

Metode priprave i karakterizacija liposoma s vankomicinom

Rubinić, Barbara

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:365876>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Barbara Rubinić

**METODE PRIPRAVE I
KARAKTERIZACIJA LIPOSOMA S
VANKOMICINOM**

Diplomski rad

predložen Kemijском odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre kemije

Zagreb, 5. ožujka 2021. godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Xelliji pod mentorstvom prof. dr. sc. Ernesta Meštovića.
Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Nikola Cindro.

Zahvale

Veliko hvala mentoru prof. dr. sc. Ernestu Meštroviću na vodstvu pri izradi rada i razumijevanju. Veliko hvala neposrednom voditelju, doc. dr. sc. Nikoli Cindri na svemu što ste me naučili o radu u laboratoriju, strpljenju i motivaciji. Od srca se zahvaljujem dr. sc. Ivoni Jasprići što je uvijek bila spremna pomoći i motivirala nas je za daljnji rad. Hvala vam još jednom što sam upravo s vama uspjela napraviti ovakav diplomski rad!

Veliko hvala kolegici Zrinki Duvnjak na pomoći u laboratoriju, podršci i savjetima!

Hvala Almi Ramić, mag.chem., dr. sc. Jasmini Jukić, Ediju Topiću, mag.chem, prof. dr. sc. Ivani Biljan, prof. dr. sc. Josipu Požaru i Ivi Habinovec, mag.chem. na svakoj pomoći u eksperimentima!

Zahvaljujem se članovima Zavoda za farmaceutsku kemiju, prof. dr. sc. Branki Zorc, prof.dr.sc. Zrinki Rajić, Marini Marinović, mag.appl.chem., dr. sc. Maji Beus, Goranu Poje, mag.pharm. i dr. sc. Kristini Pavić što su mi predali veliku ljubav i motivaciju za rad u znanosti!

Mama i tata hvala vam! Jako sam sretna što imam prilike napisat vam koliko sam vam zahvalna, iako će svaka riječ koja napišem biti premalo. Hvala vam na svojoj podršci, što ste uvijek stajali uz mene i vjerovali da ja to mogu!

Hvala mojoj sestri Patriciji na razumijevanju i što si uvijek tu kada te trebam!

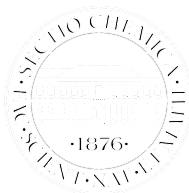
Hvala ti Tomi na svemu! Najviše na ogromnom strpljenju, hvala ti što si me uvijek podržavao u svim mojim ludim naumima i željama. Hvala ti što si uvijek stajao uz mene kada je bilo teško i što mi nisi dao da odustanem!

Hvala svim mojim prijateljima koji su vjerovali u mene!

Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD.....	2
§ 2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Vankomicin.....	4
2.1.1. <i>Struktura vankomicina i klinička primjena u Republici Hrvatskoj</i>	<i>4</i>
2.1.2. <i>Farmakokinetika</i>	<i>5</i>
2.1.3. <i>Farmakodinamika</i>	<i>6</i>
2.1.4. <i>Nuspojave.....</i>	<i>7</i>
2.1.5. <i>Nefrotoksičnost.....</i>	<i>7</i>
2.2. Liposomi.....	11
2.2.1. <i>Definicija i vrste liposoma</i>	<i>11</i>
2.2.2. <i>Upotreba liposoma.....</i>	<i>12</i>
2.2.3. <i>Liposomi u farmaceutskoj industriji i medicini.....</i>	<i>12</i>
2.2.4. <i>Metode priprave liposoma</i>	<i>16</i>
2.2.5. <i>Metode karakterizacije liposoma</i>	<i>17</i>
§ 3. MATERIJALI I METODE.....	19
3.1. Priprava liposoma s vankomicinom metodom film hidratacije.....	19
3.1.1. <i>Inkluzijski eksperiment 001</i>	<i>19</i>
3.1.2. <i>Inkluzijski eksperiment 002.....</i>	<i>20</i>
3.1.3. <i>Inkluzijski eksperiment 003.....</i>	<i>20</i>
3.1.4. <i>Inkluzijski eksperiment 004.....</i>	<i>20</i>
3.1.5. <i>Inkluzijski eksperiment 005.....</i>	<i>21</i>
3.1.6. <i>Inkluzijski eksperiment 009.....</i>	<i>21</i>
3.2. Priprava liposoma s vankomicinom metodom smrzavanja	22
3.2.1. <i>Inkluzijski eksperiment 006.....</i>	<i>22</i>
3.2.2. <i>Inkluzijski eksperiment 007.....</i>	<i>22</i>
3.2.3. <i>Inkluzijski eksperiment 008.....</i>	<i>23</i>
3.2.4. <i>Inkluzijski eksperiment 010.....</i>	<i>23</i>
3.2.5. <i>Inkluzijski eksperiment 011.....</i>	<i>24</i>
3.3. Karakterizacija liposoma	25
3.3.1. <i>Optička mikroskopija</i>	<i>25</i>

3.3.2. Mikroskopija atomskih sila (AFM)	25
3.3.3. Dinamičko rasporšenje svjetlosti (DLS)	25
3.3.4. Elektrokinetika	26
3.3.5. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)	26
3.3.6. Gel-filtracijska kromatografija	26
3.3.7. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....	27
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. Karakterizacija liposoma s vankomicinom pripremljeni metodom film hidratacije.....	30
4.1.1. Optička mikroskopija	30
4.1.2. Mikroskopija atomskih sila (AFM)	33
4.1.3. Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS)	35
4.1.4. Elektrokinetika	38
4.1.5. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)	38
4.1.6. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....	40
4.2. Karakterizacija liposoma s vankomicinom pripremljen metodom smrzavanja	42
4.2.1. Optička mikroskopija	42
4.2.2. Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS)	43
4.2.3. Elektrokinetika	45
4.2.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) pri različitim pH pufera	46
4.2.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....	49
§ 5. ZAKLJUČAK	51
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	52
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	53
§ 8. DODATAK.....	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXXVI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

METODE PRIPRAVE I KARAKTERIZACIJA LIPOSOMA S VANKOMICINOM

Barbara Rubinić

Vankomicin je glikopeptidni antibiotik koji se koristi kod infekcija meticilin-rezistentnim *Staphylococcom aureusom* (MRSA). Vankomicin može uzrokovati nefrotoksičnost u ovisnosti o primjenjenoj dozi, do 40% slučajeva. Primjena vankomicina u formulaciji s liposomom, sfernom lipidnom vezikulom, pokazuje smanjeno zadržavanje vankomicina u bubregu i stoga smanjenu nefrotoksičnost. Liposomi s vankomicinom pripremljeni su metodom hidratacije filma te metodom smrzavanja. Karakterizirani su koristeći optičku mikroskopiju, mikroskopiju atomskih sila (AFM), diferencijalnu skenirajuću kalorimetriju (DSC), dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS) te elektokinetiku. Optičkom mikroskopijom dokazano je postojanje liposoma. DSC-om je pokazano kako metode pripreme značajno utječu na termička svojstva liposoma. DLS-om je pokazano kako prazni liposomi imaju sličnu raspodjelu u veličini kao i liposomi s uklopljenim vankomicinom. ζ -potencijal praznih liposoma veći je od ζ -potencijala liposoma s uklopljenim vankomicinom što ukazuje na veću nestabilnost i sklonost agregacije liposoma s vankomicinom, što je potvrđeno i AFM-om. Enkapsulacijska efikasnost vankomicina najveća je u liposomima pripremljenima metodom smrzavanja mjerena 30 dana nakon pripreme.

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC), dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS), elektrokinetika, enkapsulacijska efikasnost (EE), liposomi, vankomicin, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Mentor: dr. sc. Ernest Meštrović, nasl. red. prof.

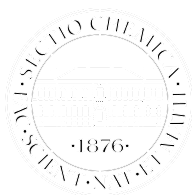
Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Nikola Cindro

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Nikola Cindro
2. prof. dr. sc. Ernest Meštrović
3. doc. dr. sc. Marko Močibob

Zamjena: izv. prof. dr. sc. Ivana Biljan

Datum diplomskog ispita: 5. ožujka 2021.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF VANCOMYCIN LIPOSOMES

Barbara Rubinić

Vancomycin is a glycopeptide antibiotic used for treatment of infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Nephrotoxicity is observed in up to 40% of cases, depending on the dosis. In formulation with liposomes, lipid vesicles, vancomycin's concentration in the kidney lowers faster, reducing the nephrotoxicity. Vancomycin liposomes were prepared using thin film hydration and freeze-thaw method. Characterization was made by optical microscopy, atomic force microscopy (AFM), differential scanning calorimetry (DSC), dynamic light scattering (DLS) and electrokinetics. Using optical microscopy, the existence of liposomes was proved. DSC results suggest that thermodynamic properties of liposomes significantly depend of the preparation method. DLS showed that empty liposomes and vancomycin liposomes have almost the same size distribution. ζ -potential was greater for empty liposomes in comparison to vancomycin liposomes, suggesting that vancomycin liposomes are less stable and more prone to aggregation, which was confirmed by AFM. Encapsulation efficiency of vancomycin was the highest in liposomes prepared by the freeze-thaw method when the analysis was performed 30 days after preparation.

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: differential scanning calorimetry (DSC), dynamic light scattering (DLS), electrokinetics, encapsulation efficiency (EE), liposome, vancomycin, high performance liquid chromatography (HPLC)

Mentor: dr. sc. Ernest Meštrović, prof.

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): doc. dr. sc. Nikola Cindro

Reviewers:

1. doc. dr. sc. Nikola Cindro
 2. prof. dr. sc. Ernest Meštrović
 3. doc. dr. sc. Marko Močibob
- Substitute: izv. prof. dr. sc. Ivana Biljan

Date of exam: 5th March 2021

§ 1. UVOD

Vankomicin je triciklički glikopeptidni antibiotik koji se najčešće koristi kod infekcija meticil-rezistentnom bakterijom *Staphylococcus aureus* (MRSA) te bakterijom *Clostridium difficile*.¹ Mali se udio lijeka metabolizira te se 24 sata nakon administracije izlučuje 75 - 90 % u aktivnom obliku putem bubrega.² Vankomicin je nefrotoksičan što je potvrđeno u 10 – 20 % pacijenata koji su dobili uobičajenu dozu vankomicina, dok je ta stopa kod viših doza iznosila 30-40 %. Također, za svaki dodatan dan primjene vankomicina povećava se rizik od nefrotoksičnosti za čak 12 %.³ Metode kojima se nastoji umanjiti nefrotoksičnost vankomicina su promijena načina primjene lijeka, primjerice intermitentna umjesto kontinuirana intravenska primjena ili modifikacija sustava dopreme lijeka.⁴ Jedan od načina smanjenja nefrotoksičnosti vankomicina jest modifikacija sustava dopreme lijeka u obliku liposomalnih formulacija, a moguće i poboljšanja farmakokinetičkih svojstava samog lijeka. *In vitro* studije pokazale su da sporije i kontrolirano otpuštanje vankomicina iz liposoma produljuje vrijeme poluživota i srednje vrijeme ostanka u plazmi. Također, mijenja se biodistribucija u vidu smanjene koncentracije vankomicina u bubregu u odnosu na otopljeni vankomicin što ukazuje na bolja farmakokinetička svojstva lijeka uklopljenog u liposome.⁵ Liposomi su sferne čestice koje se sastoje od fosfolipidnog dvosloja s određenim udjelom kolesterola. Aktivnim tvarima u formulaciji s liposomom mijenjaju se farmakokinetički parametri.⁶ Vankomicin u formulaciji s liposomom više se zadržava u jetri, slezeni i plućima za razliku od otopljenog vankomicina. Također, koncentracija vankomicina u formulaciji s liposomom manja je u bubregu, nego u primjeni solubilnog vankomicina za što se smatra da pridonosi manjoj nefrotoksičnosti liposomske formulacije.⁷

Cilj ovog istraživanja jest pripremiti unilamelarne liposome s inkapsuliranim vankomicinom metodom hidratacije filma te metodom smrzavanja. Osmislit će se niz eksperimenata s ciljem optimizacije metode i povećanja enkapsulacijske učinkovitosti koja se analizira metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Dobivene formulacije bit će karakterizirane metodama optičke mikroskopije, mikroskopije atomskih sila (AFM), diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC), dinamičkim raspršenjem svjetlosti (DLS) te elektokinetikom. Cilj navedenog istraživanja je pripremiti i istražiti svojstva liposoma koji sadrže vankomicin s ciljem umanjivanja nefrotoksičnosti kod vankomicina.

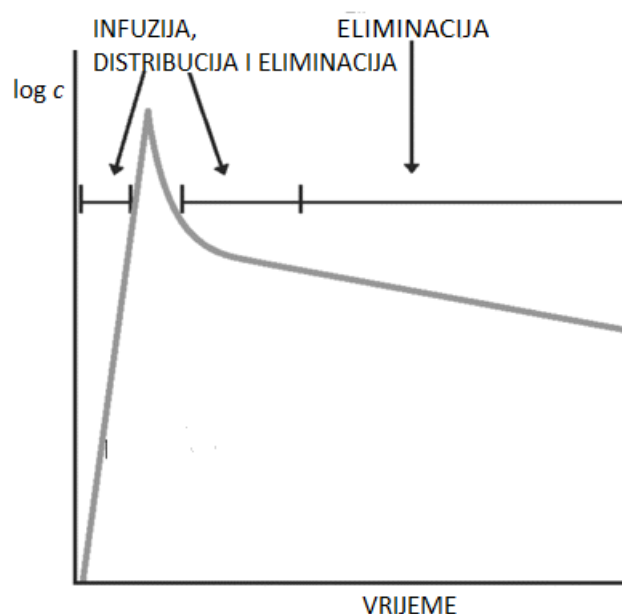
Vankomicin se administrira intravenski ili *per os*. Baktericidno djeluje na većinu gram-pozitivnih koka i bacila kao što su *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium spp.*, a najčešće se koristi kod infekcija meticil-rezistentnim *Staphylococcus aureusom* (MRSA) te *Clostridiumom difficile* (*per os* primjena). Bakteriostatski djeluje na *Enterococcus spp.*¹. Klinička indikacija za primjenu vankomicina su složene infekcije kože (nekrotizirajuće i nenekrotizirajuće), osteomijelitis i zglobne infekcije, pneumonija uključujući izvanbolnički, bolnički tip pneumonije i pneumoniju povezanu s mehaničkom ventilacijom (upalu pluća kod osoba koje su intubirane i strojno ventilirane) te infektivni endokarditis. Kontraindikacija za primjenu vankomicina je preosjetljivost na djelatnu tvar ili neku od pomoćnih tvari u formulaciji.²

2.1.2. Farmakokinetika

Vankomicin se administrira intravenski u infuziji trajanja minimalno 60 minuta. Biodistribucija vankomicina ovisi o tkivu i prisustvu upale.⁹ Omjer lijeka u cerebrospinalnom likvoru prema serumu iznosi do 0,18 kada ne postoji upala, dok je prodiranje kroz krvno-moždanu barijeru veće u prisutnosti inflamacije kada omjer iznosi do 0,48¹⁰. Penetracija vankomicina u plućno tkivo je varijabilna, a pokazana je pozitivna korelacija između upalnih parametara i distribucije vankomicina u pluća.¹¹ Vankomicin u uzorku neinficirane kosti doseže koncentraciju 10% u odnosu na serum, dok se kod inficirane kosti koncentracija povećava na 30% u odnosu na serum.¹² Prilikom peroralne primjene vankomicina, gotovo nema sistemske distribucije.¹³

Vankomicin se umjereno veže na proteine plazme, prvenstveno albumin, s frakcijom vezanja između 30 i 55%.^{2,9} Lijek se vrlo malo metabolizira te se 24h nakon administracije izlučuje 75% do 90% u aktivnom obliku putem bubrega², dok su koncentracije u jetri i žući 24h nakon administracije gotovo nemjerljive, manje od 5%.^{2,13} Poluvrijeme života vankomicina iznosi od 4 do 6 sati u bolesnika s očuvanom bubrežnom funkcijom. Kod djece poluvrijeme života vankomicina iznosi 2,2 do 3 sata, dok za anefrične bolesnike iznosi prosječno 7,5 dana^{2,13}. Usprkos tome što je većina izlučivanja vankomicina putem glomerularne filtracije, lijek se ne može učinkovito eliminirati hemodijalizom ili peritonealnom dijalizom ukoliko su koncentracije u plazmi previsoke.² Klirens plazme iznosi otprilike 0,058 Lkg⁻¹h⁻¹, a bubrežni klirens 0,048 Lkg⁻¹h⁻¹ kod pacijenata s očuvanom bubrežnom funkcijom^{2,13}. Najvažniji parametar kojim se mjeri antimikrobna učinkovitost vankomicina opisuje se omjerom 24-satnom područjem ispod krivulje koja opisuje varijaciju koncentracije lijeka u serumu kao

funkcija vremena (AUC – *area under the curve*) po minimalnoj inhibicijskoj koncentraciji (MIC) koja se definira kao najmanja koncentracija koja zaustavlja vidljivi rast bakterija (AUC/MIC).¹⁴



Slika 2. Shematski prikaz kretanja logaritma serumske koncentracije vankomicina u vremenu s označenim farmakokinetičkim značajkama kao što su infuzija, distribucija i eliminacija. Shema je preuzeta i prilagođena iz izvora 10.⁹

2.1.3. Farmakodinamika

Mehanizam djelovanja vankomicina je inhibicija sinteze stanične stijenke Gram-pozitivnih bakterija stvarajući vodikovu vezu s D-alanil-D-alaninom iz *N*-acetilmuraminsko kiselinskog (NAM) peptidnog prekursora ili *N*-acetilglukozamin (NAG)-peptidnih prekursora. Na taj se način onemogućuje polimerizacija kompleksa fosfodisaharid pentapeptida i umreženo povezivanje peptidoglikana.^{12,13} Vankomicin dodatno mijenja propusnost stanične membrane bakterija i utječe na sintezu ribonukleinske kiseline (RNA).¹²

Postoji više načina nastanka rezistencije na antibiotike. Kod vankomicina nije uočena pojava križne rezistencije s drugim skupinama antibiotika. Gram-pozitivne Bakterije roda *Erysipelothrix*, *Leuconostoc* i *Pediococcus* inherentno su rezistentne na vankomicin.¹² Bakterije roda *Enterococcus* stekle su rezistenciju na vankomicin razvitkom klastera gena s “visokom” i “niskom” rezistencijom. Klasteri gena s visokom rezistencijom su: *vanA*, *vanB*, *vanD* i *vanM* koji mijenjaju terminalnu aminokiselinu peptidnog prekursora iz D-Ala-D-Ala u D-Ala-D-

laktat te vankomicin više ne može stvarati kompleks s navedenim peptidom. Klasteri gena s niskom rezistencijom su the *vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, i *vanN* te oni uzrokuju promjenu terminalnog aminokiselinog peptidnog prekursora u D-Ala-D-Ser.¹⁵ Geni *vanA* i *vanB* nalaze se na plazmidima i mogu se konjugacijom prenijeti u druge bakterije roda *Enterococcus* pa čak i na bakterije roda *Staphylococcus*. Upravo zbog toga predstavljaju potencijalnu opasnost u stvaranju multirezistentnih bakterija za čije liječenje postoje ograničene mogućnosti, kao što je upotreba antibiotika linezolida. Do danas su opisani sojevi bakterija *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pneumoniae* koji su rezistentni na vankomicin.¹²

2.1.4. Nuspojave

Najčešće nuspojave koje se javljaju kod primjene vankomicina su upala potkožnih vena (flebitis), pseudoalergijske reakcija te „sindrom crvenog vrata“.² „Sindrom crvenog vrata“ karakteriziran je naletima crvenila u lice i gornje dijelove trupa te pruritus (svrbež). Opisano je kao anafilaktoidna reakcija, no rijetko se javlja hipotenzija i angioedem. Reakcija nastaje zbog otpuštanja histamina iz mastocita posredovano neimunom reakcijom, a ovisi o primljenjenoj dozi i brzini primjene vankomicina u infuziji.¹⁶ Ostale nuspojave koje su navedene kao česte (incidencija jednaka ili veća od jedan na deset administracija lijeka) su hipotenzija, dispneja (zaduha) i stridor (visokofrekventni, grub zvuk koji nastaje u inspriju), svrbež, urtikarija, egzantem i upala sluznica, bubrežna insuficijencija koja se manifestira porastom serumskog kreatinina. Također, za vrijeme ili nakon brze infuzije može doći do anafilaktičke reakcije.²

2.1.5. Nefrotoksičnost

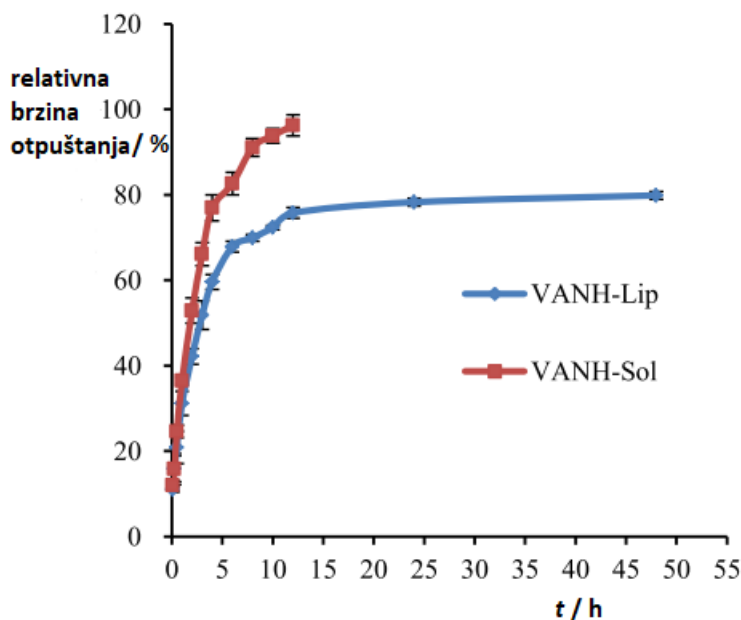
Nefrotoksičnost (oštećenje bubrega) kod vankomicina definirana je kao porast kreatinina u serumu za 0,5 mg/dL ili 50% iznad gornje referentne vrijednosti u dva uzastopna mjerenja nekoliko dana nakon administracije vankomicina, a bez drugog očitog uzroka.¹⁷ Međutim, neke studije za opisivanje akutnog bubrežnog oštećenja (AKI „acute kidney injury“) koriste RIFLE (akronim za *Risk, Injury, Failure, Loss, End-Stage-Renal-Disease*) ili AKIN (kratica za *Acute kidney injury network*) kriterije koji određuju stupanj bubrežnog oštećenja te uzimaju u obzir i volumen izlučenog urina uz koncentraciju kreatinina u serumu.⁴

Do danas nije poznat točan mehanizam nefrotoksičnosti vankomicina. U studijama je pokazano kako vankomicin dovodi do nastanka oksidativnog stresa u stanici produkcijom slobodnih radikala. Pretpostavka da na taj način dolazi do nefrotoksičnosti, posebno u proksimalnom zavijenom tubulu, potvrđena je u mnogobrojnim studijama kada su primjenjivani antioksidansi, kao što su vitamin E, vitamin C i N-acetilcistein, pri čemu dolazi do smanjenja nefrotoksičnosti.⁴ Osim toga, vankomicin iducira apoptozu proksimalnog zavijenog tubula na način da nastali superoksidni radikali u mitohondriju dovode do depolarizacije membrane te na poslijetku do aktivacije kaspaze 9 i kaspaze 3 i/ili 7 što vodi u induciranu staničnu smrt.¹⁸

Glavni čimbenici koji doprinose nastanku nefrotoksičnosti nakon primjene vankomicina su visoka primjenjena doza i duljina trajanja liječenja.⁵ U preglednom članku opisana je nefrotoksičnost u 10 do 20% pacijenata koji su dobili uobičajenu dozu vankomicina, dok je ta stopa kod viših doza iznosila 30-40%.³ Također, za svaki dodatan dan primjene vankomicina povećava se rizik od nefrotoksičnosti za čak za 12%.³ Ostali čimbenici koji predisponiraju nastanku nefrotoksičnosti su već od ranije oštećena bubrežna funkcija, primjena lijekova koji isto mogu djelovati nefrotoksično, kod pretilih bolesnika te bolesnika s dubokom visceralnom infekcijom.⁵

Postupci kojima se nastoji umanjiti nefrotoksičnost vankomicina su način primjene lijeka i njegova modifikacija. Preporuča se primijeniti lijek pravilno doziran prema tjelesnoj masi (15-20 mg/kg), razmatrati administraciju visoke udarne doze od 25-30 mg/kg u teškim infekcijama koja nije povezana s nefrotoksičnosti. Infuziju vankomicina preporučeno je davati intermitentno radije nego kontinuirano. Nije potrebno doći do maksimalne dozvoljene koncentracije budući da ona ne korelira niti s učinkovitošću niti s toksičnošću, već je preporučeno da doza održavanja iznosi 10 do 15 mg/L, odnosno 15 do 20 mg/L kod teških infekcija. Ukoliko se pojave znakovi nefrotoksičnosti više od dva dana nakon primjene vankomicina preporučeno je vankomicin zamijeniti daptomicinom ili linezolidom prema indikaciji koji imaju sličnu učinkovitost, ali nisu nefrotoksični. Primjenom vankomicina kod prije navedenih rizičnih skupina ili zajedno s drugim nefrotoksičnim lijekovima potrebno je pratiti terapijsku dozu lijeka u krvi.⁴ Drugi pokušaj smanjenja nefrotoksičnosti vankomicina jest modifikacija lijeka u obliku poboljšanja *drug delivery* (sustava za isporuku lijekova) s ciljem smanjenja nefrotoksičnosti, a moguće i poboljšanja svojstva samog lijeka.⁵ Jedna od mogućnosti o kojoj će biti više riječi ovdje je priprava liposoma s vankomicinom.⁵ *In vitro* studije pokazale su sporije i kontrolirano, bifazično otpuštanje vankomicina iz liposoma koji pokazuje kinetiku u

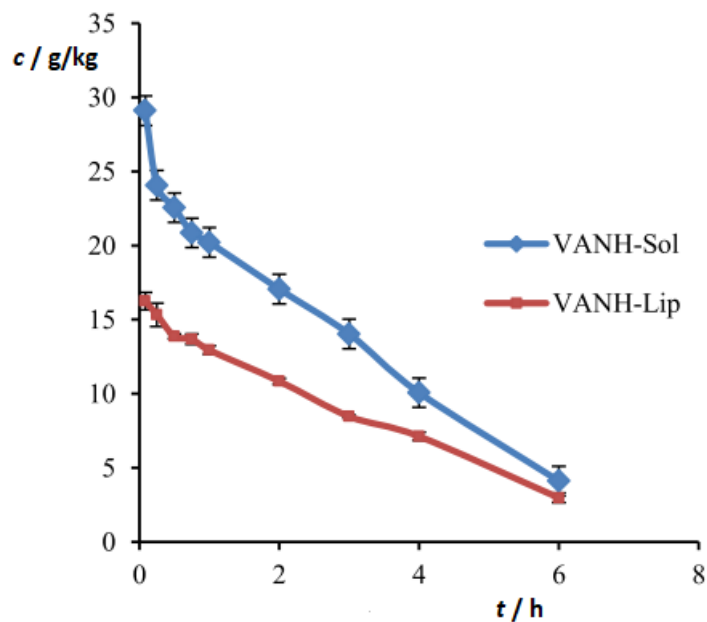
skladu s Weibullovom jednadžbom naspram otopljenog vankomicina koje je brža te prati model kinetike prvog reda kao što je prikazano na Slici 3.⁷



Slika 3. Prikaz kinetike otpuštanja vankomicina u *in vitro* studiji. Plava linija predstavlja otpuštanje vankomicin iz liposoma, dok crvena linija predstavlja otpuštanje otopljenog vankomicina (graf preuzet i prilagođen iz izvora 7.)⁷

U *in vivo* studijama na mišu kao modelnom organizmu praćeni su farmakokinetički parametri. Vrijeme poluživota vankomicina u liposomu povećana je 1,2 puta naprama otopljenog vankomicina. Srednje vrijeme ostanka u plazmi (*mean residence time* - MRT) i AUC veći su kod vankomicina u formulaciji s liposomom, nego u solubilnom vankomicinu. Povećanje MRT-a može se pripisati sporijem otpuštanju vankomicina iz liposoma te smanjen klirens u retikuloendotelnom sustavu.⁷ Naime, pokazano je da nanočestice veličine do 220 nm mogu izbjeći fagocitozu u makrofagu.¹⁹ Povećanje oba parametra i duže zadržavanje vankomicina u plazmi mogu pridonijeti većoj terapijskoj efikasnosti.⁷ Prilikom istraživanja biodistribucije vankomicina, pokazano je kako se vankomicin u formulaciji s liposomom više zadržava u jetri, slezeni i plućima za razliku od topljivog vankomicina, dok je koncentracija vankomicina u formulaciji s liposomom manja u bubregu, nego kod administracije solubilnog vankomicina što može pridonijeti manjoj nefrotoksičnosti liposomske formulacije. Graf je prikazan na Slici 4.⁷

U studiji s antitumorskim lijekovima pokazano je kako manja ekspozicija lijeka u liposomskoj formulaciji na tkivo bubrega, može objasniti smanjenu nefrotoksičnost.²⁰



Slika 4. Koncentracija vankomicina u bubregu nakon primjene vankomicina u formulaciji s liposomom i solubilnog vankomicina. Plava linija predstavlja otopljeni vankomicin, dok crvena linija predstavlja vankomicin iz liposoma (graf je preuzet i prilagođen iz izvora 7) ⁷

2.2. Liposomi

2.2.1. Definicija i vrste liposoma

Liposomi su sferične lipidne vezikule sačinjene od fosfolipida.^{6,21} Fosfolipidi su amifilne molekule koje se sastoje od hidrofilne glave i hidrofobnih repova.²² Ta karakteristika fosfolipida omogućuje da se u vodenom, hidrofilnom mediju organiziraju u vezikule koje se sastoje od dvosloja fosfolipida.²¹ Veličina liposoma može varirati u redu veličine nanometar do reda veličine mikrometra.⁶ Prema veličini i broju fosfolipidnih dvosloja, liposomi su klasificirani u tri skupine. Prva skupina su male unilamelarne vezikule (*small unilamellar vesicles* SUV) koje se sastoje od jednog fosfolipidnog dvosloja, veličine do 100 nm. Velike unilamelarne vezikule (*large unilamellar vesicles* LUV) sastoje se od jednog fosfolipidnog dvosloja, veći od 100 nm. Multilamelarne vezikule sastoje se od više slojeva fosfolipidnog dvosloja, a veličina je proporcionalna broju dvosloja.^{6,21} Podjela liposoma je prikazana na Slici 5.



