of skin infections. Therefore, the aim of this study was to prepare and evaluate potential of the AZT-loaded liposomes for the treatment of complicated bacterial skin infections. Several types of AZT-loaded liposomes, differing in the physicochemical properties, were prepared and evaluated for *in vitro* AZT release, *ex vivo* skin deposition/penetration, *in vitro* antibacterial/antibiofilm activity against several methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clinical isolates and *in vitro* biocompatibility with the human skin cells. Additionally, AZT-loaded liposomes were incorporated into chitosan vehicle to obtain proper viscosity and pronounced retention of the formulation at the application site, allowing extended AZT release with possible further increase in antimicrobial activity.

**Methods:** AZT-loaded liposomes, differing in the surface charge and bilayer elasticity, i.e. conventional liposomes (CLs), deformable liposomes (DLs), propylene glycol-embedding liposomes (PGLs) and cationic liposomes (CATLs), were prepared by the film method and



homogenized by extrusion. Mean diameters, polydispersity indexes and zeta potential of the obtained phospholipid vesicles were determined by photon correlation spectroscopy, while liposomes' bilayer properties were assessed by calculating the degree of membrane elasticity. All AZT-loaded liposomes were compared for the encapsulation efficiency by applying two different methods for the separation of the liposomally-entrapped AZT (minicolumn centrifugation and ultracentrifugation), whereas quantification of AZT was performed by high performance liquid chromatography (HPLC). To evaluate physical stability of the various types of AZT-loaded liposomes, the changes in the mean diameter, polydispersity index and zeta potential were monitored over 10 months of storage at 4 °C. Franz diffusion cell method was utilized for *in vitro* AZT release experiments and *ex vivo* deposition/permeation studies on the full-thickness ear pig skin model. Antimicrobial and antibiofilm potentials of the AZT-loaded liposomes were assessed against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and 5 different MRSA clinical isolates by determining minimal inhibitory concentrations (MICs) and minimal biofilm inhibitory concentrations (MBICs). The liposomes were also examined for *in vitro* biocompatibility with the human keratinocyte (HaCaT) and human diploid fibroblast (MJ90hTERT) cell lines.

Continuing the research on development of phospholipid-based formulations, the each of the AZT-loaded liposomal dispersion was incorporated into 2.5 % (w/w) chitosan-based vehicle prepared from the high molecular weight chitosan with the concentration of liposomes in the chitosan-based vehicle being 30 % (w/w) (AZT-loaded liposomes/chitosan vehicle). Control vehicle was prepared under the same conditions by mixing the equivalent amount of AZT-solution into the vehicle. The release of AZT from the control and liposomes-in-vehicle (CL-in-vehicle, DL-in-vehicle, PGL-in-vehicle and CATL-in-vehicle) was determined by the Franz diffusion cell method, while the efficacy of all the formulations was examined by assessment of anti-MRSA potential using *in vitro* agar diffusion method. Finally, mechanical and rheological properties of all the liposomes-in-vehicle, as well as compatibility of the different AZT-loaded liposomes with the chitosan vehicle, were determined by conducting rheological studies (flow curve, tack test) and texture analysis.

**Results:** (Phospho)lipid constituents, single chain surfactant and propylene glycol have influenced physicochemical characteristics of AZT-loaded liposomes, their stability, AZT release profiles, skin deposition/penetration, interaction with bacteria and compatibility with the human skin cells. CLs, DLs and PGLs were negatively surface charged with average diameters 130-170 nm, whereas positively surface charged CATLs were significantly larger (220 nm). Presence of propylene glycol and single chain surfactant in the bilayers of PGLs

and DLs, contributed to the high degree of membrane elasticity and facilitated the encapsulation of AZT (up to 64 % in DLs). On the contrary, CLs and particularly CATLs were of rigid bilayers, consequently incorporating lesser amount of AZT. The elasticity/rigidity of the AZT-loaded liposomes affected their physical stability as well. Although during the first 2 months of storage, mean diameters, zeta potential and polydispersity indexes of both elastic and rigid liposomes remained unchanged, after 10 months of storage elastic liposomes (DLs, PGLs) appeared to be less stable than CLs and CATLs.

All the liposomes enabled prolonged release of AZT with an initial burst effect followed by a slower release phase. Such a release profile would be suitable to attain high initial local drug concentration and rapid onset of action, with subsequent maintenance of effective antibiotic concentration over a longer period of time. AZT release rates were also affected by bilayer compactness, manifesting in the slower AZT release from CLs and CATLs as compared to elastic DLs and PGLs. These results were consistent with the skin deposition/penetration of AZT achieved by the different liposomes: the lowest ratio of the deposited AZT was obtained with rigid CATLs, while elastic DLs and PGLs were mostly retained inside the skin (77 %). Significantly reduced AZT penetration through the skin obtained by all the AZT-loaded liposomes, in comparison to the AZT-solution, is of great importance for escaping systemic AZT absorption and increasing the topical drug concentration at the desired site of action.

The advantages of the liposomal encapsulation of AZT were confirmed by significantly enhanced *in vitro* antibacterial activities against both planktonic and biofilm-forming MRSA clinical isolates achieved by all the AZT-loaded liposomes. The highest anti-MRSA activity was obtained by CATLs, with MICs and MBICs up to 32-fold lower than MICs of AZT-solution (control). DLs and PGLs were somewhat less effective than CATLs in the inhibition of both bacterial growth and biofilm formation, but were still more efficient than CLs.

The cytotoxicity evaluation demonstrated that all the AZT-loaded liposomes were biocompatible with both the keratinocytes and fibroblasts at the concentrations that covered and exceeded corresponding MIC and MBIC values. Fibroblasts, which are known to be more sensitive than keratinocytes, were less tolerable to all the AZT-loaded liposomes, particularly CATLs, but only at very high AZT concentrations.

Incorporation of AZT-loaded liposomes into chitosan vehicle resulted in a significantly slower release of AZT in comparison to both control and corresponding liposomal dispersions. AZT release profiles from liposomes-in-vehicle were in agreement with the

physicochemical properties of the incorporated AZT-loaded liposomes, showing the highest 24-hour cumulative release from DL-in-vehicle and PGL-in-vehicle (40 %). All of the tested liposomes incorporated into chitosan vehicle demonstrated stronger *in vitro* anti-MRSA activity than the control, while empty vehicle failed to show any anti-staphylococcal activity at the tested concentration range.

Texture analysis of chitosan vehicle with incorporated AZT-liposomes demonstrated the influence of liposomal constituents on texture parameters of the formulations: hardness, cohesiveness and adhesiveness, and also provided valuable data on the compatibility of liposomes with the chitosan vehicle. Incorporation of CLs, DLs and CATLs showed greater impact on the original structure of the chitosan vehicle than the control. Among the examined liposomes-in-vehicle formulations, PGL-in-vehicle possessed superior mechanical properties, which can be ascribed to the presence of propylene glycol in the formulation. Rheological measurements demonstrated a thixotropic non-Newtonian pseudoplastic behavior of the empty vehicle and all the formulations liposomes-in-vehicle, as well as viscosity appropriate for dermal administration.

**Conclusion:** The performed investigations have confirmed substantial potential of the phospholipid-based delivery system for improved topical treatment of the MRSA-related bacterial infections. Considering the importance of the physical properties of the liposomes on skin deposition/penetration, anti-MRSA activity and desired mechanical features of the formulation, CATL-in-vehicle could be suitable for the treatment of superficial skin infections with an impaired *stratum corneum*, whereas PGL-in-vehicle could be relevant for the treatment of deep skin infections. However, their efficacy has to be examined *in vivo* to substantiate these assumptions.

**Keywords:** deformable liposomes, propylene glycol-embedding liposomes, cationic liposomes, azithromycin, chitosan, vehicle, topical drug delivery, skin, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1 GRAĐA I FUNKCIJA KOŽE.....	2
1.2. PRIMJENA LIJEKOVA NA KOŽU .....	4
1.2.1. Transport lijeka kroz kožu .....	5
1.3. LIPOSOMI U DERMATOLOGIJI .....	6
1.3.1. Konvencionalni liposomi .....	10
1.3.2. Deformabilni liposomi .....	11
1.3.3. Propilenglikol liposomi.....	14
1.3.4. Etosomi .....	15
1.4. INFEKCIJE KOŽE I MEKIH TKIVA .....	20
1.4.1. Bakterijske infekcije kože i mekih tkiva.....	20
1.4.2. Biofilmovi .....	21
1.4.3. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	22
1.5. LOKALNA ANTIMIKROBNA TERAPIJA INFEKCIJA KOŽE .....	23
1.5.1. Liposomi kao nosači antimikrobnih lijekova za topikalnu primjenu na kožu .....	24
1.6. DERMATOLOŠKE PODLOGE.....	30
1.6.1. Kitozanske podloge.....	31
1.6.2. Liposomi uklopljeni u podlogu .....	32
1.7. AZITROMICIN .....	40
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	41
3. MATERIJALI I METODE .....	44
3.1. MATERIJALI.....	45
3.2. METODE.....	46
3.2.1. Priprava liposoma .....	46
3.2.2. Određivanje srednjeg promjera liposoma i indeksa polidisperznosti .....	47
3.2.3. Određivanje zeta potencijala liposoma .....	48
3.2.4. Određivanje uspješnosti uklapanja AZT-a u liposome .....	48
3.2.5. Određivanje sadržaja AZT-a metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) .....	49
3.2.6. Određivanje elastičnosti liposoma .....	50
3.2.7. Ispitivanje stabilnosti AZT-liposoma tijekom skladištenja .....	50

3.2.8. <i>In vitro</i> oslobađanje AZT-a iz liposoma .....	51
3.2.9. <i>Ex vivo</i> ispitivanje permeabilnosti AZT-a u kožu.....	51
3.2.10. Mikrobiološka ispitivanja AZT-liposoma.....	52
3.2.11. Ispitivanje <i>in vitro</i> citotoksičnosti AZT-liposoma.....	56
3.2.12. Priprava kitozanske podloge i uklapanje liposoma.....	57
3.2.13. <i>In vitro</i> oslobađanje AZT-a iz formulacija liposomi-u-podlozi.....	58
3.2.14. Mikrobiološka ispitivanja formulacija liposoma-u-podlozi.....	58
3.2.15. Teksturna analiza formulacija liposomi-u-podlozi .....	59
3.2.16. Reološka ispitivanja formulacija liposomi-u-podlozi .....	59
3.2.17. Statistička analiza podataka .....	60
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	61
4.1. Fizičko-kemijska karakterizacija liposoma .....	62
4.1.1. Veličina i površinski naboj AZT-liposoma.....	62
4.1.2. Elastičnost/rigidnost liposoma .....	64
4.1.3. Uspješnost uklapanja AZT-a u liposome.....	66
4.2. Stabilnost liposoma tijekom skladištenja .....	69
4.3. Oslobađanje AZT-a iz liposoma <i>in vitro</i> .....	73
4.4. Permeabilnost/odlaganje AZT-a u kožu .....	75
4.5. Antibakterijska aktivnost liposoma <i>in vitro</i> .....	79
4.6. Biokompatibilnost AZT-liposoma.....	82
4.7. <i>In vitro</i> oslobađanje AZT-a iz formulacija liposomi-u-podlozi .....	86
4.8. <i>In vitro</i> antibakterijski učinak formulacija liposomi-u-podlozi.....	90
4.9. Teksturna i reološka karakterizacija formulacija liposomi-u-podlozi.....	95
4.9.1. Teksturna svojstva formulacija liposomi-u-podlozi .....	95
4.9.2. Viskoznost formulacija liposomi-u-podlozi .....	99
4.9.3. Određivanje adhezivnosti formulacija liposomi-u-podlozi .....	103
5. ZAKLJUČCI.....	107
6. LITERATURA.....	110
7. POPIS KRATICA .....	138
ŽIVOTOPIS .....	141
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA .....	143
PRILOG .....	146

## **1. UVOD**

## 1.1 GRAĐA I FUNKCIJA KOŽE

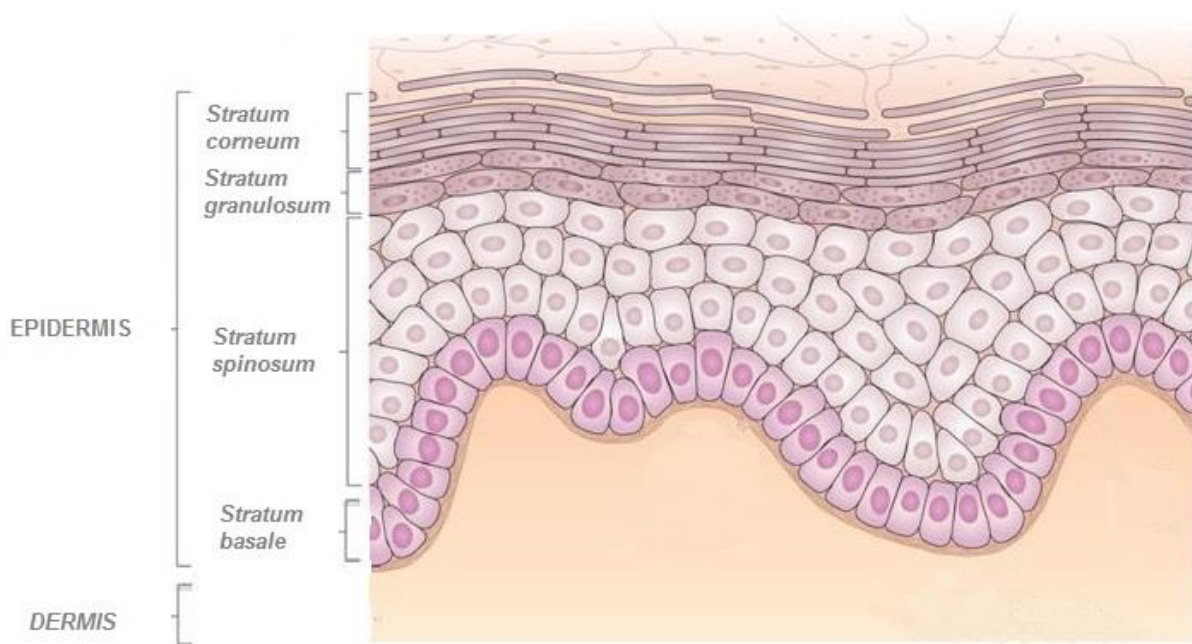
Koža (lat. *cutis*) je najveći i najteži ljudski organ, koji predstavlja prvu liniju obrane organizma od štetnih vanjskih utjecaja (UV zračenje, mikroorganizmi, kemikalije i dr.). Koža ima važnu ulogu u termoregulaciji, sprječavanju gubitka tekućine, pohrani energije, sintezi melanina, keratina, vitamina D, lipida i proteina, sudjeluje u izmjeni tvari i veoma je važan osjetilni organ (osjet dodira, boli, temperature, pritiska). Strukturno se sastoji od tri osnovna sloja: epidermisa, dermisa i rahlog potkožnog sloja hipodermisa, te kožnih privjesaka (nokti, dlake i pripadajuće žlijezde znojnice i lojnice), koji imaju važnu ulogu u cjelokupnoj funkciji kože (Sterry i sur., 2006).

Epidermis je najgornji, vanjski sloj kože te je veoma važna prepreka u zaštiti tijela od toksina, bakterija i gubitka tekućine. Sastoji se od 4 ili 5 tipičnih slojeva keratinocita postavljenih jedan na drugi: rožnati sloj (lat. *stratum corneum*), svijetli sloj (lat. *stratum lucidum*), zrnati sloj (lat. *stratum granulosum*), trnasti sloj (lat. *stratum spinosum*) i bazalni sloj (lat. *stratum basale*) (Slika 1). *Stratum spinosum* i *stratum basale* zajedno čine tzv. *stratum germinative*. Bazalni sloj sastoji se od jednog sloja tzv. bazalnih stanica, čijom se neprekidnom mitozom i migracijom prema višim slojevima epidermis konstantno obnavlja. Na putu prema površini kože, bazalne stanice sazrijevaju i prolaze kroz proces diferencijacije, poznat kao keratinizacija ili kornifikacija. Keratinizirane stanice (korneociti) u rožnatom sloju međusobno su povezane dezmosomima i okružene epidermalnim lipidima, odnosno intercelularnim visokoorganiziranim lipidnim matriksom koji sadrži ceramide (40-50 %), slobodne masne kiseline (15-25 %), kolesterol (20-25 %), kolesterol-sulfat (5-10 %), trigliceride, sterolne estere i voskove, a debljina mu se kreće između 10 i 20  $\mu\text{m}$  (Elias i Menon, 1991). Zbog svoje specifične građe upravo rožnati sloj ima odlučujuću ulogu kao mehaničko-kemijska barijera koja sprječava isparavanje vode iz dubljih slojeva kože, ali i štiti organizam od penetracije različitih ksenobiotika iz okoliša (Escobar-Chávez i sur., 2012; Vanić, 2015; Verma i sur., 2003).

Dermis je građen od vezivnog tkiva koje služi kao potpora epidermisu od kojeg ga odjeljuje bazalna membrana, a sastoji se od papilarnog i retikularnog sloja (Kotla i sur., 2017). Papilarni sloj sadrži mnogo elastičnih vlakana kolagena i elastina, dobro je prokrvljen, zbog čega sudjeluje u regulaciji temperature i tlaka, dostavi hranjivih tvari u epidermis te koži daje ružičastu boju. Retikularni sloj se nalazi ispod papilarnog sloja, a čine ga gusto vezivno tkivo, tj. stanice fibroblasta koje luče ekstracelularni matriks s umreženim

glikozaminoglikanima (hijaluronska kiselina i dermatan sulfat) i vlaknastim proteinima (kolagen, elastin, laminin, fibronektin), potom krvne i limfne žile te živci (Escobar-Chávez i sur., 2012).

Hipodermis ili potkoža (lat. *hipodermis, subcutis*) je najdublji sloj kože koji služi kao veza između dermisa i pokretnih struktura ispod njega (fascije, mišići, tetive). Sastoji se od rahlog vezivnog tkiva koje sadrži različitu količinu masnoga tkiva, tj. adipocita (lat. *panniculus adiposus*). Njegova debljina ovisi o dobi, spolu te endokrinom i nutritivnom statusu organizma svake osobe, ali i lokalizaciji na pojedinim dijelovima tijela (Igarashi i sur., 2005).



**Slika 1.** Građa epidermisa. Preuzeto i prilagođeno iz Solanas i Benitah (2013), uz dozvolu Springer Nature.



## 1.2. PRIMJENA LIJEKOVA NA KOŽU

Zahvaljujući specifičnoj anatomiji i fiziologiji, koža se ponaša kao selektivna dvosmjerna barijera kroz koju je moguća penetracija, ali i eliminacija različitih tvari iz organizma. Također, zbog lake dostupnosti i velike površine, koža predstavlja važan put primjene lijekova.

Dermalni put primjene podrazumijeva dostavu i zadržavanje lijeka u koži (većinom u epidermisu) čime se osigurava isključivo lokalno djelovanje, dok je prolazak lijeka u sistemsku cirkulaciju izbjegnut ili minimaliziran. Na taj se način mogu bitno smanjiti nepoželjne sistemske nuspojave i eventualni toksični učinci lijeka (Banović i sur., 2011). Koža se istražuje i kao alternativni put sistemske primjene lijekova. Riječ je o transdermalnoj primjeni koja u usporedbi s oralnim putem primjene lijekova nudi brojne prednosti. Prije svega, izbjegnut je utjecaj varijabli koje se bitno odražavaju na gastrointestinalnu apsorpciju lijeka (pH gastrointestinalnih sokova, prisutnost hrane i peristaltička aktivnost crijeva), a zaobilaznjem prvoga prolaska lijeka kroz jetru spriječena je njegova brza metabolička razgradnja, što je posebice važno za lijekove male bioraspoloživosti. Nadalje, polaganim i kontroliranom oslobađanjem lijeka i penetracijom kroz kožu osigurava se kontinuirana apsorpcija i ujednačena koncentracija lijeka u plazmi, što je osobito značajno kod lijekova kratkog vremena polueliminacije (Barry, 2007; Okyar i sur., 2012).

Zbog svih navedenih prednosti kože kao puta primjene lijekova, ne čudi podatak da je više od trećine terapijskih sustava koji se danas klinički ispituju namijenjeno upravo dopremiti lijekova u kožu (dermalna primjena) ili kroz kožu (transdermalna primjena) (Jepps i sur., 2013). Tijekom razvoja i optimizacije sastava formulacija namijenjenih primjeni na kožu, važno je imati u vidu mjesto djelovanja djelatne tvari i kakav se terapijski učinak želi postići: i) lokalni učinak lijeka na samoj površini kože (npr. blokatori UV zračenja, kozmetički učinak, antiseptički učinak), ii) lokalni učinak lijeka u epidermisu (npr. kortikosteroidi u liječenju dermatosa, antimikrobni učinak kod kožnih infekcija), iii) transdermalni učinak lijeka u tkivu koje se nalazi ispod kože (npr. nesteroidni protuupalni lijekovi u liječenju reumatoloških bolesti), ili iv) transdermalna sistemska raspoloživost lijeka (npr. transdermalni flasteri estrogena, nikotina, fentanila itd.) (Escobar-Chávez i sur., 2012).

### 1.2.1. Transport lijeka kroz kožu

Perkutana, tj. dermalna apsorpcija je proces prolaska djelatne tvari u/kroz kožu, a uključuje penetraciju (ulazak tvari u rožnati sloj, tj. *stratum corneum*), permeaciju (prolazak tvari kroz slojeve kože koji su strukturno i funkcionalno različiti od površinskog rožnatog sloja) i apsorpciju (prolazak tvari u sistemsku cirkulaciju). Doprema lijeka u/kroz kožu i njegova perkutana apsorpcija može se odvijati različitim putevima. To su: (i) intercelularni put (lijek prolazi kroz međustanične lipidne domene rožnatog sloja), (ii) transcelularni put (lijek prolazi kroz stanice) te (iii) transfolikularni i transglandularni put transporta (lijek prolazi uz folikul dlaka ili uz izvodni kanal žlijezde lojnice ili znojnice). Iako su transcelularni i transfolikularni put mogući mehanizmi prolaska lijeka u/kroz kožu, brojne studije su pokazale da intercelularni put (najduži u usporedbi s ostalim putevima) predstavlja dominantni mehanizam prolaska lijeka u kožu. Pritom lijek difundira i razdjeljuje se između polarnih glava i nepolarnih alkilnih lanaca međustaničnih lipida (Barry, 2007; Escobar-Chávez i sur., 2012).

Zbog svoje specifične građe (model „cigleni zid”) lipofilni rožnati sloj kože ima odlučujuću ulogu u kontroli perkutane apsorpcije molekula djelatne tvari (lijeka) i predstavlja glavnu prepreku prolasku lijeka u dublje slojeve epidermisa i dermisa (Menon i sur., 2012). Procjenjuje se da je rožnati sloj, koji zauzima svega 1-10 % ukupne debljine kože (debljina 10-20  $\mu\text{m}$ ), odgovoran za  $\geq 80$  % ukupne rezistencije kože prema prolasku ksenobiotika (Cevc i sur., 1996). Parametri koji utječu na isporuku lokalno primijenjenih lijekova su veličina molekule, lipofilnost, prisustvo promotora penetracije, vrsta topikalne formulacije i fizičko stanje rožnatog sloja kože (Verma i sur., 2003). Općenito vrijedi da je transport lipofilnih i neioniziranih lijekova kroz kožu bolji u odnosu na hidrofilne i ionizirane molekule te da je sposobnost permeacije kroz kožu obrnuto proporcionalna veličini molekule (tvari molekulske mase veće od 500 Da teško penetriraju u kožu) (Bartosova i Bajgar, 2012). Međutim, postoji veliki broj fizikalnih i kemijskih pristupa koji se koriste za poboljšanje penetracije, permeacije i apsorpcije dermalno ili transdermalno primijenjenih lijekova. U fizikalne metode ubrajamo ionoforezu, sonoforezu, elektroporaciju, magnetoforezu, fotomehaničke valove (laser) i mikroigle (Barry, 2001; Brown i sur., 2006). Najčešće korišteni kemijski pristup u poboljšanju permeacije lijeka kroz slojeve kože jest primjena kemijskih promotora penetracije, koji djeluju tako da reverzibilno mijenjaju strukturnu kompaktnost kože te olakšavaju i pospješuju prolazak lijeka u dublje slojeve kože (Williams, 2012). U sastavu dermalnih/transdermalnih formulacija kao promotori penetracije

koriste se različiti spojevi: alkoholi (etanol, izopropanol, oktanol, dekanol), glikoli (propilenglikol, dietilenglikol, 1,3-butilenglikol, 1,2-butilenglikol), esteri (etil-acetat, oktil-salicilat, etil-oleat, gliceril-monooleat, izopropil-miristat), monoetileteri, sulfoksidi (dimetil-sulfoksid, decilmetil-sulfoksid), površinski aktivne tvari (natrijev lauril-sulfat, polioksietilen lauril-eter, polisorbit), amidi (urea), masne kiseline (oleinska, laurinska, palmitinska, linolna, linolenska, stearinska) i drugi (Lane, 2013; Okyar i sur., 2012; Tran, 2013). Svakako valja napomenuti da voda također djeluje kao promotor penetracije, jer se pokazalo da većina molekula bolje penetrira kroz hidratizirani *stratum corneum*, odnosno kada se formulacija primijeni u okluzivnim uvjetima ili svojim sastavom djeluje okluzivno (Barry, 2007).

Osim navedenih fizikalnih i kemijskih pristupa u optimizaciji dopreme dermalno i transdermalno primijenjenih lijekova, značajan je interes znanstvene i stručne zajednice usmjeren na razvoj nanofarmaceutika poput nanoemulzija, čvrstih lipidnih nanočestica (engl. *solid lipid nanoparticles*), dendrimera, različitih polimernih nanočestica i vezikularnih nanosustava (liposomi, niosomi) (Cereda i sur., 2013; Cevc i Vierl, 2010; Prow i sur., 2011; Subongkot i sur., 2012). Primjena nanonosača omogućava poboljšavanje farmakokinetičkih svojstava uklopljenog lijeka, povećanje njegove bioraspoloživosti i koncentracije na ciljanom mjestu djelovanja, postizanje produljenog i/ili kontroliranog oslobađanja lijeka te poboljšanu penetraciju lijeka u/kroz kožu (Elsayed i sur., 2007a; Escobar-Chávez i sur., 2012; Vanić, 2015). Među istraživanim (trans)dermalnim terapijskim nanosustavima posebno su se istaknuli liposomi (fosfolipidne vezikule). Liposomi su prvi put opisani još 1965., kada je uočeno da u kontaktu lecitina s vodom spontano nastaju vezikule nalik biološkim membranama (Bangham i sur., 1965). Premda su prvotno istraživani kao modelne biološke membrane, liposomi se početkom 70-tih godina prošlog stoljeća počinju istraživati kao nosači lijekova (Gregoriadis i sur., 1971), pri čemu su pokazali izniman terapijski potencijal.

### **1.3. LIPOSOMI U DERMATOLOGIJI**

Liposomi su sferične vezikule, nanometarskih ili mikrometarskih dimenzija (od 20-ak nm do 10-ak ili više  $\mu\text{m}$ , a najčešće u rasponu 100-500 nm), građene od jednog ili više fosfolipidnih dvoslojeva koji obavijaju jedan ili više unutarnjih vodenih odjeljaka. Osnovnu građevnu jedinicu čine fosfolipidi, amfipatske molekule građene od hidrofilnih „glava“ i hidrofobnih „repova“ (lanci masnih kiselina). U ovojnici liposoma fosfolipidi su složeni u

obliku dvosloja, tako da su polarne hidrofilne „glave“ orijentirane prema vanjskoj i unutarnjoj vodenoj fazi, zaklanjajući pritom nepolarne, hidrofobne „repove“ koji se orijentiraju jedan prema drugome. Strukturna svojstva liposoma omogućuju uklapanje djelatnih tvari (lijekova) različitih fizičko-kemijskih svojstava. Hidrofilni lijekovi se uklapaju u vodeni odjeljak, hidrofobni u lipidni dio fosfolipidnog dvosloja, dok se amfipatski lijekovi uklapaju na granici između ta dva odjeljka. Uspješnost uklapanja djelatnih tvari ovisi o njihovim svojstvima te je veća za hidrofobne, a manja za hidrofilne molekule (Fang i sur., 2006; Zucker i sur., 2009).

Ovisno o temperaturi, fosfolipidni dvoslojevi (membrane) postoje u visokoorganiziranoj, čvrstoj gel fazi ili 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 u biološkom okruženju. Međutim, fluidnost fosfolipidnog dvosloja može biti i poželjno svojstvo za postizanje bolje permeabilnosti uklopljenog lijeka (Vanić, 2012, 2015).

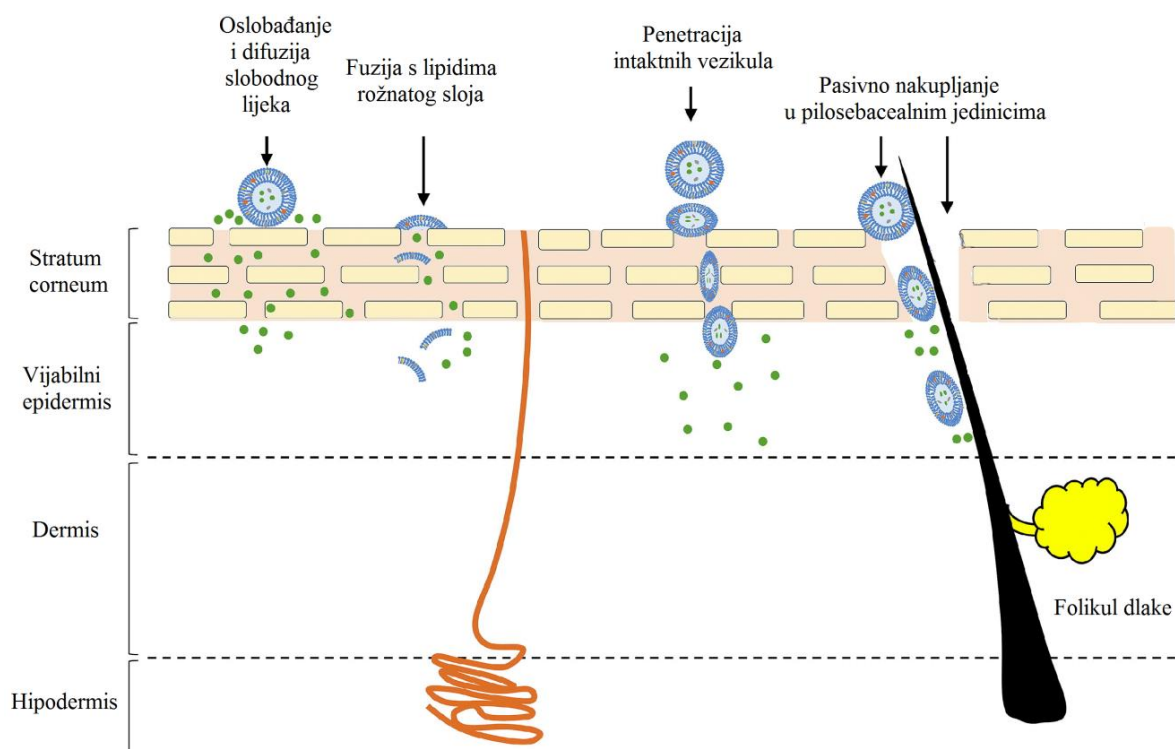
Zbog strukturne sličnosti s biološkim membranama, neimunogenosti i biorazgradljivosti, liposomi su fiziološki prihvatljivi, što im omogućava primjenu u različitim terapijskim područjima: infektivna oboljenja (virusna, bakterijska, gljivična, parazitska), dijagnostika, onkologija, hormonska terapija, stimulacija imunološkog odgovora, vakcinacija itd. (Akbarzadeh i sur., 2013; Vanić, 2012). Danas je na svjetskom tržištu prisutno nekoliko desetaka registriranih liposomskih formulacija, a značajan broj liposomskih lijekova nalazi se i u različitim fazama kliničkih ispitivanja (Bulbake i sur., 2017).

Iako je veći dio registriranih liposomskih pripravaka namijenjen za parenteralnu primjenu, liposomi se uvelike istražuju kao topikalni pripravci za primjenu na sluznice (nazalna, bronhalna, vaginalna, cervikalna, bukalna i okularna sluznica) i na kožu (Kotla i sur., 2017; Vanić i Škalko-Basnet, 2014; Vanić i sur., 2015).

Liposomi mogu doprinijeti stabilnosti uklopljenog lijeka, djelovati kao promotori penetracije hidrofilnih lijekova u kožu, osigurati ciljanu dostavu lijekova u kožne privjeske te osigurati depo (spremište) za kontroliranu dostavu lipofilnih lijekova u kožu (de Leeuw i sur., 2009; Vanić, 2015), što ih čini iznimno vrijednim terapijskim sustavima za (trans)dermalnu dopremu lijekova. Strukturna sličnost liposomskog dvosloja s membranom stanica i strukturama međustaničnog lipidnog matriksa omogućava učinkovitiju penetraciju uklopljenog lijeka kroz epidermalnu barijeru u odnosu na klasične topikalne lijekovite oblike. Liposomske formulacije također smanjuju učestalost i stupanj iritacija kože koje nerijetko bivaju izazvane topikalnom primjenom klasičnih dermalnih lijekovitih oblika (Vanić, 2015).

U literaturi je opisano više mehanizama kojima liposomi pospješuju dopremu lijekova u/kroz kožu (Slika 2):

- i. Lijek se oslobađa iz liposoma te potom difundira u kožu.
- ii. Liposomi se adsorbiraju na stanice rožnatog sloja pri čemu dolazi do fuzije. Molekularna struktura liposoma slična je onoj endogenih lipida kože te je stoga moguća izmjena lipida kože s (fosfo)lipidima liposoma. Pritom fosfolipidi iz liposoma zapravo djeluju kao promotori penetracije, fluidizirajući intercelularne lipidne domene rožnatog sloja (de Leeuw i sur., 2009).
- iii. Penetracija intaktnih liposoma kroz rožnati sloj do živih slojeva epidermisa. Smatra se da je za ovaj mehanizam penetracije liposoma ključna deformabilnost membrane liposoma i transepidermalni osmotski gradijent kože (Cevc i Blume, 1992).
- iv. Liposomi se pasivno nakupljaju unutar pilosebacealnih jedinica. Za ovaj mehanizam dopreme lijekova u kožu upitno je u kojoj mjeri doprinosi ukupnoj dopremi lijeka u kožu; međutim, može biti važan kod kožnih oboljenja čija je etiologija vezana uz folikul dlake i pripadajuće žlijezde (Ciotti i Weiner, 2002; Lauer i sur., 1996).

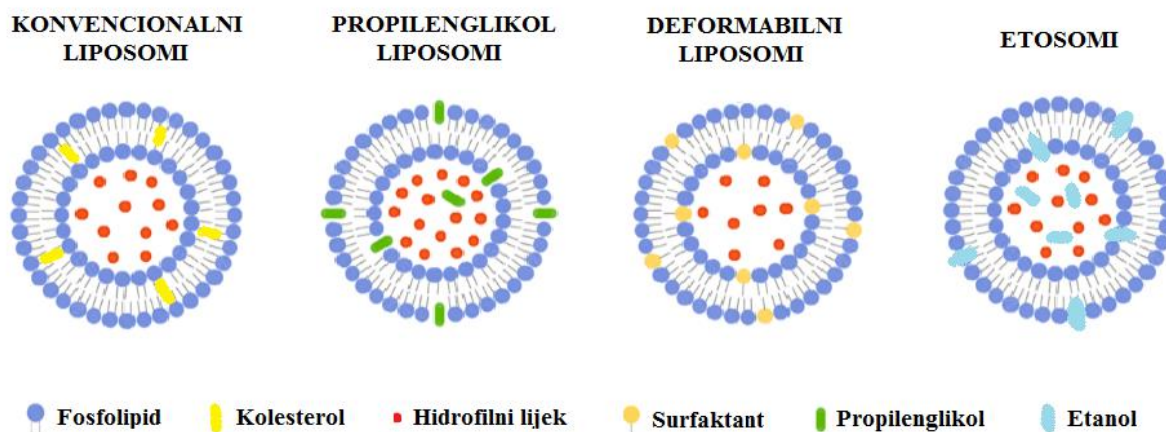


**Slika 2.** Interakcije liposoma i kože. Preuzeto i prilagođeno iz Roberts i sur. (2017) uz dozvolu *Elseviera*-a.

Važni čimbenici koji utječu na odlaganje liposoma u kožu su (fosfo)lipidni sastav i termodinamičko stanje dvosloja, način primjene na kožu (okluzivni ili neokluzivni uvjeti), ukupna količina lipida u liposomskoj formulaciji, veličina, površinski naboj i lamelarnost liposoma (El Maghraby i sur., 2006; Gillet i sur., 2011b; Sinico i sur., 2005; Hua, 2015).

Liposomi se mogu klasificirati s obzirom na (fosfo)lipidni sastav, veličinu (promjer), broj fosfolipidnih dvoslojeva, elastičnost/rigidnost dvoslojeva, površinski naboj ili prisutnost određenih površinskih liganada. Navedena svojstva mogu imati značajan utjecaj na stabilnost liposoma, način oslobađanja uklopljenih djelatnih tvari (lijekova) i interakciju s biološkim sustavima (Vanić, 2015). Prema veličini i broju fosfolipidnih dvoslojeva razlikuju se skupine unilamelarnih, multilamelarnih, oligolamelarnih i multivezikularnih liposoma. Lamelarnost fosfolipidnih vezikula ima izravan utjecaj na sposobnost uklapanja lijeka, sposobnost permeacije, kinetiku oslobađanja lijeka, interakcije sa stanicama i ulazak liposoma u stanicu (Kotla i sur., 2017).

S obzirom na (fosfo)lipidni sastav, tj. prisustvo jednolančanih surfaktanata i/ili pojačivača penetracije (propilenglikol, etanol i sl.) koji utječu na elastičnost fosfolipidnog dvosloja, razlikuju se konvencionalni i elastični liposomi (Slika 3). U potonje se ubrajaju deformabilni liposomi, propilenglikol liposomi, etosomi i invasomi (Elsayed i sur., 2007a; Vanić, 2015).



**Slika 3.** Shematski prikaz najčešće istraživanih tipova liposoma za dermalnu i transdermalnu primjenu. Preuzeto i prilagođeno iz Vanić i sur., (2015), uz dozvolu *Bentham Science Publishers Ltd-a*.

### 1.3.1. Konvencionalni liposomi

Konvencionalni ili klasični liposomi građeni su od jednog fosfolipidnog dvosloja (unilamelarni liposomi) ili više koncentrično položenih dvoslojeva (oligo- ili multi-lamelarni liposomi) koji sadrže neutralne fosfolipide ili kombinacije neutralnih i negativno nabijenih fosfolipida (Slika 3). Unutar dvoslojeva konvencionalnih liposoma često je prisutan kolesterol koji povećava njihovu mikroviskoznost te na taj način povećava rigidnost (čvrstoću) liposomske membrane i stabilnost liposoma, istovremeno smanjujući permeabilnost uklopljenih hidrofилnih tvari (Kotla i sur., 2017). Konvencionalni liposomi predstavljaju prvu generaciju liposoma istraživanih za dermalnu primjenu lijekova (Tablica 1).

Mezei i Gulasekharan su prvi ukazali na mogućnost primjene liposoma u dermatoterapiji. Pokazali su da se topikalnom primjenom konvencionalnih liposoma s triamcinolonacetonom postiže veća koncentracija lijeka u epidermisu kunića, a značajno manja u krvi i urinu, u usporedbi sa standardnim topikalnim pripravkom (Mezei i Gulasekharan, 1980; Mezei i Gulasekharan, 1982). Slični učinci su zabilježeni i s liposomskom formulacijom hidrokortizona (Wohlrab i Lasch, 1987, 1989), a potom su uslijedile brojne *in vivo* studije u kojima je ispitivana učinkovitost liposoma u dermatoterapiji. Potvrđeni su bolji farmakološki učinci, bolja penetracija hidrofилnih lijekova u kožu, veće koncentracije lijeka na mjestu djelovanja, manja učestalost doziranja i manje izražene nuspojave liposomski uklopljenih lijekova: anestetika tetrakaina (Gesztos i Mezei, 1988) i lidokaina (Foldvari i sur., 1990; Sharma i sur., 1994), kortikosteroida (Fresta i Puglisi, 1997), tretinoina (Masini i sur., 1993), ciklosporina (Egbaria i sur., 1990) i antiandrogena (Bernard i sur., 1995) u usporedbi s klasičnim ljekovitim oblicima (otopina, losion, mast, krema, gel). Konvencionalni liposomi su se pokazali i prikladnim nosačima vitamina D3 i ditranola u topikalnoj terapiji psorijaze. Liposomska formulacija vitamina D3, primijenjena u znatno nižim koncentracijama postigla je jednak terapijski učinak kao klasični pripravak vitamina D3 (Körbel i sur., 2001). Uklapanjem ditranola u liposome poboljšana je njegova epidermalna bioraspoloživost, pri čemu je terapijski učinak postignut uz niže primijenjene doze te manju učestalost nuspojava (Agarwal i sur., 2001).

Osim terapijskih prednosti koje pružaju u dopremi uklopljenih lijekova, liposomi i bez uklopljene djelatne tvari pokazuju pozitivne učinke na kožu (hidratacija kože i obnavljanje narušenog integriteta rožnatog sloja), što može biti korisno svojstvo u liječenju *xerosis cutis* ili atopijskog dermatitisa (Betz i sur., 2005; de Leeuw i sur., 2009). Sposobnost hidratacije kože važna je za subjektivni doživljaj pacijenata prilikom nanošenja liposomskih formulacija

na kožu, u smislu stvaranja ugodnog osjećaja na koži, smanjenog zatezanja suhe kože te smanjenog rizika od potencijalnih iritacija kože (de Leeuw i sur., 2009; Vanić, 2015). Primjerice, tretinoin (retinoid koji se topikalno primjenjuje u liječenju akni) pokazuje dobru terapijsku učinkovitost, ali primjena na kožu popraćena je brojnim nuspojavama poput iritacija, eritema, perutanja kože, osjećaja peckanja i povećane fotosjetljivosti na mjestu primjene. U dvostruko-slijepom ispitivanju provedenom na 20 ispitanika učinkovitost i podnošljivost 0,01 %-tnog liposomskog tretinoina uspoređivana je s 0,025 %-tnim ili 0,5 %-tnim gelom tretinoina. Iako je učinkovitost uspoređivanih formulacija bila podjednaka, liposomska formulacija se pokazala superiornom s obzirom na značajno smanjenje iritacija kože (Schäfer-Korting i sur., 1994).

Većina istraživanja usmjerena na dostavu lijekova u kožu posredstvom konvencionalnih liposoma potvrđuje lokalizirane terapijske učinke, pri čemu se liposomi akumuliraju u rožnatom sloju, gornjim slojevima epidermisa i pilosebacealnim jedinicama u koži (Agarwal i sur., 2000; Bernard i sur., 1995; Ciotti i Weiner, 2002; Hoffman, 1998; Li i Hoffman, 1997; Tabbakhian i sur., 2006). Kako bi se omogućila dostava lijekova u dublje slojeve kože, ili čak postigao transdermalni učinak, razvijeni su liposomi elastičnih fosfolipidnih dvoslojeva, poput deformabilnih liposoma, etosoma i propilenglikol liposoma.

### **1.3.2. Deformabilni liposomi**

Deformabilni liposomi poznati su još i kao ultradeformabilni, elastični ili fleksibilni liposomi, odnosno Transfersomi<sup>®</sup> (Cevc i Blume, 1992). To su elastične vezikule čija je membrana građena od fosfolipida i tzv. rubnog aktivatora (jednolančani surfaktant) (Slika 3), koji djeluje tako da narušava integritet dvosloja, smanjujući mu kompaktnost i čvrstoću (rigidnost), čime se povećava njegova elastičnost (deformabilnost).

Deformabilni liposomi pripremaju se istim metodama kao i konvencionalni liposomi, pri čemu se rubni aktivator dodaje u formulaciju zajedno s ostalim sastavnicama fosfolipidnog dvosloja. Najčešće korišteni fosfolipidi uključuju sojin fosfatidilkolin ili fosfatidilkolin iz jaja (Chen i sur., 2013). Osim fosfolipida i surfaktanata, pojedine formulacije deformabilnih liposoma mogu sadržavati i manje količine etanola ( $\leq 10\%$ ) koji se dodaje u vodenu fazu tijekom pripreme liposoma (Benson, 2006; Elsayed i sur., 2006). Optimalnim molarnim omjerom fosfolipida i surfaktanta, postižu se željena elastična svojstva vezikula uz očuvanje integriteta membrane. Ukoliko je količina surfaktanta premala, vezikule nisu dovoljno elastične, dok se kod prevelike količine liposomi transformiraju u micelle. Kao rubni aktivatori



najčešće se primjenjuju: natrijev kolat, natrijev deoksikolat, Span 60<sup>®</sup>, Span 65<sup>®</sup>, Span 80<sup>®</sup>, Tween 20<sup>®</sup>, Tween 60<sup>®</sup>, Tween 80<sup>®</sup> i dikalijev glicirizinat (Benson, 2006). Dodatak rubnog aktivatora kao konstituensa fosfolipidnog dvosloja pokazao je utjecaj na fizička svojstva liposoma (Elsayed i sur., 2007a; El Zaafarany i sur., 2010; Palac i sur., 2014a; Vanić i sur., 2013), pa su se primjerice srednji promjeri deformabilnih liposoma i uspješnost uklapanja lijeka pokazali uglavnom manjima u odnosu na odgovarajuće konvencionalne liposome (Palac i sur., 2014a; Vanić i sur., 2013, 2014a). Povećanjem udjela rubnog aktivatora raste dakako deformabilnost fosfolipidnog dvosloja, ali opada uspješnost uklapanja lijeka (El Zaafarany i sur., 2010) i povećava se propusnost dvoslojeva za uklopljene djelatne tvari, posebice za hidrofilne lijekove (Chen i sur., 2013).

U literaturi su opisana dva mehanizma kojima deformabilni liposomi pospješuju prolazak uklopljenog lijeka u/kroz kožu. Prvi mehanizam podrazumijeva prolazak intaktnih liposoma u dublje slojeve kože ili čak transdermalno u neokluzivnim uvjetima (Slika 2). Naime, u neokluzivnim uvjetima voda iz primijenjene disperzije deformabilnih liposoma isparava na površini kože, a vezikule postaju djelomično dehidrirane. Kako bi ostale hidratizirane, vezikule počinju slijediti transepidermalni hidratacijski gradijent kroz kožu, a elastičnost membrane im olakšava prolaz između stanica rožnatog sloja. Neki autori navode da deformabilni liposomi mogu proći kroz pore koje su manje od 1/5 ili 1/10 njihovog promjera te na taj način mogu dopremiti lijek u dublje slojeve epidermisa (Cevc i sur., 1998, 2002; Cevc i Blume, 2001; Song i Kim, 2006). Drugi mehanizam je poticanje prolaska lijeka kroz kožu na način da (fosfo)lipidi i surfaktanti iz ovojnice liposoma modificiraju i fluidiziraju intercelularne lipide rožnatog sloja, čime se olakšava prolaz oslobođenog lijeka u/kroz rožnati sloj (Banović i sur., 2011; Elsayed i sur., 2007a; van den Bergh i sur., 1999).

Deformabilni liposomi su dosad istraživani za (trans)dermalnu dopremu različitih djelatnih tvari, uključujući: peptide (Cevc i sur., 1995), proteine (Cevc, 2003; Chopra i Cevc, 1995; Paul i sur., 1995, 1998), kozmeceutike (Saraf i sur., 2011), analgetike (Cevc i Blume, 2001; Duangjit i sur., 2011), anestetike (Planas i sur., 1992), kortikosteroide (Cevc i sur., 1997; Gillet i sur., 2011b), spolne hormone (El Maghraby i sur., 1999, 2001b; Garg i sur., 2006), antimikrobne lijekove (Ghannoum i sur., 2011; Maurya i sur., 2010; Singodia i sur., 2010; Zhao i sur., 2007), antineoplastike (Hiruta i sur., 2006) i druge. Ispitivanja su potvrdila da deformabilni liposomi pospješuju penetraciju i permeaciju uklopljenih tvari kroz kožu u odnosu na konvencionalne liposome i/ili konvencionalne topikalne pripravke. Međutim, usprkos brojnim istraživanjima, još uvijek se u znanstvenim krugovima vodi rasprava mogu li deformabilni liposomi kao nosači lijekova uistinu intaktni

penetrirati kroz kožu ili djeluju isključivo kao promotori penetracije (Benson, 2006). Dio dosad provedenih istraživanja potvrđuje sposobnost prolaska deformabilnih liposoma s uklopljenim lijekom u dublje slojeve kože uz postizanje transdermalnog učinka lijeka, pri čemu se učinak u pojedinim slučajevima mogao usporediti sa supkutanom primjenom (Cevc i sur., 1998; Cevc i Blume, 2001; Cevc, 2003; Garg i sur., 2006; Guo i sur., 2000b). S druge strane, određene su studije pokazale da deformabilni liposomi povećavaju odlaganje uklopljenog lijeka u kožu, ali bez da nefragmentirani (intaktni) liposomi prolaze u dublje slojeve epidermisa. Primjerice, Honeywell-Nguyen i suradnici (2002) su uspoređivali interakciju konvencionalnih liposoma (s čvrstim dvoslojevima) i elastičnih liposoma s humanom kožom *in vitro* i *in vivo*, te su uočili prolazak intaktnih elastičnih vezikula u dublje slojeve rožnatog sloja. Međutim, usprkos evidentno boljoj penetrabilnosti elastičnih liposoma u odnosu na one čvrstih (rigidnih) dvoslojeva, autori navode da je prolazak intaktnih vezikula kroz *stratum corneum* dublje u epidermis malo vjerojatan proces.

El Maghraby i suradnici (1999) su pokazali bolju penetraciju ultradeformabilnih vezikula s uklopljenim estradiolom u odnosu na konvencionalne liposome. Također su potvrdili da je transdermalni hidratacijski gradijent glavna pokretačka sila za transport deformabilnih vezikula, budući da je fluks estradiola kroz kožu bio značajno smanjen u okluzivnim uvjetima primjene (El Maghraby i sur., 2001b). Poboljšana dermalna dostava dikalijevog glicirizinata utvrđena je za deformabilne liposome u kojima je dikalijev glicirizinat predstavljao ujedno djelatnu tvar i rubni aktivator (Trotta i sur.; 2002). Štoviše, kada je u vezikule takvog membranskog sastava uklopljen metotreksat, zabilježen je 3-4 puta veći penetracijski potencijal deformabilnih liposoma u odnosu na konvencionalne liposome i vodenu otopinu lijeka. Pritom je u koži utvrđeno 50 % primijenjene doze metotreksata, što ukazuje na mogućnost korištenja deformabilnih liposoma u topikalnoj terapiji psorijaze (Trotta i sur., 2004).

Cevc i Blume (2003) su proveli *in vivo* ispitivanje Transfersoma<sup>®</sup> s triamcinolonacetonom na animalnom modelu (miševi), pokazavši da se sa značajno manjom primijenjenom dozom lijeka u odnosu na konvencionalne pripravke (krema, mast) postiže učinkovita doprema triamcinolonacetomida u kožu te produljeni protuupalni učinak. Gillet i suradnici (2011b) su uspoređivali konvencionalne i deformabilne liposome s uklopljenim betametazonom, ispitujući utjecaj kompozicije fosfolipidnog dvosloja na penetracijska svojstva liposoma. Primjenom konfokalne mikroskopije pokazali su da deformabilni liposomi ne ostaju intaktni prilikom penetracije u dublje slojeve kože, već ostaju u gornjim slojevima kože služeći kao depo iz kojeg se lijek oslobađa i difundira u dublje,

vijabilne slojeve epidermisa. Ispitivanjima deformabilnih liposoma s 5-fluorouracilom također se pokazalo da elastične vezikule ne penetriraju kroz kožu intaktne, već da fosfolipidi i rubni aktivatori djeluju kao dobri promotori penetracije, omogućujući bolju dostavu lijeka u kožu u odnosu na konvencionalne liposome (El Maghraby i sur., 2001a, 2006).

Na temelju provedenih istraživanja proizlazi da oba mehanizma kojima deformabilni liposomi pospješuju prolazak uklopljenog lijeka u/kroz kožu u neokluzivnim uvjetima (penetracija intaktnih vezikula i poboljšavanje penetracije uklopljenog lijeka), imaju važnu ulogu u poboljšanoj dostavi lijekova u kožu u odnosu na konvencionalne liposome. Koji će od ta dva mehanizma dominirati ovisi prvenstveno o fizičko-kemijskim svojstvima samog lijeka (Elsayed i sur., 2007a). Tako će za hidrofilne lijekove prevladavati mehanizam poticanja penetracije lijeka u kožu, a za lipofilne prolazak intaktnih vezikula (Banović i sur., 2011).

### **1.3.3. Propilenglikol liposomi**

Propilenglikol liposomi noviji su tip elastičnih fosfolipidnih vezikula za učinkovitu dostavu lijekova u kožu (Elsayed i sur., 2007b). Građeni su od fosfolipida, propilenglikola i vode (Slika 3). Propilenglikol u formulaciji može poslužiti kao (su)otapalo za fosfolipide i lipofilni lijek ili se dodaje kao dio vodene faze tijekom pripreme liposoma. Propilenglikol liposome karakterizira veća uspješnost uklapanja djelatnih tvari u odnosu na konvencionalne i deformabilne liposome sličnog fosfolipidnog sastava (Palac i sur., 2014a; Vanić i sur., 2014a).

*In vivo* istraživanja na životinjskim modelima pokazala su značajno bolji učinak propilenglikol liposoma u dermalnoj dostavi lokalnog anestetika cinhokaina u usporedbi s konvencionalnim, ali i deformabilnim liposomima i etosomima (Elsayed i sur., 2007b). Manconi i suradnici (2009) su ispitali utjecaj koncentracije propilenglikola (10, 20, 30, 40 ili 50 %) na fizičko-kemijska svojstva propilenglikol liposoma. Pokazali su da se s povećanjem koncentracije propilenglikola blago smanjuje promjer vezikula, pri čemu je učinak bio izraženiji za liposome s uklopljenim diklofenakom nego za prazne liposome. Zeta potencijal se nije značajno mijenjao, ali je uspješnost uklapanja hidrofilnog lijeka rasla s povećanjem udjela propilenglikola. Zanimljivo je istaknuti da je njihovo istraživanje pokazalo i veću fizičku stabilnost propilenglikol liposoma u odnosu na konvencionalne liposome tijekom 4 tjedna pohrane formulacija pri 4 °C. U drugoj studiji iste grupe autora, u kojoj je ispitivana *ex vivo* permeabilnost liposomski uklopljenog diklofenaka na svinjskom modelu

kože, pokazana je značajno bolja permeabilnost diklofenaka iz liposoma koji u svom sastavu imaju glikolne molekule (Transcutol®) u odnosu na konvencionalne liposome i komercijalni topikalni pripravak diklofenaka (Diclofenac Sandoz® gel 1%) (Manconi i sur., 2011).

Superiornost propilenglikol liposoma u odnosu na konvencionalne liposome koja je zabilježena u svim gore navedenim studijama, može se objasniti prisutnošću propilenglikola u formulaciji. Naime, propilenglikol je prisutan i u unutarnjoj i u vanjskoj vodenoj fazi liposoma. Prisutnost propilenglikola u unutarnjoj vodenoj fazi ima učinak na povećanje topljivosti lijeka čime doprinosi boljoj uspješnosti uklapanja u odnosu na konvencionalne liposome istog fosfolipidnog sastava. Propilenglikol prisutan u vanjskoj vodenoj fazi liposomske disperzije djeluje kao promotor penetracije čime se osigurava poboljšana dostava uklopljenog lijeka u kožu (Vanić, 2015). Također, propilenglikol se ugrađuje u fosfolipidni dvosloj čineći ga značajno fleksibilnijim (Zhao i sur., 2013), a kombinacija povećane fleksibilnosti lipidnog dvosloja i djelovanja propilenglikola kao promotora apsorpcije vjerojatno su ključni čimbenici u postizanju učinkovitije dopreme lijekova u kožu posredstvom propilenglikol liposoma, iako točan mehanizam transporta u kožu još uvijek nije sasvim razjašnjen.

#### **1.3.4. Etosomi**

Etosomi (Slika 3) su vrsta fosfolipidnih vezikula, sastavljena od fosfolipida, vode i etanola. Pripremaju se otapanjem smjese lipida i lijeka u etanolu, a potom se ovoj otopini postepeno dodaje vodena faza uz neprekidno miješanje. Udio etanola u etosomima iznosi 20-45 %, zahvaljujući čemu etosomi omogućuju dobro uklapanje slabo topljivih djelatnih tvari (Godin i Touitou, 2003). Prisustvo etanola utječe i na veličinu liposoma, pri čemu su se etosomi pokazali značajno manjima u odnosu na konvencionalne liposome istog fosfolipidnog sastava (Touitou, 1996). Etanol djeluje i na smanjenje  $T_c$  (fosfo)lipida, zbog čega (fosfo)lipidni dvosloj pokazuje veću fluidnost i elastičnost u odnosu na konvencionalne liposome (Nainwal i sur., 2018). Osim toga, etanol je odličan promotor apsorpcije, a za razliku od deformabilnih liposoma, isporuka etosomski uklopljenih lijekova u/kroz kožu pokazala se učinkovitom i u okluzivnim i u neokluzivnim uvjetima (Ainbinder i Touitou, 2005; Lopez-Pinto i sur., 2005).

Brojna *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* ispitivanja (Tablica 1) pokazala su da se uklapanjem djelatnih tvari u različite tipove liposoma značajno poboljšava (trans)dermalna isporuka lijekova.

**Tablica 1.** Odabrana istraživanja liposoma za dermalnu dostavu lijekova (prilagođeno iz Vanić, 2015)

Tip liposoma	Primjena	Djelatna tvar	Vrsta istraživanja	Literatura
Konvencionalni liposomi	Lokalna anestezija	Lidokain	<i>In vivo</i> (zamorci) Klinička studija	Foldvari i sur., 1990
	Akne	Tretinoin	Klinička studija	Schäfer-Korting, 1994
		Benzoilperoksid	Klinička studija	Fluhr i sur., 1999
	Fotodinamska terapija (vitiligo)	Kelin	Klinička studija	De Leeuw i sur., 2003
	Fotodinamska terapija (pomlađivanje kože)	5-aminolevulinska kiselina	Klinička studija	Christiansen i sur., 2007
	Psorijaza	Vitamin D3	<i>In vivo</i> (miševi)	Körbel i sur., 2001
		Ditranol	<i>Ex vivo</i> (koža miševa)	Agarwal i sur., 2001
	Upalne bolesti kože	Hidrokortizon	<i>Ex vivo</i> (humana koža) <i>In vivo</i> (zamorci)	Wohlrab i Lasch, 1987, 1989
		Triamcinolonacetonid	<i>In vivo</i> (kunići)	Mezei i Gulasekharam, 1980

Deformabilni liposomi	Lokalna anestezija	Lidokain Tetrakain	<i>In vivo</i> (štakori) Klinička studija	Planas i sur., 1992
	Psorijaza	Metotreksat	<i>Ex vivo</i> (svinjska koža)	Trotta i sur., 2004
		Ciklosporin A	<i>Ex vivo</i> (koža miševa)	Guo i sur., 2000a
	Rak kože	Celekoksib	<i>In vitro</i> <i>Ex vivo</i> (humana koža)	Bragagni i sur., 2012
		Bleomicin	<i>In vivo</i> (štakori)	Hiruta i sur., 2006
	Upalne bolesti kože	Triamcinolonacetonid	<i>In vivo</i> (miševi)	Cevc i Blume, 2003 Cevc i sur., 1997
		Deksametazon Hidrokortizon	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i> (štakori)	Cevc i Blume, 2004
		Deksametazon	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i> (štakori)	Jain i sur., 2003
		Betametazon	<i>Ex vivo</i> (svinjska koža)	Gillet i sur., 2011b
		Dikalijev glicirizinat	<i>In vitro</i> <i>Ex vivo</i> (svinjska koža)	Trotta i sur., 2002
Propilenglikol liposomi	Lokalna anestezija	Cinhokain	<i>In vivo</i> (zečevi)	Elsayed i sur., 2007b

Etosomi	Akne	Azelatna kiselina	<i>In vitro</i>	Esposito i sur., 2004
	Alopecija	Ciklosporin A	<i>In vitro</i>	Verma i sur., 2004
	Fotodinamska terapija (vitiligo, psorijaza)	Psoralen	<i>Ex vivo</i> (koža štakora) <i>In vivo</i> (štakori)	Zhang i sur., 2014
	Psorijaza	Metotreksat	<i>Ex vivo</i> (humana koža)	Dubey i sur., 2007



## 1.4. INFEKCIJE KOŽE I MEKIH TKIVA

### 1.4.1. Bakterijske infekcije kože i mekih tkiva

Infekcije kože i pridruženih mekih tkiva (engl. *skin and soft-tissue infections*, SSTI) obuhvaćaju široki spektar stanja koji se često susreću u kliničkoj praksi. S obzirom na površinu i dubinu kože zahvaćene infekcijom te klinički tijek i prognoze, infekcije kože mogu se podijeliti na komplicirane i nekomplicirane, varirajući od jednostavnih supkutanih apscesa do teških nekoritizirajućih infekcija (Barie i Wilson, 2015). Nekomplicirane infekcije su površinske, ne zahvaćaju dublje strukture kože i mogu se uspješno tretirati incizijom, drenažom i/ili lokalnom/sistemskom antibiotskom terapijom. Komplicirane infekcije zahvaćaju hipodermis, fascije i mišiće u dubokim slojevima ispod kože, a zbog potencijalnih amputacija i životne opasnosti za pacijenta uslijed bakterijemija, zahtijevaju hitan tretman u vidu mehaničkog čišćenja, složenijih kirurških intervencija i pažljivog odabira prikladne antimikrobne terapije (May, 2011; Rajan, 2012).

Uzevši u obzir različite kliničke manifestacije infekcija kože te učestalost rekurentnih epizoda bolesti, točnu prevalenciju SSTI teško je precizno utvrditi. Na temelju trogodišnje retrospektivne studije provedene u SAD-u procjenjuje se da broj klinički dijagnosticiranih SSTI iznosi otprilike 500 slučajeva na 10 000 osoba godišnje (Miller i sur., 2015; Ray, 2013). Učestalost hospitalizacija povezanih sa SSTI je između 2000. i 2004. godine rasla za 29 % na godišnjoj razini (Edelsberg i sur., 2009), dok je broj hospitalizacija zbog infekcija kože povezanih sa *Staphylococcus aureus* narastao za čak 123 % u razdoblju između 2001. i 2009. godine (Suaya i sur., 2014). Posebnu kategoriju SSTI predstavljaju postoperativne infekcije kože i mekih tkiva (unutar 30 dana nakon zahvata, odnosno unutar godinu dana ako je riječ o ugradnji implantata), za koje se smatra da predstavljaju najčešći oblik bolnički stečenih infekcija (oko 31 %), koji zahvaća više od 500 000 pacijenata godišnje, pritom uzrokujući 8000-10 000 smrtnih ishoda godišnje (Magill i sur., 2012; Najjar-Pellet i Smink, 2015).

Bakterijska etiologija SSTI potvrđena je u otprilike 60 % slučajeva, a većina je uzrokovana Gram-pozitivnim patogenima, i to najčešće vrstama *S. aureus* i *Streptococcus pyogenes* (Edelsberg i sur., 2009; Garau i sur., 2013). Gram-negativne bakterije i anaerobi su uglavnom kopatogeni kod kompliciranih infekcija, za koje je karakteristična mješovita patogena flora (Cardona i Wilson, 2015; Hawn i sur., 2011). Bakterijski uzročnici izolirani iz inficiranih područja kože ovisit će prvenstveno o etiologiji rane, ali i lociranosti infekcije na pojedinim dijelovima tijela (Pulido-Cejudo i sur., 2017).

### 1.4.2. Biofilmovi

Kada su posrijedi SSTI, poseban problem predstavljaju biofilmovi. Naime, vrlo čest uzrok rekurentnih kožnih infekcija i kroničnih dubokih rana su bakterijski biofilmovi (Fux i sur., 2003; Metcalf i Bowler, 2013). Prisutnost biofilmova dokazana je u čak 60 % kroničnih, sporo-zarastajućih rana s kojima se susreće 1-2 % populacije razvijenih zemalja (Phillips i sur., 2010). Biofilmovi su kompleksne imobilizirane nakupine bakterija uklopljene u ekstracelularni polimerni matriks, građen od egzopolisaharida, proteina, bakterijske DNA i vode. Točna struktura i sastav biofilmova ovisi o mnogo čimbenika, uključujući karakteristike podloge na koju je biofilm adheriran, dostupnost nutrijenata i mikroorganizme koji ga sačinjavaju (Flemming i Wingender, 2010). Rast i sazrijevanje biofilma, kao i održavanje takve visokoorganizirane zajednice, regulirani su intercelularnom komunikacijom putem molekulskih kemijskih signala, poznatoj kao *quorum sensing* (Annous i sur., 2009; Solano i sur., 2014). Zbog specifične strukture i kemijskog sastava ekstracelularnog polimernog matriksa većina antimikrobnih lijekova teško penetrira u biofilm, što rezultira neučinkovitom terapijom i povećanom rezistentnošću bakterija u biofilmu. *In vitro* testovi osjetljivosti biofilmova na antibiotike pokazuju do čak 1 000 puta veće minimalne inhibitorne koncentracije (MIK-ove) u odnosu na planktonske bakterije (Kasimanickam i sur., 2012). Značajan problem predstavlja manje od 1 % bakterija u biofilmu (tzv. perzistori) koje odolijevaju kontinuiranoj izloženosti antibioticima jer se nalaze u obliku nalik sporama, što za posljedicu ima smanjenu učinkovitost antibiotika u antibiofilm terapiji, pojavu recidiva i razvoj rezistencije na antibiotike (Wood, 2017).

Zbog visoke rezistencije na antibiotike i perzistora unutar biofilma, koji predstavljaju kontinuirani izvor reinfekcije, biofilmovi usporavaju ili onemogućavaju cijeljenje rane uvjetujući njezin kronični karakter (Metcalf i Bowler, 2013). Nažalost, učestalost kroničnih rana na svjetskoj razini je u neprestanom porastu zbog progresije metaboličkih bolesti poput dijabetesa, pretilosti i kardiovaskularnih oboljenja, kao i sve većeg broja starijih bolesnika. Za očekivati je da će sve navedeno u budućnosti doprinijeti značajnijem opterećenju zdravstvenog sustava te je stoga istraživanje učinkovite antimikrobne terapije kroničnih infekcija kože i suzbijanja stvaranja biofilmova od izuzetnog medicinskog značaja.

### 1.4.3. *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* (zlatni stafilokok), rod *Staphylococcus*, red *Firmicutes*, je Gram-pozitivna bakterija s više od 200 poznatih sojeva. Jedna od karakteristika *S. aureus* je sposobnost asimptomatske kolonizacije čovjeka, kao dio normalne komenzalne mikrobiote (nazalna sluznica, gornji respiratorni trakt, vaginalna sluznica, koža). Osim što su asimptomatski nositelji pod većim rizikom od infekcija povezanih s ovom vrstom, ujedno su i glavni izvor širenja *S. aureus* u općoj populaciji. Osnovni način prijenosa bakterije je direktni kontakt, najčešće dodirrom, ali moguć je i prijenos kapljičnim putem ili prijenos s kontaminiranih predmeta i površina (Miller i Diep, 2008; Todd, 2005). Smatra se da otprilike 15-40 % populacije spada u asimptomatske nositelje, a u određenim patološkim stanjima može doći do patogene kolonizacije nositelja ovom vrstom (van Belkum i sur., 2009). Veću predispoziciju za stečene infekcije stafilokokom uvjetuju činitelji vezani uz samog domaćina: narušen integritet kože (uslijed mehaničkih i kemijskih ozljeda ili težih oblika atopijskog dermatitisa), dijabetes, imunodeficijencije, poremećaji funkcije neutrofila, malnutricije, deficijencija željeza i dr. (Chambers i DeLeo, 2009; Findley i Grice, 2014).

Vrsta *S. aureus* može uzrokovati niz različitih infekcija, a dominantni oblik su infekcije kože i mekih tkiva, poput prišteva, čireva, folikulitisa, impetiga, celulitisa, sindroma ljuštenja kože (engl. *Staphylococcal scalded skin syndrome*) i raznih apscesa. Spada u 5 najčešćih bolnički-stečenih infektanata te je česti uzročnik izoliran kod inficiranih rana, opekline i postoperativnih rana. Može uzrokovati i upalu pluća, upalu srednjeg uha ili zvukovoda, sinusitis, meningitis, osteomijelitis, artritis, endokarditis te sindrom toksičnog šoka, bakterijemiju i sepsu, koji su veoma ozbiljna i po život opasna stanja. Također je poznato da na implantatima koji se ugrađuju u tijelo *S. aureus* može formirati biofilmove (sam ili u kombinaciji s drugim patogenima), odakle može penetrirati u okolna tkiva (Lowy, 1998; Zago i sur., 2015).

*S. aureus* je izrazito prilagodljiv patogen s dokazanom sposobnošću da brzo i lako razvija otpornost na antibiotike i antiseptike. Iz tog razloga sve veći javno-zdravstveni problem u cijelome svijetu postaju stafilokokne infekcije otporne na antibiotike, i to prvenstveno meticilin-rezistentni *S. aureus*, tzv. MRSA (Grundmann i sur., 2006; Hassoun i sur., 2017; Hope i sur., 2008). Rezistencija MRSA sojeva na meticilin vezana je uz prisustvo posebnog penicilin-vezujućeg proteina u membrani (PBP2a), a uočena je još 1961. godine. Od 1985. prevalencija MRSA-e postaje značajna, rastući kontinuirano do danas (Barada i sur., 2007; Rodvold i sur., 2014). Procjenjuje se da je 40-50 % izoliranih sojeva

vrste *S. aureus* otporno na meticilin (Forestier i sur., 2007; Ray i sur., 2013), a uz infekcije MRSA-om povezana je značajno veća stopa morbiditeta i mortaliteta nego uz osjetljive sojeve *S. aureus* (Durai i sur., 2010; Rodvold i sur., 2014; van Hal i sur., 2012). U državama EU-a približno 150 000 pacijenata godišnje se zarazi MRSA-om, što rezultira bolničkim troškovima u iznosu od 380 milijuna eura (Köck i sur., 2010). Zbog svega navedenog prevencija i uspješno liječenje MRSA-infekcija identificirani su kao jedan od javno-zdravstvenih prioriteta u EU-u i svijetu.

## **1.5. LOKALNA ANTIMIKROBNA TERAPIJA INFEKCIJA KOŽE**

Konvencionalna terapija nekompliciranih i akutnih bakterijskih infekcija kože oslanja se na lokalnu i/ili sistemsku primjenu antimikrobnih lijekova. Terapija kompliciranih i kroničnih bakterijskih infekcija kože (duboke rane povezane s razvojem biofilma, ulceracije, dijabetičko stopalo i sl.) obuhvaća postupke mehaničke obrade rane u kombinaciji s funkcionalnim oblogama za rane te lokalnom i/ili sistemskom antimikrobnom terapijom (Boateng i sur., 2008). Učinkovitost antimikrobne terapije u velikoj će mjeri ovisiti o težini kliničke slike, rezistentnosti uzročnika, brzini intervencije i općem stanju pacijenta. Eradikacija uzročnika zahtijeva efikasnu antibiotsku terapiju usmjerenu prvenstveno protiv najvjerojatnijeg uzročnika, pa tako sistemski terapija različitim  $\beta$ -laktamima, makrolidima i linkozamidima (klindamicin) predstavlja temelj liječenja SSTI. Brojna istraživanja pokazuju da sistemski primijenjeni antibiotici u vrlo visokim dozama relativno uspješno eliminiraju većinu bakterija, ali uzrokuju i niz neželjenih nuspojava te slabe imunološki sustav bolesnika, uz povećanu mogućnost razvoja rezistencije (Dai i sur., 2010). Stoga lokalna primjena antibiotika u liječenju infekcija ima prednosti u odnosu na sistemsku, posebice uzevši u obzir učestalost doziranja, ukupnu količinu lijeka koju je potrebno primijeniti, ali i potencijalne nuspojave i toksične učinke koje je ovim putem primjene moguće izbjeći ili barem svesti na minimum. Također, ovaj je oblik terapije jednostavniji i prihvatljiviji za pacijenta (Lipsky i Hoey, 2009). Usprkos tome, relativno mali broj antibiotika primjenjuje se kao lokalna topikalna antimikrobna terapija (npr. mupirocin, mafenidacetat, bacitracin, neomicinsulfat, polimiksin B) te su topikalni antimikrobni pripravci puno slabije zastupljeni u terapiji kožnih infekcija u odnosu na sistemsku terapiju (Dai i sur., 2010).

### 1.5.1. Liposomi kao nosači antimikrobnih lijekova za topikalnu primjenu na kožu

Liječenje SSTI može biti veoma teško i dugotrajno. Razlog tome je rezistencija mikroorganizama koji se najčešće povezuju uz kožne infekcije (npr. *S. pyogenes* na makrolide; *S. aureus* na meticilin, vankomicin, penicilin i mupirocin), a koja rezultira većom stopom hospitalizacija, dugotrajnim liječenjem i povećanim bolničkim troškovima. Noviji antimikrobni lijekovi (npr. linezolid, kvinupristin/dalfopristin, gatifloksacin, gemifloksacin i moksifloksacin) nisu pokazali značajan napredak u odnosu na dosadašnju antimikrobnu terapiju (Guay, 2005), a istraživanje novih antibiotika sve je manje atraktivno farmaceutskim kompanijama (Yang i sur., 2018). Iz navedenih razloga konvencionalna antimikrobna terapija postaje sve manje uspješna u borbi protiv infektivnih bolesti. Stoga je veliki dio istraživanja usmjeren na uklapanje postojećih antibiotika u terapijske (nano)sustave, kako bi im se poboljšala farmakokinetička svojstva i mikrobiološka aktivnost te na taj način smanjila potrebna doza, učestalost doziranja i nuspojave (Abed i Couvreur, 2014; Alhariri i sur., 2013; Basnet i Škalko-Basnet, 2013; Forier i sur., 2014; Martin i sur., 2015; Nafee, 2015). Među brojnim nanosustavima, kao nosači antibiotika najviše su istraživani liposomi (Hsu i sur., 2017). Naime, dobra fizičko-kemijska svojstva liposoma, mali promjer vezikula, velika površina u odnosu na masu, biorazgradljivost, biokompatibilnost, sposobnost solubilizacije slabo topljivih lijekova, dobar kontakt s mikroorganizmima i stanicama domaćina te funkcionalna raznolikost, čine ih prikladnim terapijskim sustavima za dostavu antimikrobnih lijekova, povećanje njihove bioraspoloživosti, biokompatibilnosti i terapijske učinkovitosti te smanjenje lokalnih/sistemskih nuspojava (Drulis-Kawa i Dorotkiewicz-Jach, 2010). Zanimljivo je istaknuti da je prvi liposomski pripravak koji se pojavio na tržištu još 1988. (Pevaryl® Lipogel) sadržavao uklopljeni ekonazol i bio namijenjen upravo za topikalnu antimikrobnu terapiju dermatomikoza (Naeff, 1996).

Dosad su provedena brojna *in vitro*, *in vivo* i klinička istraživanja topikalne primjene liposoma za učinkovitu dermalnu dostavu antimikrobnih tvari. Pokazano je da liposomi poboljšavaju isporuku antimikrobnih lijekova u kožu djelujući kao depoi koji omogućuju kontrolirano i/ili produljeno oslobađanje lijeka, čime se smanjuje učestalost doziranja. Prednosti i potencijali topikalnih formulacija liposoma za dermalnu primjenu detaljno su prikazani preglednim radovima (Abed i Couvreur, 2014; de Leeuw i sur., 2009; Sinico i Fadda, 2009; Vanić i sur., 2015; Vanić i Škalko-Basnet, 2017).

Rezultati odabranih *in vitro*, te *in vivo* i kliničkih istraživanja različitih tipova liposoma s antimikrobnim lijekovima za dermalnu primjenu sažeti su Tablicom 2.

**Tablica 2.** Pregled istraživanja liposoma s uklopljenim antimikrobnim lijekovima za dermalnu primjenu

Antimikrobni lijek	Vrsta liposoma	Vrsta istraživanja	Rezultati	Literatura
Klindamicin-hidroklorid	Konvencionalni liposomi	Klinička studija	Značajno manji broj pustula u odnosu na klasičnu formulaciju (losion).	Škalko i sur., 1992
		<i>Ex vivo</i> (svinjska koža) <i>In vivo</i> (miševi) Klinička studija	4 puta veća učinkovitost u smanjivanju otvorenih komedona u usporedbi s otopinom lijeka.	Honzak i Šentjunc, 2000
Eritromicin	Etosomi	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i> (miševi)	Biokompatibilnost s fibroblastima kože; 2-2,5 puta niže vrijednosti MIK-a ( <i>S. aureus</i> ) u odnosu na otopinu lijeka; inokulacija sa <i>S. aureus</i> rezultirala potpunom inhibicijom razvoja infekcije <i>in vivo</i> .	Godin i Touitou, 2005
		<i>In vivo</i> (miševi)	Poboljšano cijeljenje dubokih kožnih infekcija uzrokovanih <i>S. aureus</i> -om; inhibicija bakterijskog rasta.	Godin i sur., 2005
Bacitracin	Etosomi Konvencionalni liposomi	<i>In vitro</i> <i>Ex vivo</i> (humana koža i koža štakora) <i>In vivo</i> (štakori)	Penetracija antibiotika i lipida u fibroblaste <i>in vitro</i> , oslobađanje bacitracina unutar stanica; doprema antibiotika u duboke slojeve kože kroz međustanične lipidne domene u rožnatom sloju. Okluzija nije imala utjecaj na permeacijski profil.	Godin i Touitou, 2004
Neomicinsulfat	Deformabilni liposomi	<i>In vivo</i> (štakori)	Potpuna eradikacija infekcije uzrokovane <i>S. aureus</i> -om nakon 7 dana.	Darwhekar i sur., 2012
Daptomicin	Deformabilni liposomi	<i>In vivo</i> (miševi)	Učinkovita terapijska koncentracija održana nekoliko sati; značajna inhibicija bakterijskog rasta i stvaranja biofilmova u ranama.	Li i sur., 2013
Amfotericin B	Etosomi	<i>In vivo</i> (štakori)	Poboljšana antifungalna aktivnost ( <i>Candida albicans</i> ); dobra podnošljivost (nisu uočene iritacije).	Kaur i sur., 2015

Mikonazolnitrat	Propilenglikol liposomi	<i>In vitro</i>	Superiornost propilenglikol liposoma u odnosu na otopinu lijeka i konvencionalne liposome s obzirom na uklapanje i oslobađanje mikonazola, stabilnost tijekom skladištenja, antifungalnu aktivnost i zadržavanje u koži.	Elmoslemany i sur., 2012
	Konvencionalni liposomi	<i>In vitro</i> <i>Ex vivo</i> (koža miševa)	Značajno bolje zadržavanje liposomskog mikonazola u koži u odnosu na mikonazol u komercijalnim pripravcima (kreme).	Agarwal i Prakash, 2002
Ekonazol	Konvencionalni liposomi	Klinička studija (Pevaryl <sup>®</sup> Lipogel)	Brzi početak djelovanja zbog veće koncentracije lijeka u rožnatom sloju; manje učestalo doziranje liposomskog gela u odnosu na kremu.	Naeff, 1996
Povidon-jod	Konvencionalni liposomi	Klinička studija	Povećana epitelizacija i efikasnije cijeljenje rane u odnosu na klorheksidinsku gazu.	Vogt i sur., 2001
		Klinička studija	Brže i potpunije cijeljenje opekline u usporedbi sa srebro-sulfadiazinskom kremom; dobar terapijski učinak i lokalna podnošljivost liposomskog pripravka.	Homann i sur., 2007
		Klinička studija (faza III) Repithel <sup>®</sup> gel	Poboljšana epitelizacija, smanjeno odbacivanje transplantata, značajno poboljšano cijeljenje (posebice kod pušača).	Vogt i sur., 2006
Aciklovir	Etosomi	Klinička studija	Učinkovito liječenje infekcija uzrokovanih <i>Herpes simplex</i> virusom (HSV).	Horwitz i sur., 1999
		Klinička studija (Supra-Vir <sup>®</sup> )	Učinkovito liječenje HSV infekcija; povećana penetracija lijeka u kožu; stabilnost formulacije (3 godine).	Sudkhar i sur., 2013
Terbinafin	Deformabilni liposomi Etosomi	<i>Ex vivo</i> (koža miševa)	Poboljšana dostava lijeka u kožu, pri čemu je permeacija kroz kožu izraženija od odlaganja lijeka u koži.	Zhang i sur., 2012
	Deformabilni liposomi	Klinička studija (faza II)	Potenciranje antifungalnog učinka <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> .	Ghannoum i sur., 2012

HSV, *Herpes simplex* virus; MIK, minimalna inhibitorna koncentracija

Djelotvornost liposoma u topikalnoj antimikrobnoj terapiji temelji se ponajprije na poboljšanju penetracije uklopljenog antimikrobnog lijeka kroz *stratum corneum* domaćina i membranu ili stanični zid mikrobnog patogena. *In vitro* istraživanja provedena s bacitracinom uklopljenim u etosome na kulturama 3T3 fibroblasta (izoliranim iz albino miševa) pokazala su penetraciju etosoma i oslobađanje uklopljenog bacitracina unutar stanica. *Ex vivo* ispitivanjima na humanoj i životinjskoj koži dokazano je da etosomi uspješno prolaze kroz intercelularne lipidne domene rožnatog sloja i dopremaju bacitracin u dublje slojeve kože, pri čemu okluzija nije imala utjecaj na dopremu lijeka (Godin i Touitou, 2004). Antibakterijski učinak eritromicina uklopljenog u etosome testiran je *in vitro* na 3 različita bakterijska soja: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 29213 i eritromicin-rezistentni *S. aureus*. Postignute su značajno veće zone inhibicije korištenjem liposomskog eritromicina u odnosu na vodeno-etanolnu otopinu lijeka, kao i 2-2,5 puta niže vrijednosti MIK-ova za sve tretirane sojeve u odnosu na otopinu eritromicina. *In vitro* antimikrobni učinak potkrijepljen je i *in vivo* ispitivanjima na miševima: etosomski eritromicin inokuliran *in vivo* zajedno sa *S. aureus* ATCC 29213 postigao je potpunu inhibiciju razvoja infekcija, dok su se u slučaju primjene vodeno-etanolne otopine lijeka unutar 5 dana od inokulacije razvili duboki dermalni i supkutani apscesi. Histopatološka analiza potvrdila je učinkovitost etosoma u dopremi eritromicina u dublje slojeve kože s ciljem eradikacije stafilokokne infekcije (Godin i Touitou, 2005). Etosomski pripravak eritromicina pokazao je učinkovitost i u tretiranju dubokih kožnih infekcija uzrokovanih vrstom *S. aureus in vivo* na animalnom modelu (miševi), pri čemu je zabilježeno uspješno cijeljenje kože i inhibicija bakterijskog rasta (Godin i sur., 2005). Osim antibiotika, etosomi su istraživani i kao nanonosači antifungika (Kaur i sur., 2015) i antivirusika (Horwitz i sur., 1999). Štoviše, etosomski pripravak aciklovira registriran je za lokalnu terapiju *Herpes labialis*-a (Supra-Vir<sup>®</sup>).

Primjena liposomski uklopljenih antibiotika pokazala se zanimljivim pristupom i u antimikrobnoj topikalnoj terapiji akni. Škalko i suradnici (1992) su proveli kliničku studiju u kojoj je liposomski pripravak klindamicina pokazao značajno veću efikasnost u tretiranju pustula nego klasični losion klindamicina. Bolja učinkovitost 1 %-tnog liposomskog klindamicina u tretiranju akni u odnosu na 1 %-tnu otopinu klindamicina (Klimicin T<sup>®</sup>, Lek) potvrđena je i u kliničkoj studiji koju su proveli Honzak i Šentjerc (2000). Fluhr i suradnici (1999) su pokazali da se korištenjem liposoma s uklopljenim benzoilperoksidom postiže bolji antibakterijski učinak na bakterijske uzročnike uključene u patogenezu akni (*Propionibacterium* i *Micrococcaceae*), u odnosu na komercijalni pripravak benzoilperoksida (Tablica 1).



Liposomi su se također pokazali potentnim nanosustavima za ciljanu isporuku antimikrobnih lijekova u biofilmove, u svrhu prevencije ili eradikacije istih. Ispitivani su kao nosači za razne antibiotike (vankomicin, gentamicin, klorheksidin, triklozan, benzil penicilin, amikacin, tobramicin, klaritromicin, azitromicin, meropenem, daptomicin, rifampicin, metronidazol, ciprofloksacin) i za tretiranje biofilмова različitih bakterijskih vrsta (*S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus oralis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*). Ispitivane su formulacije različitog lipidnog sastava, površinskog naboja i promjera vezikula, a pokazano je da se optimizacijom fizičkih svojstava liposoma (lipidni sastav, površinski naboj, promjer liposoma) mogu dobiti formulacije učinkovite u eradikaciji i/ili prevenciji nastanka biofilмова (Rukavina i Vanić, 2016). Najveći broj istraživanja proveden je s konvencionalnim liposomima, no najbolji rezultati u ciljanoj dostavi antibiotika u biofilmove postignuti su korištenjem tzv. fluidosoma, tj. fuzogenih liposoma, čiji se terapijski potencijal zasniva na fuziji s bakterijskom stanicom i oslobađanju uklopljenog antibiotika u citoplazmu patogena (Beaulac i sur., 1996, 1998; Drulis-Kawa i sur., 2006a, 2006b; Nicolosi i sur., 2010; Sachetelli i sur., 2000).

Deformabilni su liposomi pokazali veliki potencijal u topikalnoj antibiofilm terapiji. Primjerice, uklapanjem daptomicina u deformabilne liposome građene od lecitina i natrijevog kolata (17:1, *m/m*), postignuto je uspješno uklapanje lijeka (> 85 %) uz odličnu stabilnost vezikula tijekom 2 mjeseca skladištenja (pri 4 °C). *Ex vivo* eksperimenti na koži miševa pokazali su brzu i uspješnu permeaciju liposomskog daptomicina u kožu (> 95 % nakon 12 sati), a dobiveni podaci potkrijepljeni su i farmakokinetičkom analizom *in vivo*, koja je potvrdila da deformabilni liposomi omogućuju uspješnu permeaciju daptomicina u kožu i pridružena tkiva, pri čemu se visoka koncentracija lijeka postiže brzo i održava kroz nekoliko sati. Osim povoljnog farmakokinetičkog profila, za deformabilne liposome s daptomicinom dokazan je poboljšani antibakterijski učinak na *S. aureus* biofilmove *in vitro* i *in vivo* (miševi). Naime, 4 dana nakon tretiranja miševa inokuliranih sa *S. aureus*-om utvrđen je zadovoljavajući antibiofilm učinak deformabilnih liposoma s daptomicinom, pri čemu je učinkovitost bila jednaka intravenskoj primjeni antibiotika. Iako u opisanoj studiji točan mehanizam djelovanja deformabilnih liposoma nije detaljno istražen, autori navode da je terapijska učinkovitost najvjerojatnije rezultat poboljšane penetracije vezikula u *stratum corneum* i fuzije elastičnih vezikula s biofilmom (Li i sur., 2013).

Darwhekar i suradnici (2012) ispitivali su učinkovitost topikalno primijenjenih deformabilnih liposoma s neomicinsulfatom za liječenje kožnih infekcija. Uklapanjem u deformabilne liposome značajno je pospješena penetracija i odlaganje antibiotika u dublje slojeve kože *ex vivo*. Nadalje, liposomski antibiotik pokazao je jači antibakterijski učinak na *S. aureus in vitro* u odnosu na otopinu lijeka, dok su *in vivo* ispitivanja provedena na animalnom modelu (štakori) pokazala uspješno cijeljenje dubokih dermalnih infekcija uzrokovanih *S. aureus*-om te inhibiciju bakterijskog rasta. Takvi rezultati povezani su s fizičkim svojstvima liposoma, prvenstveno s elastičnošću dvoslojeva koja im omogućava penetraciju u dublje slojeve kože, fuziju sa stanicama kože i intracelularnu dopremu uklopljenog antibiotika. U istoj studiji provedena su i ispitivanja biokompatibilnosti deformabilnih liposoma s neomicinsulfatom te je histološkom analizom utvrđena očuvanost integriteta tretirane animalne kože.

Osim za liječenje bakterijskih infekcija kože, elastični liposomi su se pokazali učinkovitim nosačima antimikrobnih lijekova i u liječenju gljivičnih infekcija kože i kožnih privjesaka. Gljivične infekcije nokta (onihomikoze) izrazito su otporne te zahtijevaju dugotrajno liječenje. Nedostaci oralne terapije antimikoticima su visoki rizik interakcija antimikotika s drugim lijekovima i pojave ozbiljnih nuspojava (npr. hepatička toksičnost), ali i relativno visoka stopa recidiva (Piraccini i sur., 2010). S druge strane, lokalna terapija onihomikoza uglavnom je nedovoljno učinkovita, ponajprije zbog nemogućnosti topikalno primijenjenog antifungalnog lijeka da prodre duboko u nokatnu ploču, kako bi u potpunosti eliminirao uzročnika (Murdan, 2002). Inovativni terapijski sustav TDT 067, temeljen na deformabilnim liposomima, razvijen je s ciljem poboljšanja dopreme antimikotika terbinafina u nokatnu ploču, nokatni žlijeb i okolno tkivo. Učinkovitost ovog liposomskog terapijskog sustava potvrđena je *in vitro* na različitim vrstama dermatofita (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*) s dobivenim MIK vrijednostima 8-60 puta manjima od MIK-ova otopine terbinafina i komercijalno dostupnog terbinafinskog aerosola (Ghannoum i sur., 2011). Fungicidni učinak TDT 067 potvrđen je i evaluacijom morfologije *Trichophyton rubrum*, koja je pokazala potpunu disrupciju hifalne strukture uzročnika *in vitro*, ali i *in vivo*, u uzorcima dobivenima od ispitanika uključenih u fazu II kliničke studije (Ghannoum i sur., 2012). U komparativnoj studiji Zhang i suradnika (2012), nakon primjene u neokluzivnim uvjetima, količina terbinafina u koži miševa *ex vivo* bila je 1,26-1,56 puta veća za elastične liposome (deformabilni liposomi i etosomi) nego za konvencionalne liposome. Također, odlaganje terbinafina u kožu s obzirom na primijenjenu dozu (%) bilo je 2,52-9,88 puta veće za elastične u odnosu na konvencionalne liposome.

Superiornost elastičnih vezikula potvrđena je i *in vivo* (miševi), primjenom konfokalne laserske mikroskopije, pri čemu se pokazalo da deformabilni liposomi pospješuju odlaganje i nakupljanje fluorescentnog markera u samoj koži, dok etosomi pospješuju permeaciju kroz kožu. Potrebno je istaknuti da su u opisanoj studiji etosomi s dodatkom propilenglikola u svojoj strukturi (binarni etosomi) pokazali veću stabilnost od klasičnih etosoma i bolji penetracijski potencijal od svih uspoređivanih vrsta liposoma. Poboljšanje penetracijskog potencijala vezikula kao rezultat prisustva propilenglikola u liposomskoj formulaciji opisali su i Elmoslemany i suradnici (2012). Naime, u njihovoj su studiji propilenglikol liposomi pokazali značajno bolje uklapanje mikonazolnitrata, veću stabilnost tijekom skladištenja te veću antifungalnu aktivnost *in vitro* (*Candida albicans*), kao i bolje odlaganje u humanoj koži (*ex vivo*) u usporedbi s konvencionalnim liposomima.

## 1.6. DERMATOLOŠKE PODLOGE

Za primjenu lijekova u dermatoterapiji uglavnom se koriste različite vrste podloga. Osim što služe kao nosači lijekova, podloge nerijetko i same pokazuju povoljne učinke na kožu te mogu imati ključnu ulogu u terapijskom učinku pripravka u cjelini (Winckle i sur., 2008). Idealna podloga trebala bi biti: kemijski i mikrobiološki stabilna, fiziološki podnošljiva, oslobađati lijek u dostatnoj mjeri, a pritom ne pokazivati inkompatibilnosti s djelatnom ili drugim pomoćnim tvarima, imati prikladnu konzistenciju (koja će osigurati zadovoljavajuću adhezivnost i razmazivost) te pokazivati sposobnost vezanja vode i djelatnih tvari. Sastav podloge u dermatološkim pripravcima treba prilagoditi: djelatnoj tvari koja se dodaje u sustav, mjestu primjene (dlakavost površine, blizina sluznice), statusu kože (zdrava koža, ozlijeđena ili oboljela koža), tipu kože (masna, suha ili mješovita) i stadiju bolesti ukoliko se liječi oboljela koža (akutni ili kronični tip oboljenja) (Senjković, 2003). Dermatološke podloge razlikuju se s obzirom na kemijska svojstva, lipofilnost, isperivost te konzistenciju (čvrste, polučvrste i tekuće podloge). Tijekom optimizacije formulacija namijenjenih primjeni na kožu provode se brojna istraživanja koja uključuju: (i) određivanje profila oslobađanja lijeka, (ii) ispitivanje permeabilnosti uklopljenog lijeka kroz membrane (iii) reološka i teksturna ispitivanja poput određivanja viskoznosti, čvrstoće, adhezivnosti i rasprostiranja (distribucije) pripravka po koži, (iv) ispitivanje kompatibilnosti lijeka s pomoćnim tvarima, (v) određivanje stabilnosti

pripravka tijekom pohrane (skladištenja), (vi) studije biokompatibilnosti te (vii) testove iritacije (das Neves i Bahia, 2006).

Posljednjih desetljeća intenzivno se istražuju različite polimerne viskoelastične podloge bioadhezivnih svojstava koje mogu osigurati dostatno zadržavanje pripravka na koži ili sluznici te produljeno i/ili kontrolirano oslobađanje uklopljenog lijeka. Veliki broj polimernih podloga prisutan je na tržištu, dok su mnoge u fazama pretkliničkih i kliničkih ispitivanja. Osim za učinkovitu (trans)dermalnu primjenu različitih lijekova, određeni su tipovi viskoelastičnih podloga baziranih na polimerima pokazali i poželjna svojstva u poticanju cijeljenja rana i opekotina na koži (Ibrahim i sur., 2017). Takve podloge mogu apsorbirati tkivni eksudat, prevenirati dehidraciju, ali i zbog svoje porozne strukture omogućiti izmjenu plinova kod kožnih oboljenja te pozitivno utjecati na reepitelizaciju epidermisa i odlaganje kolagena u dermis (Pachua, 2015).

### **1.6.1. Kitozanske podloge**

Kitozan je prirodni linearni polimer, molekulske mase između 50 i 2000 kDa, koji se dobiva djelomičnom alkalnom N-deacetilacijom hitina (visokomolekularni polisaharid sastavljen od  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glukozamina i N-acetil-D-glukozamina). Jedini je kationski polimer prirodnog porijekla, bioadhezivan je i biorazgradljiv, a ujedno i neimunogen, što ga čini veoma zanimljivim za primjenu u oblikovanju farmaceutskih i kozmetičkih pripravaka (Hurler i sur., 2013a; Nilsen-Nygaard i sur., 2015).

U brojnim je istraživanjima kitozan pokazao antimikrobne učinke za koje se smatra da su rezultat više različitih mehanizama djelovanja (Andres i sur., 2007; Dai i sur., 2011; No i sur., 2002). Primjerice, elektrostatska interakcija između pozitivno nabijenog kitozana i negativno nabijene stanične membrane mikroorganizama dovodi do oštećenja membrane i istjecanja unutarstaničnog sadržaja, a pri nižim koncentracijama (< 0,2 mg/ml) uzrokuje aglutinaciju bakterijskih stanica. Osim što povećava permeabilnost stanične membrane, kitozan ulazi u interakciju s DNA i utječe na ekspresiju pojedinih gena te pokazuje i značajnu sposobnost keliranja različitih metalnih iona koji su važni za stabilnost staničnog zida. Sve navedeno u konačnici rezultira smrću stanice i inhibicijom rasta mikroorganizama. Spektr antimikrobne aktivnosti kitozana uključuje gljivice i bakterije, pri čemu je pokazao veći antibakterijski potencijal prema Gram-pozitivnim u odnosu na Gram-negativne bakterije (Kong i sur., 2010; Raafat i sur., 2008; Rabea i sur., 2003).

Uz okolišne čimbenike (pH, temperatura, ionska jakost, prisutnost metalnih iona i organskih tvari) na antimikrobni učinak utječu tip kitozana, molekulska masa i stupanj deacetilacije, koncentracija i viskoznost kitozana u sustavu te fizičko stanje i eventualna kemijska derivatizacija kitozana (Dai i sur., 2011). Osim na mikroorganizme, kitozan može djelovati i na domaćina na način da aktivira ili inaktivira obrambene procese u tkivima (npr. inhibicijom određenih enzima), ostvarujući tako imunomodulatorne učinke (Fong i Hoemann, 2018).

Kitozanske viskoelastične podloge dobivaju se kovalentnim poprečnim povezivanjem ili nekovalentnim umrežavanjem kitozanskih polimera, primjerice otapanjem kitozana u razrijeđenim organskim kiselinama. Podloge u kojima kitozan nije kovalentno umrežen imaju prednost u vidu izbjegavanja potencijalno toksičnih poprečnih umreživača (engl. *cross-linkers*) i reagensa, ali pokazuju i manju robusnost i nešto lošija mehanička svojstva, posebice u *in vivo* uvjetima (Nilsen-Nygaard i sur., 2015).

Zbog svog omekšavajućeg i zaštitnog učinka na kožu te biorazgradljivosti i biadhezivnosti, kitozanske podloge se intenzivno istražuju kao nosači za dermalnu primjenu lijekova (Giri i sur., 2012; Hurler i Škalko-Basnet, 2012). Njihova primjena nije ograničena samo na kožu već se koriste i za oralnu, nazalnu, bukalnu, rektalnu, vaginalnu i okularnu primjenu lijekova (Gupta i sur., 2002; Nilsen-Nygaard i sur., 2015). Istraživanja su pokazala da kitozanske podloge pokazuju inherentna antimikrobna svojstva (Akncbay i sur., 2007; Kandimalla i sur., 2013; Li i sur., 2011), poboljšavaju cijeljenje rana i opekotina te značajno smanjuju upalu (Dai i sur., 2011; Denis i sur., 2012; Hurler i sur., 2013a). Naime, uz svoj hemostatski učinak (Ahmadi i sur., 2015), kitozan i njegovi derivati potiču aktivnost imunoloških i drugih stanica uključenih u proces cijeljenja kože, poput polimorfonuklearnih leukocita, makrofaga, fibroblasta i keratinocita (Dai i sur., 2011). Dokazano je da na sposobnost kitozana da pospješuje cijeljenje rana i opekotina značajno utječu njegova molekulska masa i stupanj deacetilacije. Visokomolekulski kitozan s većim stupnjem deacetilacije pokazuje bolji učinak na cijeljenje rana od niskomolekulskog i srednjemolekulskog kitozana (Alsarra, 2009; Minagawa i sur., 2007).

### **1.6.2. Liposomi uklopljeni u podlogu**

Tekuća konzistencija i niska viskoznost liposomskih disperzija može predstavljati ograničenje njihove topikalne primjene. Prikladnu viskoznost liposomskih disperzija namijenjenih topikalnoj primjeni na kožu i dulje zadržavanje na mjestu primjene moguće je

postići uklapanjem u polučvrste dermatološke podloge. Time se može dodatno usporiti oslobađanje uklopljenog lijeka, a izborom podloge odgovarajućih svojstava i povećati stabilnost liposoma (Darwhekar i sur., 2012; Elnaggar i sur., 2014; Pavelić i sur., 2001, 2004, 2005a, 2005b; Škalko i sur., 1998). Mobilnost liposoma i potencijal dostave lijeka na/u kožu uvelike će ovisiti o njihovoj interakciji s podlogom. Prisustvo liposoma u podlozi može se odraziti u promjenama teksturnih svojstva osnovne podloge, što se posljedično reflektira i na oslobađanje lijeka iz takvog kompleksnog sustava (Hurler i sur., 2011). Valja naglasiti da će konačni ishod terapije ovisiti, ne samo o potentnosti i postignutoj koncentraciji lijeka na oboljelom području koja je određena permeabilnošću lijeka u kožu, već i o brojnim drugim čimbenicima kao što su teksturne karakteristike apliciranog pripravka, bioadhezivnost i biokompatibilnost te profil oslobađanja lijeka iz kompleksne formulacije liposomi-u-podlozi (Elnaggar i sur., 2014; Hurler i sur., 2012). Sama podloga može značajno utjecati na bioraspoloživost lijeka, ali i (pato)fiziološki status kože koja se tretira/liječi. Naime, prilikom primjene na kožu, podloge mogu značajno utjecati na stanje epidermisa, hidrataciju ili isušivanje kože, lubrikaciju, tonus, okluziju ili zaštitu kože te epitelizaciju i cijeljenje rana ili opekline (Nagelreiter i sur., 2013; Rehman i Zulfakar, 2014; Sanna i sur., 2009).

Zbog dobre kompatibilnosti s liposomima, viskoelastične podloge bazirane na polimerima (Carbopol<sup>®</sup>, kitozan, karboksimetilceluloza, hidroksipropilmetilceluloza, ksantanska guma i dr.) najčešće su korištene podloge za uklapanje liposoma namijenjenih topikalnoj primjeni. Uklapanjem liposoma u spomenute podloge moguće je povećati stabilnost liposoma, postići produljeno i kontrolirano oslobađanje uklopljenog lijeka, povećati (trans)dermalnu permeabilnost, postići dostatno zadržavanje na mjestu primjene i poboljšati terapijske učinke formulacije (Ibrahim i sur., 2017). Dosada su provedena mnogobrojna istraživanja različitih formulacija liposomi-u-podlozi namijenjenih primjeni na kožu za različite terapijske ciljeve (liječenje upalnih bolesti kože, tretiranje akni, lokalna anestezija, analgezija, antitumorska terapija, liječenje dermatomikoza, fotodinamska terapija, antimikrobna i antiinfektivna terapija).

Pregled odabranih *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo* i kliničkih ispitivanja različitih liposomskih formulacija uklopljenih u viskoelastične podloge bazirane na polimerima prikazan je Tablicom 3.

**Tablica 3.** Primjeri istraživanja polimernih viskoelastičnih podloga s uklopljenim liposomima namijenjenih (trans)dermalnoj primjeni

Primjena	Fosfolipidni sastav liposoma	Djelatna tvar	Polimer	Rezultati	Literatura
Analgezija	SPC/kolesterol	Diklofenaknatrij	Carbopol® 934	Odgođeno i produljeno oslobađanje u odnosu na kontrolnu podlogu; permeabilnost lijeka iz liposoma uklopljenih u podlogu ovisna o sadržaju lijeka ( <i>ex vivo</i> ).	Jithan i Swathi, 2010
	SPC/kolesterol	Ketoprofen	Carbopol® 934	Produljeno oslobađanje lijeka iz liposoma-u-podlozi u odnosu na kontrolnu podlogu.	Mansoori i sur., 2012
	SPC/kolesterol/ SDCh/Tween 80®	Brucin	Carbopol® 940	Bolja permeacija lijeka u kožu; izostanak iritacijskog učinka na intaktnoj i na oštećenoj koži.	Wang i sur., 2009
Lokalna anestezija	SPC/kolesterol	Lidokain	Carbopol® 940	Povećana stabilnost liposoma uklopljenih u podlogu; produljeno oslobađanje lijeka iz liposoma-u-podlozi u odnosu na kontrolu.	Glavas-Dodov i sur., 2002
	SPC/kolesterol		Carbopol® 940	Veća perkutana permeacija lidokaina u odnosu na kontrolu.	Gong i sur., 2006

Antitumorska terapija	PL90H/kolesterol	5-fluorouracil	Kitozan (n.n.)	Značajno sporije oslobađanje iz liposoma-u-podlozi u odnosu na kontrolu; oslobađanje lijeka slijedi Higuchijev difuzijski model.	Glavas-Dodov i sur., 2003
	SPC/kolesterol SPC/Span 60 <sup>®</sup> SPC/Span 80 <sup>®</sup> SPC/Tween 80 <sup>®</sup>		Carbopol <sup>®</sup> 980	Bolja dermalna dostava lijeka s elastičnim liposomima-u-podlozi u odnosu na kremu s neuklopljenim lijekom; liposomi-u-podlozi bez iritacijskog učinka na kožu.	Hussain i sur., 2016
Akne	EPC/kolesterol	Tretionoin	Carbopol <sup>®</sup> 934	Povećana stabilnost liposoma; produljeno oslobađanje; 1,5 puta veća učinkovitost uz značajno manje iritacije u odnosu na kontrolu.	Patel i sur., 2000
	EPC/kolesterol	Benzoilperoksid	Carbopol <sup>®</sup> 934	Dvostruko bolja učinkovitost liposoma-u-podlozi u odnosu na komercijalni gel; manje lokalnih nuspojava.	Patel i sur., 2001
	EPC/kolesterol	Laurinska kiselina	HEC	Uspješna eradikacija <i>Propionibacterium acnes in vitro</i> i <i>in vivo</i> (miševi); učinkovitost <i>in vivo</i> usporediva s kremom benzoilperoksida; manja toksičnost na koži u odnosu na standardne i komercijalne kreme.	Pornpattananangkul i sur., 2013



Lokalna antimikrobna terapija	PL90G/ Tween 80®	Neomicinsulfat	Carbopol® 934	Poboljšana stabilnost uklopljenih deformabilnih liposoma; prikladna reološka svojstva formulacije; bolji <i>in vitro</i> antibakterijski učinak u odnosu na kontrolu i otopinu lijeka; kompatibilnost s kožom ( <i>in vivo</i> ).	Darwhekar i sur., 2012
	SPC	Mupirocin	Kitozan (HMW)	Produljeno i odgođeno oslobađanje lijeka <i>in vitro</i> i <i>ex vivo</i> ; antimikrobni učinak na <i>S. auerus</i> i <i>B. subtilis</i> ; veća bioadhezivnost u odnosu na komercijalni pripravak.	Hurler i sur., 2012
				Prevenција nastanka <i>S. auerus</i> biofilma; kraće vrijeme cijeljenja u usporedbi s s komercijalnim pripravkom ( <i>in vivo</i> ); biokompatibilnost.	Hurler i sur., 2013a
Fotodinamska terapija (karcinom skvamoznih stanica)	SPC	Temoporfin	Carbopol® 980 NF	Dostava veće količine temoporfina u rožnati sloj i dublje slojeve epidermisa u odnosu na kontrolu.	Dragičević-Ćurić i sur., 2009
Fotodinamska terapija (akne)	PC/kolesterol	MP	CMC	Sporije <i>in vitro</i> oslobađanje iz liposoma-u-podlozi u odnosu na kontrolu; liposomi-u-podlozi učinkovitiji u destrukciji pilosebacealnih jedinica u odnosu na kontrolu ( <i>in vivo</i> , miševi) te u redukciji broja lezija na koži, uz manje nuspojave (klinička studija).	Fadel i sur., 2009

Cijeljenje rana (infektivne dermatoze)	SPC	PVP-jod	Carbomer (n.n.)	Učinkovitost formulacije (Repithel <sup>®</sup> ) i izvrsna podnošljivost pripravka potvrđena kliničkim ispitivanjem.	Augustin i sur., 2017
Dermato- mikoze	Epikuron <sup>®</sup> 200/ kolesterol	Flukonazol	Carbopol <sup>®</sup> 941	Manja permeacija flukonazola, ali višestruko veća retencija lijeka u koži u odnosu na kontrolu ( <i>ex vivo</i> ).	Zhao i sur., 2007
	PL90H/kolesterol		Carbopol <sup>®</sup> 934 NF	Povećana permeacija kroz i odlaganje u kožu <i>ex vivo</i> (štakori) u odnosu na kontrolu i komercijalni gel; dokazana stabilnost kroz 60 dana.	Mitkari i sur., 2010
	PC/kolesterol DSPC/kolesterol	Griseofulvin	Carbopol <sup>®</sup> 974 HEC Carbopol <sup>®</sup> /HEC	Utjecaj reoloških svojstava podloge na oslobađanje lijeka.	Mourtas i sur., 2007
	PC/kolesterol	Itrakonazol	Carbopol <sup>®</sup> 934	<i>Ex vivo</i> studije (albino štakori) pokazale bolju permeaciju lijeka kroz kožu iz liposoma-u-podlozi u odnosu na kontrolu.	Sampathi i sur., 2014
	PC/Etanol	Amfotericin B	Carbopol <sup>®</sup> 934 P	Povećana permeacija i odlaganje lijeka u kožu, bez zabilježenih iritacija. Značajno poboljšana antifungalna aktivnost u odnosu na komercijalni gel ( <i>C. albicans</i> ).	Kaur i sur., 2015
Onihomikoze	PC/Tween 80 <sup>®</sup>	Terbinafin	HPMC	Značajno bolja permeacija u kožu, zadržavanje u koži i bolja bioraspodjelivost liposoma-u-podlozi u odnosu na komercijalni pripravak (Lamisil <sup>®</sup> krema).	Yang i sur., 2015

Lokalna protuupalna terapija	EPC/kolesterol	Hidrokortizon	Carbopol® 934	Manja apsorpcija lijeka iz liposoma-u-podlozi u odnosu na standardni pripravak (mast); veća koncentracija i dulje zadržavanje lijeka u koži.	Kim i sur., 1997
	PC/kolesterol	Indometacin	Ksantanska guma	Produljen protuupalni učinak u odnosu na otopinu indometacina (klinička studija).	Puglia i sur., 2004
	PC/kolesterol	Fikocijanin	Carbopol® 940	Bolje nakupljanje fikocijanina u koži ( <i>ex vivo</i> ) u odnosu na kontrolni gel; uspješna inhibicija edema na animalnom modelu (štakori), uz smanjenje aktivnosti mijeloperoksidaze za 60 %.	Manconia i sur., 2009
	SPC/PL90G	Betametazonvalerat Diflukortolonvalerat	Kitozan (MMW)	Na animalnom modelu (štakori) dokazan jači protuupalni učinak u odnosu na komercijalne kreme kortikosteroida; potpuna supresija vazodilatacije, edema i upale; dokazana sigurnost formulacije liposomi-u-podlozi.	Eroglu i sur., 2016
	HSPC/TA/ Tween 80®	Glicirizinska kiselina Lizin	Carbopol® 971 P	Liposomi-u-podlozi pokazali bolji učinak na smanjenje edema i eritema <i>in vivo</i> (miševi) u odnosu na kontrolu i komercijalne pripravke kortikosteroida.	Li i sur., 2012

Antifibrotski učinak (IPF)	SPC/natrijev kolat	Pirfenidon	HPMC	Odgodeno oslobađanje iz liposoma-u-podlozi; 5 puta veći fluks lijeka kroz kožu primjenom liposoma-u-podlozi liposomskog u odnosu na kontrolu.	Jose i sur., 2016
-	DPPC/kolesterol	Karboksifluorescein	Kitozan (HMW)	Stabilnost liposoma uklopljenih u podlogu; odgođeno i produljeno oslobađanje karboksifluoresceina iz formulacije liposoma-u-podlozi odnosu na kontrolu.	Billard i sur., 2015
-	PL90G	Kalcein	Kitozan (HMW)/želatina	Očuvan integritet i povećana stabilnost liposoma nakon uklapanja u podlogu; bolji profil oslobađanja postignut uklapanjem MLV u podlogu u odnosu na SUV u podlozi.	Ciobanu i sur., 2014

ALA, aminolevulinska kiselina; CMC, karboksimetilceluloza; DPPC, dipalmitoilfosfatidilkolin; DSPC, distearoilfosfatidilkolin; EPC, fosfatidilkolin iz jaja; HS, *Hidradenitis suppurativa*; HSPC, hidrogenirani sojin fosfatidilkolin; HEC, hidroksietilceluloza; HMW, visoka molekulska masa; HPMC, hidroksipropilmetilceluloza; IPF, idiopatska pulmonalna fibroza; MLV, multilamelarni liposomi; MMW, srednja molekulska masa; MP, metilensko plavilo; n.n., nije naveden tip kitozana/karbomera u radu; PC, fosfatidilkolin; PL90G, Phospholipon® 90 G; PL 90H, Phospholipon® 90H; PVP, polivinilpirolidon; SDCh, natrijev deoksikolat; SPC, fosfatidilkolin iz soje; SUV, mali unilamelarni liposomi; TA, tokoferilacetat

## 1.7. AZITROMICIN

Azitromicin (AZT) je sintetski derivat eritromicina (9-deoksi-9a-aza-9a-metil-9a homoeritromicin A). Slično ostalim makrolidima, AZT inhibira sintezu proteina vezanjem na 50S podjedinicu ribosoma. Djeluje na većinu Gram-pozitivnih bakterija poput *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., na neke Gram-negativne bakterije (*Haemophilus influenzae*, *Neisseria* spp., *Legionella* spp.), te na bakterije bez stanične stijenke poput *Mycoplasma* spp. i obavezne intracelularne patogene kao što su *Chlamydia* spp. (Imamura i sur., 2005; Vrhovac, 2007; Zuckerman, 2004). Indiciran je za infekcije gornjih dišnih puteva (faringitis, tonzilitis, sinusitis, *otitis media*) te infekcije donjih dišnih puteva (akutna egzacerbacija kroničnog bronhitisa, izvanbolnički stečena pneumonija), infekcije kože i potkožnog tkiva (*acne vulgaris*, *erythema migrans*, erizipel, impetigo, piodermija), spolno prenosive bolesti (nekomplikirani uretritis, cervicitis uzrokovan bakterijom *Chlamydia trachomatis*), infekcije želuca i dvanaesnika uzrokovane vrstom *Helicobacter pylori* te kronični prostatitis uzrokovan bakterijom *Chlamydia trachomatis* (Baza lijekova, HALMED). Može se koristiti i za liječenje bakterijskih infekcija oka, prvenstveno blefaritisa i konjunktivitisa (Wu i sur., 2010). Osim širokospektralnog antimikrobnog djelovanja, brojna istraživanja ukazuju i na imunomodulatorne i protuupalne učinke AZT-a (Amsden, 2005; Banjanac i sur., 2012; Gillis i Iglewski, 2004; Kanoh i sur., 2010; Kwiatkowska i Mašliška, 2012; Labro, 1998) te inhibirajući utjecaj na formiranje biofilmova i međustaničnu komunikaciju bakterija (Bala i sur., 2011; Favre-Bonte i sur., 2003; Presterl i sur., 2009; Starner i sur., 2008). Farmakokinetiku AZT-a karakterizira niska koncentracija u plazmi te visoka i dugotrajna koncentracija u tkivima (dobro se raspodjeljuje u tkiva te postiže visoke koncentracije intracelularno). AZT postiže visoke koncentracije u obligatnim ili fakultativnim fagocitima koji su od velikog značenja u liječenju bakterijskih infekcija, osobito onih izazvanih intracelularnim uzročnicima (Francetić, 2008; Lode i sur., 1996; Van Bambeke i Tulkens, 2001).

AZT se primjenjuje oralno (tablete, kapsule, oralna suspenzija), parenteralno (otopina za intravensku primjenu) ili lokalno u oftalmologiji (kapi ili mast za oči) (Peters i sur., 1992; Wu i sur., 2010). Lijek se uglavnom koristi u obliku dihidrata (relativna molekulska masa=785,03; log P=3,98), a karakterizira ga ograničena topljivost u vodi (DrugBank).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Najčešći uzročnik infekcija kože i mekih tkiva je *S. aureus*. Poseban izazov u liječenju infekcija kože uzrokovanih *S. aureus*-om predstavlja rastuća pojavnost rezistencije na antibiotike (MRSA) te formiranje biofilmova, što za posljedicu ima smanjenu učinkovitost primijenjenih antibiotika, pojavu recidiva i razvoj kroničnih infekcija. Komplikirane stafilokokne infekcije kože, poput erizipela, celulitisa, impetiga, folikulitisa, dermatitisa, dijabetičkih rana, kroničnih i postoperativnih rana, u kombinaciji s određenim komorbiditetima mogu rezultirati ozbiljnim zdravstvenim komplikacijama ili čak bakterijemijom. U tim je slučajevima nužna hospitalizacija, uz visoke troškove za zdravstveni sustav i mogući smrtni ishod za pacijenta.

Sistemsom primjenom potentnih antibiotika infekcije kože se relativno uspješno liječe, ali uz niz neželjenih nuspojava i povećani rizik razvoja rezistencije. Topikalnom primjenom antimikrobnih lijekova omogućuje se postizanje visoke lokalne koncentracije lijeka na oboljelom mjestu, uz primjenu značajno nižih doza antibiotika i manje nuspojava u usporedbi sa sistemskom primjenom. Međutim, primjena klasičnih topikalnih ljekovitih oblika kod kompliciranih ili dubokih infekcija kože u praksi je često nedovoljno učinkovita, ponajprije zbog loše penetracije lijeka u kožu i biofilm, koja je posljedica fizičko-kemijskih svojstava lijeka i ljekovitog oblika (formulacije). Stoga se opravdanom pokazala potreba razvoja terapijskih (nano)sustava čijom bi se primjenom omogućila učinkovita, kontrolirana dostava antimikrobnih lijekova na ograničeno (oboljelo) područje. Zbog svoje biokompatibilnosti, biorazgradljivosti, netoksičnosti i neimunogenosti, liposomi su pokazali veliki potencijal u topikalnoj antimikrobnoj/antibiofilm terapiji. Oni mogu osigurati kontrolirano i produljeno oslobađanje uklopljenog antimikrobnog lijeka, zaštititi nestabilni lijek od nepovoljnog djelovanja biološkog okruženja, omogućiti ciljanu dostavu i visoke koncentracije antibiotika na mjestu djelovanja te fuziju s bakterijskim i/ili inficiranim eukariotskim stanicama (Rukavina i Vanić, 2016; Škalko-Basnet i Vanić, 2017).

Premda je AZT indiciran u oralnoj terapiji kožnih infekcija, dosada nije registriran topikalni pripravak AZT-a za lokalnu primjenu na kožu. Stoga razvoj i optimizacija topikalnog terapijskog nanosustava s uklopljenim AZT-om predstavlja poseban izazov.

Uklanjanjem AZT-a u liposome (AZT-liposomi) očekuje se postizanje boljeg otapanja lijeka, odgođenog i kontroliranog oslobađanja na mjestu djelovanja te poboljšanje antibakterijskog i antibiofilm učinka.

Uklanjanje AZT-a u kombinaciji s kationskim antibakterijskim peptidom u liposome, predloženo je kao inovativni pristup u sistemskoj terapiji MRSA-infekcija (Liu i sur., 2016).

Međutim, potencijal AZT-liposoma za lokalnu terapiju MRSA-om uzrokovanih infekcija kože do sada nije istraživana.

Konvencionalni liposomi s uklopljenim AZT-om pokazali su se prikladnim terapijskim sustavom za liječenje pulmonalnih infekcija uzrokovanih vrstama *Mycobacterium avium* (Oh i sur., 1995) i *P. aeruginosa* (Imamura i sur., 2005; Solleti i sur., 2015), ali dosada nisu provedene komparativne studije rigidnih kationskih te elastičnih deformabilnih i propilenglikol liposoma s AZT-om.

Stoga su u sklopu ovog rada pripremljeni AZT-liposomi različitog sastava, membranske elastičnosti i površinskog naboja. Potom su im određivana fizičko-kemijska svojstva, profil oslobađanja AZT-a i permeabilnost u/kroz kožu (*ex vivo*) te *in vitro* antibakterijska i antibiofilm aktivnost na *S. aureus* i MRSA kliničke izolate. Za procjenu biokompatibilnosti AZT-liposoma provedeno je *in vitro* ispitivanje citotoksičnosti na humanim stanicama kože, koje je prvo takvo ispitivanje u znanstvenoj literaturi.

Kako bi se postigla prikladna viskoznost disperzije AZT-liposoma za primjenu na kožu, isti su uklopljeni u kitozansku viskoelastičnu podlogu. Kitozan je odabran zbog njegove dokazane biorazgradljivosti i bioadhezivnosti, potencijalnih inherentnih antimikrobnih svojstava te povoljnih učinaka na cijeljenje i reepitelizaciju kože. Osim odgovarajuće viskoznosti, uklapanje AZT-liposoma u kitozansku podlogu imalo je za cilj i postizanje produljenog, kontroliranog i lokaliziranog oslobađanja AZT-a te eventualnog sinergističkog antimikrobnog učinka između kitozana i liposomskog AZT-a.

Pripremljeni terapijski sustavi tipa liposomi-u-podlozi karakterizirani su s obzirom na profil oslobađanja AZT-a, *in vitro* antibakterijski učinak te teksturna i reološka svojstva.



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

### 3.1. MATERIJALI

Za pripravu liposoma upotrijebljeni su: sojin lecitin (S75) i dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC) proizvođača Lipoid GmbH (Njemačka), dimetildioktadecilamonijev bromid (DODAB) i natrijev deoksikolat (SDCh) proizvođača Sigma-Aldrich (Sjedinjene Američke Države) te propilenglikol (Kemig, Hrvatska). Djelatnu tvar azitromicin (AZT) u obliku dihidrata donirala je PLIVA Hrvatska d.o.o. (Hrvatska). Kao otapala za (fosfo)lipide korišteni su koncentrirani etanol i metanol (Kemika, Hrvatska), dok su metanol i acetonitril korišteni za određivanje sadržaja AZT-a nabavljeni od proizvođača BDH, Prolabo® (Velika Britanija). Za izradu minikolona korišten je Sephadex G-50 (Sigma, Njemačka).

Fosfatni pufer (0,01 M; pH 7,5) pripremljen je otapanjem 1,3609 g kalijevog dihidrogenfosfata (Kemika, Hrvatska) u 1000 ml pročišćene vode te podešavanjem pH korištenjem 1 M otopine kalijevog hidroksida. Fosfatni pufer filtriran je prije upotrebe kroz celuloza-nitratni filter veličine pora 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech, Njemačka).

Za izradu kitozanske viskoelastične podloge korišten je kitozan visoke molekulske mase (Fluka, Njemačka), te 3,5 %-tna otopina mliječne kiseline, dobivena razrjeđivanjem 4 g 88 %-tne otopine mliječne kiseline (Kemig, Hrvatska) pročišćenom vodom do 100 g.

Antimikrobno djelovanje AZT-liposoma testirano je na bakterijskom soju *S. aureus* ATCC 29213 i pet MRSA sojeva iz Zbirke mikroorganizama Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (MFBF 10674, 10676, 10677, 10679, 10680).

U antimikrobnim ispitivanjima korišteni su sljedeći materijali: Müller-Hinton bujon (MHB) (Merck, Njemačka), Müller-Hinton agar (MHA) (Merck, Njemačka), triptik soja bujon (TSB) (Difco, Sjedinjene Američke Države), D-(+) glukoza (Kemika, Hrvatska), 2,3,5-trifeniltetrazolin klorid (TTC) (Sigma-Aldrich, Sjedinjene Američke Države), 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolin bromid (MTT) (Sigma, Njemačka), fosfatni pufer pH 7,4 (PBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Sjedinjene Američke Države) i dimetil-sulfoksid (DMSO) (Sigma, Njemačka). Korištena su dva tipa sterilnih mikrotitarskih pločica s 96 jažica: Microplate 96 W (Greiner Bio-One, Njemačka) i Nunclon Surface (Thermo Fisher Scientific, Sjedinjene Američke Države). Mikrobiološki materijal i pribor korišten u mikrobiološkim ispitivanjima je pribavljen sterilan ili je steriliziran autoklaviranjem pri 121 °C/1 atmosfera tijekom 20 minuta.

Stanična kultura humanih diploidnih fibroblasta MJ90hTERT ustupljena je s Instituta Ruđer Bošković (Zagreb, Hrvatska). Za uzgoj humanih staničnih linija keratinocita kože HaCaT (Cell Line Services, Njemačka) i fibroblasta kože MJ90hTERT korišteni su sljedeći materijali: posude za uzgoj stanica proizvođača Techno Plastic Products AG (Švicarska) i Falcon (Sjedinjene Američke Države), Dulbekov hranidbeni medij s visokom dozom glukoze (DMEM) (Lonza, Švicarska) uz dodatak 10 % fetalnog telećeg seruma (FBS) (Biosera, Francuska), smjesa antibiotika penicilina, streptomicina i amfotericina B (Lonza, Švicarska), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (Lonza, Švicarska), tripsin 2,5 %-tni (Lonza, Švicarska), fosfatni pufer (PBS; pH 7,3-7,5) bez Ca i Mg (Lonza, Švicarska). Za utvrđivanje vijabilnosti tretiranih stanica u kulturi korišten je MTT (Sigma, Njemačka) te izopropanol i klorovodična kiselina (Kemig, Hrvatska).

Sve kemikalije korištene u ispitivanjima bile su analitičkog stupnja čistoće. Sve kemikalije i otapala korištena za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC) određivanje bile su HPLC stupnja čistoće. Voda korištena u ispitivanjima bila je pročišćena voda.

## **3.2. METODE**

### **3.2.1. Priprava liposoma**

Konvencionalni (CL), deformabilni (DL), propilenglikol liposomi (PGL) i kationski liposomi (CATL) s uklopljenim AZT-om (ukupne koncentracije lipida 26 mM) pripremljeni su tzv. film metodom (Vanić, 2012). S75 za CL i PGL, S75 i SDCh u omjeru 85:15 (*m/m*) za DL te DPPC i DODAB u molarnom omjeru 7:3 (*n/n*) za CATL, otopljeni su u koncentriranom etanolu u tikvici okruglog dna, zajedno s odgovarajućom količinom AZT-a (15 mg). Etanol je uklonjen uparavanjem pomoću rotacijskog vakuumskeg uparivača (Büchi Rotavapor R-200, Büchi, Labortechnik AG, Švicarska) pri temperaturi 40 °C, odnosno 60 °C za CATL. Nakon uklanjanja etanola, dobiveni tanki lipidni film hidratiziran je dodatkom 5 ml fosfatnog pufera (0,01 M; pH 7,5). Za izradu PGL-a u fosfatni pufer je dodano 10, 20 ili 30 % (*m/m*) propilenglikola (Tablica 4). Dobivene liposomske disperzije ekstrudirane su tri puta kroz polikarbonatne membrane promjera pora 400 nm i još tri puta kroz polikarbonatne membrane promjera pora 200 nm korištenjem ručnog mini-ekstrudera

(LiposoFast Basic, Avestin, Kanada). Ekstruzija CATL-a izvedena je pri 60 °C, prethodnim zagrijavanjem liposomske disperzije i ručnog mini-ekstrudera na vodenoj kupelji.

Prazni liposomi (bez uklopljenog AZT-a), pripremljeni su pri istim uvjetima, ali bez dodatka AZT-a u lipidnu fazu te su korišteni kao kontrola u ispitivanjima citotoksičnosti i antimikrobnog učinka.

**Tablica 4.** Sastav liposoma s AZT-om

Liposomske formulacije	S75 (mg)	SDCh (mg)	PG (mg)	DPPC (mg)	DODAB (mg)	AZT (mg)
CL	100	-	-	-	-	15
DL	85	15	-	-	-	15
PGL-10	100	-	500	-	-	15
PGL-20	100	-	1000	-	-	15
PGL-30	100	-	1500	-	-	15
CATL	-	-	-	73	27	15

CATL, kationski liposomi; CL, konvencionalni liposomi; DL, deformabilni liposomi; DODAB, dimetildioktadecilamonijev bromid; DPPC, dipalmitoilfosfatidilkolin; PG, propilenglikol; PGL, propilenglikol liposomi; S75, sojin lecitin; SDCh, natrijev deoksikolat. Volumen pojedine liposomske disperzije iznosio je 5 ml.

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

Srednji promjer i indeks polidisperznosti liposoma određeni su metodom fotonske korelacijske spektroskopije na uređaju Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Ujedinjeno Kraljevstvo). Uređaj je prije mjerenja kalibriran korištenjem standarda (Duke Scientific Corporation, Sjedinjene Američke Države). Mjerenja su provedena pri temperaturi od 25 °C te kutu raspršenja od 90 °. Liposomski uzorci su netom prije mjerenja razrijeđivani s 1 mM otopinom NaCl, prethodno filtriranom kroz Minisart filtere (Sigma Aldrich, Njemačka) promjera pora 200 nm te sonicirani 10 sekundi na ultrazvučnoj kupelji (Branson 1210, Branson Ultrasonics, Sjedinjene Američke Države).

### 3.2.3. Određivanje zeta potencijala liposoma

Zeta potencijal ispitivanih AZT-liposoma određeni su na uređaju Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, UK). Uređaj je prije mjerenja kalibriran korištenjem standarda s vrijednošću zeta potencijala  $-50 \pm 5$  mV (*Zeta Potential Transfer Standard*, Malvern, UK). Liposomski uzorci su netom prije mjerenja razrjeđivani s 1 mM otopinom NaCl, prethodno filtriranom kroz Minisart filtere promjera pora 200 nm. Mjerenja su provedena pri temperaturi od 25 °C.

### 3.2.4. Određivanje uspješnosti uklapanja AZT-a u liposome

Određivanju sadržaja uklopljenog lijeka (AZT) u liposome prethodilo je odjeljivanje slobodne (neuklopljene) od liposomske (uklopljene) frakcije AZT-a. Pritom su korištene dvije različite metode: centrifugiranje minikolone i ultracentrifugiranje liposomskih disperzija.

#### i) Centrifugiranje minikolone

Minikolone su pripravljene na način da je izdubreni Sephadex G-50 stavljen u plastične brizgalice volumena 2 ml (kojima je uklonjen klip za ubrizgavanje) kako bi se nakon centrifugiranja (Heraeus Megafuge 1.0, Sepatech, UK) pri 2000 okr/min tijekom 3 min dobio suhi stupac gela (minikolona) za odjeljivanje liposoma, visine 1,8 cm. Na tako pripremljenu minikolonu pažljivo je nanoseno 400  $\mu$ l liposomske disperzije. Nakon centrifugiranja (3 min, 2000 okr/min), eluat liposoma s uklopljenim lijekom sakupljen je u kivetu za centrifugu te pohranjen za naknadno određivanje sadržaja lijeka (HPLC). Kolona je potom ispirana s 200  $\mu$ l fosfatnog pufera (pH 7,5), a nakon svakog ciklusa centrifugiranja eluat je uklonjen i pohranjen za daljnju analizu. Frakcije, tj. eluati su prikupljeni dok sav neuklopljeni lijek nije ispran s kolone (Vanić i sur., 2013).

#### ii) Ultracentrifugiranje

Liposomske disperzije centrifugirane su tijekom 60 minuta pri  $100\,000 \times g$  i 20 °C (Beckman Optima LE-80 K Ultracentrifuge, Beckman Coulte, Sjedinjene Američke Države). Nakon odjeljivanja supernatanta (neuklopljeni lijek), pelet je redispergirao u fosfatnom puferu pH 7,5 (liposomi s AZT-om) te je postupak centrifugiranja još jednom ponovljen pri istim uvjetima (60 minuta,  $100\,000 \times g$ , 20 °C) (Palac i sur., 2014a).

Nakon odjeljivanja liposoma s uklopljenim AZT-om od neuklopljenog AZT-a opisanim separacijskim metodama, koncentracija lijeka u pojedinim frakcijama određivana je primjenom HPLC-a (poglavlje 3.2.5.). Liposomske frakcije koje su sadržavale uklopljeni AZT tretirane su metanolom kako bi se otopili lipidi i oslobodio uklopljeni AZT, dok su frakcije sa slobodnim (neuklopljenim) lijekom po potrebi razrjeđivane puferom (pH 7,5).

Za svaki uzorak liposoma izračunata je relativna uspješnost uklapanja AZT-a (%) i analitički prinos (engl. *recovery*) prema navedenim jednadžbama:

$$\text{Uspješnost uklapanja (\%)} = \frac{m_{\text{uklopljeni lijek}}}{m_{\text{uklopljeni lijek}} + m_{\text{slobodni lijek}}} \times 100$$

$$\text{Analitički prinos (\%)} = \frac{m_{\text{uklopljeni lijek}} + m_{\text{slobodni lijek}}}{m_{\text{ukupni lijek}}} \times 100$$

Masa ukupnog lijeka predstavlja masu AZT-a određenu u uzorku prije odjeljivanja uklopljene i neuklopljene frakcije lijeka.

### **3.2.5. Određivanje sadržaja AZT-a metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)**

Sadržaj AZT-a u uzorcima određivan je metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC). Sve analize provedene su na tekućinskom kromatografu koji se sastojao od SCL-10Avp upravljačke jedinice, LC-10Advp binarne pumpe, DGU-14A degazera, termostatirane pećnice CTO-10Avp i SDP-10Avp UV-Vis detektora (Shimadzu, Japan). Za HPLC odjeljivanje korištena je Kinetex C18 kolona unutarnjeg promjera 4,6 mm × 100 mm i veličine čestica 5 μm (Phenomenex, Sjedinjene Američke Države) spregnuta s pretkolonom SecurityGuard ULTRA HPLC C18 (Phenomenex, Sjedinjene Američke Države). Odjeljivanje je provedeno u izokratnim uvjetima koristeći smjesu acetonitrila HPLC čistoće i fosfatnog pufera (pH 7,5) u omjeru 7:3 (V/V) kao mobilnu fazu. Mobilna faza degazirana je prije upotrebe pomoću ultrazvučne kupelji (Branson 1210, Branson Ultrasonics, Sjedinjene Američke Države). Brzina protoka mobilne faze bila je 1 ml u minuti, a temperatura kolone 40 °C. Injektirani volumen iznosio je 20 μl. UV detekcija analita provedena je pri 210 nm. Kvantifikacija je

provedena u koncentracijskom području 1-80 µg/ml. Prikupljanje i obrada podataka provedeni su pomoću programa LCsolution (Shimadzu, Japan).

Primijenjena analitička metoda validirana je u skladu sa smjericama *International Conference on Harmonization*, 2005 (ICH). Određeni su sljedeći validacijski parametri: granica dokazivanja, granica određivanja, linearnost, točnost i preciznost. Linearnost je procijenjena pomoću linearne regresije metodom najmanjih kvadrata koristeći pet različitih koncentracija standardnih otopina (10, 20, 40, 60, 80 µg/ml). Granica dokazivanja i granica određivanja procijenjene su pomoću istih razrjeđenja kao i linearnost, a definirani su kao omjeri signala i šuma koji su jednaki 3, odnosno 10. Točnost metode određena je koristeći tri poznate koncentracije (20, 40 i 80 µg/ml) AZT-a, tako da je svaki uzorak analiziran tri puta. Preciznost u istom danu (ponovljivost) određena je koristeći standardne otopine AZT-a u koncentraciji 40 µg/ml. Za procjenu ponovljivosti mjerenja su provedena šest puta unutar jednog dana. Obrada podataka provedena je pomoću programa Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft).

### **3.2.6. Određivanje elastičnosti liposoma**

Membranska elastičnost liposoma određivana je uz pomoć uređaja vlastoručne izrade (Vanić i sur., 2014a). Ukratko, definirani vanjski tlak (2,5 bara) korišten je kao potisna sila za protiskivanje ekstrudiranih liposomskih disperzija kroz polikarbonatne membrane promjera pora 100 nm. Pritom je mjerena masa liposomske preparacije u gramima (J) koja je ekstrudirana kroz polikarbonatne membrane promjera pore 100 nm ( $r_p$ ) tijekom 5 minuta te srednji promjer liposoma nakon ekstruzije ( $r_v$ ) (nm). Kao mjera elastičnosti liposoma određen je stupanj membranske elastičnosti (E) prema sljedećem izrazu:

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

### **3.2.7. Ispitivanje stabilnosti AZT-liposoma tijekom skladištenja**

Disperzije ekstrudiranih AZT-liposoma (CL, DL, PGL, CATL) pohranjene su u hladnjak pri 4 °C, te im je nakon 2 i 10 mjeseci skladištenja određivan srednji promjer, indeks polidisperznosti i zeta potencijal na način opisan u poglavljima 3.2.2. i 3.2.3.

### **3.2.8. *In vitro* oslobađanje AZT-a iz liposoma**

Ispitivanje oslobađanja AZT-a iz liposoma, kojima je prethodno odijeljen neuklopljeni AZT ultracentrifuganjem (poglavlje 3.2.4.), provedeno je na statičnoj Franzovoj difuzijskoj ćeliji (PermeGear Inc., Sjedinjene Američke Države) površine 3,14 cm<sup>2</sup>. Pritom su korištene celuloza-nitratne membrane (Sartorius Stedim Biotech, Njemačka) učvršćene između donorskog i receptorskog odjeljka, a cijeli je sustav termostatiran pri 32 °C pomoću vodene kupelji i sustava za cirkulaciju termostatirane vode (Hurler i sur., 2012). Određeni volumen AZT-liposoma ili AZT-otopine (6:4, V/V, etanol/demineralizirana voda), koji odgovara masi AZT-a od 1,5 mg, stavljen je u donorski odjeljak. Kao receptorski medij (15 ml) korišten je fosfatni pufer (pH 7,5) uz dodatak 5 % etanola (V/V), kako bi se postigli uvjeti osigurane topljivosti. Receptorski medij je tijekom ispitivanja miješan pomoću magnetskog mješača (200 rpm). Uzorci receptorskog medija (0,5 ml) uzimani su u odgovarajućim vremenskim intervalima (svakih 30 minuta tijekom prvih 6 sati te potom nakon 24 sata) i nadomještani termostatiranim svježim medijem (fosfatni pufer, pH 7,5). Sadržaj oslobođenog AZT-a određivan je HPLC metodom.

### **3.2.9. *Ex vivo* ispitivanje permeabilnosti AZT-a u kožu**

Permeabilnost liposomskog AZT-a, prethodno odijeljenog od neuklopljenog AZT-a, ispitivana je *ex vivo* na statičnoj Franzovoj difuzijskoj ćeliji. Pritom je korištena svinjska koža (dorzalna strana uške) dobivena iz lokalne klaonice. Unutar tri sata od pogubljenja životinja uzorci svinjske kože su transportirani i obrađeni kako bi se uklonio višak dlake brijanjem te je kirurškim priborom odijeljena koža (dermis s epidermisom) od potkožnog vezivnog tkiva. Dobiveni uzorci kože, veličine otprilike 4 × 4 cm i debljine 1 mm, isprani su fiziološkom otopinom, lagano posušeni staničevinom, umotani u aluminijsku foliju te potom naglo smrznuti pri -70 °C.

Neposredno prije ispitivanja permeabilnosti uzorci kože su odmrznuti pri sobnoj temperaturi te isprani fosfatnim puferom (pH 7,5). Uzorci kože potom su učvršćeni između donorskog i receptorskog odjeljka Franzove difuzijske ćelije (površine 3,14 cm<sup>2</sup>), s rožnatim slojem okrenutim prema donorskom odjeljku. Receptorski odjeljak ispunjen je s 15 ml fosfatnog pufera (pH 7,5), koji je kontinuirano miješan pomoću magnetskog mješača (200 okr/min), a cijeli je sustav termostatiran pri 37±1 °C kako bi se osigurala temperatura na površini kože između 32 i 34 °C. Uzorci AZT-liposoma ili AZT-otopine (kontrola), koji su



sadržavali 1 mg AZT-a, stavljeni su u donorski odjeljak, koji je potom prekriven parafilmom (osim za DL). Uzorci receptorskog medija (0,5 ml) uzimani su u odgovarajućim vremenskim intervalima (nakon 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 24 sata), te nadomještani termostatiranim svježim medijem. Nakon 24 sata tekući sadržaj u donorskom odjeljku (ukoliko je bio prisutan) uklonjen je pipetiranjem, stavljen u odmjernu tikvicu (10 ml), a površina kože pažljivo je isprana metanolom (2 ml). Oba su uzorka zatim sjedinjena i dopunjena metanolom do 10 ml. Taj sjedinjeni uzorak poslužio je za određivanje AZT-a koji nije penetrirao u kožu (nepenetrirana frakcija AZT-a). Uzorak kože je potom izrezan na veoma sitne dijelove, a AZT deponiran u koži ekstrahiran je metanolom tijekom 4 sata uz lagano protresivanje (50 okr/min) (Environmental Shaker-Incubator ES-20/60, Biosan, Latvija). Sadržaj AZT-a u svim je uzrocima određen HPLC metodom (poglavlje 3.2.5.). Eksperimenti su provedeni u triplikatu.

### **3.2.10. Mikrobiološka ispitivanja AZT-liposoma**

Antimikrobni učinak AZT-liposoma ispitan je na bakterijskom soju *S. aureus* ATCC 29213 i pet MRSA sojeva (MFBF 10674, 10676, 10677, 10679, 10680) iz Zbirke mikroorganizama Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

#### **Priprema inokuluma**

Za pripremu inokuluma korištene su 24-satne bakterijske kulture, uzgojene aerobno u MHB-u pri temperaturi 37 °C (Sanyo, MIR-553, Japan). Bakterije su potom suspendirane u fiziološkoj otopini (0,9 % NaCl) do koncentracije stanica od 0,5 MacFarlanda (određeno pomoću nefelometra BioMerieux, Francuska), što odgovara koncentraciji bakterijskih stanica od  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml.

#### **Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK)**

Određivanje MIK-ova na planktonskim bakterijama provedeno je metodom dvostruke mikrodilucije u MHB-u, u skladu s NCCLS smjernicama (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, NCCLS 2007) uz kolorimetrijsko određivanje vijabilnosti pomoću TTC reagensa pri valnoj duljini 540 nm. Kolorimetrijska metoda koja koristi TTC identična je metodi mikrodilucije u bujonu opisanoj u NCCLS smjernicama s obzirom na reagense, pripremu medija, inokulum i vrijeme inkubacije, uz razliku što je TTC reagens dodan u jažice

na kraju inkubacijskog vremena i to tako da konačna koncentracija u svakoj jažici bude 0,5 mg/ml.