Slika 5. Prikaz vrste liposoma prema broju fosfolipidnog dvosloja i veličini na multilamelarne vezikule (MLV), velike i male unilamelarne vezikule (LUV, odnosno SUV).⁶

Fizikalno-kemijska svojstva liposoma mogu se mijenjati na nekoliko načina. Liposomske vezikule mogu biti neutralne, no mogu biti pozitivno ili negativno nabijene na površini korištenjem nabijenih fosfolipida tijekom pripreve. Promjenom sastava i omjera fosfolipida može se utjecati na fizikalno-kemijska svojstva. Dodatkom sterola može se utjecati na fluidnost fosfolipidnog dvosloja i stabilnost vezikula. Ako se na površini nalazi polietilen-glikol, liposomi su otporniji na razgradnju i duže se zadržavaju u cirkulaciji.^{6,21} Liposomi mogu biti

ovisni o promjeni pH i promjeni temperature, a modifikacijom lipida, dodatkom kolesterola, protutijela i polimera dodatno se utječe na fizikalno-kemijska svojstva liposoma.⁶

2.2.2. Upotreba liposoma

Liposomi su našli svoju upotrebu u prehrambenoj, kozmetičkoj, tekstilnoj, poljoprivrednoj i farmaceutskoj industriji te medicini.^{21,23,24} Prehrambena industrija koristi mnoge enzime u pripravi hrane, a pokazano je kako primjena inkapsuliranih enzima otklanja ograničenja kod primjene slobodnih enzima kao što su visoka osjetljivost na uvjete okoliša.²⁵ Najčešće se primjenjuju kod mliječnih proizvoda kao što su sirevi, a svoju primjenu nalaze i kao sustav za dostavu vitamina te minerala.^{21,25} Upotreba liposoma u kozmetičkoj industriji poboljšava svojstva ciljnih tvari na način da povećava prodornost, stabilnost i topljivost. Također, produljuju vrijeme djelovanja ciljne tvari, odvajaju ciljne tvari od vanjskog okoliša i na taj način onemogućuju pojedine neželjene reakcije, a osim toga smanjuju nuspojave i toksičnost ciljnih tvari. Postoji mogućnost pripreme specifičnih liposoma za pojedine stanice primjenom imunoglobulina.²⁶ Prednost korištenja liposoma u tekstilnoj industriji je smanjenje zagađenja okoliša, a primjenjuju se kod izbjeljivača i tekstilnih boja.²³ Primjer primjene liposoma u poljoprivrednoj industriji jest enkapsulacija senzora za acetil-koliesterazu, enzimu koji je ciljna meta organofosfatnih pesticida, čime se bolje kontrolira toksičnost pesticida i zagađenje okoliša.^{24,27} Primjena liposoma u farmaceutskoj industriji i medicini opisana je u idućem odlomku.

2.2.3. Liposomi u farmaceutskoj industriji i medicini

Liposomske formulacije mogu se administrirati *per os*, intravenski ili izravno u plućno tkivo. Farmakokinetička svojstva liposoma mogu promijeniti svojstva primjenjene ciljne molekule.⁶ Nakon primjene liposomalne formulacije intravenski, vrijeme zadržavanja liposoma u sistemskoj cirkulaciji te farmakokinetika ovisni o njihovoj veličini, naboju, fluidnosti te membranskim lipidima.^{6,28} Iz sistavne cirkulacije eliminiraju ih stanice retikuloendotelnog sustava, koje se uglavnom nalaze u jetri i slezeni.²⁹ Liposomi su u sistemskoj cirkulaciji opsonizirani komponentama komplementa (C3a i C5a), imunoglobulinima, albuminom i lipoproteinima.³⁰ Produljenje zadržavanja liposoma u sistemskoj cirkulaciji moguće je korištenjem pegiliranih liposoma. Pegilirani liposomi konjugirani su s polietilen-glikolom koji

na površini stvara steričku inhibiciju i onemogućuje interakciju s proteinima i stanicama čime se smanjuje unos liposoma u retikuloendotelni sustav pomoću opsonizacije. No, unos liposoma nije potpuno onemogućen, što ukazuje i na druge mehanizme unosa.³¹

Toksičnost liposoma ovisna je o naboju. Pokazano je kako su neutralni i negativno nabijeni liposomi relativno netoksični, dok su pozitivno nabijeni liposomi izrazito toksični za epitelne stanice pluća. Također, toksičnost liposomskih formulacija može potjecati od ostatka neupranih organskih otapala za koje se smatra da mogu djelovati na inhibiciju enzima, denaturaciju proteina te nepovoljno utjecati na staničnu membranu. Višak organskog otapala može se ukoniti metodama dijalize, vakuum upravanja ili gel-filtracije.⁶

Liposomi mogu biti pripremljeni tako da se na ciljno mjesto dovode aktivno ili pasivno. Aktivno ciljane liposomske formulacije mogu se specifično dostavljati stanicama pomoću raznih mehanizama. Ultrazvučni valovi koji fokusiraju tumorsko tkivo, magnetski vođeni liposomi koji na svojoj površini imaju paramagnetske čestice, fotosenzitivni liposomi koji otpuštaju svoj sadržaj pod utjecajem zraka ultraljubičaste (UV) svjetlosti, pH ovisni liposomi ili liposomi ovisni o temperaturi. Drugi važan mehanizam aktivnog ciljanja jest konjugacija ciljne molekule s liposomom te imunoliposomi koji u svojem fosfolipidnom dvosloju sadrže imunoglobuline, ugljikohidrate ili hormone koji služe kao ligandi receptora ciljnih stanica.²¹

Lijekovi koji su odobreni u svijetu do 2017. godine u formulaciji s liposomom prikazani su u Tablici 1.³² U Republici Hrvatskoj odobren je Myocet®³³.

Lipidne nanočestice korištene su u formulaciji mRNA cjepiva protiv SARS-CoV-2 tvrtke Pfizer-BioNTech i Moderna.^{34,35}

Tablica 1. Odobreni lijekovi u formulaciji s liposomom 2017. godine u svijetu raspoređeni prema farmakodinamičkoj skupini aktivne tvari i godini odobrenja.³²

Naziv lijeka	Aktivna tvar	Klinička indikacija	Godina odobrenja
CITOSTATICI			
Doxil®	doksorubicin	Ca mammae, Ca ovarii, Kaposijev sarkom	1995.
DaunoXome®	daunorubicin	Kaposijev sarkom povezan s AIDS-om	1996.
Depocyt®	citarabin	Neoplastični meningitis	1999.
Myocet®	doksorubicin	Metastatski Ca mammae	2000.
Mepact®	mifamurtid	Osteosarkom (visoki gradus, neresektabilan)	2004.
Marqibo®	vinkristin	Akutna limfoblastična leukemija	2012.
Onivyde™	irinotekan	Metastatski Ca pancreasa	2015.
ANTIMIKOTICI			
Abelcet®	Amfotericin B	Invazivne gljivične infekcije	1995.
Ambisome®	Amfotericin B	gljivične infekcije	1997.

ANTIVIRALNI LIJEKOVI			
Amphotec®	Amfotericin B	Teške gljivične infekcije	1996.
Epaxal®	Inaktivirani HAV	Hepatitis A	1993.
Inflexal®V	Inaktivirani hemaglutinin virusa <i>influenzae</i> A i B	Gripa	1997.
OSTALO			
Visudyne®	verteporfin	Neovaskularizacija žilnice	2000.
DepoDur™	Morfij-sulfat	Bol	2004.
Exparel®	bupivakain	Bol	2011.

2.2.4. Metode priprave liposoma

Metode priprave liposoma korištene u ovom radu su metoda hidratacije filma, koja se još naziva i Banghamova metoda,²¹ te metoda smrzavanja.⁷

Metoda hidratacije filma ili Banghamova metoda temelji se na otapanju lipida u kloroformu u okrugloj tikvici. Kloroform se ukloni uparavanjem uz prisutnost vakuuma, a dobiveni suhi film lipida hidratira se s vodenom otopinom željene molekule. Smjesa se podvrgne laganom miješanju kako bi se otopio cijeli film.³⁶

Prilikom priprave liposoma metodom smrzavanja, koristi se lipidni film pripremljen prema metodi hidratacije filma. Dobiveni film lipida hidratira se i podvrgne laganom miješanju. Nakon toga se smjesa može podvrgnuti sonikaciji. Zatim slijedi nekoliko ciklusa (uobičajeno dva) smrzavanja i zagrijavanja. Smrzavanje se može postići pomoću tekućeg dušika ili upotrebom zamrzivača temperature -20°C . Nakon smrzavanja slijedi zagrijavanje za koje se često koristi vodena kupelj u rasponu temperatura od 40°C do 65°C . Omjer vremena smrzavanja i zagrijavanja je 1:2. Liposomi pripremljeni metodom smrzavanja pokazuju veću enkapsulacijsku efikasnost od metode priprave hidratacije filma.^{7,37} Predložena objašnjenja za veću enkapsulacijsku efikasnost kod smrzavanja su sljedeća: kod temperatura zagrijavanja manjih od 65°C pokazana je veću enkapsulacijska efikasnost (EE) vjerojatno kao posljedica sporijeg otapanja leda što stvara povoljnu kriokoncentraciju otopine ciljne molekule i liposoma čime se povećava enkapsulacija molekule kod rehidracije liposoma. Prilikom zamrzavanja, liposomi se nalaze u gusto populiranim nakupinama koje onemogućuju difuziju ciljne molekule iz liposoma. No, liposomi smješteni centralno imaju smanjen dodir s ciljnom molekulom što može prouzrokovati smanjenu EE, te primjenom minimalno dva ciklusa smrzavanja i zagrijavanja dolazi do reorganizacije u gustim nakupinama te jednakomjernog kontakta svih liposoma s ciljnom molekulom. Također, visoke koncentracije liposoma i ciljne molekule mogu sniziti temperaturu tališta otapala te otapanje malog volumena otapala uz liposome čini ih hidratiranima i sprečava fuziju dvaju liposoma.³⁷

2.2.5. Metode karakterizacije liposoma

Mikroskopija atomskih sila (*atomic force microscopy*, AFM) metoda je u kojoj se stvara trodimenzijski prikaz površine nanočestica, a čija je rezolucija u nanometrima ili Angström. ^{21,38} AFM se sastoji od sonde koja „šeće“ po površini tako da je njen oštar vrh u kontaktu s površinom koja se snima, a s njene gornje strane reflektira se laserska zraka koju detektira fotodioda. Razlike u površini savijaju sondu i dolazi do otklona od ravnoteže i pretvorbe u električni signal.³⁸ Navedena metoda omogućuje da se prikažu liposomi bez promjene u njihovom obliku i na taj način su proučavani različiti čimbenici poput kolesterola, sastava lipida i aktina te njihov utjecaj na veličinu, oblik i stabilnost liposoma.³⁹ Prednost metode je mogućnost vizualizacije bioloških molekula u fiziološkim uvjetima te u staničnim procesima.²¹

Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS) metoda je kojom se određuje veličina i distribucija veličine čestica. Temelji se na difrakciji najčešće monokromatske, laserske svjetlosti koja difraktira prilikom nailaska na čestice u otopini. Intenzitet difrakcije promjenjiv je zbog neprestanog gibanja čestica u otopini. Difraktirana svjetlost može interferirati konstruktivno ili destruktivno. Detektor očitava promjene u intenzitetu i amplitudi tijekom vremena.⁴⁰ DLS se koristi u određivanju veličine distribucije liposoma.²¹ Analiza liposoma DLS tehnikom može se opisati Gaussovom monomodalnom distribucijom s jednim, širokim, vrškom u rasponu veličine od 20 do 200 nm ili bimodalnom distribucijom s dva uska vrška prvi u rasponu veličine od 30 do 70 nm, a drugi u rasponu veličine od 100 do 200 nm.⁴¹

ζ-potencijal definiran je kao potencijal koji se nalazi na površini makromolekule i adsorbiranih molekula iz otopine.⁴² Mjerenjem elektroforetske pokretljivosti (elektrokinetike) određuje se ζ-potencijal.²¹ Elektroforetska pokretljivost mjeri se na način da se napravi elektroforeza, otopina koja se nalazi između dvije elektrode u električnom polju. potencijal korelira sa stabilnosti liposomskih čestica – čestice manjeg ζ-potencijala nastoje stvarati agregate.²¹ ζ-potencijal pozitivno nabijenih liposoma iznad 25mV, a negativno nabijenih liposoma ispod -25mV ukazuje na visoku stabilnost kolodinih čestica.⁴³

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) metoda je kojom se, indirektno, može odrediti kvaliteta pripreme liposoma te imati uvid u moguća onečišćenja uzorka prateći promjenu temperatura prijelaza, širinu pikova te povećan broj prijelaza koji može odgovarati onečišćenju. Rezultat analize DSC-om jest termogram iz kojeg se mogu izračunati temperature prijelaza (T_m), promjena entalpije prijelaza (ΔH) i promjena entropije prijelaza (ΔS). Dobiveni termogrami razlikuju se kod multilamelarnih liposoma i jednostavnih malih unilamelarnih vezikula. Termogram kod multilamelarnih liposoma ima uže „pikove“, a temperature prijelaza su više. Studije pokazuju kako temperatura prijelaza ovisi o veličini liposoma. Analizom liposoma s pripravkom lijeka, dobivaju se različite krivulje od analize čistih liposoma. DSC u tom slučaju može u ponovljenim eksperimentima služiti kao metoda provjere reproducibilnosti usporedbom više pripravaka napravljenih istom tehnikom te kao metoda za provjeru stabilnosti usporedbom analize istog pripravka u različitim vremenskim razdobljima.⁴⁴

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) metoda je koja, kod liposomskih formulacija, služi za određivanje enkapsulacijske efikasnosti.²¹ HPLC je analitička metoda koja se temelji na prolasku uzorka nošenog mobilnom fazom, pod određenim tlakom, kroz kolonu u kojoj se nalazi stacionarna faza što dovodi do odvajanja analita na temelju razlike u adsorpciji. Detektori na HPLC-u detektiraju i kvantificiraju analit.⁴⁵ Prilikom određivanja enkapsulacijske efikasnosti u liposomskim formulacijama, potrebno je prethodno ukloniti neuklopljene molekule što se može učiniti gel-filtracijskom kromatografijom²¹, a naknadno se liziraju liposomi kako bi se pomoću HPLC-a mjerio odziv detektora za željenu molekulu.^{7,46,47} Formula za izračun enkapsulacijske efikasnosti (EE) prikazana je jednadžbom (Eq 1).⁴⁷

$$EE = \frac{m(vankomicin)_{lipo}}{m(vankomicin)_0}$$

(Eq. 1)

$m(vankomicin)_{lipo}$ - masa vankomicina iz liposoma

$m(vankomicin)_0$ – početna masa vankomicina

§ 3. MATERIJALI I METODE

Tvari korištene u eksperimentima: kolesterol (3 β -hidroksi-5-kolesten) čistoće >99%, 10x koncentrat fosfatnog pufera (PBS) *pH* 7,4 i Spehadex G-50 nabavljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich (SAD), kloroform je nabavljen od tvrtke Lach-Ner (Češka), vankomicin hidroklorid nabavljen je od tvrtke Xellia (Zagreb), metanol i acetonitril nabavljeni su od tvrtke Thermo Fisher Scientific (SAD) te Lipoid S-100.

Korišteni instrumenti: Agilent 1100 HPLC, XTERRA® 4,6x250 nm kolona za HPLC, TA DSC 25, *Brookhaven 90 Plus Particle Size Analyzer*, *Brookhaven Instruments Corporation* (DLS), *ZetaPlus*, *Brookhaven Instruments Corporation* (elektrokientika), MultiMode 8 (*Bruker*) (AFM).

3.1. Priprava liposoma s vankomicinom metodom film hidratacije

3.1.1. Inkluzijski eksperiment 001

Smjesa 440,0 mg lipida i 73,5 mg kolesterola (omjer 3:1) otopljena je u 20 mL kloroforma. Korištenjem rotacijskog uparivača pri temperaturi vodene kupelji od 60°C i tlaka od oko 250 mbar uklonjen je višak otapala (i stvoren film s malo mjehurića). Smjesa se ostavi u vakuum eksikatoru 24 h pri sobnoj temperaturi. 148,6 mg vankomicin hidroklorida otopi se u 28,6 mL fosfatnog pufera PBS-a (*pH*=7,4). Film lipida i otopina vankomicina zagriju se na 40°C te pomješaju. Smjesa se ostavi na tresilici 60 minuta pri temperaturi od 40°C i 35 rpm okretaja. Smjesa je podijeljena u dva dijela – S i E. Dio S podvrgnut je sonikaciji pomoću sonikatora (5+25%), u pet ciklusa od 90 s sa 60 s između pojedinih ciklusa. Dio E podvrgnut je ekstruderu, uređaju koji se sastoji od dvije šprice, a između je polikarbonatna membrana različite veličine pora kako bi se dobili unilamelarni liposomi. 1mL uzorka liposoma propušten 13 puta kroz polikarbonatnu membranu ekstrudera od 800 nm (Ea), od toga je uzeto 0,5 mL te je propušteno 11 puta kroz polikarbonatnu membranu od 400 nm (Eb), a od toga je uzeto 0,25 mL te je propušteno kroz polikarbonatnu membranu od 200 nm (Ec).

3.1.2. *Inkluzijski eksperiment 002*

Smjesa 434,6 mg lipida i 70,0 mg kolesterola (omjer 3:1) otopljena je u 20 mL kloroforma. Korištenjem rotacijskog uparivača pri temperaturi vodene kupelji od 40°C i tlaka od oko 250 mbar pri 100 rpm uklonjen je višak otapala. Kada je otapalo uklonjeno skoro do kraja, poveća se rotacija na 270 rpm u trajanju 1 minute kako bi se stvorio homogeni film. Zatim se uključi vakuum do tlaka 5 mbar u trajanju 8 minuta na 150 rpm. Smjesa se ostavi u vakuum eksikatoru 24 h pri sobnoj temperaturi. 160,7 mg vankomicin hidroklorida otopi se u 28,6 mL fosfatnog pufera PBS-a ($pH=7,4$). Film lipida i otopina vankomicina zagriju se na 40°C te pomješaju. Smjesa se ostavi na tersilici 60 minuta pri temperaturi od 40°C i 4 rpm. Smjesa je podijeljena je podvrgnuta sonikaciji pomoću sonikatora na snazi (5+25%), u pet ciklusa od 90 s sa 60 s između pojedinih ciklusa.

3.1.3. *Inkluzijski eksperiment 003*

Smjesa 428,5 mg lipida i 77 mg kolesterola (omjer 3:1) otopljena je u 20 mL kloroforma. Korištenjem rotacijskog uparivača pri temperaturi vodene kupelji od 40°C i tlaka od oko 250 mbar pri 100 rpm uklonjen je višak otapala. Kada je otapalo uklonjeno skoro do kraja, poveća se rotacija na 250 rpm u trajanju oko 1 minute kako bi se stvorio homogeni film. Zatim se uključi vakuum do tlaka 6 mbar u trajanju 10 minuta na 100 rpm. Smjesa se ostavi u vakuum eksikatoru 19 h pri sobnoj temperaturi. Film lipida i 28,6 mL fosfatnog pufera PBS-a ($pH=7,4$) zagriju se na 40°C te pomješaju. Smjesa se ostavi na tersilici 60 minuta pri temperaturi od 40°C i 4 rpm. Smjesa se podijeli na S i E. Dio S podvrgnut je sonikaciji pomoću sonikatora (5+25%) u pet ciklusa od 90 s sa 60 s između pojedinih ciklusa. Dio E podvrgnut je ekstruderu te je ukupno 12 mL u serijama po 1 mL propušteno 13 puta kroz polikarbonatnu membranu od 800 nm (Ea), 11 puta kroz polikarbonatnu membranu od 400 nm (Eb) te kroz polikarbonatnu membranu od 200 nm (Ec).

3.1.4. *Inkluzijski eksperiment 004*

Smjesa 432,4 mg lipida i 76 mg kolesterola (omjer 3:1) otopljena je u 20 mL kloroforma. Korištenjem rotacijskog uparivača pri temperaturi vodene kupelji od 40°C i tlaka od oko 250 mbar pri 100 rpm uklonjen je višak otapala. Kada je otapalo uklonjeno skoro do kraja, poveća se rotacija na 250 rpm u trajanju nekoliko minuta kako bi se stvorio homogeni film. Zatim se

uključi vakuum do tlaka 6 mbar u trajanju 10 minuta na 250 rpm. Smjesa se ostavi u vakuum eksikatoru 19 h pri sobnoj temperaturi. 153,2 mg vankomicin hidroklorida otopi se u 28,6 mL fosfatnog pufera PBS-a ($pH=7,4$). Film lipida i otopina vankomicina zagriju se na 40°C te pomješaju. Smjesa se ostavi na tersilici 60 minuta pri temperaturi od 40°C i 4 rpm.

Smjesa se podijeli na S i E. Dio S podvrgnut je sonikaciji pomoću sonikatora (5+25%), u pet ciklusa od 90 s sa 60 s između pojedinih ciklusa. Dio E podvrgnut je ekstruderu te je ukupno 12 mL u serijama po 1 mL propušteno 13 puta kroz polikarbonatnu membranu od 800 nm (Ea), 11 puta kroz polikarbonatnu membranu od 400 nm (Eb) te kroz polikarbonatnu membranu od 200 nm (Ec).

3.1.5. *Inkluzijski eksperiment 005*

Smjesa 448,4 mg lipida i 73 mg kolesterola (omjer 3:1) otopljena je u 20 mL kloroforma. Korištenjem rotacijskog uparivača pri temperaturi vodene kupelji od 40°C i tlaka od oko 250 mbar pri 100 rpm uklonjen je višak otapala. Kada je otapalo uklonjeno skoro do kraja, poveća se rotacija na 250 rpm u trajanju nekoliko minuta kako bi se stvorio homogeni film. Zatim se uključi vakuum do tlaka 6 mbar u trajanju 10 minuta na 250 rpm. Smjesa se ostavi u vakuum eksikatoru oko 24 h pri sobnoj temperaturi. 152,6 mg vankomicin hidroklorida otopi se u 28,6 mL fosfatnog pufera PBS-a ($pH=7,4$). Film lipida i otopina vankomicina zagriju se na 40°C te pomješaju. Smjesa se ostavi na tersilici 60 minuta pri temperaturi od 40°C i 4 rpm.

Smjesa je je podvrgnuta sonikaciji pomoću sonikatora na snazi (5+25%), u pet ciklusa od 90 s sa 60 s između ciklusa.

3.1.6. *Inkluzijski eksperiment 009*

Smjesa 455,4 mg lipida i 78,5 mg kolesterola (omjer 3:1) otopljena je u 20 mL kloroforma. Korištenjem rotacijskog uparivača pri temperaturi vodene kupelji od 40°C i tlaka od oko 250 mbar pri 150 rpm uklonjen je višak otapala. Kada je otapalo uklonjeno skoro do kraja, poveća se rotacija na 270 rpm u trajanju nekoliko minuta kako bi se stvorio homogeni film. Zatim se uključi vakuum do tlaka 6 mbar u trajanju 10 minuta na 150 rpm. Smjesa se ostavi u vakuum eksikatoru oko 72 h pri sobnoj temperaturi. 143,5 mg vankomicin hidroklorida otopi se u 28,6 mL fosfatnog pufera PBS-a ($pH=7,4$). Film lipida i otopina vankomicina zagriju se na 40°C te pomješaju. Smjesa se ostavi na tersilici 60 minuta pri temperaturi od 40°C i 4 rpm.

Smjesa je je podvrgnuta sonikaciji pomoću sonikatora na snazi (5+25%), u pet ciklusa od 90 s sa 60 s između ciklusa.

3.2. Priprava liposoma s vankomicinom metodom smrzavanja

3.2.1. Inkluzijski eksperiment 006

Smjesa 455,5 mg lipida i 77,5 mg kolesterola (omjer 3:1) otopljena je u 20 mL kloroforma. Korištenjem rotacijskog uparivača pri temperaturi vodene kupelji od 50°C i tlaka od oko 170 mbar pri 150 rpm uklonjen je višak otapala. Kada je otapalo uklonjeno skoro do kraja, poveća se rotacija na 270 rpm u trajanju od oko minute kako bi se stvorio homogeni film. Zatim se uključi vakuum do tlaka 9 mbar u trajanju 2-3 minute na 150 rpm. Smjesa se ostavi u vakuum eksikatoru 48 h pri sobnoj temperaturi. 142,8 mg vankomicin hidroklorida otopi se u 28,6 mL fosfatnog pufera PBS-a ($pH=7,4$). Film lipida i otopina vankomicina zagriju se na 40°C te pomješaju. Smjesa se ostavi na tersilici 60 minuta pri temperaturi od 40°C i 4 rpm. Dobivena smjesa povrdgne se dvama ciklusima smrzavanja i hlađenja – hlađenje u tekućem dušiku tijekom razdoblja od 10 minuta, a zatim grijanje u vodenoj kupelji na 65°C u tajanju od 5 minuta. Smjesa je je podvrgnuta sonikaciji pomoću sonikatora na snazi (5 +25%), u jednom ciklusu od 60s.

3.2.2. Inkluzijski eksperiment 007

Smjesa 454,0 mg lipida i 76,2 mg kolesterola (omjer 3:1) otopljena je u 20 mL kloroforma. Korištenjem rotacijskog uparivača pri temperaturi vodene kupelji od 40°C i tlaka od oko 185 mbar pri 150 rpm uklonjen je višak otapala. Kada je otapalo uklonjeno skoro do kraja, poveća se rotacija na 270 rpm u trajanju od oko minute kako bi se stvorio homogeni film. Zatim se uključi vakuum do tlaka 7 mbar u trajanju 2-3 minute na 150 rpm. Smjesa se ostavi u vakuum eksikatoru 48 h pri sobnoj temperaturi.

144,1 mg vankomicin hidroklorida otopi se u 28,6 mL fosfatnog pufera PBS-a ($pH=7,4$). Film lipida i otopina vankomicina zagriju se na 40°C te pomješaju. Smjesa se ostavi na tersilici 60 minuta pri temperaturi od 40°C i 4 rpm. Dobivena smjesa povrdgne se dvama ciklusima smrzavanja i hlađenja – hlađenje u tekućem dušiku tijekom razdoblja od 5 minuta, a zatim

grijanje u vodenoj kupelji na 65°C u tajanju od 10 minuta. Smjesa je je podvrgnuta sonikaciji pomoću sonikatora na snazi (5+25%), u pet ciklusa od 90 s sa 60 s između ciklusa.

3.2.3. *Inkluzijski eksperiment 008*

Smjesa 453,7 mg lipida i 76,7 mg kolesterola (omjer 3:1) otopljena je u 20 mL kloroforma. Korištenjem rotacijskog uparivača pri temperaturi vodene kupelji od 40°C i tlaka od oko 185 mbar pri 150 rpm uklonjen je višak otapala. Kada je otapalo uklonjeno skoro do kraja, poveća se rotacija na 270 rpm u trajanju od oko minute kako bi se stvorio homogeni film. Zatim se uključi vakuum do tlaka 7 mbar u trajanju 2-3 minute na 150 rpm. Smjesa se ostavi u vakuum eksikatoru 48 h pri sobnoj temperaturi.

142,9 mg vankomicin hidroklorida otopi se u 28,6 mL fosfatnog pufera PBS-a ($pH=7,4$). Film lipida i otopina vankomicina zagriju se na 40°C te pomješaju. Smjesa se ostavi na tersilici 60 minuta pri temperaturi od 40°C i 4 rpm. Smjesa je je podvrgnuta sonikaciji pomoću sonikatora na snazi (5+25%), u 5 ciklusa od 90 s sa 60 s između ciklusa. Dobivena smjesa povrdgne se dvama ciklusima smrzavanja i hlađenja – hlađenje u tekućem dušiku tijekom razdoblja od 5 minuta, a zatim grijanje u vodenoj kupelji na 65°C u tajanju od 10 minuta.

3.2.4. *Inkluzijski eksperiment 010*

Smjesa 451,6 mg lipida i 77,4 mg kolesterola (omjer 3:1) otopljena je u 20 mL kloroforma. Korištenjem rotacijskog uparivača pri temperaturi vodene kupelji od 40°C i tlaka od oko 185 mbar pri 150 rpm uklonjen je višak otapala. Kada je otapalo uklonjeno skoro do kraja, poveća se rotacija na 270 rpm u trajanju od oko minute kako bi se stvorio homogeni film. Zatim se uključi vakuum do tlaka 7 mbar u trajanju 2-3 minute na 150 rpm. Smjesa se ostavi u vakuum eksikatoru 72 h pri sobnoj temperaturi. 143,9 mg vankomicin hidroklorida otopi se u 28,6 mL fosfatnog pufera PBS-a ($pH=7,4$). Film lipida i otopina vankomicina zagriju se na 40°C te pomješaju. Smjesa se ostavi na tersilici 60 minuta pri temperaturi od 40°C i 4 rpm. Dobivena smjesa povrdgne se dvama ciklusima smrzavanja i hlađenja – hlađenje u tekućem dušiku tijekom razdoblja od 5 minuta, a zatim grijanje u vodenoj kupelji na 65°C u tajanju od 10 minuta. Smjesa je je podvrgnuta sonikaciji pomoću sonikatora na snazi (5+25%), u pet ciklusa od 90 s sa 60 s između ciklusa.

3.2.5. *Inkluzijski eksperiment 011*

Smjesa 447,7 mg lipida i 78,7 mg kolesterola (omjer 3:1) otopljena je u 20 mL kloroforma. Korištenjem rotacijskog uparivača pri temperaturi vodene kupelji od 40°C i tlaka od oko 100 mbar pri 150 rpm uklonjen je višak otapala. Kada je otapalo uklonjeno skoro do kraja, poveća se rotacija na 270 rpm u trajanju od oko minute kako bi se stvorio homogeni film. Zatim se uključi vakuum do tlaka 7 mbar u trajanju 2-3 minute na 150 rpm. Smjesa se ostavi u vakuum eksikatoru 72 h pri sobnoj temperaturi. Film lipida i 28,6 mL fosfatnog pufera PBS-a ($pH=7,4$) zagriju se na 40°C te pomješaju. Smjesa se ostavi na tersilici 60 minuta pri temperaturi od 40°C i 4 rpm. Dobivena smjesa povrdgne se dvama ciklusima smrzavanja i hlađenja – hlađenje u tekućem dušiku tijekom razdoblja od 5 minuta, a zatim grijanje u vodenoj kupelji na 65°C u tajanju od 10 minuta. Smjesa je je podvrgnuta sonikaciji pomoću sonikatora na snazi (5+25%), u pet ciklusa od 90 s s 60 s između ciklusa.

3.3. Karakterizacija liposoma

3.3.1. Optička mikroskopija

Predmetno i pokrovno staklo prebrisani su 96% etanolom i osušeni prije upotrebe. Uzorci su bez razrjeđenja nanoseni kapalicom u volumenu jedne kapi na predmetno staklo koje je zatim pokriveno pokrovnim stakalcem. Optička mikroskopija izvodila se pri povećanjima od 40X, 100X i 400X.

3.3.2. Mikroskopija atomskih sila (AFM)

Uzorak liposoma volumena 5 μL nanosen je na supstrat tinjca. Nakon sušenja na sobnoj temperaturi, uzorak je analiziran mikroskopijom atomskih sila. Mjerenja su provedena na uređaju MultiMode 8 (*Bruker*) pomoću piezoelektričnog skenera s rasponom skeniranja u xy -smjeru od $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ i u z -smjeru od $2,5 \mu\text{m}$. Mjerenja su provedena na zraku pri sobnoj temperaturi i vlažnosti od 40–50%, u dinamičkom tapkajućem načinu rada sa sondama izrađenim od silicija (*Bruker*, NCHV-A, nominalna frekvencija 320 kHz, nominalna konstanta opruge 40 N/m). Mjerenja su provedena pri brzinama skeniranja između 1–2 Hz uz razlučivost skeniranja od 256 uzoraka po retku. Obrada i analiza slika izvršene su pomoću softvera NanoScope Analysis 2.0 (*Bruker*).

3.3.3. Dinamičko rasporšenje svjetlosti (DLS)

Uzorak liposoma volumena 2,0 mL otpipetira se u plastičnu kivetu. Mjerenja su izvedena na instrumentu *Brookhaven 90 Plus Particle Size Analyzer*, *Brookhaven Instruments Corporation* pri temperaturi od 25 °C, uz indeks loma $n = 1,6$, valnu duljinu laserskog zračenja od 659 nm te kut raspršenja od 90° u odnosu na upadno zračenje.

3.3.4. Elektrokinetika

Uzorci za mjerenje ζ -potencijala elektrokinetikom priređeni su razrjeđivanjem s 1xPBS-om u omjeru 1:4 (500 μ L uzorka i 1500 μ L 1xPBS-a). Mjerenja su izvedena na instrumentu *ZetaPlus*, *Brookhaven Instruments Corporation* pri temperaturi od 25 °C uz valnu duljina laserskog zračenja od 660 nm.

3.3.5. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija izvedena je na instrumentu TA DSC 25. Mjerenje se izvodi u dinamičkoj atmosferi dušika s protokom od 50 mL/min. Volumen uzorka suspenzije liposoma od 20 μ L mjeren je u Tzero aluminijskim posudicama. Raspon temperatura prilikom mjerenja je između -40°C i 80°C. Kako bi se istražila dinamika procesa, mjereno je uz brzin zagrijavanja od 2 °C/min do 40 °C/min. Prije izvođenja analize, uzorci su nekoliko dana smješteni na temperaturi između 4°C i 8°C i homogenizirani.

3.3.6. Gel-filtracijska kromatografija

Pripravljen liposomi s enkapsuliranim vankomicinom odijeljuju se od otopljenog vankomicina u otopini gel-filtracijskom kromatografijom. Gel-filtracijska kromatografija izvodi se u koloni prikazanoj na Slici 6., punjenoj Sephadexom-G50 otopljenim u puferu 1xPBS-u pri različitim *pH* vrijednostima (7,4; 7,0; 5,5).



Slika 6. Fotografija kolone korištene za gel-filtracijsku kromatografiju punjenu Sephadexom-G50

Na vrh kolone doda se 0,5 mL uzorka smjese liposoma s vankomicinom, dok se u drugim eksperimentima dodaje 0,5 mL otopljenog vankomicina s plavim dekstranom ($\gamma(\text{vankomicina}) \approx 6 \text{ mg/mL}$ volumena 1 mL u koji je dodano $150 \mu\text{L}$ plavog dekstrana). Kada smjesa uđe u kolonu, eluira se 1xPBS-om ($\text{pH}=7,4; 7,0; 5,5$) i sakupljaju eluati od 1 mL kod uzorka liposoma, a 1,5 mL kod otopljenog vankomicina.

3.3.7. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Priprema uzorka volumena 1 mL prije analize HPLC-om zahtjeva lizu liposoma koja se izvodi dodatkom 1 mL 0,6% Tritona X-100.

Tekućinska kromatografija visoke performanse koristi mobilnu fazu A i B. Sastav mobilnih faza ukupnog volumena 1000 mL prikazan je u Tablici 2.

Tablica 2. Sastav mobilnih faza A i B ukupnog volumena 1000 mL korištenih za HPLC analizu vankomicina

Naziv tvari	V / mL	
	Mobilna faza A	Mobilna faza B
Fosfatni pufer*	910	840
Acetonitril	50	80
Metanol	40	80

*Fosfatni pufer volumena 2000 mL pripremljen je otapanjem 1,74 g natrijevog hidrogenfosfata (Na_2HPO_4) i 13,69 g natrijevog dihidrogenfosfata dihidrata ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) u 2 L redestilirane vode. *pH* pufera korigiran je dodatkom NaOH ili HCl potenciometrijskom titracijom na *pH*=7,4.

Prilikom analize HPLC-om, mikroinjektira se 20 μL uzorka. Protok iznosi 1,5 mL/min, maksimalan tlak iznosi 400 bara, temperatura kolone je 22,0°C, a vrijeme analize jednog uzorka traje 35 minuta. Valne duljine pri kojima je praćena analiza su 210 nm i 280 nm.

Režim eluiranja je prikazan u Tablici 3.

Tablica 3. Metoda graduacije mobilnih faza u vremenu

Vrijeme / min	Mobilna faza A	Mobilna faza B
0	100%	0%
2	0%	100%
11	0%	100%
25	100%	0%
30	100%	0%
35	0%	0%

Pripremljeni su standardne otopine u odmjernim tikvicama, ukupnog volumena 10 mL, pomoću kojih je napravljen baždarni pravac. Od 10 mL automatskom pipetom otpipetira se 1,5 mL u vijalu za HPLC analizu. U Tablici 4. prikazane su masene koncentracije vankomicina u standardnim otopinama.

Tablica 4. Masene koncentracije vankomicina u standardnim otopinama.

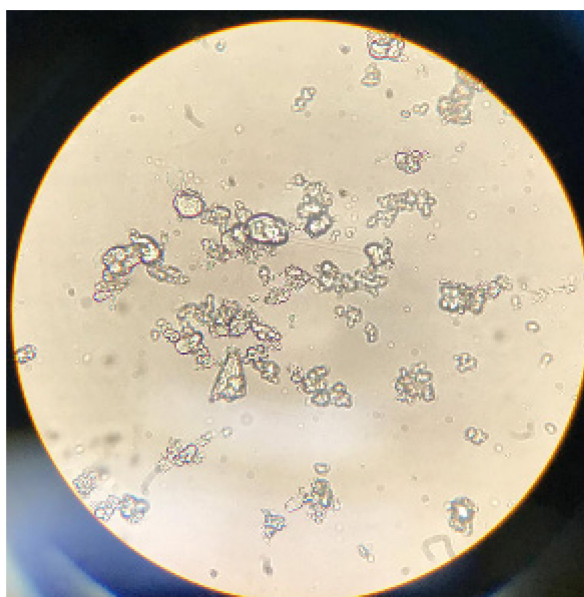
Standard	γ / mg/mL
1	$7,37 \cdot 10^{-4}$
2	$1,00 \cdot 10^{-3}$
3	$1,05 \cdot 10^{-3}$
4	$2,93 \cdot 10^{-3}$
5	$5,70 \cdot 10^{-3}$
6	$8,97 \cdot 10^{-3}$
7	$9,14 \cdot 10^{-3}$
8	$5,66 \cdot 10^{-2}$
9	$5,69 \cdot 10^{-2}$
10	$8,90 \cdot 10^{-2}$

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

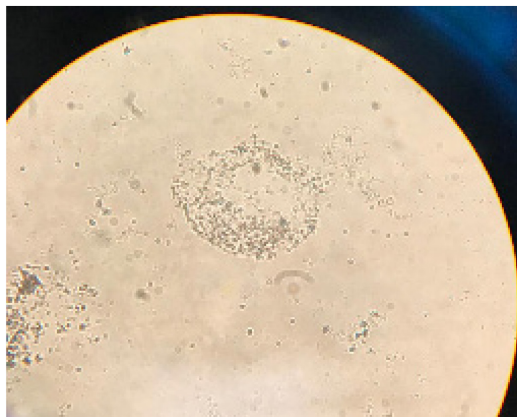
4.1. Karakterizacija liposoma s vankomicinom pripravljeni metodom film hidratacije

4.1.1. Optička mikroskopija

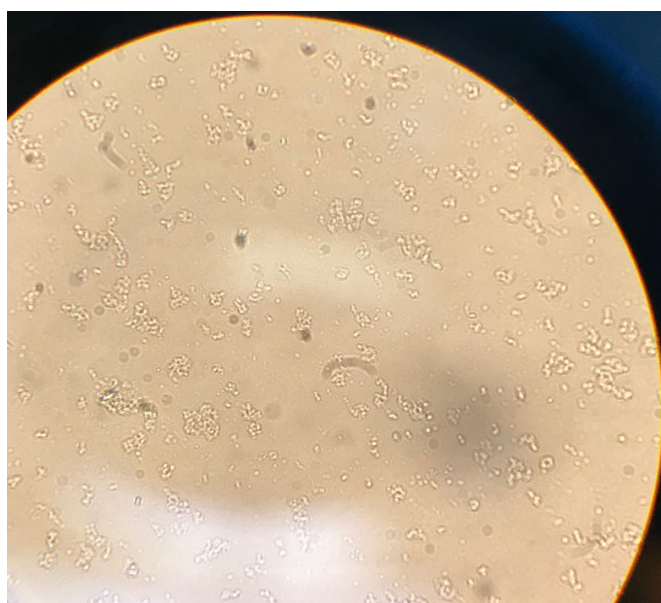
Na slikama 7., 8. i 9. prikazane su fotografije dobivenih liposoma s uklopljenim vankomicinom pri povećanju od 400X na svjetlosnom mikroskopu u različitim fazama inkluzijskog eksperimenta 001 nakon hidratacije, zatim nakon sonikacije ili ekstruzije. Na svim fotografijama prikazane su sferične strukture različitih veličina koje predstavljaju liposome.



Slika 7. Liposomi s uklopljenim vankomicinom inkluzijskog eksperimenta 001 nakon hidratacije prikazani optičkim mikroskopom pri povećanju od 400X.

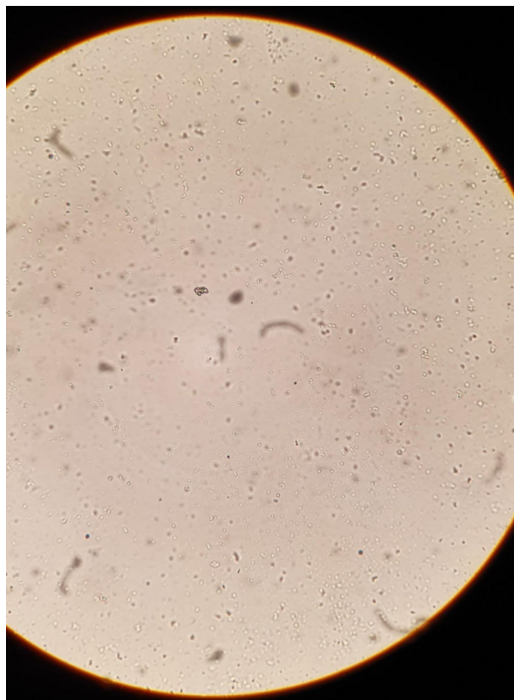


Slika 8. Liposomi s uklopljenim vankomicinom inkluzijskog eksperimenta 001 nakon sonikacije prikazani optičkim mikroskopom pri povećanju od 400X.

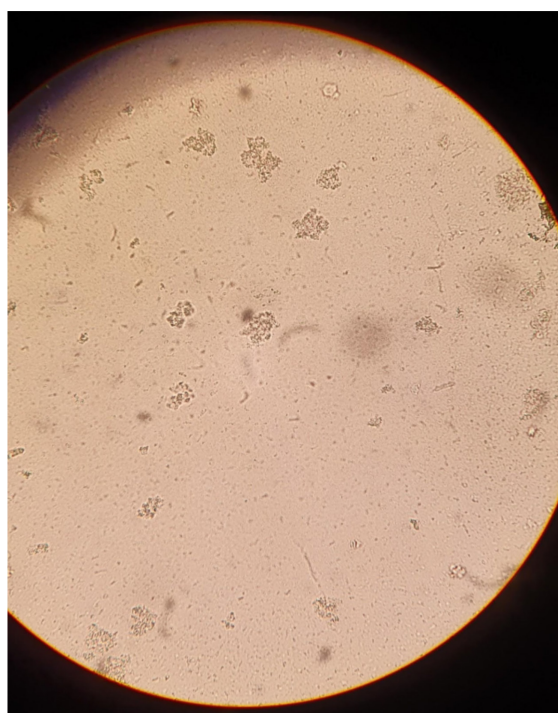


Slika 9. Liposomi s uklopljenim vankomicinom inkluzijskog eksperimenta 001 nakon ekstruzije kroz polikarbonatnu membranu od 200 nm prikazani optičkim mikroskopom pri povećanju od 400X.

Na slikama 10. i 11. prikazane su fotografije praznih liposoma inkluzijskog eksperimenta 003 (bez uklopljenog vankomicina) nakon sonikacije te nakon ekstruzije pri povećanju od 400X. Uočavaju se sferne nakupine koje odgovaraju liposomima. Optičkom mikroskopijom ne nalazi se značajna i objektivna razlika između praznih liposoma i liposoma s uklopljenim vankomicinom, već se potvrđuje stvaranje liposoma.



Slika 10. Prazni liposomi inkluzijskog eksperimenta 003 nakon sonikacije prikazani optičkim mikroskopom pri povećanju od 400X.

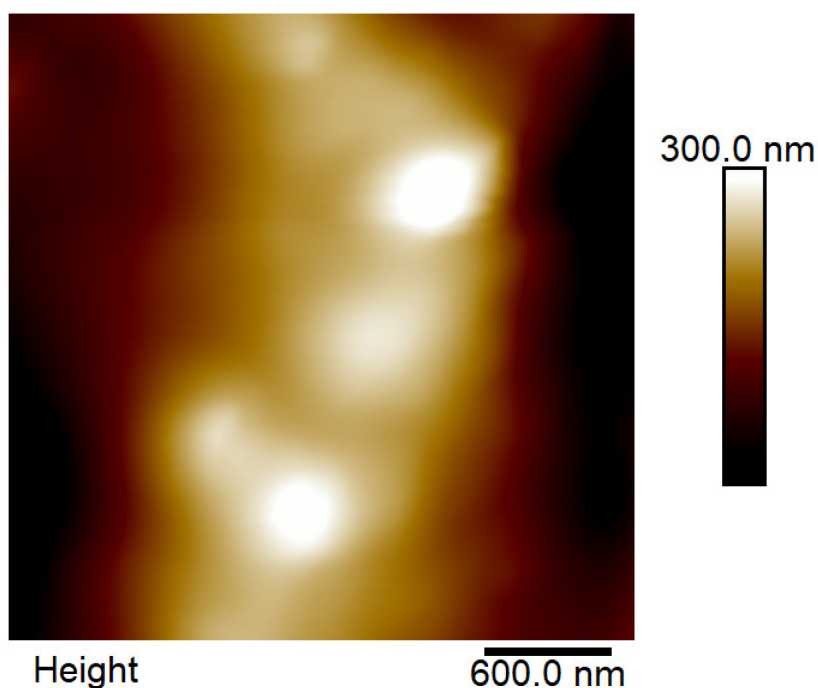


Slika 11. Prazni liposomi inkluzijskog eksperimenta 003 nakon ekstruzije kroz polikarbonatnu membranu od 200 nm prikazani optičkim mikroskopom pri povećanju od 400X.

4.1.2. Mikroskopija atomskih sila (AFM)

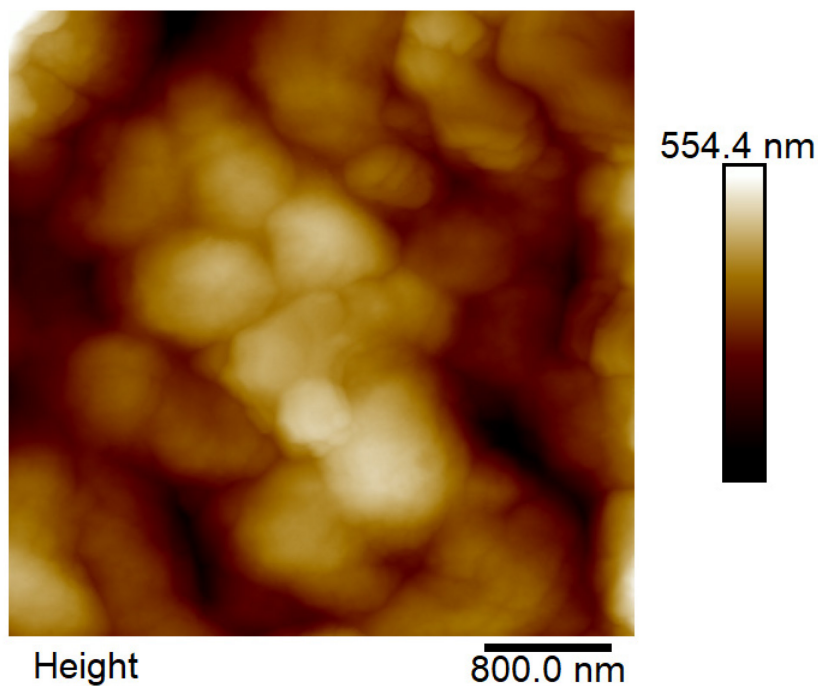
Na Slikama 12. i 13. prikazani su rezultati mikroskopije atomskih sila liposoma inkluzijskog eksperimenta 003S (prazni liposomi) te 004S (liposomi s uklopljenim vankomicinom) nakon sonikacije. Uzorci liposoma inkluzijskog eksperimenta 003E i 004E nakon provedene ekstruzije nisu upotrebljivi za analizu mikroskopijom atomskih sila zbog taloženja.

Na Slici 12. vidljive su sfere praznih liposoma nakon sonikacije (003S) veličine oko 200 nm. Elipsoidni oblik liposoma moguć je zbog interakcije liposoma s površinom.



Slika 12. Prikaz praznih liposoma iz inkluzijskog eksperimenta 003 nakon sonikacije metodom mikroskopije atomskih sila (AFM)

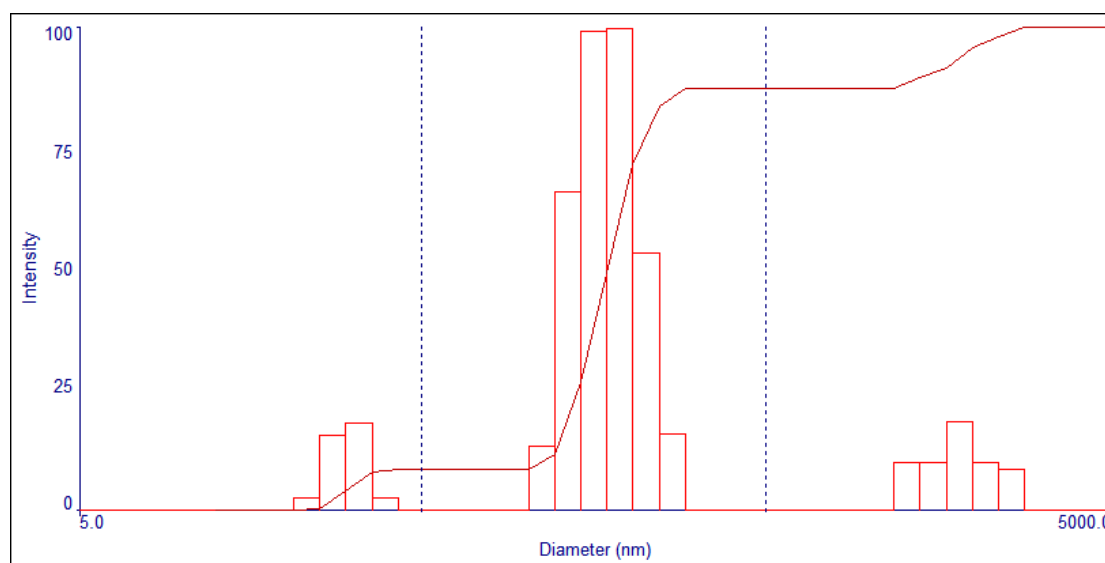
Liposomi s uklopljenim vankomicinom nakon sonikacije (004S) na AFM-u prikazani su kao agregati. Rezultat odgovara podatku da imaju niži ζ -potencijal od praznih liposoma te su podložniji agregaciji (to će se dodatno objasniti u poglavlju Rezultati elektrokinetike).