Korištene su mikrotitarske pločice s 96 jažica (Microplate 96 W, Greiner Bio-One, Njemačka). U svaku jažicu, osim u prvi stupac, dodano je po 100  $\mu$ l MHB-a. Potom je u prvu jažicu dodano 200  $\mu$ l svake od testiranih preparacija AZT-liposoma ili AZT-otopine, koncentracije 512  $\mu$ g/ml. Dvostrukim serijskim razrjeđenjem dobivene su koncentracije ispitivanih formulacija u rasponu koncentracija (ekvivalenta AZT-a) od 0,25  $\mu$ g/ml do 256  $\mu$ g/ml. Prethodno priređeni bakterijski inokulumi razrjeđeni su u MHB-u do koncentracije  $1 \times 10^6$  CFU/ml, nakon čega je po 100  $\mu$ l razrijeđenog inokuluma dodano u svaku jažicu mikrotitarske pločice te je konačna koncentracija bakterija u pojedinoj jažici iznosila  $5 \times 10^5$  CFU/ml. Mikrotitarske pločice s uzorcima inkubirane su 24 sata pri 37 °C. Bujon s kulturom ispitivanih bakterija služio je kao pozitivna kontrola (kontrola rasta), a čisti bujon bez dodatka bakterija kao negativna kontrola. Budući da je otopina AZT-a za određivanje MIK-ova pripremljena u smjesi koncentriranog etanola i vode (6/4, V/V), kao kontrola za AZT-otopinu (kontrola otapala) korištena je smjesa koncentriranog etanola i vode (6/4, V/V), u koncentracijskom rasponu koji je ekvivalentan sadržaju organskog otapala u AZT-otopini.

Nakon 24-satne inkubacije ploča, po 20  $\mu$ l vodene otopine TTC-a koncentracije 5 mg/ml dodano je u svaku jažicu. Budući da žive bakterijske stanice metaboliziraju TTC reagens do crvenog produkta formazana, u jažicama u kojima postoji bakterijski rast uočava se crveno obojenje koje izostaje u jažicama u kojima nema bakterijskog rasta. Apsorbancija formazana koja ukazuje na prisustvo bakterija određivana je spektrofotometrom pri valnoj duljini od 540 nm (iEMS Reader, Labsystems). MIK je određen kao najmanja koncentracija liposomski uklopljenog ili slobodnog AZT-a koja je inhibirala vidljivi bakterijski rast nakon 24-satne inkubacije s tretirajućim agensima. Ispitivanja za svaki soj stafilokoka i svaku formulaciju provedena su u kvadriplikatu.

Na isti (gore opisan) način testirani su i liposomi bez uklopljenog lijeka (tzv. „prazni” liposomi) kako bi se utvrdilo pokazuju li (fosfo)lipidi, surfaktanti i suotapala korištena za pripravu liposoma potencijalni inherentni antimikrobni učinak na ispitivanim bakterijskim sojevima.

## **Određivanje minimalne biofilm-inhibirajuće koncentracije (MBIK) i minimalne biofilm-eliminirajuće koncentracije (MBEK)**

*In vitro* antibiofilm učinci AZT-liposoma, tj. inhibicija stvaranja i razaranje formiranih biofilмова ispitivanih *S. aureus* sojeva, određivani su primjenom metode koju su izvorno opisali Walencka i suradnici (2005), a modificirali Kifer i suradnici (2016). MBIK i MBEK vrijednosti su utvrđene korištenjem MTT testa.

*S. aureus* ATCC 29213 i MRSA sojevi su uzgajani u MHB-u tijekom 24 sata pri 37 °C, a potom su priređena razrjeđenja od  $1 \times 10^6$  CFU/ml u 5 ml tekućeg TSB-a obogaćenog s 0,25 % D-(+) glukoze (TSBGlc). Prekonoćne kulture (24 sata, 37 °C) razrijeđene su u omjeru 1:20 u TSBGlc-u. Konačni volumen od 100 µl bakterijskih inokuluma dodan je u svaku jažicu mikrotitarske pločice s 96 jažica (Nunclon Surface; Nunc, Thermo Fisher Scientific, Sjedinjene Američke Države) te su ploče inkubirane 24 sata pri 37 °C kako bi se u jažicama formirao biofilm.

Nakon 24-satne inkubacije i formiranja biofilma, aspiracijom je uklonjen medij iz jažica, a one su potom veoma pažljivo isprane fiziološkom otopinom kako se ne bi oštetio formirani biofilm na dnu jažice.

Za ispitivanje antibiofilm učinka, na biofilm je dodano po 100 µl AZT-liposoma ili AZT-otopine, u rasponu koncentracija od 0,5 µg/ml do 512 µg/ml (AZT ekvivalent). Testirana razrjeđenja dobivena su razrjeđivanjem formulacija s TSB-om do ciljane koncentracije AZT-a. U kontrolne jažice dodan je čisti TSB. Budući da je AZT-otopina za određivanje MBEK-ova pripremljena u smjesi koncentriranog etanola i vode (6/4, V/V), kao kontrola otapala korištena je smjesa etanol/voda (6/4, V/V) u koncentracijskom rasponu koji je ekvivalentan sadržaju organskog otapala u AZT-otopini. Ploče su potom inkubirane 24 sata pri 37 °C, nakon čega je medij s tretirajućim agensima aspiriran. Za vizualizaciju biofilma korištena je modificirana metoda po Kairu (Kairo i sur., 1999; Walencka i sur., 2005). Za detekciju živih stanica u biofilmu korišten je MTT. U svaku jažicu je dodano po 100 µl otopine MTT-a u PBS-u (0,1 mg/ml). Ploče su zatim inkubirane 2,5 sata na 37 °C. Na kraju inkubacijskog perioda medij s reagensom je zamijenjen sa 100 µl DMSO-a. Ploče su potom inkubirane 15 minuta pri sobnoj temperaturi uz lagano protresivanje kako bi se nastali ljubičasti kristali formazana potpuno otopili. Apsorbancija formazana u jažicama s biofilmom određena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 540 nm. Vijabilnost biofilma izražena je kao postotak preživjelih stanica određenog soja bakterije, odnosno apsorbancija formazana u jažicama koje su tretirane ispitivanim formulacijama u odnosu prema apsorbanciji

netretiranog biofilma. MBEK je određen kao najmanja koncentracija liposomskog ili slobodnog AZT-a kod koje nije detektirana vijabilnost bakterija u biofilmu nakon 24 sata inkubacije. Ispitivanja su provedena u kvadriplikatu.

Za određivanje MBIK-ova inokulumi bakterija priređeni su kao i za određivanje MBEK-ova, u TSBGlc bujonu (Kifer i sur., 2016). U jažice mikrotitarske pločice s 96 jažica (Nunclon Surface, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Sjedinjene Američke Države) dodano je po 50  $\mu$ l ispitivane formulacije (AZT-liposomi ili AZT-otopina), u rasponu koncentracija od 0,25  $\mu$ g/ml do 256  $\mu$ g/ml AZT-a (koncentracijski nizovi priređeni su razrjeđivanjem AZT-liposoma ili AZT-otopine s TSBGlc bujonom). U kontrolne jažice dodano je 50  $\mu$ l čistog TSBGlc bujona ili odgovarajuća razrjeđenja smjese koncentriranog etanola i vode (6/4, V/V) u TSBGlc bujonu (kontrola otapala). Potom je u sve jažice dodano po 50  $\mu$ l prethodno priređenih suspenzija bakterijskih sojeva te su ploče inkubirane aerobno tijekom 24 sata pri 37 °C. Nakon aspiracije medija u svaku jažicu dodano je po 50  $\mu$ l otopine MTT-a u PBS-u (0,1 mg/ml) te su ploče inkubirane 2,5 sata pri 37 °C. Na kraju inkubacijskog perioda u svaku jažicu je dodano 150  $\mu$ l DMSO-a, a ploče su potom inkubirane 15 minuta pri sobnoj temperaturi uz lagano protresivanje. Apsorbancija formazana u jažicama s biofilmom određena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 540 nm. MBIK je određen kao najmanja koncentracija liposomskog ili slobodnog AZT-a koja je inhibirala vidljivi bakterijski rast i formiranje biofilma nakon 24 sata inkubacije.

Bujon s kulturom ispitivanih bakterija služio je kao pozitivna kontrola (kontrola rasta), a čisti bujon bez dodatka bakterija kao negativna kontrola. Budući da je otopina AZT-a za određivanje MBIK-ova pripremljena u smjesi koncentriranog etanola i vode (6/4, V/V), kao kontrola za otopinu AZT-a (kontrola otapala) korištena je smjesa koncentriranog etanola i vode (6/4, V/V), u koncentracijskom rasponu koji je ekvivalentan sadržaju organskog otapala u AZT-otopini.

Na isti (gore opisan) način testirani su i liposomi bez uklopljenog lijeka (tzv. „prazni” liposomi) kako bi se utvrdilo pokazuju li (fosfo)lipidi, surfaktanti i suotapala korištena za pripravu liposoma potencijalni inherentni antibiofilm učinak na ispitivanim bakterijskim sojevima.

Sva ispitivanja su provedena u kvadriplikatu.

### **3.2.11. Ispitivanje *in vitro* citotoksičnosti AZT-liposoma**

#### **Stanične linije i uvjeti uzgoja**

U ispitivanjima citotoksičnosti AZT-liposoma korištena su dva tipa humanih staničnih linija; HaCaT (keratinociti kože) i MJ90hTERT (fibroblasti kože). Stanice su uzgojene u skladu s protokolom kojeg preporučuje proizvođač te su nasađivane u sterilnim uvjetima u posude za uzgoj od 25, 75 i 150 cm<sup>2</sup>. Uzgajane su u inkubatoru (Sanyo CO<sub>2</sub> incubator, Japan) pri 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> i 95 % relativne vlažnosti. Za uzgoj oba tipa humanih stanica korišten je DMEM hranidbeni medij u koji je dodano 1 % smjese antibiotika penicilina, streptomicina i amfotericina B te 10 % FBS-a. Nakon što bi stanice postigle 80-90 % konfluentnosti, presađivane su u nove tikvice. Prilikom presađivanja, hranidbeni medij je odsisan te su stanice isprane s PBS-om koji je potom uklonjen. Nakon toga su stanice inkubirane s 0,02 %-tnom (*m/V*) otopinom EDTA pri 37 °C tijekom 3 minute. Uslijedila je tripsinizacija 0,125 %-tnom (*m/V*) otopinom tripsina za HaCaT stanice, odnosno 0,025 %-tnom (*m/V*) otopinom tripsina za fibroblaste. Nakon odvajanja stanica od podloge učinak tripsina inhibiran je dodatkom hranidbenog medija (DMEM/10 % FBS) u volumnom omjeru 3:2 (hranidbeni medij:tripsin). Tijekom uzgoja stanica hranidbeni medij je mijenjan svaka dva dana. Rast i stanje stanica praćeni su invertnim mikroskopom (Primovert, Carl Zeiss AG, Njemačka).

#### **Ispitivanje *in vitro* citotoksičnosti: MTT test**

Za određivanje citotoksičnosti AZT-liposoma, stanice su nasađene na ploče s 96 jažica (Nunclon Surface; Nunc, Thermo Fisher Scientific, Sjedinjene Američke Države) pri gustoći od  $15 \times 10^3$  stanica/jažici. Za postizanje odgovarajuće konfluentnosti, nakon nasađivanja, fibroblastima je bilo potrebno 72 sata inkubacije, a HaCaT stanicama 48 sati inkubacije. Nakon postizanja konfluentnosti, stanice su bile spremne za tretiranje s ispitivanim formulacijama.

AZT-liposomi i AZT-otopina razrijeđeni su DMEM medijem (bez dodatka FBS-a) kako bi se pripravili uzorci konačne koncentracije AZT-a od 0,25 µg/ml do 64 µg/ml. Na opisani način pripremljeni su i kontrolni uzorci, liposomi bez uklopljenog AZT-a, tj. „prazni” liposomi te otapalo korišteno za pripravu AZT-otopine. Nakon inkubacije i postizanja odgovarajuće konfluentnosti, uklonjen je hranidbeni medij iz jažica sa stanicama, jažice su nježno isprane PBS-om, pazeći da se ne ošteti sloj stanica na dnu jažice, te su stanice potom

tretirane s po 100  $\mu$ l uzorka, tijekom 24 sata. Negativna kontrola bile su stanice inkubirane s DMEM medijem. Nakon 24 sata ispitivani agensi su odsisani, a stanicama je vraćen svježi DMEM s 10 % FBS-a (100  $\mu$ l po jažici) u kojem su inkubirane iduća 24 sata, nakon čega je im je vijabilnost određena kolorimetrijski, MTT testom.

MTT test je kolorimetrijski test za ispitivanje metaboličke aktivnosti stanica. Otopina MTT-a žute boje prelazi u ljubičastu boju zbog nastalog, u vodi netopljivog, formazana. Formazan je produkt redukcije MTT-a u stanicama. Intenzitet boje ljubičastih kristala formazana mjeri se spektrofotometrijski, a izmjerena apsorbancija je izravno proporcionalna koncentraciji formazana te predstavlja metaboličku aktivnost stanice, odnosno mjeru vijabilnosti stanica. Otopina MTT-a koncentracije 5  $\mu$ g/ml pripravljena je u PBS-u i dodana je u medij u omjeru 1:10 (10  $\mu$ l otopine prema 100  $\mu$ l medija). Tretirane stanice su najprije inkubirane 120 minuta pri 37 °C nakon čega im je odsisan medij i dodan kiseli izopropanol (100  $\mu$ l/jažici), koji je pripremljen dodatkom 100  $\mu$ l koncentrirane klorovodične kiseline na 30 ml izopropanola. Apsorbancija je mjerena pri valnoj duljini od 570 nm (Victor, PerkinElmer, Sjedinjene Američke Države). Metabolička aktivnost tretiranih stanica izražena je kao relativna vrijednost, u odnosu na metaboličku aktivnost kontrolnih netretiranih stanica koje su inkubirane u DMEM mediju.

### **3.2.12. Priprava kitozanske podloge i uklapanje liposoma**

Viskoelastična podloga za uklapanje AZT-liposoma izrađena je dispergiranjem 2,5 g kitozana visoke molekulske mase u 37,5 g 3,5 %-tne otopine mliječne kiseline uz intenzivno ručno miješanje staklenim štapićem te soniciranje na ultrazvučnoj kupelji (Branson 1210, Branson Ultrasonics, Sjedinjene Američke Države) tijekom 60 minuta. Nakon toga je dodan propilenglikol (10 g) uz intenzivno miješanje staklenim štapićem te pročišćena voda u obrocima do ukupne mase od 100 g. Tako pripravljena disperzija kitozana pokrivena je parafilmom i ostavljena da bubri tijekom iduća 24 sata pri sobnoj temperaturi. Količina mliječne kiseline za pripravu kitozanske podloge pažljivo je optimizirana kako bi se osiguralo potpuno bubrenje kitozana, ali uz postizanje prihvatljivog pH podloge (pH ~ 5).

AZT-liposomi, kod kojih je prethodno provedeno odjeljivanje neuklopljenog AZT-a, ručno su umiješani u izvornu kitozansku podlogu u koncentraciji 30 % (*m/m*; liposomi/podloga). Na isti način pripravljena je i kontrola koja je umjesto AZT-liposoma sadržavala AZT-otopinu uklopljenu u kitozansku podlogu u istoj koncentraciji AZT-a i istom masenom udjelu kao i formulacije liposomi-u-podlozi (30 %, *m/m*). Svi uzorci podloga

(liposomi-u-podlozi, kontrola) su prije daljnjih ispitivanja podvrgnuti centrifugiranju (3000 okr/min, 3 min) kako bi se odstranio uklopljeni zrak.

### **3.2.13. *In vitro* oslobađanje AZT-a iz formulacija liposomi-u-podlozi**

*In vitro* ispitivanje oslobađanja AZT-a iz različitih liposomskih formulacija uklopljenih u kitozansku podlogu provedeno je pomoću statične Franzove difuzijske ćelije, površine 3,14 cm<sup>2</sup>. Pritom su korištene celuloza-nitratne membrane (Sartorius Stedim Biotech, Njemačka), a cijeli je sustav termostatiran pri 32 °C pomoću vodene kupelji i sustava za cirkulaciju termostatirane vode. Određena masa pripravka liposomi-u-podlozi, koja je odgovarala približno 1 mg AZT-a, nanesa je u ravnomjernom sloju na prethodno nakvašenu membranu u donorskom odjeljku. Kao receptorski medij (15 ml) korišten je fosfatni pufer pH 7,5 uz dodatak 5 % etanola, kako bi se postigli uvjeti osigurane topljivosti. Receptorski medij je tijekom cijelog eksperimenta miješan pomoću magnetskog mješača (200 okr/min). Uzorci receptorskog medija (0,5 ml) uzimani su u odgovarajućim vremenskim intervalima (svakih 30 minuta tijekom prvih 6 sati te nakon 24 sata) i nadomještani termostatiranim svježim fosfatnim puferom (pH 7,5). Sadržaj oslobođenog AZT-a određen je HPLC metodom.

Pri istim uvjetima, provedena su i ispitivanja s kontrolom, koja je umjesto AZT-liposoma sadržavala ekvivalentnu količinu AZT-otopine (6:4, V/V, etanol/voda).

### **3.2.14. Mikrobiološka ispitivanja formulacija liposoma-u-podlozi**

Za procjenu antimikrobne aktivnosti terapijskog sustava liposoma-u-podlozi korištena je *in vitro* metoda, tzv. agar-difuzijski test. Antimikrobni učinak ispitan je na bakterijskom soju *S. aureus* ATCC 29213 i pet MRSA sojeva (MFBF 10674, 10676, 10677, 10679, 10680) iz Zbirke mikroorganizama Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Inokulumi ispitivanih bakterijskih sojeva u MHB-u, koncentracije stanica  $1 \times 10^8$  CFU/ml pripremljeni su kako je opisano u poglavlju 3.2.10. Inokulumi su potom razrijeđeni fiziološkom otopinom u omjeru 1:10 te ravnomjerno dispergirani u prethodno rastaljenom MHA-u, ohlađenom na odgovarajuću temperaturu (~ 37 °C). Po 20 ml ovako priređenog MHA izliveno je u sterilne Petrijeve zdjelice (100 × 15 mm) na ravnoj plohi te ostavljeno da se ohladi i skrutne. Pomoću sterilnih čeličnih prstenova na svakoj je ploči u agaru izbušeno 6 jažica promjera 6 mm. U tako dobivene jažice dodano je približno 0,1 g

ispitivanih uzoraka: liposomi-u-podlozi, kontrola, izvorna kitozanska podloga te smjesa otapala etanol/voda (6/4, V/V) uklopljena u kitozansku podlogu (30 %, *m/m*). Nakon dodavanja tretirajućih agenasa, ploče su stavljene u hladnjak na 1 sat (2-8 °C), a potom u inkubator 24 sata pri 37 °C u aerobnim uvjetima. Nakon 24-satne inkubacije, uočen je konfluentni bakterijski rast na ploči, a zone inhibicije bakterijskog rasta izmjerene su u milimetrima. Kako bi bile usporedive, izmjerene zone inhibicije korigirane su s obzirom na točan sadržaj AZT-a u formulacijama, odnosno točnu odvagu podloge koja je nanescena u jažicu. Testovi su provedeni u duplikatu.

Kako bi se antimikrobni učinak kitozanskih podloga s uklopljenim AZT-liposomima usporedio s antimikrobnim učinkom AZT-liposoma, agar-difuzijskom metodom testirane su i liposomske disperzije, tako što je u jažice dodano po 100 µl AZT-liposoma ili AZT-otopine ekvivalentne koncentracije AZT-a kao u liposomskim uzorcima. U kontrolnu jažicu dodano je 100 µl smjese koncentriranog etanola i vode (6/4, V/V).

### **3.2.15. Teksturna analiza formulacija liposomi-u-podlozi**

Teksturna svojstva kitozanske podloge s uklopljenim AZT-liposomima određena su teksturnim analizatorom (Texture Analyzer TA.XT Plus, Stable Micro Systems, Ujedinjeno Kraljevstvo). Svaka od formulacija liposomi-u-podlozi (približne mase 50 g) stavljena je u cilindrični spremnik. Disk promjera 40 mm protisnut je kroz ispitivanu formulaciju (10 mm, brzinom 1 mm u sekundi) i potom uklonjen. Svaki uzorak testiran je 5 puta pri jednakim eksperimentalnim uvjetima te im je određena čvrstoća, kohezivnost i adhezivnost.

Pri istim uvjetima provedena su ispitivanja izvorne kitozanske podloge i kontrole, koja je umjesto liposoma sadržavala otopinu AZT-a uklopljenu u kitozansku podlogu.

### **3.2.16. Reološka ispitivanja formulacija liposomi-u-podlozi**

Reološka karakterizacija formulacija liposomi-u-podlozi provedena je na modularnom reometru Physica MCR 301 (Anton Paar, Austrija) koristeći mjerno tijelo PP25 i temperaturnu ploču P-PTD200. Ispitivanja su također provedena s izvornom kitozanskom podlogom i kontrolom (AZT-otopina uklopljena u podlogu).



### **Ispitivanje profila viskoznosti**

Profili viskoznosti izmjereni su u rasponu brzina smicanja  $0,01-1000 \text{ s}^{-1}$ , na 15 mjernih točaka uz logaritamski postavljeno trajanje u svakoj točki (100 do 1 s), te mjerno tijelo PP25 ( $d=1 \text{ mm}$ ). Svi su uzorci mjereni pri temperaturi  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Kao relevantni raspon viskoznosti uzet je onaj unutar brzina smicanja  $0,1-1000 \text{ s}^{-1}$ , kroz 12 točaka.

### **Test adhezivnosti**

Ispitivanje adhezivnosti različitih formulacija liposomi-u-podlozi provedeno je tzv. „*tack*“ testom pri  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Test je podijeljen na 3 intervala. U prvom se mjerno tijelo spusti do uzorka, u drugom ga na 50 sekundi pritisne silom od 10 N te se potom, u trećem intervalu, odvaja od uzorka brzinom  $5 \text{ mm/s}$ .

### **3.2.17. Statistička analiza podataka**

Za statističku analizu i usporedbu primijenjen je t-test (dvije grupe podataka), odnosno jednosmjerna analiza varijance (engl. *one-way ANOVA test*) nadopunjena multiparametrijskim Tukey-evim post-hoc testom (tri ili više grupa podataka). Razina značajnosti ( $\alpha$ ) u svim testovima bila je 0,05. Obrada podataka provedena je pomoću programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Sjedinjene Američke Države).

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

## 4.1. Fizičko-kemijska karakterizacija liposoma

(Fosfo)lipidni sastav značajno utječe na fizičko-kemijska svojstva liposoma, koja se odražavaju na njihovu terapijsku učinkovitost. Stoga je prvi korak u razvoju liposomskih formulacija njihova evaluacija i optimizacija s obzirom na sastav, odabir i koncentraciju (fosfo)lipida, surfaktanta i suotapala, koji pak utječu na veličinu liposoma, površinski naboj, membransku elastičnost i uspješnost uklapanja lijeka.

### 4.1.1. Veličina i površinski naboj AZT-liposoma

CL, DL, PGL i CATL su pripremljeni film metodom, pri čemu je koncentracija lijeka (3 mg/ml) i (fosfo)lipida (20 mg/ml) bila jednaka za sve preparacije. Srednji promjer, indeks polidisperznosti i zeta potencijal određeni su fotonskom korelacijskom spektroskopijom 24 sata nakon pripreme liposoma (prije ekstruzije) te odmah nakon ekstruzije liposomskih preparacija.

**Tablica 5.** Veličina i površinski naboj AZT-liposoma

Liposomska formulacija	Srednji promjer (nm)		Indeks polidisperznosti		Zeta potencijal (mV)*
	Prije ekstruzije	Nakon ekstruzije	Prije ekstruzije	Nakon ekstruzije	
CL	1135 ± 62	165 ± 3	1,00 ± 0,00	0,12 ± 0,02	-43,9 ± 0,7
DL	972 ± 20	132 ± 2	0,96 ± 0,12	0,14 ± 0,02	-45,8 ± 0,5
PGL	1089 ± 8	143 ± 1	1,00 ± 0,00	0,09 ± 0,01	-48,4 ± 1,9
CATL	1628 ± 35	217 ± 2	1,00 ± 0,00	0,43 ± 0,10	+62,2 ± 1,0

CATL, kationski liposomi; CL, konvencionalni liposomi; DL, deformabilni liposomi; PGL, propilenglikol liposomi. Prikazane vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost ± S.D. (n=3, srednji promjer i indeks polidisperznosti; n=6, zeta potencijal). \*Zeta potencijal liposomskih disperzija izmjeren je nakon ekstruzije.

Metodom hidratacije fosfolipidnog filma (film metoda) dobivaju se veliki multilamelarni liposomi visokog indeksa polidisperznosti (Torchilin i Weissig, 2003). Kao što je prikazano u Tablici 5, izvorno pripremljeni AZT-liposomi bili su većeg srednjeg promjera (oko 1  $\mu\text{m}$ ), uz izrazito širok raspon veličina (indeks polidisperznosti  $\geq 0,96$ ). Kako bi se homogenizirale disperzije AZT-liposoma i postigla veličina liposoma prikladna za dermalnu primjenu (Verma i sur., 2003) provedena je ekstruzija izvorno pripremljenih liposomskih disperzija kroz membrane promjera pora 400 nm (1  $\times$ ) i 200 nm (3  $\times$ ).

Ekstruzija je rezultirala statistički značajnim smanjenjem srednjeg promjera i indeksa polidisperznosti (t-test,  $P < 0,05$ ) za svaki tip AZT-liposoma. Srednji promjeri ekstrudiranih CL-a, DL-a i PGL-a bili su u rasponu 132-165 nm, pri čemu su, očekivano, DL bili najmanji. Najveći srednji promjer imali su CATL (217 nm), što se može pripisati njihovom sastavu i temperaturi pri kojoj su izvedena mjerenja veličine i indeksa polidisperznosti (25 °C). Naime, CATL sadrži DPPC i DODAB koji doprinose višoj  $T_c$  lipidnih dvoslojeva (Benatti i sur., 2001; Ulrich, 2002) u odnosu na S75 korišten za izradu ostalih AZT-liposoma.

Poznavanje zeta potencijala liposoma je od velike važnosti jer o naboju na površini liposoma ovisi interakcija liposoma i lijeka koji se želi uklopiti, ponašanje liposoma u *in vivo* uvjetima te stabilnost pripremljenih liposomskih disperzija (Torchilin i Weissig, 2003). Izmjerene vrijednosti zeta potencijala liposoma (Tablica 5) bile su u skladu s nabojem (fosfo)lipida korištenih za pripravu pojedinih liposomskih preparacija. Vrijednosti zeta potencijala izmjerene za CL, DL i PGL bile su izrazito negativne (-43 do -48 mV), što je očekivano s obzirom na (fosfo)lipidni sastav preparacija, u kojima dominira negativno nabijeni sojin lecitin, S75. Slični rezultati dobiveni su uklapanjem hidrofilnog lijeka (diklofenaknatrij) u liposome istog lipidnog sastava (Palac i sur., 2014a).

Negativno nabijeni (anionski) liposomi pokazali su se prikladnijim nosačima za dermalnu dostavu uklopljenog lijeka u kožu u usporebi s pozitivno nabijenim i neutralnim liposomima (Gillet i sur., 2011a). S druge strane, pozitivno nabijeni (kationski) liposomi pokazali su bolje antibakterijske učinke na planktonske bakterije i bakterije u biofilmu od neutralnih i anionskih liposoma (Dong i sur., 2015; Drulis-Kawa i sur., 2009; Robinson i sur., 2001). Kationski liposomi u ovom istraživanju (CATL) su imali vrijednosti zeta potencijala od približno +60 mV, što se pripisuje prisustvu kationskog lipida (DODAB) u lipidnom dvosloju.

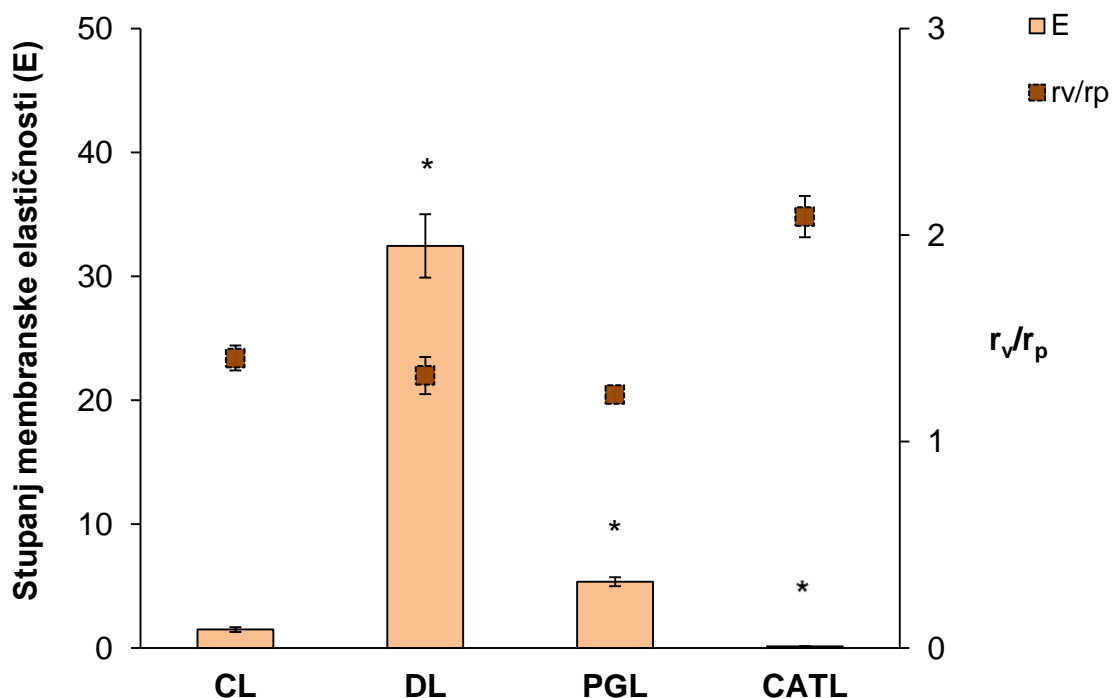
#### 4.1.2. Elastičnost/rigidnost liposoma

Termodinamičko stanje (fosfo)lipidnih dvoslojeva utječe na stabilnost liposomskih formulacija, profil oslobađanja uklopljenog lijeka, interakciju liposoma s bakterijama i biofilmovima te učinkovitost dopreme uklopljenog lijeka u kožu (Martin i sur., 2015). Iz navedenih je razloga određivanje stupnja elastičnosti fosfolipidnih dvoslojeva od posebne važnosti u karakterizaciji liposoma namijenjenih dermalnoj primjeni antimikrobnih lijekova.

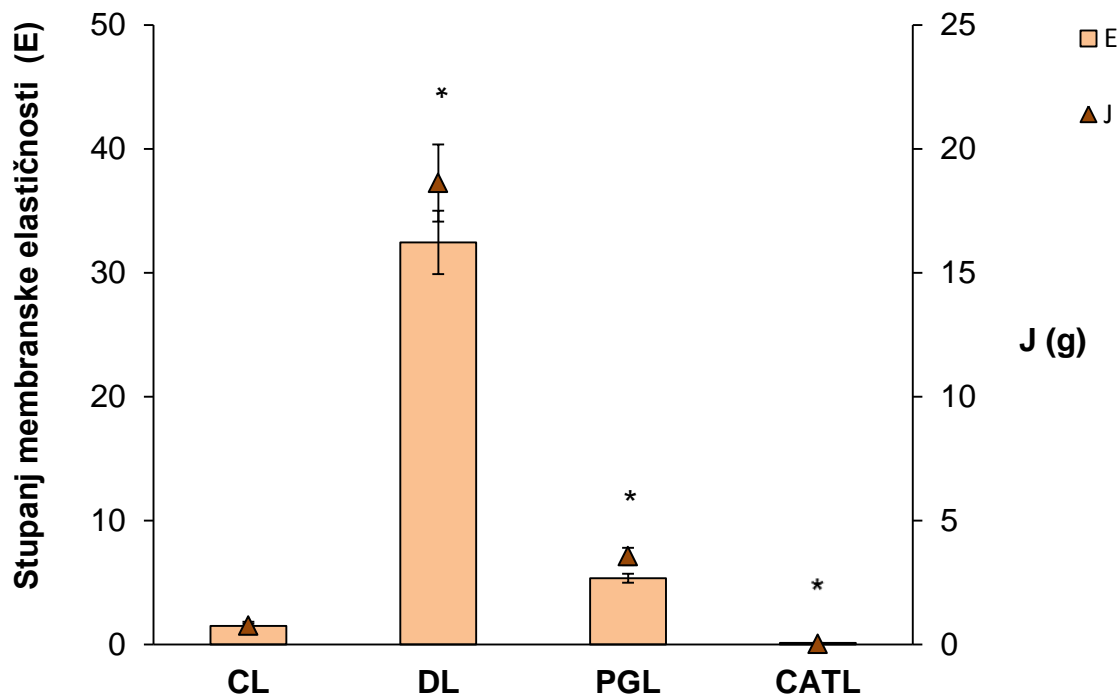
Rezultati ispitivanja prikazani Slikama 4 i 5 pokazuju da na stupanj membranske elastičnosti (E) značajnije utječe količina (masa) ekstrudiranih liposoma (J) u određenom vremenskom intervalu negoli prosječan promjer vezikula ( $r_v$ ) zabilježen netom nakon protiskivanja liposomskih formulacija kroz membrane određenog promjera pora (100 nm). Usporedbom različitih AZT-liposoma, utvrđen je najveći stupanj elastičnosti (E) za DL (32,5). Štoviše, E vrijednost za DL bila je 6 puta veća od one izmjerene za PGL, odnosno čak 21 put veća od E vrijednosti za CL (Slika 4). Značajno veće E vrijednosti za elastične liposome u odnosu na konvencionalne liposome, dobivene su i u ranije provedenom istraživanju liposomskih formulacija s uklopljenim diklofenaknatrijem. Pritom valja naglasiti da je za elastične AZT-liposome (DL, PGL) razlika u dobivenim E vrijednostima bila mnogo veća nego za deformabilne i propilenglikol liposome s uklopljenim diklofenaknatrijem (Palac i sur., 2014a). Nasuprot elastičnim AZT-liposomima (DL, PGL), CL i CATL su bili karakterizirani čvršćim (rigidnijim) dvoslojevima, s E vrijednostima 1,5 (CL), odnosno 0,15 (CATL).

Razlike u elastičnosti/rigidnosti (fosfo)lipidnih dvoslojeva ispitivanih AZT-liposoma u direktnoj su vezi s njihovim sastavom. Naime, DL uz S75 sadrži 15 % SDCh-a (*m/m*), jednolančanog surfaktanta koji se ugrađuje u fosfolipidni dvosloj, čineći ga fluidnijim, odnosno elastičnijim (Cevc i Blume, 1992, 2001; Palac i sur., 2014a). Sličan učinak postignut je i dodatkom propilenglikola, čije se molekule dijelom interkaliraju u lipidni dvosloj (Zhao i sur., 2013) čineći ga elastičnijim u odnosu na konvencionalne liposome istog fosfolipidnog sastava (Palac i sur., 2014a; Vanić i sur., 2014a). S75 koji se nalazi u sastavu CL-a, PGL-a i DL-a, ima  $T_c$  značajno nižu od sobne ili fiziološke temperature (New, 1990), zahvaljujući prisustvu nezasićenih masnih kiselina u molekulama fosfolipida. S druge strane, DPPC i DODAB (u CATL-u) su lipidi s visokim udjelom dugolančanih zasićenih masnih kiselina, zbog čega imaju veću temperaturu faznog prijelaza (41 °C, odnosno 45°C) te su pri sobnoj i fiziološkoj temperaturi krutine (Benatti i sur., 2001; Ulrich, 2002). Uzevši u obzir te

činjenice, CATL je očekivano pokazao najniži stupanj membranske elastičnosti od svih ispitivanih AZT-liposoma.



**Slika 4.** Stupanj membranske elastičnosti (E) kao funkcija  $r_v/r_p$  (omjer srednjeg promjera liposoma nakon ekstruzije i promjera pora na polikarbonatnoj membrani kroz koju se protiskuje liposomska preparacija). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D. (n=3). \*Statistički značajna razlika u usporedbi sa stupnjem elastičnosti CL-a (t-test,  $P < 0,05$ ).



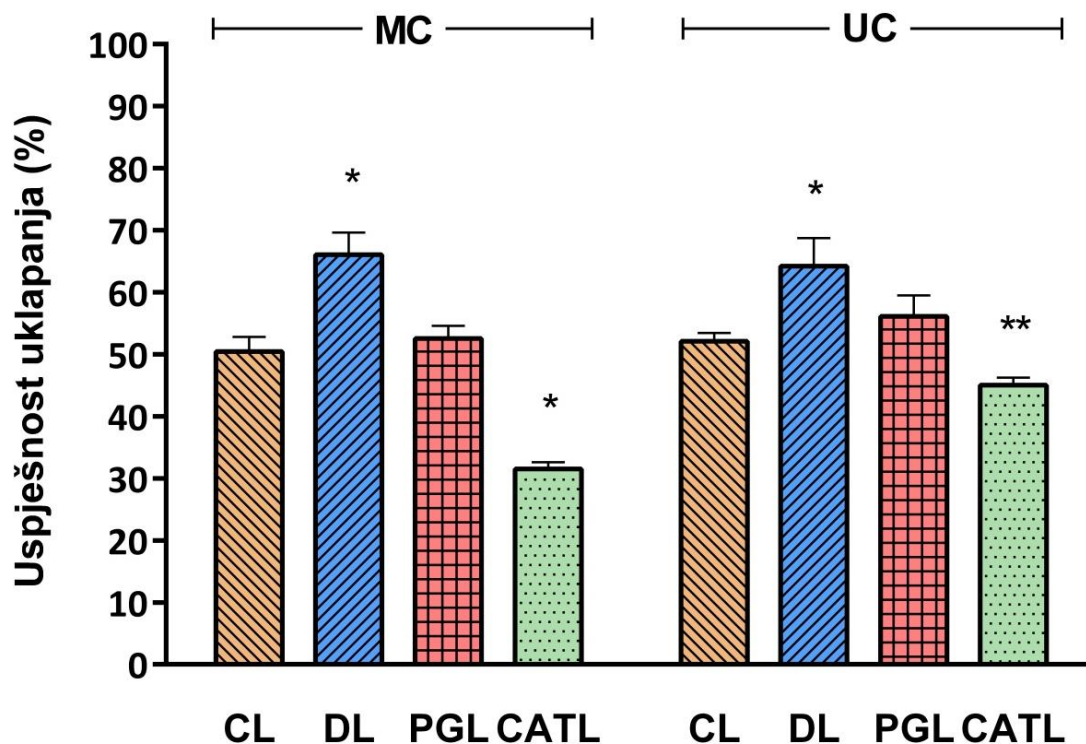
**Slika 5.** Stupanj membranske elastičnosti (E) kao funkcija J (masa liposomske preparacije koja je ekstrudirana kroz polikarbonatnu membranu tijekom 5 minuta). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D. (n=3). \*Statistički značajna razlika u usporedbi sa stupnjem elastičnosti CL-a (t-test,  $P < 0,05$ ).

#### 4.1.3. Uspješnost uklapanja AZT-a u liposome

Učinkovitost topikalne antimikrobne terapije određena je postignutom koncentracijom antimikrobnog lijeka na mjestu djelovanja, koja je ovisna o količini primijenjene liposomske formulacije, odnosno koncentraciji uklopljenog lijeka (Messiaen i sur., 2013). Stoga je tijekom optimizacije liposomskih formulacija namijenjenih topikalnom liječenju bakterijskih infekcija potrebno postići adekvatno uklapanje antibiotika u liposome.

Uspješnost uklapanja AZT-a uspoređivana je s obzirom na tip vezikula (CL, DL, PGL, CATL) te primijenjenu metodu odjeljivanja liposoma s uklopljenim AZT-om (centrifugiranje minikolone i ultracentrifugiranje), kako bi se optimizirao proces odjeljivanja neuklopljene frakcije AZT-a za daljnja istraživanja.

Uspješnost uklapanja AZT-a izražena je kao relativni udio uklopljenog lijeka (%) (Slika 6).



**Slika 6.** Uspješnost uklapanja AZT-a (%) u različite tipove liposoma s obzirom na korištene metode odjeljivanja uklopljenog i neuklopljenog lijeka (MC, centrifugiranje minikolone; UC, ultracentrifugiranje). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D. (n=3). \*Statistički značajna razlika u usporedbi s CL-om (ANOVA,  $P < 0,05$ ). \*\*Statistički značajna razlika u odnosu na istu preparaciju liposoma odijeljenu korištenjem metode centrifugiranja minikolone (t-test,  $P < 0,05$ ).

Obje metode odjeljivanja neuklopljenog od liposomski uklopljenog AZT-a, rezultirale su sličnim vrijednostima uspješnosti uklapanja AZT-a za CL, DL i PGL, izuzev za CATL. Naime, nakon odjeljivanja neuklopljenog AZT-a ultracentrifugiranjem, uspješnost uklapanja AZT-a u CATL bila je značajno veća (45 %) u odnosu na vrijednost dobivenu primjenom metode centrifugiranja minikolone (32 %) (t-test,  $P < 0,05$ ). Uzimajući u obzir dobivene vrijednosti analitičkog prinosa AZT-a, odjeljivanje ultracentrifugiranjem je odabrano kao točnija i prikladnija metoda te je korištena u daljnjim ispitivanjima. Naime, vrijednosti analitičkog prinosa bile su 96,1-109,9 % za metodu ultracentrifugiranja, tj. 75,2-89,4 % za metodu centrifugiranja minikolone). Za liposomsku preparaciju CATL vrijednosti analitičkog prinosa iznosile su 81,6 % (metoda centrifugiranja minikolone), odnosno 96,1 % (metoda ultracentrifugiranja).



Udio uklopljenog AZT-a u ispitivanim liposomskim formulacijama (CL, DL, PGL, CATL) iznosio je između 45 % i 64 %. Najbolje uklapanje postignuto je s DL-om (64 %), što se može objasniti prisustvom anionskog surfaktanta (rubnog aktivatora) u fosfolipidnom dvosloju, koji potpomaže solubilizaciju lipofilnog lijeka. Superiornost deformabilnih liposoma u odnosu na konvencionalne i propilenglikol liposome s obzirom na uspješnost uklapanja utvrđena je i u studiji Elsayeda i suradnika (2007b). Naime, deformabilni liposomi s natrijevim kolatom kao rubnim aktivatorom, omogućili su značajno bolje uklapanje cinhokaina (84 %) u odnosu na konvencionalne (47 %) i propilenglikol liposome s 10 % propilenglikola (64 %), odnosno 20 % propilenglikola u formulaciji (77 %). Nasuprot tome, deformabilni liposomi su se pokazali manje uspješnima od konvencionalnih i propilenglikol liposoma za uklapanje diklofenaknatrija. Naime, u liposome identičnog (fosfo)lipidnog sastava kao CL, DL i PGL uklopljeno je 13 % (konvencionalni liposomi), 8 % (deformabilni liposomi) i 17 % (propilenglikol liposomi) diklofenaknatrija (Palac i sur., 2014a). Takvi kontradiktorni rezultati mogu se objasniti različitim fizičko-kemijskim svojstvima uklopljenih lijekova. Nasuprot lipofilnim i slabo topljivim AZT-u i cinhokainu, diklofenaknatrij je hidrofilna molekula koja se, umjesto u liposomsku membranu, uklapa u unutarnju vodenu fazu liposoma. Imajući u vidu činjenicu da se hidrofilni lijekovi slabije uklapaju u liposome od lipofilnih lijekova (Fang i sur., 2006; Zucker i sur., 2009), uspješnost uklapanja AZT-a je očekivano bila veća od uspješnosti uklapanja diklofenaknatrija u liposome analognog (fosfo)lipidnog sastava (Palac i sur., 2014a).

Uzevši u obzir relativno visok udio propilenglikola (30 %, *m/m*) u PGL-u, koji kao suotapalo povećava topljivost slabije topljivih lijekova (Lane, 2013), očekivalo se da će PGL omogućiti bolje uklapanje AZT-a od CL-a. Međutim, neovisno o korištenoj metodi odjeljivanja, pokazalo se da je uspješnost uklapanja AZT-a u CL bila otprilike 50 %, a za PGL 53-56 %, pri čemu nije utvrđena statistički značajna razlika između ovih dvaju tipova liposoma (*t*-test,  $P > 0,05$ ). Takav je rezultat u suprotnosti s rezultatima dobivenima u prethodnim studijama, koje su pokazale veću uspješnost uklapanja u propilenglikol liposome nego u konvencionalne liposome, kako za hidrofilne (Manconi i sur. 2009; Palac i sur., 2014a), tako i za lipofilne lijekove (Elmoslemanny i sur., 2012; Elsayed i sur., 2007b). Vanić i suradnici (2014a) su priredili tzv. deformabilne propilenglikol liposome te su pokazali da dodatak propilenglikola u liposomsku formulaciju povećava uspješnost uklapanja metronidazola trostruko u odnosu na konvencionalne liposome, odnosno četverostruko u odnosu na deformabilne liposome bez dodatka propilenglikola.

## 4.2. Stabilnost liposoma tijekom skladištenja

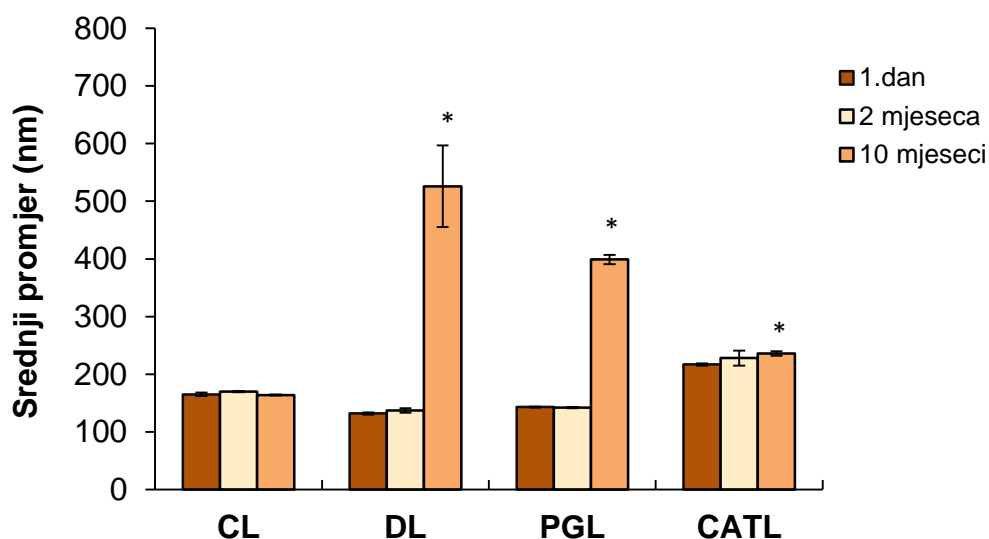
Fizička stabilnost liposoma određivana je praćenjem promjene veličine (srednji promjer, indeks polidisperznosti) (Slike 7 i 8) i zeta potencijala (Slika 9) ekstrudiranih AZT-liposoma tijekom 10 mjeseci pohrane pri 4 °C.

Rezultati provedenih ispitivanja pokazuju da se srednji promjer i indeks polidisperznosti, kao i zeta potencijal, za sve ispitivane AZT-liposome, nisu značajno promijenili nakon 2 mjeseca skladištenja. Stabilnost analognih liposomskih formulacija, ali s drugom uklopljenom tvari (cinhokainom) potvrđena je u studiji Elsayeda i suradnika (2007b), koji u vremenskom periodu od 30 dana nisu zabilježili znatnije promjene u veličini liposoma skladištenih pri temperaturi od 5 °C. U istraživanjima koja su proveli Manconi i suradnici (2009) propilenglikol liposomi s diklofenaknatrijem su se pokazali stabilnima tijekom 28 dana pohrane pri sobnoj temperaturi (25 °C), pri čemu je utvrđen stabilizirajući antiagregacijski učinak propilenglikola na liposome.

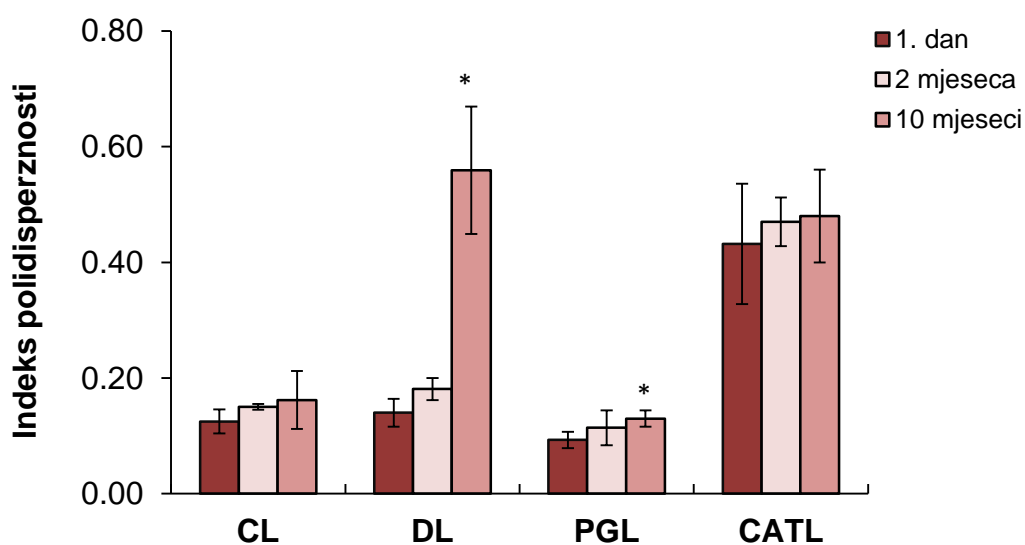
Iako su nakon 2 mjeseca skladištenja srednji promjeri i indeksi polidisperznosti ostali nepromijenjeni za sve ispitivane AZT-liposome, nakon 10 mjeseci pohrane za elastične su liposome zabilježene statistički značajne promjene ispitivanih parametara u odnosu na njihove početne vrijednosti (t-test,  $P < 0,05$ ) (Slike 7 i 8). Povećanje srednjih promjera DL-a i PGL-a te indeksa polidisperznosti za PGL upućuje da je u navedenom periodu došlo do agregacije ili fuzije elastičnih AZT-liposoma. Uočene promjene posljedica su prisutnosti jednolančanog surfaktanta, odnosno propilenglikola u (fosfo)lipidnim dvoslojevima, koji istovremeno doprinose deformabilnosti, ali i manjoj kompaktnosti dvosloja, što se odražava u fizičkoj nestabilnosti liposoma tijekom duljeg vremenskog razdoblja. U prilog tome ide i činjenica da su vrijednosti srednjeg promjera i indeksa polidisperznosti za rigidne liposome (CL i CATL) ostale gotovo nepromijenjene (t-test,  $P > 0,05$ ) tijekom 10 mjeseci. Porast veličine elastičnih AZT-liposoma tijekom duljeg vremenskog razdoblja u suglasnosti je s rezultatima ispitivanja stabilnosti liposoma istog membranskog sastava, s uklopljenim hidrofilnim lijekom (Palac i sur., 2014a). Ta su ispitivanja također pokazala značajan porast promjera deformabilnih i propilenglikol liposoma nakon 10 mjeseci čuvanja pri istim uvjetima (4 °C). Međutim, nasuprot AZT-liposomima, u studiji s diklofenaknatrijem promjena veličine bila je izraženija za konvencionalne nego za elastične liposome. Zanimljivo je spomenuti da su Elmoslemany i suradnici (2012) dobili posve suprotne rezultate stabilitetne evaluacije. Naime, nakon 90 dana pohrane liposoma pri 4 °C nisu zabilježili povećanje, nego značajno smanjenje

srednjeg promjera vezikula, koje je bilo veće za konvencionalne nego za propilenglikol liposome. S obzirom na kontradiktornosti između ovdje prikazanih rezultata fizičke stabilnosti AZT-liposoma i rezultata stabilitetnih studija provedenih na sličnim tipovima liposoma, teško je načelno predvidjeti kako će dodatak surfaktanta i propilenglikola utjecati na stabilnost liposomskih formulacija. Čini se kako stabilnost vezikula ovisi o više čimbenika, uključujući ne samo sastav liposoma, nego i uklopljenu djelatnu tvar, uvjete i duljinu skladištenja liposomske disperzije.

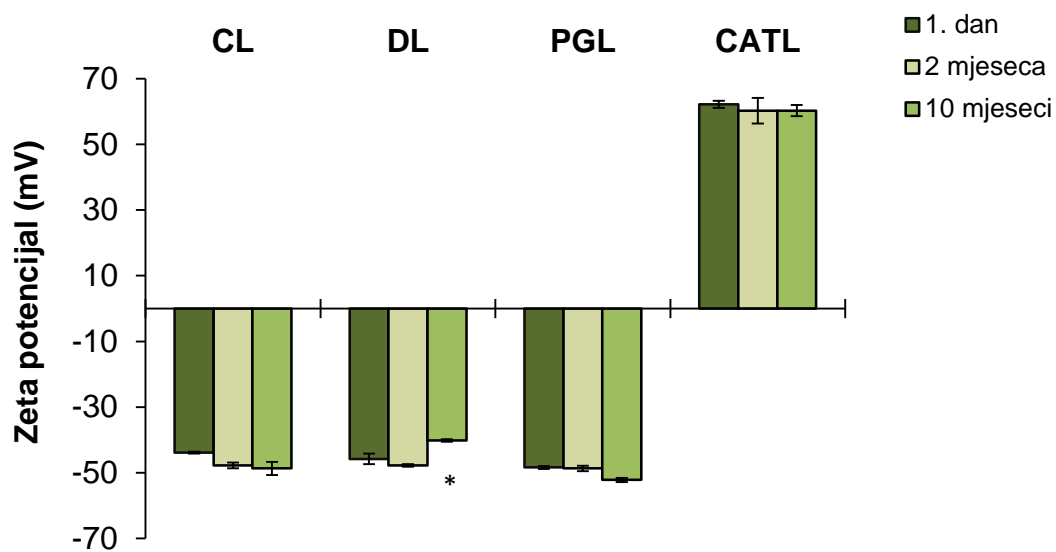
Izmjerene apsolutne vrijednosti zeta potencijala liposoma veće od 30 mV upućuju na formiranje fizički stabilnih liposomskih disperzija. Ukoliko je apsolutna vrijednost zeta potencijala niska, tada ne postoji dovoljno jaka odbojna sila koja bi spriječila agregaciju i flokulaciju čestica. Očekuje se da će čestice s apsolutnim vrijednostima zeta potencijala većima od 30 mV imati dobru stabilnost, odnosno veoma dobru stabilnost ako je vrijednost zeta potencijala veća 60 mV (Honary i Zahir, 2013). Rezultati ispitivanja fizičke stabilnosti CL-a, DL-a i PGL-a u suglasnosti su s rezultatima stabilitetne evaluacije liposoma istog membranskog sastava, ali s diklofenaknatrijem kao uklopljenom djelatnom tvari (Palac i sur., 2014a). Vrijednosti zeta potencijala AZT-liposoma nisu se značajno mijenjale tijekom 10 mjeseci skladištenja pri 4 °C (t-test,  $P > 0,05$ ) izuzev DL-a, kod kojih je nakon 10 mjeseci utvrđen pad apsolutne vrijednosti zeta potencijala (t-test,  $P < 0,05$ ) (Slika 9).



**Slika 7.** Srednji promjer AZT-liposoma tijekom 10 mjeseci pohrane pri 4 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D. (n=3). \*Statistički značajna razlika (t-test,  $P < 0,05$ ) u odnosu na početnu vrijednost srednjeg promjera (1. dan).



**Slika 8.** Indeks polidisperznosti AZT-liposoma tijekom 10 mjeseci pohrane pri 4 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D. (n=3). \*Statistički značajna razlika (t-test,  $P < 0,05$ ) u odnosu na početnu vrijednost indeksa polidisperznosti (1. dan).



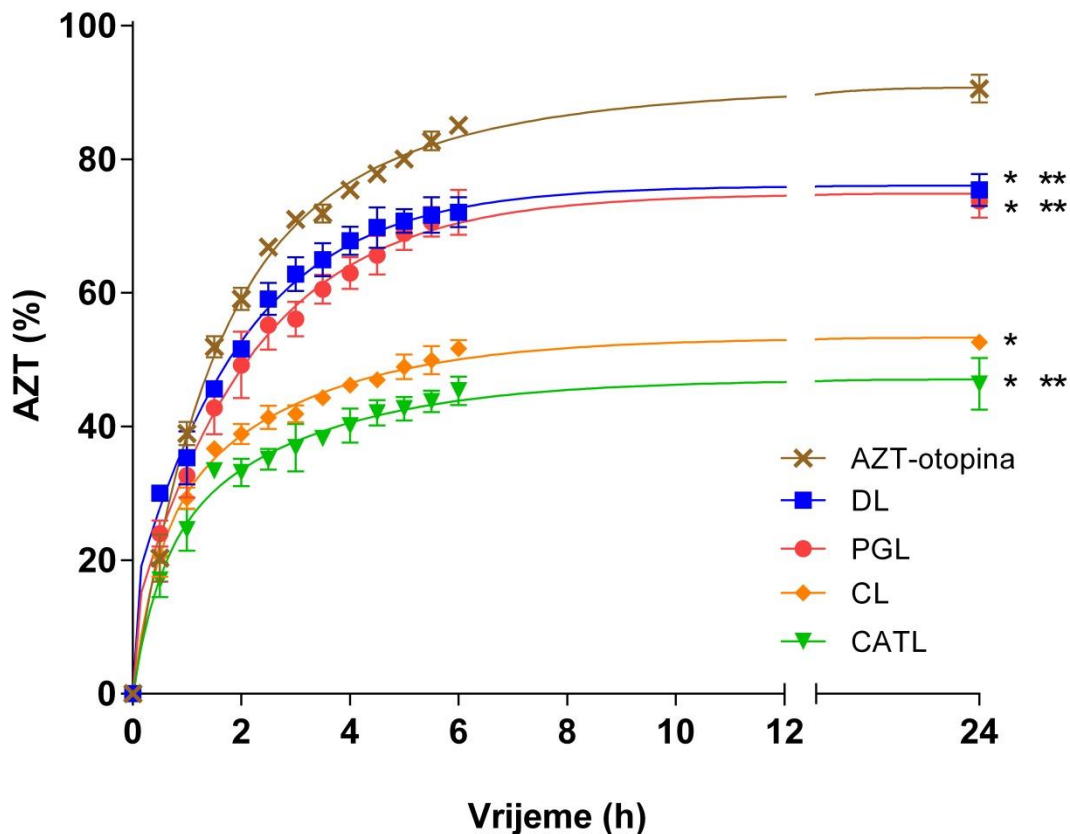
**Slika 9.** Zeta potencijal AZT-liposoma tijekom 10 mjeseci pohrane pri 4 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± S.D. (n=3). \*Statistički značajna razlika (t-test,  $P < 0,05$ ) u odnosu na početnu vrijednost zeta potencijala (1. dan).

### 4.3. Oslobađanje AZT-a iz liposoma *in vitro*

Kontrolirano oslobađanje uklopljene djelatne tvari iz liposoma od velikog je značaja za njihovu primjenu kao nosača lijekova i postizanje učinkovite topikalne antimikrobne terapije (Škalko-Basnet i Vanić, 2017). Uklanjanjem AZT-a u liposome postignuto je sporije oslobađanje lijeka u odnosu na kontrolu (AZT-otopina) (Slika 10). Sve ispitivane liposomske disperzije pokazale su trend naglog oslobađanja AZT-a (engl. *burst release*) u prva dva sata ispitivanja, koji je bio izraženiji za elastične liposome (DL i PGL). Nakon početno brze tendencije, oslobađanje AZT-a se usporava tijekom sljedeća 22 sata. Takav dvofazni profil oslobađanja uklopljenog lijeka često se uočava kod nanočestica, a pogodan je za postizanje inicijalno visoke lokalne koncentracije lijeka na mjestu djelovanja i brzi početak djelovanja antibiotika, nakon čega slijedi održavanje učinkovite koncentracije antibiotika na mjestu djelovanja kroz dulji vremenski period (Sanbhal i sur., 2018). Nakon 24 sata, kumulativni udio oslobođenog AZT-a iznosio je: 49 % za CATL, 53 % za CL, 74 % za PGL, 75 % za DL te 91 % za AZT-otopinu. Sličan profil oslobađanja i vrijednosti kumulativno oslobođenog AZT-a dobili su i Liu i suradnici (2016), čije je ispitivanje provedeno korištenjem dijalizacijske metode, dok su kao receptorski medij također koristili fosfatni pufer (pH 7,4). Pritom je nakon 24 sata oslobođeno 66 % AZT-a iz konvencionalnih liposoma te 91 % iz AZT-otopine.

Usporedbom profila oslobađanja AZT-a iz različitih tipova liposoma razvidno je da na oslobađanje uklopljenog lijeka značajno utječe elastičnost/rigidnost fosfolipidnih dvoslojeva liposoma. Tako je značajno veći udio AZT-a oslobođen iz oba tipa elastičnih vezikula (DL, PGL) nego iz liposoma čvrstih (fosfo)lipidnih dvoslojeva, CL-a i CATL-a (ANOVA,  $P < 0,05$ ). Primjerice, tijekom prvih 6 sati ispitivanja iz elastičnih AZT-liposoma (DL, PGL) oslobođeno je približno 70 % uklopljenog AZT-a, dok je u istom vremenskom intervalu iz CL-a oslobođeno 52 % uklopljenog AZT-a (Slika 10). Brže oslobađanje AZT-a iz elastičnih liposoma je očekivano i u skladu s rezultatima dobivenima u ranijim studijama (Palac i sur., 2014a; Vanić i sur., 2014a), a posljedica je povećane propusnosti membrane za uklopljenu djelatnu tvar. Naime, elastični liposomi u lipidnom dvosloju sadrže interkalirani SDCh (DL) ili propilenglikol (PGL), koji narušavaju integritet (kompaktnost, čvrstoću) dvosloja, čineći ga permeabilnijim za uklopljeni lijek. U prilog navedenoj tezi idu rezultati studije u kojoj je lipofilni modelni lijek (fenofibrat) uklopljen u dva tipa liposoma: klasične (konvencionalne) liposome, građene od sojinog fosfatidilkolina i kolesterola te deformabilne liposome, građene od sojinog fosfatidilkolina i natrijevog deoksikolata. Pritom je tijekom

prva dva sata ispitivanja oslobađanja fenofibrata iz oba tipa liposoma oslobođeno oko 20 % fenofibrata, u usporedbi s gotovo 100 %-tnim kumulativnim oslobađanjem zabilježenim za mikronizirani fenofibrat (dijalizacijska metoda). Usporedba profila oslobađanja fenofibrata iz različitih tipova liposoma tijekom naredna 22 sata ispitivanja pokazala je brže oslobađanje lijeka iz deformabilnih nego iz konvencionalnih liposoma (Chen i sur., 2009).



**Slika 10.** Kumulativni udio oslobođenog AZT-a (%) iz različitih tipova liposoma. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D. (n=3). \*Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (ANOVA,  $P < 0,05$ ). \*\*Statistički značajna razlika u odnosu na CL (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

Za razliku od elastičnih liposoma, oslobađanje uklopljenog AZT-a iz CL-a, a pogotovo iz CATL-a, bilo je značajno sporije (Slika 10), što se dovodi u vezu s rigidnošću (fosfo)lipidnih dvoslojeva CL-a i CATL-a (Slike 4 i 5), odnosno lipidnim sastavom formulacija. Budući da su CATL-i građeni od lipida više  $T_c$ , njihove membrane su manje propusne za uklopljeni sadržaj. Navedeno je u suglasnosti s ranijim studijama koje su pokazale da  $T_c$  (fosfo)lipida koji izgrađuju liposomsku membranu značajno utječe na

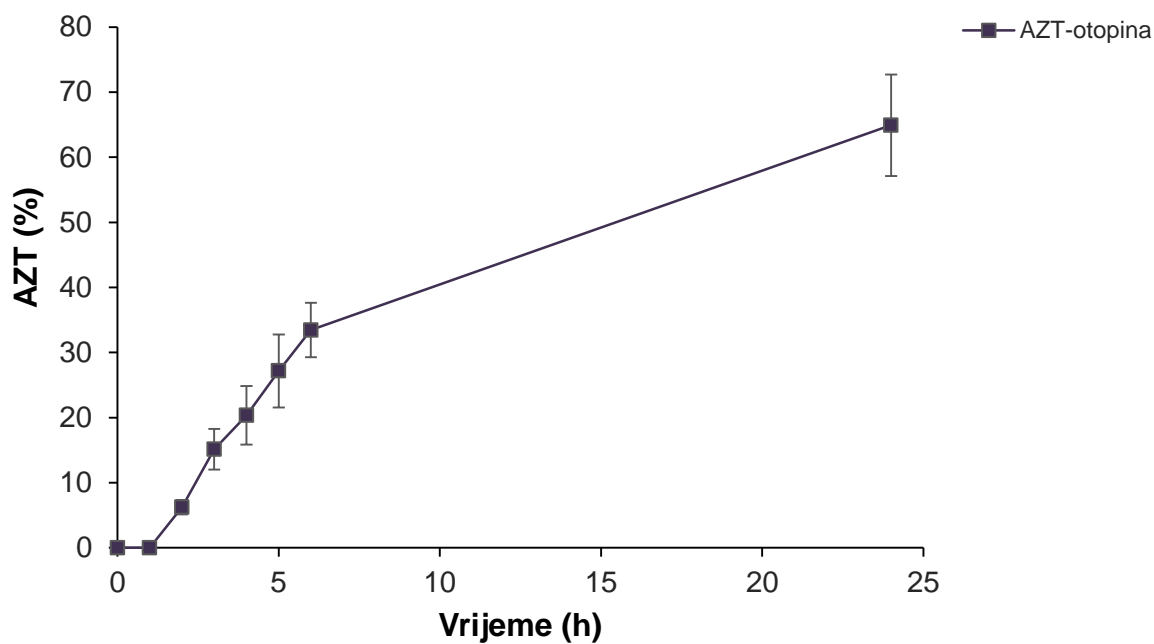
zadržavanje lijeka u liposomima, odnosno oslobađanje lijeka iz liposoma (Anderson i Omri, 2004). Primjerice, Kawano i suradnici (2009) su pokazali da je brzina oslobađanja doksorubicina iz liposoma građenih od dimiristoil fosfatidilkolina ( $T_c=23\text{ }^\circ\text{C}$ ) značajno veća od brzine oslobađanja doksorubicina iz liposoma građenih od hidrogeniranog sojinog fosfatidilkolina ( $T_c=50\text{-}60\text{ }^\circ\text{C}$ ).

#### **4.4. Permeabilnost/odlaganje AZT-a u kožu**

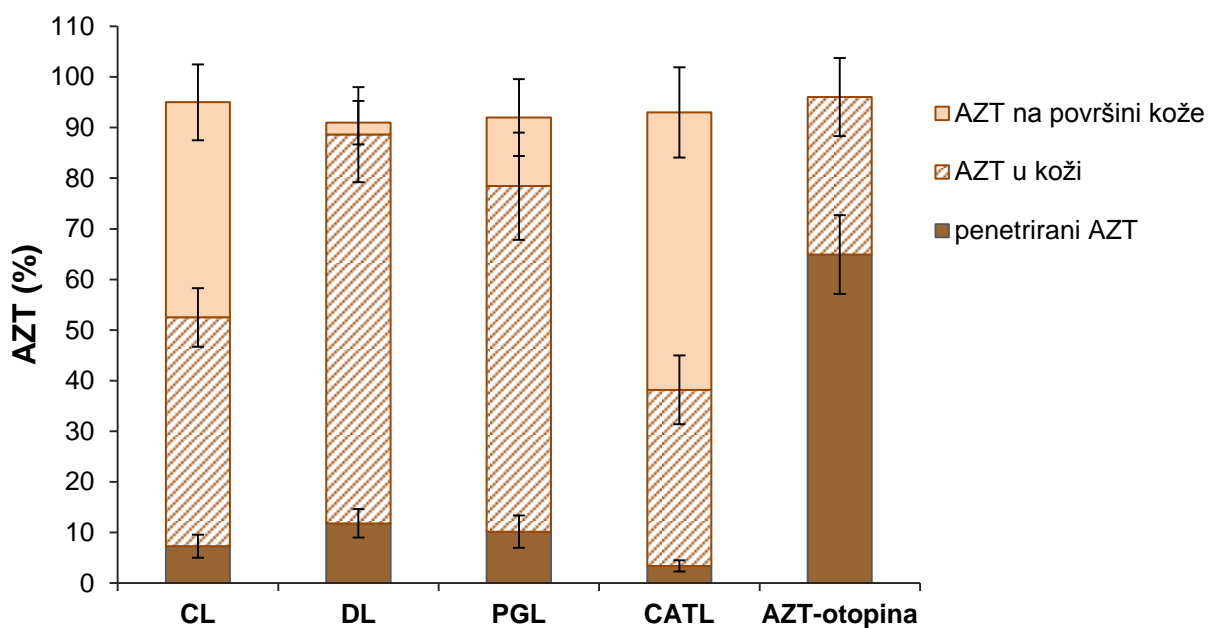
Ispitivanje permeabilnosti lijeka u/kroz kožu neophodno je u razvoju i evaluaciji farmaceutskih oblika namijenjenih (trans)dermalnoj dostavi lijekova (Barry, 2007). Budući da bakterijske infekcije kože mogu zahvaćati različite slojeve kože te se klinički manifestirati zadebljanjima površinskih slojeva kože, otvorenim ranama ili suhim lezijama (Esposito i sur., 2017), potrebno je utvrditi učinak AZT-liposoma u pospješivanju penetracije lijeka u kožu i/ili zadržavanju (lokalizaciji) AZT-a na površini, odnosno unutar kože. Ispitivanja permeabilnosti/odlaganja AZT-a iz različitih tipova liposoma provedena su na svinjskoj koži (*ex vivo*), a rezultati su prikazani Slikama 11 i 12.

Tijekom prvih 6 sati ispitivanja niti za jednu liposomsku formulaciju nije detektirano prisustvo AZT-a u receptorskom mediju, odnosno količina AZT-a bila je ispod granica detekcije, dok je za kontrolu (AZT-otopina) prisutnost lijeka u receptorskom odjeljku utvrđena 2 sata nakon stavljanja uzorka na površinu kože (Slika 11). Stoga se rezultati permeabilnosti/odlaganja AZT-a u kožu iz različitih AZT-liposoma (Slika 12) odnose na vrijednosti određene nakon 24 sata ispitivanja.





**Slika 11.** Kumulativni udio AZT-a (%) koji je penetrirao kroz kožu (*ex vivo*) tijekom 24 sata. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D. (n=3).



**Slika 12.** Permeabilnost i odlaganje AZT-a u kožu (*ex vivo*) nakon 24 sata. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D. (n=3).

Iz Slike 12, koja prikazuje odlaganje/penetraciju lijeka u/kroz kožu nakon 24 sata, vidljivo je da sve testirane liposomske formulacije omogućavaju zadržavanje AZT-a na površini kože ili unutar kože u znatno većem opsegu nego AZT-otopina (kontrola). Tako je u receptorskom odjeljku Franzove difuzijske ćelije nakon 24 sata detektirano čak 65 % AZT-a primjenom AZT-otopine (kontrola), što je značajno više u odnosu na količinu AZT-a određenu u receptorskom mediju nakon primjene AZT-liposoma: DL (12 %), PGL (10 %), CL (7 %) i CATL (3 %). Dakle, primjenom liposoma smanjuje se nepoželjna penetracija AZT-a kroz kožu, što je od izuzetnog značaja za postizanje željenog lokaliziranog antimikrobnog učinka na površini i unutar kože. Time se izbjegava ili minimalizira sistemska apsorpcija AZT-a te potencijalne nuspojave i rizik razvoja bakterijske rezistencije (Škalko-Basnet i Vanić, 2017).