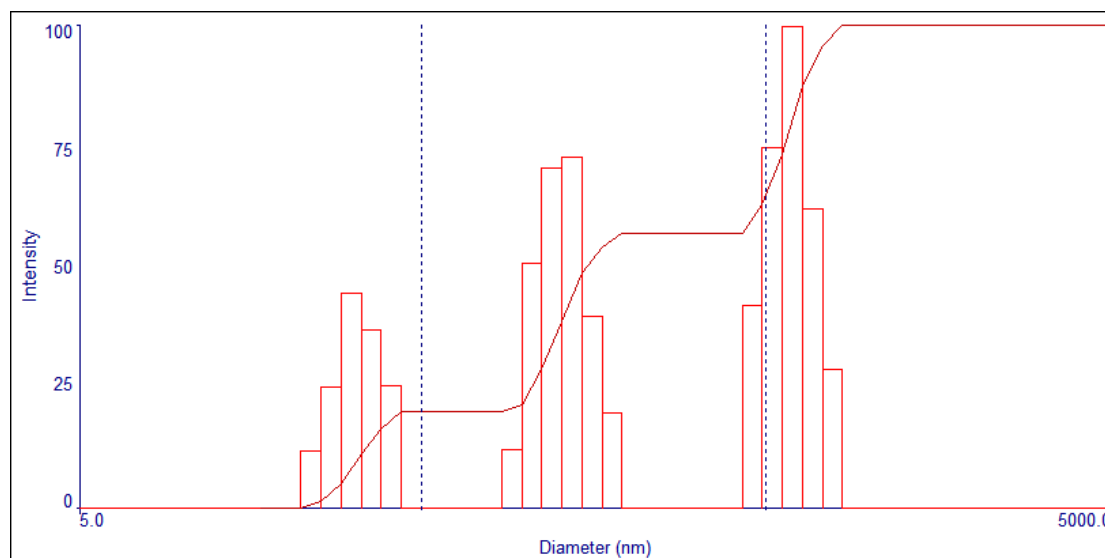
Slika 13. Prikaz liposoma iz inkluzijskog eksperimenta 004 nakon sonikacije metodom mikroskopije atomskih sila (AFM)

4.1.3. Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS)

Na Slikama 14. i 15. prikazane su raspodjele veličine praznih liposoma inkluzijskog eksperimenta 003 nakon sonikacije (003S) i nakon ekstruzije (003E) prema intenzitetu. Na oba prikaza vidljiva su tri područja raspodjele liposoma prema dijametru. Srednja vrijednost dijametra liposoma 003S iznosi $146,6 \pm 3,4$ nm (medijan vrijednosti svakog od tri područja prikazanih na Slici 14. iznosi 32,42 nm, 186,10 nm, 1804,67 nm), dok srednja vrijednost dijametra praznih liposoma nakon ekstruzije (003E) iznosi $158,3 \pm 10,1$ nm (medijan vrijednosti svakog od tri područja prikazanih na Slici 15. iznosi 30,80 nm, 135,00 nm, 591,67 nm). Iz navedenog prikaza, vidljivo je kako liposomi nakon ekstruzije imaju manji raspon veličina, no postoje tri područja raspodjele koji su gotovo istog intenziteta, dok je kod praznih liposoma nakon sonikacije veći raspon veličina liposoma, no intenzitet je najveći za područje raspodjele s medijanom 186,10 nm, dok su intenziteti za druga dva područja gotovo četiri puta manja.

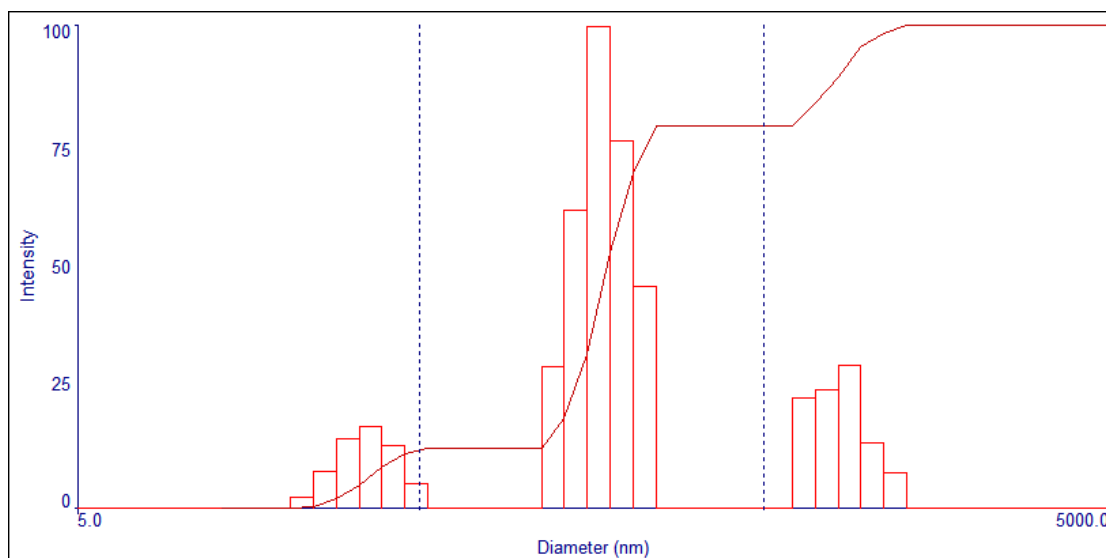


Slika 14. Dijagram prikazuje raspodjelu veličine praznih liposoma inkluzijskog eksperimenta nakon sonikacije (003S) prema intenzitetu.

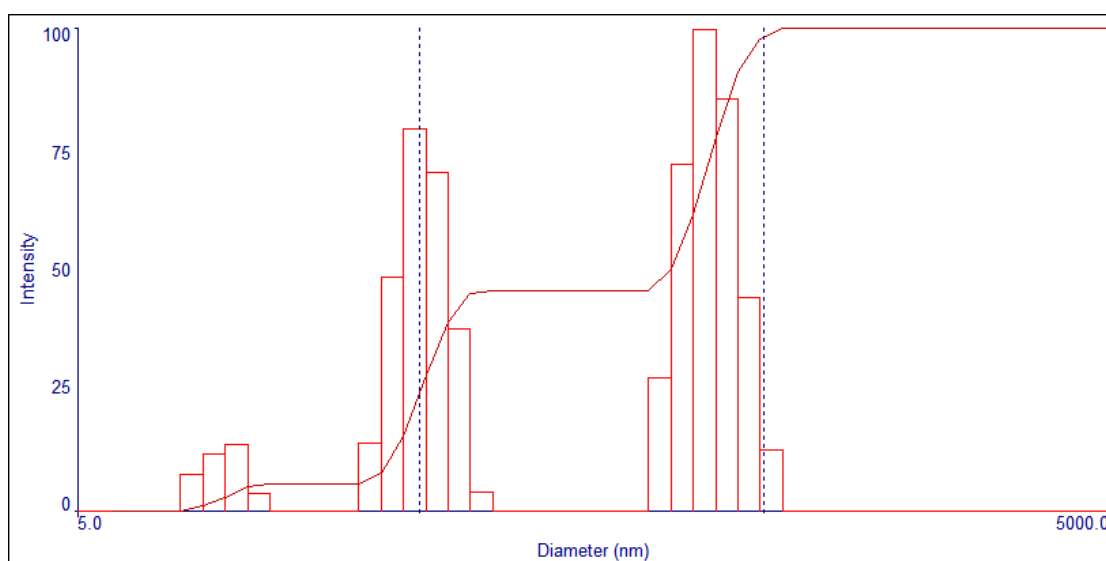


Slika 15. Dijagram prikazuje raspodjelu veličine praznih liposoma inkluzijskog eksperimenta nakon ekstruzije (003E) prema intenzitetu.

Na Slikama 16. i 17. prikazane su raspodjele veličine liposoma s uklopljenim vankomicinom inkluzijskog eksperimenta 004 nakon sonikacije (004S) i nakon ekstruzije (004E) prema intenzitetu. Na oba prikaza vidljiva su tri područja raspodjele liposoma prema dijametru. Srednja vrijednost dijametra liposoma 004S iznosi $160,1 \pm 3,3$ nm (medijan vrijednosti svakog od tri područja prikazanih na Slici 16. iznosi 35,54 nm, 163,68 nm, 878,35 nm), dok srednja vrijednost dijametra liposoma s vankomicinom nakon ekstruzije (004E) iznosi $110 \pm 4,4$ nm (medijan vrijednosti svakog od tri područja prikazanih na Slici 17. iznosi 14,46 nm, 47,73 nm, 332,45 nm). Iz navedenog prikaza, vidljivo je kako liposomi nakon ekstruzije imaju manji raspon veličina, no postoje tri područja raspodjele dijametra liposoma medijana 47,73 nm i 332,45 nm gotovo su istog intenziteta, dok je kod liposoma nakon sonikacije veći raspon veličina liposoma, no intenzitet je najveći za područje raspodjele s medijanom 163,68 nm, dok su intenziteti za druga dva područja gotovo četiri puta manja.



Slika 16. Dijagram prikazuje raspodjelu veličine liposoma s uklopljenim vankomicinom inkluzijskog eksperimenta nakon sonikacije (004S) prema intenzitetu.



Slika 17. Dijagram prikazuje raspodjelu veličine liposoma s uklopljenim vankomicinom inkluzijskog eksperimenta nakon ekstruzije (004E) prema intenzitetu.

Usporedbom dijagrama za prazne liposome (003) i liposoma s uklopljenim vankomicinom (004) vidi se kako je srednja vrijednost veličine liposoma nakon sonikacije veći kod liposoma s uklopljenim vankomicinom, što je očekivano s obzirom da je vankomicin molekula mase oko 1450 Da. Međutim, nakon ekstruzije, prazni liposomi (003E) imaju veću srednju vrijednost dijametara od liposoma s uklopljenim vankomicinom (004E). Kod praznih liposoma i liposoma

s vankomicinom, pokazano je kako nakon ekstruzije u raspodjeli postoji intenzitet gotovo iste veličine za tri područja raspodjele, dok je kod sonikacije raspodjela veličine liposoma s maksimalnim središnjim intenzitetom, a intenziteti druga dva područja raspodjele gotovo su četverostruko manja od središnjeg intenziteta.

4.1.4. Elektrokinetika

Srednja vrijednost ζ -potencijala praznih liposoma nakon sonikacije (inkluzijski eksperiment 003S) iznosi $25,03 \pm 2,56$ mV (raspon od 14 do 33 mV). Srednja vrijednost ζ -potencijala liposoma s uklopljenim vankomicinom nakon sonikacije (inkluzijski eksperiment 004S) iznosi $14,66 \pm 2,66$ mV (raspon od 4 do 25 mV). Rezultati ζ -potencijala govore u prilog činjenici da su prazni liposomi stabilniji i manje skloni agregaciji, dok su liposomi s uklopljenim vankomicinom skloniji agregaciji. Potvrda navedene interpretacije su rezultati mikroskopije atomskih sila (Slika 12. i 13.)

4.1.5. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom dobiveni su termogrami za uzorke praznih liposoma nakon ekstruzije (003E) ili sonikacije (003S), liposoma s vankomicinom nakon ekstruzije (004E) ili sonikacije (004S i 002S). Termogrami su prikazani u Dodatku – Slika D1A. – D5B. U Tablici 5. navedeni su termodinamički parametri poput početne temperature taljenja i kristalizacije te odgovarajuće entalpije. Iz navedenih podataka vidljivo je kako postoji značajna temperaturna razlika u početku taljenja (od -1.89 °C do -3.53 °C) i u entalpijama taljenja (od 200 do 340 J/g), što sugerira da način pripreme liposoma ima značajan utjecaj na termička svojstva liposoma. Navedeni termički prijelaz odgovara termičkom prijelazu otapala. Uočava se da uzorci liposoma nakon sonikacije imaju značajno više entalpije taljenja od ekstrudiranih uzoraka. U uzorku 003S uočava se termički prijelaz pri -20 °C što može biti povezano s lipidima, dok svi ostali uzorci imaju samo termalne prijelaze koji odgovaraju termičkim prijelazima otapala (vode).

Tablica 5. Termodinamički parametri taljenja i kristalizacije nakon DSC analize liposoma

	Početak kristalizacije / °C	Entalpija kristalizacije $\Delta H / \text{J g}^{-1}$	Početak taljenja / °C	Entalpija taljenja $\Delta H / \text{J g}^{-1}$
003E	-16,03	219,69	-2,44	211,81
003S	-15,78	296,49	-3,00	281,11
004E	-19,19	205,95	-3,53	199,97
004S	-17,66	286,50	-3,15	284,53
002S	-20,72	317,38	-1,89	336,21

U drugom dijelu eksperimenta, učinjena je ciklička DSC analiza (Dodatak, Slika D6A.-D10.B) čiji su rezultati prikazani u Tablici 6. U uzorcima 003S i 004S uočava se reverzibilni endotermni prijelaz pri temperaturi od -36°C i -38°C . Može se zaključiti kako ti uzorci imaju pravi prijelaz gel-kristal (lipid). Iako su temperature prijelaza niže od očekivanih za lipide, entalpija prijelaza od otprilike 1 kcal/g je očekivana za lipide. Uzorci 004E i 002S ne pokazuju termalne prijelaze. U uzorku 003 uočavaju se male promjene u nagibu krivulje pri -20°C što bi moglo označavati slabu *glass* tranziciju.

Tablica 6. Vrijednosti entalpije i toplinskog kapaciteta za uzorka liposoma iz termograma dobivenih u cikličkoj diferencijalnoj skenirajućoj kalorimetriji

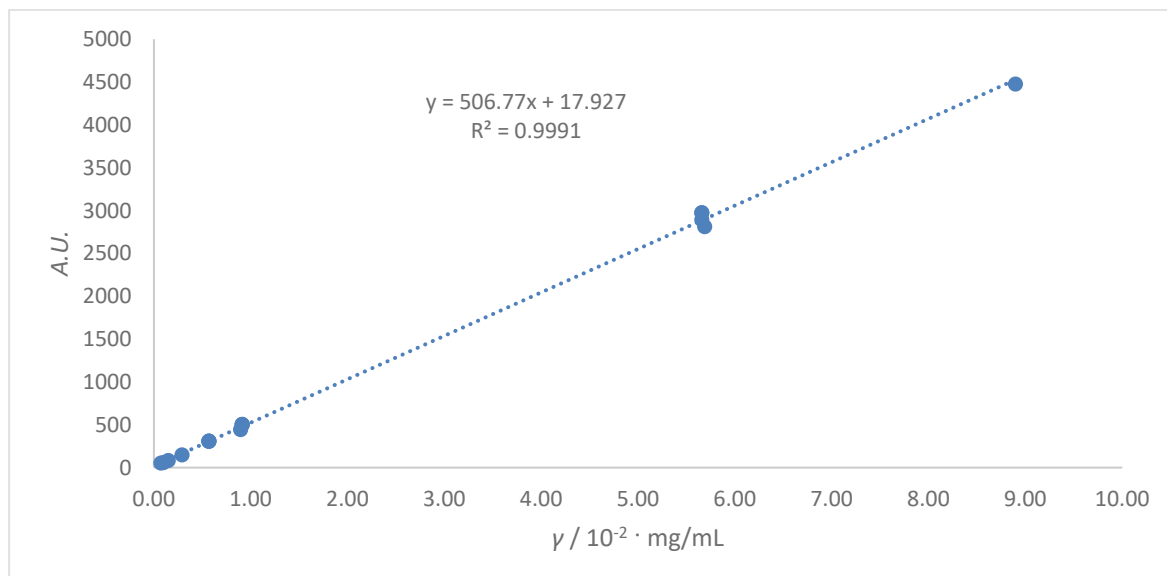
	2 °C/min	5 °C/min	10 °C/min	20 °C/min	40 °C/min	
003E	-	-23,68	-23,32	-20,06	-	$t / ^{\circ}\text{C}$
	-	0,258	0,224	0,254	-	$\Delta C_p / \text{J}/(\text{g } ^{\circ}\text{C})$
003S	Endo vršak -23,08	Endo vršak -22,70	Endo vršak -22,39	Endo vršak -21,82	Endo vršak -20,73	$t / ^{\circ}\text{C}$
	5,97	4,77	4,06	3,47	2,43	$\Delta H / \text{J/g}$
004E	-	-	-	-	-	
004S	Endo vršak -22,99	Endo vršak -22,67	Endo vršak -22,36	Endo vršak -21,84	Endo vršak -20,89	$t / ^{\circ}\text{C}$
	2,70	5,58	4,98	4,34	3,00	$\Delta H / \text{J/g}$
002S	-	-	-	-	-	

4.1.6. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

U Tablici 7. prikazani su rezultati apsorbancije standardnih otopina vankomicina pri 210 nm. Prema navedenim podacima načinjen je baždarni pravac prikazan na Slici 18. R^2 baždarnog pravca iznosi 0,9991 što je zadovoljavajuće za upotrebu u određivanju enkapsulacijske efikasnosti.

Tablica 7. Odziv detektora za otopine standarda vankomicina pri 210 nm za izradu baždarnog pravca.

Standard	γ / mg/mL	A.U.
1	$7,37 \cdot 10^{-4}$	50,1
2	$1,00 \cdot 10^{-3}$	55,3
3	$1,05 \cdot 10^{-3}$	80,1
4	$2,93 \cdot 10^{-3}$	145,6
5	$5,70 \cdot 10^{-3}$	305,3
5	$5,70 \cdot 10^{-3}$	304,8
5	$5,70 \cdot 10^{-3}$	307,3
6	$8,97 \cdot 10^{-3}$	441,5
7	$9,14 \cdot 10^{-3}$	498,1
7	$9,14 \cdot 10^{-3}$	501,3
7	$9,14 \cdot 10^{-3}$	502,3
8	$5,66 \cdot 10^{-2}$	2972,5
8	$5,66 \cdot 10^{-2}$	2972,3
8	$5,66 \cdot 10^{-2}$	2888,9
9	$5,69 \cdot 10^{-2}$	2808,6
10	$8,90 \cdot 10^{-2}$	4474,7



Slika 18. Baždarni pravac za standardne otopine vankomicina prema tablici 5.

U Tablici 8. prikazane su dobivene apsorbancije nakon gel-filtracijske kromatografije uzorka liposoma (009) i HPLC-a. Također, izračunate su masene koncentracije te masa vankomicina. Vrijednosti u 1. vijali predstavlja masu vankomicina enkapsuliranu u liposomu, dok vijale 4. i 5. predstavljaju otopljeni vankomicin koji nije enkapsuliran u liposom. Enkapsulacijska efikasnost (EE) za liposome s vankomicinom pripremljeni metodom hidratacije filma iznosi 0,73%.

Tablica 8. Vrijednosti apsorbancije dobivene HPLC analizom (odziv detektora pri 210 nm) za inkluzijski eksperiment 009. Korištenjem baždarnog pravca izračunata je masena koncentracija i masa vankomicina.

Vijala	A.U.	$\gamma / \text{mg/mL}$	m / g
1	55,1	$7,34 \cdot 10^{-4}$	$1,83 \cdot 10^{-2}$
2	0	0	0
3	0	0	0
4	4650,82	$9,14 \cdot 10^{-2}$	2,28
5	20,7	$5,47 \cdot 10^{-5}$	$1,37 \cdot 10^{-3}$
6	0	0	0

$$EE = \frac{m(\text{vankomicina iz liposoma})}{m(\text{vankomicina})_0}$$

$$EE = 0,73\%$$

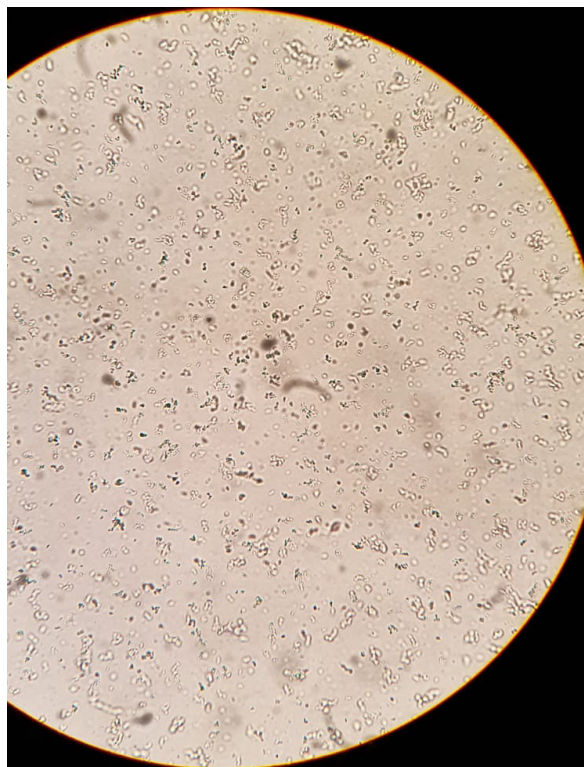
4.2. Karakterizacija liposoma s vankomicinom pripravljen metodom smrzavanja

4.2.1. Optička mikroskopija

Na Slici 19. prikazana je fotografija dobivenih liposoma s uklopljenim vankomicinom (inkluzijski eksperiment 010), dok je na Slici 20. prikazana fotografija praznih liposoma (inkluzijski eksperiment 011) pri povećanju od 400X na svjetlosnom mikroskopu. Na obje slike prikazane su sferične strukture različitih veličina koje predstavljaju liposomime. Optičkim mikroskopijom ne nalazi se značajna i objektivna razlika između praznih liposoma i liposoma s uklopljenim vankomicinom, no dokazano je stvaranje liposoma.



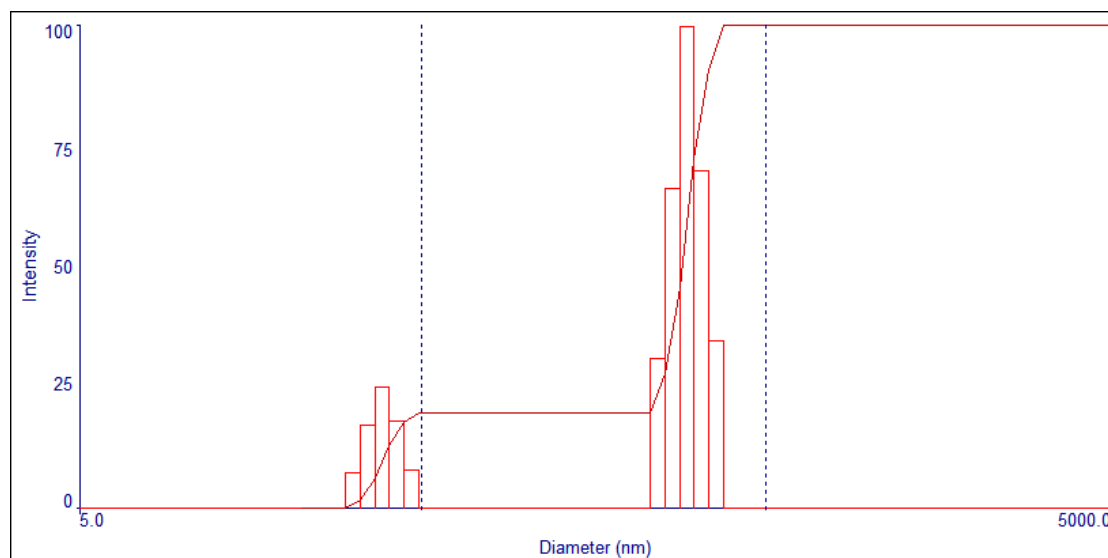
Slika 19. Liposomi s uklopljenim vankomicinom inkluzijskog eksperimenta 010 prikazani optičkim mikroskopom pri povećanju od 400X.



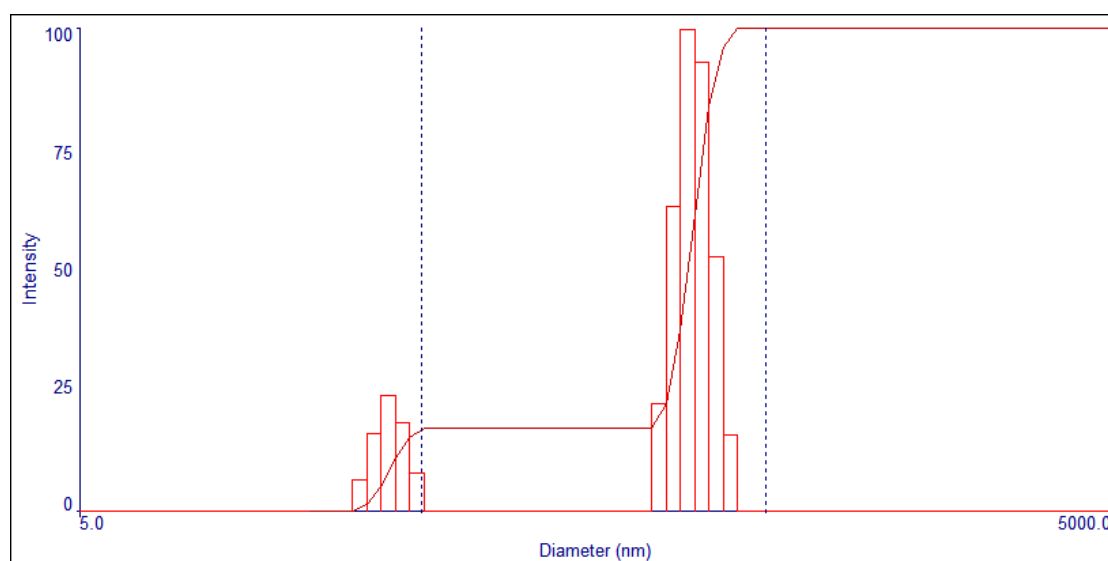
Slika 20. Prazni liposomi inkluzijskog eksperimenta 011 prikazani optičkim mikroskopom pri povećanju od 400X.

4.2.2. Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS)

Na Slikama 21. i 22. prikazane su raspodjele veličine liposoma s uklopljenim vankomicinom inkluzijskog eksperimenta 011 te praznih liposoma inkluzijskog eksperimenta 011 prema intenzitetu. Na oba prikaza vidljiva su dva područja raspodjele veličine liposoma prema dijametru. Srednja vrijednost dijametra liposoma s uklopljenim vankomicinom (010) iznosi $192,2 \pm 4,9$ nm (medijan vrijednosti svakog od dva područja prikazanih na Slici 21. iznosi 37,96 nm, 292,12 nm). Srednja vrijednost dijametra praznih liposoma (011) iznosi $219 \pm 34,4$ nm (medijan vrijednosti svakog od dva područja prikazanih na Slici 22. iznosi 39,52 nm, 293,92 nm). Na oba dijagrama vidljivo je kako je intenzitet područja raspodjele između 20 i 30 nm četiri puta manji od intenziteta područja raspodjele između 200 i 300 nm.



Slika 21. Dijagram prikazuje raspodjelu veličine liposoma s uklopljenim vankomicinom inkluzijskog eksperimenta (010) prema intenzitetu.



Slika 22. Dijagram prikazuje raspodjelu veličine praznih liposoma inkluzijskog eksperimenta (011) prema intenzitetu.

Usporedbom DLS rezultata liposoma pripremljenih metodom film hidratacije i metodom smrzavanja, pokazano je kako liposomi pripremljeni metodom smrzavanja imaju samo dva područja raspodjele intenziteta prema dijametru, dok kod liposoma pripremljenih metodom hidratacije filma nalazi se tri područja intenziteta prema dijametru. Dobivene srednje vrijednosti slične su za obje metode.

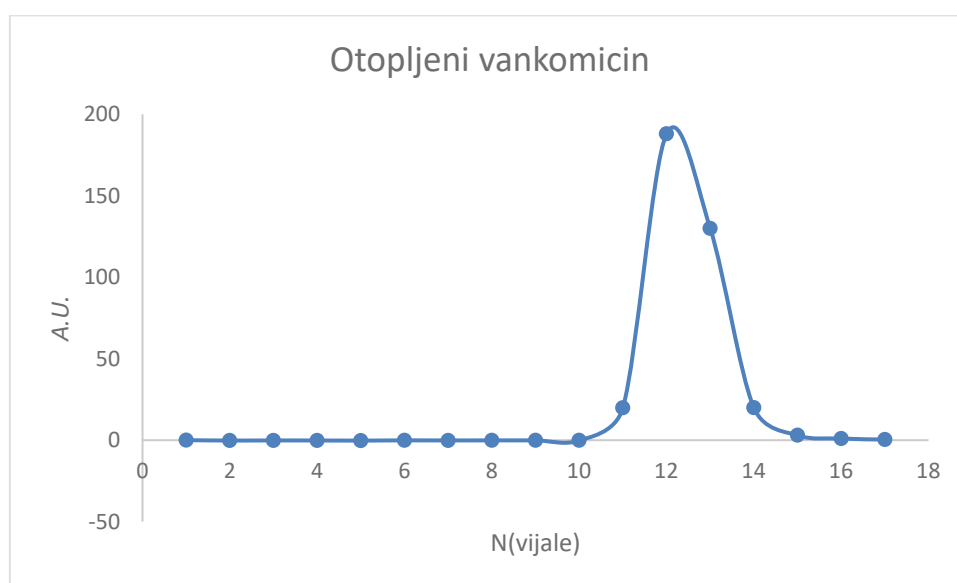
4.2.3. Elektrokinetika

Srednja vrijednost ζ -potencijala praznih liposoma (inkluzijski eksperiment 011) iznosi $26,65 \pm 2,21$ mV. Srednja vrijednost ζ -potencijala liposoma s uklopljenim vankomicinom (inkluzijski eksperiment 010) iznosi $14,57 \pm 2,75$ mV. Rezultati ζ -potencijala govore u prilog činjenici da su prazni liposomi stabilniji i manje skloni agregaciji, dok su liposomi s uklopljenim vankomicinom skloniji agregaciji.

Vrijednosti ζ -potencijala kod liposomima pripremljenima metodom hidratacije filma i metodom smrzavanja je podjednaka, te obje metode pokazuju kako su prazni liposomi manje podložni agregaciji.

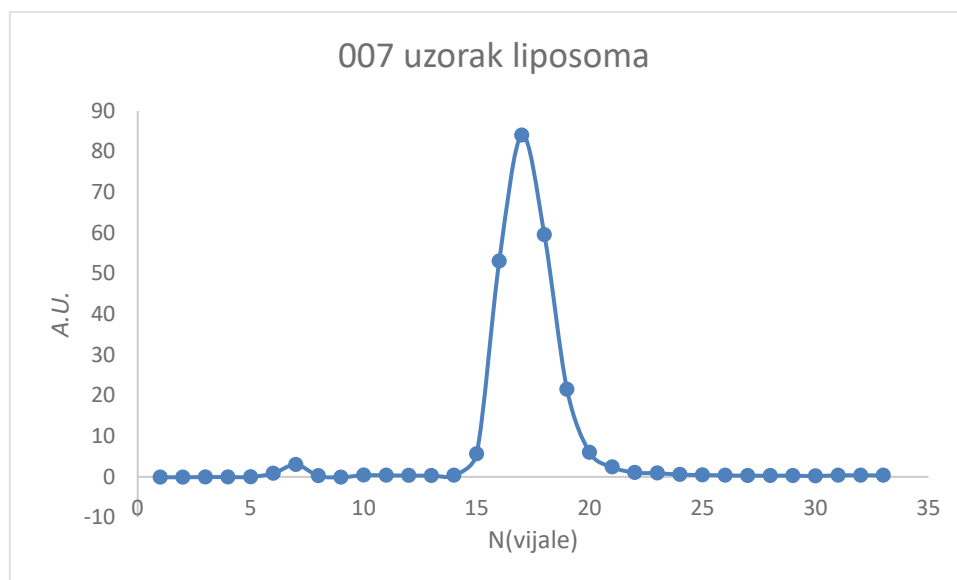
4.2.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) pri različitim pH pufera

Slika 23. predstavlja HPLC analizu nakon provedene gel-filtracijske kromatografije otopljenog vankomicina ($\gamma=6,6$ mg/mL) i plavog dekstrana pri $pH=5,5$. Volumen izlaska plavog dekstrana s kolone predstavlja mrtvo vrijeme zadržavanja na koloni. Plavi dekstran izlazi u 5. i 6. vijali. Vankomicin izlazi od 11 od 15 vijale (nakon 15 mL). Ovim eksperimentom pokazano je da se vankomicin zadržava na Sephadexu G-50 pri $pH=5,5$.



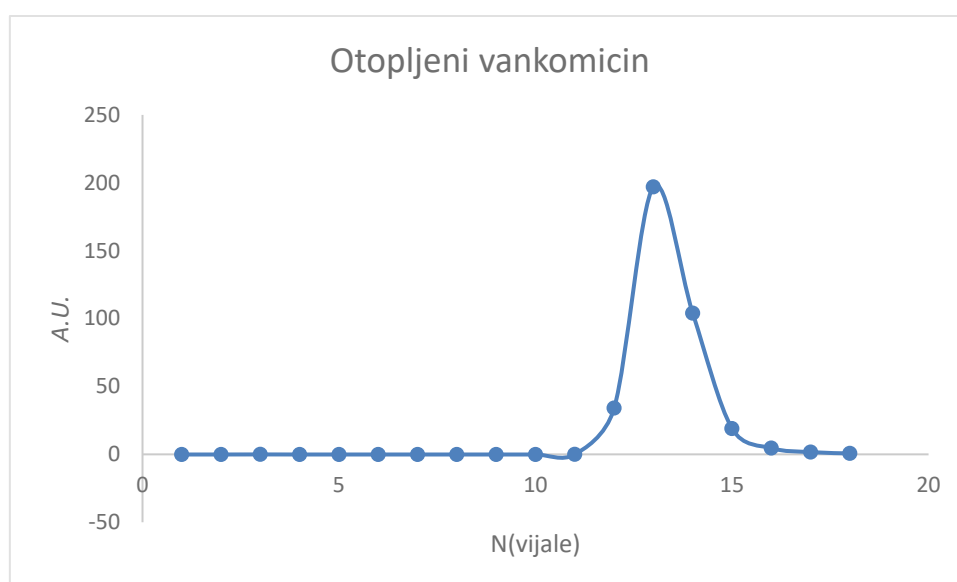
Slika 23. Grafički prikaz eluiranja otopine vankomicina ($\gamma=6,6$ mg/mL) i plavog dekstrana u puferu 1xPBS $pH=5,5$ na Sephadexu G-50. Odziv detektora pri 280 nm.

Slika 24. predstavlja HPLC analizu nakon provedene gel-filtracijske kromatografije suspenzije liposoma inkluzijskog eksperimenta 007 pri $pH=5,5$. Liposomi se eliraju od 6. do 9. vijale (6-9 mL), dok otopljeni vankomicin izlazi u 15. vijali (nakon 15 mL). Ovim eksperimentom pokazano je kako je odvajanje liposoma od otopljenog vankomicina pomoću gel-filtracijske kromatografije pri navedenim uvjetima (Sephadex G-50; $pH=5,5$) zadovoljavajuće, te se može koristiti kao sepracijska metoda za potrebe kvantifikacije enkapsuliranog vankomicina.



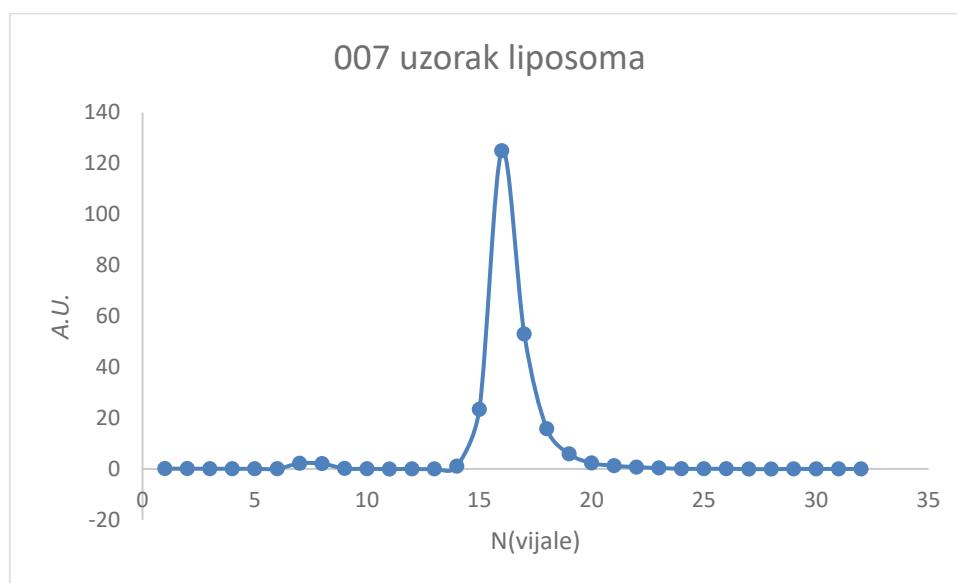
Slika 24. Grafički prikaz gel-filtracijske kromatografije liposoma s uklopljenim vankomicinom u inkluzijskom eksperimenta 007 u puferu 1xPBS $pH=5,5$ na Sephadexu G-50. Odziv detektora pri 280 nm.

Slika 25. predstavlja HPLC analizu nakon provedene gel-filtracijske kromatografije otopljenog vankomicina ($\gamma=6,2$ mg/mL) i plavog dekstrana pri $pH=7,0$. Plavi dekstran izlazi u 5. i 6. vijali. Vankomicin izlazi od 11. od 15. vijale (nakon 15 mL). Ovim eksperimentom pokazano je da se vankomicin zadržava na Sephadexu G-50 pri $pH=7,0$.



Slika 25. Grafički prikaz eluiranja otopine vankomicina ($\gamma=6,2$ mg/mL) u puferu 1xPBS $pH=7,0$ na Sephadexu G-50. Odziv detektora pri 280 nm.

Slika 26. predstavlja HPLC analizu nakon provedene gel-filtracijske kromatografije suspenzije liposoma inkluzijskog eksperimenta 007 pri $pH=7,0$. Liposomi se eluiraju od 7. do 9. vijale, dok otopljeni vankomicin izlazi u 15. vijali (nakon 15 mL). Ovim eksperimentom pokazano je kako je odvajanje liposoma od otopljenog vankomicina pomoću gel-filtracijske kromatografije pri navedenim uvjetima (Sephadex G-50; $pH=7,0$) zadovoljavajuće, te se može koristiti kao sepracijska metoda za potrebe kvantifikacije enkapsuliranog vankomicina.



Slika 26. Grafički prikaz gel-filtracijske kromatografije liposoma s uklopljenim vankomicinom u inkluzijskom eksperimenta 007 u puferu 1xPBS $pH=5,5$ na Sephadexu G-50. Odziv detektora pri 280 nm.

4.2.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

U Tablici 9. prikazane su dobivene apsorbancije nakon gel-filtracijske kromatografije i HPLC analize u inkluzijskom eksperimentu 010 (pripravljen isti dan). Izračunate su masene koncentracije te masa vankomicina. Vrijednosti u 1. vijali predstavlja masu vankomicina enkapsuliranu u liposomu, dok vijale 4., 5. i 6. predstavljaju otopljeni vankomicin koji nije enkapsuliran u liposom. Enkapsulacijska efikasnost (EE) za liposome s vankomicinom pripravljeni metodom hidratacije filma iznosi 0,86%.

Tablica 9. Vrijednosti apsorbancije dobivene HPLC analizom za inkluzijski eksperiment 010 (pripremljen isti dan). Korištenjem baždarnog pavca izračunata je masena koncentracija i masa vankomicina. Odziv detektora pri 210 nm.

Vijala	A.U.	γ / mg/mL	m / g
1	62,1	$8,72 \cdot 10^{-4}$	$2,18 \cdot 10^{-2}$
2	0	0	0
3	0	0	0
4	4655,9	$9,15 \cdot 10^{-2}$	2,29
5	33,4	$3,05 \cdot 10^{-4}$	$7,63 \cdot 10^{-3}$
6	26	$1,59 \cdot 10^{-5}$	$3,98 \cdot 10^{-3}$

$$EE = \frac{m(\text{vankomicina iz liposoma})}{m(\text{vankomicina})_0}$$

$$EE = 0,86 \%$$

U Tablici 10. prikazane su dobivene apsorbancije nakon gel-filtracijske kromatografije i HPLC analize u inkluzijskom eksperimentu 007 (pripravljen prije otprilike 30 dana). Izračunate su masene koncentracije te masa vankomicina. Vrijednosti u 1. vijali predstavlja masu vankomicina enkapsuliranu u liposomu, dok vijale 4., 5. i 6. predstavljaju otopljeni vankomicin koji nije enkapsuliran u liposom. Enkapsulacijska efikasnost (EE) za liposome s vankomicinom pripravljeni metodom smrzavanja 30 dana prije analize iznosi 1,95%.

Tablica 10. Vrijednosti apsorbancije dobivene HPLC analizom za inkluzijski eksperiment 007 (pripremljen prije otprilike mjesec dana). Korištenjem baždarnog pavca izračunata je masena koncentracija i masa vankomicina. Odziv detektora pri 210 nm.

Vijala	<i>A.U.</i>	γ / mg/mL	<i>m</i> / g
1	117,7	$1,97 \cdot 10^{-3}$	$4,92 \cdot 10^{-2}$
2	0	0	0
3	0	0	0
4	4677	$9,19 \cdot 10^{-2}$	2,29
5	204,5	$3,68 \cdot 10^{-3}$	$9,20 \cdot 10^{-2}$
6	110	$1,81 \cdot 10^{-3}$	$4,52 \cdot 10^{-2}$

$$EE = \frac{m(\text{vankomicina iz liposoma})}{m(\text{vankomicina})_0}$$

$$EE = 1,95 \%$$

Enkapsulacijska efikasnost veća je kod liposoma pripremljenih prije otprilike mjesec dana, nego u liposoma koji su pripremljeni isti dan. Moguće objašnjenje je da stalna zasićenost vankomicinom kroz duži vremenski period može povećati enkapsulaciju.

Rezultati pokazuju kako je postignuta veća enkapsulacijska efikasnost kod pripreve liposoma metodom smrzavanja, nego kod pripreve liposoma metodom hidratacije filma, kao što je i opisano u literaturi.

§ 5. ZAKLJUČAK

Liposomi su pripremljeni dvjema metodama – metodom hidratacije filma te metodom smrzavanja. Liposomi pripremljeni metodom hidratacije filma analizirani su nakon sonikacije i nakon ekstruzije. Rezultati ζ -potencijala, DLS-a te fizikalno-kemijska svojstva (taložnje) liposoma nakon ekstruzije bili su manje povoljni u usporedbi s istim rezultatima liposoma nakon sonikacije. U DSC analizi pokazano je kako termodinamička svojstva pripremljenih liposoma značajno utječe metoda pripreme liposoma. Razlike u rezultatima AFM-a, DLS-a i elektrokinetike između praznih liposoma i liposoma s uklopljenim vankomicinom, sugeriraju da je zaista došlo do uklapanja vankomicina u liposome. To je potvrđeno HPLC analizama nakon gel-filtracijske kromatografije otopljenog vankomicina i suspenzije liposoma gdje se vidi da postoji dodatan vršak detekcije vankomicina u uzorku liposoma za razliku od otopljenog vankomicina. Količina inkapsuliranog vankomicina kvantificirana je pri čemu je pokazano da je enkapsulacijska efikasnost najveća za liposome pripravljene metodom smrzavanja koji su analizirani otprilike 30 dana nakon pripreme uzorka, a najmanja za liposome pripravljene metodom hidratacije filma, što je u skladu s literaturom.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AFM	mikroskopija atomskih sila (<i>atomic force microscopy</i>)
AIDS	sindrom stečene imunodeficijencije
AKIN	<i>Acute kidney injury network</i>
AUC	površina ispod krivulje plaznatske koncentracije u vremenu (<i>area under the curve</i>)
DLS	dinamičko raspršenje svjetlosti
EE	enkapsulacijska efikasnost
HAV	hepatitis virus A
HPLC	tekućinska kromatografija visokih performansi
LUV	velike unilamelarne vezikule
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
MLV	multilamelarne vezikule
MRT	srednje vrijeme ostanka u plazmi (<i>mean residence time</i>)
MRSA	meticilin-rezistentni <i>Staphylococcus aureus</i>
NAM	<i>N</i> -acetilmuraminska kiselina
NAG	<i>N</i> -acetilglukozamin
PBS	fosfatni pufer (<i>phosphate buffer saline</i>)
RIFLE	akronim za rizik, ozljedu, zatajivanje, gubitak i završni stadij bubrežnog zatajivanja (<i>Risk, Injury, Failure, Loss, End-Stage-Renal-Disease</i>)
RNA	ribonukleinska kiselina
SUV	male unilamelarne vezikule
UV	ultraljubičasto

§ 7. LITERATURNI IZVORI

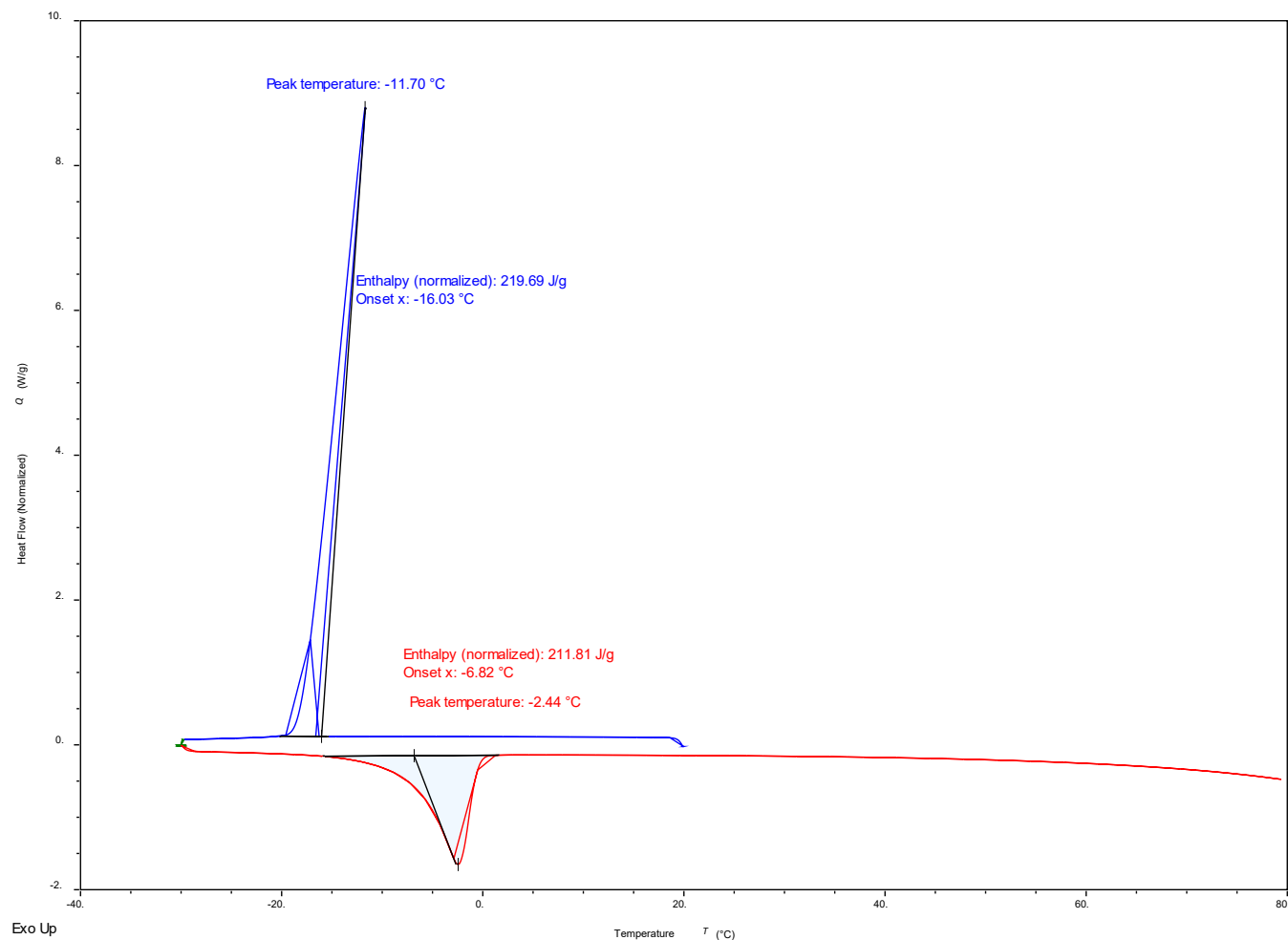
1. <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/infektologija/bakterije-i-antibakterijski-lijekovi/vankomicin>. (datum pristupa 17. studenog 2020.)
2. https://halmed.hr//upl/lijekovi/SPC/SPC_UP-I-530-09-17-02-344-345.pdf (datum pristupa 17. studenog 2020.)
3. S. Elyasi, H. Khalili, S. Dashti-Khavidaki, A. Mohammadpour. *European Journal of Clinical Pharmacology* **68**, (2012) 1243–1255.
4. E. Filippone, W. Kraft, J. Farber. *Clin. Pharmacol. Ther.* **102**, (2017) 459–469.
5. O. Bamgbola. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism* **7** (2016) 136–147.
6. M. Alhariri, A. Azghani, A. Omri. *Expert Opin. Drug Deliv.* **10**, (2013) 1515–1532.
7. J. Liu, Z. Wang, F. Li, J. Gao, L. Wang, G. Huang. *Asian J. Pharm. Sci.* **10**, (2015) 212–222.
8. <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:28001>. (datum pristupa 16. studenog 2020.)
9. M. J. Rybak. *Clin. Infect. Dis.* **42**, (2006) S35–S39.
10. J. Albanèse, M. Léone, B. Bruguerolle, M. L. Ayem, B. Lacarelle, C. Martin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, (2000) 1356–1358.
11. C. Lamer, V. De Beco, P. Soler, S. Calvat, J. Y. Fagon, M. C. Dombret -, R. Farinotti, J. Chastre, C. Gibert. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, (1993) 281–286.
12. <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780323376921002367?scrollTo=%23hl0002148>. (datum pristupa 19. studenog 2020.)
13. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00512>. (datum pristupa 19. studenog 2020.)
14. W. A. Craig. *Infectious Disease Clinics of North America* **17** (2003) 479–501.
15. A. M. Guzman Prieto, W. van Schaik, M. R. C. Rogers, T. M. Coque, F. Baquero, J. Corander, R. J. L. Willems. *Frontiers in Microbiology* **7** (2016). 1-15.
16. S. Sivagnanam, D. Deleu. *Crit. Care* **7**, (2003) 119–120.
17. J.H. Martin, R. Norris, M. Barras, J. Roberts, R. Morris, M. Doogue, G. RD. Jones, *Clin Biochem Rev.* **22** (2010) 21-24.

18. Y. Arimura, T. Yano, M. Hirano, Y. Sakamoto, N. Egashira, R. Oishi. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, (2012) 1865–1873.
19. L. Huang, B. Sullenger, R. Juliano. *J. Drug Target.* **18**, (2010) 567–574.
20. Q.G. van Hoesel, P.A. Steerenberg, D. J. Crommelin, A. van Dijk, W. van Oort, S. Klein, J.M. Douze, D.J. de Wildt, F.C. Hillen, *Cancer Res.* **44**, (1984) 3698-705.
21. B. Maherani, E. Arab-Tehrany, M. R. Mozafari, C. Gaiani, M. Linder. *Curr. Nanosci.* **7**, (2011) 436–452.
22. D. Nelson, M. Cox, *Leningher principles of biochemistry*, W.H. Freeman and Company, New York, 2005, str. 348-349.
23. F. Y. Telegin, O. A. Belokurova, N. P. Shchitova. *Russ. J. Gen. Chem.* **83**, (2013) 214–219.
24. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20123413984>. (datum pristupa 31. prosinca 2020.)
25. A. Mohammadi, S. M. Jafari, A. S. Mahoonak, M. Ghorbani. *Food and Bioprocess Technology* **14** (2020) 23-38.
26. H. R. Ahmadi Ashtiani, P. Bishe, N.-A. Lashgari, M. A. Nilforoushzadeh, S. Zare. *J. Ski. Stem Cell* **3**, (2016). (3)e65815
27. V. Dhull, A. Gahlaut, N. Dilbaghi, V. Hooda. *Biochem. Res. Int.* **2013**, (2013) 1-18.
28. I. A. J. M. Bakker-Woudenberg, A. F. Lokerse, M. T. ten Kate, G. Storm. *BBA - Mol. Basis Dis.* **1138**, (1992) 318–326.
29. I. A. J. M. Bakker-Woudenberg. *Int J Antimicrob Agents*, **19** (2002) 299–311.
30. N. Bertrand, J. C. Leroux. *Journal of Controlled Release*, **161** (2012) 152–163
31. L. Sercombe, T. Veerati, F. Moheimani, S. Y. Wu, A. K. Sood, S. Hua. *Frontiers in Pharmacology* , **6** (2015) 286.
32. U. Bulbake, S. Doppalapudi, N. Kommineni, W. Khan. *Pharmaceutics* **9**, **12** (2017). 1-33.
33. http://www.hzzo.hr/search?type%5B1%5D=1&type%5B2%5D=2&type%5B3%5D=3&type%5B4%5D=4&type%5B5%5D=5&media_type%5B1%5D=1&query=myocet. (datum pristupa 4. siječnja 2021.)
34. M. J. Mulligan, K. E. Lyke, N. Kitchin, J. Absalon, A. Gurtman, S. Lockhart, K. Neuzil, V. Raabe, R. Bailey, K. A. Swanson, P. Li, K. Koury, W. Kalina, D. Cooper, C. Fontes-Garfias, P. Y. Shi, Ö. Türeci, K. R. Tompkins, E. E. Walsh, R. Frenck, A. R.