Usporedba rezultata ispitivanja odlaganja/permeabilnosti AZT-a na/u kožu primjenom različitih tipova liposoma (Slika 12) pokazala je da se najbolje zadržavanje AZT-a na površini kože postiže primjenom CATL-a (55 %). Potom slijede CL (43 %), PGL (14 %) i DL (2 %). DL su se u najvećoj mjeri zadržali unutar kože (77 %), dok je upola manje AZT-a u koži utvrđeno primjenom CATL-a (35 %). Premda je u usporedbi s AZT-otopinom permeabilnost AZT-a kroz kožu značajno smanjena primjenom AZT-liposoma, vidljive su varijabilnosti u sadržaju permeiranog AZT-a ovisno o korištenoj liposomskoj formulaciji (Slika 12). Takvi rezultati upućuju na povezanost elastičnosti/rigidnosti (čvrstoće) (fosfo)lipidnih dvoslojeva AZT-liposoma s permeabilnošću, tj. odlaganjem lijeka u koži. Naime, visok stupanj membranske elastičnosti DL-a omogućuje značajno bolju permeabilnost AZT-a u odnosu na primjerice CATL, koji su karakterizirani izrazito rigidnim membranama (Slike 4 i 5). Osim elastičnosti/rigidnosti dvoslojeva AZT-liposoma, na permeabilnost/odlaganje AZT-a u kožu utječe i površinski naboj liposoma. Zbog pozitivnog površinskog naboja, CATL mogu stupati u snažne interakcije s negativno nabijenom površinom kože, omogućavajući zadržavanje lijeka na samoj površini kože i/ili u površinskim slojevima kože. Nasuprot tome, negativno nabijeni liposomi (CL, PGL i DL) ne stupaju u privlačne elektrostatske interakcije s kožom, te je posljedično udio penetriranog AZT-a bio veći za anionske liposome (Slika 12). Navedeno je u skladu s rezultatima prijašnjih studija koje su pokazale da pozitivno nabijeni liposomi pokazuju bolju retenciju uklopljenog lijeka na/u koži u odnosu na neutralne i negativno nabijene liposome (Kirjavainen i sur., 1996; Manosroi i sur., 2004; Song i Kim, 2006).

Provedena *in vitro* i *ex vivo* ispitivanja potvrđuju da se uklapanjem AZT-a u liposome može usporiti njegovo oslobađanje (Slika 10) te lokalizirati učinak lijeka na površini kože

(CL, CATL) ili unutar kože (PGL, DL) (Slika 12). Takvi rezultati su u suglasnosti s ispitivanjem koje su proveli Hurler i suradnici (2012). Naime, uklapanjem mupirocina u liposome omogućeno je produljeno oslobađanje lijeka i bolja (učinkovitija) doprema mupirocina u kožu (*ex vivo*) u odnosu na otopinu mupirocina.

Rezultati ispitivanja odlaganja/permeabilnosti AZT-liposoma u kožu također potvrđuju da se topikalnom primjenom liposoma može postići različit spektar učinaka, varirajući od terapijskog učinka na površini kože, u gornjim slojevima epidermisa ili u donjim slojevima kože. Pritom na penetraciju liposoma i permeabilnost uklopljenog lijeka u kožu značajno utječe sastav i fizičko-kemijska svojstva liposoma, što su potvrdile i brojne druge studije (El Maghraby i sur., 2009; Elsayed i sur., 2007b; Gillet i sur., 2011b; Hua, 2015). Primjenom liposoma s čvrstim dvoslojevima (membranama) ograničava se doprema uklopljenog lijeka u *stratum corneum* i gornje slojeve kože (El Maghraby i sur., 2009; Hua, 2015), dok liposomi s većim stupnjem membranske elastičnosti (elastični liposomi) pospješuju penetraciju i dostavu lijeka u dublje slojeve kože (Vanić i sur., 2015).

Budući da je *S. aureus* i ekstracelularni i intracelularni patogen, koji može perzistirati unutar inficiranih keratinocita u koži (Abu-Humaidan i sur., 2018; Soong i sur., 2015), učinkovita doprema antibiotika u inficirane stanice od iznimne je važnosti za postizanje željenog antibakterijskog učinka. Uzimajući u obzir potrebu učinkovite dostave antimikrobnog lijeka u inficirane stanice te potvrđeni penetracijski potencijal ispitivanih elastičnih liposoma (Palac i sur., 2014a; Rukavina i Vanić, 2016; Vanić i sur.; 2013), DL i PGL s AZT-om bili bi prikladni za tretiranje dubokih kroničnih rana i infekcija. S druge strane, liposomi rigidnijih fosfolipidnih dvoslojeva, poput CL-a i CATL-a, bili bi prikladni za liječenje akutnih i kroničnih infekcija kod kojih je glavnina patoloških procesa lokalizirana u rožnatom sloju i gornjim slojevima epidermisa, poput npr. inficiranih površinskih opekotina. Dakako, navedene pretpostavke potrebno je potvrditi daljnjim istraživanjima (*in vivo* animalne studije).

#### 4.5. Antibakterijska aktivnost liposoma *in vitro*

Antibakterijski učinak AZT-liposoma ispitan je na *S. aureus* ATCC 29213 i 5 različitih MRSA kliničkih izolata (planktonske bakterije i bakterije u biofilmu). Rezultati su prikazani Tablicama 6 i 7.

**Tablica 6.** *In vitro* aktivnost AZT-liposoma u inhibiciji rasta planktonskih bakterija: *S. aureus* i MRSA izolati

<i>S. aureus</i> soj/ MRSA izolat	MIK ( $\mu\text{g/ml}$ )						
	AZT-otopina	CL	DL	PGL	PGL-20	PGL-10	CATL
ATCC 29213	2	1	0,5	0,5	1	1	0,25
MFBF 10674	8	4	1	2	2	4	0,25
MFBF 10676	4	4	1	1	2	2	0,25
MFBF 10677	4	2	1	1	1	2	0,25
MFBF 10679	2	1	1	1	1	1	0,25
MFBF 10680	2	1	1	1	1	1	0,25

AZT, azitromicin; CATL, kationski liposomi; CL, konvencionalni liposomi; DL, deformabilni liposomi; MIK, minimalna inhibitorna koncentracija azitromicina; PGL, propilenglikol liposomi s 30 % propilenglikola; PGL-10, propilenglikol liposomi s 10 % propilenglikola; PGL-20; propilenglikol liposomi s 20 % propilenglikola. Prikazane vrijednosti MIK-ova predstavljaju srednju vrijednost ( $n=4$ ), a izražene su prema koncentraciji AZT-a u formulaciji.

Rezultati prikazani Tablicom 6 potvrđuju da se primjenom AZT-liposoma postiže značajno bolji *in vitro* antibakterijski učinak na *S. aureus* i MRSA izolate, u odnosu na AZT-otopinu u ekvivalentnoj koncentraciji AZT-a. Među ispitivanim liposomskim formulacijama najbolji antibakterijski učinak pokazali su CATL, čije su MIK vrijednosti bile čak do 32 puta manje od MIK vrijednosti AZT-otopine za isti bakterijski soj/izolat. Najmanju učinkovitost u inhibiciji rasta planktonskih bakterija od svih su liposomskih formulacija

pokazali CL, ali su pripadajuće MIK vrijednosti za većinu testiranih bakterija i dalje bile barem dvostruko manje od AZT-otopine.

Elastični AZT-liposomi (DL i PGL) pokazali su gotovo identičan antibakterijski potencijal. Tako su na sojevima *S. aureus* ATCC 29213 te MRSA izolatima MFBF 10676, 10677, 10679 i 10680, dobivene jednake MIK vrijednosti za obje preparacije AZT-liposoma, u rasponu od 0,5 do 1 µg/ml. Na istim je sojevima AZT-otopina bila značajno manje učinkovita, s MIK vrijednostima u rasponu od 2 do 8 µg/ml. Na soju MFBF 10674 za PGL je dobiven dvostruko veći MIK od DL-a, ali i dalje 4 puta manji od AZT-otopine (Tablica 6).

Kako bi se utvrdio utjecaj sadržaja propilenglikola na antibakterijsku aktivnost PGL-a, pripremljeni su i testirani AZT-liposomi s nižim udjelom propilenglikola (10 % i 20 %). Dobivene MIK vrijednosti pokazale su da udio propilenglikola u disperziji AZT-liposoma utječe na njihovu antibakterijsku aktivnost, pri čemu smanjenje sadržaja propilenglikola rezultira povećanjem MIK-ova, tj. smanjenjem antibakterijske aktivnosti na sojeve *S. aureus* ATCC 29213, MFBF 10674, 10676 i 10677.

Osim na planktonskim bakterijama, antibakterijska aktivnost AZT-liposoma testirana je i na biofilmovima istih sojeva/izolata stafilokoka. Primjenom AZT-liposoma u rasponu koncentracija AZT-a od 0,25 do 256 µg/ml nije zabilježen antibiofilm učinak na prethodno formiranim biofilmovima. Međutim, u istom rasponu koncentracija zabilježen je inhibirajući učinak AZT-liposoma na formiranje biofilмова, pri čemu su vrijednosti MBIK-ova za sve liposomske formulacije bile manje od MBIK-ova slobodnog AZT-a (Tablica 7).

Vrijednosti MBIK-ova za AZT-liposome kretale su se u rasponu 0,5-8 µg/ml, dok su za AZT-otopinu iznosile 8-32 µg/ml. Slično kao i za planktonske bakterije, najučinkovitiji u inhibiciji formiranja biofilma bili su CATL, pokazujući čak do 32 puta manji MBIK od AZT-otopine (MFBF 10674, 10676, 10677 i 10679). U usporedbi s drugim AZT-liposomima, CL su bili najmanje uspješni u inhibiciji formiranja MRSA biofilмова, ali su MBIK-ovi dobiveni za CL bili još uvijek 4-8 puta manji u odnosu na AZT-otopinu. Antibiofilm učinak elastičnih AZT-liposoma (DL, PGL) pokazao se nešto lošijim od CATL-a, ali boljim od CL-a i od AZT-otopine. Primjerice, MBIK-ovi za DL bili su 8-32 puta niži od MBIK-ova AZT-otopine. Usporedbom antibiofilm aktivnosti DL-a i PGL-a utvrđena je podjednaka učinkovitost oba tipa liposoma prema MRSA izolatima MFBF 10676, 10679 i 10680.

Prisustvo 30 % propilenglikola u PGL-u odrazilo se u većoj antibiofilm aktivnosti uklopljenog antibiotika, pri čemu su MBIK-ovi za PGL bili značajno niži u odnosu na MBIK-ove dobivene s CL-om. Štoviše, antibiofilm potencijal propilenglikol liposoma ovisio

je o koncentraciji propilenglikola u formulaciji (Tablica 7). Tako su MBIK-ovi za propilenglikol liposome s 10 % propilenglikola (PGL-10) ili 20 % propilenglikola (PGL-20) bili dvostruko veći od MBIK-a za PGL koji su sadržavali 30 % propilenglikola (ispitano na *S. aureus* ATCC 29213).

**Tablica 7.** *In vitro* aktivnost AZT-liposoma u prevenciji stvaranja biofilmova: *S. aureus* i MRSA izolati

<i>S. aureus</i> soj/ MRSA izolat	MBIK (µg/ml)						
	AZT-otopina	CL	DL	PGL	PGL-20	PGL-10	CATL
ATCC 29213	8	8	1	2	4	4	0,5
MFBF 10674	32	4	1	4	n.o.	n.o.	1
MFBF 10676	32	4	2	2	n.o.	n.o.	1
MFBF 10677	32	4	2	4	n.o.	n.o.	1
MFBF 10679	16	4	1	1	n.o.	n.o.	0,5
MFBF 10680	16	4	2	2	n.o.	n.o.	1

CATL, kationski liposomi; CL, konvencionalni liposomi; DL, deformabilni liposomi; MBIK, minimalna biofilm inhibitorna koncentracija azitromicina; n.o., nije određivano; PGL, propilenglikol liposomi s 30 % propilenglikola; PGL-10, propilenglikol liposomi s 10 % propilenglikola; PGL-20, propilenglikol liposomi s 20 % propilenglikola. Prikazane vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost (n=4), a izražene su prema koncentraciji AZT-a u formulaciji.

Prikazani rezultati mikrobioloških ispitivanja potvrđuju veći antibakterijski učinak AZT-a uklopljenog u liposome, što je dokazano i u ranijim istraživanjima (Liu i sur., 2016; Oh i sur., 1995; Solleti i sur., 2015) na više različitih patogena (*S. aureus*, *M. avium*, *P. aeruginosa*). Premda je anti-MRSA učinak AZT-liposoma bio superiorniji u odnosu na otopinu lijeka, „prazni“ liposomi (bez uklopljenog AZT-a) nisu pokazali direktan inhibirajući učinak na rast planktonskih bakterija i prevenciju formiranja biofilmova za testirane bakterijske sojeve u ispitivanom rasponu koncentracija. Dakle, sami liposomi (bez AZT-a) ne posjeduju inherentnu antibakterijsku aktivnost, već kao spremišni sustavi omogućavaju

učinkovitu dopremu uklopljenog antibiotika te tako potenciraju njegovu antibakterijsku aktivnost.

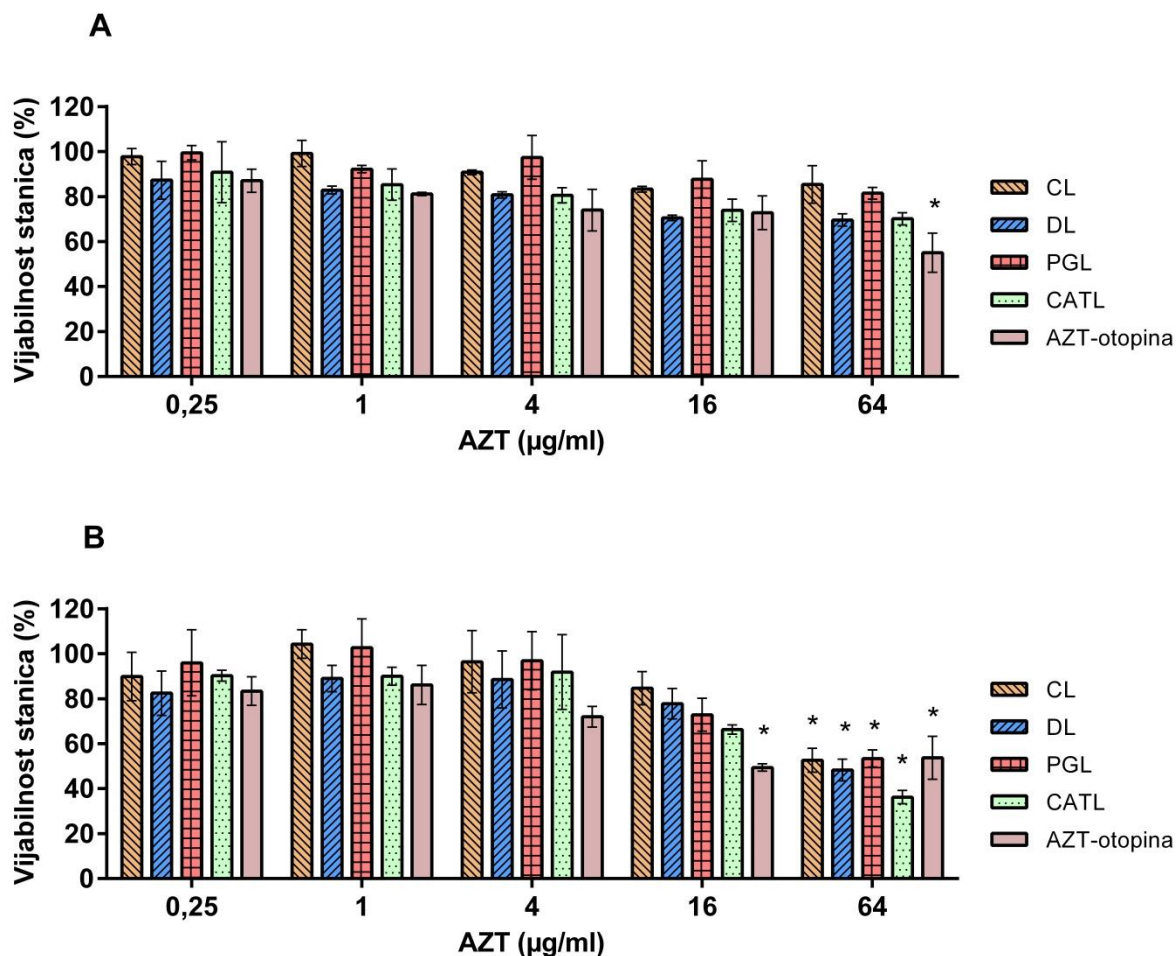
Nadalje, dobiveni MIK-ovi i MBIK-ovi potvrđuju da fizičko-kemijska svojstva liposoma, fosfolipidni sastav, prisustvo surfaktanta i propilenglikola, utječu na antibakterijski učinak liposomskog AZT-a. Pozitivno nabijeni liposomi (CATL) inhibirali su rast stafilokoka i formiranje biofilmova pri nižim koncentracijama od negativno nabijenih liposoma (CL, DL, PGL). Takav rezultat se može pripisati prisustvu kationskog lipida (DODAB-a) u formulaciji CATL-a, za kojeg je dokazano da posjeduje antimikrobna svojstva (Melo i sur., 2010; Ragioto i sur., 2014) te snažnijoj interakciji između pozitivno nabijenih CATL-a i negativno nabijene površine bakterija. Iako su bili manje učinkoviti od CATL-a, anionski su liposomi (CL, DL, PGL) pokazali superiorniji antibakterijski učinak od AZT-otopine. Ranija ispitivanja provedena na *M. avium*-u (intracelularni patogen) pokazala su bolju učinkovitost negativno nabijenih AZT-liposoma u odnosu na slobodni AZT, pri čemu je antibakterijski učinak bio jači, što je bio veći molarni udio površinski negativno nabijenih lipida u sastavu liposoma (Oh i sur., 1995).

Elastični AZT-liposomi (DL i PGL) su pokazali slabiji antistafilokokni i anti-MRSA potencijal od CATL-a, ali jači od CL-a. Poboljšani antibakterijski učinak elastičnih liposoma s uklopljenim antibiotikom zabilježen je i u drugim *in vitro*, ali i *in vivo* studijama. Primjerice, nakon lokalne primjene deformabilnih liposoma s daptomicinom (sastavljenih od lecitina i SDCh-a) na kožu miševa (*in vivo*), antibiotik je detektiran u dubljim slojevima kože, pri čemu su se terapijske koncentracije lijeka održale tijekom više sati, rezultirajući značajnom inhibicijom rasta bakterija i stvaranja biofilma (Li i sur., 2013). Također, Hsu i suradnici (2017) su na MRSA-inficiranim keratinocitima (*in vitro*) pokazali da dodatak deoksikolične kiseline u lipidni dvosloj sastavljen od fosfatidilkolina povećava fluidnost liposomske membrane, ali i antibakterijsku aktivnost uklopljenog kloramfenikola.

#### **4.6. Biokompatibilnost AZT-liposoma**

Biokompatibilnost AZT-liposoma ispitana je *in vitro* na staničnim linijama humanih keratinocita (HaCaT) i fibroblasta (MJ90hTERT), primjenom MTT testa za procjenu metaboličke aktivnosti tretiranih stanica. Stanične linije bile su izložene djelovanju AZT-liposoma ili AZT-otopine tijekom 24 sata. Raspon koncentracija u kojem je testirana

citotoksičnost iznosio je od 0,25 do 64  $\mu\text{g}$  AZT-a/ml, što pokriva ili višestruko nadilazi raspon MIK i MBIK vrijednosti dobivenih za AZT-liposome i AZT-otopinu (poglavlje 4.5).



**Slika 13.** Vijabilnost keratinocita HaCaT (A) i fibroblasta MJ90hTERT (B) nakon 24 sata inkubacije s AZT-liposomima i AZT-otopinom pri 37 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D. (n=3) \*Vijabilnost stanica < 70 %.

Provedena ispitivanja pokazuju da u rasponu koncentracija AZT-a od 0,25 do 16  $\mu\text{g/ml}$  nije utvrđen citotoksični učinak AZT-a na keratinocite (Slika 13A). Pri najvećoj testiranoj koncentraciji AZT-a (64  $\mu\text{g/ml}$ ), AZT-otopina je pokazala citotoksični učinak na keratinocite (vijabilnost < 70 %). Nasuprot tome, vijabilnost keratinocita za AZT-liposome je pri maksimalnoj koncentraciji AZT-a bila veća od AZT-otopine te iznad 70 %, što je definirano kao kritična granica za utvrđivanje citotoksičnosti (ISO10993-5). Očekivano, pri nižim koncentracijama AZT-a vijabilnost HaCaT stanica je bila značajno veća. Usporedba različitih tipova AZT-liposoma, pokazala je da su CL i PGL biokompatibilni s HaCaT stanicama u svim ispitivanim koncentracijama. Pri najvećoj testiranoj koncentraciji AZT-a, vijabilnost



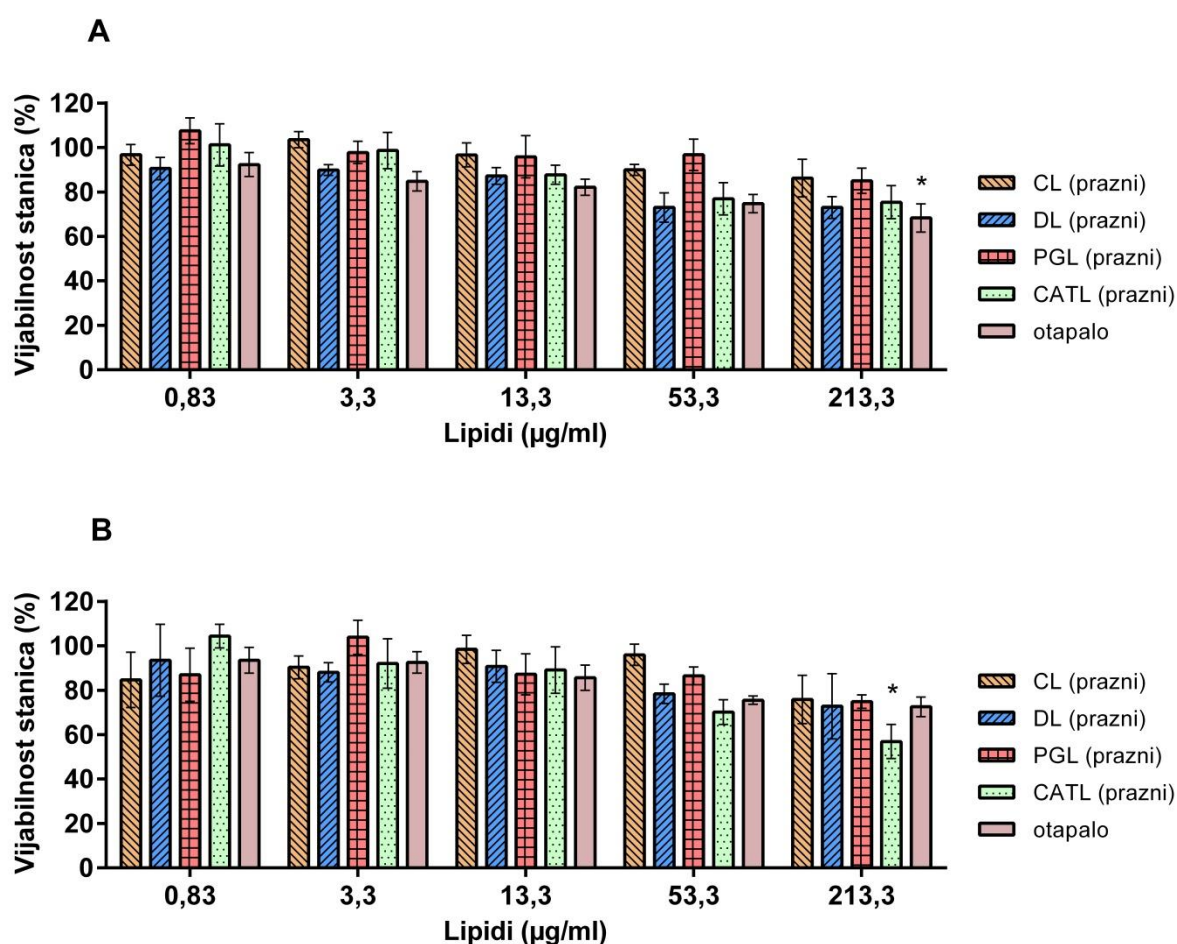
stanica tretiranih DL-om ili CATL-om bila je manja od vijabilnosti stanica tretiranih CL-om ili PGL-om (ANOVA,  $P < 0,05$ ), ali i dalje na razini koja se smatra netoksičnom (vijabilnost  $> 70\%$ ) (Slika 13A).

Jednako kao i za keratinocyte, niti jedna od testiranih liposomskih formulacija nije pokazala citotoksične učinke na fibroblaste u rasponu koncentracija AZT-a 0,25-16  $\mu\text{g/ml}$  (vijabilnost stanica  $> 80\%$ ) (Slika 13B). Pri koncentraciji AZT-a od 16  $\mu\text{g/ml}$  vijabilnost fibroblasta bila je iznad 80% za CL te iznad 70% za DL i PGL, dok je za CATL bila zanemarivo manja od 70% (t-test,  $P > 0,05$ ). Značajno smanjenje vijabilnosti fibroblasta (vijabilnost  $< 60\%$ ) zabilježeno je pri koncentraciji AZT-a od 64  $\mu\text{g/ml}$ , pri čemu je citotoksični učinak zabilježen za sve uzorke (AZT-liposomi i AZT-otopina). Međutim, za razliku od liposomskog AZT-a i za razliku od HaCaT stanica, za AZT-otopinu je utvrđeno značajno smanjenje vijabilnosti fibroblasta i pri koncentraciji AZT-a od 16  $\mu\text{g/ml}$  (t-test,  $P < 0,05$ ). Takvi rezultati u suglasnosti su s ranijim istraživanjima koja su pokazala nešto veću osjetljivost fibroblasta prema mikro- i nanočesticama s uklopljenim lijekovima (djelatnim tvarima) u odnosu na HaCaT stanice (Duvnjak Romić i sur., 2016; Hafner i sur., 2011).

Kako bi se utvrdilo je li biokompatibilnost AZT-liposoma izravno ovisna o (fosfo)lipidnom sastavu liposoma, provedena su *in vitro* ispitivanja biokompatibilnosti praznih liposoma (bez uklopljenog AZT) u rasponu koncentracija (fosfo)lipida koje odgovaraju testiranim koncentracijama AZT-liposoma. Rezultati prikazani Slikom 14 ukazuju na biokompatibilnost svih tvari korištenih za pripremu liposoma s kulturama stanica kože (vijabilnost  $\geq 70\%$ ), izuzevši CATL pri najvećoj koncentraciji lipida. Naime, fibroblasti tretirani praznim CATL-om pri najvećoj su testiranoj koncentraciji pokazali značajno smanjenu vijabilnost (57%) (Slika 14B).

Rezultati provedenih testiranja biokompatibilnosti AZT-liposoma, kao i rezultati mikrobioloških ispitivanja (Tablica 6 i 7), u skladu su s brojnim istraživanjima koja pokazuju da se uklapanjem antibiotika u liposome pospješuje antibakterijska aktivnost lijeka, ali i smanjuje njihov citotoksični potencijal (Alhajlan i sur., 2013; Halwani i sur., 2008; Mugabe i sur., 2005). Iznimkom su se pokazali jedino CATL pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji (64  $\mu\text{g AZT/ml}$ ), na kojoj je izmjerena vijabilnost stanica bila značajno niža od vijabilnosti stanica tretiranih AZT-otopinom u ekvivalentnoj koncentraciji AZT-a. Razlog je najvjerojatnije prisutnost kationskog lipida (DODAB) u lipidnom dvosloju CATL-a koji pri većoj koncentraciji pridonosi toksičnosti sustava (Slika 14B). Naime, za kationske lipide s

kvarternim amonijakom u strukturi je poznato da posjeduju inherentnu antibakterijsku aktivnost, ali i citotoksični potencijal (Manosroi i sur., 2008; Ragioto i sur., 2014; Soenen i sur., 2009). Primjerice, prisustvo 0,5 mM DODAB-a rezultiralo je 50 %-tnim smanjenjem vijabilnosti stanica u kulturi fibroblasta (Carmona-Ribeiro i sur., 1997). Tome u prilog idu i rezultati ispitivanja koja su proveli Alhajlan i suradnici (2013), a koja pokazuju da uklapanje klaritromicina u pozitivno nabijene liposome rezultira smanjenom vijabilnošću humanih A549 stanica pluća. S druge strane, negativno i neutralno nabijeni liposomi djelovali su protektivno na A549 stanice, pritom značajno smanjujući citotoksičnost klaritromicina.



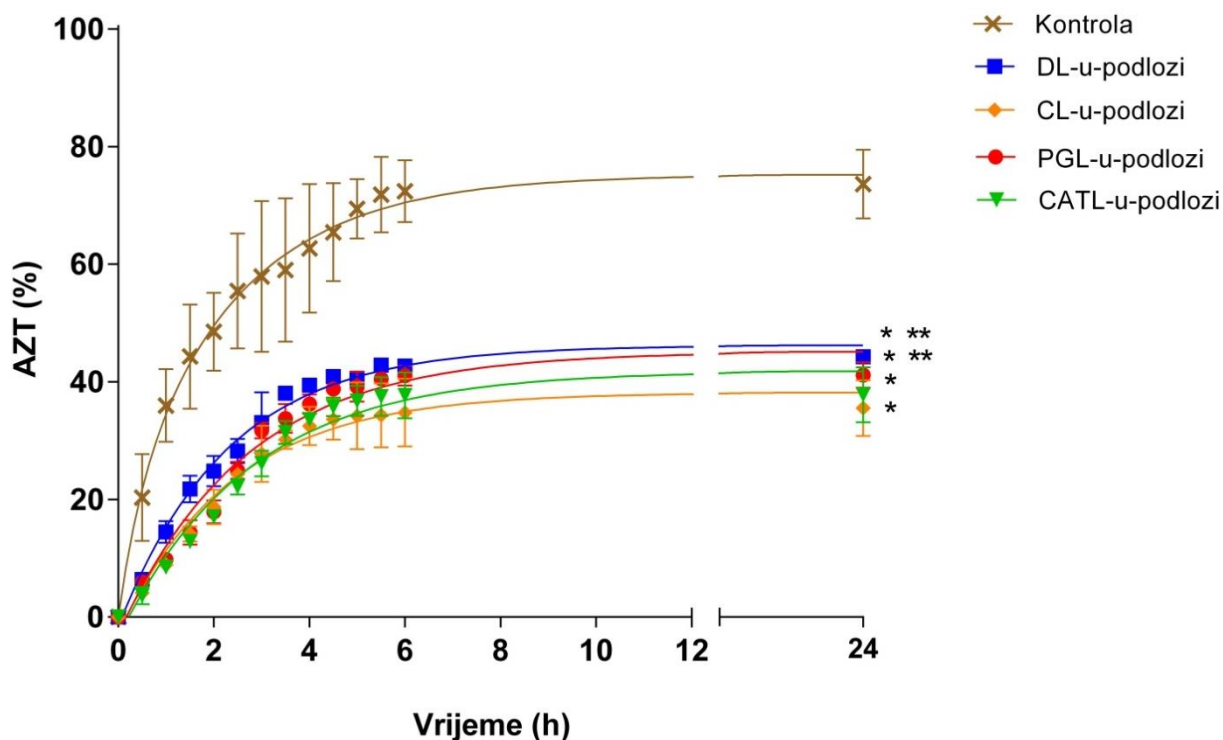
**Slika 14.** Vijabilnost keratinocita HaCaT (A) i fibroblasta MJ90hTERT (B) nakon 24 sata inkubacije s praznim liposomima ili otapalom korištenim za pripremu AZT-otopine pri 37 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± S.D. (n=3) \* Vijabilnost stanica < 70 %.

#### **4.7. *In vitro* oslobađanje AZT-a iz formulacija liposomi-u-podlozi**

Umješavanjem liposoma u viskoelastičnu podlogu postiže se odgovarajuća viskoznost liposomskog pripravka i njegovo zadržavanje na mjestu primjene (Cohen i sur., 2012; Mourtas i sur., 2007, 2008b; Paavola i sur., 2000; Pavelić i sur., 2001). Osim toga, povećanjem viskoznosti vanjske vodene faze liposoma moguće je i povećanje njihove fizičke stabilnosti (Mourtas i sur., 2008b; Pavelić i sur., 2005b). Fizičko-kemijska svojstva podloge dokazano utječu i na farmakokinetička svojstva uklopljenog lijeka, omogućujući kontrolirano i/ili produljeno oslobađanje lijeka te pospješujući penetraciju i permeaciju lijeka kroz kožu (Ruel-Gariepy i sur., 2002). Budući da interakcija između dermatološke podloge, kože, liposoma i uklopljenog lijeka može značajno utjecati na konačni klinički učinak formulacije i terapijski ishod, odabir podloge i optimizacija formulacije liposomi-u-podlozi, predstavlja važan korak u razvoju takvih terapijskih sustava namijenjenih primjeni na kožu.

Zahvaljujući hidrofilnosti, trodimenzionalnoj matriksnoj strukturi, biorazgradljivosti, bioadhezivnosti te visokom stupnju kompatibilnosti s uklopljenim lijekovima, kitozanske podloge predstavljaju prikladan farmaceutski oblik za lokalnu antimikrobnu terapiju (Yang i sur., 2018). Uz sve navedeno, kitozanske podloge pokazuju izvjesne intrinzične biološke učinke (antimikrobni učinak, poticanje cijeljenja rana, prevencija upale), što ih čini posebno zanimljivima u lokalnoj terapiji kožnih infekcija, rana i opekotina. Uzevši sve te činjenice u obzir, kitozanska podloga odabrana je za uklapanje AZT-liposoma. Za izradu viskoelastične podloge korišten je visokomolekulski kitozan, za kojeg je pokazano da ima bolji učinak na cijeljenje rana u odnosu na nisko- i srednje-molekulski kitozan (Alsarra, 2009; Minagawa i sur., 2007).

AZT-liposomi (CL, DL, PGL i CATL), iz kojih je prethodno odijeljen neuklopljeni AZT, umiješani su u kitozansku podlogu u masenom udjelu od 30 % (*m/m*), te su dobivene formulacije liposomi-u-podlozi. Ispitivanja oslobađanja AZT-a iz kitozanskih podloga s uklopljenim različitim vrstama AZT-liposoma (CL-u-podlozi, DL-u-podlozi, PGL-u-podlozi, CATL-u-podlozi) provedena su na Franzovoj difuzijskoj ćeliji, na način detaljno opisan u poglavlju 3.2.11.



**Slika 15.** Kumulativni udio (%) oslobođenog AZT-a iz kitozanske podloge s uklopljenim liposomima. Kontrola označava kitozansku podlogu koja je umjesto AZT-liposoma sadržavala ekvivalentnu količinu AZT-otopine. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost  $\pm$  S.D. (n=3). \*Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (t-test,  $P < 0,05$ ). \*\*Statistički značajna razlika u odnosu na CL-u-podlozi (t-test,  $P < 0,05$ ).

Rezultati prikazani Slikom 15 pokazuju da se uklapanjem AZT-liposoma u kitozansku podlogu značajno usporava oslobađanje AZT-a u odnosu na analogne liposomske disperzije (Slika 9). Također, oslobađanje AZT-a iz liposoma uklopljenih u kitozansku podlogu bilo je sporije u odnosu na kontrolu (AZT-otopina uklopljena u kitozansku podlogu). Takvi se rezultati poklapaju s rezultatima studije provedene na terapijskom sustavu liposomi-u-podlozi dobivenom umješavanjem liposoma s uklopljenim polifenolima (resveratrol, epikatehin) u 2,5 %-tnu ( $m/m$ ) kitozansku podlogu pripravljenu iz kitozana srednje molekulske mase. Ispitivanje je pokazalo produljeno oslobađanje polifenola iz liposoma-u-podlozi te sporiji trend oslobađanja djelatnih tvari u odnosu na disperziju liposoma (Jøraholmen i sur., 2019). Štoviše, usporedba kumulativnog udjela oslobođenog resveratrola/epikatehina (Jøraholmen i sur., 2019) s kumulativnim udjelom oslobođenog AZT-a (Slika 15) iz liposoma-u-podlozi tijekom 8 sati, ukazuje na veoma sličnu kinetiku oslobađanja *in vitro*. Pritom je krivulja oslobađanja AZT-a iz liposoma-u-podlozi strmija u odnosu na krivulje

oslobađanja resveratrola/epikatehina iz liposoma-u-podlozi, iako su Jøraholmen i suradnici koristili kitozan manje molekulske mase u odnosu na onaj korišten u ovom radu. Razlog tome mogao bi biti u nešto veći udio AZT-liposomske disperzije uklopljene u kitozansku podlogu (30 %, *m/m*) u odnosu na liposomske polifenole (20 %, *m/m*). Naime, uklapanjem većeg udjela tekuće faze u kitozansku podlogu bitno se smanjuje njena mikroviskoznoš, što se reflektira na oslobađanje uklopljenog lijeka iz formulacije. U prilog toj tezi ide i ispitivanje provedeno na kitozanskoj podlozi s uklopljenim liposomskim kloramfenikolom, gdje je korišten kitozan visoke molekulske mase u jednakoj koncentraciji kao u ovom ispitivanju, ali s manjim udjelom liposoma u podlozi (10 %, *m/m*). Pritom je pokazano sporije oslobađanje kloramfenikola iz liposoma-u-podlozi unutar prvih 6 sati ispitivanja (Hurler i i Škalko Basnet, 2012) nego u ovom radu.

Poput resveratrola, epikatehina i kloramfenikola korištenih u opisanim studijama, AZT je molekula koja pokazuje veoma slabu topljivost u vodi, što se pokazalo jednim od ključnih parametara koji utječu na brzinu oslobađanja lijeka iz terapijskih sustava liposomi-u-podlozi. U istraživanjima koja su proveli Mourtas i suradnici (2007), difuzija lipofilnog lijeka iz liposoma u podlogu bila je značajno sporija od difuzije lijeka iz podloge u okoliš te je predstavljala glavni čimbenik koji je utjecao na brzinu oslobađanja lijeka iz formulacije liposomi-u-podlozi. Nadalje, pokazali su da su za amfipatske i lipofilne lijekove topljivost u vodi i stupanj lipofilnosti ključni parametri koji određuju razdjeljivanje lijeka između liposoma i podloge te njegovo oslobađanje u okolni medij, dok je oslobađanje hidrofilnog lijeka iz liposoma-u-podlozi određeno ponajprije fizičko-kemijskim svojstvima liposoma uklopljenih u podlogu (Mourtas i sur., 2008a). Međutim, rezultati provedenih ispitivanja s lipofilnim AZT-om (Slika 15) ukazuju na značajan utjecaj elastičnosti/rigidnosti liposoma na profil oslobađanja AZT-a iz liposoma-u-podlozi. Između formulacija CL-u-podlozi i CATL-u-podlozi nije utvrđena statistički značajna razlika u brzini oslobađanja AZT-a (*t*-test,  $P > 0,05$ ), ali se AZT zato znatno brže oslobađao iz elastičnih liposoma uklopljenih u kitozansku podlogu (DL-u-podlozi, PGL-u-podlozi), nego iz podloge s uklopljenim konvencionalnim liposomima (CL-u-podlozi). Dobiveni profili oslobađanja AZT-a iz različitih tipova liposoma uklopljenih u kitozansku podlogu u suglasnosti su s istraživanjem provedenim na polučvrstim formulacijama elastičnih liposoma s hidrofilnim lijekom (diklofenaknatrij), a koje je pokazalo brže oslobađanje lijeka iz karbopolskih podloga s uklopljenim elastičnim liposomima u odnosu na karbopolske podloge s uklopljenim konvencionalnim liposomima (Palac i sur., 2014b). Takvi rezultati mogu se pripisati

elastičnosti lipidnog dvosloja DL-a i PGL-a, odnosno povećanoj permeabilnosti njihovih membrana u odnosu na liposome s čvrstim dvoslojevima (CL, CATL).

Ruel-Gariepy i suradnici (2002) također su pokazali da sastav, odnosno rigidnost liposomske membrane utječe na brzinu oslobađanja karboksifluoresceina iz liposoma uklopljenih u kitozansku podlogu. Točnije, dodatkom kolesterola u fosfolipidne dvoslojeve građene od fosfatidilkolina smanjeno je oslobađanje karboksifluoresceina za 20 % u odnosu na liposome bez kolesterola. U istoj je studiji utvrđeno da liposomi pripremljeni iz kolesterola i distearoilfosfatidilkolina (DSPC), fosfolipida s visokom  $T_c$  (55 °C), pokazuju nešto veću fizičku stabilnost od liposoma građanih od fosfatidilkolina i kolesterola. Međutim, ispitivanjem brzine oslobađanja karboksifluoresceina iz liposoma-u-podlozi, nije utvrđena bitna razlika između DSPC/kolesterol i fosfatidilkolin/kolesterol liposoma uklopljenih u podlogu, što je u skladu s ovdje prikazanim rezultatima (nije utvrđena značajna razlika između CATL-u-podlozi i CL-u-podlozi s obzirom na profil oslobađanja AZT-a).

Utjecaj sastava (fosfo)lipidnog dvosloja na interakciju liposoma s podlogom i oslobađanje lijeka iz liposoma-u-podlozi potvrđen je i u drugim studijama (Cohen i sur., 2012; DiTizio i sur., 1998; Li i sur., 2012). Hurler i suradnici (2013b) su pokazali da naboj na površini liposoma utječe na oslobađanje uklopljenih fluorescentnih markera iz liposoma inkorporiranih u karbopolsku ili kitozansku podlogu. Pritom je oslobađanje bilo brže iz negativno nabijenih liposoma, a sporije iz pozitivno nabijenih liposoma u odnosu na neutralne liposome. Nasuprot tome, rezultati prikazani u ovom radu ne ukazuju na jednoznačni utjecaj površinskog naboja AZT-liposoma na brzinu oslobađanja AZT-a iz sustava liposomi-u-podlozi. Iako se AZT brže oslobađao iz formulacija DL-u-podlozi i PGL-u-podlozi u odnosu na CATL-u-podlozi (ANOVA,  $P < 0,05$ ), nije uočena značajna razlika u brzini oslobađanja AZT-a između negativno nabijenih konvencionalnih i pozitivno nabijenih kationskih liposoma uklopljenih u kitozansku podlogu (t-test,  $P > 0,05$ ), već je presudan parametar za uočene razlike u udjelu oslobođenog AZT-a bila elastičnost/čvrstoća liposomskih dvoslojeva.

#### 4.8. *In vitro* antibakterijski učinak formulacija liposomi-u-podlozi

Dosadašnja istraživanja su pokazala prikladnost korištenja kitozanskih podloga za uklapanje antimikrobnih djelatnih tvari (Denis i sur., 2012; Hurler i Škalko-Basnet, 2012; Hurler i sur., 2012, 2013a; Riberio i sur., 2009), zbog čega je kitozanska podloga odabrana za uklapanje AZT-liposoma. Osim odgovarajuće viskoznosti te postizanja produljenog, kontroliranog i lokaliziranog oslobađanja AZT-a, uklapanje AZT-liposoma u kitozansku podlogu u ovom je istraživanju imalo za cilj postizanje poboljšanog antimikrobnog učinka liposomskog AZT-a uslijed prisustva kitozana u terapijskom sustavu.

Određivanje antibakterijske aktivnosti liposoma-u-podlozi provedeno je korištenjem *in vitro* agar-difuzijske metode, a rezultati ispitivanja prikazani su Tablicom 8.

**Tablica 8.** Inhibicijske zone (mm) formulacija liposomi-u-podlozi i kontrole nakon 24 sata inkubacije.

Formulacija	ATCC 29213	MFBF 10674	MFBF 10676	MFBF 10677	MFBF 10679	MFBF 10680
CL-u-podlozi	20,9±2,0*	19,1±0,6*	16,9±0,6	16,2±1,5*	16,1±0,1*	17,1±1,3
DL-u-podlozi	26,2±0,2*	24,7±0,9*	27,7±1,3*	26,2±0,3*	23,4±1,4*	24,4±0,5*
PGL-u-podlozi	24,4±1,0*	23,8±1,2*	23,1±0,7*	20,1±0,6*	23,7±0,2*	22,6±1,2*
CATL-u-podlozi	28,1±0,5*	26,2±1,0*	27,5±2,4*	28,5±2,2*	27,3±1,7*	27,4±2,4*
Kontrola	16,8±0,3	15,7±0,2	16,2±0,1	14,8±1,1	14,4±0,3	14,3±0,8

CATL-u-podlozi, kitozanska podloga s uklopljenim kationskim liposomima; CL-u-podlozi, kitozanska podloga s uklopljenim konvencionalnim liposomima; DL-u-podlozi, kitozanska podloga s uklopljenim deformabilnim liposomima; PGL-u-podlozi, kitozanska podloga s uklopljenim propilenglikol liposomima. Prikazane vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost ± S.D. (n=2). \*Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (t-test,  $P < 0,05$ ).

Intenzitet antibakterijskog učinka, tj. promjer inhibicijskih zona utvrđenih na odabranom soju zlatnog stafilokoka i MRSA izolatima (Tablica 8), ovisio je o tipu liposoma i o bakterijskom soju/izolatu. Formulacija CL-u-podlozi na svim je ispitivanim sojevima pokazala manji inhibicijski učinak na rast bakterija u usporedbi s drugim formulacijama liposomi-u-podlozi (ANOVA,  $P < 0,05$ ). Pritom su izmjerene zone inhibicije za CL-u-podlozi bile značajno veće od kontrole (t-test,  $P < 0,05$ ), izuzevši MRSA izolate MFBF 10676 i MFBF 10680 (t-test,  $P > 0,05$ ). Ostale formulacije liposomi-u-podlozi (DL-u-podlozi, PGL-u-podlozi, CATL-u-podlozi) na svim su testiranim sojevima pokazale inhibicijski učinak bolji od kontrole (t-test,  $P < 0,05$ ).

Za *S. aureus* ATCC 29213 i MRSA izolat MFBF 10674 izmjerene su zone inhibicije formulacija DL-u-podlozi i CATL-u-podlozi bile slične (ANOVA,  $P > 0,05$ ), dok je formulacija PGL-u-podlozi pokazala manju uspješnost u inhibiciji bakterijskog rasta od formulacije CATL-u-podlozi (ANOVA,  $P < 0,05$ ). Na MRSA izolatima MFBF 10676 i MFBF 10677 formulacija CATL-u-podlozi također je pokazala značajno veće zone inhibicije u odnosu na PGL-u-podlozi (ANOVA,  $P < 0,05$ ), a na ovim se sojevima formulacija PGL-u-podlozi pokazala manje uspješnom i od DL-u-podlozi (ANOVA,  $P < 0,05$ ). Za sojeve MFBF 10679 i MFBF 10680 utvrđen je bolji inhibicijski učinak formulacije CATL-u-podlozi od formulacija CL-u-podlozi i PGL-u-podlozi (ANOVA,  $P < 0,05$ ), a za soj MFBF 10679 bolji učinak CATL-u-podlozi dokazan je i u odnosu na DL-u-podlozi (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

Na osnovu prikazanih rezultata anti-MRSA učinka svih ispitivanih formulacija liposomi-u-podlozi, očito je da su, izuzevši CL-u-podlozi, čiji je anti-MRSA učinak na određenim sojevima (MFBF 10676 i MFBF 10680) bio sličan kontroli, liposomi uklopljeni u kitozansku podlogu imali značajno bolji *in vitro* antibakterijski potencijal u odnosu na otopinu AZT-a uklopljenu u podlogu. Za većinu ispitivanih MRSA izolata (izuzevši MFBF 10679) CATL-u-podlozi i DL-u-podlozi su pokazali slične promjere inhibicijskih zona (ANOVA,  $P > 0,05$ ). Usporedba formulacija CATL-u-podlozi i DL-u-podlozi s PGL-u-podlozi je pokazala da je formulacija CATL-u-podlozi potentnija od formulacije PGL-u-podlozi na svim testiranim bakterijskim sojevima (ANOVA,  $P < 0,05$ ), dok je formulacija DL-u-podlozi bila bolja od formulacije PGL-u-podlozi samo na sojevima MFBF 10674 i MFBF 10676 (ANOVA,  $P < 0,05$ ). Uzevši sve navedeno u obzir, očito je da formulacija CATL-u-podlozi posjeduje najjači anti-MRSA potencijal, a potom slijede redom DL-u-podlozi, PGL-u-podlozi i CL-u-podlozi.



Premda dostupna znanstvena literatura upućuje na antimikrobni potencijal kitozana (Akncbay i sur., 2007; Kandimalla i sur., 2013; Li i sur., 2011), u ovom istraživanju prazna kitozanska podloga (bez AZT-a) nije pokazala inhibicijski učinak na rast bakterija u agaru. Razlog takvih proturječnih rezultata mogu biti različite bakterijske vrste koje su ispitivane, različite metode određivanja antibakterijskog učinka, različiti pH podloge, različita molekulska masa, stupanj deacetilacije, koncentracija ili tip kitozana koji je korišten za izradu podloge, a za koje se pokazalo da mogu utjecati na biološku aktivnost kitozana (Dai i sur., 2011). Primjerice, klinička studija provedena na 15 pacijenata pokazala je da je 1 %-tna kitozanska podloga (priređena iz kitozana visoke molekulske mase), zasebno i u kombinaciji s metronidazolom, učinkovita u tretiranju kroničnog periodontitisa. Iako autori zaključuju da kitozanska podloga posjeduje antimikrobna svojstva, u tom istraživanju nije dokazan direktan antibakterijski učinak kitozanske podloge u kulturama bakterija, već su markeri gingivalne upale korišteni kao indirektna mjera antibakterijskog učinka (Akncbay i sur., 2007). Kandimalla i suradnici (2013) su koristili kitozan srednje molekulske mase, u koncentraciji 0,125 % do 1 % za pripravu podloge u koju su uklopili metronidazol. Iako su pokazali da kitozanska podloga potencira antibakterijski učinak metronidazola *in vitro* te da je znatno učinkovitija u razaranju biofilma *P. aeruginosa* od polikarbofilne podloge, antibakterijski učinak same podloge (bez antibiotika) nije ispitan. Antibakterijski učinak kitozanske podloge na više različitih bakterijskih vrsta, uključujući *S. aureus*, ispitivali su i Li i suradnici (2011). Međutim, kitozanska podloga u njihovom istraživanju bila je bazirana na kemijski modificiranom kitozanu (kitozan deriviran dodatkom hidrofobnog alkilnog lanca, hidrofilnog polietilenglikolnog lanca i metakrilata, te kvarternizacijom amino skupine).

U konačnici treba naglasiti da su, uz nabrojane različitosti, sva gore opisana istraživanja koristila drugačije metode za utvrđivanje antibakterijskog učinka, što također može biti uzrok proturječnostima u rezultatima. S druge strane, rezultati dobiveni *in vivo* ispitivanjem na štakorima (Cakmak i sur., 2009), u suglasnosti su s ovdje prezentiranim rezultatima. Naime, 8 dana nakon implantacije mrežice obložene kitozanskim gelom (kitozan visoke molekulske mase) s uklopljenim triklozanom, uz istovremeno inficiranje životinja sa *S. aureus*-om, utvrđen je preventivni antimikrobni učinak formulacije kitozana, bez tragova apscesa, nekroze i gnojnog eksudata. Međutim, u skupini životinja kojima je implantirana mrežica obložena kitozanskim gelom bez antibiotika, u istom je periodu došlo do razvoja infekcije i nekroze u rani, odnosno nije dokazan antimikrobni učinak „prazne“ kitozanske podloge.

Usprkos tome što ispitivanje antimikrobnog učinka temeljeno na određivanju promjera zona inhibicije bakterijskog rasta (Tablica 8) nije pokazalo anti-MRSA djelovanje same podloge, logično je pretpostaviti da specifična mikrostruktura viskoelastične kitozanske podloge, zahvaljujući kojoj se postiže produljeno i kontrolirano oslobađanje AZT-a (Slika 15) te produljeno zadržavanje na mjestu primjene, ipak može imati indirektan utjecaj na ukupna antibakterijska svojstva formulacije, posebice *in vivo*.

Osim ispitivanja antimikrobnog učinka liposoma-u-podlozi u odnosu na izvornu kitozansku podlogu (bez AZT-a) i kontrolu (s uklopljenom AZT-otopinom), istom je metodom (agar-difuzijski test) ispitan inhibicijski učinak AZT-liposoma (tekuće disperzije) na rast odabranih stafilokoka (Tablica 9).

**Tablica 9.** Inhibicijske zone (mm) AZT-liposoma i AZT-otopine nakon inkubacije 24 sata.

Formulacija	ATCC 29213	MFBF 10674	MFBF 10676	MFBF 10677	MFBF 10679	MFBF 10680
CL	25,6±1,1*	25,6±1,5*	24,1±2,0	24,3±1,3*	24,0±0,8*	24,0±3,8
DL	29,1±4,1*	27,2±2,7*	27,6±0,5*	27,2±1,4*	26,7±2,1*	25,2±0,0*
PGL	27,6±2,2*	26,0±0,0*	26,3±0,4*	25,5±0,7*	25,5±0,7*	26,0±0,0*
CATL	29,3±3,6*	28,1±3,6*	29,0±3,2*	27,4±0,9*	26,8±1,8*	26,8±1,8*
AZT-otopina	21,8±1,1	16,9±2,7	20,5±1,8	19,5±1,1	20,3±2,1	19,9±2,7

CATL, kationski liposomi; CL, konvencionalni liposomi; DL, deformabilni liposomi; PGL, propilenglikol liposomi. Prikazane vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost ± S.D. (n=2). \*Statistički značajna razlika u odnosu na AZT-otopinu (t-test,  $P < 0,05$ ).

Zone inhibicije bakterijskog rasta izmjerene za sve AZT-liposome bile su značajno veće od onih izmjerenih za AZT-otopinu (t-test,  $P < 0,05$ ). Izuzetak su bili CL, za koje na MRSA izolatima MFBF 10676 i 10680 nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na AZT-otopinu (t-test,  $P > 0,05$ ). Usporedba izmjerenih inhibicijskih zona različitih AZT-liposoma pokazuje da ne postoji značajna razlika u aktivnosti AZT-liposoma prema

različitim MRSA izolatima (ANOVA,  $P > 0,05$ ), izuzevši CATL koji se pokazao učinkovitijim od CL-a na izolatima MFBF 10676 i 10677, ali i od PGL-a na izolatu MFBF 10676 (ANOVA,  $P < 0,05$ ). Za prazne liposome (bez AZT-a) utvrđen je potpuni izostanak zona inhibicije, kao i za kontrolu otapala (smjesa etanola i vode; 6/4, V/V). Takvi rezultati su u suglasnosti s rezultatima dobivenima metodom dvostruke mikrodilucije (Tablica 6), iako valja primijetiti da je agar-difuzijski test pokazao manji kapacitet za diferenciranje liposomskih preparacija međusobno. U ranije spomenutoj studiji Elmoslemany i suradnika (2012) (poglavlje 1.6.2), agar-difuzijskom metodom utvrđene su zone inhibicije rasta *C. albicans* za liposomski mikonazolnitrat, koje su potvrdile veći antifungalni potencijal liposomskog mikonazolnitrata u odnosu na otopinu lijeka, ali i superiornost propilenglikol liposoma u odnosu na konvencionalne liposome.

Promjeri zona inhibicije za AZT-liposome (Tablica 9) bili su 1,1-1,4 puta veći u odnosu na istu liposomsku formulaciju kada je uklopljena u kitozansku podlogu (Tablica 8) (t-test,  $P < 0,05$ ). Međutim, kada se u obzir uzme da je koncentracija AZT-a u izvornim liposomskim suspenzijama bila čak 3,3 puta veća od koncentracije AZT-a u analognim formulacijama liposomi-u-podlozi (izvorne liposomske preparacije dodane su u kitozansku podlogu u masenom udjelu od 30 %), proizlazi da se uklapanjem u kitozansku podlogu postiže poboljšanje antibakterijskog potencijala AZT-liposoma, kao i AZT-otopine. Naime, liposomi uklopljeni u viskoelastičnu kitozansku podlogu omogućuju bolje zadržavanje pripravka na mjestu primjene i bolju interakciju s mikrookolišem te kontrolirano oslobađanje antibiotika u cilju postizanja produljenog antibakterijskog učinka. Produljenim oslobađanjem antibiotika moguće je poboljšati i antimikrobni učinak uklopljenog lijeka, budući da se na taj način osigurava konstantna koncentracija antibiotika na mjestu primjene, uz značajno manje oscilacije u koncentraciji (Yang i sur., 2018).

Dobiveni rezultati djelomično su u skladu s rezultatima objavljenima u studiji Darwhekar i suradnika (2012), a koji su primjenom agar-difuzijskog testa pokazali da deformabilni liposomi s uklopljenim neomicinsulfatom postižu jači inhibicijski učinak na *S. aureus* od otopine lijeka. U sklopu provedenih istraživanja određivan je antibakterijski učinak deformabilnih liposoma uklopljenih u karbopolsku podlogu, za koji su zabilježene veće inhibicijske zone od otopine neomicinsulfata u podlozi. Iako je promjer zona inhibicije bio veći za tekuću liposomsku disperziju u odnosu na liposome-u-podlozi, iz podataka navedenih u radu nije moguće ustanoviti jesu li koncentracije antibiotika u oba ispitivana pripravka (liposomska disperzija i liposomi-u-podlozi) bile jednake, te stoga nije moguća valjana usporedba s ovdje opisanim rezultatima.

## 4.9. Teksturna i reološka karakterizacija formulacija liposomi-u-podlozi

Ponašanje i svojstva viskoelastičnih podloga *in vivo* izravno su povezana s njihovim reološkim i teksturnim karakteristikama (Elnaggar i sur., 2014; Yu i sur., 2011). One su pak uvelike određena sastavom podloge, pri čemu samo jedan konstituens može značajno promijeniti reološke karakteristike sustava (Hurler i sur., 2012; Owen i sur., 2001). Stoga je poznavanje reoloških i teksturnih svojstava dermatoloških pripravaka veoma važno, posebice za potencijalno prenošenje proizvodnog procesa iz laboratorijskih u industrijske uvjete proizvodnje (engl. *scale-up*), ali i kliničku primjenu. Naime, viskoznost formulacije utječe na njezino zadržavanje na mjestu primjene, oslobađanje uklopljenog lijeka i u konačnosti, terapijsku učinkovitost (Vanić i sur., 2014b).

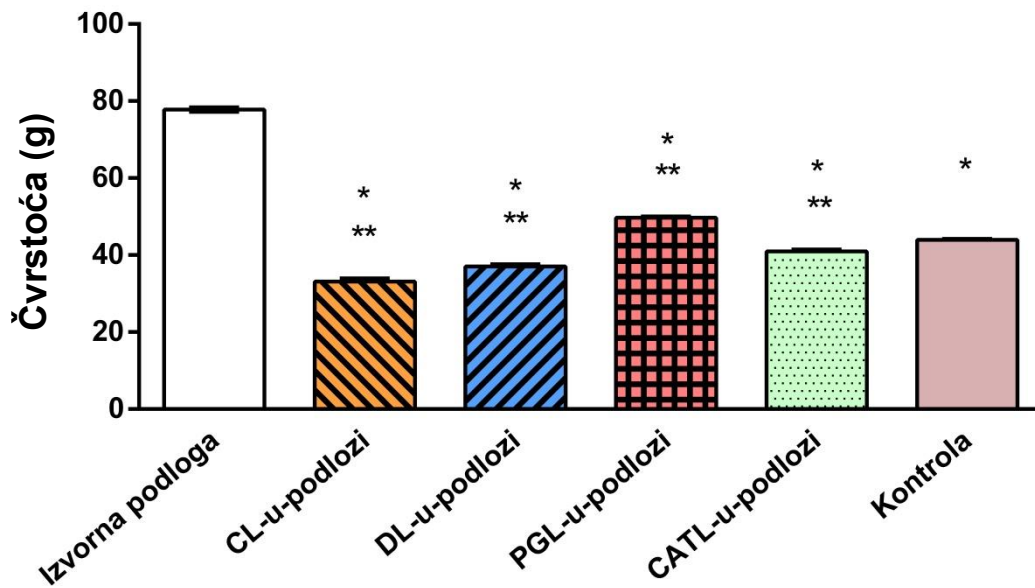
### 4.9.1. Teksturna svojstva formulacija liposomi-u-podlozi

Karakterizacija kitozanskih podloga s uklopljenim AZT-liposomima uključivala je teksturnu analizu mehaničkih svojstava formulacija, tj. procjenu teksturnih parametara: čvrstoće, adhezivnosti i kohezivnosti. Ti su parametri u izravnoj korelaciji s razmazivošću pripravka (čvrstoća) i zadržavanjem pripravka na mjestu primjene (adhezivnost) te sposobnošću istiskivanja pripravka iz spremnika/tube (kohezivnost) (Hurler i Škalko-Basnet, 2012; Hurler i sur., 2012; Vanić i sur., 2014a).

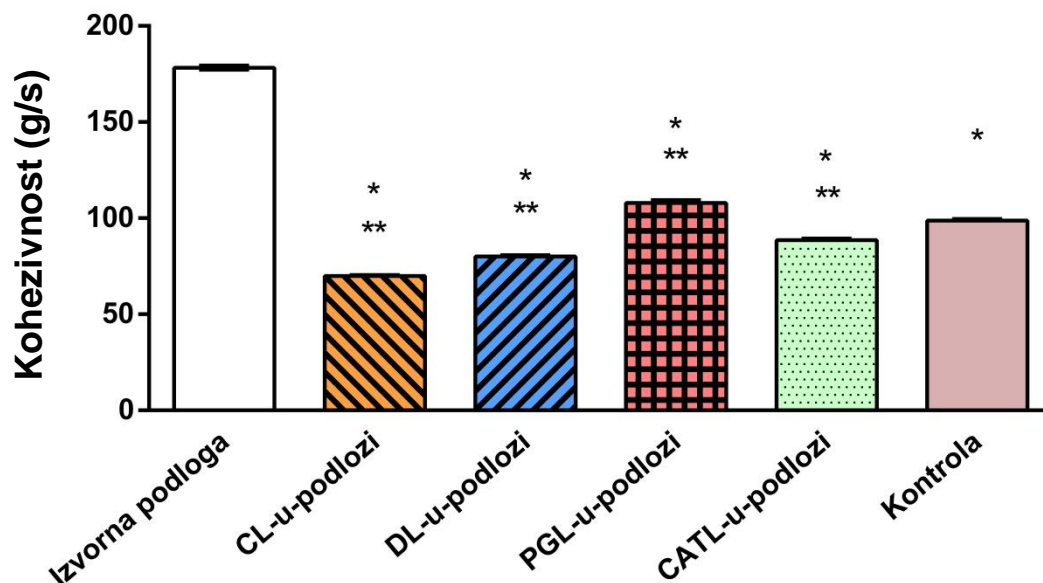
Rezultati ispitivanja prikazani Slikama 16-18 pokazuju da se umješavanjem 30 % (*m/m*) AZT-liposoma ili AZT-otopine u izvornu kitozansku podlogu značajno mijenjaju njezini teksturni parametri: čvrstoća, kohezivnost i adhezivnost (t-test,  $P < 0,05$ ). Dodatkom AZT-liposoma ili AZT-otopine čvrstoća kitozanske podloge značajno opada (Slika 16). Najmanje smanjenje čvrstoće utvrđeno je za PGL-u-podlozi, potom slijede kontrola, CATL-u-podlozi i DL-u-podlozi, dok je najveća promjena čvrstoće zabilježena za CL-u-podlozi.

Umješavanje disperzije AZT-liposoma ili AZT-otopine u kitozansku podlogu očekivano se odrazilo i na smanjenje njezine kohezivnosti (t-test,  $P < 0,05$ ) (Slika 17). Usporedba sustava liposomi-u-podlozi i kontrole pokazala je da PGL najmanje narušava kohezivnost kitozanske podloge, odnosno potpomažu očuvanje njezine strukture u usporedbi s AZT-otopinom (kontrola). Kohezivnost CATL-u-podlozi je bila veoma slična kohezivnosti kontrole, dok je najniža kohezivnost utvrđena za CL-u-podlozi.

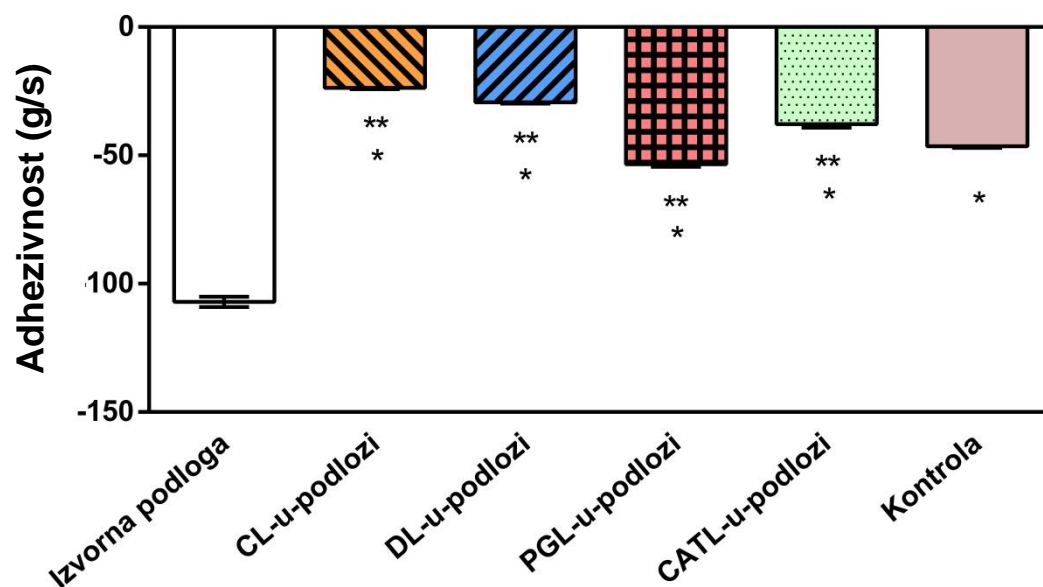
Adhezivnost kitozanske podloge se također značajno smanjila dodatkom disperzije AZT-liposoma ili AZT-otopine (t-test,  $P < 0,05$ ). Usporedbom formulacija liposomi-u-podlozi i kontrole, slično kao i za parametre čvrstoće i kohezivnosti, utvrđena je najveća adhezivnost za PGL-u-podlozi, dok su CL-u-podlozi i DL-u-podlozi bili značajno manje adhezivni (Slika 18).



**Slika 16.** Utjecaj dodatka disperzije AZT-liposoma ili AZT-otopine (kontrola) na čvrstoću kitozanske podloge. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D. (n=5). \*Statistički značajna razlika u odnosu na izvornu kitozansku podlogu (t-test,  $P < 0,05$ ). \*\*Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (t-test,  $P < 0,05$ ).



**Slika 17.** Utjecaj dodatka disperzije AZT-liposoma ili AZT-otopine (kontrola) na kohezivnost kitozanske podloge. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D. (n=5). \*Statistički značajna razlika u odnosu na izvornu kitozansku podlogu (t-test,  $P < 0,05$ ). \*\* Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (t-test,  $P < 0,05$ )



**Slika 18.** Utjecaj dodatka disperzije AZT-liposoma ili AZT-otopine (kontrola) na adhezivnost izvorne kitozanske podloge. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D. (n=5). \*Statistički značajna razlika u odnosu na izvornu kitozansku podlogu (t-test,  $P < 0,05$ ). \*\*Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (t-test,  $P < 0,05$ )

Provedena ispitivanja teksturnih svojstava formulacija liposomi-u-podlozi pokazuju da se svi ispitivani teksturni parametri značajno mijenjaju, tj. opadaju, dodatkom disperzije AZT-liposoma ili AZT-otopine (kontrola) u izvornu kitozansku podlogu (Slike 16-18). Takvi rezultati su očekivani zbog relativno velikog udjela tekuće faze (disperzije liposoma ili otopine AZT) koja je dodana u sustav (30 %, *m/m*), pri čemu dolazi do značajnog razrjeđivanja viskoelastične podloge kitozana, odnosno smanjenja ukupne koncentracije polimera te posljedično manje viskoznosti sustava, čime se značajno mijenjaju njegova teksturna svojstva. U prilog tome idu i rezultati dosadašnjih provedenih studija s karbopolskim i kitozanskim viskoelastičnim podlogama, koje pokazuju da je opseg promjene teksturnih svojstava bio veći što je udio liposoma u sustavu liposomi-u-podlozi bio veći (Hurler i sur., 2011, 2013b; Palac i sur., 2014b; Vanić i sur., 2014a).