- Falsey, P. R. Dormitzer, W. C. Gruber, U. Şahin, K. U. Jansen. *Nature* **586**, (2020) 589–593.
35. K. S. Corbett, D. K. Edwards, S. R. Leist, O. M. Abiona, S. Boyoglu-Barnum, R. A. Gillespie, S. Himansu, B. S. Graham *et al.* *Nature* **586**, (2020) 567–571.
36. A. D. Bangham, M. M. Standish, J. C. Watkins. *J. Mol. Biol.* **13**, (1965) 238–252.
37. A. P. Costa, X. Xu, D. J. Burgess. *Pharm. Res.* **31**, (2014) 97–103.
38. <https://www.afmworkshop.com/images/news2019/01/Measuring-and-understanding-force-distance-curves-v2.pdf>. (datum pristupa 27. studenog 2020. godine)
39. K. A. Edwards, A. J. Baeumner. *Talanta*, **68** (2006) 1432–1441.
40. B.J. Berne, R. Pecora, *Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics*, Dover Publications INC, New York, 2000., str. 1-8.
41. S. Hupfeld, A. M. Holsaeter, M. Skar, C. B. Frantzen, M. Brandl. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **6**, (2006) 3025–3031.
42. <https://goldbook.iupac.org/terms/view/E01968> (datum pristupa 15. prosinca 2020.)
43. A. J. Shnoudeh, I. Hamad, R. W. Abdo, L. Qadumii, A. Y. Jaber, H. S. Surchi, S. Z. Alkelany. in *Biomaterials and Bionanotechnology*, Elsevier, Amsterdam, 2019. str. 527–612.
44. R. L. Biltonen, D. Lichtenberg. *Chem. Phys. Lipids* **64**, (1993) 129–142.
45. http://www.mournetrainingservices.co.uk/Preview_book_introduction_HPLC.pdf. (datum pristupa 16. prosinca 2020.)
46. A. Pumerantz, K. Muppidi, S. Agnihotri, C. Guerra, V. Venketaraman, J. Wang, G. Betageri. *Int. J. Antimicrob. Agents* **37**, (2011) 140–144.
47. K. Muppidi, A. S. Pumerantz, J. Wang, G. Betageri. *ISRN Pharm.* **2012**, (2012) 1–8.

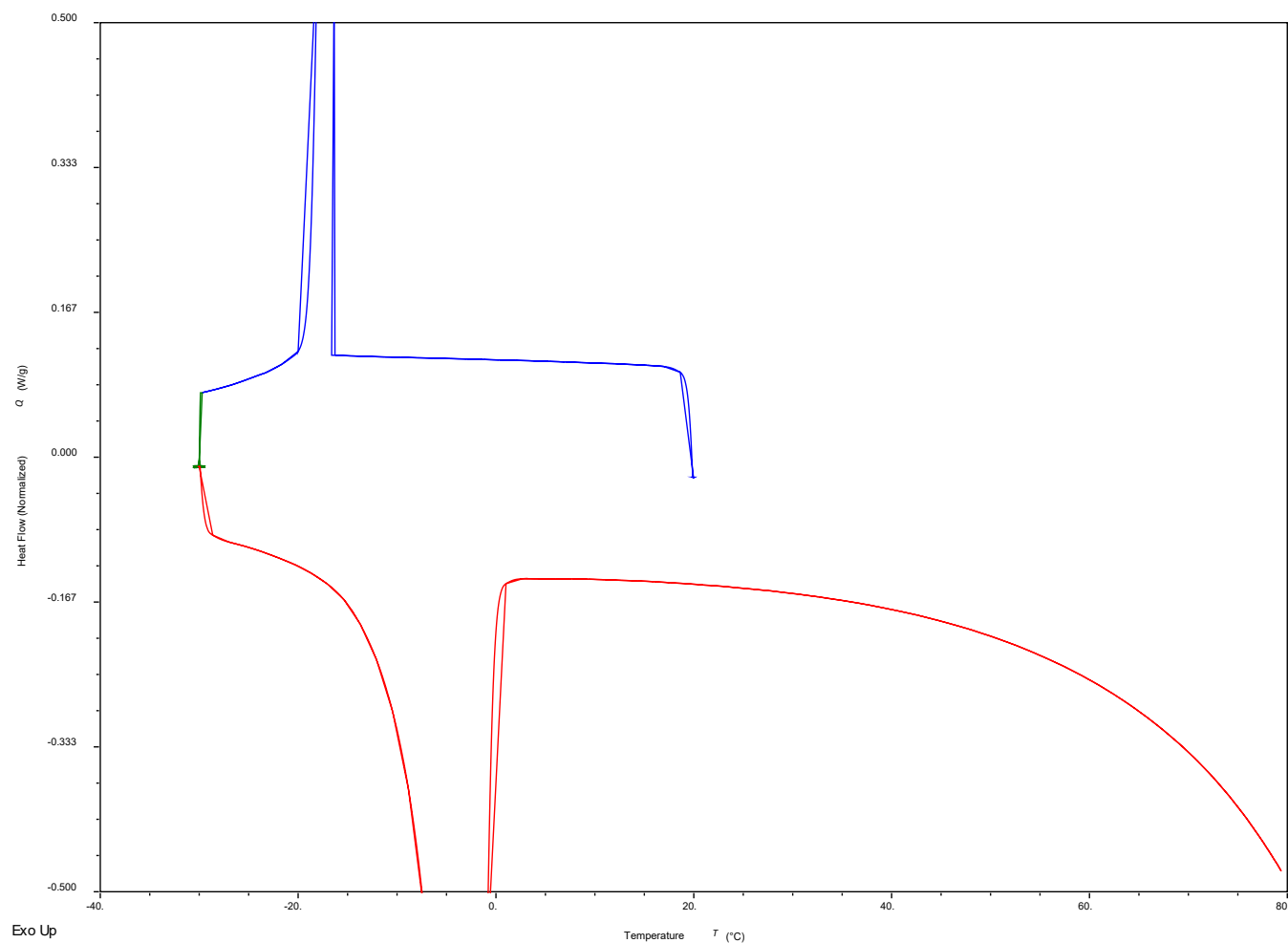
§ 8. DODATAK

003 E

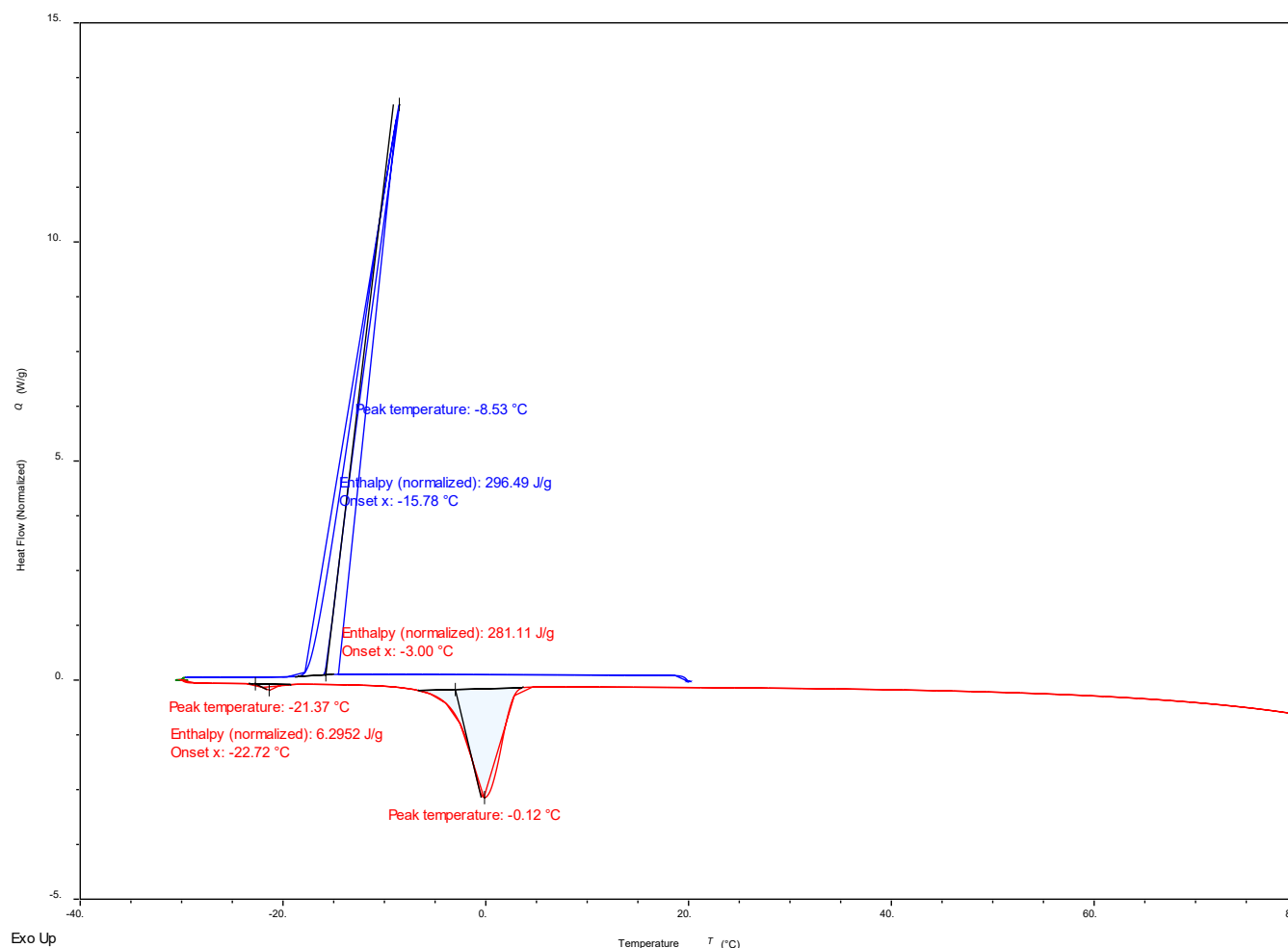


Slika D1A. DSC analiza praznih liposoma nakon ekstruzije (003E) u rasponu temperatura od -30 °C do 80 °C. Plava linija predstavlja hlađenje, dok crvena linija predstavlja zagrijavanje. Izmjerene entalpije taljenja i kristalizacije usporedive su s entalpijom taljenja i karistalizacije vode (333,55 J/g).

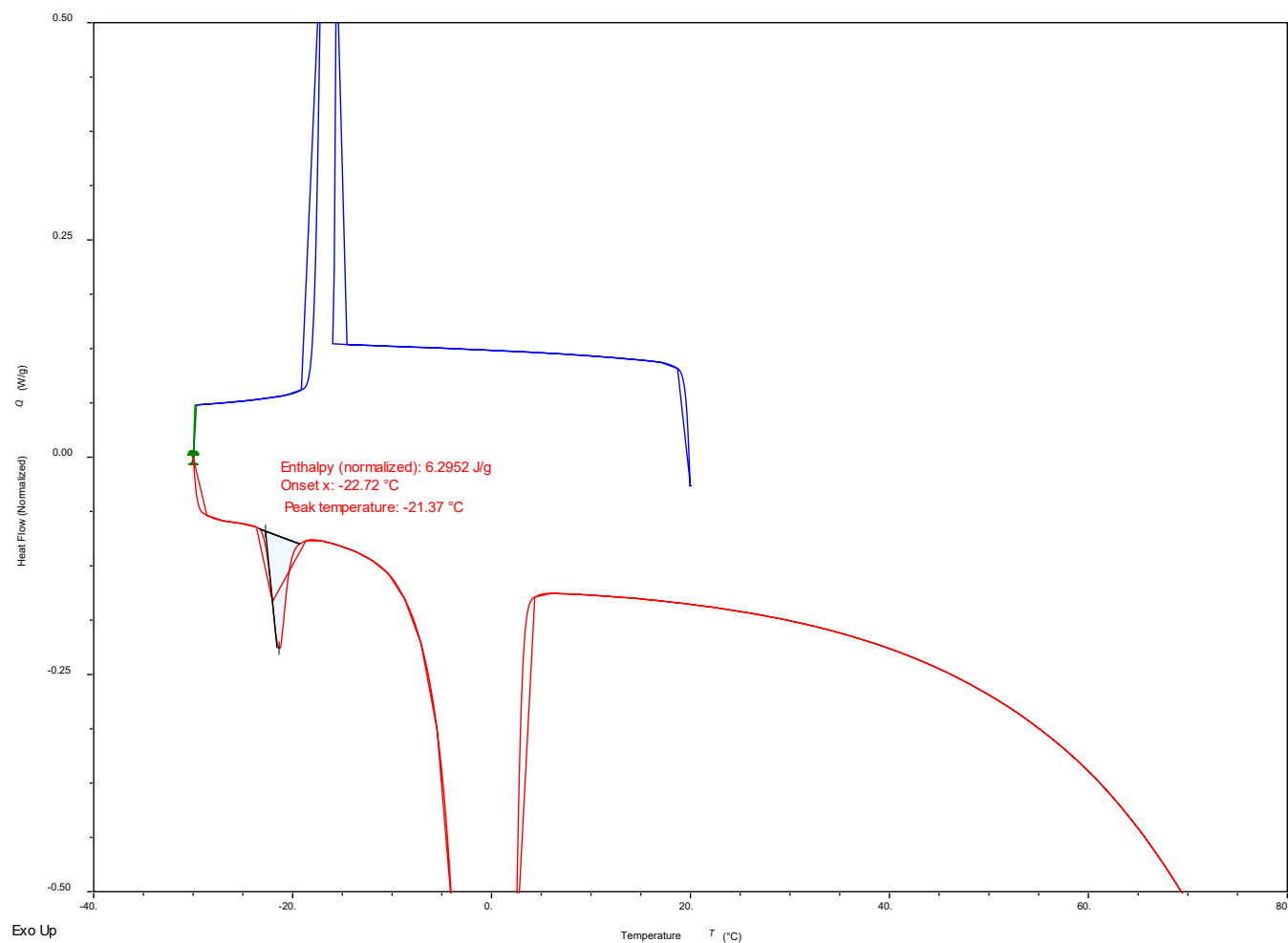
003 E



Slika D1B. DSC analiza praznih liposoma nakon ekstruzije (003E) u rasponu od -30 °C do 80 °C (uvećano). Ne uočavaju se drugi termički prijelazi osim taljenja i kristalizacije vode.

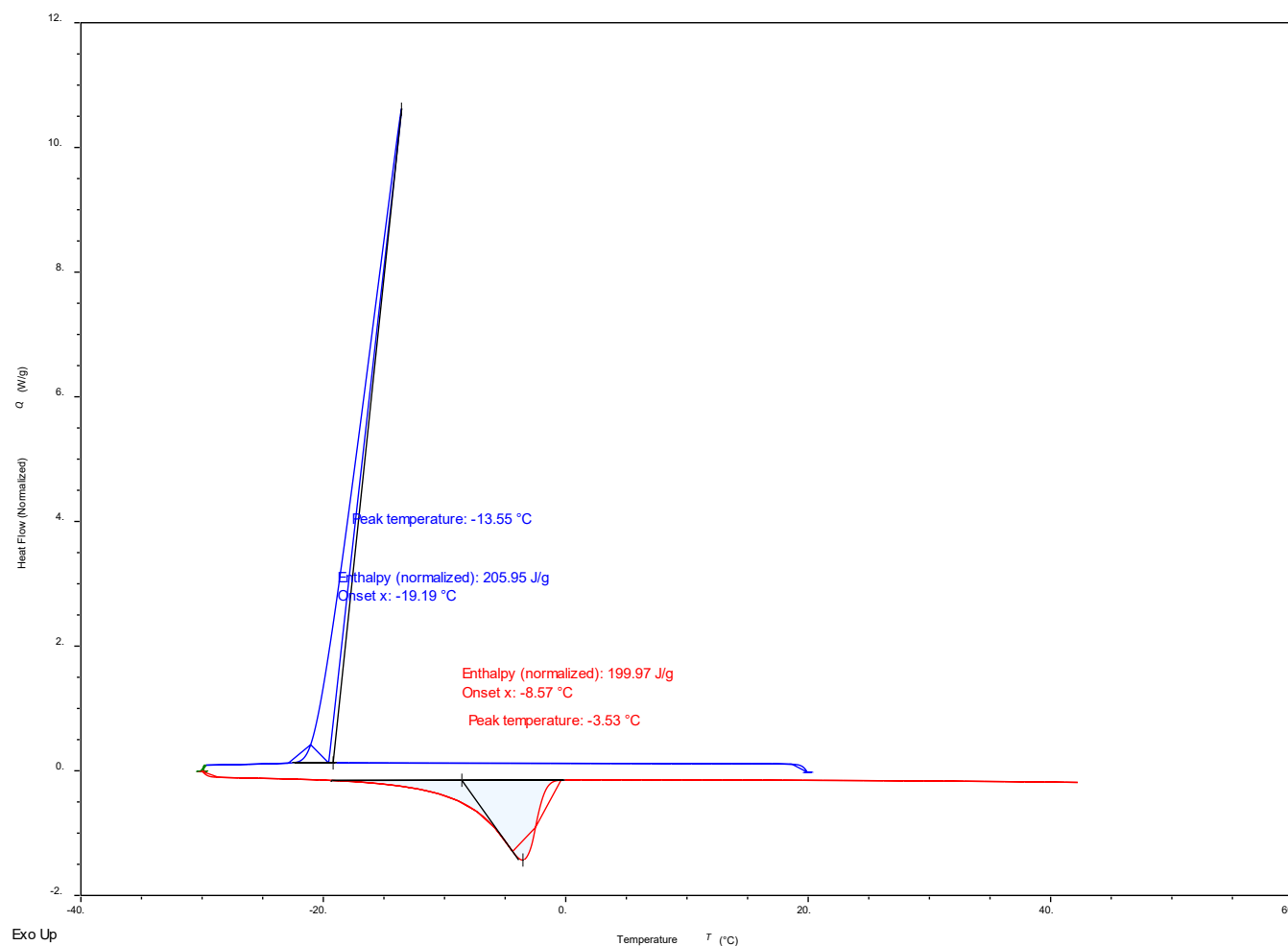


Slika D2A. DSC analiza praznih liposoma nakon sonikacije (003S) u rasponu temperatura od -30 °C do 80 °C. Plava linija predstavlja hlađenje, dok crvena linija predstavlja zagrijavanje. Izmjerene entalpije taljenja i kristalizacije usporedive su s entalpijom taljenja i karistalizacije vode (333,55 J/g).



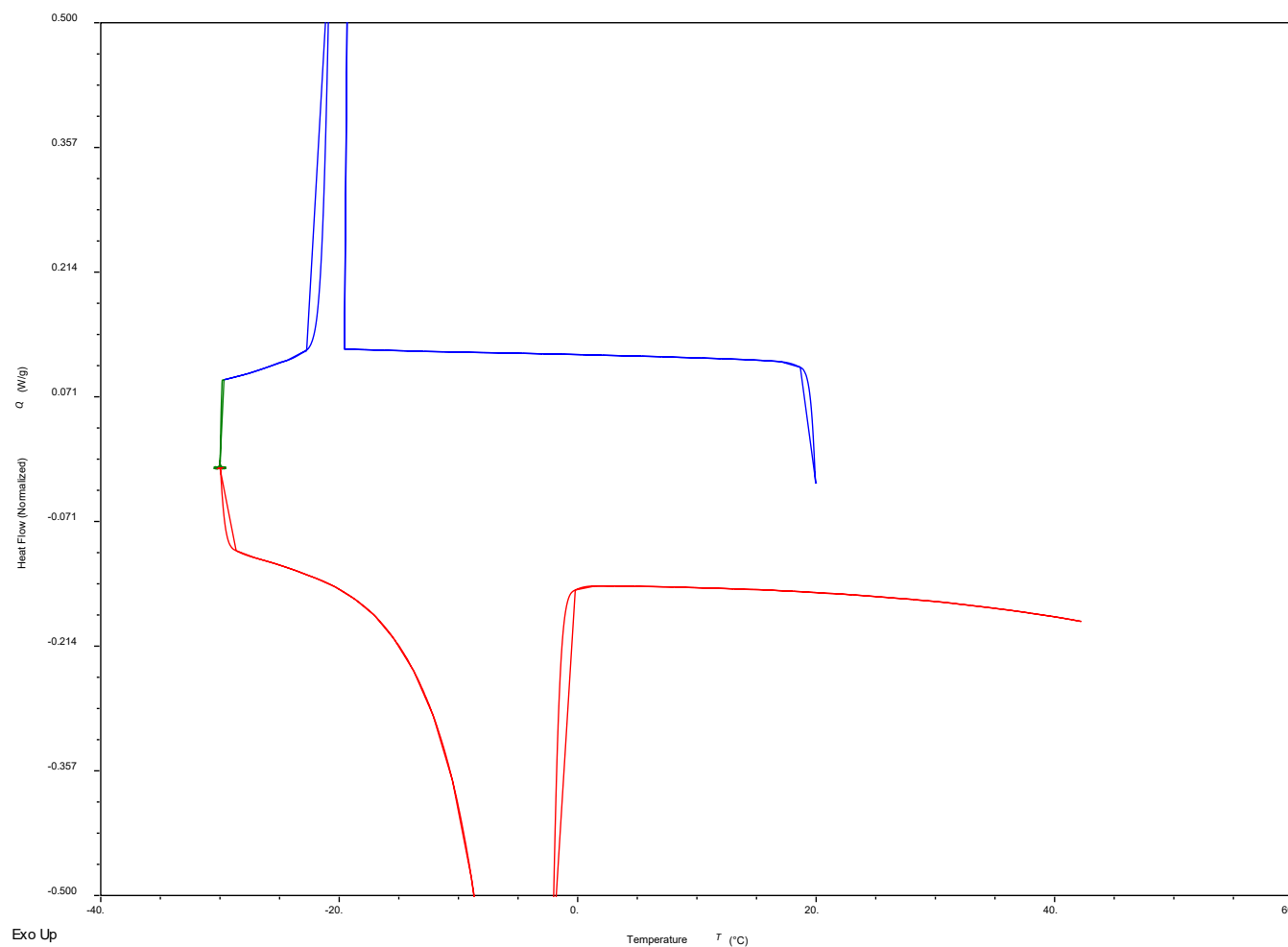
Slika D2B. DSC analiza praznih liposoma nakon sonikacije (003S) u rasponu od -30 °C do 80 °C (uvećano). Uočava se termički prijelaz pri temperaturi od $-22,7$ °C.

004 E

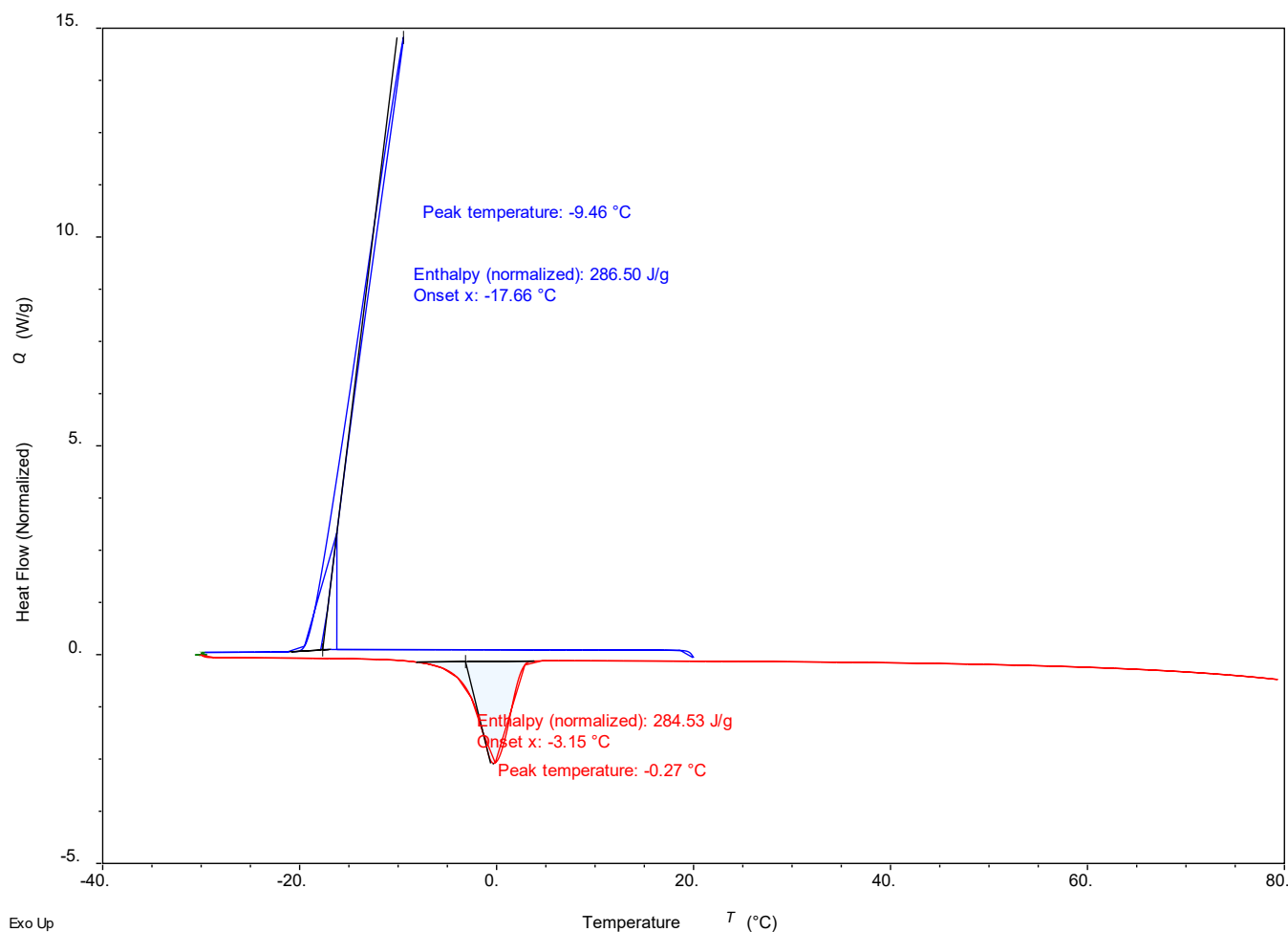


Slika D3A. DSC analiza liposoma s vankomicinom nakon ekstruzije (004E) u rasponu temperatura od -30 °C do 80 °C. Plava linija predstavlja hlađenje, dok crvena linija predstavlja zagrijavanje. Izmjerene entalpije taljenja i kristalizacije usporedive su s entalpijom taljenja i karistalizacije vode (333,55 J/g).