Karbopolske podloge pokazale su visok stupanj kompatibilnosti s anionskim liposomima, budući da se njihova teksturna svojstva nisu značajno mijenjala u usporedbi s kontrolom (Palac i sur., 2014b; Vanić i sur., 2014a). S druge strane, za kitozanske podloge pripravljene iz kitozana visoke molekuleske mase (2,5 %, *m/m*) je utvrđeno da površinski naboj liposoma može imati utjecaja na teksturna svojstva. Pozitivno i negativno nabijeni liposomi pokazali su manje narušavanje teksturnih svojstava izvorne podloge od neutralnih liposoma, pri čemu su pozitivno nabijeni liposomi više utjecali na teksturna svojstva podloga od negativno nabijenih liposoma (Hurler i sur., 2013b). S obzirom da je promjena čvrstoće, kohezivnosti i adhezivnosti u ovom radu bila veća za CL i DL uklopljene u podlogu nego za PGL, CATL i otopinu lijeka uklopljene u podlogu (Slika 16-18), očito je da gradivne komponente AZT-liposoma i prisustvo suotapala (propilenglikol) utječu na njihovu interakciju s kitozanskom podlogom. Suprotno rezultatima koje su prikazali Hurler i suradnici (2013b), u ovom je istraživanju promjena čvrstoće i adhezivnosti nakon dodatka AZT-liposoma u kitozansku podlogu bila manje izražena za kationske (CATL) nego za anionske liposome (CL, DL). Izuzetak je formulacija PGL-u-podlozi (anionski liposomi), kod koje je promjena navedenih teksturnih parametara bila najmanja od svih ispitivanih formulacija liposomi-u-podlozi, ali i od kontrole. Pretpostavlja se da propilenglikol iz disperzije PGL-a, doprinosi ukupnoj viskoznosti formulacije, pa su promjene teksturnih parametara u odnosu na izvornu kitozansku podlogu bile manje nego za ostale AZT-liposome uklopljene u kitozansku podlogu i kontrolu. Ovu pretpostavku potkrepljuju rezultati istraživanja u kojem se pokazalo da uklapanje liposomskih disperzija u kitozansku podlogu bez dodanog glicerola rezultira manjom kohezivnošću podloge u odnosu na formulaciju liposomi-u-podlozi s dodatkom glicerola (Hurler i sur., 2012). Glicerol mijenja prirodu

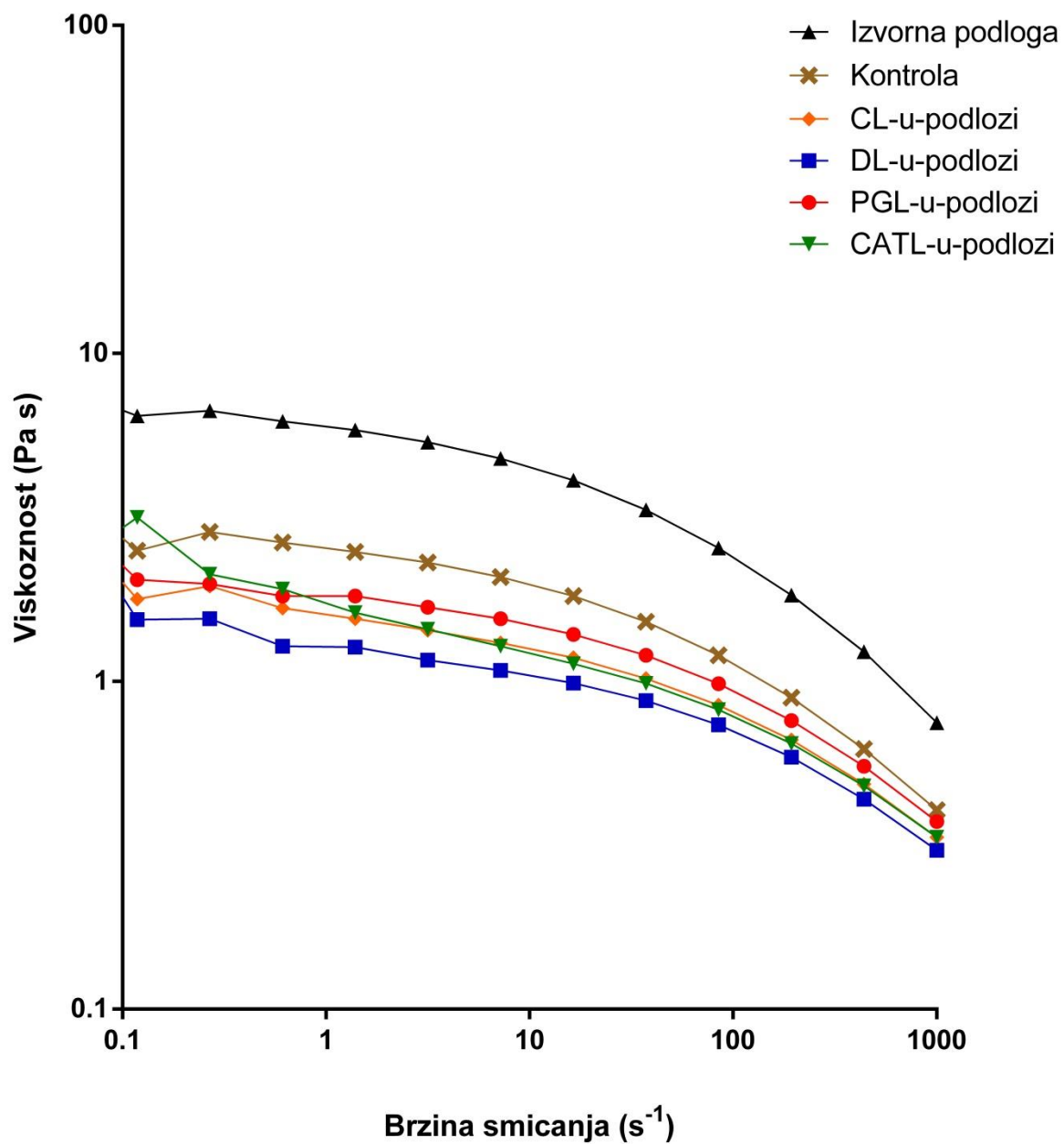
vodikovih veza unutar kitozanske podloge te time utječe na njezina svojstva (Islam i sur., 2004), a budući da su glicerol i propilenglikol srodna suotapala (veće viskoznosti u odnosu na vodu), moguće je da propilenglikol pokazuje slične učinke u interakciji s kitozanskim viskoelastičnim podlogama. U nedavno objavljenom istraživanju je potvrđeno da dodatak 10 % propilenglikola u 2,5 %-tnu kitozansku podlogu, priređenu iz kitozana visoke molekulske mase, rezultira podlogom superiornih teksturnih svojstava (Jøraholmen i sur., 2019).

#### **4.9.2. Viskoznost formulacija liposomi-u-podlozi**

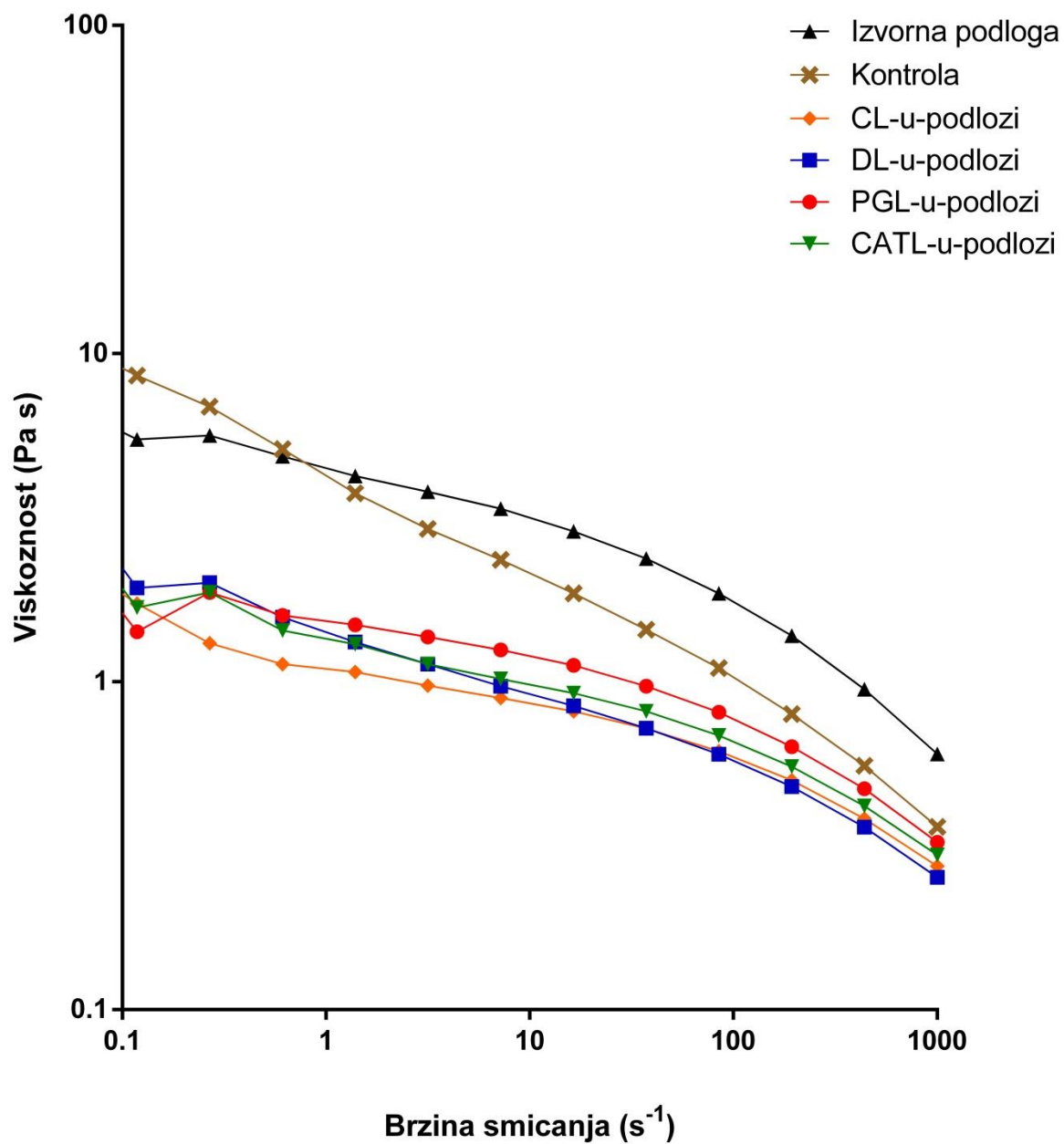
Profili viskoznosti (engl. *flow curve*) kitozanske podloge bez ili s uklopljenim AZT-liposomima, tj. AZT-otopinom izmjereni su pri temperaturi 25 °C (Slika 19) i 34 °C (Slika 20), što odgovara standardnoj sobnoj temperaturi i temperaturi na površini kože. Kao relevantni raspon viskoznosti uzet je onaj unutar brzine smicanja od 0,1 do 1000 s<sup>-1</sup>. Svi uzorci su pokazali očekivano ne-Newtonovsko ponašanje, karakteristično za pseudoplastične sustave. Naime, viskoznost formulacija je bila ovisna o brzini smicanja te se povećanjem brzine viskoznost smanjivala. Kod manjih smičnih brzina pseudoplastični sustav ima konstantnu viskoznost, budući da u sustavu postoje brojne međumolekulske interakcije, a lanci polimera su međusobno umreženi u klupko. Kako se povećava vanjska sila, viskoznost pseudoplastičnih sustava se smanjuje te u trenu postizanja kritične vrijednosti smične brzine ili smičnog naprezanja dolazi do naglog pada viskoznosti, kao rezultat mikrostrukturnih preslagivanja u sustavu (raskid međumolekulskih interakcija, odmotavanje i slaganje lanaca polimera u paralelne snopove). Takvo je ponašanje (engl. *shear-thinning*) očekivano kod polimernih viskoelastičnih podloga, te poželjno, jer omogućuje da se podloga primjenom vanjske sile lako razmazuje po površini, dok se prestankom djelovanja vanjske sile formulacija prestaje gibati te se zadržava na mjestu primjene (das Neves i sur., 2009).

Rezultati provedenih ispitivanja viskoznosti kitozanske podloge pokazuju da dodatak AZT-otopine u podlogu rezultira smanjenjem viskoznosti same podloge (Slika 19). Umješavanje AZT-liposoma u kitozansku podlogu također je uzrokovalo smanjenje njezine viskoznosti, a učinak je bio i veći nego za AZT-otopinu (kontrola) (Slika 19). Takve promjene u viskoznosti zabilježene su za sve ispitivane formulacije liposomi-u-podlozi pri obje temperature, 25 °C (Slika 19) i 34 °C (Slika 20). Izuzetak je kontrola koja je pri 34 °C i pri malim brzinama smicanja (manjima od 1 s<sup>-1</sup>) imala veću viskoznost od izvorne podloge (Slika 20).





**Slika 19.** Profili viskoznosti formulacija liposomi-u-podlozi, kontrole i izvorne kitozanske podloge pri 25 °C.



**Slika 20.** Profili viskoznosti formulacija liposomi-u-podlozi, kontrole i izvorne kitozanske podloge pri 34 °C.

Mourtas i suradnici (2008b) su pokazali da se reološka svojstva karbopolskih i hidroksietilceluloznih viskoelastičnih podloga značajno mijenjaju ovisno o fizičko-kemijskim svojstvima liposoma koji se dodaju u podlogu. Pritom su utvrdili da elastičnost/rigidnost liposomskih dvoslojeva i koncentracija liposoma u sustavu značajno doprinose reološkim karakteristikama formulacije liposomi-u-podlozi. Tako primjerice liposomi pripremljeni s lecitinom nisu pokazali značajan utjecaj na profil viskoznosti, dok su liposomi pripremljeni s hidrogeniranim fosfatidilkolinom, odnosno kombinacijom hidrogeniranog fosfatidilkolina i kolesterola u fosfolipidnim dvoslojevima, značajno utjecali na viskoznost formulacije liposomi-u-podlozi. Pokazali su da što je liposomska membrana čvršća (rigidnija) i koncentracija uklopljenih liposoma veća, to će utjecaj na viskoznost sustava biti veći (Mourtas i sur., 2008b). Međutim, rezultati prikazani Slikama 19 i 20 nisu potvrdili isti trend za ispitivane liposomske formulacije uklopljene u kitozansku podlogu. Naime, pri brzinama smicanja većim ili jednakim  $1\text{ s}^{-1}$  nije utvrđena značajnija razlika između elastičnih liposoma (DL i PGL) u odnosu na rigidne liposome (CL, CATL). S druge strane, takvi su rezultati u skladu s onima dobivenima za karbopolske podloge s uklopljenim deformabilnim propilenglikol liposomima i konvencionalnim liposomima, kod kojih nije utvrđena statistički značajna razlika u reološkim svojstvima ispitivanih formulacija liposomi-u-podlozi. Međutim, profili viskoznosti za liposome-u-podlozi i kontrolu (otopina lijeka uklopljena u podlogu) u spomenutoj su studiji bili gotovo jednaki (Vanić i sur., 2014a). Nasuprot tome, u ovom su istraživanju liposomi-u-podlozi i kontrola pokazali značajno različite profile viskoznosti, pri čemu je dodatak disperzije liposoma znatnije utjecao na smanjenje viskoznosti kitozanske podloge nego dodatak otopine lijeka (kontrola).

Odstupanja i proturječnosti s navedenim istraživanjima mogu se objasniti činjenicom da spomenuta istraživanja nisu uključivala kitozanske podloge, već karbopolske i hidroksietilcelulozne podloge, koje pokazuju drugačija reološka svojstva od kitozanskih podloga. Također, udio uklopljenih liposomskih formulacija u spomenutim je studijama bio značajno niži (1-20 %, u odnosu na 30 % u ovom istraživanju), što je bitno uzeti u obzir budući da je potvrđeno da upravo koncentracija liposoma uklopljenih u podlogu značajno utječe na reološka svojstva formulacije (Mourtas i sur., 2008b; Ruel-Gariepy i sur., 2002).

### 4.9.3. Određivanje adhezivnosti formulacija liposomi-u-podlozi

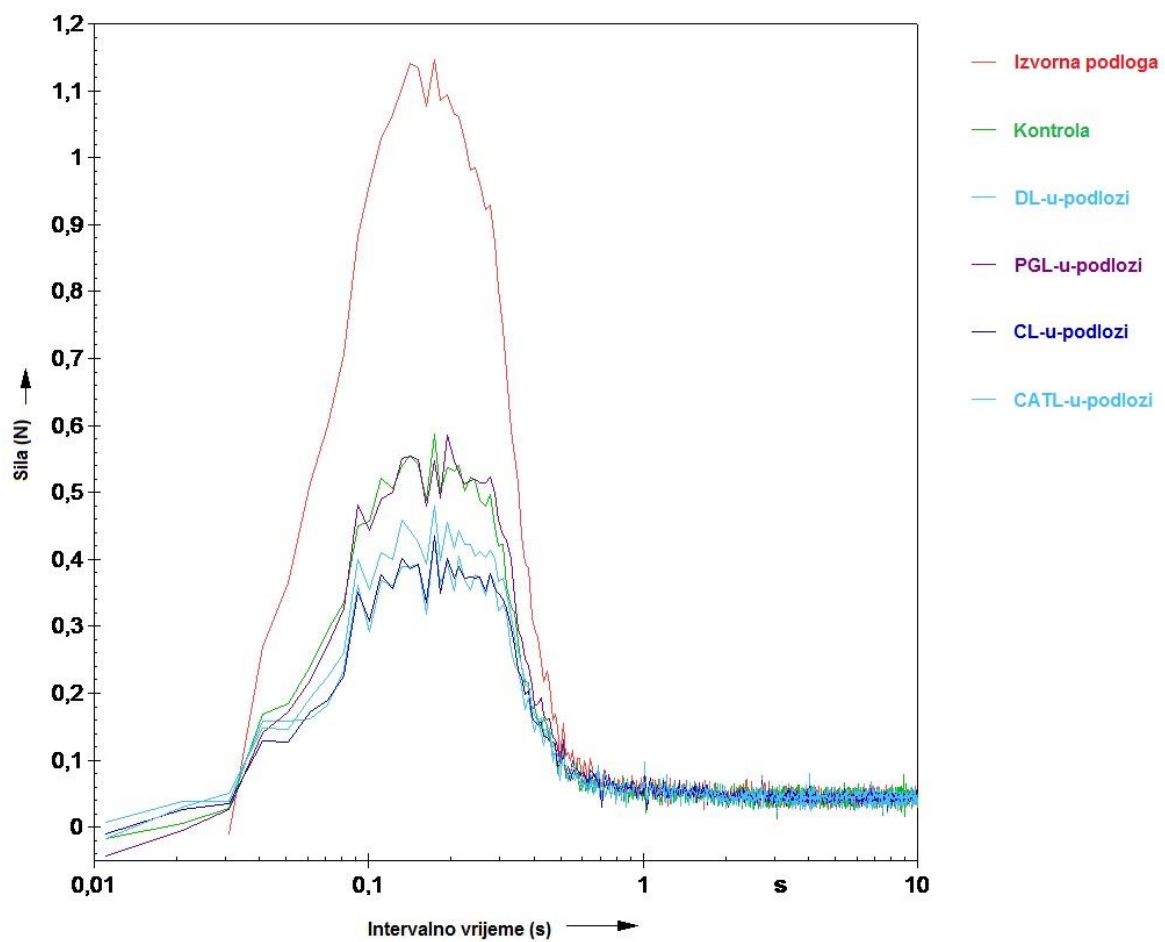
Adhezivnost svih ispitivanih formulacija (liposomi-u-podlozi i kontrola) određivana je tzv. *tack* testom pri 25 °C i 34 °C (Tablica 10, Slike 21 i 22). Krivulje ispitivanih formulacija liposomi-u-podlozi pokazale su tzv. *clean break* (engl.), pri obje temperature (Slike 21 i 22). Slično kao i u prethodnim reološkim ispitivanjima, dodatak AZT-otopine u izvornu kitozansku podlogu imao je značajan utjecaj na njezinu strukturu te se primijenjena sila, odnosno adhezivnost, značajno smanjila. Umješavanjem CL-a, DL-a i CATL-a u izvornu kitozansku podlogu adhezivnost se još više smanjila. Jedini izuzetak bila je formulacija je PGL-u-podlozi čiji je profil adhezivnosti bio veoma sličan kontroli (Slika 29). Svi ispitivani uzorci pokazali su smanjenje adhezivnosti povećanjem temperature (Slika 30).

Rezultati ispitivanja adhezivnosti *tack* testom u suglasnosti su s rezultatima adhezivnosti određivane teksturnim analizatorom pri 25 °C (Slika 18). Oni potvrđuju da se adhezivnost izvorne kitozanske podloge značajno mijenja (smanjuje) umješavanjem AZT-liposoma ili AZT-otopine. Promjena adhezivnosti kod teksturne je analize također bila veća za AZT-liposome nego za AZT-otopinu, a izuzetak je također bila formulacija PGL-u-podlozi kod koje je zabilježena najmanja promjena u intenzitetu adhezije u odnosu na izvornu kitozansku podlogu (Slika 18).

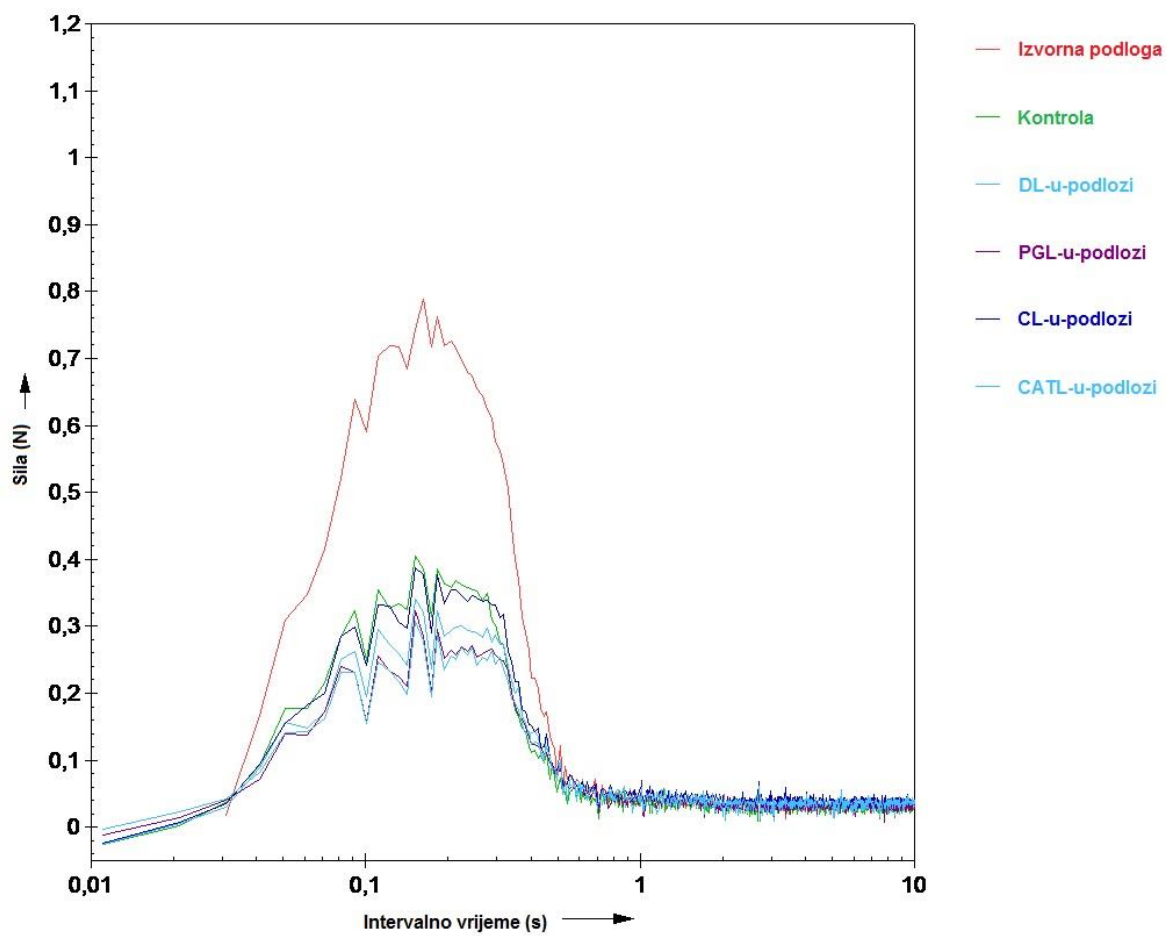
Premda su sve formulacije liposomi-u-podlozi bile okarakterizirane smanjenom adhezivnošću u odnosu na adhezivnost izvorne podloge, treba imati u vidu da je izvorna podloga bila visoke viskoznosti (Slika 19 i 20), upravo kako bi se umješavanjem odgovarajuće mase liposomskih disperzija u konačnici postigla konzistencija pripravka prikladna za lokalnu primjenu na kožu. Stoga je pad u intenzitetu svih određivanih teksturnih i reoloških parametara bio očekivan. Dodatnim ispitivanjima bioadhezivnosti formulacija liposomi-u-podlozi dobili bi se vrijedni podaci važni za procjenu prikladnosti takvih terapijskih sustava za željeni put primjene (topikalna primjena na kožu) i terapijski cilj (antimikrobna terapija). Naime, bioadhezivnost ima važnu ulogu u liječenju kožnih ozljeda i infekcija, budući da je dostatno zadržavanje pripravka na koži nužan preduvjet za ostvarivanje odgovarajućeg terapijskog odgovora. Pritom valja u obzir uzeti i potencijalno prisustvo i pH eksudata na mjestu infekcije, što je dodatni izazov u razvoju farmaceutskih pripravaka za lokalnu antimikrobnu terapiju.

**Tablica 10.** Rezultati ispitivanja adhezivnosti formulacija liposomi-u-podlozi, kontrole i izvorne kitozanske podloge *tack* testom

Uzorak	Temperatura: 25 °C			Temperatura: 34 °C		
	Vrijeme (s)	Vršna sila (N)	Razmak (mm)	Vrijeme (s)	Vršna sila (N)	Razmak (mm)
Izvorna kitozanska podloga	15,2	1,15	0,65	15,2	0,79	0,64
Kontrola	15,2	0,59	0,65	15,2	0,39	0,67
CL-u-podlozi	15,2	0,44	0,65	15,2	0,32	0,63
DL-u-podlozi	15,2	0,44	0,65	15,2	0,31	0,63
PGL-u-podlozi	15,2	0,59	0,69	15,2	0,39	0,63
CATL-u-podlozi	15,2	0,46	0,69	15,2	0,32	0,67



**Slika 21.** Određivanje adhezivnosti formulacija liposomi-u-podlozi, kontrole i izvorne kitozanske podloge pri 25 °C.



**Slika 22.** Određivanje adhezivnosti formulacija liposomi-u-podlozi, kontrole i izvorne kitozanske podloge pri 34 °C.

## **5. ZAKLJUČCI**



Pripremljeni su i evaluirani inovativni terapijski sustavi za poboljšanu topikalnu antimikrobnu terapiju temeljeni na fosfolipidnim vezikulama (liposomima) uklopljenima u kitozansku podlogu.

Liposomi različitog (fosfo)lipidnog sastava s uklopljenim AZT-om (CL, DL, PGL i CATL), pripremljeni su film metodom i homogenizirani ekstruzijom.

Fizičko-kemijska karakterizacija AZT-liposoma potvrdila je utjecaj (fosfo)lipidnog sastava, tj. prisustva jednolančanog surfaktanta i suotapala (propilenglikol) na veličinu liposoma, naboj na njihovoj površini, membransku elastičnost/rigidnost, uklapanje AZT-a i fizičku stabilnost. Anionski liposomi s AZT-om (CL, DL i PGL) bili su srednjeg promjera 130-170 nm s elastičnim dvoslojevima (DL, PGL), dok su kationski liposomi s AZT-om (CATL) bili nešto veći (220 nm) i izrazito rigidnih (čvrstih) membrana. Prisustvo jednolančanog surfaktanta u (fosfo)lipidnom dvosloju DL-a i propilenglikola u PGL-u rezultiralo je visokim uklapanjem AZT-a, ali i manjom fizičkom stabilnošću tijekom duljeg vremenskog razdoblja. CL i CATL su uklopili nešto manje AZT-a, ali su ostali fizički stabilni i nakon 10 mjeseci pohrane pri 4 °C.

Rigidnost/elastičnost fosfolipidnih dvoslojeva AZT-liposoma utjecala je na oslobađanje AZT-a iz liposoma i odlaganje/penetraciju antibiotika na površinu ili unutar kože. AZT se sporije oslobađao iz CL-a i CATL-a nego iz elastičnih PGL-a i DL-a. Dvofazni profil oslobađanja AZT-a, postignut sa svim ispitivanim formulacijama liposoma, pogodan je za postizanje početno visoke koncentracije lijeka na mjestu primjene i brzi početak djelovanja te održavanje učinkovite koncentracije antibiotika kroz dulji vremenski period.

Uklapanjem u liposome značajno je smanjena permeabilnost AZT-a kroz kožu što je od iznimnog značaja za postizanje lokaliziranog antibakterijskog učinka na površini kože primjenom CATL-a ili u dubljim slojevima kože primjenom elastičnih PGL-a ili DL-a.

Fosfolipidni sastav liposoma utjecao je na antibakterijsku aktivnost i biokompatibilnost AZT-liposoma *in vitro*. Svi AZT-liposomi pokazali su značajno bolji antibakterijski učinak na *S. aureus* ATCC 2193 i MRSA kliničke izolate od AZT-otopine. Najbolji anti-MRSA učinak pokazali su CATL zbog prisustva kationskog lipida u membrani liposoma, a potom slijede DL, PGL i CL.

Superiornost CATL-a potvrđena je i u inhibiciji formiranja MRSA biofilmova, s MBIK vrijednostima čak do 32 puta manjima od AZT-otopine, dok su DL i PGL bili nešto manje učinkoviti od CATL-a, ali i dalje značajno potentniji od CL-a te posebice od AZT-otopine.

Citotoksičnost AZT-a *in vitro* značajno je smanjena njegovom ugradnjom u liposome. Ispitivanja provedena na kulturama humanih keratinocita i fibroblasta potvrdila su biokompatibilnost svih ispitivanih AZT-liposoma s keratinocitima pri koncentracijama AZT-a daleko većima od utvrđenih MIK i MBIK vrijednosti. U odnosu na keratinocite, fibroblasti su bili osjetljiviji na AZT-liposome, pogotovo na CATL, ali tek pri najvećim testiranim koncentracijama AZT-a, koje su bile do 64 puta veće od pripadajućeg MBIK-a.

Uklapanje AZT liposoma u kitozansku podlogu rezultiralo je značajno sporijim oslobađanjem AZT-a. Pokazano je da elastičnost/rigidnost fosfolipidnih dvoslojeva ima utjecaja na brzinu oslobađanja. Najsporije oslobađanje postignuto je iz CATL-u-podlozi, a najbrže iz DL-u-podlozi i PGL-u-podlozi, pri čemu je nakon 24 sata iz oba tipa elastičnih liposoma oslobođeno oko 40 % AZT-a.

Svi AZT-liposomi uklopljeni u kitozansku podlogu pokazali su zadovoljavajući anti-MRSA učinak. Intenzitet antibakterijskog učinka ovisio je i o tipu liposoma i o bakterijskom soju/izolatu. Slično kao u ispitivanjima s disperzijama AZT-liposoma, najjači anti-MRSA učinak pokazala je formulacija CATL-u-podlozi, a najslabiji CL-u-podlozi, koji je bio veći od učinka kontrole (AZT-otopina uklopljena u kitozansku podlogu). Izvorna kitozanska podloga nije pokazala antibakterijski učinak u ispitivanim koncentracijama.

Teksturna analiza liposoma-u-podlozi pokazala je prikladnu čvrstoću, kohezivnost i adhezivnost formulacija koje su direktno povezane s njihovom primjenom i zadržavanjem na koži. Formulacija PGL-u-podlozi se pokazala superiornom u odnosu na sve ispitivane formulacije liposomi-u-podlozi te u odnosu na kontrolu.

Reološka karakterizacija je potvrdila tiksotropno ponašanje sustava liposomi-u-podlozi, što je poželjno svojstvo u pogledu topikalne primjene formulacija. Uklapanje disperzija AZT-liposoma ili AZT-otopine uzrokovalo je smanjenje viskoznosti i adhezivnosti formulacija u odnosu na izvornu kitozansku podlogu, ali je viskoznost terapijskog sustava ostala prikladna za primjenu na kožu.

Imajući u vidu rezultate svih provedenih ispitivanja, posebice uzimajući u obzir snažan anti-MRSA učinak, biokompatibilnost, zadržavanje formulacije na mjestu primjene i lokalizaciju antibiotika na površini i u unutrašnjosti kože, formulacija CATL-u-podlozi bi bila prikladna za liječenje kompliciranih, površinskih, MRSA-om uzrokovanih infekcija kože, dok bi formulacija PGL-u-podlozi bila prikladna za tretiranje dubokih kožnih infekcija. Međutim, potrebno je provesti daljnja *in vivo* animalna ispitivanja kojima bi se takve pretpostavke potvrdile.

## **6. LITERATURA**

- Abed N, Couvreur P. Nanocarriers for antibiotics: A promising solution to treat intracellular bacterial infections. *Int J Antimicrob Ag* 2014; 43: 485-496.
- Abu-Humaidan AH, Elvén M, Sonesson A, Garred P, Sørensen OE. Persistent Intracellular *Staphylococcus aureus* in keratinocytes lead to activation of the complement system with subsequent reduction in the intracellular bacterial load. *Front Immunol* 2018; 9: 396.
- Agarwal R, Katare OP, Vyas SP. The pilosebaceous unit: a pivotal route for topical drug delivery. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2000; 22(2): 129-133.
- Agarwal R, Katare OP, Vyas SP. Preparation and *in vitro* evaluation of liposomal/niosomal delivery systems for antipsoriatic drug dithranol. *Int J Pharm* 2001; 228: 43-52.
- Agarwal R, Prakash O. Preparation and *in vitro* evaluation of miconazole nitrate loaded topical liposomes. *Pharm Technol N Am* 2002; 26(11): 48-60.
- Ahmadi F, Oveisi Z, Samani SM, Amoozgar Z. Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. *Res Pharm Sci* 2015; 10(1): 1-16.
- Ainbinder D, Touitou E. Testosterone ethosomes for enhanced transdermal delivery. *Drug Deliv* 2005; 12(5): 297-303.
- Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett* 2013; 8(1): 102.
- Akncbay H, Senel S, Ay ZY. Application of chitosan gel in the treatment of chronic periodontitis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007; 80(2): 290-296.
- Alhajlan M, Alhariri M, Omri A. Efficacy and safety of liposomal clarithromycin and its effect on *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 2694-2704.
- Alhariri M, Azghani A, Omri A. Liposomal antibiotics for the treatment of infectious diseases. *Expert Opin Drug Del* 2013; 10: 1515-1532.
- Alsarra I. Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds. *Int J Biol Macromol* 2009; 45: 16-21.
- Amsden GW. Anti-inflammatory effects of macrolides – an underappreciated benefit in the treatment of community-acquired respiratory tract infections and chronic inflammatory pulmonary conditions? *J Antimicrob Chemother* 2005; 55(1): 10-21.
- Anderson M, Omri A. The effect of different lipid components on the *in vitro* stability and release kinetics of liposome formulations. *Drug Deliv* 2004; 11(1): 33-39.

- Andres Y, Giraud L, Gerente C, Le Cloirec P. Antibacterial effects of chitosan powder: mechanisms of action. *Environ Technol* 2007; 28(12): 1357-1363.
- Annous BA, Fratamico PM, Smith JL. Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do. *J Food Sci* 2009; 74(1): 24-37.
- Augustin M, Goepel L, Jacobi A, Bosse B, Mueller S, Hopp M. Efficacy and tolerability of liposomal polyvinylpyrrolidone-iodine hydrogel for the localized treatment of chronic infective, inflammatory, dermatoses: an uncontrolled pilot study. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2017; 10: 373-384.
- Bala A, Kumar R, Harjai K. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by azithromycin and its effectiveness in urinary tract infections. *J Med Microbiol* 2011; 60(3): 300-306.
- Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965; 13: 238-252.
- Banović J, Bego M, Cuković N, Vanić Ž. Lipidne vezikule za (trans)dermalnu primjenu lijekova. *Farm glas* 2011, 67: 229-244.
- Banjanac M, Munić Kos V, Nujić K, Vrančić M, Belamarić D, Crnković S, Hlevnjak M, Eraković Haber V. Anti-inflammatory mechanism of action of azithromycin in LPS-stimulated J774A.1 cells. *Pharmacol Res* 2012; 66(4): 357-362.
- Barada K, Hanaki H, Yamaguchi Y, Ikeda S, Akama H, Nakae T, Inamatsu T, Sunakawa K. Trends of beta-lactam antibiotic susceptibility in blood-borne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and their linkage to the staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) type. *J Infect Chemother* 2007; 13(4): 213-218.
- Barie PS, Wilson SE. Impact of evolving epidemiology on treatments for complicated skin and skin structure infections: the surgical perspective. *J Am Coll Surg* 2015; 220: 105-116.
- Barry BW. Transdermal drug delivery. U: Aulton ME, ur. *The design and manufacture of Medicines*. Elsevier, 2007; 565-597.
- Barry BW. Novel mechanisms and devices to enable transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci* 2001; 14: 101-114.
- Bartosova L, Bajgar J. Transdermal Drug Delivery *In Vitro* Using Diffusion Cells. *Curr Med Chem* 2012; 19: 4671-4677.
- Basnet P, Škalco-Basnet N. Nanodelivery systems for improved topical antimicrobial therapy. *Curr Pharm Des* 2013; 19: 7237-7243.

- Beaulac C, Clement-Major S, Hawari J, Lagace J. Eradication of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with fluid liposome-encapsulated tobramycin in an animal model of chronic pulmonary infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 665-669.
- Beaulac C, Sachelletti S, Lagace J. *In-vitro* bactericidal efficacy of sub-MIC concentrations of liposome-encapsulated antibiotic against gram-negative and gram-positive bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41(1): 35-41.
- Benatti CR, Feitosa E, Fernandez RM, Lamy-Freund MT. Structural and thermal characterization of dioctadecyldimethylammonium bromide dispersions by spin labels. *Chem Phys Lipids* 2001; 111(2): 93-104.
- Benson HAE. Transfersomes for transdermal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2006; 3: 727-737.
- Bernard E, Dubois JL, Wepierre J. Percutaneous absorption of a new antiandrogen included in liposomes or in solution. *Int J Pharm* 1995; 126(1-2): 235-243.
- Betz G, Aeppli A, Menshutina N, Leuenberger H. *In vivo* comparison of various liposome formulations for cosmetic application. *Int J Pharm* 2005; 296(1-2): 44-54.
- Bhojar N, Giri TK, Tripathi DK, Alexander A, Ajazuddin. Recent advances in novel drug delivery system through gels: review. *J Pharm Bioall Sci* 2012; 2: 21-39.
- Billard A, Pourchet L, Malaise S, Alcouffe P, Montembault A, Ladavière C. Liposome-loaded chitosan physical hydrogel: toward a promising delayed-release biosystem. *Carbohydr Polym* 2015; 115: 651-657.
- Boateng JS, Matthews KH, Stevens HNE, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *J Pharm Sci* 2008; 97: 2892-2923.
- Bragagni M, Mennini N, Maestrelli F, Cirri M, Mura P. Comparative study of liposomes, transfersomes and ethosomes as carriers for improving topical delivery of celecoxib. *Drug Deliv* 2012; 19: 354-361.
- Brown MB, Martin GP, Jones SA, Akomeah FK. Dermal and transdermal drug delivery systems: current and future prospects. *Drug Deliv* 2006; 13(3): 175-187.
- Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal formulations in clinical use: An updated review. *Pharmaceutics* 2017; 9(2): 12.
- Cakmak A, Cirpanli Y, Bilensoy E, Yorganci K, Caliş S, Saribaş Z, Kaynaroğlu V. Antibacterial activity of triclosan chitosan coated graft on hernia graft infection model. *Int J Pharm* 2009; 381(2): 214-219.

- Cardona AF, Wilson SE. Skin and soft-tissue infections: A critical review and the role of telavancin in their treatment. *Clin Infect Dis* 2015; 61: 69-78.
- Carmona-Ribeiro AM, Ortis F, Schumacher RI, Armelin MCS. Interaction between cationic vesicles and cultured mammalian cells. *Langmuir* 1997; 13: 2215-2218.
- Cereda CM, Franz-Montan M, da Silva CM, Casadei BR, Tofoli GR, de Araujo DR, de Paula E. Transdermal delivery of butamben using elastic and conventional liposomes. *J Liposome Res* 2013; 23: 228-234.
- Cevc G, Blume G, Schätzlein A, Gebauer D, Paul A. The skin: a pathway for systemic treatment with patches and lipid-based agent carriers. *Adv Drug Deliv Rev* 1996; 18(3): 349-378.
- Cevc G, Blume G, Schätzlein A. Transdermal drug carriers: Basic properties, optimization and transfer efficiency in the case of epicutaneously applied peptides. *J Contr Release* 1995; 36(1-2): 3-16.
- Cevc G, Blume G, Schätzlein A. Transfersomes-mediated transepidermal delivery improves the regio-specificity and biological activity of corticosteroids *in vivo*. *J Contr Release* 1997; 45(3): 211-226.
- Cevc G, Blume G. Biological activity and characteristics of triamcinolone-acetonide formulated with the self-regulating drug carriers Transfersomes. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1614: 156-164.
- Cevc G, Blume G. Hydrocortisone and dexamethasone in very deformable drug carriers have increased biological potency, prolonged effect, and reduced therapeutic dosage. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1663(1-2): 61-73.
- Cevc G, Blume G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transepidermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1104: 226-232.
- Cevc G, Blume G. New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, Transfersomes. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1514(2): 191-205.
- Cevc G, Gebauer D, Stieber J, Schätzlein A, Blume G. Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1368(2): 201-215.
- Cevc G, Vierl U. Nanotechnology and the transdermal route: a state of the art review and critical appraisal. *J Control Release* 2010; 141: 277-299.

- Cevc G. Transdermal drug delivery of insulin with ultradeformable carriers. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42: 461-474.
- Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7(9): 629-641.
- Chen J, Lu WL, Gu W, Lu SS, Chen ZP, Cai BC. Skin permeation behavior of elastic liposomes: role of formulation ingredients. *Expert Opin Drug Deliv* 2013; 10: 845-856.
- Chen Y, Lu Y, Chen J, Lai J, Sun J, Hu F, Wu W. Enhanced bioavailability of the poorly water-soluble drug fenofibrate by using liposomes containing a bile salt. *Int J Pharm* 2009; 376(1-2): 153-160.
- Chopra A, Cevc G. Noninvasive administration of protein antigens: Transdermal immunization with bovine serum albumin in transfersomes. *Vaccine Res* 1995; 4: 145-164.
- Christiansen K, Bjerring P, Troilius A. 5-ALA for photodynamic photorejuvenation-- optimization of treatment regime based on normal-skin fluorescence measurements. *Lasers Surg Med* 2007; 39(4): 302-310.
- Ciobanu BC, Cadinoiu AN, Popa M, Desbrieres J, Peptu CA. Modulated release from liposomes entrapped in chitoan/gelatin hydrogels. *Materials Science and Engineering C* 2014; 43(1): 383-391.
- Ciotti SN, Weiner N. Follicular liposomal delivery systems. *J Liposome Res* 2002; 12(1-2): 143-148.
- Cohen R, Kanaan H, Grant GJ, Barenholz Y. Prolonged analgesia from Bupisome and Bupigel formulations: from design and fabrication to improved stability. *J Control Release* 2012; 160: 346-352.
- Dai T, Huang YY, Sharma SK, Hashmi JT, Kurup DB, Hamblin MR. Topical antimicrobials for burn wound infections. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2010; 5(2): 124-151.
- Dai T, Tanaka M, Huang YY, Hamblin MR. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011; 9(7): 857-879.
- Dong D, Thomas N, Thierry B, Vreugde S, Prestidge CA, Wormald PJ. Distribution and inhibition of liposomes on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm. *PLoS One* 2015; 10(6): e0131806.



- das Neves J, Bahia MF. Gels as vaginal drug delivery systems. *Int J Pharm* 2006; 318:1-14.
- Dragičević-Čurić N, Winter S, Stupar M, Milič J, Krajišnik D, Gitterd B, Fahra A. Temoporfin-loaded liposomal gels: Viscoelastic properties and *in vitro* skin penetration. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009; 373(1-2): 77-84.
- de Leeuw J, de Vijlder HC, Bjerring P, Neumann HAM. Liposomes in dermatology today. *JEADV* 2009; 23: 505-516.
- de Leeuw J, van der Beek N, Maierhofer G, Neugebauer WD. A case study to evaluate the treatment of vitiligo with khellin encapsulated in L-phenylalanin stabilized phosphatidylcholine liposomes in combination with ultraviolet light therapy. *Eur J Dermatol* 2003; 13(5): 474-477.
- Darwhekar G, Jain DK, Choudhary A. Elastic liposomes for delivery of neomycin sulphate in deep skin infection. *AJPS* 2012; 7(4): 230-240.
- Denis TGS., Dai T, Huang YY, Hamblin MR. 2012. Wound-healing properties of chitosan and its use in wound dressing biopharmaceuticals. U: Sarmiento, B., das Neves, J. (Eds.), *Chitosan-based systems for biopharmaceuticals: delivery, targeting and polymer therapeutics*. John Wiley & Sons Ltd., Hoboken, New Jersey, 429-447.
- DiTizio V, Ferguson GW, Mittelman MW, Houry AE, Bruce AW, DiCosmo F. A liposomal hydrogel for the prevention of bacterial adhesion to catheters. *Biomaterials* 1998; 19(20):1877-1884.
- Drulis-Kawa Z, Dorotkiewicz-Jach A. Liposomes as delivery systems for antibiotics. *Int J Pharm* 2010; 387(1-2): 187-198.
- Drulis-Kawa Z, Gubernator J, Dorotkiewicz-Jach A, Dorotkiewicz W, Kozubek A. A comparison of the *in vitro* antimicrobial activity of liposomes containing meropenem and gentamicin. *Cell Mol Biol Lett* 2006a; 11: 360-375.
- Drulis-Kawa Z, Gubernator J, Dorotkiewicz-Jach A, Dorotkiewicz W, Kozubek A. *In vitro* antimicrobial activity of liposomal meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Int J Pharm* 2006b; 315(1-2): 59-66.
- Drulis-Kawa Z, Dorotkiewicz-Jach A, Gubernator J, Gula G, Bocer T, Doroszkiewicz W. The interaction between *Pseudomonas aeruginosa* cells and cationic PC:Chol:DOTAP liposomal vesicles versus outer-membrane structure and envelope properties of bacterial cell. *Int J Pharm* 2009; 367(1-2): 211-219.

- Duangjit S, Opanasopit P, Rojanarata T, Ngawhirunpat T. Characterization and *in vitro* skin permeation of meloxicam-loaded liposomes versus Transfersomes. *J Drug Deliv* 2011; 418316.
- Dubey V, Mishra D, Dutta T, Nahar M, Saraf DK, Jain NK. Dermal and transdermal delivery of an anti-psoriatic agent via ethanolic liposomes. *J Control Release* 2007; 123(2): 148-154.
- Durai R, Ng PC, Hoque H. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an update. *AORN J* 2010; 91(5): 599-606.
- Duvnjak Romić M, Klarić Šegvić M, Lovrić J, Pepić I, Cetina-Čižmek B, Filipović- Grčić J, Hafner A. Melatonin-loaded chitosan/Pluronic® F127 microspheres as *in situ* forming hydrogel: an innovative antimicrobial wound dressing. *Eur J Pharm Biopharm* 2016; 107: 67-79.
- Edelsberg J, Taneja C, Zervos M, Haque N, Moore C, Reyes K, Spalding J, Jiang J, Oster G. Trends in US hospital admissions for skin and soft tissue infections. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1516-1518.
- Egbaria K, Ramachandran C, Weiner N. Topical delivery of ciclosporin: evaluation of various formulations using *in vitro* diffusion studies in hairless mouse skin. *Skin Pharmacol* 1990; 3(1): 21-28.
- El Maghraby GM, Williams AC, Barry BW. Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin? *J Pharm Pharmacol* 2006; 58: 415-429.
- El Maghraby GM, Williams AC, Barry BW. Skin delivery of 5-fluorouracil from ultradeformable and standard liposomes in-vitro. *J Pharm Pharmacol* 2001a; 53: 1069-1077.
- El Maghraby GM, Williams AC, Barry BW. Skin delivery of oestradiol from deformable and traditional liposomes: mechanistic studies. *J Pharm Pharmacol* 1999; 51(10): 1123-1134.
- El Maghraby GM, Williams AC, Barry BW. Skin hydration and possible shunt route penetration in controlled estradiol delivery from ultradeformable and standard liposomes. *J Pharm Pharmacol* 2001b; 53(10): 1311-1322.
- El Maghraby GM, Williams AC. Vesicular systems for delivering conventional small organic molecules and larger macromolecules to and through human skin. *Expert Opin. Drug Deliv* 2009; 6: 149-163.

- El Zaafarany GM, Awad GA, Holayel SM, Mortada ND. Role of edge activators and surface charge in developing ultradeformable vesicles with enhanced skin delivery. *Int J Pharm* 2010; 397(1-2): 164-172.
- Elnaggar YS, El-Refaie WM, El-Massik MA, Abdallah OY. Lecithin-based nanostructured gels for skin delivery: an update on state of art and recent applications. *J Control Release* 2014; 180: 10-24.
- Elias PM, Menon GK. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv Lipid Res* 1991; 24: 1-26.
- 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. Deformable liposomes and ethosomes: mechanism of enhanced skin delivery. *Int J Pharm* 2006; 322: 60-66.
- Elsayed MM, Abdallah OY, Naggar VF, Khalafallah NM. PG-liposomes: novel lipid vesicles for skin delivery of drugs. *J Pharm Pharmacol* 2007b; 59: 1447-1450.
- Elsayed MM, Abdallah OY, Naggar VF, Khalafallah NM. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. *Int J Pharm* 2007a; 332(1-2): 1-16.
- Eroglu İ, Azizoglu E, Ozyazici M, Nenni M, Gürer Orhan H, Özbal S, Tekmen I, Ertam I, Unal I, Ozer O. Effective topical delivery systems for corticosteroids: dermatological and histological evaluations. *Drug Deliv* 2016; 23(5):1502-1513.
- Escobar-Chávez JJ, Rodríguez-Cruz MI, Domínguez-Delgado LC. Chemical and Physical Enhancers for Transdermal Drug Delivery. U: Pharmacology. Luca Gallelli, urednik, InTech, 2012; 19: 398-420.
- Esposito E, Menegatti E, Cortesi R. Ethosomes and liposomes as topical vehicles for azelaic acid: a preformulation study. *J Cosmet Sci* 2004; 55(3): 253-264.
- Esposito S, Bassetti M, Concia E, De Simone G, De Rosa FG, Grossi P, Novelli A, Menichetti F, Petrosillo N, Tinelli M, Tumbarello M, Sanguinetti M, Viale P, Venditti M, Viscoli C. Diagnosis and management of skin and soft-tissue infections (SSTI). A literature review and consensus statement: an update. *J Chemother* 2017; 29: 197-214.
- Fadel MA, Salah M, Samy N, Mona S. Liposomal methylene blue hydrogel for selective photodynamic therapy of acne vulgaris. *J Drugs Dermatol* 2009; 8(11): 983-990.

- Fang JY, Hwang TL, Huang YL. Liposomes as vehicles for enhancing drug delivery via skin routes. *Curr Nanosci* 2006; 2(1): 55-70.
- Favre-Bonté S, Köhler T, Van Delden C. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*: role of the C4-HSL cell-to-cell signal and inhibition by azithromycin. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52(4): 598-604.
- Findley K, Grice EA. The skin microbiome: A focus on pathogens and their association with skin disease. Miller V, ed. *PLoS Pathogens*. 2014; 10(11): e1004436
- Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8: 623-633.
- Fluhr JW, Barsom O, Gehring W, Gloor M. Antibacterial efficacy of benzoyl peroxide in phospholipid liposomes. A vehicle-controlled, comparative study in patients with papulopustular acne. *Dermatology* 1999; 198(3): 273-277.
- Foldvari M, Gesztes A, Mezei M. Dermal drug delivery by liposome encapsulation: clinical and electron microscopic studies. *J Microencapsul* 1990; 7: 479-489.
- Fong D, Hoemann CD. Chitosan immunomodulatory properties: perspectives on the impact of structural properties and dosage. *Future Sci OA* 2018; 4(1)
- Forestier E, Remy V, Mohseni-Zadeh M, Lesens O, Jauhlac B, Christmann D, Hansman Y. MRSA bacteremia: recent epidemiological and therapeutical trends. *Rev Med Interne* 2007; 28(11): 746-755.
- Forier, K, Raemdonck K, De Smedt SC, Demeester J, Coenye T, Braeckmans K. Lipid and polymer nanoparticles for drug delivery to bacterial biofilms. *J Control Release* 2014; 190: 607-623.
- Francetić I. Farmakokinetika azitromicina. U: *Medicus*. Kolumbić Lakoš A, urednik, Pliva Hrvatska, Zagreb, 2008, 9-14.
- Fresta M, Puglisi GC. Corticosteroid dermal delivery with skin-lipid liposomes. *J Control Release* 1997; 44: 141-151.
- Fux CA, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Costerton JW. Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. *Expert Rev Anti-infect Ther* 2003; 1: 667-683.
- Garau J, Ostermann H, Medina J, Avila M, McBride K, Blasi F; REACH grupa. Current management of patients hospitalized with complicated skin and soft tissue infections across Europe (2010–2011): assessment of clinical practice patterns and real-life effectiveness of antibiotics from the REACH study. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19: 377-385.

- Garg M, Mishra D, Agashe H, Jain NK. Ehinylestradiol loaded ultraflexible liposomes: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *J Pharm Pharmacol* 2006; 58: 459-468,
- Gesztes A, Mezei M. Topical anesthesia of the skin by liposome-encapsulated tetracaine. *Anesth Analg* 1988; 67: 1079-1081.
- Ghannoum M, Isham N, Herbert J, Henry W, Yurdakul S. Activity of TDT 067 (terbinafine in Transfersome) against agents of onychomycosis, as determined by minimum inhibitory and fungicidal concentrations. *J Clin Microbiol* 2011; 49(5): 1716-1720.
- Ghannoum M, Isham N, Henry W, Kroon HA, Yurdakul S. Evaluation of the morphological effects of TDT 067 (terbinafine in Transfersome) and conventional terbinafine on dermatophyte hyphae in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(5): 2530-2534.
- Gillet A, Compere P, Lecomte F, Hubert P, Ducat E, Evrard B, Piel G. Liposome surface charge influence on skin penetration behavior. *Int J Pharm* 2011a; 411: 223-231.
- Gillet A, Lecomte F, Hubert P, Ducat E, Evrard B, Piel G. Skin penetration behaviour of liposomes as a function of their composition. *Eur J Pharm Biopharm* 2011b; 79: 43-53.
- Gillis RJ, Iglewski BH. Azithromycin retards *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *J Clin Microbiol* 2004; 42(12): 5842-5845.
- Giri TK, Thakur A, Alexander A, Ajazuddin, Badwaik H, Tripathi DK. Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: present status and applications. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2012; 2: 439-449.
- Glavas-Dodov M, Fredro-Kumbaradzi E, Goracinova K, Calis S, Simonoska M, Hincal AA. 5-Fluorouracil in topical liposome gels for anticancer treatment-formulation and evaluation. *Acta Pharmaceutica* 2003; 53(4): 241-250.
- Glavas-Dodov M, Goracinova K, Mladenovska K, Fredro-Kumbaradzi E. Release profile of lidocaine HCl from topical liposomal gel formulation. *Int J Pharm* 2002; 242: 381-384.
- Godin B, Touitou E. Erythromycin ethosomal systems: physicochemical characterization and enhanced antibacterial activity. *Curr Drug Deliv* 2005; 2: 269-275.
- Godin B, Touitou E. Mechanism of bacitracin permeation enhancement through the skin and cellular membranes from an ethosomal carrier. *J Control Release* 2004; 94: 365-379.

- Godin B, Touitou E, Rubinstein E, Athamna A, Athamna M. A new approach for treatment of deep skin infections by an ethosomal antibiotic preparation: an *in vivo* study. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55(6): 989-994.
- Godin B, Touitou E. Ethosomes: New prospects in transdermal delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2003; 20(1): 63-102.
- Gong JH, Liu Y, Tang LH, Xu XJ, Zhang XN. An alternative lidocaine hydrochloride liposomal gel formulation: preparation, percutaneous permeation, and release kinetics. *PDA JPST* 2006; 60(4): 259-263.
- Gregoriadis G, Leathwood PD, Ryman BE. Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Lett* 1971; 14(2): 95-99.
- Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E. Emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet* 2006; 368: 874-885.
- Guay D. Treatment of bacterial skin and skin structure infections. *Expert Opin Pharmacother* 2005; 4(8): 1259-1275.
- Guo J, Ping Q, Sun G, Jiao C. Lecithin vesicular carriers for transdermal delivery of cyclosporin A. *Int J Pharm* 2000a; 194(2): 201-207.
- Guo J, Ping Q, Zhang L. Transdermal delivery of insulin in mice by using lecithin vesicles as a carrier. *Drug Deliv* 2000b; 7(2): 113-116.
- Gupta P, Vermani K, Garg S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *DDT* 2002; 7(10): 569-579.
- Hafner A, Lovrić J, Pepić I, Filipović-Grčić J. Lecithin/chitosan nanoparticles for transdermal delivery of melatonin. *J Microencapsul* 2011; 28: 807-815.
- Halwani M, Yebio B, Suntres ZE, Alipour M, Azghani AO, Omri A. Coencapsulation of gallium with gentamicin in liposomes enhances antimicrobial activity of gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 1291-1297.
- Hassoun A, Linden PK, Friedman B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations - a review of recent developments in MRSA management and treatment. *Crit Care* 2017; 21: 211.
- Hawn MT, Vick CC, Richman J, Holman W, Deierhoi RJ, Graham LA, Henderson WG, Itani KM. Surgical site infection prevention: time to move beyond the surgical care improvement program. *Ann Surg* 2011; 254: 494-499.

- Hiruta Y, Hattori Y, Kawano K, Obata Y, Maitani Y. Novel ultra-deformable vesicles entrapped with bleomycin and enhanced to penetrate rat skin. *J Control Release* 2006; 113(2): 146-154.
- Hoffman RM. Topical liposome targeting of dyes, melanins, genes, and proteins selectively to hair follicles. *J Drug Target* 1998; 5(2): 67-74.
- Homann HH, Rosbach O, Moll W, Vogt PM, Germann G, Hopp M, Langer-Brauburger B, Reimer K, Steinau HU. A liposome hydrogel with polyvinyl-pyrrolidone iodine in the local treatment of partial-thickness burn wounds. *Ann Plast Surg* 2007; 59(4): 423-427.
- Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano drug delivery systems a review. *Trop J Pharm Res* 2013; 12: 255-264.
- Honeywell-Nguyen PL, de Graaff AM, Groenink HW, Bouwstra JA. The *in vivo* and *in vitro* interactions of elastic and rigid vesicles with human skin. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1573(2): 130-140.
- Honzak L, Šentjerc M. Development of liposome encapsulated clindamycin hydrochloride for treatment of *acne vulgaris*. *Pflugers Arch* 2000; 44-45.
- Hope R, Livermore DM, Brick G, Lillie M, Reynolds R. Non-susceptibility trends among staphylococci from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001–06. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 65-74.
- Horwitz E, Pisanty S, Czerninski R, Helser M, Eliav E, Touitou E. A clinical evaluation of a novel liposomal carrier for acyclovir in the topical treatment of recurrent herpes labialis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 87(6): 700-705.
- Hsu CY, Yang SC, Sung CT, Weng YH, Fang JY. Anti-MRSA malleable liposomes carrying chloramphenicol for ameliorating hair follicle targeting. *Int J Nanomedicine* 2017; 12: 8227-8238.
- Hua S. Lipid-based nano-delivery systems for skin delivery of drugs and bioactives. *Front Pharmacol* 2015; 6: 219.
- Hurler J, Berg OA, Skar M, Conradi AH, Johnsen PJ, Škalko-Basnet N. Improved burns therapy: liposomes-in-hydrogel delivery system for mupirocin. *J Pharm Sci* 2012; 101(10): 3906-3915.
- Hurler J, Engesland A, Kermany BP, Škalko-Basnet N. Improved texture analysis for hydrogel characterization: Gel cohesiveness, adhesiveness and hardness. *J App Pharm Sci* 2011; 125: 180-188.

- Hurler J, Sorensen KK, Fallarero A, Vuorela P, Škalko-Basnet N. Liposomes-in-Hydrogel delivery system with mupirocin: *in vitro* antibiofilm studies and *in vivo* evaluation in mice burn model. *Biomed Res Int* 2013a; 1-8.
- Hurler J, Škalko-Basnet N. Potentials of chitosan-based delivery systems in wound therapy: bioadhesion study. *J Funct Biomater* 2012; 3: 37-48.
- Hurler J, Žakelj S, Mravljak J, Pajk S, Kristl A, Schubert R, Škalko-Basnet N. The effect of lipid composition and liposome size on the release properties of liposomes-in-hydrogel. *Int J Pharm* 2013b; 456(1): 49-57.
- Hussain A, Samad A, Ramzan M, Ahsan MN. Ur.: Rehman Z, Ahmad FJ. Elastic liposome-based gel for topical delivery of 5-fluorouracil: *in vitro* and *in vivo* investigation. *Drug Deliv* 2016; 23(4): 1115-1129.
- Ibrahim MM, Nair AB, Aldhubiab BE, Shehata TM. Hydrogels and Their Combination with Liposomes, Niosomes, or Transfersomes for Dermal and Transdermal Drug Delivery. U: Catala A, ur. Liposomes; InTech, 2017, DOI: 10.5772/intechopen.68158. Dostupno na: <https://www.intechopen.com/books/liposomes/hydrogels-and-their-combination-with-liposomes-niosomes-or-transfersomes-for-dermal-and-transdermal>
- Igarashi T, Nishino K, Nayar KS. The appearance of human skin, Technical report: CUCS-024-05, Columbia University, New York, 2005, 1-18. <http://www.cs.columbia.edu>
- Imamura Y, Higashiyama Y, Tomono K, Izumikawa K, Yanagihara K, Ohno H, Miyazaki Y, Hirakata Y, Mizuta Y, Kadota J, Iglewski BH, Kohno S. Azithromycin exhibits bactericidal effects on *Pseudomonas aeruginosa* through interaction with the outer membrane. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(4): 1377-1380.
- International Conference on Harmonization (ICH). Validation of analytical procedures: text and methodology ICH-Q2 (R1), Geneva, 2005.
- Islam MT, Rodríguez-Hornedo N, Ciotti S, Ackermann C. Rheological characterization of topical carbomer gels neutralized to different pH. *Pharm Res* 2004; 21(7): 1192-1199.
- Jain S, Jain P, Umamaheshwari RB, Jain NK. Transfersomes - a novel vesicular carrier for enhanced transdermal delivery: development, characterization, and performance evaluation. *Drug Dev Ind Pharm* 2003; 29: 1013-1026.



- Jepps OG, Dancik Y, Anissimov YG, Roberts MS. Modeling the human skin barrier-- towards a better understanding of dermal absorption. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65: 152-168.
- Jithan AV, Swathi M. Development of topical diclofenac sodium liposomal gel for better antiinflammatory activity. *IJPSN* 2010; 3(2): 986-993.
- Jøraholmen MW, Basnet P, Tostrup MJ, Moueffaq S, Škalko-Basnet N. Localized therapy of vaginal infections and inflammation: liposomes-in-hydrogel delivery system for polyphenols. *Pharmaceutics* 2019; 27; 11(2). pii: E53.
- Jose A, Mandapalli PK, Venuganti VV. Liposomal hydrogel formulation for transdermal delivery of pirlfenidone. *J Liposome Res* 2016; 26(2): 139-147.
- Kairo SK, Bedwell J, Tyler PC, Carter A, Corbel MJ. Development of a tetrazolium salt assay for rapid determination of viability of BCG vaccines. *Vaccine* 1999; 17(19): 2423-2428.
- Kandimalla KK, Borden E, Omtri RS, Boyapati SP, Smith M, Leby K, Mulpuru M, Gadde M. Ability of chitosan gels to disrupt bacterial biofilms and their applications in the treatment of bacterial vaginosis. *J Pharm Sci* 2013; 102(7): 2096-2101.
- Kanoh S, Rubin BK. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. *Clin Microbiol* 2010; 23(3): 590-615.
- Kasimanickam RK, Ranjan A, Asokan GV, Kasimanickam VE, Kastelic JP. Prevention and treatment of biofilms by hybrid- and nano-technologies. *Int J Nanomed* 2012; 8: 2809-2819.
- Kaur L, Jain SK, Manhas RK, Sharma D. Nanoethosomal formulation for skin targeting of amphotericin B: an *in vitro* and *in vivo* assessment. *J Liposome Res* 2015; 25(4): 294-307.
- Kawano K, Onose E, Hattori Y, Maitani Y. Higher liposomal membrane fluidity enhances the *in vitro* antitumor activity of folate-targeted liposomal mitoxantrone. *Mol Pharm* 2009; 6: 98-104.
- Kifer D, Mužinić V, Šegvić Klarić M. Antimicrobial potency of single and combined mupirocin and monoterpenes, thymol, menthol and 1,8-cineole against *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm growth. *J Antibiot* 2016; 69(9): 689-696.

- Kim MK, Chung SJ, Lee MH, Chob AR, Shim CK. Targeted and sustained delivery of hydrocortisone to normal and *stratum corneum*-removed skin without enhanced skin absorption using a liposome gel. *J Control Rel* 1997; 46(3): 243-225.
- Kirjavainen M, Urtti A, Jääskeläinen I, Suhonen TM, Paronen P, Valjakka-Koskela R, Kiesvaara J, Mönkkönen J. Interaction of liposomes with human skin *in vitro*-the influence of lipid composition and structure. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1304(3): 179-189.
- Köck R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, Mielke M, Peters G, Skov RL, Struelens MJ, Tacconelli E, Navarro Torné A, Witte W, Friedrich AW. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill* 2010; 15(41): 19688.
- Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int J Food Microbiol* 2010; 144(1): 51-63.
- Körbel JN, Sebök 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 Skin Physiol* 2001;14: 291-295.
- Kotla MG, Chandrasekar B, Rooney Peadar, Sivaraman G, Larranaga A, Vijaya Krishna K, Pandit A, Rochev Y. Biomimetic lipid-based nanosystems for enhanced dermal delivery of drugs and bioactive agents. *ACS Biomater Sci Eng* 2017; 3(7): 1262-1272.
- Kwiatkowska B, Maślińska M. Macrolide therapy in chronic inflammatory diseases. *Mediators Inflamm* 2012; ID 636157
- Labro MT. Anti-inflammatory activity of macrolides: a new therapeutic potential? *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 37-46.
- Lane ME. Skin penetration enhancers. *Int J Pharm* 2013; 447: 12-21.
- Lauer AC, Ramachandran C, Lieb LM, Niemiec S, Weiner ND. Targeted delivery to the pilosebaceous unit via liposomes. *Adv Drug Deliv Rev* 1996; 18(3): 311-324.
- Li C, Zhang X, Huang X, Wang X, Liao G, Chen Z. Preparation and characterization of flexible nanoliposomes loaded with daptomycin, a novel antibiotic, for topical skin therapy. *Int J Nanomedicine* 2013; 8: 1285-1292.
- Li P, Poon YF, Li W, Zhu HY, Yeap SH, Cao Y, Qi X, Zhou C, Lamrani M, Beuerman RW, Kang ET, Mu Y, Li CM, Chang MW, Leong SSJ, Chan-Park MB. A polycationic

- antimicrobial and biocompatible hydrogel with microbe membrane suctioning ability. *Nat Mater* 2011; 10(2): 149-156.
- Li S, Qiu YQ, Zhang SH, Gao YH. A novel transdermal formulation of 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid with lysine for improving bioavailability and efficacy. *Skin Pharmacol Physiol* 2012; 25(5): 257-268.
- Lipsky BA, Hoey C. Topical antimicrobial therapy for treating chronic wounds. *Clin Infect Dis* 2009; 49(10): 1541-1549.
- Liu X, Li Z, Wang X, Chen Y, Wu F, Men K, Xu T, Luo Y, Yang L. Novel antimicrobial peptide-modified azithromycin-loaded liposomes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Nanomed* 2016; 11:6781-6794.
- Lode H, Borner K, Koeppe P, Schaberg T. Azithromycin-review of key chemical, pharmacokinetic and microbiological features. *J Antimicrob Chemother* 1996; 37: 1-8.
- López-Pinto JM, González-Rodríguez ML, Rabasco AM. Effect of cholesterol and ethanol on dermal delivery from DPPC liposomes. *Int J Pharm* 2005; 298(1): 1-12.
- Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 1998; 339: 520-532.
- Magill SS, Hellinger W, Cohen J, Kay R, Bailey C, Boland B, Carey D, de Guzman J, Dominguez K, Edwards J, Goraczewski L, Horan T, Miller M, Phelps M, Saltford R, Seibert J, Smith B, Starling P, Viergutz B, Walsh K, Rathore M, Guzman N, Fridkin S. Prevalence of healthcare-associated infections in acute care hospitals in Jacksonville, Florida. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2012; 33: 283-291.
- Manconi M, Caddeo C, Sinico C, Valenti D, Mostallino MC, Biggio G, Fadda AM. *Ex vivo* skin delivery of diclofenac by transcutol containing liposomes and suggested mechanism of vesicle-skin interaction. *Eur J Pharm Biopharm* 2011; 78(1): 27-35.
- Manconi M, Mura S, Sinico C, Fadda AM, Vila AO, Molina F. Development and characterization of liposomes containing glycols as carriers for diclofenac. *Colloid Surface A* 2009; 342(1-2): 53-58.
- Manconia M, Pendás J, Ledón N, Moreira T, Sinico C, Saso L, Fadda AM. Phycocyanin liposomes for topical anti-inflammatory activity: *in-vitro in-vivo* studies. *J Pharm Pharmacol* 2009; 61(4):423-430.

- Manosroi A, Kongkaneramt L, Manosroi J. Stability and transdermal absorption of topical amphotericin B liposome formulations. *Int J Pharm* 2004; 270(1-2): 279-286.
- Manosroi A, Thathang K, Werner RG, Schubert R, Peschka-Süss R, Manosroi J. Development of highly stable and low toxic cationic liposomes for gene therapy. *Arzneimittelforschung* 2008; 58: 485-492.
- Mansoori MA, Jawade S, Agrawal S, Khan MI. Formulation development of ketoprofen liposomal gel. *IJPI's J Pharm Cosmet* 2012; 2(10): 23-29.
- Martin, C, Low WL, Gupta A, Amin MC, Radecka I, Britland ST, Raj P, Kenward KM. Strategies for antimicrobial drug delivery to biofilm. *Curr Pharm Des* 2015; 21: 43-66.
- Masini V, Bonte F, Meybeck A, Wepierre J. Cutaneous bioavailability in hairless rats of tretinoin in liposomes or gel. *J Pharm Sci* 1993; 82(1): 17-21.
- Maurya SD, Aggarwal S, Tilak VK, Dhakar RC, Singh A, Maurya G. Enhanced transdermal delivery of indinavir sulfate via transfersomes. *Int J Compreh Pharm* 2010; 1(1): 1-7.
- May AK. Skin and soft tissue infections: the new surgical infection society guidelines. *Surg Infect (Larchmt)* 2011; 12: 179-184.
- Melo LD, Mamizuka EM, Carmona-Ribeiro AM. Antimicrobial particles from cationic lipid and polyelectrolytes. *Langmuir* 2010. 26:12300-12306.
- Menon GK, Cleary GW, Lane ME. The structure and function of the *stratum corneum*. *Int J Pharm* 2012; 435(1): 3-9.
- Messiaen AS, Forier K, Nelis H, Braeckmans K, Coenye T. Transport of nanoparticles and tobramycin-loaded liposomes in *Burkholderia cepacia* complex biofilms. *PloS One*, 2013; 8:e79220.
- Metcalf DG, Bowler PG. Biofilms delay wound healing: A review of the evidence. *Burn Trauma* 2013; 1: 5-12.
- 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.
- Mezei M, Gulasekharam V. Liposomes – a selective drug delivery system for the topical route of administration: gel dosage form. *J Pharm Pharmacol* 1982; 34: 473-474.
- Miller LG, Diep BA. Clinical practice: colonization, fomites, and virulence: rethinking the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 752-760.