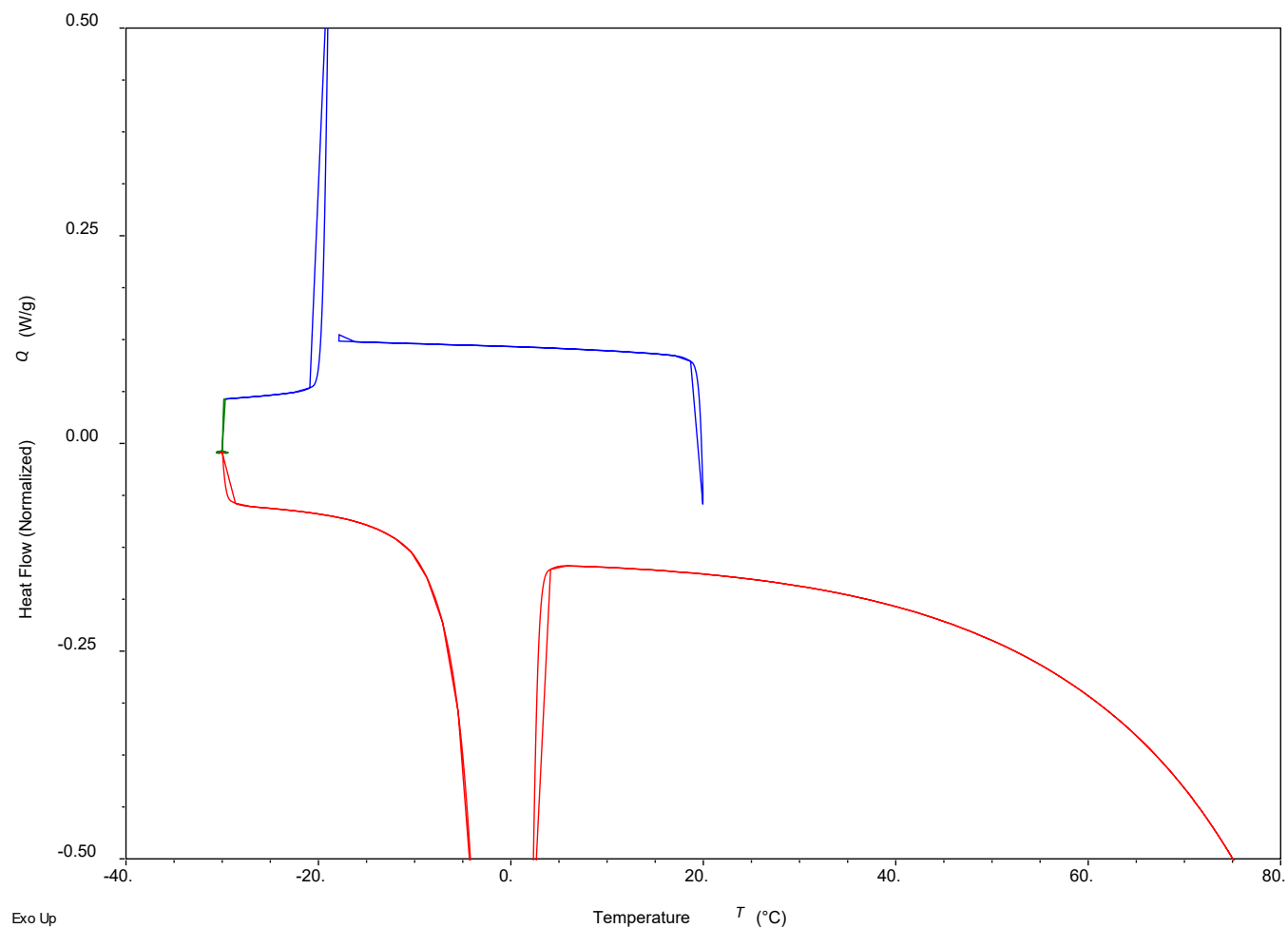
004 E



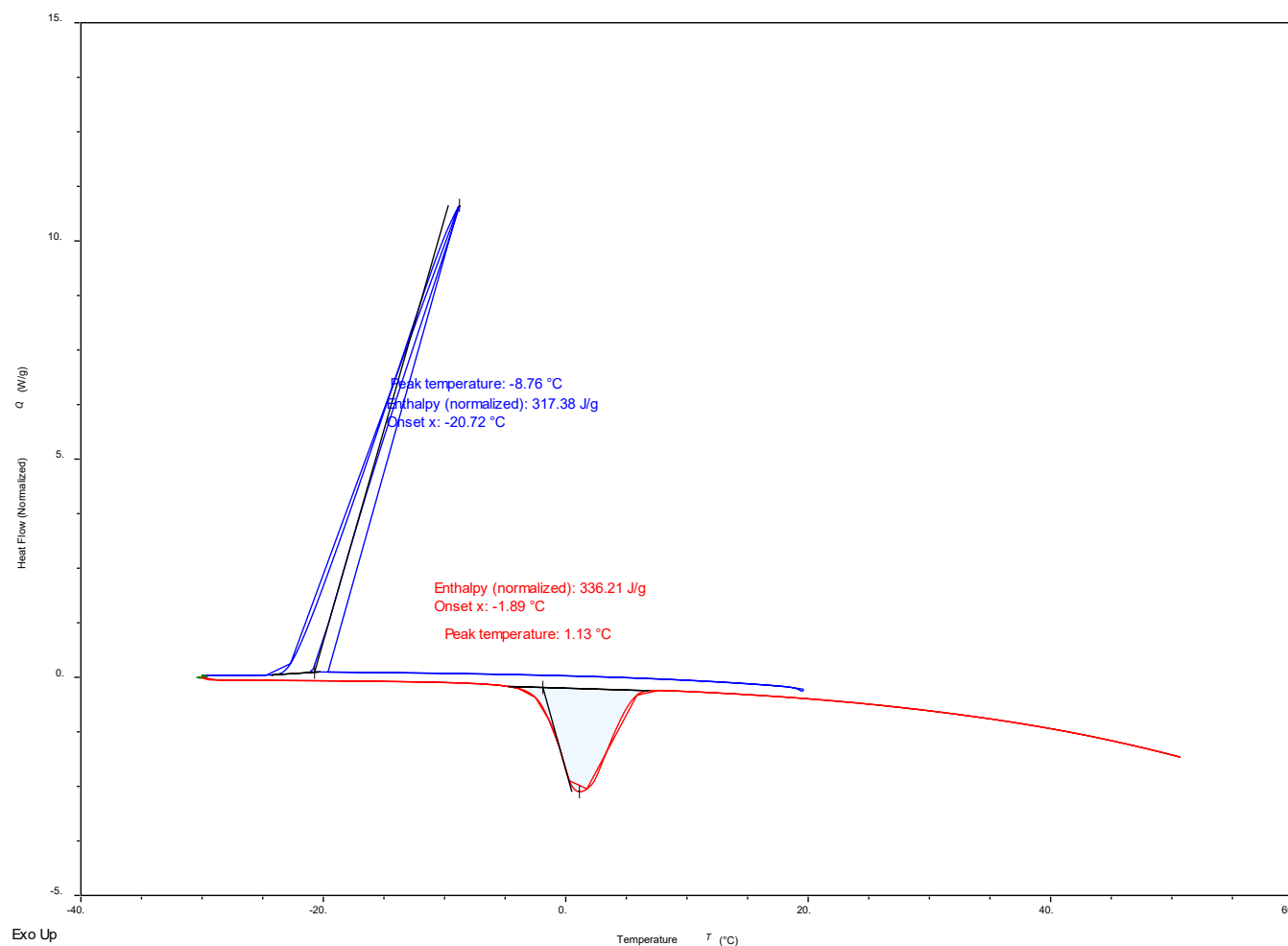
Slika D3B. DSC analiza liposoma s vankomicinom nakon ekstruzije (004E) u rasponu od -30 °C do 80 °C (uvećano). Ne uočavaju se drugi termički prijelazi osim taljenja i kristalizacije vode.



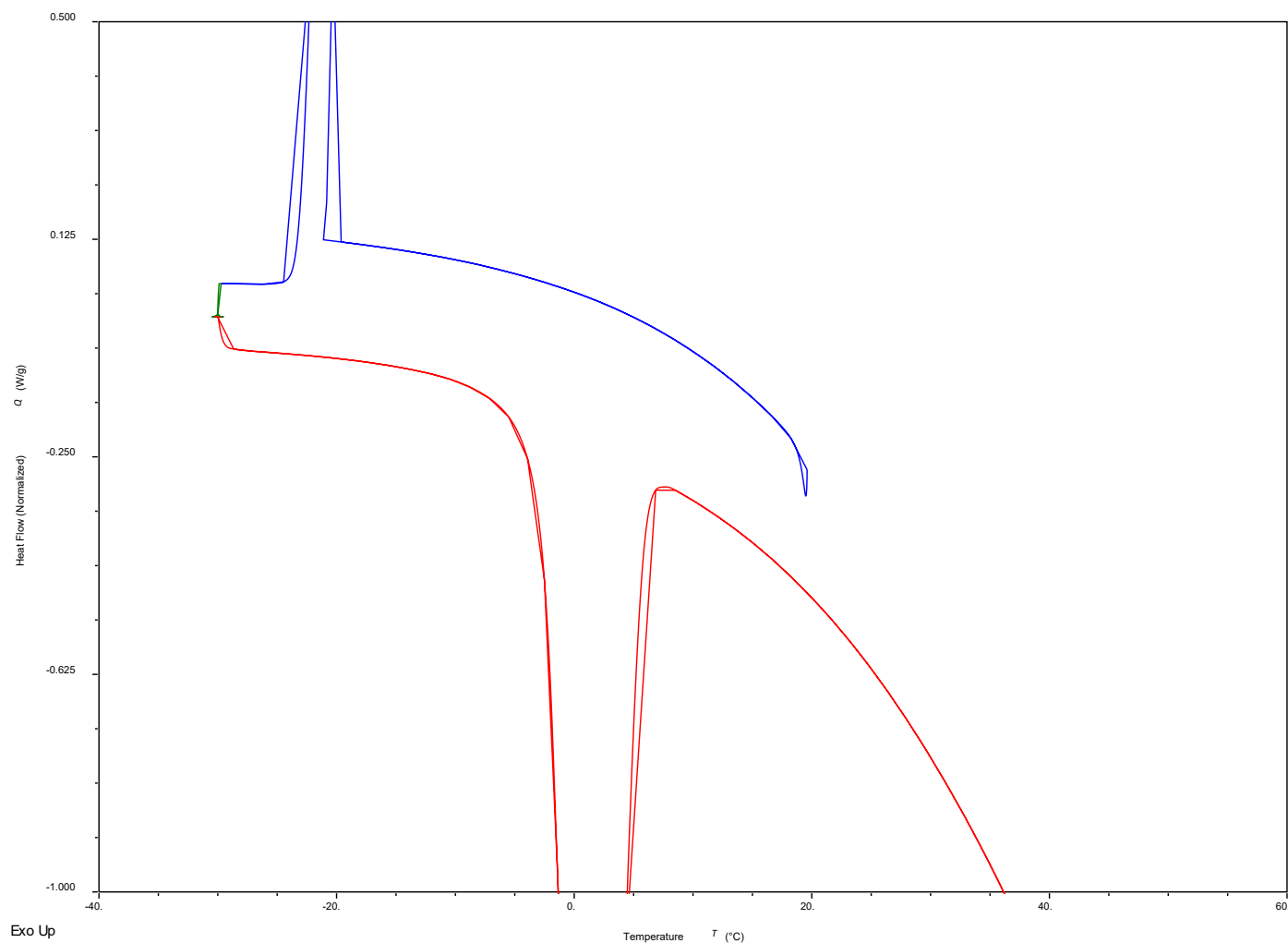
Slika D4A. DSC analiza liposoma s vankomicinom nakon sonikacije (004S) u rasponu temperatura od -30 °C do 80 °C. Plava linija predstavlja hlađenje, dok crvena linija predstavlja zagrijavanje. Izmjerene entalpije taljenja i kristalizacije usporedive su s entalpijom taljenja i karistalizacije vode (333,55 J/g).



Slika D4B. DSC analiza liposoma s vankomicinom nakon sonikacije (004S) u rasponu od -30 °C do 80 °C (uvećano). Ne uočavaju se drugi termički prijelazi osim taljenja i kristalizacije vode.

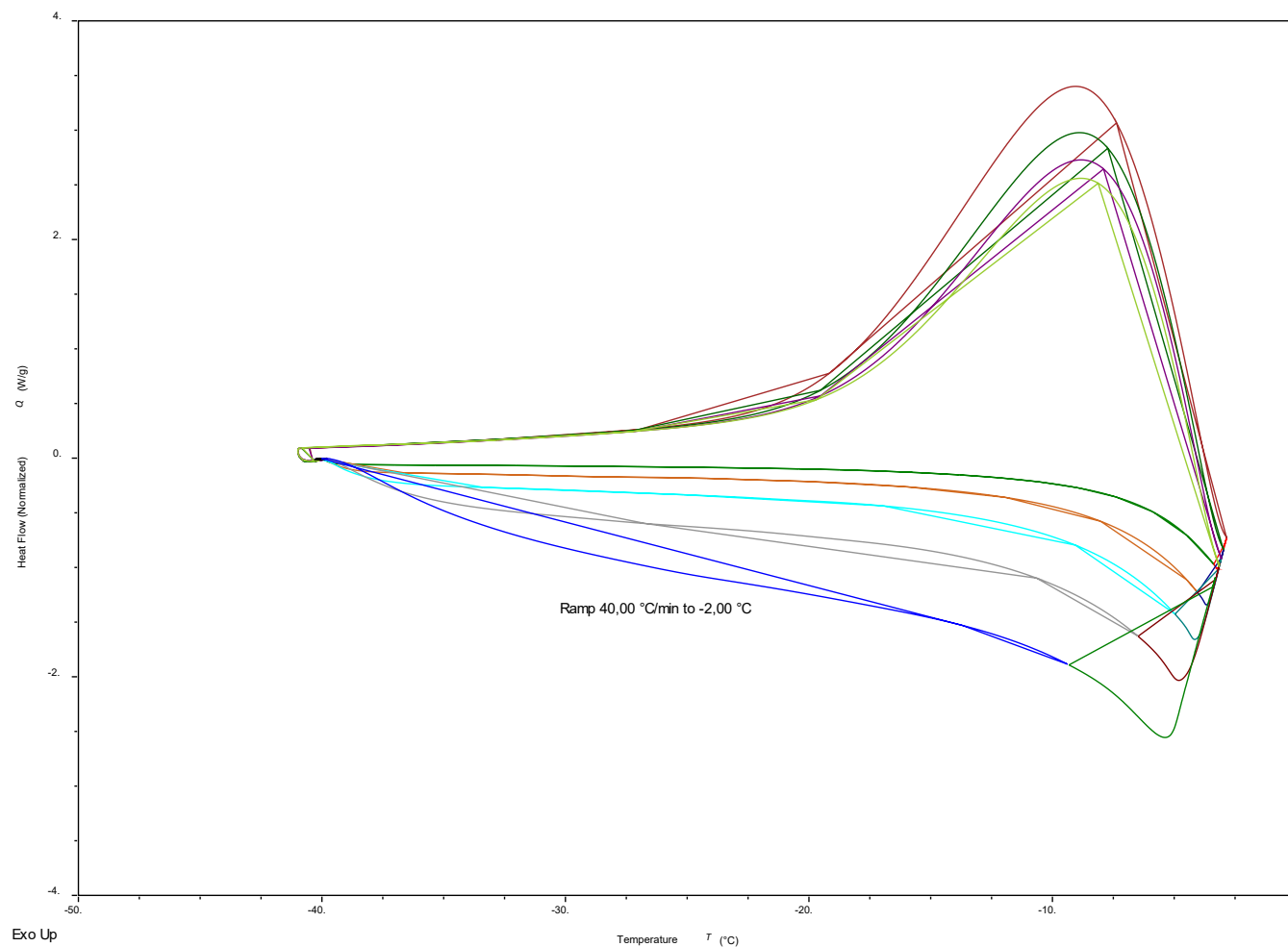


Slika D5A. DSC analiza liposoma s vankomicinom nakon sonikacije (002S) u rasponu temperatura od -30 °C do 80 °C. Plava linija predstavlja hlađenje, dok crvena linija predstavlja zagrijavanje. Izmjerene entalpije taljenja i kristalizacije usporedive su s entalpijom taljenja i karistalizacije vode (333,55 J/g).



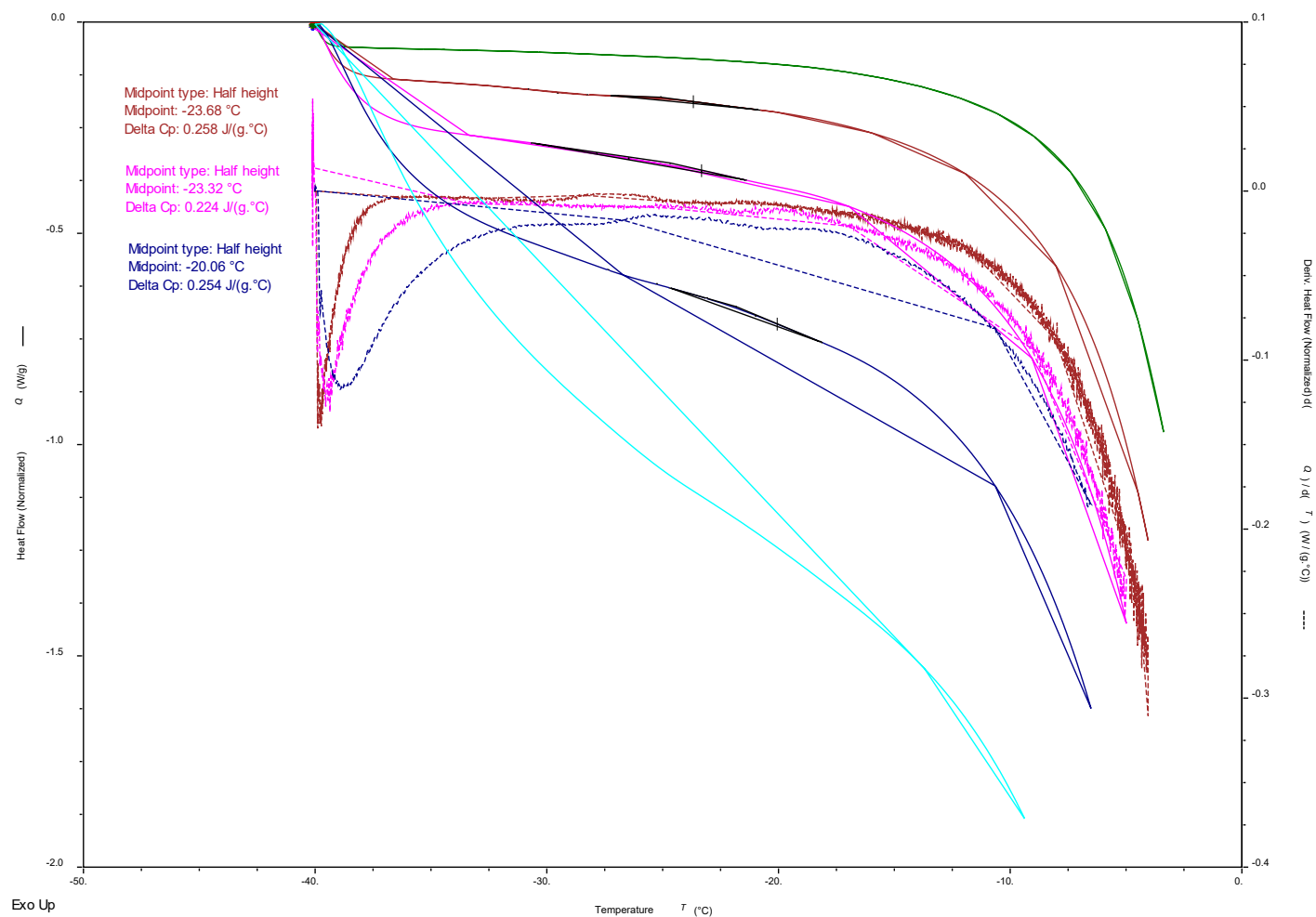
Slika D5B. DSC analiza liposoma s vankomicinom nakon sonikacije (002S) u rasponu od -30 °C do 80 °C (uvećano). Ne uočavaju se drugi termički prijelazi osim taljenja i kristalizacije vode.

003-E dynamic



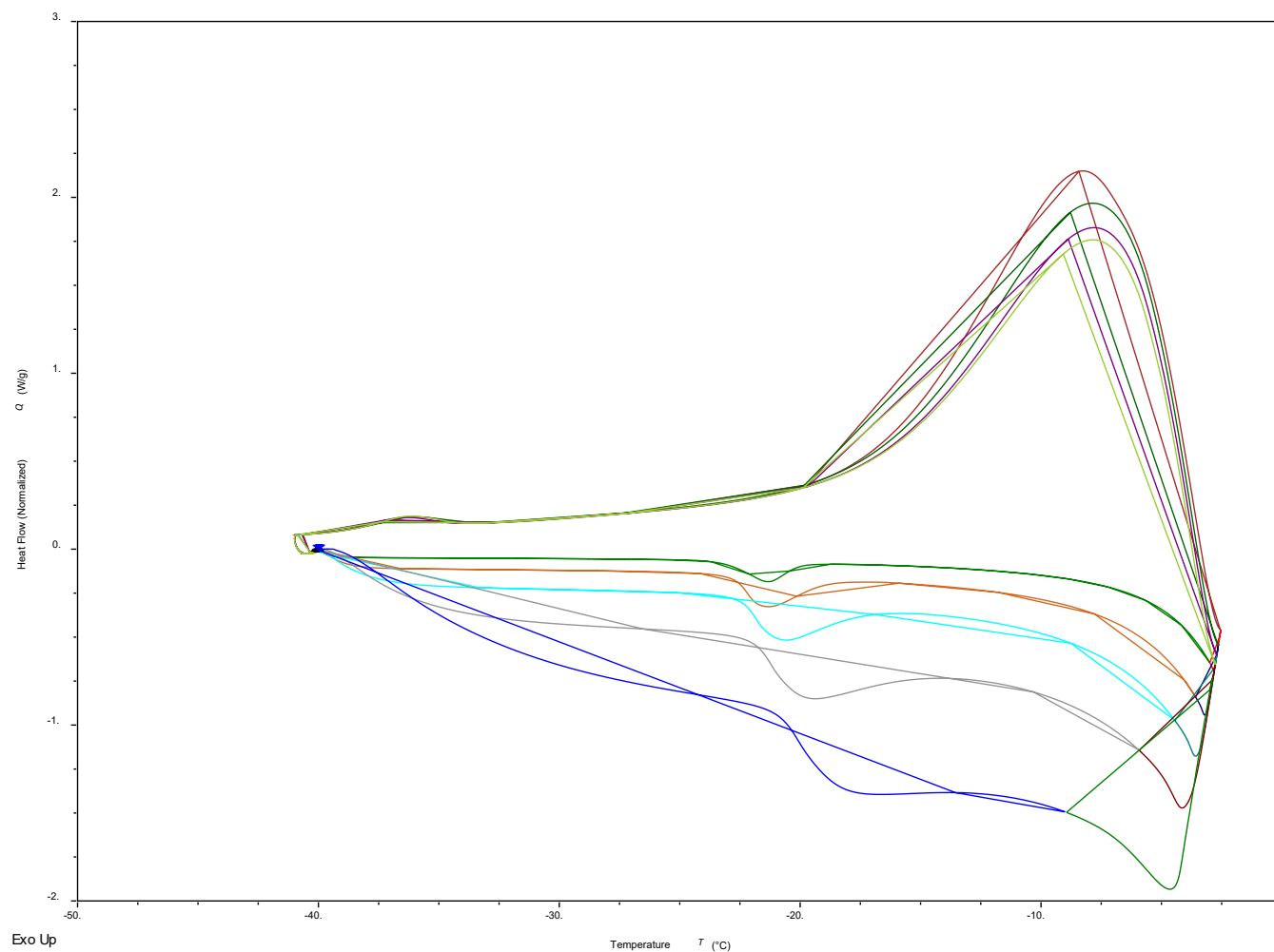
Slika D6A. Ciklička DSC analiza praznih liposoma nakon ekstruzije (003E) u rasponu temperatura od -40 °C do -2 °C pri različitim brzinama zagrijavanja. Ne uočavaju se značajni termički prijelazi. Slike D6A-D10B slijede istu legednu.

003-E dynamic



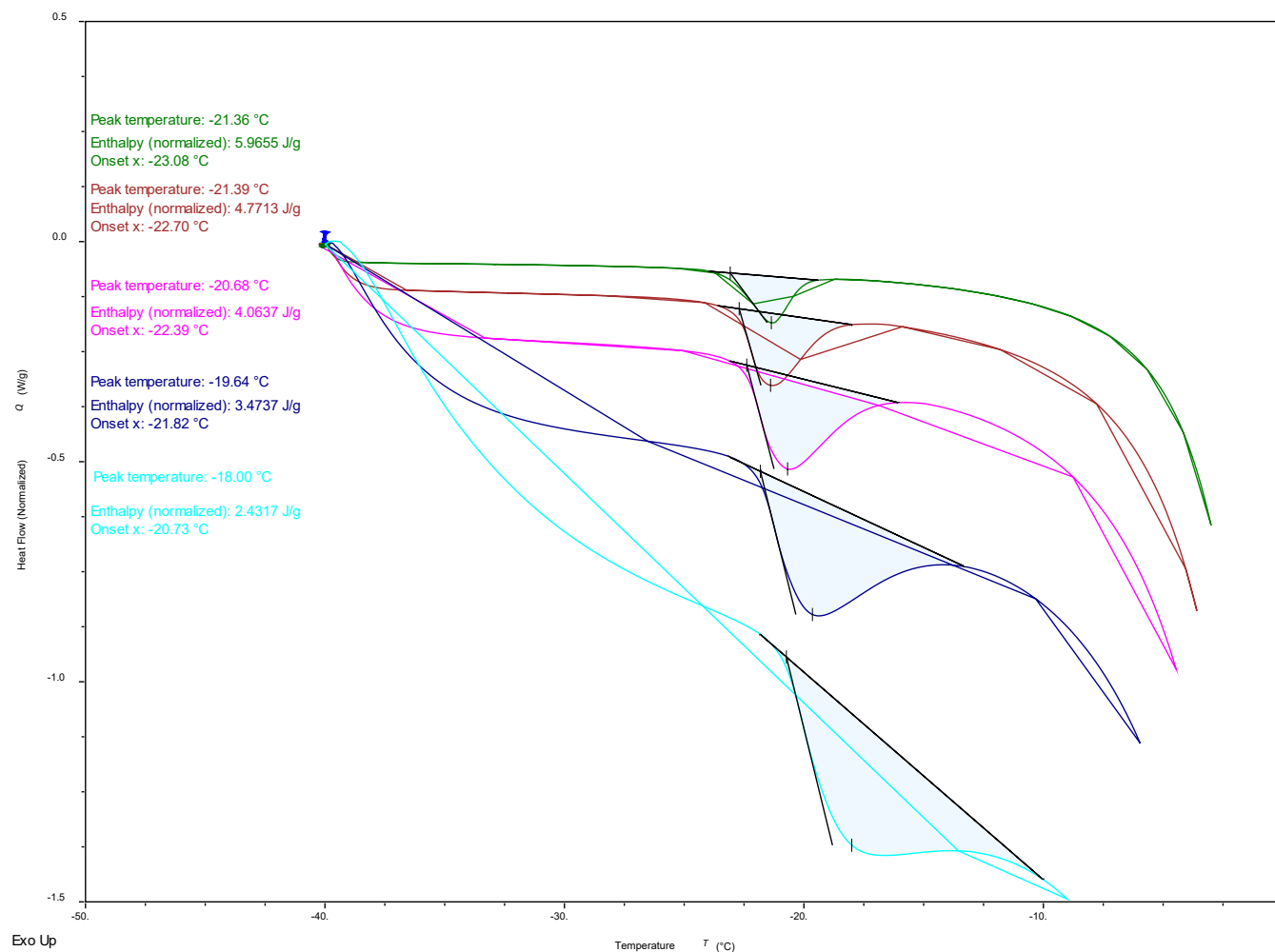
Slika D6B. Ciklička DSC analiza praznih liposoma nakon ekstruzije (003E) u rasponu temperatura od -40 °C do -2 °C, brzine zagrijavanja gledano od gora prema dolje iznose: 2 °C/min, 5 °C/min, 10 °C/min, 20 °C/min i 40 °C/min. Maksimum 1. derivacije (iscrtkana linija) pokazuje mali toplinski kapacitet čak i pri -20 °C.