- Miller LG, Eisenberg DF, Liu H, Chang CL, Wang Y, Luthra R, Wallace A, Fang C, Singer J, Suaya JA. Incidence of skin and soft tissue infections in ambulatory and inpatient settings, 2005-2010. *BMC Infect Dis* 2015; 15:362.
- Minagawa T, Okamura Y, Shigemasa Y, Minami S, Okamoto Y. Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing. *Carbohydr Polym* 2007; 67(4): 640-644.
- Mitkari B, Korde S, Mahadik KR. Formulation and evaluation of topical liposomal gel for fluconazole. *IJPER* 2010; 44(4): 324-333.
- Mourtas S, Duraj S, Fotopoulou S, Antimisariis SG. Integrity of liposomes in presence of various formulation excipients, when dispersed in aqueous media and in hydrogels. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2008a; 61: 270-276.
- Mourtas S, Fotopoulou S, Duraj S, Sfika V, Tsakiroglou C, Antimisariis SG. Liposomal drugs dispersed in hydrogels. Effect of liposome, drug and gel properties on drug release kinetics. *Colloids and Surfaces B* 2007; 55(2): 212-221.
- Mourtas S, Haikou M, Theodoropoulou M, Tsakiroglou C, Antimisariis SG. The effect of added liposomes on the rheological properties of a hydrogel: a systematic study. *J Colloid Interface Sci* 2008b; 317: 611-619.
- Mugabe C, Azghani AO, Omri A. Liposome-mediated gentamicin delivery: development and activity against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 269-271.
- Murdan, S. Drug delivery to the nail following topical application. *Int J Pharm* 2002; 236: 1-26.
- Naeff R. Feasibility of topical liposome drugs produced on an industrial scale. *Adv Drug Del Rev* 1996; 18(3): 343-347.
- Nafee N. 2015. Nanocarriers against bacterial biofilms: current status and future perspectives. In: Rai, M., Kon, K. (Eds.), *Nanotechnology in diagnosis, treatment and prophylaxis of infectious diseases*. Elsevier, London, 167-189.
- Nagelreiter C, Raffener S, Geyerhofer C, Klang V, Valenta C. Influence of drug content, type of semi-solid vehicle and rheological properties on the skin penetration of the model drug fludrocortisone acetate. *Int J Pharm* 2013; 448: 305-312.
- Najjar-Pellet J, Smink DS. Prophylactic antibiotics and prevention of surgical site infections. *Surg Clin North Am* 2015; 95: 269-283.

- NCCLS Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2007. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- New RRC, 1990. Liposomes: A Practical Approach. IRL Press, Oxford.
- Nicolosi D, Scalia M, Nicolosi VM, Pignatello R. Encapsulation in fusogenic liposomes broadens the spectrum of action of vancomycin against Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Ag* 2010; 35: 553-555.
- Nilsen-Nygaard J, Strand SP, Vårum KM, Draget KI, Nordgård CT. Chitosan: gels and interfacial properties. *Polymers* 2015; 7(3): 552-579.
- No HK, Park NY, Lee SH, Meyers SP. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol.* 2002; 74(1–2): 65-72.
- Oh YK, Nix DE, Straubinger RM. Formulation and efficacy of liposome-encapsulated antibiotics for therapy of intracellular *Mycobacterium avium* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(9): 2104-2111.
- Okyar A, Özsoy Y, Güngör S. Novel formulation approaches for dermal and transdermal delivery of non-steroidal anti-inflammatory drugs. [http://www.intechopen.com—Medicine; immunology, allergology and rheumatology; "rheumatoid arthritis - treatment"](http://www.intechopen.com—Medicine; immunology, allergology and rheumatology; ), ur: Andrew B. Lemmey. 2012
- Owen DH, Peters JJ, Katz DF. Comparison of the rheological properties of advantages and replens. *Contraception* 2001; 64: 393-396.
- Paavola A, Kilpelainen I, Yliruusi J, Rosenberg P. Controlled release injectable liposomal gel of ibuprofen for epidural analgesia. *Int J Pharm* 2000; 199: 85-93.
- Pachua L. Recent developments in novel drug delivery systems for wound healing. *Expert Opin Drug Deliv* 2015; 12: 1-15.
- 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* 2014a; 24: 313-322.
- Palac Z, Hurler J, Škalko-Basnet N, Filipović-Grčić J, Vanić Ž. Elastic liposomes-in-vehicle formulations destined for skin therapy: the synergy between type of liposomes and vehicle. *Drug Dev Ind Pharm* 2014b; 1-7.
- Patel VB, Misra AN, Marfatia YS. Preparation and comparative clinical evaluation of liposomal gel of benzoyl peroxide for acne. *Drug Dev Ind Pharm* 2001; 27(8): 863-869.

- Patel VB, Misra AN, Marfatia YS. Topical liposomal gel of tretinoin for the treatment of acne: research and clinical implications. *Pharm Dev Technol* 2000; 5(4): 455-464.
- Paul A, Cevc G, Bachhawat BK. Transdermal immunisation with an integral membrane component, gap junction protein, by means of ultradeformable drug carriers, transfersomes. *Vaccine* 1998; 16(2-3): 188-195.
- Paul A, Cevc G, Bachhawat BK. Transdermal immunization with large proteins by means of ultradeformable drug carriers. *Eur J Immunol* 1995; 25(12): 3521-3524.
- Pavelić Ž, Škalko-Basnet N, Filipović-Grčić J, Martinac A, Jalšenjak I. Development and *in vitro* evaluation of a liposomal vaginal delivery system for acyclovir. *J Control Release* 2005b; 106(1-2): 34-43.
- Pavelić Ž, Škalko-Basnet N, Jalšenjak I. Characterisation and *in vitro* evaluation of bioadhesive liposome gels for local therapy of vaginitis. *Int J Pharm* 2005a; 301(1-2): 140-148.
- Pavelić Ž, Škalko-Basnet N, Jalšenjak I. Liposomal gel with chloramphenicol: characterisation and *in vitro* release. *Acta Pharm* 2004; 54(4): 319-330.
- Pavelić Ž, Škalko-Basnet N, Schubert R. Liposomal gels for vaginal drug delivery. *Int J Pharm* 2001; 219(1-2):139-149.
- Peters DH, Friedel HA, McTavish D. Azithromycin. A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy. *Drugs* 1992; 44: 750-799.
- Phillips PL, Wolcott RD, Fletcher J, Schultz GS. Biofilms made easy. *Wounds Int* 2010; 1:1-6.
- Piraccini BM, Sisti A, Tosti A. Long-term follow-up of toenail onychomycosis caused by dermatophytes after successful treatment with systemic antifungal agents. *J Am Acad Dermatol* 2010; 62: 411-414.
- Planas ME, Gonzalez P, Rodriguez L, Sanchez S, Cevc G. Noninvasive percutaneous induction of topical analgesia by a new type of drug carrier, and prolongation of local pain insensitivity by anesthetic liposomes. *Anesth Analg* 1992; 75(4): 615-621.
- Pornpattananangkul D, Fu V, Thamphiwatana S, Zhang L, Chen M, Vecchio J, Gao W, Huang CM, Zhang L. *In vivo* treatment of *Propionibacterium acnes* infection with liposomal lauric acids. *Adv Healthc Mater* 2013; 2(10):1322-1328.
- Presterl E, Hajdu S, Lassnigg AM, Hirsch AM, Holinka J, Graninger W. Effects of azithromycin in combination with vancomycin, daptomycin, fosfomycin, tigecycline,

- and ceftriaxone on staphylococcus epidermidis biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* August 2009; 53(8): 3205-3210.
- Prow TW, Grice JE, Lin LL, Faye R, Butler M, Becker W, Wurm EM, Yoong C, Robertson TA, Soyer HP, Roberts MS. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 63: 470-491.
- Puglia C, Trombetta D, Venuti V, Saija A, Bonina F. Evaluation of *in-vivo* topical anti-inflammatory activity of indometacin from liposomal vesicles. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56(10): 1225-1232.
- Pulido-Cejudo A, Guzmán-Gutierrez M, Jalife-Montaña A, Ortiz-Covarrubias A, Martínez-Ordaz JL, Noyola-Villalobos HF, Hurtado-López LM. Management of acute bacterial skin and skin structure infections with a focus on patients at high risk of treatment failure. *Ther Adv Infect Dis* 2017; 4(5): 143-161.
- Raafat D, von Bargen K, Haas A, Sahl HG. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(12): 3764–3773.
- Rabea E, Badawy M, Stevens V.C, Smaghe G, Steurbault W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 2003; 4(6): 1457-1465.
- Ragioto DAMT, Carrasco LDM, Carmona-Ribeiro AM. Novel gramicidin formulations in cationic lipid as broad-spectrum microbicidal agents. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 3183-3192.
- Rajan S. Skin and soft-tissue infections: classifying and treating a spectrum. *Cleve Clin J Med* 2012; 79: 57-66.
- Ray GT, Suaya JA, Baxter R. Incidence, microbiology, and patient characteristics of skin and soft-tissue infections in a U.S. population: a retrospective population-based study. *BMC Infect Dis* 2013; 13: 252.
- Rehman K, Zulfakar MH. Recent advances in gel technologies for topical and transdermal drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 2014; 40: 433-440.
- Roberts MS, Mohammed Y, Pastore MN, Namjoshi S, Yousef S, Alinaghi A, Haridass IN, Abd E, Leite-Silva VR, Benson H, Grice JE. Topical and cutaneous delivery using nanosystems. *J Control Release* 2017; 247: 86-105.
- Robinson, AM, Bannister M, Creeth JE, Jones MN. The interaction of phospholipid liposomes with mixed bacterial biofilms and their use in the delivery of bactericide. *Colloid Surface A* 2001; 186: 43-53.



- Rodvold KA, McConeghy KW. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* therapy: past, present, and future. *Clin Infect Dis* 2014; 58(1): 20-27.
- Ruel-Gariepy E, Leclair G, Hildgen P, Gupta A, Leroux JC. Thermosensitive chitosan-based hydrogel containing liposomes for the delivery of hydrophilic molecules. *J Control Release* 2002; 82: 373-383.
- Rukavina Z, Vanić Ž. Current trends in development of liposomes for targeting bacterial biofilms. *Pharmaceutics* 2016; 8(2): 18.
- Sachetelli S, Khalil H, Chen T, Beaulac C, Senechal S, Lagace J. Demonstration of a fusion mechanism between a fluid bactericidal liposomal formulation and bacterial cells. *BBA-Biomembranes* 2000; 1463: 254-266.
- Sampathi S, Ajimera T, Kuchana V. Preparation and evaluation of liposome entrapped hydrogel complex systems of itraconazole for enhanced transdermal permeation. *JPSI* 2014; 3(1): 25-29.
- Sanbhal N, Saitaer X, Li Y, Mao Y, Zou T, Sun G, Wang L. Controlled levofloxacin release and antibacterial properties of  $\beta$ -cyclodextrins-grafted polypropylene mesh devices for hernia repair. *Polymers* 2018; 10(5): 493.
- Sanna V, Peana AT, Moretti MD. Effect of vehicle on diclofenac sodium permeation from new topical formulations: *in vitro* and *in vivo* studies. *Curr Drug Deliv* 2009; 6: 93-100.
- Saraf S, Jeswani G, Kaur CD, Saraf S. Development of novel herbal cosmetic cream with *Curcuma longa* extract loaded transfersomes for antiwrinkle effect. *Afr J Pharm Pharmacol* 2011; 5(8): 1054-1062.
- Schäfer-Korting M, Korting HC, Ponce-Pöschl E. Liposomal tretinoin for uncomplicated acne vulgaris. *Clin Invest* 1994; 72: 1086-1091.
- Senjković Romana. *Osnove oblikovanja lijekova*. 2. izdanje. Zagreb: Školska knjiga, 2003.
- Sharma BB, Jain SK, Vyas SP. Topical liposome system bearing local anaesthetic lignocaine: preparation and evaluation. *J Microencapsul* 1994; 11(3): 279-286.
- Singodia D, Gupta GK, Verma A, Singh V, Shukla P, Misra P, Sundar S, Dube A, Mishra PR. Development and performance evaluation of amphotericin B transfersomes against resistant and sensitive clinical isolates of visceral leishmaniasis. *J Biomed Nanotechnol* 2010; 6(3): 293-302.
- Sinico C, Fadda AM. Vesicular carriers for dermal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2009; 6(8): 813-825.

- Sinico C, Manconi M, Peppi M, Lai F, Valenti D, Fadda AM. Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: *in vitro* evaluation of drug permeation and vesicle-skin interaction. *J Control Release* 2005; 103(1): 123-136.
- Soenen SJ, Brisson AR, De Cuyper M. Addressing the problem of cationic lipid-mediated toxicity: the magnetoliposome model. *Biomaterials* 2009; 30: 3691-3701.
- Solanas G, Benitah SA. Regenerating the skin: a task for the heterogeneous stem cell pool and surrounding niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14(11): 737-748.
- Solano C, Echeverez M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* 2014; 18: 96-104.
- Solleti VS, Alhariri M, Halwani M, Omri A. Antimicrobial properties of liposomal azithromycin for *Pseudomonas* infections in cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70(3): 784-796.
- Song YK, Kim CK. Topical delivery of low-molecular-weight heparin with surface-charged flexible liposomes. *Biomaterials* 2006; 27(2): 271-280.
- Soong G, Paulino F, Wachtel S, Parker D, Wickersham M, Zhang D, Brown A, Lauren C, Dowd M, West E, Horst B, Planet P, Prince A. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* adaptation to human keratinocytes. 2015; *MBio* pii: e00289-15. doi: 10.1128/mBio.00289-15.
- Starner TD, Shrout JD, Parsek MR, Appelbaum PC, Kim GH. Subinhibitory concentrations of azithromycin decrease nontypeable haemophilus influenzae biofilm formation and diminish established biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(1): 137-145.
- Sterry W, Paus R, Burgdorf W. *Dermatology - thieme clinical companions*, georg thieme verlag, Stuttgart, New York, 2006
- Suaya JA, Mera RM, Cassidy A, O'Hara P, Amrine-Madsen H, Burstin S, Miller LG. Incidence and cost of hospitalizations associated with *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections in the United States from 2001 through 2009. *BMC Infect Dis* 2014; 14: 296.
- Subongkot T, Duangjit S, Rojanarata T, Opanasopit P, Ngawhirunpat T. Ultradeflatable liposomes with terpenes for delivery of hydrophilic compound. *J Liposome Res* 2012; 22: 254-262.
- Sudkhar CK, Upadhyay N, Jain S, Charyulu RN. Ethosomes as non-invasive loom in transdermal drug delivery systems. Sebastian M, Ninan N, Haghi AK, ur. U: *Nanomedicine and Drug Delivery*. Apple Academic Press Inc 2013; 1-17.

- Škalko N, Čajkovac M, Jalšenjak I. Liposomes with clindamycin hydrochloride in the therapy of Acne vulgaris. *Int J Pharm* 1992; 85: 97-101.
- Škalko N, Čajkovac M, Jalšenjak I. Liposomes with metronidazole for topical use: The choice of preparation method and vehicle. *J Liposome Res* 1998; 8(2): 283-293.
- Škalko-Basnet N, Vanić Ž. Lipid-based nanopharmaceuticals in antimicrobial therapy. U: Boukherroub, R., Szunerits, S., Drider, D. (Eds.), *Functionalized Nanomaterials for the Management of Microbial Infection, A Strategy to Address Microbial Drug Resistance*. 2017; Elsevier, Amsterdam, 111-152.
- Tabbakhian M, Tavakoli N, Jaafari MR, Daneshamouz S. Enhancement of follicular delivery of finasteride by liposomes and niosomes. *In vitro* permeation and *in vivo* deposition studies using hamster flank and ear models. *Int J Pharm* 2006; 323(1-2): 1-10.
- Todd JK. *Staphylococca* infections. *Pediatr Rev* 2005; 26(12): 444-450.
- Torchilin V, Weissig (2003). *Liposomes: A Practical Approach*. New York; Oxford University Press
- Touitou E, Compositions for applying active substances to or through the skin. Compositions for applying active substances to or through the skin. United States patent US 5540934 A. 1996
- Trotta M, Peira E, Carlotti ME, Gallarate M. Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate. *Int J Pharm* 2004; 270(1-2): 119-125.
- Trotta M, Peira E, Debernardi F, Gallarate M. Elastic liposomes for skin delivery of dipotassium glycyrrhizinate. *Int J Pharm* 2002; 241(2): 319-327.
- Ulrich AS. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Biosci Rep* 2002; 22: 129-150.
- Van Bambeke F, Tulkens PM. Macrolides: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 18:17-23.
- van Belkum A, Melles DC, Nouwen J, van Leeuwen WB, van Wamel W, Vos MC, Wertheim HF, Verbrugh HA. Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 2009; 9(1): 32-47.
- van den Bergh BA, Bouwstra JA, Junginger HE, Wertz PW. Elasticity of vesicles affects hairless mouse skin structure and permeability. *J Control Release* 1999; 62(3): 367-379.

- van Hal SJ, Jensen SO, Vaska VL, Espedido BA, Paterson DL, Gosbell IB. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. Clin Microbiol Rev 2012; 25: 362-386.
- Vanić Ž, Hafner A, Bego M, Škalko-Basnet N. Characterization of various deformable liposomes with metronidazole. Drug Dev Ind Pharm 2013; 39: 481-488.
- Vanić Ž, Hlaeter AM, Škalko-Basnet N. (Phospho)lipid-based nanosystems for skin administration. Curr Pharm Des 2015; 21: 4174-4192.
- Vanić Ž, Hurler J, Ferderber K, Golja Gašparović P, Škalko-Basnet N, Filipović-Grčić J. Novel vaginal drug delivery system: deformable propylene glycol liposomes-in-hydrogel. J Liposome Res 2014a; 24: 27-36.
- Vanić Ž, Palac Z, Škalko-Basnet N. Hidrogelovi za vaginalnu primjenu lijekova. Farm glas 2014b; 70: 813-826.
- Vanić Ž, Škalko-Basnet N. Nanopharmaceuticals for improved topical vaginal therapy: Can they deliver?. Eur J Pharm Sci 2013; 50: 29-41.
- Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: strukturna svojstva i klasifikacija. Farm glas 2012; 391-400.
- Vanić Ž. Phospholipid Vesicles for Enhanced Drug Delivery in Dermatology. J Drug Discov Develop and Deliv 2015; 2: 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; 3: 277-282.
- Verma DD, Verma S, McElwee KJ, Freyschmidt-Paul P, Hoffman R, Fahr A. Treatment of alopecia areata in the DEBR model using cyclosporin a lipid vesicles. Eur J Dermatol 2004; 14(5): 332-338.
- Vogt PM, Hauser J, Rossbach O, Bosse B, Fleischer W, Steinau HU. Polyvinyl pyrrolidone-iodine liposome hydrogel improves epithelialization by combining moisture and antiseptis. A new concept in wound therapy. Wound Repair Regen 2001; 9: 116-122.
- Vogt PM, Reimer K, Hauser J, Rossbach O, Steinau HU, Bosse B, Muller S, Schmidt T, Fleischer W. PVP-iodine in hydrosomes and hydrogel-a novel concept in wound therapy leads to enhanced epithelialization and reduced loss of skin grafts. Burns 2006; 32(6): 698-705.
- Vrhovac B. Farmakoterapijski priručnik. Zagreb, Medicinska naklada, 2007, 350.

- Walencka E, Sadowska B, Rozalska S, Hryniewicz W, Rozalska B. Lysostaphin as a potential therapeutic agent for staphylococcal biofilm eradication. *Pol J Microbiol* 2005; 54: 191-200.
- Wang J, Yuan Y, Liu C, Zhu D, Shen X, Yang B. Preparation and pharmaceutical/pharmacodynamic evaluation of topical brucine-loaded liposomal hydrogel. *J Mater Sci: Mater Med* 2009; 20: 2075-2084.
- Williams AC. Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 64: 128-137.
- Winckle G, Anissimov YG, Cross SE, Wise G, Roberts MS. An integrated pharmacokinetic and imaging evaluation of vehicle effects on solute human epidermal flux and retention characteristics. *Pharm Res* 2008; 25: 158-166.
- Wohlrab W, Lasch J. Penetration kinetics of liposomal hydrocortisone in human skin. *Dermatologica* 1987; 174: 18-22.
- Wohlrab W, Lasch J. The effect of liposomal incorporation of topically applied hydrocortisone on its serum concentration and urinary excretion. *Dermatol Monatschr* 1989; 175: 348-352.
- Wood TK. Strategies for combating persistent cell and biofilm infections. *Microb Biotechnol* 2017; 10(5): 1054-1056.
- Wu EC, Kowalski RP, Romanowski EG, Mah FS, Gordon YJ and Shanks RMQ. AzaSite<sup>®</sup> inhibits *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococcus biofilm formation *in vitro*. *J Ocul Pharmacol Ther* 2010; 26(6): 557-562.
- Yang K, Han Q, Chen B, Zheng Y, Zhang K, Li Q, Wang J. Antimicrobial hydrogels: promising materials for medical application. *Int J Nanomedicine* 2018; 13: 2217-2263.
- Yang Y, Ou R, Guan S, Ye X, Hu B, Zhang Y, Lu S, Zhou Y, Yuan Z, Zhang J, Li QG. A novel drug delivery gel of terbinafine hydrochloride with high penetration for external use. *Drug Deliv* 2015; 22(8): 1086-1093.
- Zago CE, Silva S, Sanitá PV; Barbugli PA, Dias CMI, Lordello VB, Vergani CE. Dynamics of Biofilm Formation and the Interaction between *Candida albicans* and Methicillin-Susceptible (MSSA) and -Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)". 2015; PLoS ONE. 10 (4): e0123206.
- Zhang JP, Wei YH, Zhou Y, Li YQ, Wu XA. Ethosomes, binary ethosomes and transfersomes of terbinafine hydrochloride: a comparative study. *Arch Pharm Res* 2012; 35: 109-117.

Zhang Y, Shen L, Zhao J, Feng N. Evaluation of psoralen ethosomes for topical delivery in rats by using *in vivo* microdialysis. *Int J Nanomedicine* 2014; 9(1): 669-678.

Zhao SS, Du Q, Cao DY. Preparation of liposomal fluconazole gel and *in vitro* transdermal delivery. *J Chin Pharm Sci* 2007; 116-118.

Zhao YZ, Dai DD, Lu CT, Chen LJ, Lin M, Shen XT, Li XK, Zhang M, Jiang X, Jin RR, Li X, Lv HF, Cai L, Huang PT. Epirubicin loaded with propylene glycol liposomes significantly overcomes multidrug resistance in breast cancer. *Cancer Lett* 2013; 330(1): 74-83.

Zucker D, Marcus D, Barenholz Y, Goldblum A. Liposome drugs loading efficiency: a working model based on loading conditions and drugs physicochemical properties. *J Control Rel* 2009; 139(1): 73-80.

Zuckerman JM. Macrolides and ketolides: azithromycin, clarithromycin, telithromycin. *Infect Dis Clin North Am* 2004; 18(3): 621-649.

### **Mrežne stranice**

Baza lijekova, HALMED: [www.almp.hr](http://www.almp.hr)

Goodyer S. Measuring polymers using a rotational rheometer in oscillatory mode. Anton Paar Ltd. [http://www.tpa.org/archive/papers/15052013/Measuring\\_Polymers\\_using\\_a\\_Rotational\\_Rheometer\\_in\\_Oscillatory\\_Mode.pdf](http://www.tpa.org/archive/papers/15052013/Measuring_Polymers_using_a_Rotational_Rheometer_in_Oscillatory_Mode.pdf).

DrugBank: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00207>

## **7. POPIS KRATICA**

## POPIS OZNAKA, SIMBOLA I KRATICA

ANOVA	jednosmjerna analiza varijance
AZT	azitromicin
CATL	kationski liposomi s azitromicinom
CL	konvencionalni liposomi s azitromicinom
CMC	karboksimetilceluloza
DL	deformabilni liposomi s azitromicinom
DMEM	Dulbekov hranidbeni medij s visokom dozom glukoze
DMSO	dimetil-sulfoksid
DODAB	dimetildioktadecilamonijev bromid
DPPC	dipalmitoilfosfatidilkolin
DSPC	distearoilfosfatidilkolin
E	stupanj membranske elastičnosti
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EPC	fosfatidilkolin iz jaja
FBS	fetalni teleći serum
G'	modul pohrane
G''	modul gubitka
HaCaT	humani keratinociti
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
HPMC	hidroksipropilmetilceluloza
HSPC	hidrogenirani sojin fosfatidilkolin
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IPF	idiopatska pulmonalna fibroza
J	masa liposomske preparacije
MBEK	minimalna biofilm-eliminirajuća koncentracija
MBIK	minimalna biofilm-inhibirajuća koncentracija
MC	centrifugiranje minikolone
MHA	Müller-Hinton agar
MHB	Müller-Hinton bujon
MIC	<i>minimal inhibitory concentration</i>
MBIC	<i>minimal biofilm inhibitory concentration</i>
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija



MJ90hTERT	humani diploidni fibroblasti
MLV	multilamelarni liposomi
MRSA	Metilicin-rezistentni <i>Staphylococcus aureus</i>
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolin bromid
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
PBS	fosfatni pufer
PC	fosfatidilkolin
PGL	propilenglikol liposomi s azitromicinom
PL 90G	Phospholipon <sup>®</sup> 90G
PL 90H	Phospholipon <sup>®</sup> 90H
PVP	polivinilpirolidon
RSD	relativna standardna devijacija
$r_v$	srednji promjer liposoma nakon ekstruzije
S75	sojin lecitin
SDCh	natrijev deoksikolat
SPC	sojin fosfatidilkolin
SSTI	infekcije kože i pridruženih mekih tkiva
SUV	mali unilamelarni liposomi
TA	tokoferilacetat
$T_c$	temperatura faznog prijelaza
TSB	triptik soja bujon
TSBGlc	triptik soja bujon obogaćen s 0,25 % D-(+) glukoze
TTC	2,3,5-trifeniltetrazolin klorid
UC	ultracentrifugiranje

**ŽIVOTOPIS**

Zora Rukavina (r. Palac) rođena je 12. srpnja 1987. u Zagrebu. Osnovnu školu i VII. gimnaziju završila je također u Zagrebu. Studij farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2006. godine, a 2010. g. dodijeljena joj je Dekanova nagrada za studentski znanstveni rad pod naslovom „Antitumorski, antifungalni i antimikrobni učinak biljnih vrsta *Epilobium angustifolium* i *Epilobium parviflorum*”. Diplomski rad pod naslovom „Citotoksičnost egzo- i endometabolita vrsta *Aspergillus versicolor* i *Stachybotrys chartarum*” izradila je na Zavodu za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu. Diplomirala je 2011. g., a od 1. srpnja iste godine zaposlena je na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta kao asistent-znanstveni novak. Sudjeluje u izvođenju nastave iz kolegija Oblikovanje lijekova, Magistralna receptura i Kozmetologija. Poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti upisuje 2013. g. Do sada je u koautorstvu objavila pet znanstvenih radova u *Web of Science*, od čega četiri u časopisima koje citira baza *Current Contents*, te jedan stručni rad. Aktivno je sudjelovala na stranim i domaćim znanstvenim skupovima s četiri usmena i dvanaest posterskih priopćenja. Održala je nekoliko radionica i prezentacija na Danima otvorenih vrata FBF-a i Festivalu znanosti te aktivno sudjelovala u radu organizacijskog i znanstvenog odbora FARMEBS-a.

Popis radova:

**Rukavina Z**, Šegvić Klarić M, Filipović-Grčić J, Lovrić J, Vanić Ž. Azithromycin-loaded liposomes for enhanced topical treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. *International Journal of Pharmaceutics* 2018; 553: 109-119.

**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. *Journal of Liposome Research* 2014; 24: 313-322.

**Palac Z**, Hurler J, Škalko-Basnet N, Filipović-Grčić J, Vanić Ž. Elastic liposomes-in-vehicle formulations destined for skin therapy: the synergy between type of liposomes and vehicle. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2015; 41: 1247-1253.

Flaten GE, **Palac Z**, Engesland A, Filipović-Grčić J, Vanić Ž, Škalko-Basnet N. *In vitro* skin models as a tool in optimization of drug formulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015; 75: 10-24.

**Rukavina Z**, Vanić Ž. Current trends in development of liposomes for targeting bacterial biofilms. *Pharmaceutics* 2016; 8(2): 18.

Vanić Ž, **Palac Z**, Škalko-Basnet N. Hidrogelovi za vaginalnu primjenu lijekova. *Farmaceutski glasnik* 2014; 70: 813-826.

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Zavod za farmaceutsku tehnologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorski rad

### RAZVOJ NOVIH FOSFOLIPIDNIH TERAPIJSKIH SUSTAVA ZA TOPIKALNU ANTIMIKROBNU TERAPIJU

Zora Rukavina

#### SAŽETAK

Učinkovita topikalna terapija infekcija kože te prevencija stvaranja biofilmova i razvoja rezistencije mikroorganizama od velikog su medicinskog značaja. Cilj ovog rada bio je razviti biorazgradljiv, djelotvoran i siguran terapijski sustav za topikalnu antimikrobnu terapiju, zasnovan na fosfolipidnim vezikulama (liposomima) uklopljenima u kitozansku podlogu. U tu svrhu pripravljeno je i evaluirano nekoliko tipova liposoma s uklopljenim azitromicinom (AZT) različitog naboja na površini i čvrstoće/elastičnosti fosfolipidnih dvoslojeva: konvencionalni liposomi (CL), deformabilni liposomi (DL), propilenglikol liposomi (PGL) i kationski liposomi (CATL). Čvrstoća/elastičnost fosfolipidnih dvoslojeva AZT-liposoma utjecala je na fizičku stabilnost, profil oslobađanja AZT-a i lokalizaciju antibiotika u koži. Najsporije oslobađanje AZT-a, te odlaganje na površini kože, postignuto je CATL-om, karakteriziranim čvrstim dvoslojevima. Elastični liposomi (DL i PGL) pokazali su brže oslobađanje te nakupljanje AZT-a u unutrašnjosti kože. Svi AZT-liposomi pokazali su antibakterijski učinak na MRSA kliničke izolate, pri čemu su minimalne biofilm inhibitorne koncentracije bile i do 32 puta manje od onih utvrđenih za AZT-otopinu. Najjači anti-MRSA učinak imali su CATL, potom slijede DL, PGL i CL. Svi AZT-liposomi bili su biokompatibilni s keratinocitima i fibroblastima, čak i pri značajno većim koncentracijama AZT-a od pripadajućih minimalnih inhibitornih koncentracija i minimalnih biofilm inhibitornih koncentracija. Uklapanjem AZT-liposoma u kitozansku podlogu produljeno je oslobađanje AZT-a i postignuta prikladna viskoznost za topikalnu primjenu na kožu. Anti-MRSA učinak svih formulacija liposomi-u-podlozi bio je znatno veći od onog postignutog s kontrolom. Teksturna analiza ispitivanih formulacija liposomi-u-podlozi pokazala je prikladnu čvrstoću, kohezivnost i adhezivnost formulacija, posebice PGL-u-podlozi, a koje su direktno povezane s njihovom primjenom i zadržavanjem na koži. Uzimajući u obzir rezultate svih provedenih ispitivanja, formulacija CATL-u-podlozi bila bi prikladna za liječenje MRSA-om uzrokovanih infekcija kod kojih je potrebna lokalizacija antibiotika u površinskim slojevima kože, dok bi formulacija PGL-u-podlozi omogućila bolju dostavu antibiotika u dublje slojeve kože. Međutim, potrebno je provesti *in vivo* animalna ispitivanja terapijske učinkovitosti kako bi se te pretpostavke i potvrdile.

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

Rad sadrži: 144 stranice, 22 grafička prikaza, 10 tablica i 325 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: deformabilni liposomi, propilenglikol liposomi, kationski liposomi, azitromicin, kitozan, podloga, topikalna primjena, koža, meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus*(MRSA)

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Hafner**, *izvanredna profesorica, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*

**Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, *redovita profesorica, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*

**Dr. sc. Biserka Cetina Čižmek**, *znanstvena savjetnica, PLIVA Hrvatska d.o.o.*

Rad prihvaćen: rujan 2019.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of Pharmaceutical Technology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

PhD thesis

### DEVELOPMENT OF NOVEL PHOSPHOLIPID DRUG DELIVERY SYSTEMS FOR TOPICAL ANTIMICROBIAL THERAPY

Zora Rukavina

#### SUMMARY

Effective topical therapy of complicated skin infections, prevention of biofilm formation and antimicrobial resistance is of great medical importance. The aim of this research was to develop a biodegradable, efficient and safe delivery system for topical antimicrobial therapy, based on the drug-loaded phospholipid vesicles (liposomes) incorporated into the chitosan-based vehicle. For that purpose several types of azithromycin-loaded (AZT) liposomes with different surface charges and rigidity/elasticity of (phospho)lipid bilayers have been prepared and evaluated: conventional liposomes (CLs), deformable liposomes (DLs), propylene glycol-embedding liposomes (PGLs) and cationic liposomes (CATLs). The rigidity/elasticity of AZT-loaded liposomes influenced their physical stability, AZT release profile and its localization inside the skin. The slowest release and deposition of AZT on the skin surface was achieved by CATLs, characterized with rigid bilayers, whereas elastic liposomes (DLs and PGLs) demonstrated faster release and accumulation of the drug within the skin. All AZT-loaded liposomes showed antibacterial activity against MRSA clinical isolates, with minimal biofilm inhibitory concentrations up to 32-fold lower than those determined for the AZT-solution. The strongest anti-MRSA effect was demonstrated by CATLs, followed by DLs, PGLs and CLs. All AZT-loaded liposomes were biocompatible with keratinocytes and fibroblasts, even at AZT concentrations significantly higher than the corresponding minimal inhibitory concentrations and minimal biofilm inhibitory concentrations. Incorporation of AZT-loaded liposomes into the chitosan vehicle resulted in the prolonged AZT release and viscosity appropriate for skin application. AZT-liposomes incorporated into chitosan vehicle, especially CATL-in-vehicle, demonstrated significantly enhanced anti-MRSA effect, as compared to the chitosan vehicle embedding AZT-solution. Texture analysis of AZT-liposomes incorporated into chitosan vehicle showed a suitable hardness, cohesiveness and adhesiveness, in particular PGL-in-vehicle, which are directly related to their skin application and retention. Considering the results of all the experiments performed, CATL-in-vehicle would be suitable for the treatment of MRSA-infections requiring localization of the antibiotic in the upper layers of the skin, while PGL-in-vehicle facilitates delivery of AZT into deeper skin layers. However, further *in vivo* animal studies are necessary to confirm those assumptions.

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

Thesis includes: 144 pages, 22 figures, 10 tables and 325 references. Original is in Croatian language.

Keywords: deformable liposomes, propylene glycol-embedding liposomes, cationic liposomes, azithromycin, chitosan, vehicle, topical drug delivery, skin, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Supervisor: **Željka Vanić, Ph.D.**, Associate Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb.

Reviewers: **Anita Hafner, Ph.D.**, Associate Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb.

**Maja Šegvić Klarić, Ph.D.**, Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb.

**Biserka Cetina Čižmek, Ph.D.**, Scientific Advisor, PLIVA Croatia Ltd.

The thesis accepted: September 2019.

**PRILOG**

Prilog sadrži tri originalna znanstvena rada objavljena u časopisima koji su zastupljeni u Current Contents bazi, jedan koji obrađuje problematiku iznesenu u ovom radu, a druga dva iz užeg područja problematike obrađene u ovom radu:

- Rukavina Z, Šegvić Klarić M, Filipović-Grčić J, Lovrić J, Vanić Ž. Azithromycin-loaded liposomes for enhanced topical treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. *International Journal of Pharmaceutics* 2018; 553: 109-119.
- 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. *Journal of Liposome Research* 2014; 24: 313-322.
- Palac Z, Hurler J, Škalko-Basnet N, Filipović-Grčić J, Vanić Ž. Elastic liposomes-in-vehicle formulations destined for skin therapy: the synergy between type of liposomes and vehicle. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2015; 41: 1247-1253.





## Azithromycin-loaded liposomes for enhanced topical treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections



Zora Rukavina<sup>a</sup>, Maja Šegvić Klarić<sup>b</sup>, Jelena Filipović-Grčić<sup>a</sup>, Jasmina Lovrić<sup>a</sup>, Željka Vanić<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Pharmaceutical Technology, A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

<sup>b</sup> University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Microbiology, A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Elastic liposomes  
Cationic liposomes  
Azithromycin  
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)  
Biofilm  
Biocompatibility

### ABSTRACT

Antibiotic delivery via liposomal encapsulation represents a promising approach for the efficient topical treatment of skin infections. The present study aimed to investigate the potential of using different types of azithromycin (AZT)-loaded liposomes to locally treat skin infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. Conventional liposomes (CLs), deformable liposomes (DLs), propylene glycol-containing liposomes (PGLs) and cationic liposomes (CATLs) encapsulating AZT were prepared, and their physical characteristics, drug release profiles, *ex vivo* skin penetration/deposition abilities, *in vitro* anti-MRSA activities (planktonic bacteria and biofilm) and cell biocompatibilities were assessed. The (phospho)lipid composition and presence of surfactant or propylene glycol affected the physical characteristics of the liposomes, the release profile of AZT, its deposition inside the skin, as well as *in vitro* antibacterial efficacy and tolerability with the skin cells. All the liposomes retained AZT inside the skin more efficiently than did the control and were biocompatible with keratinocytes and fibroblasts. CATLs, DLs and PGLs efficiently inhibited MRSA strain growth and were superior to free AZT in preventing biofilm formation, exhibiting minimal inhibitory concentrations and minimal biofilm inhibitory concentrations up to 32-fold lower than those of AZT solution, thus confirming their potential for improved topical treatment of MRSA-caused skin infections.

### 1. Introduction

Bacterial infections of the skin and soft tissues are the most frequent disorders encountered in acute ambulatory care, and the majority of primary skin infections are caused by *Staphylococcus aureus*. The substantial challenge in managing *S. aureus* infection is antibiotic resistance, as demonstrated by the development of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains and accompanying biofilms. Complex staphylococcal skin infections, such as erysipelas, cellulitis, impetigo, folliculitis, dermatitis, diabetic ulcers, chronic and postoperative wounds, in association with co-morbid conditions and/or bacteremia may lead to severe complications and hospital admission, resulting in a high economic burden and possible mortality (Creech et al., 2015; Godin et al.,

2005; Kennedy et al., 2010; Lee et al., 2013).

Topical antibiotic application is fundamental for the treatment of skin infections; however, the effectiveness of antibiotics is often reduced due to an insufficient local drug concentration, increased antibiotic-resistant strains, biofilm formation or inability of the drug to reach the site of action. Therefore, these conditions require treatment with high doses of potent oral or parenteral antibiotics (Fung et al., 2003), which may result in a significant incidence of side effects, possible allergic reactions, patient inconvenience and an enhanced risk of antibiotic resistance development. The use of nanopharmaceuticals represents a promising strategy for the effective topical delivery of antibiotics and overcoming drug-resistant strains in the skin (Hsu et al., 2017). Among the different nanopharmaceuticals studied as

**Abbreviations:** AZT, azithromycin; CATLs, cationic liposomes; CLs, conventional liposomes; DLs, deformable liposomes; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's medium; DMSO, dimethyl sulfoxide; DODAB, dimethyldioctadecylammonium bromide; DPPC, dipalmitoylphosphatidylcholine; HaCaT, human keratinocyte cell line; E, degree of liposome membrane elasticity; FD, free (untrapped) drug; J, amount of extruded liposomes in elasticity measurements; LD, drug in liposomes; MHB, Müller-Hinton broth; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; MBIC, minimum biofilm inhibitory concentration; MIC, minimal inhibitory concentration; MJ90hTERT, human diploid fibroblast strain; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; PBS, phosphate buffer saline (pH 7.5); PCS, photon correlation spectroscopy; PDI, polydispersity index; PG, propylene glycol; PGLs, propylene glycol containing liposomes; SDCh, sodium deoxycholate; TSB, Tryptic soy broth; TSBGlc, TSB supplemented with 0.25% D-(+)-glucose

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [zpalac@pharma.hr](mailto:zpalac@pharma.hr) (Z. Rukavina), [msegvic@pharma.hr](mailto:msegvic@pharma.hr) (M. Šegvić Klarić), [jfilipov@pharma.hr](mailto:jfilipov@pharma.hr) (J. Filipović-Grčić), [jlovric@pharma.hr](mailto:jlovric@pharma.hr) (J. Lovrić), [zvanic@pharma.hr](mailto:zvanic@pharma.hr) (Ž. Vanić).

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.10.024>

Received 16 August 2018; Received in revised form 22 September 2018; Accepted 8 October 2018

Available online 09 October 2018

0378-5173/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Table 1**  
Composition of AZT-loaded liposomes.

Liposomes	Lipoid S75 (mg)	SDCh (mg)	PG (mg)	DPPE (mg)	DODAB (mg)	AZT (mg)
CLs	100					15
DLs	85	15				15
PGLs	100		1500			15
CATLs				73	27	15

AZT, azithromycin; CATLs, cationic liposomes; CLs, conventional liposomes; DLs, deformable liposomes; DPPE, dipalmitoylphosphatidylcholine; DODAB, dimethyldioctadecylammonium bromide; Lipoid S75, soybean lecithin containing 75% phosphatidylcholine; PG, propylene glycol; PGLs, propylene glycol liposomes; SDCh, sodium deoxycholate. The volume of all the liposome dispersions was 5 ml.

antimicrobial carriers (Alhariri et al., 2013; Forier et al., 2014; Nafee, 2015), liposomes are of particular importance due to their safety profile and targeting ability. Manipulations of different liposomal physical properties, including their size, surface charge and coating, bilayer composition and membrane rigidity/elasticity, allow the design of liposomes with favored pharmacokinetic and pharmacodynamic drug profiles. The unique features of liposomes lie in their lipid bilayer structure, mimicking cell membranes and allowing fusion with bacterial membranes (Rukavina and Vanić, 2016). Hence, an entrapped antibiotic can be released to the cell membrane or the interior of a bacterial cell (Sachetelli et al., 2000), permitting high local drug concentrations.

Azithromycin (AZT) is a potent, broad-spectrum macrolide antibiotic that can be administered orally, parenterally or ophthalmically (Peters et al., 1992; Wu et al., 2010), but no registered topical formulation of AZT exists for skin application. The drug is commonly available in the form of dihydrate (MW 785, log P = 3.98) and is characterized by limited water solubility (McFarland et al., 1997; Mandić, 2014). Encapsulation of AZT in liposomes is expected to increase the drug solubility, allowing sustained drug release and enhanced antimicrobial activity. Conventional liposomes containing AZT have shown potential for the possible treatment of pulmonary infections caused by *Mycobacterium avium* (Oh et al., 1995) and *Pseudomonas aeruginosa* (Imamura et al., 2005; Solleti et al., 2015). Recently, Liu et al. (2016) demonstrated the co-encapsulation of cationic antibacterial peptide into AZT-containing liposomes as a promising strategy for the systemic treatment of MRSA infections.

Herein, we propose, for the first time, the use of AZT-loaded liposomes for the improved topical treatment of MRSA-caused skin infections. Since there is no registered formulation of AZT for topical skin therapy, research in this area represents a great challenge. To the best of our knowledge, AZT-loaded cationic liposomes with rigid bilayers and elastic AZT vesicles, i.e. deformable and propylene glycol-containing liposomes, have not yet been investigated. Moreover, according to the literature search, this is the first study evaluating biocompatibility of AZT-loaded liposomes with human skin cells *in vitro*.

AZT-loaded liposomes differing in composition, membrane elasticity and surface charge were prepared, and their physical properties, AZT release profiles, and *in vitro* antibacterial activities against planktonic *S. aureus* and MRSA strains were evaluated. In addition, the effectiveness of liposomes in inhibiting *S. aureus* and MRSA biofilm formation was assessed, while the biocompatibility of liposomes was examined *in vitro* using human skin keratinocytes and fibroblasts.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Soy lecithin (Lipoid S75) and dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPE) were generously gifted from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). AZT in the form of dihydrate was kindly provided by PLIVA Croatia Ltd. (Zagreb, Croatia). Sephadex G-50, sodium deoxycholate (SDCh), dimethyldioctadecylammonium bromide (DODAB), 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), and dimethyl sulfoxide (DMSO)

were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Methanol, ethanol and acetonitrile were purchased from BDH Prolabo (Lutterworth, UK). All organic solvents were of HPLC grade. Müller-Hinton broth (MHB) and tryptic soy broth (TSB) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All other chemicals or solvents used in this study were of analytical grade and purchased from Kemika (Zagreb, Croatia) or Sigma-Aldrich.

Phosphate buffered saline (PBS, 0.01 M) was prepared by dissolving  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1.3609 g) in purified water up to 1000 ml, and the pH was adjusted to 7.5 by adding 10 M KOH. PBS was filtered through cellulose nitrate membrane filters (0.45  $\mu\text{m}$  pore size) obtained from Sartorius AG (Göttingen, Germany). For antimicrobial assays, commercially available phosphate buffer at pH 7.4 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Paisley, UK) was used.

### 2.2. Methods

#### 2.2.1. Preparation of liposomes

Different liposome preparations, i.e., conventional liposomes (CLs), deformable liposomes (DLs), propylene glycol-containing liposomes (PGLs) and cationic liposomes (CATLs) (26 mM total lipids) were prepared by a film hydration method (Palac et al., 2014). Briefly, (phospho)lipids and AZT (Table 1) were dissolved in concentrated ethanol (3 ml) in a round-bottom flask. The ethanol was completely removed at 40 °C (CLs, DLs, PGLs) or 50 °C (CATLs) using a rotary vacuum evaporator (Büchi Rotavapor R-200, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland), and the dried lipid layer (film) was hydrated by the addition of 5 ml of PBS (0.01 M, pH 7.5) at room temperature (CLs, DLs, PGLs) or 50 °C (CATLs). For the preparation of PGLs, 30% (w/v) propylene glycol (PG) was added to the PBS. CLs, DLs and PGLs were extruded (LiposoFast Basic, Avestin, Canada) at room temperature through 400 nm (1 $\times$ ) and 200 nm (3 $\times$ ) pore-sized polycarbonate membranes (Avestin, Canada), while CATLs extrusion was performed at approximately 55 °C. All liposome dispersions were stored in a refrigerator at 4 °C.

AZT-free (empty) liposomes, were prepared under the same conditions but without addition of AZT and were used as controls in *in vitro* antimicrobial and cytotoxicity studies.

#### 2.2.2. Size measurements

The average diameters and polydispersity indexes (PDIs) of the different liposomes were determined by photon correlation spectroscopy (PCS) on a Zetasizer 3000HS instrument (Malvern Instruments, Malvern, UK) 24 h after preparation. Measurements were performed at a scattering angle of 90° and a temperature of 25 °C. The liposomal samples were diluted with PBS (previously filtered through 200-nm Minisart filters) to attain a count rate between 100 and 300 Kcps. Prior to the measurements, all liposomes were sonicated for approximately 10 s in an ultrasonication bath (Branson 1210, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, USA) (Vanić et al., 2013).

#### 2.2.3. Zeta potential measurements

Zeta potential measurements were performed on a Zetasizer 3000HS instrument (Malvern Instruments, Malvern, UK) using a capillary cell

with the optical modulator operating at 1000 Hz. To ensure the validity of the measurements, the instrument was calibrated throughout the measurements using the Malvern Zeta Potential Transfer Standard ( $-50 \pm 5$  mV). Liposomal samples were prepared by diluting the liposome dispersions with an appropriate volume of 1 mM NaCl. All measurements were performed at 25 °C (Palac et al., 2014).

#### 2.2.4. Measurements of liposome elasticity

The bilayer elasticities of the different liposomes were determined with a homemade device as previously reported (Vanić et al., 2014). Briefly, an external pressure of 2.5 bar was used to drive the flux of extruded liposome suspensions through a membrane with a pore size of 100 nm. The amount of the liposome dispersion that was extruded in 5 min was determined, and the mean diameter was monitored by PCS measurements before and after extrusion. The degree of liposome membrane elasticity (E) was calculated using the following equation:

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

where J is the amount of dispersion (g) extruded in 5 min,  $r_v$  is the mean diameter of the liposomes after extrusion and  $r_p$  is the membrane pore size.

#### 2.2.5. HPLC assay for AZT

Quantification of AZT was performed by HPLC. The chromatographic system consisted of an SCL-10Avp system controller, an LC-10Advp pump, a DGU-14A degasser, an SDP-10Avp UV-VIS detector, a CTO-10Avp column oven and LC solution 1.11 software (Shimadzu, Kyoto, Japan). All samples were filtered through 0.22 µm Minisart RC4 filters (Sartorius AG) prior to analysis. Separation was carried out on a Kinetex® C18 column (4.6 mm × 100 mm, Phenomenex, Torrance, USA) using a mixture of acetonitrile and PBS, pH 7.5 (70/30, v/v) as the mobile phase. The flow rate was 1 ml/min, and the oven temperature was maintained at 40 °C. UV detection was performed at a wavelength of 210 nm. The AZT peaks were detected at a retention time of 4.6 min, and the total run time was 10 min. Solutions of AZT in methanol at drug concentrations ranging from 10 to 80 µg/ml were used to construct a standard curve ( $R^2 = 0.9971$ ). Quantitative analysis was performed in triplicate.

#### 2.2.6. Entrapment efficiency determination

The untrapped drug was separated from the liposomes by two different methods: minicolumn centrifugation and ultracentrifugation. Minicolumn centrifugation was conducted with Sephadex G-50 minicolumns according to a previously described procedure (Vanić et al., 2013). For the ultracentrifugation method, 1 ml of each liposome suspension was diluted in 4 ml of PBS and ultracentrifuged (Beckman Optima LE-80 K Ultracentrifuge, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA) for 1 h at 120,000g (20 °C). The supernatant (untrapped drug) was removed, and the pellet (liposomes) was washed with PBS and ultracentrifuged under the same conditions. Finally, the pellet containing only entrapped AZT was resuspended in 1 ml of PBS and used in subsequent experiments.

The amounts of untrapped and entrapped AZT were determined by HPLC. The content of the liposomally entrapped drug was determined after dissolving the liposomes in methanol.

The entrapment of the drug and the drug recovery were expressed according to the following equations:

$$\text{Entrapment efficiency (\%)} = \frac{\text{LD}}{\text{LD} + \text{FD}} \cdot 100$$

$$\text{Drug recovery (\%)} = \frac{\text{LD} + \text{FD}}{\text{total drug}} \cdot 100$$

where LD is the drug in liposomes and FD is the free (untrapped) drug.

The amount of total drug was determined by using an aliquot of the

initial liposome dispersion and methanol to dissolve liposomal lipids. The amounts of drug recovered were determined to be 96.1–109.9% (ultracentrifugation method) and 75.2–89.4% (minicolumn centrifugation method) for all samples.

#### 2.2.7. Storage stability studies

CLs, DLs, PGLs and CATLs containing AZT were stored at 4 °C for ten months, and their mean diameters, PDIs and zeta potentials were determined as described above (2.2.2 and 2.2.3).

#### 2.2.8. In vitro release studies

The release of AZT from liposomes (previously separated from the untrapped drug by ultracentrifugation) was determined on a Franz cell diffusion system under sink conditions using cellulose membranes (Sartorius AG) and a heating circulator set to 32 °C (Palac et al., 2014). The acceptor chamber (15 ml) was filled with PBS, and ethanol (5%, v/v, ethanol/PBS) was added to ensure sink conditions. Then, liposomes (corresponding to 800 µg of AZT) or a control solution containing an equivalent amount of AZT dissolved in a mixture of ethanol and water (6/4, v/v) was added to the donor chamber on a presoaked cellulose membrane, and the system was adequately sealed. The receptor medium was constantly mixed with a magnetic stirrer. Aliquots (0.5 ml) were withdrawn from the acceptor compartment at certain time intervals and replaced with the fresh medium. The amount of released AZT was determined by HPLC as described above.

#### 2.2.9. Ex vivo skin penetration/deposition experiments

A porcine ear skin model was used to assess the penetration/deposition of AZT from the different types of liposomes. Ears were obtained from the local slaughterhouse, and full-thickness skin was taken from the back of the ear. The subcutaneous tissue was removed, and the excised skin was rinsed with water, cut into appropriately sized pieces and frozen at  $-20$  °C. The thickness of the skin was approximately 1 mm. Prior to the experiments, the skin was defrosted and pre-equilibrated in pH 7.5 buffer for 15 min. The skin was sandwiched between the donor and receptor compartments of the Franz cell (surface area of 3.14 cm<sup>2</sup>), with the *stratum corneum* facing the donor compartment. The receptor compartment was filled with 15 ml of phosphate buffer (pH 7.5), which was continuously stirred with a small magnetic stirrer (200 rpm) and temperature-controlled at  $37 \pm 1$  °C throughout the experiments to mimic the physiological skin surface temperature (32 °C) in the donor compartment. Samples of the drug-loaded liposomes or control (corresponding to 1 mg of AZT) were placed in the donor compartment and properly sealed (except DL). The receptor medium (500 µl) was removed at certain time intervals (1, 2, 3, 4, 5, 6 and 24 h) and immediately replaced with an equal amount of fresh buffer. After 24 h, the liquid (if present) in the donor compartment was removed by pipetting, and the skin surface was carefully rinsed with methanol. Both fractions were mixed together and dissolved in methanol (representing nonpenetrated drug), while the skin was cut into very small pieces, and the drug retained within the skin was extracted with methanol (4 h, agitation). The drug content in all collected samples was determined by HPLC (Section 2.2.5). The experiments were performed in triplicate.

#### 2.2.10. Antimicrobial assays

**2.2.10.1. Sample preparation.** The antimicrobial activity of AZT-loaded liposomes was investigated with respect to both free AZT solution (6/4, v/v, ethanol/water) and empty (AZT-free) liposomes. Prior to the experiment, the tested formulations were diluted with MHB to obtain a final AZT concentration of 512 µg/ml. The antimicrobial activity of the prepared samples was tested on *S. aureus* (ATCC 29213) and five clinical isolates of *S. aureus* MRSA strains (MFBF 10674, MFBF 10676, MFBF 10677, MFBF 10679, MFBF 10680) taken from the microbial collection of the Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb (Croatia). All experiments were

performed in four replicates.

**2.2.10.2. Antimicrobial activity against planktonic bacteria.** To determine the minimal inhibitory concentrations (MICs) of the liposomal formulations, a two-fold microdilution assay was performed on a 96-well plate using MHB according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) standard protocol (NCCLS, 2007). Cultures of *S. aureus* in broth were treated with AZT-containing liposomes at concentrations ranging from 0.25 to 256 µg/ml. Cultures of *S. aureus* in MHB broth were used as negative controls, whereas solutions of appropriately diluted free AZT in wells containing planktonic bacteria served as positive controls. Empty (drug-free) liposomes and AZT solvent were tested under the same conditions to elucidate possible antibacterial effects exerted by the liposome bilayer constituents or the solvent itself. After 24 h of incubation at 37 °C, the MICs were assessed by absorbance measurement at 620 nm (iEMS, LabSystems, Bradenton, USA). The MIC was defined as the lowest concentration of antimicrobial agent that restricted growth to a level < 0.05 at 620 nm. MICs were additionally confirmed using TTC reagent dissolved in sterile water (20 mg/ml) (Klančnik et al., 2010).

**2.2.10.3. Antimicrobial activity against biofilm.** Minimum biofilm inhibitory concentrations (MBICs) were determined according to the method previously described by Kifer et al. (2016). To assess MBIC, staphylococci were inoculated with TSB supplemented with 0.25% D-(+)-glucose (TSBGlc) to a final concentration of  $1-2 \times 10^6$  cfu/ml and incubated for 24 h at 37 °C. Samples of AZT liposomes were appropriately diluted in TSBGlc to obtain an initial AZT concentration of 512 µg/ml. The two-fold dilution method was used to further dilute the samples in TSBGlc at AZT concentrations ranging from 0.25 µg/ml to 256 µg/ml in a 96-well (50 µl per well) tissue culture plate (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark). The overnight bacterial cultures were diluted 1:10 in TSBGlc, and 50 µl of each bacterial cell suspension was added to each well. Each strain was treated with the AZT-loaded liposomes in quadruplicate. After incubation, the medium was removed from the wells by careful aspiration, and the wells were gently washed with 100 µl of PBS (pH 7.4). The PBS was removed, and the biofilm was stained with 100 µl of MTT reagent dissolved in PBS (0.1 mg/ml). After 2 h of incubation at 37 °C, the MTT solution was replaced with 150 µl of DMSO, and the plate was incubated for 15 min at room temperature on a rotary shaker. The absorbance was measured at a wavelength of 540 nm (iEMS, MTX LabSystems, Bradenton, FL, USA). The experiments were performed with positive and negative controls, as denoted in 2.2.10.2.

### 2.2.11. In vitro cytotoxicity studies

**2.2.11.1. Cell culture conditions.** The human keratinocyte cell line HaCaT (Cell Line Services, Germany) and human diploid fibroblast strain MJ90hTERT, the latter of which was kindly provided by Dr. Ivica Rubelj, Institute Ruđer Bošković, Zagreb, Croatia (Ćukušić Kajažić et al., 2014), were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) and a mixture of penicillin, streptomycin and amphotericin B (Lonza, Basel,

Switzerland). To assess the potential cytotoxicity of the liposomally entrapped AZT, HaCaT and MJ90hTERT cells were seeded onto 96-well plates at a density of  $10^4$  and  $1.5 \times 10^4$  cells/well, respectively, and then allowed to reach confluence in 48 h. AZT liposomes were suspended in DMEM (nonsupplemented), resulting in AZT concentrations of 0.25, 1, 4, 16 and 64 µg/ml. Prior to treatment with AZT liposomes, the cell culture medium was removed, and the cells were washed with PBS. The cells were then exposed to the different AZT liposomes or ethanolic/aqueous (6/4, v/v) solutions of free AZT at the corresponding concentrations for 24 h. Cells incubated in DMEM were used as a negative control. After the treatment, *in vitro* cytotoxicity was determined by the MTT assay. The experiments were also performed with empty liposomes (without AZT) as well as with a mixture of ethanol and water used to dissolve AZT to determine the possible cytotoxicity effects of the liposome-building components and free AZT solvent.

**2.2.11.2. MTT assay.** Colorimetric MTT assays were performed to assess the metabolic activity of cells 24 h after treatment with AZT liposomes and a free AZT solution. After 24 h of treatment with AZT-loaded liposomes and the corresponding empty liposomes, the treatment agents were removed, and the cells were washed twice with PBS and then incubated with fresh DMEM supplemented with the abovementioned additives. After 24 h, 10 µl of MTT solution in DMEM (5 µg/ml) was added to each well, and the cells were then incubated for 30 min at 37 °C. After incubation, the medium was removed, and 100 µl of acidified isopropanol was added to each well. The amount of formazan was quantified spectrophotometrically at 570 nm (Victor, PerkinElmer, USA). Mitochondrial activity is expressed relative to that in the control group treated with DMEM. No interference between liposomes and the MTT assay was observed.

### 2.2.12. Statistical analysis

Statistical data analyses of the two groups were performed using Student's *t*-test, and the means were considered significantly different when  $p < 0.05$ . When comparing three or more groups, one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison tests in which  $p < 0.05$  was set as the minimal level of significance were applied. Calculations were performed with the GraphPad 5 Prism program (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Physicochemical properties of liposomes

The composition of liposomes determines their physicochemical characteristics, subsequently influencing their release and penetration properties as well as their interactions with bacteria (Rukavina and Vanić, 2016). Therefore, various types of liposomes containing AZT were prepared (Table 1), and their physicochemical properties were assessed. As shown in Table 2, the originally prepared liposomes were quite large and characterized with broad size distributions (PDI > 0.95). The extrusion of liposomes through 400- and 200-nm membranes significantly reduced the diameters of the originally prepared

**Table 2**  
Size and surface charge of AZT-loaded liposomes.

Liposomes	Mean diameter (nm)		Polydispersity index (PDI)		Zeta potential (mV)
	Non-extruded	Extruded	Non-extruded	Extruded	
CLs	1135 ± 62	165 ± 3	1.00 ± 0.00	0.12 ± 0.02	-43.9 ± 0.7
DLs	972 ± 20	132 ± 2	0.96 ± 0.12	0.14 ± 0.02	-45.8 ± 0.5
PGLs	1089 ± 8	143 ± 1	1.00 ± 0.00	0.09 ± 0.01	-48.4 ± 1.9
CATLs	1628 ± 35	217 ± 2	1.00 ± 0.00	0.43 ± 0.10	+62.2 ± 1.1

CATLs, cationic liposomes; CLs, conventional liposomes; DLs, deformable liposomes; PGLs, propylene glycol liposomes. The values indicate the mean ± S.D. (n = 3).



liposomes as well as their PDI values. Thus, AZT-loaded CLs, DLs, and PGLs ranged in size between 132 and 165 nm, while AZT-loaded CATLs were significantly larger (217 nm), likely due to the temperature at which all the size measurements were performed (25 °C). Namely, CATLs were composed of DPPC and DODAB, both of which contributed to a higher membrane phase transition temperature (New, 1990) compared with that of the other liposome preparations.

The zeta potentials of the AZT-loaded liposomes (Table 2) were in accordance with the features and surface charges of the (phospho)lipids used for the liposome preparations. CLs, DLs and PGLs had negative zeta potential values (between –40 mV and –50 mV), indicating the formation of physically stable liposomal dispersions. Negatively surface-charged liposomes have been shown to be beneficial for effective dermal drug delivery (Gillet et al., 2011). Positively charged liposomes, however, have been proven to exert more pronounced antibacterial and antibiofilm effects than neutral and negatively charged liposomes of the same size do (Dong et al., 2015; Drulis-Kawa et al., 2009; Robinson et al., 2001). The CATLs prepared in this study were shown to have a positive zeta potential of approximately +60 mV, which was expected due to the presence of cationic lipid (DODAB) in the liposome bilayers.

Assessment of liposome membrane elasticity is of substantial importance for the physicochemical evaluation of liposomes, particularly those intended for the dermal delivery of antimicrobial drugs. Namely, the thermodynamic state of the bilayers has been found to be responsible for the stability of the vesicles during storage, their drug release pattern and the interaction of liposomes with bacteria and biofilms (Martin et al., 2015). To evaluate the bilayer elasticities/rigidities of the different AZT liposomes, all vesicles were passed through polycarbonate membranes (100 nm) at a constant external pressure of 2.5 bar for 5 min. As shown in Fig. 1, the calculated degree of deformability (E) was found to be mostly determined by the amount of the

extruded liposome dispersions (J) rather than the size of liposomes after passage through the 100-nm-pore membranes. The highest degree of liposome bilayer elasticity (E) was confirmed to be 32.5 for AZT-loaded DLs, which was 6-fold and more than 21-fold higher than the E values for AZT-loaded PGLs and CLs, respectively (Fig. 1). These findings agree with our previous investigations of liposomally entrapped diclofenac sodium, in which DLs were shown to be more elastic than PGLs (Palac et al., 2014); however, the difference in E values for DLs and PGLs obtained in the present study was much more pronounced. In contrast to AZT-loaded PGLs and DLs, AZT-loaded CLs and particularly CATLs were characterized by rigid bilayers, with calculated E values of 1.5 (CL) and 0.15 (CATL) (Fig. 1).

### 3.2. Entrapment of AZT into liposomes

The efficiency of topical antimicrobial therapy is determined by the drug concentration at the site of action, which is directly dependent on the concentration of the liposome formulation applied, including the lipid concentration and the concentration of the encapsulated antimicrobial agent (Messiaen et al., 2013). To determine the drug content entrapped in the liposomes, unentrapped AZT was separated from the liposomally entrapped drug by two different separation methods: minicolumn centrifugation and ultracentrifugation. Both methods appeared to yield the same entrapment profiles for all samples (Fig. 2), with the exception of CATLs. Namely, the ultracentrifuge separation method yielded significantly higher entrapment efficiency (45%) for CATLs than did the minicolumn centrifugation method (32%) (*t*-test,  $p < 0.05$ ). To select the more appropriate and accurate separation method for subsequent investigations, the recovery values obtained by the different separation methods were compared (Section 2.2.6) Based on the results, ultracentrifugation was chosen as the more suitable separation method.

All the tested liposomes were shown to encapsulate between 45 and 64% AZT (using ultracentrifugation as the separation method). The highest entrapment efficiency was attained with DLs (64%), which was ascribed to the presence of SDCh inside the bilayers, resulting in better AZT entrapment. Although PGLs was expected to allow enhanced entrapment efficiency due to the presence of a rather high concentration of PG, a well-known co-surfactant (Elmoslemany et al., 2012; Manconi et al., 2009; Palac et al., 2014; Vanić et al., 2014), PGLs showed no significant increase in AZT content compared with CLs (ANOVA,  $p > 0.05$ ). Regardless of the separation method used, approximately 50% AZT was entrapped in CLs, and 53–56% was entrapped in PGLs (Fig. 2).

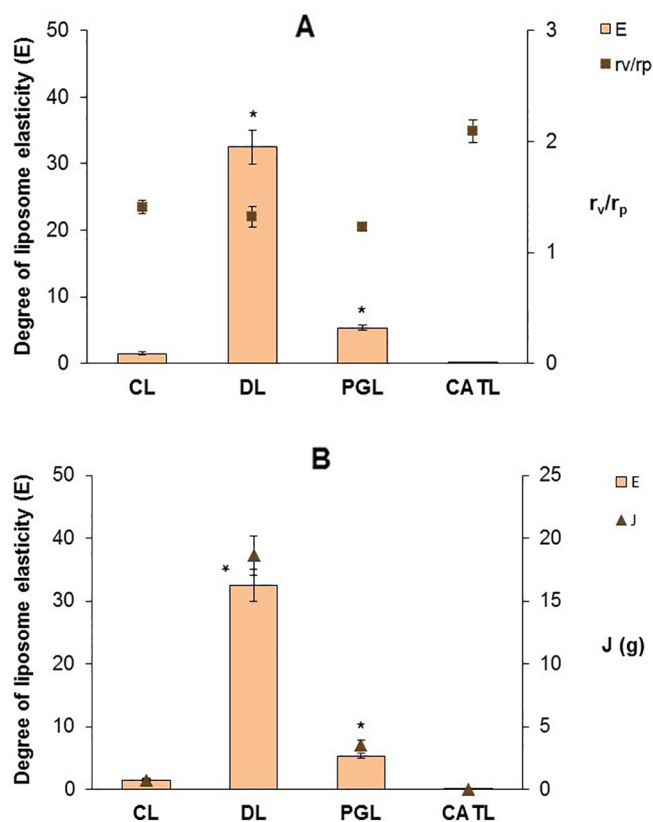


Fig. 1. The degree of liposome elasticity (E) as a function of  $r_v/r_p$  (A) and J (B). E was determined for extruded liposomes at a constant pressure of 2.5 bar. The values denote the mean  $\pm$  S.D. (n = 3). \*Statistically significant difference in the E value compared with that of CLs (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

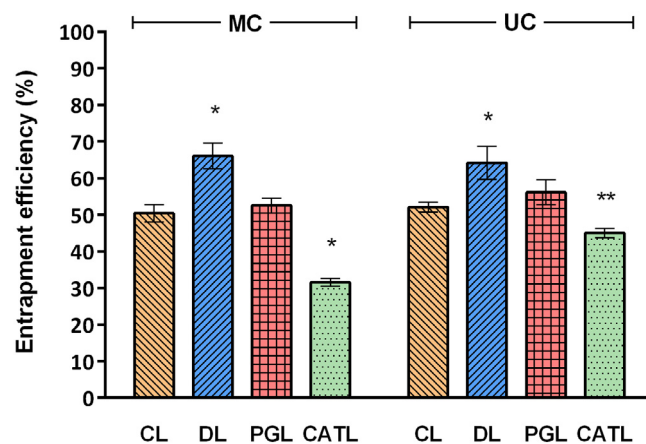


Fig. 2. Entrapment of AZT in various liposomes in relation to different separation methods (MC, minicolumn centrifugation; UC, ultracentrifugation). The values denote the mean  $\pm$  S.D. (n = 4). \*Statistically significant difference (ANOVA,  $p < 0.05$ ) compared with CLs. \*\*Statistically significant difference (*t*-test,  $p < 0.05$ ) compared with MC.

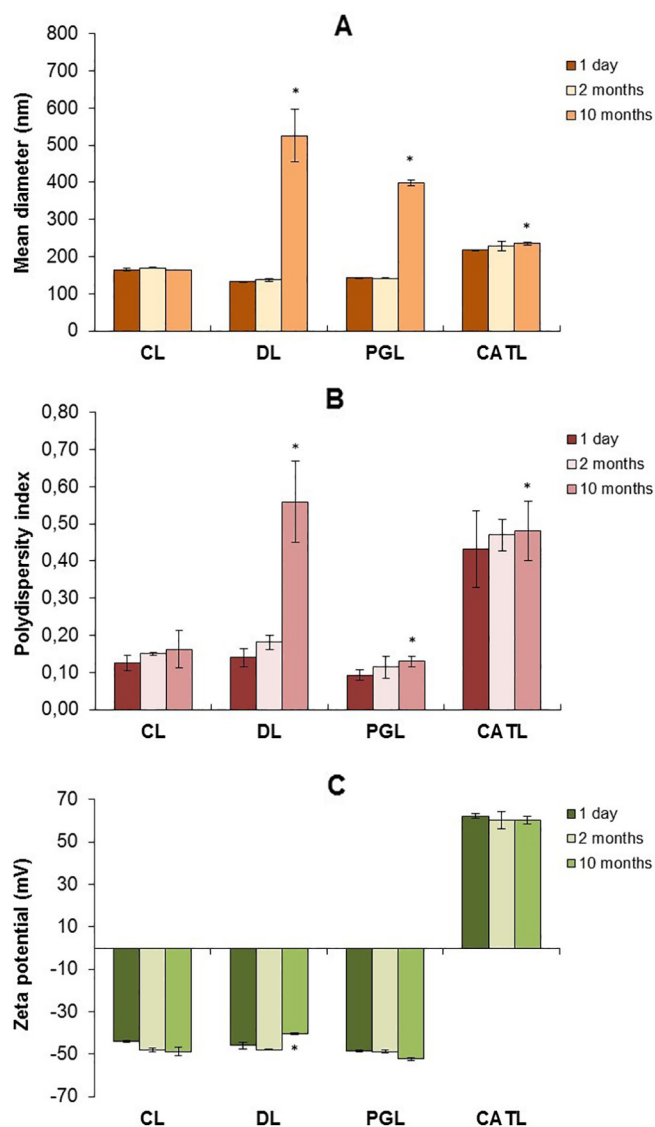


Fig. 3. Storage stabilities of the different AZT-loaded liposomes: mean diameters (A), polydispersity indexes (B) and zeta potentials (C). The values denote the mean  $\pm$  S.D. (n = 3). \*Significantly different (*t*-test,  $p < 0.05$ ) from the initially measured values (one day).

### 3.3. Storage stability assessment

Evaluations of the physical stabilities of AZT-loaded liposomes were performed by monitoring the changes in mean diameters, PDIs and zeta potentials over 10 months of storage 4 °C. The results presented in Fig. 3 demonstrate that the parameters of all the liposomes were not significantly altered after 2 months of storage. However, after 10 months, increases in the mean diameters and PDIs of DLs and PGLs were observed compared with their initial values (*t*-test,  $p < 0.05$ ). These results could be ascribed to the increased degree of membrane deformability caused by the presence of SDCh or PG, contributing to the lower physical stabilities of these liposomes over a longer period. In contrast, the monitored parameters of CLs and CATLs remained nearly unchanged over 10 months of storage, proving their good physical stability.

### 3.4. In vitro release studies

The efficacy of topical antimicrobial therapy can be improved by the controlled release of antimicrobial compounds over a predictable

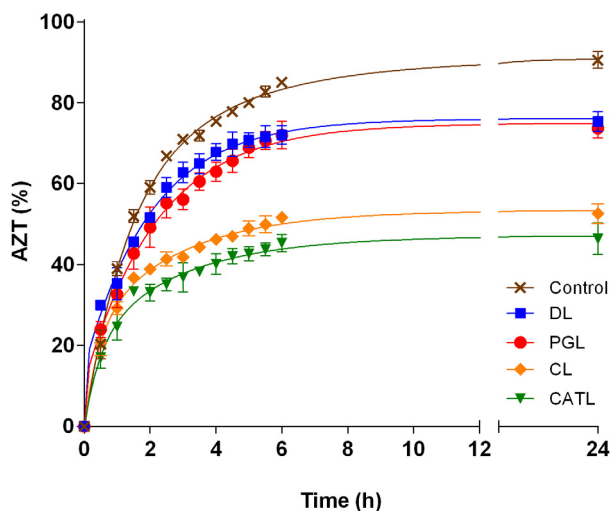


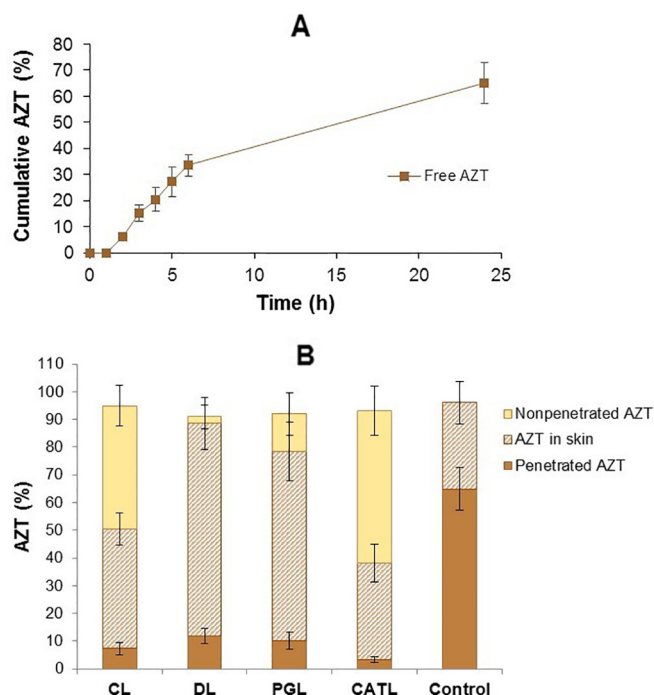
Fig. 4. The cumulative release of AZT from the different types of liposomes. The values denote the mean  $\pm$  S.D. (n = 3). \*Statistically significant difference (ANOVA,  $p < 0.05$ ) compared with the control. \*\*Statistically significant difference (ANOVA,  $p < 0.05$ ) compared with CLs.

period (Škalko-Basnet and Vanić, 2017). To evaluate the release profiles of AZT from the different types of liposomes, a Franz diffusion cell system was applied. The results presented in Fig. 4 demonstrate the sustained release of the drug from all liposomes relative to that of the control (a solution of free AZT) (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Interestingly, all the liposomes, especially the DLs and PGLs, exhibited an initial burst release (2 h) followed by a prolonged release of AZT. Such a release profile could be favorable for the rapid onset of drug action and achieving higher local drug concentrations. Assessment of the different types of liposomes confirmed the significant effect of the liposome composition and bilayer elasticity/rigidity on the drug release profile. Thus, the release rates of AZT from both types of elastic liposomes (DLs, PGLs) were significantly higher than that from CLs (ANOVA,  $p < 0.05$ ). For example, after 6 h of testing, approximately 70% of the originally entrapped drug was released from DLs and PGLs, whereas 52% was released from CLs. The increased AZT release from PGLs and DLs was expected due to the enhanced membrane permeability of the elastic liposomes caused by PG and SDCh (Palac et al., 2014; Vanić et al., 2014). Namely, the intercalation of PG into the bilayers of PGLs or the presence of an edge activator (SDCh) inside DLs affected both types of vesicles, causing them to be more permeable to the entrapped drug. These observations agree with previously reported findings for deformable and PG-embedding liposomes (Cadena et al., 2013; Kawano et al., 2009). Among the investigated liposomes, the slowest release of AZT was obtained with CATLs (ANOVA,  $p < 0.05$ ), which was most likely attributed to the pronounced bilayer rigidity caused by DPPC and DODAB (Fig. 2).

### 3.5. Ex vivo penetration/deposition of AZT

To more closely resemble a topical skin infection treatment, AZT-loaded liposomes were subjected to *ex vivo* skin penetration/deposition studies. Because chronic skin infections can be localized in different parts of the skin (from upper to deep skin layers, including subcutaneous tissue) and characterized by soft or crusting lesions (Esposito et al., 2017), several types of liposomes differing in bilayer properties were included in the examination.

The presence of AZT was not detected in the receptor compartment during the first 6 h of investigation in any of the liposome types tested (the drug content was below the limit of detection). In contrast, the AZT solution (control) penetrated the skin as early as the second hour of examination (Fig. 5A). Therefore, the results presented by Fig. 5B refer



**Fig. 5.** Cumulative amount of penetrated free AZT (control) through the skin (A). *Ex vivo* skin deposition/penetration abilities of AZT from the different types of liposomes obtained after 24 h (B). All tested formulations contained the same AZT concentration in the donor compartment (1 mg). The control represents AZT dissolved in a mixture of ethanol and water (6/4, v/v). All liposomes enabled significantly less (ANOVA,  $p < 0.05$ ) AZT penetration through the skin than did the control. The values denote the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ).

to values obtained after 24 h of testing.

Our findings clearly indicate the ability of liposomes to retain drug on the skin surface and within the skin layers (Fig. 5B), thus reducing undesired AZT penetration through the skin, which is of great importance for escaping systemic AZT absorption and increasing the local drug concentration at the desired site of action. Among the different types of liposomes examined, the highest amount of nonpenetrated AZT was achieved with CATLs (54%), followed by CLs (43%), PGLs (14%) and DLs (2%). Consequently, the levels of drug penetration achieved with the tested liposomes were as follows (descending): 12% (DLs), 10% (PGLs), 7% (CLs) and 3% (CATLs). DLs were mostly retained inside the skin (77%), while the lowest ratio of deposited AZT was obtained with CATLs (35%) (ANOVA,  $p < 0.05$ ). These results are in accordance with the bilayer properties of the AZT liposomes tested. Namely, the lipid composition contributed to the rigidity/elasticity of the liposomal bilayers, which influenced the deposition/penetration of AZT inside/through the skin. The highest degree of membrane elasticity obtained with DLs (Fig. 1) manifested in an increased penetration of AZT into the skin compared with that achieved with CATLs, which were characterized by considerably rigid bilayers. In addition to bilayer rigidity/elasticity, the surface charge of AZT liposomes also influenced the delivery of the drug into the skin. Positively surface charged CATLs could exhibit strong interaction with the negatively surface charged skin allowing accumulation of the encapsulated drug in the *stratum corneum* and upper layers of epidermis. On the contrary, negatively charged elastic liposomes (DLs and PGLs) were shown to allow better AZT deposition into the skin compared with the CATLs. These results are consistent with the well-known fact that depending on the composition of the vesicles and their physicochemical properties, liposomes permit multiple functions ranging from local to transdermal effects (El Maghraby et al., 2009; Elsayed et al., 2007; Gillet et al., 2011; Hua et al., 2015). Application of conventional liposomes has demonstrated improved skin delivery of mupirocin with the ability to ensure

sustained drug release (Hurler et al., 2012). In addition, topical application of loperamide HCl liposomal gel resulted in potent and prolonged analgesic and anti-inflammatory activity in a rodent model of acute inflammatory pain compared with controls (Iwaszkiewicz and Hua, 2014).

Delivery of drugs via conventional liposomes with rigid bilayers is commonly related to the *stratum corneum* and the upper layers of the epidermis, while liposomes with a pronounced bilayer elasticity (deformable and PG-embedding liposomes) allow deeper drug penetration into the skin (Vanić et al., 2015). Because *S. aureus* is both an extracellular and intracellular pathogen that can persist within infected keratinocytes (Abu-Humaidan et al., 2018; Soong et al., 2015), efficient delivery of AZT to infected skin cells is of great significance. Considering the penetration potential of elastic liposomes (Palac et al., 2014; Vanić et al., 2013), DLs and PGLs could be relevant for the topical treatment of chronic deep skin infections, while AZT-loaded CLs and particularly CATLs could be favorable for the treatment of chronic skin infections with a compromised *stratum corneum*, including burn wounds. However, further *in vivo* animal studies should be performed to confirm these assumptions.

### 3.6. *In vitro* anti-MRSA activity

Different types of liposomes containing AZT were evaluated for their *in vitro* antibacterial activity on *S. aureus* ATCC 29213 and 5 different MRSA clinical isolates, including both planktonic bacteria and biofilms. The results are presented in Tables 3 and 4.

Encapsulation of AZT in liposomes resulted in markedly improved *in vitro* antibacterial activity against planktonic bacteria (Table 3) compared with that achieved with a solution of free AZT. Among the different types of AZT liposomes tested, the highest anti-MRSA activity was obtained with CATLs, yielding MIC values up to 32-fold lower than those achieved with free AZT. Elastic AZT-loaded liposomes (DLs and PGLs) exhibited equal antibacterial activities against staphylococci ATCC 29213 and the MRSA 10676, 10677, 10679, and 10680 strains. Their MIC values ranged from 0.5 to 1  $\mu\text{g/ml}$ , compared with the 2–8  $\mu\text{g/ml}$  MIC range of the free drug. The only exception was the staphylococci MRSA 10674 strain, for which the activity of PGLs was twice as low as that of DLs but still 4-fold higher than that of free AZT (Table 3).

To test the possible influence of PG on the antibacterial activity of AZT-loaded PGLs, we prepared PGLs containing lower ratios of PG, i.e., 10 and 20% w/v PG. As demonstrated by the MIC values obtained (Table 3), lowering the PG concentration from 30% in PGLs to 20 and 10% w/v in PGL-20 and PGL-10, respectively, resulted in decreased activity against the staphylococci ATCC 29213, MRSA 10674, 10676, and 10677 strains, which was proportional to the ratio of PG.

Comparison of the abilities of the different types of liposomes to inhibit the growth of planktonic bacteria (Table 3) demonstrated that AZT-loaded CLs were the least effective; however, their activity was still twice as high as that of free AZT. Although the improved *in vitro*

**Table 3**

*In vitro* antibacterial activity of AZT-loaded liposomes against planktonic *S. aureus* ATCC 29213 and 5 MRSA strains.

<i>S. aureus</i> strains	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )						
	Free AZT	CLs	DLs	PGLs	PGLs-20	PGLs-10	CATLs
ATCC 29213	2	1	0.5	0.5	1	1	0.25
MFBF 10674	8	4	1	2	2	4	0.25
MFBF 10676	4	4	1	1	2	2	0.25
MFBF 10677	4	2	1	1	1	2	0.25
MFBF 10679	2	1	1	1	1	1	0.25
MFBF 10680	2	1	1	1	1	1	0.25

PGLs-20, PGLs containing 20% PG; PGLs-10, PGLs containing 10% PG.



**Table 4**  
Biofilm inhibitory effect of AZT-loaded liposomes against *S. aureus* ATCC 29213 and 5 MRSA strains.

<i>S. aureus</i> strains	MBIC ( $\mu\text{g/ml}$ )						
	Free AZT	CLs	DLs	PGLs	PGLs-20	PGLs-10	CATLs
ATCC 29213	8	8	1	2	4	4	0.5
MFBF 10674	32	4	1	4	n.d.	n.d.	1
MFBF 10676	32	4	2	2	n.d.	n.d.	1
MFBF 10677	32	4	2	4	n.d.	n.d.	1
MFBF 10679	16	4	1	1	n.d.	n.d.	0.5
MFBF 10680	16	4	2	2	n.d.	n.d.	1

n.d., not determined; PGLs-20, PGLs containing 20% PG; PGLs-10, PGLs containing 10% PG.

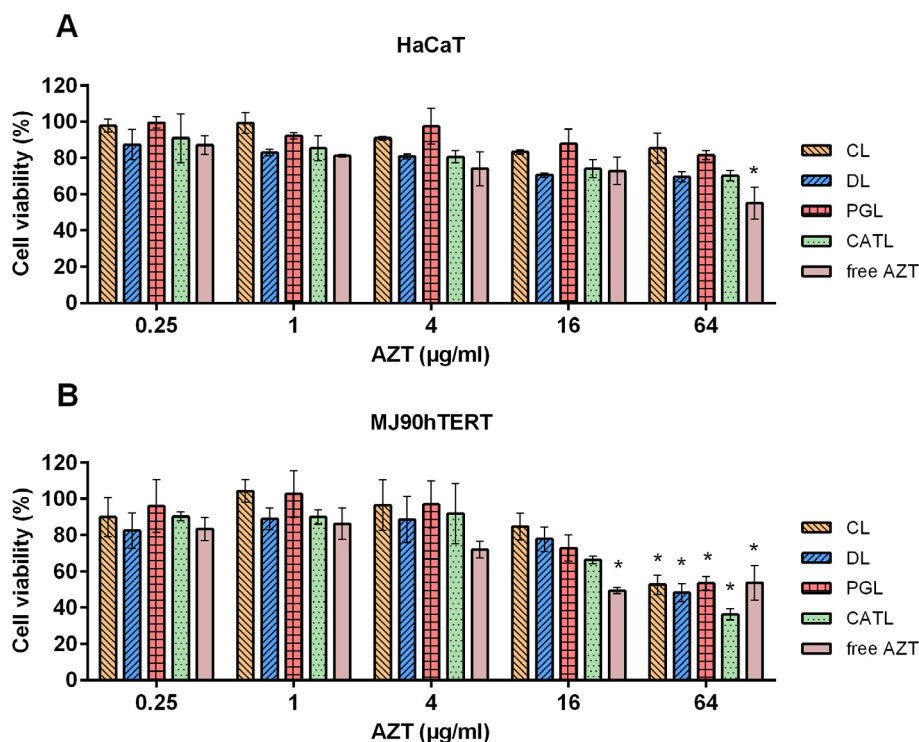
antimicrobial efficacy of AZT-loaded liposomes was clearly dependent on the liposome composition, we were not able to detect any antibacterial activity for empty liposomes (without AZT, data not shown).

To investigate the possible antibiofilm activity of AZT-loaded liposomes, *S. aureus* ATCC 29213 and MRSA strains were exposed to liposomal or free AZT at concentrations between 2 and 256  $\mu\text{g/ml}$  during biofilm formation. The results presented in Table 4 demonstrate the increased effectiveness of all AZT liposomes at preventing biofilm formation compared with that of free AZT. The MBICs of AZT-loaded liposomes that inhibited the biofilm formation of each *S. aureus* strain by 90% ranged from 0.5 to 8  $\mu\text{g/ml}$ . In contrast, the corresponding MBICs of free AZT ranged from 8 to 32  $\mu\text{g/ml}$ . Similarly to the results obtained for planktonic bacteria, the highest anti-MRSA biofilm activity was attained with AZT-loaded CATLs. In most cases (MRSA 10674, 10676, 10677 and 10679), the CATLs were 32-fold more effective at inhibiting biofilm formation than free AZT was. Compared with that of the CATLs, the ability of AZT-loaded CLs to inhibit the formation of MRSA biofilms was lower, but still 4–8 times higher than that of AZT solution. Among the two types of elastic liposomes, DLs were more efficient, with 16- to 32-fold lower MBIC values than those of free AZT. Although PGLs were

somewhat less effective than CATLs and DLs at preventing biofilm formation, they showed greater antibiofilm activity than did CLs. Moreover, PGLs' biofilm-preventing effectiveness appeared to be dependent on the PG concentration. Namely, the MBICs for AZT-loaded PGLs embedding 10 and 20% PG (PGL-10 and PGL-20) were twice as high as those of liposomes containing 30% PG (PGL) against *S. aureus* ATCC 29213. Likewise, against planktonic bacteria, empty liposomes displayed no biofilm formation prevention activity (data not shown).

Analyses of the *in vitro* antibacterial activities of the different types of AZT-loaded liposomes were consistent with previous investigations of AZT liposomes showing increased liposomal AZT activity relative to that of the free drug against different bacterial species (Oh et al., 1995; Solleti et al., 2015; Liu et al., 2016). Furthermore, the lipid composition and physical characteristics of the liposomes affected the antimicrobial activity of AZT, even though empty liposomes showed no direct antibacterial activity *in vitro* at the tested concentrations. The positively charged AZT-loaded liposomes (CATLs) inhibited bacterial growth at concentrations lower than those required by the other liposomal formulations (CLs, DLs, and PGLs). This result could have been a consequence of the presence of the cationic lipid DODAB, which is known to exert microbicidal activity (Melo et al., 2010; Ragioto et al., 2014), as well as the interaction of the positively charged liposome surface of CATLs with the negatively charged bacterial surface. In addition, it is noteworthy that both types of elastic liposomes, especially DLs, exhibited enhanced antibacterial and antibiofilm activity compared with those of CLs. These findings corroborate previous reports on efficient antibacterial activities against *S. aureus* biofilms (*in vitro* and *in vivo*) or MRSA strains (*in vitro*) of daptomycin-loaded DLs composed of lecithin and sodium cholate (Li et al., 2013) and chloramphenicol-loaded phosphatidylcholine/deoxycholic acid liposomes (Hsu et al., 2017).

The efficacy of AZT-loaded CLs, PGLs and DLs in preventing *S. aureus* strain growth could also be due to the negative surface charge on the liposome surface. Namely, negatively charged liposomes were proven to contribute to the antibacterial efficiency of encapsulated AZT against *M. avium* (Oh et al., 1995).



**Fig. 6.** Keratinocytes (A) and fibroblasts (B) viability (%) after 24 h of incubation at 37 °C with different AZT-loaded liposomes and AZT solution as determined by the MTT assay. The values denote the mean  $\pm$  S.D. (n = 3). \*Cell viability below 70%.



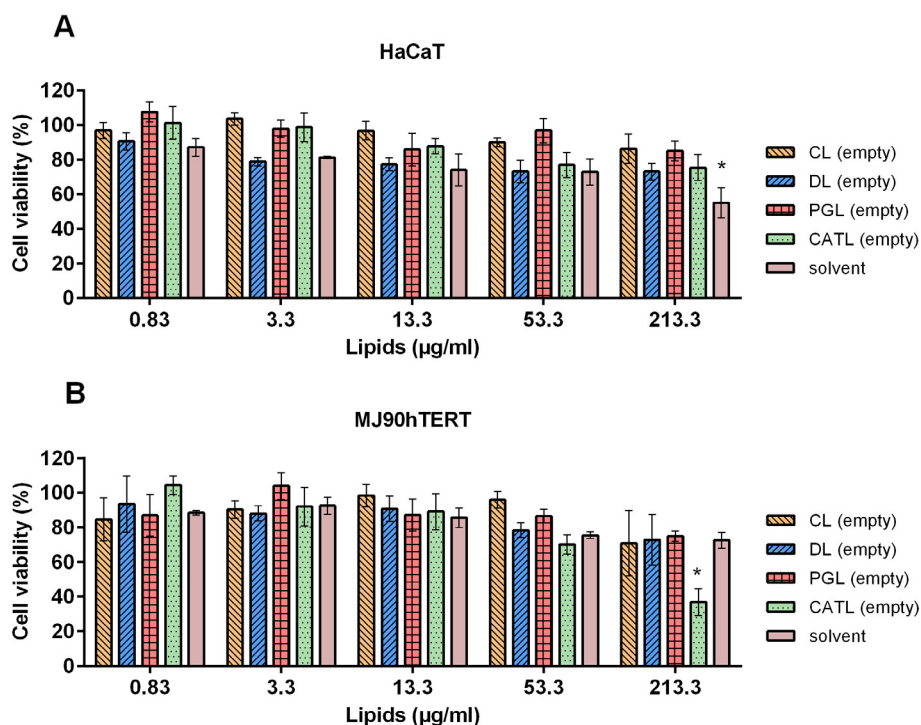


Fig. 7. Keratinocytes (A) and fibroblasts (B) viability (%) after 24 h of incubation at 37 °C with different AZT-free (empty) liposomes and solvent used for dissolving free AZT as determined by the MTT assay. The values denote the mean  $\pm$  S.D. (n = 3). \*Cell viability below 70%.

### 3.7. Cytotoxicity studies

The biocompatibilities of different types of liposomes containing AZT with human HaCaT keratinocytes and MJ90hTERT fibroblasts were evaluated by assessing the cellular metabolic activity (MTT assay). The cell lines were exposed for 24 h to AZT-loaded liposomes or free AZT at drug concentrations ranging from 0.25 to 64 µg/ml, which covered and substantially exceeded the MICs and MBICs of the liposomal and free AZT, respectively.

The results of the cytotoxicity evaluation demonstrated that all the AZT-loaded liposomes were well tolerated by the keratinocytes (Fig. 6A) and slightly less tolerated by the fibroblasts but only at elevated AZT concentrations (Fig. 6B). At the highest drug concentration tested (64 µg/ml), the viability of the keratinocytes was marginally decreased (Fig. 6A) and remained above 70%, while the viability of the fibroblasts, generally known to be more sensitive *in vitro* (Duvnjak Romić et al., 2016), was significantly reduced (Fig. 6B).

Among the different AZT liposomes, CLs and PGLs were completely biocompatible with keratinocytes (Fig. 6A) even at the highest concentration tested. At the same concentration, the viabilities of cells treated with AZT-loaded DLs and CATLs were significantly lower than those of cells treated with AZT-loaded CLs (ANOVA,  $p < 0.05$ ) but remained above 70%, which is considered the noncytotoxic threshold (ISO10993-5). Interestingly, free AZT at the highest concentration (64 µg/ml) exerted a distinct cytotoxic effect on HaCaT cells (Fig. 6A).

Cytotoxicity studies performed on fibroblasts (Fig. 6B) showed that at AZT concentrations of 0.25–4 µg/ml, all the drug-loaded liposomes were noncytotoxic (cell viability above 80%). At 16 µg/ml AZT, the cell viability was above 80% (CLs) or 70% (DLs and PGLs), while for CATLs, the viability was insignificantly decreased below 70% ( $t$ -test,  $p > 0.05$ ). Overall, fibroblasts were more sensitive to both free and liposomal AZT at higher concentration ranges than were keratinocytes. Namely, at the highest concentration, a significant reduction in cell viability ( $< 60\%$ ) was detected for all the tested samples ( $t$ -test,  $p < 0.05$ ). Our results are consistent with the previous studies demonstrating greater sensitivity of fibroblasts than keratinocytes to drug-

loaded micro- and nano-particles (Duvnjak Romić et al., 2016; Hafner et al., 2011).

Considering penetration profile of the different examined AZT liposomes (Fig. 5B) there is obviously no correlation between penetration properties of the liposomes and their biocompatibility/cytotoxicity features (Fig. 6A and B).

The drug-free (empty) liposomes were also examined for possible cytotoxicity at the concentrations that corresponded with the AZT concentrations in the loaded liposomes (Fig. 7A and B). All the drug-free liposomes were biocompatible with the tested cell lines (viability  $\geq 70\%$ ). The only exception was the drug-free CATLs at the highest concentration, as only approximately 40% of the fibroblasts treated with this preparation were viable.

The *in vitro* antibacterial and cytotoxicity studies support previous findings demonstrating that encapsulation of antibiotics in liposomes not only enhances their antibacterial activity but also protects mammalian cells against antibiotic toxicity (Alhajlan et al., 2013; Halwani et al., 2008; Mugabe et al., 2005). The only exception to this observation were CATLs at the highest AZT concentration (64 µg/ml), as the viability of cells treated with this preparation was significantly reduced compared with that of cells treated with free AZT, suggesting that the bilayer constituents of the positively charged liposomes, i.e., DODAB, contribute to the cytotoxicity independently of AZT itself. This assumption was confirmed by analysis of the cytotoxicity of empty CATLs on fibroblasts (Fig. 7B). Namely, cationic lipids with quaternary nitrogen in their molecular structure are known to exert antibacterial efficacy. However, they are also known to cause cytotoxic risks (Manosroi et al., 2008; Ragioto et al., 2014; Soenen et al., 2009). For example, it was demonstrated that 0.5 mM DODAB was toxic to 50% of fibroblasts in culture (Carmona-Ribeiro et al., 1997).

The results of the present study also corroborate the findings of Alhajlan et al. (2013), who showed that negatively charged and uncharged liposomes protected A549 human lung cells from clarithromycin toxicity, while positively charged liposomal antibiotics decreased cell viability.

#### 4. Conclusions

To the best of our knowledge, this study is the first to investigate the use of AZT-loaded liposomes for the possible treatment of MRSA-related skin infections. The physical characteristics of the liposomes were shown to influence the entrapment, release profile, skin localization, antibacterial activity and skin cell biocompatibility of AZT. Based on the superior anti-MRSA activity (with both planktonic bacteria and biofilm) and biocompatibility achieved as well as their localization inside the skin, CATLs could be used for the treatment of superficial chronic skin infections with an impaired *stratum corneum*, while elastic liposomes (DLs and PGLs) are considered optimal for the topical treatment of crusting lesions and deep skin infections.

The next step in our investigation will include the incorporation of AZT liposomes into semisolid vehicle (base) to yield a viscosity appropriate for skin applications and evaluation of the efficacy of the novel formulation on an animal model.

#### Acknowledgment

The authors are grateful to Lipoid (Ludwigshafen, Germany) and PLIVA (Zagreb, Croatia) for providing the phospholipids (SPC, DPPC) and the drug (AZT), respectively. This work was supported by a project entitled “New approach in antimicrobial therapy: Biocompatible, biofilm-penetrating nanosystems” at the University of Zagreb.

#### Declaration of interests

The authors have no conflicts of interest to declare.

#### References

- Abu-Humaidan, A.H., Elvén, M., Sonesson, A., Garred, P., Sørensen, O.E., 2018. Persistent Intracellular *Staphylococcus aureus* in keratinocytes lead to activation of the complement system with subsequent reduction in the intracellular bacterial load. *Front. Immunol.* 9, 396. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00396>.
- Alhajlan, M., Alhariri, M., Omri, A., 2013. Efficacy and safety of liposomal clarithromycin and its effect on *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2694–2704. <https://doi.org/10.1128/AAC.00235-13>.
- Alhariri, M., Azghani, A., Omri, A., 2013. Liposomal antibiotics for the treatment of infectious diseases. *Expert Opin. Drug Deliv.* 10, 1515–1532. <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.822860>.
- Cadena, P.G., Pereira, M.A., Cordeiro, R.B.S., Cavalcanti, I.M.F., Barros Neto, B., Pimentel, M.C.C.B., Lima Filho, J.L., Silva, V.L., Santos-Magalhaes, N.S., 2013. Nanoencapsulation of quercetin and resveratrol into elastic liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2012.10.022>.
- Carmona-Ribeiro, A.M., Ortis, F., Schumacher, R.I., Armelin, M.C.S., 1997. Interaction between cationic vesicles and cultured mammalian cells. *Langmuir* 13, 2215–2218. <https://doi.org/10.1021/la960759h>.
- Creech, C.B., Al-Zubeidi, D.N., Fritz, S.A., 2015. Prevention of recurrent *Staphylococcal* skin infections. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 29, 429–464. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.05.007>.
- Čukušić Kalajžić, A., Škrobot Vidaček, N., Huzak, M., Ivanković, M., Rubelj, I., 2014. Telomere Q-PNA-FISH-reliable results from stochastic signals. *PLoS One* 9, e92559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092559>.
- Dong, D., Thomas, N., Thierry, B., Vreugde, S., Clive, A., Prestidge, C.A., Wormald, P.J., 2015. Distribution and inhibition of liposomes on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *PLoS One* 10, e0131806. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131806>.
- Drulis-Kawa, Z., Dorotkiewicz-Jach, A., Gubinator, J., Gula, G., Bocor, T., Doroszkiewicz, W., 2009. The interaction between *Pseudomonas aeruginosa* cells and cationic PC:Chol:DOTAP liposomal vesicles versus outer-membrane structure and envelope properties of bacterial cell. *Int. J. Pharm.* 367, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.09.043>.
- Duvnjak Romić, M., Klarić Šegvić, M., Lovrić, J., Pepić, I., Cetina-Čizmek, B., Filipović-Grčić, J., Hafner, A., 2016. Melatonin-loaded chitosan/Pluronic® F127 microspheres as in situ forming hydrogel: an innovative antimicrobial wound dressing. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 107, 67–79. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.06.013>.
- El Maghraby, G.M., Williams, A.C., 2009. Vesicular systems for delivering conventional small organic molecules and larger macromolecules to and through human skin. *Expert Opin. Drug Deliv.* 6, 149–163. <https://doi.org/10.1517/17425240802691059>.
- Elmoslemany, R.M., Abdallah, O.Y., El-Khordagui, L.K., Khalafallah, N.M., 2012. Propylene glycol liposomes as a topical delivery system for miconazole nitrate: comparison with conventional liposomes. *AAPS PharmSciTech* 13, 723–731. <https://doi.org/10.1208/s12249-012-9783-6>.
- Elsayed, M.M., Abdallah, O.Y., Naggar, V.F., Khalafallah, N.M., 2007. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. *Int. J. Pharm.* 332, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.12.005>.
- Esposito, S., Bassetti, M., Concia, E., De Simone, G., De Rosa, F.G., Grossi, P., Novelli, A., Menichetti, F., Petrosillo, N., Tinelli, M., Tumbarello, M., Sanguinetti, M., Viale, P., Venditti, M., Viscoli, C., 2017. Diagnosis and management of skin and soft-tissue infections (SSTI). A literature review and consensus statement: an update. *J. Chemother.* 29, 197–214. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2017.1311398>.
- Forier, K., Raemdonck, K., De Smedt, S.C., Demeester, J., Coenye, T., Braeckmans, K., 2014. Lipid and polymer nanoparticles for drug delivery to bacterial biofilms. *J. Control. Release* 190, 607–623. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.055>.
- Fung, H.B., Chang, J.Y., Kuczynski, S., 2003. A practical guide to the treatment of complicated skin and soft tissue infections. *Drugs* 63, 1459–1480. <https://doi.org/10.2165/00003495-200363140-00003>.
- Gillet, A., Compere, P., Lecomte, F., Hubert, P., Ducat, E., Evrard, B., Piel, G., 2011. Liposome surface charge influence on skin penetration behavior. *Int. J. Pharm.* 411, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.049>.
- Godin, B., Touitou, E., Rubinstein, E., Athamna, A., Athamna, M., 2005. A new approach for treatment of deep skin infections by an ethosomal antibiotic preparation: an in vivo study. *J. Antimicrob. Chemother.* 55, 989–994. <https://doi.org/10.1093/jac/dki125>.
- Hafner, A., Lovrić, J., Pepić, I., Filipović-Grčić, J., 2011. Lecithin/chitosan nanoparticles for transdermal delivery of melatonin. *J. Microencapsul.* 28, 807–815. <https://doi.org/10.3109/02652048.2011.622053>.
- Halwani, M., Yebio, B., Suntres, Z.E., Alipour, M., Azghani, A.O., Omri, A., 2008. Co-encapsulation of gallium with gentamicin in liposomes enhances antimicrobial activity of gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 1291–1297. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn422>.
- Hua, S., 2015. Lipid-based nano-delivery systems for skin delivery of drugs and bioactives. *Front. Pharmacol.* 6, 219. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00219>.
- Hurler, J., Berg, O.A., Skar, M., Conradi, A.H., Johnsen, P.J., Škalco-Basnet, N., 2012. Improved burns therapy: liposomes-in-hydrogel delivery system for mupirocin. *J. Pharm. Sci.* 101, 3906–3915. <https://doi.org/10.1002/jps.23260>.
- Hsu, C.Y., Yang, S.C., Sung, C.T., Weng, Y.H., Fang, J.Y., 2017. Anti-MRSA malleable liposomes carrying chloramphenicol for ameliorating hair follicle targeting. *Int. J. Nanomedicine* 12, 8227–8238. <https://doi.org/10.2147/IJN.S147226>.
- Imamura, Y., Higashiyama, Y., Tomono, K., Izumikawa, K., Yanagihara, K., Ohno, H., Miyazaki, Y., Hirakata, Y., Mizuta, Y., Kadota, J., Iglewski, B.H., Kohno, S., 2005. Azithromycin exhibits bactericidal effects on *Pseudomonas aeruginosa* through interaction with the outer membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1377–1380. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.4.1377-1380.2005>.
- Iwaszkiewicz, K.S., Hua, S., 2014. Development of an effective topical liposomal formulation for localized analgesia and anti-inflammatory actions in the complete Freund's adjuvant rodent model of acute inflammatory pain. *Pain Physician* 17, E719–E735.
- ISO10993-5, 1992. Biological Evaluation of Medical Devices-Part 5: Tests for Cytotoxicity: In Vitro Methods.
- Kawano, K., Onose, E., Hattori, Y., Maitani, Y., 2009. Higher liposomal membrane fluidity enhances the in vitro antitumor activity of folate-targeted liposomal mitoxantrone. *Mol. Pharm.* 6, 98–104. <https://doi.org/10.1021/mp800069c>.
- Kennedy, P., Brammah, S., Wills, E., 2010. Burn, biofilm and a new appraisal of burn wound sepsis. *Burns* 36, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2009.02.017>.
- Kifer, D., Mužinić, V., Šegvić Klarić, M., 2016. Antimicrobial potency of single and combined mupirocin and monoterpenes, thymol, menthol and 1,8-cineole against *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm growth. *J. Antibiot.* 69, 689–696. <https://doi.org/10.1038/ja.2016.10>.
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., Možina Smole, S., 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J. Microbiol. Methods* 81, 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004>.
- Lee, B.Y., Singh, A., David, M.Z., Bartsch, S.M., Slayton, R.B., Huang, S.S., Zimmer, S.M., Potter, M.A., Macal, C.M., Lauderdale, D.S., Miller, L.G., Daum, R.S., 2013. The economic burden of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Clin. Microbiol. Infect.* 19, 528–536. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03914.x>.
- Li, C., Zhang, X., Huang, X., Wang, X., Liao, G., Chen, Z., 2013. Preparation and characterization of flexible nanoliposomes loaded with daptomycin, a novel antibiotic, for topical skin therapy. *Int. J. Nanomedicine* 8, 1285–1292. <https://doi.org/10.2147/IJN.S41695>.
- Liu, X., Li, Z., Wang, X., Chen, Y., Wu, F., Men, K., Xu, T., Luo, Y., Yang, L., 2016. Novel antimicrobial peptide-modified azithromycin-loaded liposomes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Nanomed.* 11, 6781–6794. <https://doi.org/10.2147/IJN.S107107>.
- Manconi, M., Mura, S., Sinico, C., Fadda, A.M., Vila, A.O., Molina, F., 2009. Development and characterization of liposomes containing glycols as carriers for diclofenac. *Colloid Surface A* 342, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.04.006>.
- Mandić, Z., 2014. Voltammetric study of the partitioning of macrocyclic antibiotics at the water/nitrobenzene interface: relationship to the pharmacokinetic profiling of macrolides. *ADMET & DMPK* 2, 168–178. <https://doi.org/10.5599/admet.2.3.46>.
- Manosroi, A., Thathang, K., Werner, R.G., Schubert, R., Peschka-Süss, R., Manosroi, J., 2008. Development of highly stable and low toxic cationic liposomes for gene therapy. *Arzneimittelforschung* 58, 485–492. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1296545>.
- Martin, C., Low, W.L., Gupta, A., Amin, M.C., Radecka, I., Britland, S.T., Raj, P., Kenward, K.M., 2015. Strategies for antimicrobial drug delivery to biofilm. *Curr. Pharm. Des.* 21, 43–66. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140905123529>.
- McFarland, J.W., Berger, C.M., Froshauer, S.A., Hayashi, S.F., Hecker, S.J., Jaynes, B.H.,

- Jefson, M.R., Kamicker, B.J., Lipinski, C.A., Lundy, K.M., Reese, C.P., Vu, C.B., 1997. Quantitative structure-activity relationships among macrolide antibacterial agents: in vitro and in vivo potency against *Pasteurella multocida*. *J. Med. Chem.* 40, 1340–1346. <https://doi.org/10.1021/jm960436i>.
- Melo, L.D., Mamizuka, E.M., Carmona-Ribeiro, A.M., 2010. Antimicrobial particles from cationic lipid and polyelectrolytes. *Langmuir* 26, 12300–12306. <https://doi.org/10.1021/la101500s>.
- Messiaen, A.S., Forier, K., Nelis, H., Braeckmans, K., Coenye, T., 2013. Transport of nanoparticles and tobramycin-loaded liposomes in *Burkholderia cepacia* complex biofilms. *PLoS One* 8, e79220. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079220>.
- Mugabe, C., Azghani, A.O., Omri, A., 2005. Liposome-mediated gentamicin delivery: development and activity against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 55, 269–271. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh518>.
- Nafee, N., 2015. Nanocarriers against bacterial biofilms: current status and future perspectives. In: Rai, M., Kon, K. (Eds.), *Nanotechnology in Diagnosis, Treatment and Prophylaxis of Infectious Diseases*. Elsevier, London, pp. 167–189.
- NCCLS Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2007. Clinical and Laboratory Standards Institute – NCCLS.
- New, R.R.C., 1990. *Liposomes: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford.
- Oh, Y.K., Nix, D.E., Straubinger, R.M., 1995. Formulation and efficacy of liposome-encapsulated antibiotics for therapy of intracellular *Mycobacterium avium* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2104–2111. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.9.2104>.
- Palac, Z., Engesland, A., Flaten, G.E., Škalko-Basnet, N., Filipović-Grčić, J., Vanić, Ž., 2014. Liposomes for (trans)dermal drug delivery: the skin-PVPA as a novel in vitro stratum corneum model in formulation development. *J. Liposome Res.* 24, 313–322. <https://doi.org/10.3109/08982104.2014.899368>.
- Peters, D.H., Friedel, H.A., McTavish, D., 1992. Azithromycin: a review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy. *Drugs* 44, 750–799.
- Ragiotto, D.A.M.T., Carrasco, L.D.M., Carmona-Ribeiro, A.M., 2014. Novel gramicidin formulations in cationic lipid as broad-spectrum microbicidal agents. *Int. J. Nanomed.* 9, 3183–3192. <https://doi.org/10.2147/IJN.S65289>.
- Robinson, A.M., Bannister, M., Creeth, J.E., Jones, M.N., 2001. The interaction of phospholipid liposomes with mixed bacterial biofilms and their use in the delivery of bactericide. *Colloid. Surface A* 186, 43–53. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(01\)00481-2](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(01)00481-2).
- Rukavina, Z., Vanić, Ž., 2016. Current trends in development of liposomes for targeting bacterial biofilms. *Pharmaceutics* 8, 18. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8020018>.
- Sachetelli, S., Khalil, H., Chen, T., Beaulac, C., Senechal, S., Lagace, J., 2000. Demonstration of a fusion mechanism between a fluid bactericidal liposomal formulation and bacterial cells. *BBA-Biomembranes* 1463, 254–266. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00217-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00217-5).
- Škalko-Basnet, N., Vanić, Ž., 2017. Lipid-based nanopharmaceuticals in antimicrobial therapy. In: Boukherroub, R., Szunerits, S., Drider, D. (Eds.), *Functionalized Nanomaterials for the Management of Microbial Infection, A Strategy to Address Microbial Drug Resistance*. Elsevier, Amsterdam, pp. 111–152.
- Soenen, S.J., Brisson, A.R., De Cuyper, M., 2009. Addressing the problem of cationic lipid-mediated toxicity: the magnetoliposome model. *Biomaterials* 30, 3691–3701. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.03.040>.
- Solleti, V.S., Alhariri, M., Halwani, M., Omri, A., 2015. Antimicrobial properties of liposomal azithromycin for *Pseudomonas* infections in cystic fibrosis patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 784–796. <https://doi.org/10.1093/jac/dku452>.
- Soong, G., Paulino, F., Wachtel, S., Parker, D., Wickersham, M., Zhang, D., Brown, A., Lauren, C., Dowd, M., West, E., Horst, B., Planet, P., Prince, A., 2015. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* adaptation to human keratinocytes. *mBio* 6 <https://doi.org/10.1128/mBio.00289-15>. e00289-15.
- Vanić, Ž., Hafner, A., Bego, M., Škalko-Basnet, N., 2013. Characterization of various deformable liposomes with metronidazole. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 39, 481–488. <https://doi.org/10.3109/03639045.2012.670247>.
- Vanić, Ž., Hurler, J., Ferderber, K., Golja Gašparović, P., Škalko-Basnet, N., Filipović-Grčić, J., 2014. Novel vaginal drug delivery system: deformable propylene glycol liposomes-in-hydrogel. *J. Liposome Res.* 24, 27–36. <https://doi.org/10.3109/08982104.2013.826242>.
- Vanić, Ž., Holsæter, A.-M., Škalko-Basnet, N., 2015. (Phospho)lipid-based nanosystems for skin administration. *Curr. Pharm. Des.* 21, 4174–4192. <https://doi.org/10.2174/1381612821666150901095838>.
- Wu, E.C., Kowalski, R.P., Romanowski, E.G., Mah, F.S., Gordon, Y.J., Shanks, R.M.Q., 2010. AzaSite® inhibits *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* biofilm formation *in vitro*. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 26, 557–562. <https://doi.org/10.1089/jop.2010.0097>.

## RESEARCH ARTICLE

**Liposomes for (trans)dermal drug delivery: the skin-PVPA as a novel *in vitro* stratum corneum model in formulation development**Zora Palac<sup>1</sup>, André Engesland<sup>2</sup>, Gøril Eide Flaten<sup>2</sup>, Nataša Škalko-Basnet<sup>2</sup>, Jelena Filipović-Grčić<sup>1</sup>, and Željka Vanić<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia and <sup>2</sup>Department of Pharmacy, Drug Transport and Delivery Research Group, Faculty of Health Sciences, University of Tromsø, Tromsø, Norway**Abstract**

Penetration potential of vesicles destined for trans(dermal) administration remains to be of great interests both in respect to drug therapy and cosmetic treatment. This study investigated the applicability of the phospholipid vesicle-based permeation assay (PVPA) as a novel *in vitro* skin barrier model for screening purposes in preformulation studies. Various classes of liposomes containing hydrophilic model drug were examined, including conventional liposomes (CLs), deformable liposomes (DLs) and propylene glycol liposomes (PGLs). The size, surface charge, membrane deformability and entrapment efficiency were found to be affected by the vesicle lipid concentration, the presence of the surfactant and propylene glycol. All liposomes exhibited prolonged drug release profiles with an initial burst effect followed by a slower release phase. The permeation of the drug from all of the tested liposomes, as assessed with the mimicked *stratum corneum* – PVPA model, was significantly enhanced as compared to the permeability of the drug in solution form. Although the DLs and the PGLs exhibited almost the same membrane elasticity, the permeability of the drug delivered by PGLs was higher ( $6.2 \times 10^{-6}$  cm/s) than DLs ( $5.5 \times 10^{-6}$  cm/s). Therefore, this study confirmed both the potential of liposomes as vesicles in trans(dermal) delivery and potential of the newly developed skin-PVPA for the screening and optimization of liposomes at the early preformulation stage.

**Keywords**

Nanotechnology, permeability, phospholipids, skin, sustained release

**History**

Received 29 November 2013

Revised 14 February 2014

Accepted 25 February 2014

Published online 19 March 2014

**Introduction**

Transdermal drug delivery provides many advantages over other administration routes, including the avoidance of gastrointestinal side-effects, hepatic first-pass effects and variability in absorption as well as lower fluctuations in plasma drug levels (El Maghraby et al., 2006). Moreover, the transdermal route is non-invasive, painless, easy and well accepted by patients. Unfortunately, the barrier nature of *stratum corneum* limits the penetration of most drugs (Honeywell-Nguyen & Bouwstra, 2005). Different strategies have been used to improve transdermal delivery, including the optimization of the drug and vehicle properties, the modification of *stratum corneum* by chemical penetration enhancers, and electrical/external force methods such as iontophoresis, electroporation and sonophoresis (Delgado-Charro & Guy, 2001). Considerable research has focused on developing nanopharmaceuticals, including nanoparticles (nanospheres, nanocapsules) derived from natural or synthetic polymers, nanoemulsions, solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid

carriers, dendrimers and vesicular nanosystems, such as niosomes and liposomes, to enhance the transport of drugs through the skin (Cereda et al., 2013; Cevc & Vierl, 2010; Prow et al., 2011; Subongkot et al., 2012). The use of nanopharmaceuticals enables the alteration of the pharmacokinetic properties of a given drug and increases its bioavailability. Liposomes have received particular attention among nanopharmaceuticals. Their phospholipid nature, non-toxicity and ability to encapsulate different compounds (hydrophilic, lipophilic and amphiphilic) make liposomes a promising option for improved skin drug delivery. However, most of the reports on conventional liposomes (CLs) describe localized effects as a result of vesicles accumulation in the *stratum corneum* or upper layers of the epidermis (Barry, 2001). To overcome these limitations, new classes of lipid vesicles with pronounced membrane elasticity, such as deformable (flexible, elastic) liposomes (DLs) (Cevc et al., 1998), ethosomes (Touitou et al., 2000), invasomes (Dragicevic-Curic et al., 2008) and propylene glycol-containing liposomes (PGLs) (Elsayed et al., 2007a), have been investigated. These novel types of liposomes demonstrate superior skin penetration ability and seem to transport active substances more efficaciously through *stratum corneum* into the deeper layers of the skin and even transdermally. In order to optimize their composition and desired outcome, the drug permeability studies, performed on robust and reliable models, are essential

Address for correspondence: Željka Vanić, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Kovačića 1, Zagreb 10000, Croatia. Tel: +38 516394762. Fax: +38 514612691. E-mail: zeljka.vanic@pharma.hr



for the successful development of liposomes for (trans)dermal drug delivery.

*In vitro* studies using human skin are ideal for monitoring drug delivery and evaluating the drug formulation because these studies ensure an accurate representation of the processes involved. However, the complex nature of biological tissue, the inter- and intra-individual variability of skin samples and ethical issues limit the use of human skin in the early stages of formulation assessment. Most *in vitro* investigations use pig ear skin because of its structural equivalence to human skin (Herkenne et al., 2007; Salerno et al., 2010); however, measurements using Franz diffusion cell and animal skin are only partially standardized, leading to large variations in permeability results (Chilcott et al., 2005). Artificial model membranes, such as silicone membranes (Oliveira et al., 2010), the ceramide-derived parallel artificial membrane permeability assay (Sinko et al., 2012) and the phospholipid vesicle-based permeation assay (PVPA) (Engesland et al., 2013), represent simple and reproducible methods for studying the fundamental mechanisms of drug permeation.

The skin-PVPA is a novel *in vitro* skin barrier model based on the tightly packed phospholipid vesicles chosen to mimic *stratum corneum*. This assay provides a valuable method for evaluating the skin permeation of different drugs (Engesland et al., 2013) and has the potential to be used to estimate (trans)dermal formulations. Skin-PVPA has not yet been examined for the assessment of skin-targeting nanopharmaceuticals. Therefore, the present study evaluated the applicability of this novel skin barrier in determining the drug penetration abilities of various liposomes. CLs, DLs and PGLs containing a hydrophilic model drug (diclofenac sodium) were prepared and their physicochemical properties were evaluated. It has been shown that the lipid concentration and composition, presence of edge activators and/or penetration enhancers, lamellarity, particle size, surface charge, entrapment efficiency and mode of application affect the degree of (trans)dermal drug penetration and, consequently, the efficacy of the liposomes as a drug delivery system (Cevc & Blume, 1992; Gillet et al., 2011a,b).

## Materials and methods

### Materials

Soy lecithin (Lipoid S75) and egg phosphatidylcholine (Lipoid E80) were generous gifts from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Diclofenac sodium (DCS) (Mw 318.13) was kindly provided by Pliva Croatia Ltd. (Zagreb, Croatia). Ceramides from bovine spinal cord, cholesterol, cholesteryl sulfate, palmitic acid, Sepharose CL-4B, Sephadex G-50 and sodium deoxycholate (SDCh) were purchased from Sigma-Aldrich Company (St. Louis, MO). Chloroform was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ethanol, methanol and propylene glycol (PG) were of analytical grade and were obtained from Kemika (Zagreb, Croatia). Filter inserts (Transwell,  $d = 6.5$  mm) and plates were purchased from Corning Inc. (Corning, NY). Mixed cellulose ester filters (0.65  $\mu$ m pore size) and the isopore filters (0.8 and 1.2  $\mu$ m pore size) were obtained from Millipore (Billerica, MA). Nucleopore filters (0.4  $\mu$ m pore

size) were purchased from Whatman (part of GE Healthcare, Oslo, Norway).

Phosphate buffer was prepared by dissolving  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.6 g),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  (6.4 g), NaCl (7.24 g) and  $\text{NaN}_3$  (0.2 g) in distilled water up to 1000 ml, and the pH was adjusted to 7.4 by adding HCl or NaOH.

### Preparation of liposomes

CLs, DLs and PGLs of different lipid concentrations (26 or 52 mM total lipids) were prepared by a film hydration method (Vanić et al., 2012). Briefly, Lipoid S75 (for the CLs and the PGLs) or Lipoid S75/SDCh at an 85/15% weight ratio (for the DLs) was dissolved in concentrated ethanol in a round-bottomed flask. The ethanol was removed completely using a rotary vacuum evaporator (Büchi Rotavapor R-200, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland), and the thin lipid layer was hydrated by adding an aqueous solution of DCS (150 mg/10 ml) for the preparation of CLs and DLs. For the preparation of PGLs, 10% or 30% (w/v) of PG was added to the aqueous solution of the DCS. All of the liposome preparations were extruded three times through the 400 nm pore size polycarbonate membranes (LiposoFast, Avestin, Canada).

The phospholipid contents in all of the liposome formulations were determined as the total amount of phosphorous according to Bartlett (1959). The recoveries were found to be in the range between 93 and 98.3% of the starting amounts.

### Size measurements

The mean diameter and the polydispersity index (PI) of the liposomes were determined by photon correlation spectroscopy (PCS) on a Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Malvern, UK) 24 h after preparation. Measurements were performed at a scattering angle of  $90^\circ$  and a temperature of  $25^\circ\text{C}$ . The liposome samples were diluted with 1 mM NaCl, which was previously filtered through 200 nm Minisart filters, to achieve a count rate of between 100 and 300 Kcps. Prior to the measurements, all of the prepared liposomes were sonicated for 15 s in an ultrasonication bath (Branson 1210, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT) (Vanić et al., 2013).

### Zeta potential measurements

Zeta potential measurements were performed on a Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Malvern, UK) using a capillary cell with the optical modulator operating at 1000 Hz. To ensure the validity of the measurements, the instrument was calibrated throughout the measurements using the Malvern Zeta Potential Transfer Standard ( $-50 \pm 5$  mV). Liposomal samples were prepared by diluting the liposome suspension with an appropriate volume of 1 mM NaCl to achieve the proper count rate. All measurements were performed at  $25^\circ\text{C}$  (Vanić et al., 2013).

### Entrapment efficiency determination

To determine the entrapment of DCS in liposomes, untrapped (free) DCS was separated from the liposomes by four

different methods: gel chromatography, minicolumn centrifugation, ultracentrifugation and dialysis. Gel chromatography was performed on Sepharose CL-4B (Vanić et al., 2012), and minicolumn centrifugation was conducted with Sephadex G-50 minicolumns according to a previously described procedure (Vanić et al., 2013). For the ultracentrifugation method, 0.5 ml of each liposome suspension was diluted with 1.5 ml of demineralized water and ultracentrifuged (Beckman Optima LE-80 K Ultracentrifuge, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA) for 1 h at 100 000 *g* (20 °C). The supernatant (untrapped drug) was removed, and the pellet was washed with 2 ml of water under the same conditions. To separate the untrapped drug by dialysis, the samples of liposome suspensions (100 µl) were placed in a dialysis bag (Dialysis Tubing Visking, Medicell International Ltd., London, UK, Mw cut-off 12–14 000 Da) and extensively dialyzed in 100 ml of demineralized water for 1 h during constant stirring at 50 rpm. The receptor medium was completely replaced with fresh medium continuing dialysis for the next hour. The concentrations of both the untrapped (free) and the liposome-entrapped drug were determined spectrophotometrically (Ultraviolet Plus, Pharmacia LKB, Cambridge, UK). The concentration of the free DCS was measured at 276 nm (demineralized water), and the loaded drug was detected at 282 nm after dissolving the liposomes in methanol.

The entrapment of the drug was expressed as the entrapment efficiency (%), and the drug/lipid ratio according to the following equations:

$$\text{Entrapment efficiency (\%)} = \frac{\text{LD}}{\text{LD} + \text{FD}} \times 100$$

$$\text{Drug/lipid ratio (\mu g/mg)} = \frac{\mu\text{g of the drug in liposomes}}{\text{mg of lipid recovered}}$$

$$\text{Drug recovery (\%)} = \frac{\text{LD} + \text{FD}}{\text{total drug}} \times 100$$

where LD is drug in liposomes and FD is free (untrapped) drug.

The amount of the total drug was determined by using an aliquot of the initial liposome suspension and adding methanol to dissolve lipids in the liposomes.

The recovery of the drug was determined for all of the samples and was found to be between 89.7 and 98.5%.

### Measurements of liposome elasticity

The membrane elasticity of the liposomes was determined with a home-made device, as previously reported (Vanić et al., 2014). In brief, an external pressure of 5 bar was used to drive the flux of extruded liposome suspensions through a membrane with a pore size of 100 nm. The amount of liposome suspension that was extruded in 5 min was measured, and the mean diameter and polydispersity index (PI) were monitored by PSC measurements before and after extrusion. The degree of membrane elasticity of the liposomes (E) was calculated with the following equation:

$$E = J(r_v/r_p)^2,$$

where J is the amount of suspension (g) extruded in 5 min,  $r_v$  is the mean diameter of the liposomes after extrusion and

$r_p$  is the membrane pore size (Ferderber et al., 2009; Jain et al., 2003).

The measurements were performed with liposomes that were prepared with the lower lipid concentration (CL-A, DL-A, PGL-10-A, PGL-30-A) and extruded three times through a membrane with a pore size of 400 nm.

### Storage stability study

Samples of CL-A, DL-A and PGL-10-A (extruded through 400 nm pore size filters) were stored for a period of ten months at 4 °C, and the mean diameter, PI and zeta potential were analyzed as described above.

### In vitro release studies

The release of DCS from liposomes that were previously separated from untrapped drug was performed on a Franz cell diffusion system under sink conditions using cellulose membranes and a heating circulator set to 32 °C (Hurler et al., 2012). The acceptor chamber (16 ml) was filled with demineralized water. Aliquots of the liposomes (200 µl) or a control solution (an aqueous solution of DCS at a concentration that corresponds to the liposome formulations) were added to the donor chamber onto a presoaked membrane, and the system was adequately sealed. The receptor medium was constantly mixed with a small magnetic stirrer. Samples (1 ml) were withdrawn from the acceptor compartment at certain time intervals and replaced with fresh medium. The amount of released DCS was determined spectrophotometrically as described above.

### Permeability studies on the novel artificial stratum corneum barrier (skin-PVPA)

The DCS permeability of various liposomes (CL-A, DL-A, PGL-10-A) was evaluated on the recently developed skin-PVPA model (Engesland et al., 2013). Phospholipid vesicles composed of materials similar to those found in human *stratum corneum* were prepared and used to build an artificial *stratum corneum* barrier.

### Preparation of vesicles for PVPA

The vesicles were prepared using the film hydration method (Flaten et al., 2006a). Two different lipid compositions were used:

- (1) E-80 (77%, w/w) and cholesterol (23%, w/w) for the preparation of phospholipid vesicles 1 (PV-1);
- (2) E-80 (50%, w/w), ceramides (27.5%, w/w), cholesterol (12.5%, w/w), cholesteryl sulfate (2.5%, w/w) and palmitic acid (7.5%, w/w) for the preparation of phospholipid vesicles 2 (PV-2).

The lipids were dissolved in chloroform (for PV-1) or in a mixture of chloroform and methanol (1:1, volume ratio, for PV-2). The organic solvents were removed by evaporation, and the dried lipid films were hydrated with phosphate buffer, pH 7.4, followed by the addition of 10% (v/v) ethanol to achieve 6% (w/v) dispersions. The PV-1 were then extruded by nitrogen-driven extrusion (Lauda Dr R Wobster GmbH Königshofen, Germany) using 400 and 1200 nm pore size filters, and the PV-2 were extruded through 1200 nm filters

using Liposofast (Avestin Europe GmbH, Mannheim, Germany). The different strategies for extrusion of the two types of vesicles were chosen because we were unable to extrude the less flexible PV-1 by hand using the easy Liposofast-based method.

The size measurements of all of the phospholipid vesicles used to prepare the PVPA were determined by PCS using a Submicron Particle Sizer 370 (PSS Nicomp Particle Sizing Systems, Santa Barbara, CA) (Flaten et al., 2006b).

#### Preparation of PVPA barriers

The modified PVPA barriers designed to study the permeability of DCS from different liposomal formulations were prepared based on the recently developed skin-PVPA models (Engesland et al., 2013). PVPA<sub>c</sub> denotes the PVPA barrier prepared with PV-1, while PVPA<sub>s</sub> denotes the more complex PVPA barrier mimicking *stratum corneum* that was prepared with PV-2. The procedure was as follows: the small vesicles (extruded through 400 nm pores) were distributed into the pores of the filter support (650 nm) using repeated centrifugation (950 g) for 15 min followed by heating at 50 °C for 45 min. Then, the large vesicles (extruded through 1200 nm pores) were deposited on top of the filter support as follows:

- 35 μl of PV-1 (for preparation of PVPA<sub>c</sub>) was deposited on the top layer of the filter support and centrifuged at 1030 g for 30 min. Invert centrifugation of inserts at 25 g was then used to remove the supernatant, followed by freezing at –70 °C for at least 1 h to promote the fusion of the vesicles. The barrier was thawed at 30 °C for 2 h prior to the permeability experiment.
- 35 μl of PV-2 (for preparation of PVPA<sub>s</sub>) was placed onto the filter support and centrifuged at 950 g for 15 min (to align the vesicles on the surface). After evaporation at 50 °C for 30 min (15 min in a closed container and 15 min in an open container), the barrier was frozen at –70 °C for 1 h. The barrier was thawed at 30 °C for 2 h prior to the permeability experiment.

#### Permeation experiments with liposomal formulations using the PVPA models

Permeation studies with various classes of liposomes containing DCS, namely, CL-A, DL-A and PGL-10-A (extruded 3 × 400 nm and separated from the untrapped drug), were performed according to the procedure described previously for the permeability testing of hydrophilic compounds (Flaten et al., 2006a). In brief, the inserts were loaded with 100 μl of the liposomal formulations, all containing the same amount of the drug (donor compartment). At certain time intervals (every 1 h in the first 3 h and every 0.5 h for the next 2 h), the inserts were moved to wells containing pH 7.4 phosphate buffer (600 μl) as an acceptor medium to maintain sink conditions. At the end of experiment (after 5 h), 200 μl of samples from each acceptor compartment were transferred into 96-well titer plates for spectrophotometric analysis (Spectramax 190; Molecular Device Corporation, Sunnyvale, CA). Control trials with DSC aqueous solutions with the same concentration of DSC as in the liposomal

samples were performed under the same conditions. All of the trials were performed at least in triplicate.

To test the integrity of the barriers, the electrical resistance of the PVPA barriers was measured (Millicell-ERS; Millipore) immediately after finishing the permeability studies.

The apparent permeability coefficients ( $P_{app}$ ) were calculated from the steady-state flux according to the following equation:

$$P_{app}(\text{cm/s}) = J/AC_d,$$

where J is the observed flux rate (nmol/s), A is the surface area of the insert (cm<sup>2</sup>) and C<sub>d</sub> is the concentration of DCS in the donor compartment (nmol/ml).

#### Statistical analysis

The statistical data analyses of the two groups were performed using Student's *t*-test, and the means were considered significantly different when  $p < 0.05$ . When comparing three or more groups, a one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test with  $p < 0.05$  set as the minimal level of significance were applied. Calculations were performed with the GraphPad Prism program (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

## Results and discussion

### Physicochemical properties of liposomes

To effectively deliver the hydrophilic drug through the skin, different classes of liposomes were prepared and investigated, including CLs, DLs and PGLs. Composition of the liposomes used as drug carrier is known to influence their physicochemical properties and therefore their efficacy as drug delivery systems (Šentjurc et al., 1999). Therefore, the first objective of this study was to evaluate and optimize the liposome formulations based on the effect of the lipid composition and concentration on the size, charge, membrane elasticity (deformability) and, most importantly, entrapment efficiency. All liposomes were prepared by the film hydration method using two different lipid concentrations (26 and 52 mM) and keeping the DCS concentration constant in all formulations (47 mM).

### Liposome size and charge

As shown in Table 1, the liposomes prepared with the lower lipid concentration (formulations denoted as CL-A, DL-A, PGL-10-A and PGL-30-A) had a mean diameter ranging from 239 nm for the DL-A to 390 nm for the PG liposomes containing 30% (w/v) of PG in formulation (PGL-30-A). The mean diameter of the CL-A liposomes was between these two formulations (278 nm). Increasing the lipid concentration from 26 to 52 mM (formulations denoted as CL-B, DL-B, PGL-10-B and PGL-30-B) resulted in a larger size of CL-B (312 nm) and PGL-30-B (405 nm), and a broader size distribution for CL-B liposomes (PI enhanced to 0.73). However, these properties remained unchanged for DL-B liposomes (*t*-test,  $p > 0.05$ ), suggesting that the lipid concentration increase did not influence the size. The smaller size of the DLs compared to the CLs has been confirmed in a recent



Table 1. The composition and physicochemical properties of different classes of liposomes containing DCS.

Formulation code	Composition			Mean diameter (nm)		Polydispersity index, PI		Zeta potential (mV)
	S 75 (mg)	SDCh (mg)	PG (g)	Non-extruded	Extruded (3 × 400 nm)	Non-extruded	Extruded (3 × 400 nm)	
CL-A	200	–	–	278 ± 3	157 ± 4	0.602 ± 0.084	0.186 ± 0.021	–60.7 ± 0.9
CL-B	400	–	–	312 ± 9	161 ± 3	0.733 ± 0.147	0.208 ± 0.057	–58.8 ± 0.4
DL-A	170	30	–	239 ± 9	147 ± 4	0.442 ± 0.024	0.285 ± 0.025	–58.6 ± 0.8
DL-B	340	60	–	240 ± 5	153 ± 1	0.452 ± 0.067	0.296 ± 0.031	–57.3 ± 0.3
PGL-10-A	200	–	1	269 ± 5	153 ± 1	0.583 ± 0.176	0.189 ± 0.022	–67.8 ± 0.6
PGL-10-B	400	–	1	293 ± 2	156 ± 4	0.688 ± 0.135	0.210 ± 0.049	–69.3 ± 1.4
PGL-30-A	200	–	3	390 ± 11	161 ± 4	0.689 ± 0.122	0.198 ± 0.018	–70.0 ± 0.8
PGL-30-B	400	–	3	405 ± 17	166 ± 1	0.454 ± 0.156	0.220 ± 0.041	–67.9 ± 0.6

CL – conventional liposomes; DL – deformable liposomes; PGL – propylene glycol liposomes; A – liposomes prepared with lower lipid concentration (26 mM total lipids); B – liposomes prepared with higher lipid concentration (52 mM, total lipids).

The amounts of S 75, SDCh and PG correspond to 10 ml of liposome suspension. The values denote the mean ± S.D. ( $n = 3$ ).

study by our group (Vanić et al., 2013) and might be ascribed to the increased flexibility and reduced surface tension of the vesicles due to the presence of SDCh, as previously reported (Chen et al., 2009). The PGLs prepared with lower lipid and PG concentration (PGL-10-A) were found to be smaller than CL-A, while PGLs-30 were the largest. This finding might be explained by an osmotic effect of the PG within the liposome leading to vesicle swelling upon the influx of water during the sample dilutions for the PSC measurements.

To obtain liposomes with diameters less than 180 nm, which are known to increase dermal drug delivery (Verma et al., 2003), all of the liposome formulations were extruded through polycarbonate membranes. The mean diameters of all of the extruded liposomes were in the range of 147 (DL-A) to 165 nm (PGL-30-B), with lower PIs for CLs and PGLs. However, the DLs had a larger PI (0.29), likely as a result of the presence of the edge activator (SDCh), which contributes the morphological varieties to the vesicle population (elongated forms) (Cevc et al., 2002) that are reflected in the size measurements resulting in an increasing PI.

The zeta potential data followed the characteristics of the material used for the preparation of liposomes, primarily soy lecithin S 75 (Table 1). Strongly negative values of approximately –60 mV for CLs and DLs and –70 mV for PGLs indicate the formation of physically stable liposomal suspensions. Negative surface charges on the liposomes are also favorable for skin applications because recent studies have shown that negatively charged liposomes enhance the skin penetration of a drug to a greater extent than positively charged and neutral liposomes (Gillet et al., 2011a).

### Entrapment efficiency

The desirable therapeutic effect by using liposomes can be achieved if the liposomes are loaded with a sufficient amount of the drug that should reach the target site. Hence, the appropriate entrapment efficiency, in addition to the appropriate size and membrane properties, is of great importance. To determine the drug content entrapped in the liposomes, untrapped DCS had to be successfully separated from the liposomes. Different separation methods were applied (gel chromatography, dialysis, minicolumn centrifugation and ultracentrifugation) to ensure that all untrapped drug was removed, and the methods were compared to optimize the

separation. Moreover, we investigated the possible influence of the lipid concentration used in the liposome preparation on the entrapment efficiency. The entrapment results were expressed in two ways: as the entrapment efficiency (%) and as the drug per lipid ratio. Although both modes appeared to yield the same entrapment profiles for all of the samples (Figures 1 and 2), differences were observed for the liposomes prepared with higher lipid concentrations. Increasing the lipid concentration enhanced the apparent entrapment efficiency for all of the liposomes (Figure 1), although the drug/lipid ratio decreased (Figure 2). Therefore, the lower lipid concentration was optimal for preparing liposomes.

Liposome extrusion has been shown to reduce the original liposome size and PI (Table 1) while simultaneously significantly reducing the encapsulation efficiency (Figures 1 and 2). Regardless of the separation method, the extruded CLs were able to encapsulate more than 100 µg of DCS per mg of lipid at lower lipid concentrations. Among the tested separation methods, gel chromatography (the most accurate and stress-free method) yielded significantly higher values of entrapped DCS in CLs (ANOVA,  $p < 0.05$ ) as compared to other methods (Figure 2). Similar patterns of higher entrapment using gel chromatography were observed for PGLs containing 10% PG (PGL-10-A).

The evaluation of the different liposome classes revealed the high entrapment of DCS in the PGLs, especially in PGL-30-A (>160 µg/mg). This increased entrapment could be attributed to the presence of PG, a well-known co-solvent that is often used in pharmaceutical formulations to improve the water solubility of drug. The increased drug incorporation in the PGLs, compared to the CLs, has been observed by several research groups (Elmoslemany et al., 2012; Manconi et al., 2009). In contrast, the lowest DCS entrapment was obtained in DLs, and similar results were confirmed by all separation methods (Figure 2). The addition of SDCh has been demonstrated to significantly decrease the liposome size and, accordingly, the entrapment of hydrophilic drugs, as recently reported (Gillet et al., 2011b; Vanić et al., 2013).

### Liposome elasticity

The essential feature of DLs is the high, stress-dependent adaptability (elasticity, deformability) of their bilayers, which



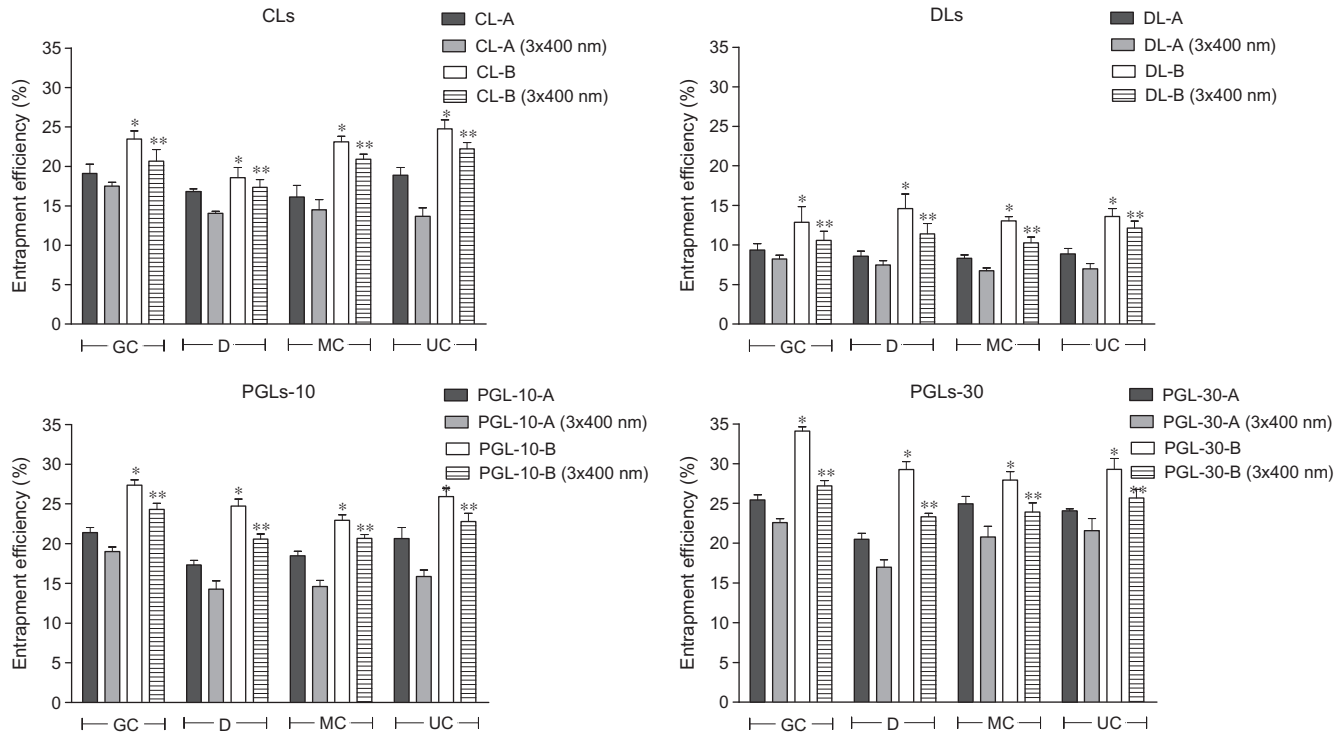


Figure 1. The entrapment of DCS (%) in various liposomes in relation to different separation methods (GC – gel chromatography; D – dialysis; MC – minicolumn centrifugation; UC – ultracentrifugation). All of the liposomes were prepared in two different concentrations of lipids: 26 mM (CL-A, DL-A, PGL-10-A and PGL-30-A) and 52 mM (CL-B, DL-B, PGL-10-B and PGL-30-B). Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ). \*Differs from the liposomes of the lower lipid concentration ( $t$ -test,  $p < 0.05$ ). \*\*Differs from the extruded liposomes of the lower lipid concentration ( $t$ -test,  $p < 0.05$ ).

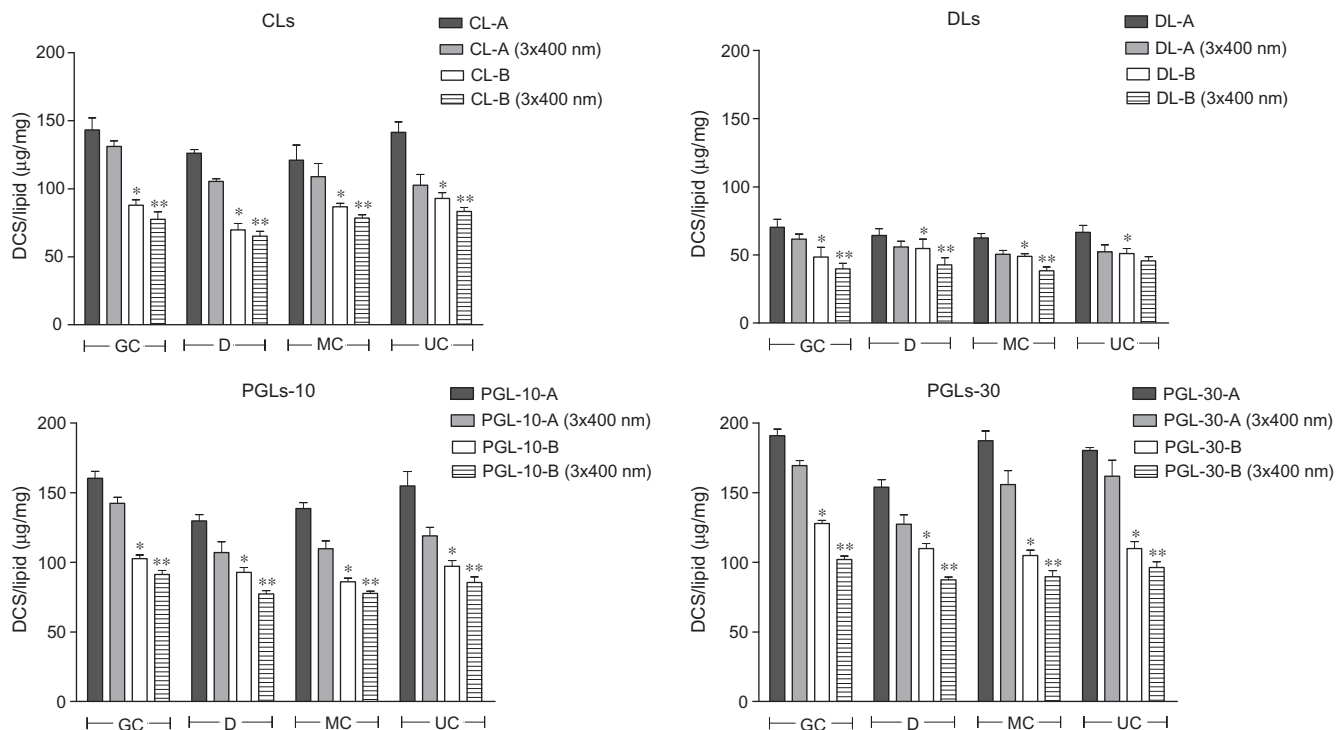


Figure 2. The entrapment of DCS (drug/lipid ratio) in various liposomes in relation to different separation methods (GC – gel chromatography; D – dialysis; MC – minicolumn centrifugation; UC – ultracentrifugation). All of the liposomes were prepared in two different concentrations of lipids: 26 mM (CL-A, DL-A, PGL-10-A and PGL-30-A) and 52 mM (CL-B, DL-B, PGL-10-B and PGL-30-B). Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ). \*Differs from the liposomes of the lower lipid concentration ( $t$ -test,  $p < 0.05$ ). \*\*Differs from the extruded liposomes of the lower lipid concentration ( $t$ -test,  $p < 0.05$ ).

allows DLs to squeeze between narrow pores that are smaller than the size of the DLs and to transport encapsulated drugs deeper through the skin following an *in vivo* transcutaneous hydration gradient under non-occlusive conditions (Cevc et al., 1998, 2002). Recently introduced PGLs have been shown to improve skin drug delivery (Manconi et al., 2009), although the exact mechanism is still under investigation. Because PG is able to solubilize phospholipids during liposome preparation (Kikuchi et al., 1994; Pavelić et al., 2005), it has been suggested that PG intercalates into the bilayers (Zhao et al., 2013), thus contributing to the flexibility of vesicles. Therefore, the membrane elasticity is an important parameter in the characterization of liposomes that are intended for (trans)dermal delivery. To determine the degree of deformability ( $E$ ) of the liposomes containing DCS, all of the vesicles were passed through polycarbonate membranes (100 nm) using a constant external pressure of 5 bar. The size of vesicles after the passage through the membrane at a constant pressure is important for the calculation of  $E$ ; however,  $E$  appears to be mostly dependent on  $J$  (the amount of the extruded liposome suspension) in this study, as shown by Figure 3. DL-A was calculated to have an  $E$  of 5.59, which is more than five-fold higher than the  $E$  value for CL-A (1.08). An approximately equal  $E$  value (5.21) was attained for PG liposomes with lipid composition that were identical to the conventional liposomes, which additionally contained 10% w/v of propylene glycol (PGL-10-A). This result suggests that PG is responsible for the improved membrane elasticity of the PGLs. Although one would expect a further increase in  $E$  with enhanced PG content, the opposite effect

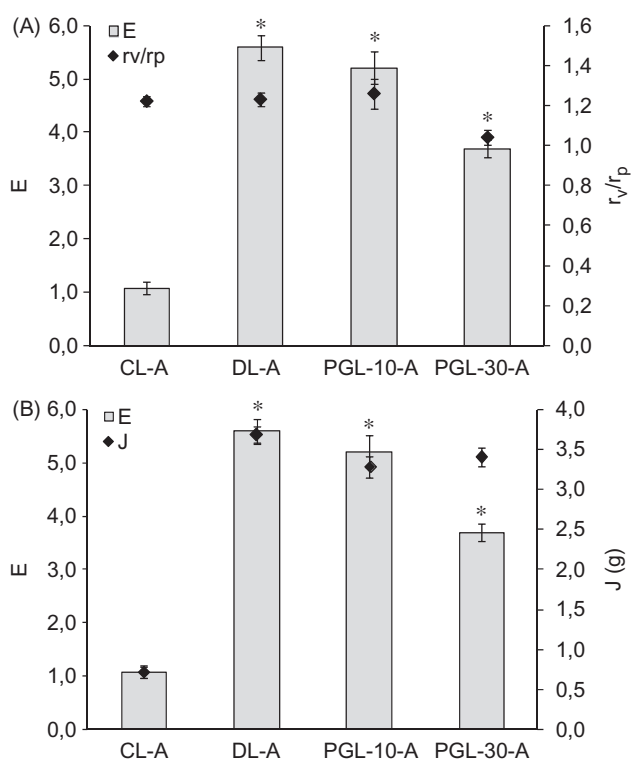


Figure 3. The degree of liposome elasticity ( $E$ ) as a function of  $r_v/r_p$  (A) and  $J$  (B).  $E$  was determined for extruded liposomes ( $3 \times 400$  nm) at a constant pressure of 5 bar. The values denote the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ). \*Statistically significant difference of the  $E$  compared to the  $E$  of CL-A (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

was observed: the degree of elasticity decreased to 3.69. Therefore, in spite of the ability of PGL-30-A to entrap a larger amount of DCS than PGL-10-A, we have excluded PGL-30-A from further studies because of its tendency to reduce liposome elasticity (Figure 3).

### Storage stability evaluation

The physical stability of the liposomes was determined by monitoring the changes in the size (mean diameter, PI) and the zeta potential during storage at  $4^\circ\text{C}$  for ten months. The results presented in Figure 4 demonstrate the increased size of all of the liposomes compared to the initial sizes. The mean diameter increased approximately 20% for PGL-10-A, and the highest increase was obtained for CL-A. The PI increased for DL-A and CL-A; however, the PI remained unchanged for PGL-10-A. The zeta potential values remained the same as those of the initial formulations, suggesting good physical stability for all of the examined liposome suspensions.

### *In vitro* release studies

The predictable and controllable release of the drug from the liposomes is an important property considering the application of liposomes as a drug delivery system. To evaluate various liposomes, we performed *in vitro* release studies. As shown in Figure 5, all of the liposomal formulations were characterized by the sustained release profiles compared to

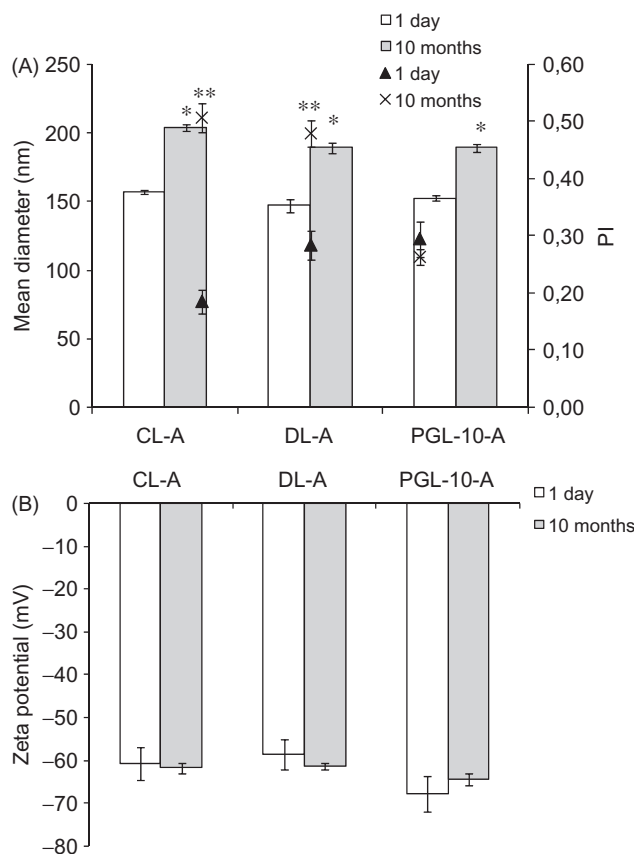


Figure 4. The storage stability of the extruded liposome formulations after ten months of storage at  $4^\circ\text{C}$ : mean diameters and PI (A); zeta potentials (B). The indicated values are the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ). \*Mean diameters were significantly different ( $t$ -test,  $p < 0.05$ ) after ten months. \*\*PI was significantly different ( $t$ -test,  $p < 0.05$ ) after ten months.

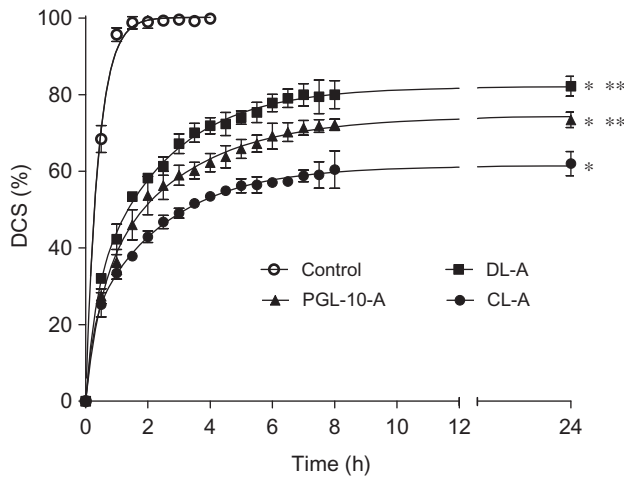


Figure 5. The cumulative release of DCS from liposome formulations performed on a Franz cell diffusion system under sink conditions using cellulose membranes and a heating circulator set to 32 °C. The values denote the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ). \*Statistically significant difference (ANOVA,  $p < 0.05$ ) compared to the control. \*\*Statistically significant difference (ANOVA,  $p < 0.05$ ) compared to CL-A.

the control (a solution of the free drug), although all of the liposomes exhibited rapid release rates during the first 2 h. This initial burst effect may be important for attaining higher levels of the drug at the target site. The release of DCS was markedly influenced by the composition of vesicles (Figure 5). The slowest drug release was obtained from CL-A, and the presence of PG enhanced drug release, most likely as a consequence of the intercalation of PG into the bilayers, causing the vesicles to be more permeable to the entrapped drug. These observations are also in an agreement with the determined degrees of membrane elasticity for the tested formulations (Figure 3). Among the investigated liposomes, the DCS release rate was the highest for DL-A. These results are expected because of the presence of the edge activator in the bilayer, which destabilizes the membranes of the DLs and makes the membranes more permeable for the entrapped drug, as previously observed (Cevc & Blume, 1992; Kawano et al., 2009). Our results also corroborate the latest reports for the faster initial drug kinetic profile of DLs compared with that of CLs (Cadena et al., 2013).

### Permeability studies

Evaluating the drug permeation through the skin is essential in the development of (trans)dermal delivery systems. Recently developed skin-PVPA, a model for monitoring the transdermal permeation of drug candidates at an early development stage (Engesland et al., 2013), was originally introduced as an artificial membrane model for the intestinal epithelia (Flaten et al., 2006a,b, 2007). The appropriate selection of the lipid composition for the PVPA could create an artificial *stratum corneum* barrier model with high reproducibility, which could eliminate the variability in human and animal *in vitro* skin studies. Moreover, this model reduces the use of animals during the early development phases of topical formulations (Engesland et al., 2013).

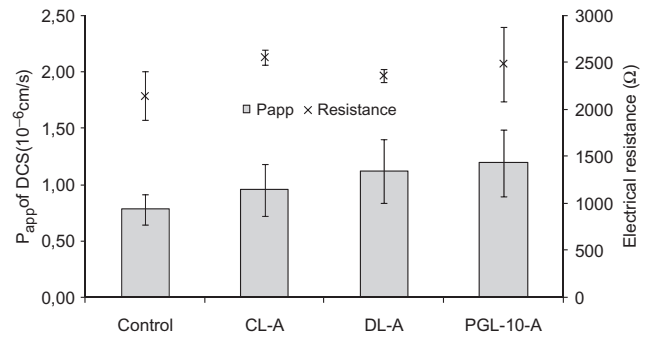


Figure 6. The permeability of DCS from the liposomal formulations on PVPA<sub>c</sub> barrier. The values denote the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ).

To enable the (trans)dermal delivery of the model hydrophilic drug DCS, different liposomal formulations were evaluated for drug permeability on a novel skin-PVPA model. This artificial barrier used to mimic the human *stratum corneum* was prepared via the tight depositing of different-sized phospholipid vesicles, composed of skin-like lipid components, on filter supports in Transwell inserts. Because the initial trials with the DCS liposomal formulations on the original skin-PVPA model (Engesland et al., 2013) exhibited difficulties in differentiating between the permeation of the model drug from different liposome formulations (data not shown), small modifications in the preparation of the skin-PVPA barrier were required. Changing the manufacturing conditions significantly influenced the properties of the barrier. Thus, to prepare a model that enabled the differentiation of DCS permeation from various liposomal formulations, the thickness of the skin-PVPA barrier was reduced by adding fewer aliquots of large vesicles on the top of the barrier (for details, see experimental section).

The assessment of the penetration ability of various liposomes containing DCS was performed using two PVPA barriers: a simple PVPA<sub>c</sub> with a top layer consisting of E-80 and cholesterol and more skin-like PVPA<sub>s</sub> prepared with phospholipid vesicles composed of lipids normally found in *stratum corneum* as the top layer. Steady-state permeation values of DCS were attained from all of the tested samples. A mean value for  $P_{app}$  of DCS was calculated for each liposomal formulation and for the control. Moreover, to validate the permeability experiments, the barrier integrity was tested by measuring the electrical resistance across the barriers throughout the study.

Figure 6 shows the slight improvement in the DCS permeation profiles using DL-A and PGL-10-A on PVPA<sub>c</sub>. However, when experiments were performed on the PVPA<sub>s</sub> with a lipid composition closer to the lipid composition in *stratum corneum* and a more loosely packed top layer of large phospholipid vesicles, the overall permeation was higher (Figure 7). All of the liposomal formulations exhibited significantly higher permeabilities than the DCS aqueous solution (ANOVA,  $p < 0.05$ ) due to the penetration-enhancing effect of the phospholipids (Elsayed et al., 2007b), especially soy lecithin, which contains a higher portion of unsaturated fatty acids. The highest  $P_{app}$  of DCS was attained with PGL-10-A, followed by DL-A, and the lowest values were

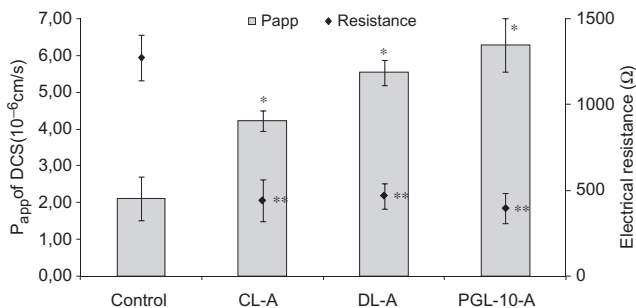


Figure 7. The permeability of DCS from the liposomal formulations using a PVPA<sub>s</sub> barrier. The values denote the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 6$ ). \* $P_{app}$  is significantly different (ANOVA,  $p < 0.05$ ) from the control. \*\*Electrical resistance is significantly different (ANOVA,  $p < 0.05$ ) from the control.

obtained with CL-A. The obtained values for the electrical resistance across the barriers were in an agreement with the calculated drug permeability. An inversely proportional relationship was observed, demonstrating a decrease of electrical resistance as a result of the increased leakiness in the barrier caused by the liposomes, which consequently increased the drug permeation (Figure 7). The differences in the amount of permeated drug among the liposome formulations examined were in accordance with the findings of previous study (Elsayed et al., 2007a,b). The presence of the edge activator (SDCh) in the bilayers of the DLs enhanced the flexibility of the vesicles and permitted the vesicles to squeeze between the cells in *stratum corneum* and transport the entrapped drug deeper into/through the skin (Cevc & Blume, 1992; Cevc et al., 1998). Although the PGLs were of the same lipid composition as the CLs, the PGLs contained PG, a known skin penetration enhancer (Lane, 2013) that, in addition to phospholipids, notably enhanced the permeation of the drug. These results are consistent with the high elasticity of PGL-10-A and DL-A (Figure 3) and with the results of the release studies (Figure 5), in which similar release profiles were observed for both types of vesicles.

Our findings demonstrate the increased permeation of hydrophilic drug when delivered through elastic vesicles. However, from the performed studies on the PVPA barriers we cannot confirm that the transport mechanism of elastic liposomes is indeed by squeezing between the “pores” in the skin as reported in the studies by Cevc et al. (1998, 2002), since we have not determined lipid/vesicles content in the receiver compartment.

A greater skin permeation of DCS using deformable liposomes (transferosomes) has been shown in recent investigations (El Zaafarany et al., 2010; Ghanbarzadeh & Arami, 2013), although studies have used different *ex vivo* skin models and the experiments differed in the composition and physicochemical properties of the investigated liposomes. The enhancement ratios found in previous studies, calculated as the ratio of the permeability coefficients obtained for the deformable liposomes and the control formulation, were between 2.4 (El Zaafarany et al., 2010) and 5.2 (Ghanbarzadeh & Arami, 2013), and in our study on the PVPA<sub>s</sub>, the enhancement ratio was 2.65. Therefore, we believe that the skin-PVPA model is a valuable *in vitro* screening method for the optimization of liposome

formulations for (trans)dermal drug delivery. However, we are aware of the necessity of conducting *ex vivo* skin permeation studies, preferably on human skin, to confirm the value of the novel *in vitro* barrier model.

The phospholipid vesicle-based barriers have already been proven to be useful for evaluating the drug permeation of oral and skin drug candidates (Engesland et al., 2013; Flaten et al., 2006a,b, 2007). In addition, intestinal PVPA has been shown to be suitable for permeability screening and formulation optimization of complex formulations like solid dispersions (Kanzer et al., 2010). However, the present study is the first to demonstrate the potential of skin-PVPA for screening the skin-penetration abilities of various liposomes as drug nanocarriers without using animals at an early development stage. The degree of the leakiness of the barrier can be finely adjusted depending on the composition of barrier vesicles and the preparation conditions to differentiate the tested formulations. The high reproducibility and stability of the barriers at determined storage conditions provide the opportunity for possible up-scaling of the model.

## Conclusion

A novel skin barrier model based on PVPA as a mimicking *stratum corneum* barrier was modified and applied in the screening of the penetration abilities of different liposome formulations containing a model hydrophilic drug. The permeation of the hydrophilic drug from the liposomes was affected by their physicochemical properties, which were influenced by the lipid composition and the presence of the edge activator or penetration enhancer. The value of the developed artificial skin barriers would be supported through verification for the evaluation of liposomes containing lipophilic and amphiphilic drugs, including those of higher molecular weight.

## Acknowledgements

The authors are grateful to Lipoid (Ludwigshafen, Germany) for providing phospholipids.

## Declaration of interest

The authors report no declaration of interest. This work was supported by grant 006-0061117-1244 from the Ministry of Science, Education and Sports of the Republic of Croatia and The Norwegian Animal Protection Fund.

## References

- Barry BW. (2001). Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci* 14:101–14.
- Bartlett GR. (1959). Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 234:466–8.
- Cadena PG, Pereira MA, Cordeiro RB, et al. (2013). Nanoencapsulation of quercetin and resveratrol into elastic liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1828:309–16.
- Cereda CM, Franz-Montan M, da Silva CM, et al. (2013). Transdermal delivery of butamben using elastic and conventional liposomes. *J Liposome Res* 23:228–34.
- Cevc G, Blume G. (1992). Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim Biophys Acta* 1104:226–32.
- Cevc G, Gebauer D, Stieber J, et al. (1998). Ultraflexible vesicles, transferosomes, have an extremely low pore penetration resistance and



- transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochim Biophys Acta* 1368:201–15.
- Cevc G, Schatzlein A, Richardsen H. (2002). Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. *Biochim Biophys Acta* 1564:21–30.
- Cevc G, Vierl U. (2010). Nanotechnology and the transdermal route: a state of the art review and critical appraisal. *J Control Release* 141: 277–99.
- Chen Y, Lu Y, Chen J, et al. (2009). Enhanced bioavailability of the poorly water-soluble drug fenofibrate by using liposomes containing a bile salt. *Int J Pharm* 376:153–60.
- Chilcott RP, Barai N, Beezer AE, et al. (2005). Inter- and intralaboratory variation of in vitro diffusion cell measurements: an international multicenter study using quasi-standardized methods and materials. *J Pharm Sci* 94:632–8.
- Delgado-Charro MB, Guy RH. (2001). Transdermal drug delivery. In: Hillery AM, Lloyd AW, Swarbrick J, eds. *Drug delivery and targeting for pharmacists and pharmaceutical scientists*. London-New York: Taylor & Francis, 208–36.
- Dragicevic-Curic N, Scheglmann D, Albrecht V, Fahr A. (2008). Temoporfin-loaded invasomes: development, characterization and in vitro skin penetration studies. *J Control Release* 127:59–69.
- El Maghraby GM, Williams AC, Barry BW. (2006). Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin? *J Pharm Pharmacol* 58:415–29.
- El Zaafarany GM, Awad GA, Holayel SM, Mortada ND. (2010). Role of edge activators and surface charge in developing ultradeformable vesicles with enhanced skin delivery. *Int J Pharm* 397:164–72.
- Elmoslemany RM, Abdallah OY, El-Khordagui LK, Khalafallah NM. (2012). Propylene glycol liposomes as a topical delivery system for miconazole nitrate: comparison with conventional liposomes. *AAPS PharmSciTech* 13:723–31.
- Elsayed MMA, Abdallah OY, Naggar VF, Khalafallah NM. (2007a). PG-liposomes: novel lipid vesicles for skin delivery of drugs. *J Pharm Pharmacol* 59:1447–50.
- Elsayed MMA, Abdallah OY, Naggar VF, Khalafallah NM. (2007b). Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. *Int J Pharm* 332:1–16.
- Engesland A, Skar M, Hansen T, et al. (2013). New applications of phospholipid vesicle-based permeation assay: permeation model mimicking skin barrier. *J Pharm Sci* 102:1588–600.
- Ferderber K, Hook S, Rades T. (2009). Phosphatidyl choline-based colloidal systems for dermal and transdermal drug delivery. *J Liposome Res* 19:267–77.
- Flaten GE, Bunjes H, Luthman K, Brandl M. (2006a). Drug permeability across a phospholipid vesicle-based barrier 2. Characterization of barrier structure, storage stability and stability towards pH changes. *Eur J Pharm Sci* 28:336–43.
- Flaten GE, Dhanikula AB, Luthman K, Brandl M. (2006b). Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: a novel approach for studying passive diffusion. *Eur J Pharm Sci* 27:80–90.
- Flaten GE, Skar M, Luthman K, Brandl M. (2007). Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: characterization of drug-membrane interactions and the effect of agitation on the barrier integrity and on the permeability. *Eur J Pharm Sci* 30:324–32.
- Ghanbarzadeh S, Arami S. (2013). Enhanced transdermal delivery of diclofenac sodium via conventional liposomes, ethosomes, and transfersomes. *BioMed Res Int* 2013:1–7.
- Gillet A, Compere P, Lecomte F, et al. (2011a). Liposome surface charge influence on skin penetration behavior. *Int J Pharm* 411:223–31.
- Gillet A, Lecomte F, Hubert P, et al. (2011b). Skin penetration behaviour of liposomes as a function of their composition. *Eur J Pharm Biopharm* 79:43–53.
- Herkenne C, Naik A, Kalia YN, et al. (2007). Ibuprofen transport into and through skin from topical formulations: in vitro–in vivo comparison. *J Invest Dermatol* 127:135–42.
- Honeywell-Nguyen PL, Bouwstra JA. (2005). Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. *Drug Discov Today Technol* 2: 67–74.
- Hurler J, Berg OA, Skar M, et al. (2012). Improved burns therapy: liposomes-in-hydrogel delivery system for mupirocin. *J Pharm Sci* 101:3906–15.
- Jain S, Jain P, Umamaheshwari RB, Jain NK. (2003). Transfersomes – a novel vesicular carrier for enhanced transdermal delivery: development, characterization, and performance evaluation. *Drug Dev Ind Pharm* 29:1013–26.
- Kanzer J, Tho I, Flaten GE, et al. (2010). In-vitro permeability screening of melt-estrudate formulations containing poorly water-soluble drug compounds using the phospholipid vesicle-based barrier. *J Pharm Pharmacol* 62:1591–8.
- Kawano K, Onose E, Hattori Y, Maitani Y. (2009). Higher liposomal membrane fluidity enhances the in vitro antitumor activity of folate-targeted liposomal mitoxantrone. *Mol Pharm* 6:98–104.
- Kikuchi H, Yamauchi H, Hirota S. (1994). A polyol dilution method for mass production of liposomes. *J Liposome Res* 4:71–91.
- Lane ME. (2013). Skin penetration enhancers. *Int J Pharm* 447:12–21.
- Manconi M, Mura S, Sinico C, et al. (2009). Development and characterization of liposomes containing glycols as carriers for diclofenac. *Colloid Surface A* 342:53–8.
- Oliveira G, Beezer AE, Hadgraft J, Lane ME. (2010). Alcohol enhanced permeation in model membranes. Part I. Thermodynamic and kinetic analyses of membrane permeation. *Int J Pharm* 393:61–7.
- Pavelić Ž, Škalko-Basnet N, Filipović-Grčić J, et al. (2005). Development and in vitro evaluation of a liposomal vaginal delivery system for acyclovir. *J Control Release* 106:34–43.
- Prow TW, Grice JE, Lin LL, et al. (2011). Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 63: 470–91.
- Salerno C, Carlucci AM, Bregni C. (2010). Study of in vitro drug release and percutaneous absorption of fluconazole from topical dosage forms. *AAPS Pharm Sci Tech* 11:986–93.
- Sinko B, Garrigues TM, Balogh GT, et al. (2012). Skin-PAMPA: a new method for fast prediction of skin penetration. *Eur J Pharm Sci* 45: 698–707.
- Subongkot T, Duangjit S, Rojanarata T, et al. (2012). Ultradeformable liposomes with terpenes for delivery of hydrophilic compound. *J Liposome Res* 22:254–62.
- Šentjurc M, Vrhovnik K, Kristl J. (1999). Liposomes as a topical delivery system: the role of size on transport studied by the EPR imaging method. *J Control Release* 59:87–97.
- Touitou E, Dayan N, Bergelson L, et al. (2000). Ethosomes – novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *J Control Release* 65:403–18.
- Vanić Ž, Barnert S, Süß R, Schubert R. (2012). Fusogenic activity of PEGylated pH-sensitive liposomes. *J Liposome Res* 22:148–57.
- Vanić Ž, Hafner A, Begó M, Škalko-Basnet N. (2013). The characterization of various deformable liposomes with metronidazole. *Drug Dev Ind Pharm* 39:481–8.
- Vanić Ž, Hurler J, Ferderber K, et al. (2014). Novel vaginal drug delivery system: deformable propylene glycol liposomes-in-hydrogel. *J Liposome Res* 24:27–36.
- Verma DD, Verma S, Blume G, Fahr A. (2003). Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *Int J Pharm* 258:141–51.
- Zhao YZ, Dai DD, Lu CT, et al. (2013). Epirubicin loaded with propylene glycol liposomes significantly overcomes multidrug resistance in breast cancer. *Cancer Lett* 330:74–83.

RESEARCH ARTICLE

## Elastic liposomes-in-vehicle formulations destined for skin therapy: the synergy between type of liposomes and vehicle

Zora Palac<sup>1</sup>, Julia Hurler<sup>2</sup>, Nataša Škalko-Basnet<sup>2</sup>, Jelena Filipović-Grčić<sup>1</sup>, and Željka Vanić<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia and <sup>2</sup>Drug Transport and Delivery Research Group, Department of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, University of Tromsø, Tromsø, Norway

### Abstract

**Objective:** The present study is focused on optimization of elastic liposomes-in-vehicle formulations in respect to drug release and formulation properties. By combining penetration potential of elastic liposomes containing high ratio of entrapped drug and physicochemical properties of vehicles, both affecting the release and texture properties, optimal formulation could be achieved.

**Materials and methods:** Deformable, propylene glycol-containing or conventional liposomes with hydrophilic model drug (diclofenac sodium) were incorporated into the following vehicles appropriate for skin application: a hydrogel, a cream base and derma membrane structure base cream (DMS base). Each formulation was assessed for *in vitro* drug release and mechanical properties.

**Results and discussion:** The composition and type of both liposomes and the vehicle affected the rate and amount of the released drug. The cream base exhibited the slowest release, followed by the hydrogel and DMS base. Similar release profiles were achieved with both types of elastic vesicles (deformable and propylene glycol liposomes); the slowest release was observed for conventional liposomes, regardless of the vehicle used. The drug release profiles from different liposomes-in-vehicle formulations were in agreement with the physicochemical properties of the formulations. All of the liposomes were found to be compatible with the hydrogel preserving its original textures, whereas a significant decrease in all texture parameters was observed for liposomes-in-DMS base, regardless of liposome type.

**Conclusion:** Propylene glycol liposomes-in-hydrogel is considered as the optimal formulation for improving skin delivery of hydrophilic drug. Further investigations involving *in vivo* animal studies are necessary to confirm its applicability in skin therapy.

### Keywords

Cream, deformable liposomes, hydrogel, hydrophilic drug, propylene glycol liposomes, skin, sustained release, texture analysis

### History

Received 26 March 2014  
Revised 17 June 2014  
Accepted 20 June 2014  
Published online 14 July 2014

### Introduction

Effective (trans) dermal drug delivery depends on both the selection of an appropriate drug and the properties of the delivery system (vehicle). Vehicles exert pronounced effects on the epidermis, affecting hydration, lubrication, drying, skin smoothness, occlusion and protection. In addition, the physicochemical properties of vehicles influence the pharmacokinetic properties of the incorporated drug by controlling its release from the vehicle and affecting penetration through the *stratum corneum*, permeation through the layers of skin and absorption into the blood. Therefore, interactions between the vehicle, skin and drug can influence the final therapeutic effect of the applied formulation<sup>1,2</sup>. For this reason, the selection of an appropriate vehicle is an important factor in increasing the efficacy of a topically applied drug<sup>3,4</sup>.

Despite the numerous types of available vehicles, dermal and particularly transdermal delivery of hydrophilic drugs is limited by the barrier nature of the outermost layers of the epidermis. Various strategies have been explored to enhance transdermal drug delivery, including adjustment of *stratum corneum* permeability by chemical penetration enhancers and electrical/external force methods, such as iontophoresis, sonophoresis and electroporation<sup>5</sup>. During the last two decades, considerable attention has been focused on developing nanodelivery systems that facilitate changes of the pharmacokinetic properties of a given drug and increase its bioavailability<sup>6</sup>. Because they are physiologically acceptable, phospholipid vesicles (liposomes) have shown great potential for improving the topical delivery of hydrophilic drugs. While conventional liposomes generally enhance skin deposition of the drug without affecting percutaneous permeation and transdermal delivery<sup>7</sup>, new classes of phospholipid vesicles, such as deformable (flexible, elastic) liposomes<sup>8–10</sup>, ethosomes<sup>11</sup>, invasomes<sup>12</sup> and propylene glycol-containing liposomes<sup>13</sup>, have been shown to increase the transport of active substances through the *stratum corneum* into the deeper layers of skin and even transdermally. Despite these advantages, topical application of liposomes can be restricted by their liquid nature. Thus, they must

be incorporated into a suitable vehicle<sup>14</sup>. In addition to increasing the viscosity and preserving physical stability of conventional liposomes incorporated into hydrogels<sup>15–18</sup>, dermatological vehicles could affect drug bioavailability and play an important role in the care and maintenance of skin health<sup>2</sup>.

In the previous study<sup>19</sup>, we optimized the preparation conditions and evaluated the skin penetration potential of the two types of elastic liposomes containing a hydrophilic model drug (diclofenac sodium) using the *stratum corneum*-like phospholipids vesicle-based permeation assay. Continuing this line of research, here we report on the optimization of semi-solid vehicles for liposomes. To the best of our knowledge, this is the first study which examines the influence of different types of vehicles on drug release and texture profiles of elastic liposomes in vehicle formulations. Deformable and propylene glycol as elastic liposomes and conventional liposomes (as control) were mixed into the following three vehicles: a hydrogel, a cream base (oil in water emulsion, O/W) and a novel cream-like vehicle that had a composition resembling natural human skin components. Each of these formulations (liposomes-in-vehicle) was tested for the drug release and characterized according to texture properties to optimize a formulation for topical administration of hydrophilic drug.

## Materials and methods

### Materials

Soy lecithin (S 75) and derma membrane structure base cream classic (DMS base) were generous gifts from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany) and KOKO GmbH (Leichlingen, Germany), respectively. Carbopol 980 NF and diclofenac sodium were kindly provided by BF Goodrich (Brussels, Belgium) and PLIVA Croatia Ltd. (Zagreb, Croatia), respectively. Sodium deoxycholate, Tween 60, glycerol monostearate, Myglyol 812 N and agarose were purchased from Sigma-Aldrich Company (St. Louis, MO). Propylene glycol, triethanolamine, cetylalcohol and vaselinum album were purchased from Kemig (Zagreb, Croatia). Ethanol and methanol were of analytical grade and obtained from Kemika (Zagreb, Croatia).

### Preparation and characterization of liposomes

Deformable, propylene glycol and conventional liposomes were prepared by the film hydration method, followed by extrusion, as previously described<sup>19</sup>. Briefly, lipid components were dissolved in concentrated ethanol in a round bottomed flask. The ethanol was removed using a rotary vacuum evaporator (Büchi Rotavapor R-200, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) and the thin lipid film was hydrated with the aqueous drug solution. The concentrations of the lipid (26 mM) and diclofenac sodium (47 mM) were kept constant for all liposome preparations. Conventional liposomes were composed of S 75. The deformable liposomes consisted of S 75 and sodium deoxycholate (85/15, mass ratio), and the propylene glycol liposomes contained the same bilayer composition as conventional liposomes with an additional 10% (w/w) propylene glycol in an aqueous phase. All of the liposomes were extruded three times through the 400-nm pore size polycarbonate membranes (LiposoFast, Avestin, Canada).

The mean diameters, size distributions (polydispersity) and zeta potentials of the liposomes were determined by photon correlation spectroscopy (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments, Malvern, UK)<sup>20,21</sup>. Membrane elasticity of extruded liposomes was evaluated by home-made device at an external pressure of 5 bar using 100-nm membranes. Detailed procedure with equation for calculation of the deformability degree (E) has

been previously described in details<sup>14,19</sup>. Separation of the un-entrapped drug was performed using gel chromatography on Sepharose CL-4B<sup>22</sup>. Thereafter, the liposomal fraction was concentrated using ultracentrifugation as previously described<sup>19</sup>. The concentrations of both the un-entrapped (free) and liposome-entrapped drug were determined spectrophotometrically (Ultrospect Plus, Pharmacia LKB, Cambridge, UK). The concentrations of free diclofenac sodium were measured at 276 nm (demineralized water), and the entrapped drug was detected at 282 nm after the liposomes were dissolved in methanol.

### Preparation of semi-solid vehicles

#### Hydrogel

Carbopol 980 NF (0.5 g) was dispersed in demineralized water (88.5 g) using a magnetic stirrer (700 rpm) for 60 minutes. Propylene glycol (10 g) was then added, and the mixture neutralized by the addition of 50% (w/w) triethanolamine in an amount sufficient to achieve a gel of pH 6<sup>23</sup>.

#### Cream base

The cream base was an oil-in-water (O/W) emulsion prepared using the modified procedure of Betz and coworkers<sup>24</sup>. Briefly, the lipophilic phase components [glycerol monostearate (4 g), cetylalcohol (6 g), Miglyol 812 (7.5 g), vaselinum album (25.5 g)] and hydrophilic phase components [Tween 60 (6.5 g), propylene glycol (10 g), distilled water (40.5 g)] were separately heated to 60 °C using a water bath. The oil phase was then gradually poured into the water phase with constant stirring by hand to form an emulsion that was stirred until the cream reached room temperature. The formed O/W emulsion was subjected to homogenization by a Three Roller Mill (Erweka SM/SMS, Erweka GmbH, Heusenstamm, Germany).

### Incorporation of liposomes into vehicles

Each of the liposome suspensions (deformable, propylene glycol or conventional liposomes) containing only liposomally-entrapped diclofenac sodium and free of un-entrapped drug, was gently mixed into the vehicles: hydrogel, cream base or DMS base.

The final concentration of liposomes in the vehicle was 10% (w/w, liposome suspension/vehicle). Control samples (solution of the free drug incorporated in vehicle, 10% w/w, drug solution/vehicle) contained the same concentration of the drug as in the liposomes.

### In vitro drug release studies

The release of the drug from the liposomes incorporated into different vehicles was determined by the method originally introduced by Pesccha et al.<sup>25</sup> and adapted for liposomal hydrogels<sup>14,16,23</sup>. Briefly, samples of the liposomes-in-vehicle formulations (3 g) were placed in glass vials and separated from 5 mL of receptor solution (distilled water) by a 2% (w/w) agarose layer, which permitted diffusion of both the released drug and intact liposomes from liposomes-in-vehicles (donor compartment). The vials were incubated at 32 °C, and the receptor solution was completely replaced at specific time intervals. The amount of the drug released was determined spectrophotometrically (before and after the addition of methanol). Controls were examined under the same conditions.

### Texture analysis of the liposomes-in-vehicle formulations

A Texture Analyzer TA.XT Plus (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK) was used to examine the texture properties of the liposomes-in-vehicle formulations. Fifty grams of each



formulation was placed in a standard beaker, ensuring that no air bubbles were included and that the surface was smooth. A disk (40 mm in diameter) was pushed into the formulation (10 mm at a speed of 1 mm/s, respectively) and removed. Each formulation was measured five times, ensuring the same conditions for each measurement. The hardness of the each formulation was determined, and the texture properties, such as cohesiveness and adhesiveness, were calculated<sup>26</sup>. Control samples were examined under the same conditions.

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA, followed by Tukey's multiparametric post hoc test, and  $p < 0.05$  was considered the minimum level of significance. Calculations were performed with the GraphPad Prism program, version 5.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

## Results and discussion

### Characterization of liposomes

Composition of the liposomes used as topical drug carrier is known to influence their physicochemical properties and therefore their efficacy as drug delivery system<sup>27,28</sup>. To allow deeper penetration of the hydrophilic drug into/through the skin, we prepared two types of elastic liposomes and compared them with each other and with conventional liposomes with respect to the following physicochemical properties: size, charge, membrane elasticity and entrapment capacity for diclofenac sodium (Table 1). The conventional and propylene glycol liposomes were nearly the same size and characterized by a homogenous size distribution, with a mean diameter between 155 (conventional liposomes) and 160 nm (propylene glycol liposomes), while the deformable liposomes were slightly smaller (143 nm) than the others. The presence of the edge activator (sodium deoxycholate) in the bilayers of deformable liposomes increased membrane flexibility and reduced surface tension, which are recognizable features of elastic liposomes, as shown in recent studies<sup>14,21,29,30</sup>. Drug entrapment was quite low in the deformable liposomes (60 µg of the drug/mg of lipid recovered), as compared to the propylene glycol liposomes (>140 µg/mg of lipid). In addition, propylene glycol increased the degree of membrane elasticity, which was nearly equal to that of the deformable liposomes (Table 1). This result may be explained by the ability of propylene glycol to solubilize phospholipids and intercalate into the bilayer<sup>13,31,32</sup>, affecting the membrane flexibility of the vesicles. Regarding the surface charge, all of the liposomes had highly negative zeta potentials (>-50 mV), indicating the formation of physically stable liposome suspensions, which was confirmed in the storage stability studies<sup>19</sup>.

Table 1. Physicochemical properties of liposomes.

Parameter	DL	PGL	CL
Mean diameter (nm)	143.3 ± 5.1	159.7 ± 3.4	156.1 ± 2.6
Polydispersity index	0.28 ± 0.05	0.20 ± 0.07	0.19 ± 0.02
Zeta potential (mV)	-56.3 ± 0.7	-61.4 ± 1.1	-58.4 ± 0.8
Degree of deformability, E	5.58 ± 0.33	5.23 ± 0.31	1.08 ± 0.11
Entrapment (drug/lipid, µg/mg)	60.3 ± 2.8	142.8 ± 4.2	129.4 ± 3.5

DL – deformable liposomes; PGL – propylene glycol liposomes; CL – conventional liposomes.

The values denote the mean ± S.D. ( $n = 3$ ).

### Liposomes-in-vehicle formulations

Appropriate viscosity of liposomes used for skin application can be achieved by incorporation into dermatological vehicles<sup>15</sup>.

Vehicle composition has been shown to influence the release properties of the incorporated drug and the penetration ability across/into the skin and may also improve the skin condition<sup>3,4,33</sup>. To examine the effect of the vehicle on the release of liposomally entrapped diclofenac sodium, different types of liposomes were incorporated into the following vehicles: the hydrogel, the cream base (O/W emulsion) and DMS base.

To follow the release of diclofenac sodium from the liposomes-in-vehicle formulations, we applied a so-called agarose method that has been shown to be very useful in evaluating drug release from liposomal vaginal gels<sup>14,16,23</sup>. The porosity of the agarose matrix permitted both intact liposomes and released (free) drug to diffuse through the matrix into the receptor solution, and the amount of drug released from the vehicle was determined spectrophotometrically before and after the addition of methanol to the supernatant over the agarose matrix<sup>16</sup>. With this method, the amount of intact liposomes released from the vehicle into the receptor medium can be determined, which is not feasible using the Franz diffusion cell method. Moreover, this method provides insight into the possible mechanisms of drug release from liposomes-in-vehicle formulations, which have been proposed to be based on the following four interconnected processes: leakage of the drug inside the vehicle, diffusion of the released drug to the receptor compartment, diffusion of intact liposomes from the vehicle into the receptor solution and release of the liposomally entrapped drug inside the receptor compartment<sup>34</sup>.

The release of diclofenac sodium from the various liposomes-in-vehicle formulations is presented in Table 2 and Figure 1. The results (Table 2) confirm slower release of the drug from all of the liposomes-in-vehicle formulations compared with the control (solution of the drug in vehicle), and compared to the drug release from liposomal suspensions<sup>19</sup>. Differences in the drug release profiles were observed between all of the liposomes and vehicles examined. The slowest release of diclofenac sodium was observed for the cream base, followed by the hydrogel and DMS base (Table 2). Interestingly, release of the drug from liposomes-in-DMS base followed the same profile as corresponding control indicating possible release of the drug from all the liposomes upon their mixing into DMS base. A comparison of the drug-release profiles from different types of liposomes incorporated in hydrogel or cream base confirmed the slowest release from conventional liposomes in both cases; the drug release from propylene glycol liposomes and especially deformable vesicles was significantly faster ( $p < 0.05$ ). These results were in agreement with the previous study<sup>19</sup>, where the highest release of the drug was achieved from deformable, followed by propylene glycol-containing liposomes, while the slowest release was demonstrated by conventional liposomes.

The release of diclofenac sodium from all of the investigated formulations followed the Higuchi diffusion model<sup>35</sup>, which was confirmed by the good correlation coefficients ranging from 0.988 to 0.995 (Figure 1). This finding indicates that the rate-controlling step in the release process was the diffusion of the leaked drug through the vehicle network to the receptor medium, which was affected by both the composition of the phospholipid vesicles and the mechanical properties of the vehicles. Thus, after 24 hours of incubation of liposomes in hydrogel at 32 °C, more than 35% of the drug was released from each formulation of elastic vesicles, while the lowest ratio of released drug (28%) was observed for the conventional liposomes ( $p < 0.05$ ).

Although the fastest drug release profile from the liposomes-in-vehicle formulations was with DMS base, the highest release of the solution of the drug in vehicle (control) was achieved with the hydrogel ( $p < 0.05$ ). These results were expected to some extent given the hydrophilic properties of both the drug and the



Table 2. *In vitro* release of diclofenac sodium from various liposomes-in-vehicle formulations.

t (h)	Hydrogel				Cream base				DMS base			
	DL	PGL	CL	Control	DL	PGL	CL	Control	DL	PGL	CL	Control
1	7.1 ± 0.7 <sup>a</sup>	4.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.7 <sup>a</sup>	13.9 ± 0.7	2.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	2.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.4 ± 0.5	7.8 ± 0.9 <sup>a</sup>	7.5 ± 0.7 <sup>a</sup>	7.2 ± 0.0 <sup>a</sup>	8.1 ± 1.2
	7.5 ± 0.6 <sup>b</sup>	4.7 ± 0.8 <sup>b</sup>	2.0 ± 0.7 <sup>b</sup>		3.1 ± 0.3 <sup>b</sup>	2.6 ± 0.2 <sup>b</sup>	2.0 ± 0.2 <sup>b</sup>		7.9 ± 0.9 <sup>b</sup>	7.8 ± 0.6 <sup>b</sup>	7.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	
	0.4 ± 0.2 <sup>c</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>c</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>c</sup>		0.3 ± 0.1 <sup>c</sup>	0.1 ± 0.1 <sup>c</sup>	0.1 ± 0.1 <sup>c</sup>		0.1 ± 0.1 <sup>c</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>c</sup>	0.1 ± 0.1 <sup>c</sup>	
2	12.8 ± 1.1 <sup>a</sup>	9.0 ± 0.5 <sup>a</sup>	4.0 ± 1.3 <sup>a</sup>	22.7 ± 1.2	6.9 ± 0.5 <sup>a</sup>	5.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	11.5 ± 1.2	13.4 ± 4.2 <sup>a</sup>	13.8 ± 0.9 <sup>a</sup>	14.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	14.6 ± 2.0
	14.0 ± 1.6 <sup>b</sup>	10.0 ± 0.4 <sup>b</sup>	4.7 ± 1.2 <sup>b</sup>		7.9 ± 1.1 <sup>b</sup>	5.9 ± 0.1 <sup>b</sup>	5.4 ± 0.6 <sup>b</sup>		13.7 ± 3.2 <sup>b</sup>	14.0 ± 3.1 <sup>b</sup>	14.3 ± 0.4 <sup>b</sup>	
	1.2 ± 0.3 <sup>c</sup>	1.0 ± 0.2 <sup>c</sup>	0.7 ± 0.2 <sup>c</sup>		1.0 ± 0.6 <sup>c</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>c</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>c</sup>		0.3 ± 0.1 <sup>c</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>c</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>c</sup>	
4	16.9 ± 2.2 <sup>a</sup>	14.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	7.1 ± 2.2 <sup>a</sup>	35.0 ± 1.4	11.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	9.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	7.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	22.0 ± 3.1	24.6 ± 0.7 <sup>a</sup>	25.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	27.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	25.6 ± 2.3
	20.3 ± 1.9 <sup>b</sup>	17.2 ± 0.5 <sup>b</sup>	8.8 ± 2.0 <sup>b</sup>		12.8 ± 0.7 <sup>b</sup>	10.0 ± 0.1 <sup>b</sup>	8.0 ± 0.4 <sup>b</sup>		24.9 ± 3.4 <sup>b</sup>	25.3 ± 3.9 <sup>b</sup>	28.2 ± 0.7 <sup>b</sup>	
	3.4 ± 0.6 <sup>c</sup>	3.0 ± 0.2 <sup>c</sup>	1.7 ± 0.2 <sup>c</sup>		1.7 ± 0.5 <sup>c</sup>	1.0 ± 0.2 <sup>c</sup>	0.6 ± 0.3 <sup>c</sup>		0.3 ± 0.2 <sup>c</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>c</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>c</sup>	
6	20.7 ± 0.9 <sup>a</sup>	17.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	8.7 ± 1.9 <sup>a</sup>	44.8 ± 2.3	14.5 ± 1.4 <sup>a</sup>	12.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	10.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	31.1 ± 4.2	37.4 ± 4.1 <sup>a</sup>	38.5 ± 3.7 <sup>a</sup>	38.7 ± 2.9 <sup>a</sup>	39.2 ± 1.9
	28.0 ± 1.9 <sup>b</sup>	24.0 ± 0.7 <sup>b</sup>	11.8 ± 2.1 <sup>b</sup>		19.9 ± 0.7 <sup>b</sup>	17.3 ± 0.3 <sup>b</sup>	12.1 ± 0.5 <sup>b</sup>		27.8 ± 4.1 <sup>b</sup>	39.1 ± 3.1 <sup>b</sup>	39.2 ± 2.6 <sup>b</sup>	
	7.3 ± 0.7 <sup>c</sup>	6.5 ± 0.5 <sup>c</sup>	3.1 ± 0.2 <sup>c</sup>		5.4 ± 0.7 <sup>c</sup>	4.8 ± 0.2 <sup>c</sup>	1.8 ± 0.4 <sup>c</sup>		0.4 ± 0.1 <sup>c</sup>	0.6 ± 0.2 <sup>c</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>c</sup>	
24	37.4 ± 1.4 <sup>a</sup>	35.5 ± 1.7 <sup>a</sup>	28.5 ± 1.8 <sup>a</sup>	89.3 ± 2.2	28.5 ± 2.6 <sup>a</sup>	25.8 ± 1.7 <sup>a</sup>	20.4 ± 0.9 <sup>a</sup>	64.2 ± 2.4	75.6 ± 2.1 <sup>a</sup>	80.3 ± 3.4 <sup>a</sup>	79.3 ± 4.3 <sup>a</sup>	76.9 ± 7.1
	49.1 ± 1.0 <sup>b</sup>	45.8 ± 0.9 <sup>b</sup>	32.3 ± 1.7 <sup>b</sup>		35.8 ± 2.1 <sup>b</sup>	32.8 ± 1.4 <sup>b</sup>	24.1 ± 1.1 <sup>b</sup>		76.1 ± 2.9 <sup>b</sup>	80.9 ± 3.8 <sup>b</sup>	80.5 ± 4.1 <sup>b</sup>	
	11.7 ± 0.8 <sup>c</sup>	11.3 ± 0.7 <sup>c</sup>	3.8 ± 0.4 <sup>c</sup>		7.3 ± 0.5 <sup>c</sup>	7.0 ± 0.4 <sup>c</sup>	3.7 ± 0.4 <sup>c</sup>		0.5 ± 0.2 <sup>c</sup>	0.6 ± 0.3 <sup>c</sup>	0.8 ± 0.3 <sup>c</sup>	

DL – deformable liposomes; PGL – propylene glycol liposomes; CL – conventional liposomes; <sup>a</sup>free drug released (%); <sup>b</sup>total drug released (%); <sup>c</sup>drug in intact liposomes released (%). Samples of liposomes-in-vehicles containing diclofenac sodium were incubated at 32 °C in distilled water (for details see section *In vitro* drug release studies). The amount of the drug in the release media was determined before (free drug) and after (total drug) disruption of the released liposomes with methanol. The difference between the total and the free drug released indicates the amount of the drug still present in the liposomes and released from the vehicle into the receptor solution (intact liposomes with drug). Control experiments (vehicles containing free drug, instead of liposomes) were performed simultaneously. The values denote the mean ± S.D. ( $n = 3$ ).

hydrogel. Diclofenac sodium has a dissociation constant (pKa) of 3.9 at 25 °C in water and a log  $p$  of 1.45<sup>36</sup>. The hydrogel used in this study contained 89% water and 10% propylene glycol, which acts as both a humectant and a skin-penetration enhancer. Therefore, encapsulation into liposomes extended the release of the drug from the hydrogel.

An evaluation of intact liposome release from the hydrogel and the cream base showed a similar release ratio of both deformable and propylene glycol liposomes compared with conventional liposomes ( $p < 0.05$ ), which can be attributed to effect of the degree of membrane elasticity of the vesicles (Table 1) on the penetration of the liposomes through the vehicle and agarose matrix into the receptor solution (Table 2). Although propylene glycol liposomes had the same bilayer composition as conventional liposomes, they contained propylene glycol, a well-known skin-penetration enhancer<sup>37,38</sup> that has been shown to contribute to membrane elasticity (Table 1), and subsequently affected the penetration of the liposomes through the vehicle network into the receptor medium. These results were consistent with those of a recent investigation<sup>14</sup> that demonstrated the significance of vesicle composition on the drug-release profile from the hydrogel. Thus, liposomes with pronounced elastic properties diffused more rapidly through the hydrogel network than conventional liposomes<sup>14</sup>. Given that the intended route of administration of the drugs in liposomes-in-vehicle formulations is through the skin, penetration of the drug through the *stratum corneum* is of great importance. An assessment of the different classes of liposomes (deformable, propylene glycol and conventional liposomes) using a novel *stratum corneum*-like phospholipid vesicle-based permeation assay<sup>19</sup> demonstrated that propylene glycol liposomes were the most promising formulation for improving the topical delivery of diclofenac sodium.

The success of dermatotherapy depends also on the properties of the formulation, particularly the spreading ability and retention of the formulation on the skin<sup>18</sup>. Texture analysis was used to evaluate the mechanical properties of the different liposomes-in-vehicle formulations, and parameters such as hardness, adhesiveness and cohesiveness were assessed (Figure 2). These properties have been directly correlated with administration parameters *in vivo*, such as spreadability (hardness) and retention of the formulation on the skin (adhesiveness) or its removal

from the container (cohesiveness)<sup>14,26</sup>. Therefore, these investigations are of major importance during the development and optimization of formulations. In addition, they provide valuable data on the compatibility of the incorporated liposomes with the vehicle.

As shown in Figure 2, the texture characteristics were significantly different between all of the examined vehicles. The cream base showed highest values of all of the parameters assessed, followed by the hydrogel and DMS base. The cream base used in this study contained vaselinum album and cetylalcohol, which were responsible for the hardness of the formulation. Mixing the liposomes in the cream base significantly (ANOVA,  $p < 0.05$ ) lowered the initial hardness by approximately 30% for the conventional and propylene glycol liposomes and slightly more for the deformable liposomes (35%; Figure 2A).

Conventional liposomes have already been proven to be compatible with Carbopol gels<sup>15,23</sup>. Stability of liposomes incorporated in vehicle, especially emulsion and lamellar types of vehicle could be influenced by the vehicle's ingredients. DMS base is a novel cream-like vehicle used in corneotherapy that is prepared without classic emulsifiers and contains lipids similar to those found in human *stratum corneum*. It is composed of hydrogenated soy phosphatidylcholine, medium chain triglycerides, phytosterols and squalane<sup>39</sup>. Clinical studies have confirmed increased levels of skin hydration and reparation of disrupted skin barriers with DMS base when used alone or with incorporated active ingredients<sup>39,40</sup>. Although it has been shown that liposomally encapsulated active compounds mixed in DMS base can significantly improve skin conditions (more than free active compounds in the vehicle)<sup>39</sup>, our results, which were based on texture analysis, indicate a possible physical instability of liposomes in DMS base. A nearly 2-fold decrease of the initial hardness was observed after incorporation of the liposomes into DMS base (more than 60%, regardless of the type of liposome). In contrast, mixing a solution of the free drug (control) into DMS base reduced the initial hardness by only 20% (Figure 2A). Therefore, we speculate that there may be an interaction/incompatibility between all of the types of liposomes used in this study and DMS base, likely caused by the interaction of the negatively charged soy lecithin (S 75) liposomes with the ingredients of the DMS base, predominantly hydrogenated

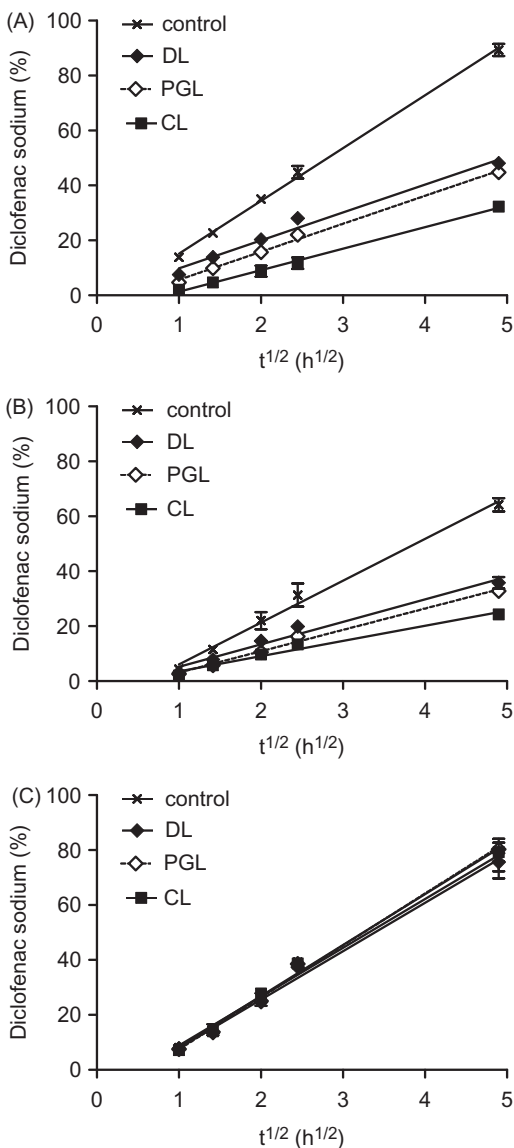


Figure 1. Cumulative release of diclofenac sodium from various liposomes-in-vehicle formulations plotted according to Higuchi<sup>35</sup> equation: liposomes-in-hydrogel (A), liposomes-in-cream base (B), liposomes-in-DMS base (C). The amounts of the released drug were detected in receptor media before addition of methanol (DL – deformable liposomes; PGL – propylene glycol liposomes; CL – conventional liposomes). The values denote the mean  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). The values without error-bars have standard deviation equal or smaller than the size of the symbols.

phospholipids. The 10% of liposomes in DMS base (w/w) represent relatively high source of the negative surface charge in the vehicle, probably causing the disturbance within the lamellar structure of DMS base. This assumption was also supported with release studies in which the ratio of intact liposomes released was lower than 1%, even after 24 hours (Table 2). To verify the interactions/compatibility of liposomes with the components of the DMS vehicle, further studies based on hydrogenated soy phosphatidylcholine liposomes would be valuable.

The smallest decrease in the original hardness was observed with liposomes in the hydrogel. Thus, all liposomes are compatible with the hydrogel ( $p>0.05$ ). These results are consistent with observations concerning Carbopol gels that were recently reported by Hurler and Škalko-Basnet<sup>41</sup> and Vanić and collaborators<sup>14</sup>, in which liposomes preserved the original structure of the gels. The other two texture parameters (cohesiveness and

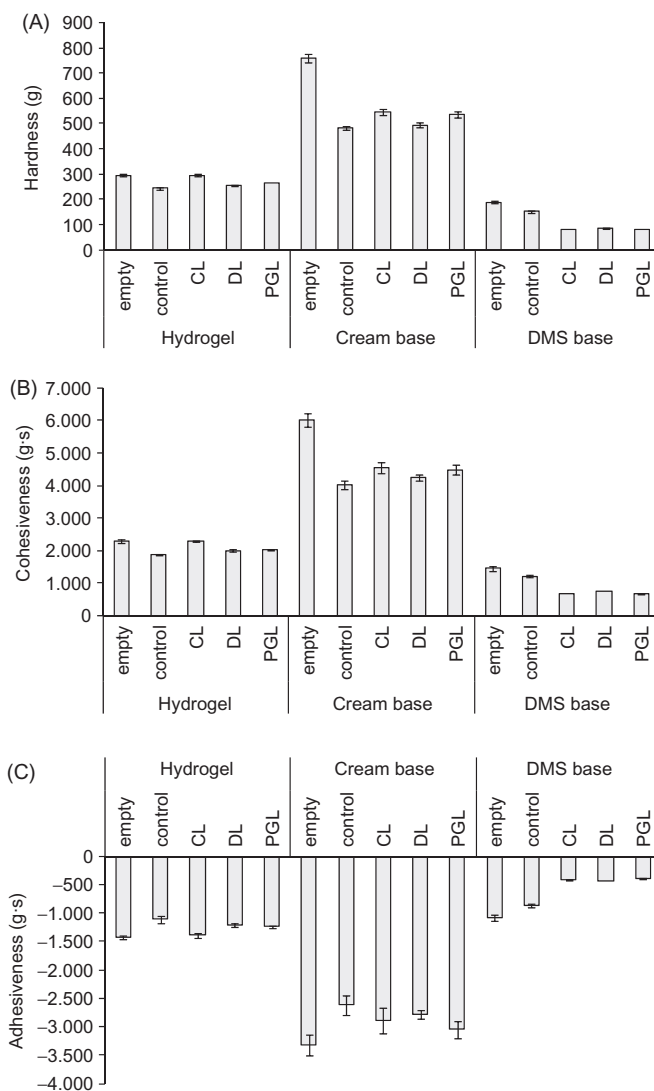


Figure 2. Influence of liposome types on the texture properties of vehicles: hardness (A), cohesiveness (B) and adhesiveness (C). Empty sample denotes original vehicle, while control sample indicates a solution of the drug incorporated in vehicle. CL, DL and PGL represent different types of liposomes in vehicle. Concentration of the free drug and liposomes in vehicles was kept constant for all the samples (10% w/w, solution of free drug or liposomes/vehicle). The values indicate the mean  $\pm$  S.D ( $n=5$ ).

adhesiveness) followed similar patterns for the examined liposomes-in-vehicle formulations (Figure 2B and C).

Vehicle composition has been shown to play an important role in spreading and retaining the formulation at the application site<sup>42</sup> and in the release profile of the incorporated drug<sup>4</sup>. Phospholipid vesicles with pronounced elastic properties have been demonstrated to considerably improve transdermal delivery of hydrophilic drugs<sup>7,8,43</sup>. By combining penetration potential of elastic liposomes containing high ratio of entrapped drug and physicochemical properties of vehicles, both affecting the release and texture properties, optimal formulation could be achieved. Therefore, propylene glycol liposomes in a hydrogel are considered as the most promising formulation for improving topical delivery of the hydrophilic drug.

## Conclusion

Deformable, propylene glycol and conventional liposomes containing diclofenac sodium were incorporated into different

vehicles appropriate for skin application and characterized by *in vitro* drug release and texture parameters. The release of the drug from the different liposomes-in-vehicle formulations was affected by the composition of the vesicles and the mechanical properties of the vehicles. All types of liposomes preserved the original texture of hydrogel. Based on these studies, propylene glycol liposomes-in-hydrogel is the most suitable formulation due to the favorable physicochemical properties of liposomes, high trapping efficiency, the drug release profile from the vehicle, the ratio of intact liposomes released and the protective mechanism of the hydrogel on liposomes. However, to confirm the superiority of the proposed formulation for the skin therapy, animal studies would be beneficial.

### Acknowledgements

The authors thank to Lipoid (Ludwigshafen, Germany) for providing soy lecithin and KOKO GmbH (Leichlingen, Germany) for providing DMS base cream classic.

### Declaration of interest

The authors report no declaration of interest. This work was supported by grant 006-0061117-1244 from the Ministry of Science, Education and Sports of the Republic of Croatia and project entitled "New approach in antimicrobial therapy: Biocompatible, biofilm-penetrating nanosystems" from the University of Zagreb.

### References

- Daniels R, Knie U. Galenics of dermal product – vehicles, properties and drug release. *J Dtsch Dermatol Ges* 2007;5:369–83.
- Weiss SC. Conventional topical delivery systems. *Dermatol Ther* 2011;24:471–6.
- Rehman K, Zulfakar MH. Recent advances in gel technologies for topical and transdermal drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 2014; 40:433–40.
- Sanna V, Peana AT, Moretti MD. Effect of vehicle on diclofenac sodium permeation from new topical formulations: *in vitro* and *in vivo* studies. *Curr Drug Deliv* 2009;6:93–100.
- Delgado-Charro MB, Guy RH. Transdermal drug delivery. In: Hillery AM, Lloyd AW, Swarbrick J, eds. *Drug delivery and targeting for pharmacists and pharmaceutical scientists*. London-New York: Taylor & Francis; 2001:208–36.
- Bosselmann S, Williams III RO. Has nanotechnology led to improved therapeutic outcomes? *Drug Dev Ind Pharm* 2012;38: 158–70.
- Elsayed MMA, Abdallah OY, Naggat VF, Khalafallah NM. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. *Int J Pharm* 2007;332:1–16.
- Cevc G, Gebauer D, Stieber J, et al. Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochim Biophys Acta* 1998;1368:201–15.
- Cevc G, Blume G. New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, Transfersomes. *Biochim Biophys Acta* 2001;1514:191–205.
- Li S, Qiu Y, Zhang S, Gao Y. Enhanced transdermal delivery of 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid via elastic vesicles: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Drug Dev Ind Pharm* 2012;38:855–65.
- Toutou E, Dayan N, Bergelson L, et al. Ethosomes – novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *J Control Release* 2000;65:403–18.
- Dragicevic-Curic N, Scheglmann D, Albrecht V, Fahr A. Temoporfin-loaded inosomes: development, characterization and *in vitro* skin penetration studies. *J Control Release* 2008;127:59–69.
- Manconi M, Mura S, Sinico C, et al. Development and characterization of liposomes containing glycols as carriers for diclofenac. *Colloid Surface A* 2009;342:53–8.
- Vanić Ž, Hurler J, Ferderber K, et al. Novel vaginal drug delivery system: deformable propylene glycol liposomes-in-hydrogel. *J Liposome Res* 2014;24:27–36.
- Škalko N, Čajkovac M, Jalšenjak I. Liposomes with metronidazole for topical use: the choice of preparation method and vehicle. *J Liposome Res* 1998;8:283–93.
- Pavelić Ž, Škalko-Basnet N, Jalšenjak I. Characterisation and *in vitro* evaluation of bioadhesive liposome gels for local therapy of vaginitis. *Int J Pharm* 2005;301:140–8.
- Mourtas S, Duraj S, Fotopoulou S, Antimisiaris SG. Integrity of liposomes in presence of various formulation excipients, when dispersed in aqueous media and in hydrogels. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2008;61:270–6.
- Hurler J, Žakelj S, Mravljak J, et al. The effect of lipid composition and liposome size on the release properties of liposomes-in-hydrogel. *Int J Pharm* 2013;456:49–57.
- Palac Z, Engesland A, Flaten GE, et al. Liposomes for (trans)dermal drug delivery: the skin-PVPA as a novel *in vitro stratum corneum* model in formulation development. *J Liposome Res* 2014; DOI:10.3109/08982104.2014.899368.
- Karn PR, Vanić Ž, Pepić I, Škalko-Basnet N. Mucoadhesive liposomal delivery systems: the choice of coating material. *Drug Dev Ind Pharm* 2011;37:482–8.
- Vanić Ž, Hafner A, Bego M, Škalko-Basnet N. The characterization of various deformable liposomes with metronidazole. *Drug Dev Ind Pharm* 2013;39:481–8.
- Vanić Ž, Barnert S, Süß R, Schubert R. Fusogenic activity of PEGylated pH-sensitive liposomes. *J Liposome Res* 2012;22: 148–57.
- Pavelić Ž, Škalko-Basnet N, Filipović-Grčić J, et al. Development and *in vitro* evaluation of a liposomal vaginal delivery system for acyclovir. *J Control Release* 2005;106:34–43.
- Betz G, Aeppli A, Menshutina N, Leuenberger H. *In vivo* comparison of various liposome formulations for cosmetic application. *Int J Pharm* 2005;296:44–54.
- Peschka R, Dennehy C, Szoka FC. A simple *in vitro* model to study the release kinetics of liposome encapsulated material. *J Control Release* 1998;56:41–51.
- Hurler J, Engesland A, Kermany BP, Škalko-Basnet N. Improved texture analysis for hydrogel characterization: Gel cohesiveness, adhesiveness and hardness. *J Appl Polym Sci* 2012;125:180–8.
- Šentjurc M, Vrhovnik K, Kristl J. Liposomes as a topical delivery system: the role of size on transport studied by the EPR imaging method. *J Control Release*, 1999;59:87–97.
- Caddeo C, Teskač K, Sinico C, Kristl J. Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. *Int J Pharm* 2008;363:183–91.
- Gillet A, Compère P, Lecomte F, et al. Liposome surface charge influence on skin penetration behaviour. *Int J Pharm* 2011;411: 223–31.
- Gillet A, Lecomte F, Hubert P, et al. Skin penetration behaviour of liposomes as a function of their composition. *Eur J Pharm Biopharm* 2011;79:43–53.
- Pavelić Ž, Škalko-Basnet N, Jalšenjak I. Liposomes containing drugs for treatment of vaginal infections. *Eur J Pharm Sci* 1999;8:345–51.
- Pavelić Ž, Škalko-Basnet N, Schubert R. Liposomal gels for vaginal drug delivery. *Int J Pharm* 2001;219:139–49.
- Nagelreiter C, Raffener S, Geyerhofer C, et al. Influence of drug content, type of semi-solid vehicle and rheological properties on the skin penetration of the model drug fludrocortisone acetate. *Int J Pharm* 2013;448:305–12.
- Vanić Ž, Škalko-Basnet N. Nanopharmaceuticals for improved topical vaginal therapy: can they deliver? *Eur J Pharm Sci* 2013;50: 29–41.
- Higuchi T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *J Pharm Sci* 1961;50:874–5.
- Rainsford KD, Kean WF, Ehrlich GE. Review of the pharmaceutical properties and clinical effects of the topical NSAID formulation diclofenac epolamine. *Curr Med Res Opin* 2008;24:2967–92.
- Lane ME. Skin penetration enhancers. *Int J Pharm* 2013;447:12–21.
- Schneider IM, Dobner B, Neubert R, Wohlrab W. Evaluation of drug penetration into human skin *ex vivo* using branched fatty acids and propylene glycol. *Int J Pharm* 1996;145:187–96.
- Lautenschlager H. Biodegradable lamellar systems in skin care, skin protection and dermatology. *SOFW-J* 2013;139:2–8.
- Szepietowski JC, Szepietowski T, Reich A. Efficacy and tolerance of the cream containing structured physiological

- lipids with endocannabinoids in the treatment of uremic pruritus: a preliminary study. *Acta Dermatovenerol Croat* 2005;13:97–103.
41. Hurler J, Škalko-Basnet N. Potentials of chitosan-based delivery systems in wound therapy: bioadhesion study. *J Funct Biomater* 2012;3:37–40.
  42. Jones DS, Woolfson AD, Brown AF. Textural analysis and flow rheometry of novel, bioadhesive antimicrobial oral gels. *Pharm Res* 1997;14:450–7.
  43. Cevc G, Blume G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim Biophys Acta* 1992;1104:226–32.