ZB-003S-DINAMIKA

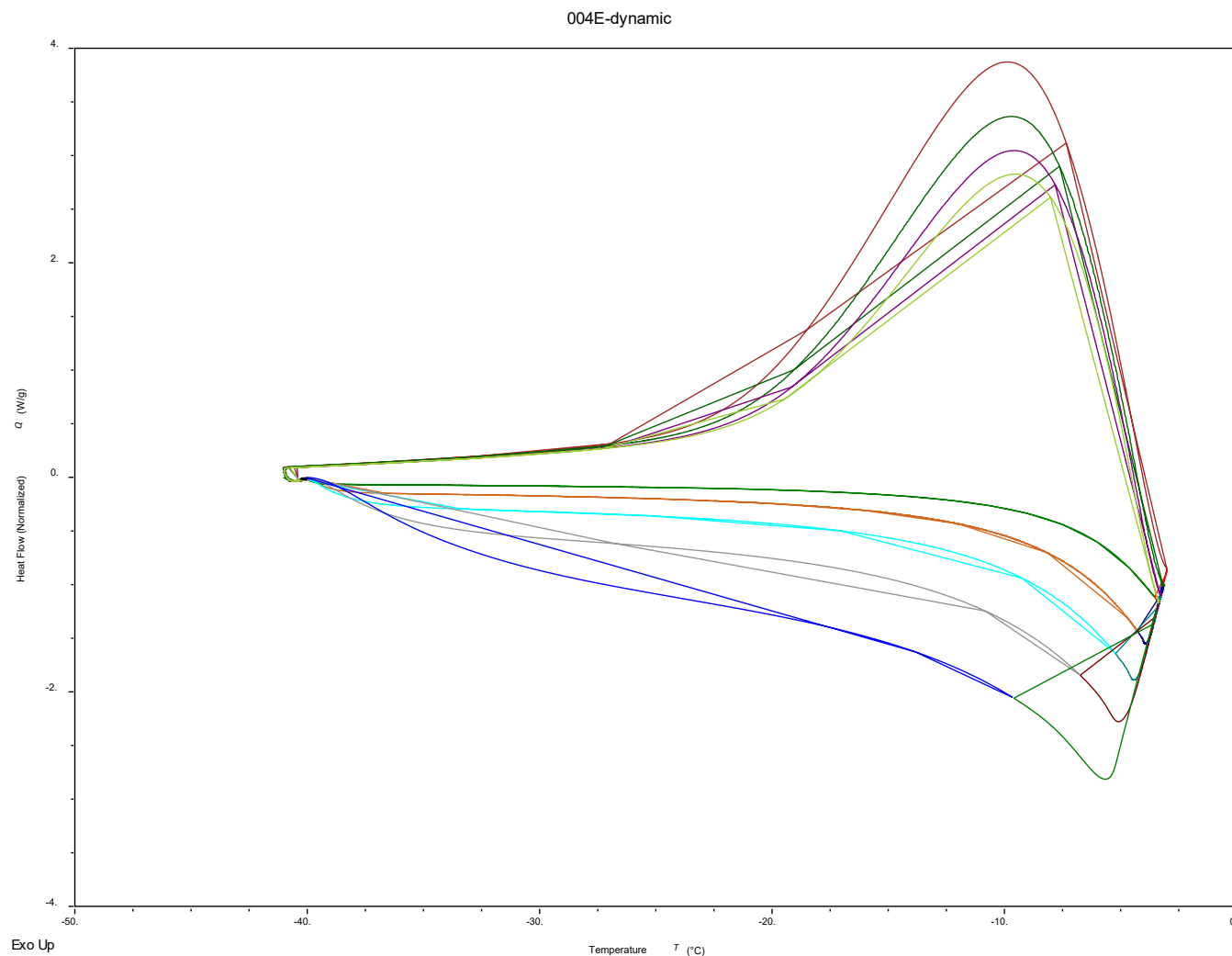


Slika D7A. Ciklička DSC analiza praznih liposoma nakon sonikacije (003S) u rasponu temperatura od -40 $^{\circ}\text{C}$ do -2 $^{\circ}\text{C}$ pri različitim brzinama zagrijavanja. Značajan termički prijelaz vidljiv je pri -20 $^{\circ}\text{C}$ kod zagrijavanja te pri -35 $^{\circ}\text{C}$ kod hlađenja.

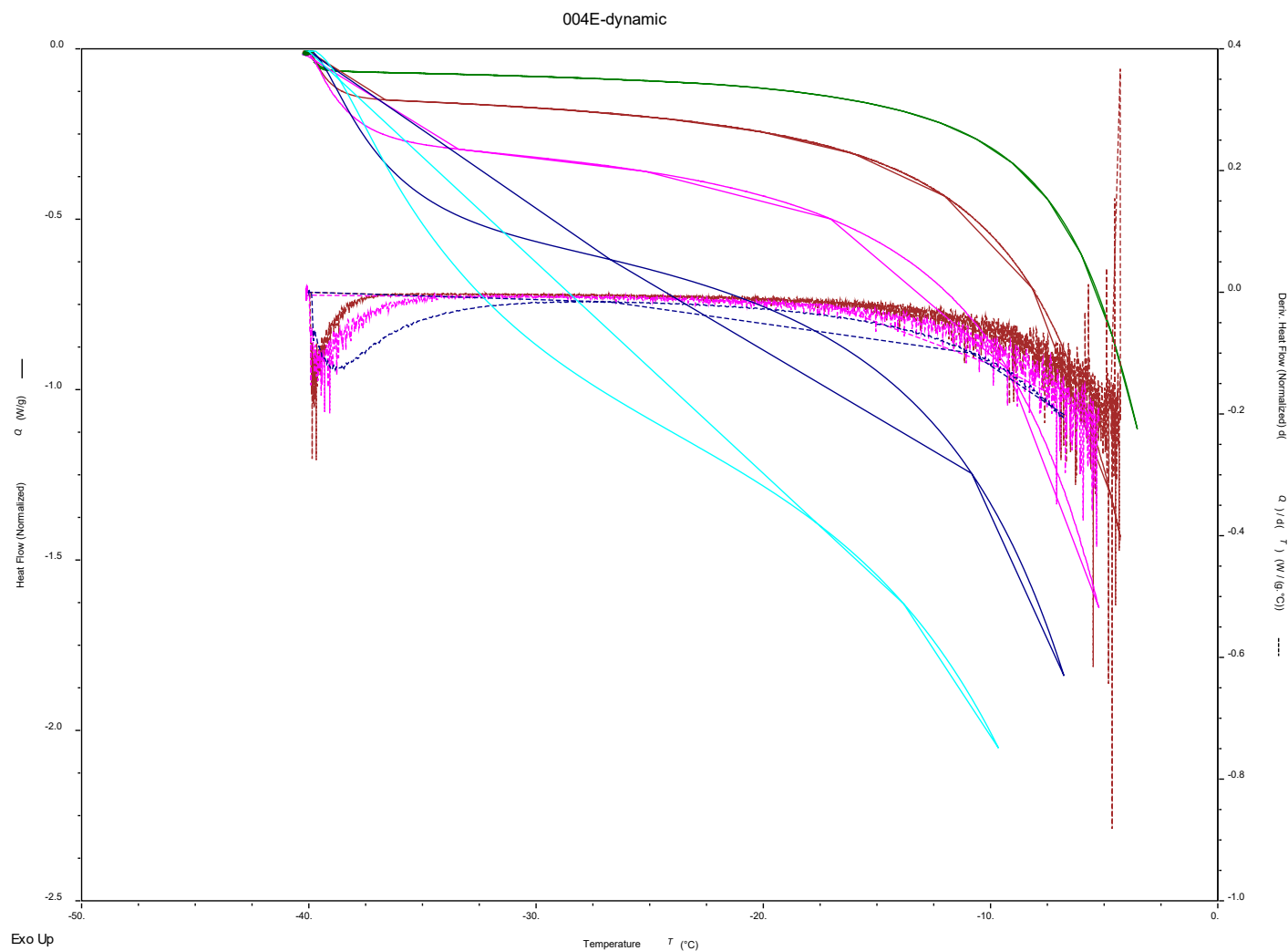
ZB-003S-DINAMIKA



Slika D7B. Ciklička DSC analiza praznih liposoma nakon sonikacije (003S) u rasponu temperatura od -40 °C do -2 °C , brzine zagrijavanja gledano od gora prema dolje iznose: 2 °C/min , 5 °C/min , 10 °C/min , 20 °C/min i 40 °C/min . Pikovi sugeriraju reverzibilni termički događaj koji može odgovarati taljenju liposoma.

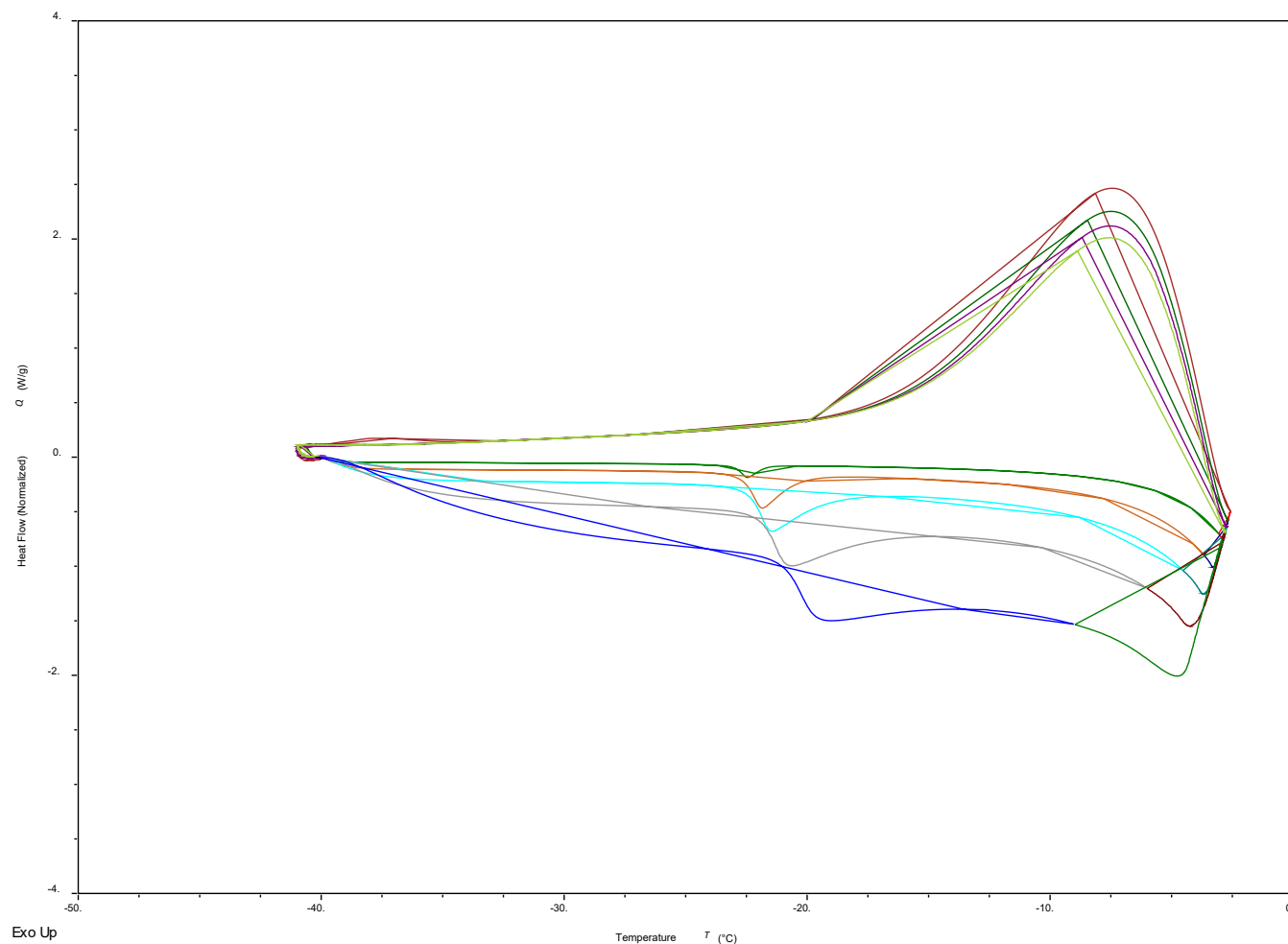


Slika D8A. Ciklička DSC analiza liposoma s vankomicinom nakon ekstruzije (004E) u rasponu temperatura od $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ pri različitim brzinama zagrijavanja. Ne uočavaju se značajni termički prijelazi.



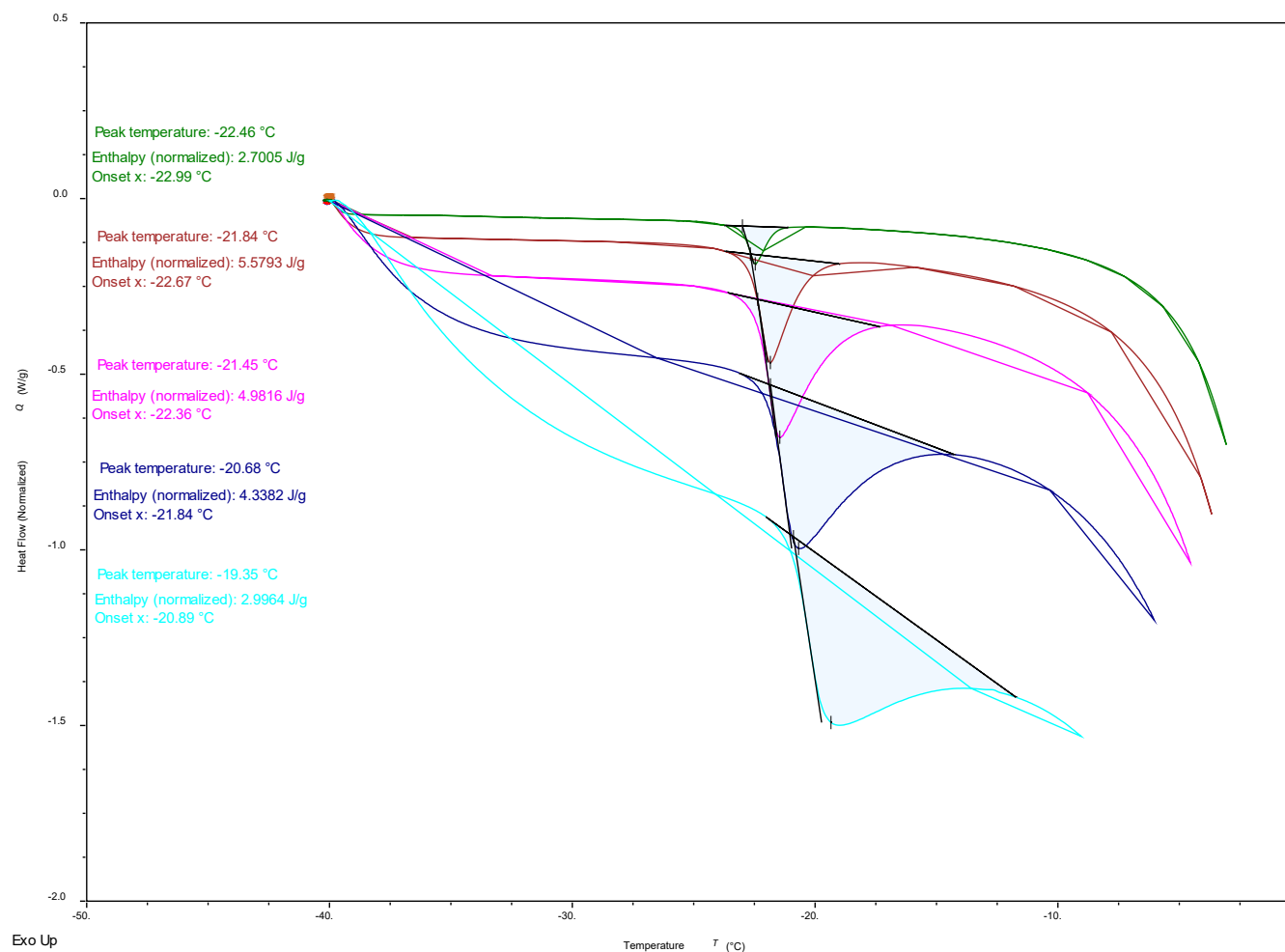
Slika D8B. Ciklička DSC analiza liposoma s vankomicinom nakon ekstruzije (004E) u rasponu temperatura od -40 °C do -2 °C, brzine zagrijavanja gledano od gora prema dolje iznose: 2 °C/min, 5 °C/min, 10 °C/min, 20 °C/min i 40 °C/min. Izostanak maksimuma u 1. derivaciji (iscrtkana krivulja) potvrđuje izostanak termičkih prijelaza u ovom temperaturnom rasponu.

004S-dynamic



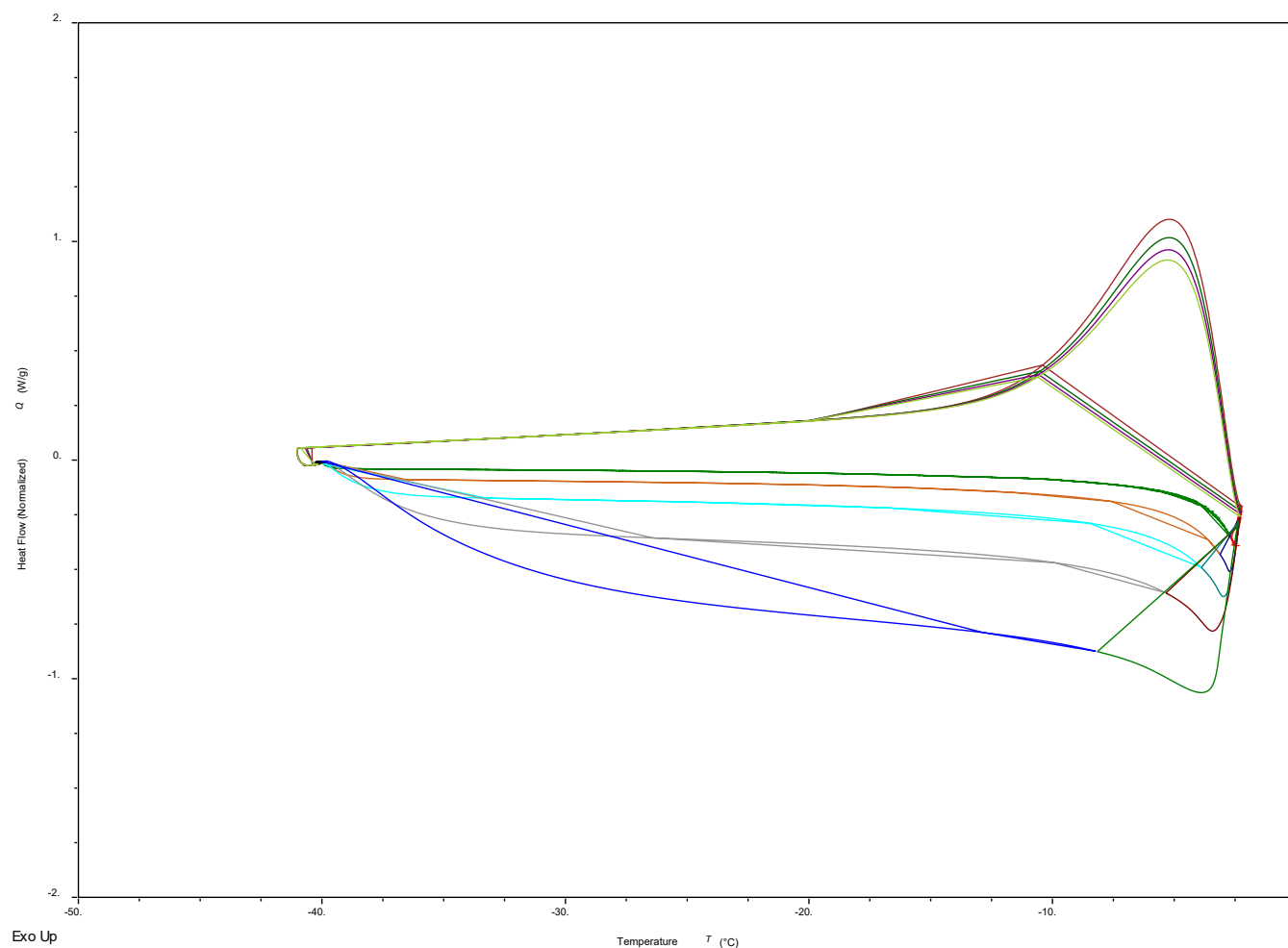
Slika D9A. Ciklička DSC analiza liposoma s vankomicinom nakon sonikacije (004S) u rasponu temperatura od $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ pri različitim brzinama zagrijavanja. Značajan termalni prijelaz vidljiv je pri $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ kod zagrijavanja te pri $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ kod hlađenja.

004S-dynamic

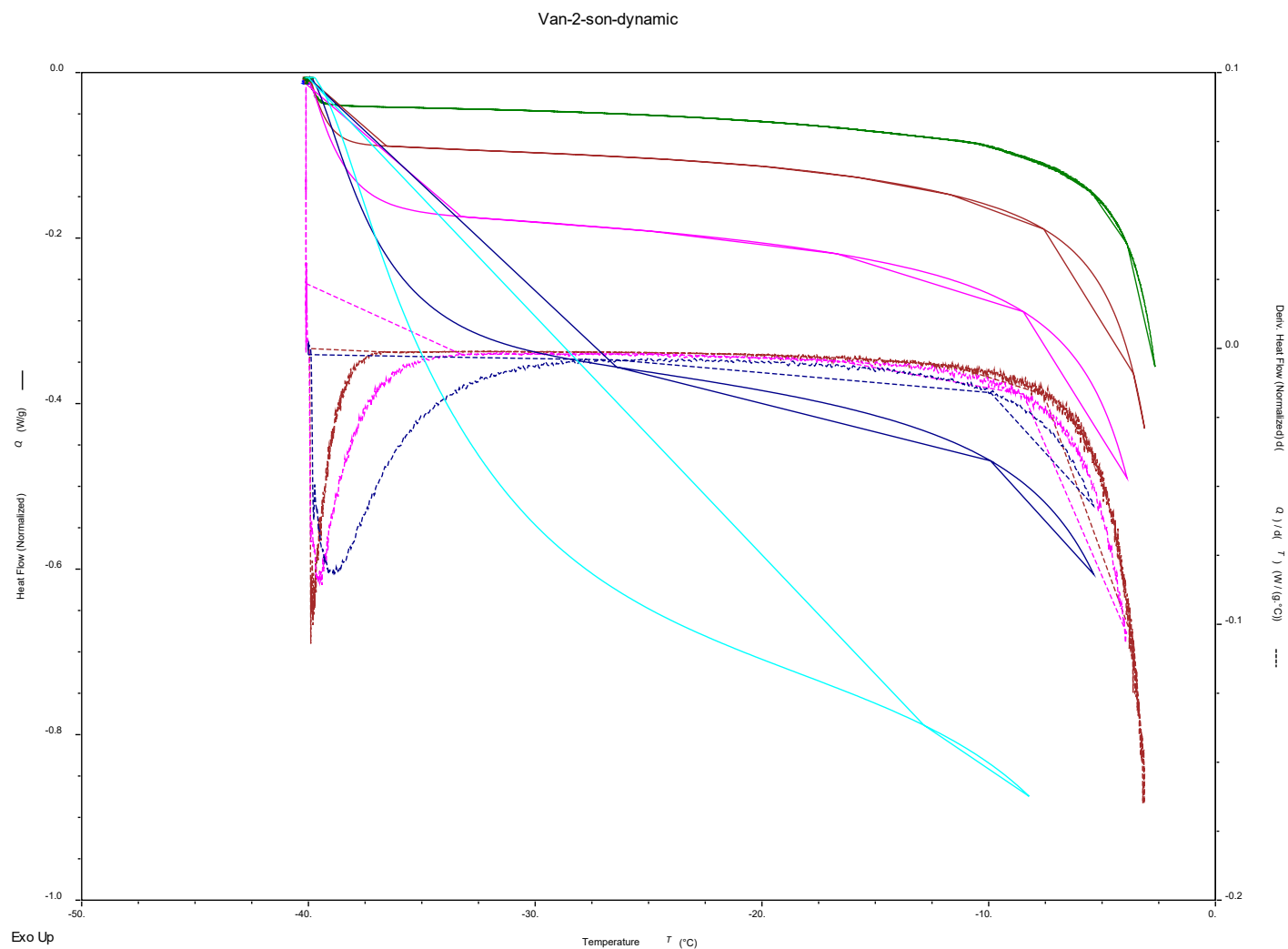


Slika D9B. Ciklička DSC analiza liposoma s vankomicinom nakon sonikacije (004S) u rasponu temperatura od -40 $^{\circ}\text{C}$ do -2 $^{\circ}\text{C}$, brzine zagrijavanja gledano od gora prema dolje iznose: 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ i 40 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Pikovi sugeriraju reverzibilni termički događaj koji može odgovarati taljenju liposoma.

Van-2-son-dynamic



Slika D10A. Ciklička DSC analiza liposoma s vankomicinom nakon sonikacije (002S) u rasponu temperatura od -40 °C do -2 °C pri različitim brzinama zagrijavanja. Ne uočavaju se značajni termički prijelazi.



Slika D10B. Ciklička DSC analiza liposoma s vankomicinom nakon sonikacije (002S) u rasponu temperatura od -40 $^\circ C$ do -2 $^\circ C$, brzine zagrijavanja gledano od gora prema dolje iznose: 2 $^\circ C/min$, 5 $^\circ C/min$, 10 $^\circ C/min$, 20 $^\circ C/min$ i 40 $^\circ C/min$. Izostanak maksimuma u 1. derivaciji (iscrtkana krivulja) potvrđuje izostanak termičkih prijelaza u ovom temperaturnom rasponu.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Barbara Rubinić

Datum rođenja: 12. listopada 1996.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

- 2003.–2010. Osnovna škola [Osnovna škola Ljubo Babić, Jastrebarsko]
- 2010.–2011. Osnovna škola [Osnovna škola Lučko, Lučko]
- 2011.–2015. Srednja škola [I. Gimnazija, Zagreb]
- 2015.–2021. Integrirani preddiplomski i diplomski studij [medicina, Medicinski fakultet, Sveučilište Zagreb, Zagreb]
- 2016.–2019. Preddiplomski studij [kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb]
- 2019.–2021. Diplomski studij [kemija, smjer istraživački, smjer Biokemija i organska kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb]

Nagrade i priznanja

2020. Posebna Dekanova nagrada za projekt „Čuvajmo naše srce“
2019. Rektorova nagrada za istraživački rad: Sinteza i karakterizacija derivata cimetne kiseline i harmina
2019. Rektorova nagrada za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici: Croatian Students Summit (CROSS15: Transplantation)
2017. Dekanova nagrada za uspjeh u studiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2014. Nagrada Nasilje nije hrabrost: Luka Ritz
2014. Nagrada gradonačelnika Jastrebarskog za volontiranje
2014. Oskar znanja – 1. mjesto na Državnom natjecanju iz kemije

Iskustvo

- 8/2020. Stručna praksa u bolnici „Maria Hilf Warstein“, Warstein, Njemačka
- 1/2018.-9/2019. volontiranje na Zavodu za farmaceutsku kemiju na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Natjecanja

2012. Državno natjecanje iz kemije 1. razred (9. mjesto)
2013. Državno natjecanje iz kemije 2. razred (3. mjesto)
2014. Državno natjecanje iz kemije 3. razred (1. mjesto)
2015. Državno natjecanje iz kemije 4. razred (5. mjesto)
2015. Međunarodna kemijska olimpijada, Baku, Azerbajdžan (IChO)

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

- 2019.-2021. pripreme i sastavljanje zadataka za izlučni ispit za Mendeljejevu kemijsku olimpijadu
2018. predavanje i eksperimentalni rad u području kemije s učenicima srednjih škola u Centru za izvrsnost Bjelovar
2016. dizaj i izvođenje radionica o acetil-salicilnoj kiselini u trajanju tjedan dana za učenike 7. i 8. razreda osnovne škole kao dio „Ljetne tvornice znanosti“ u Samoboru

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. Barbara Rubinić, Maja Beus, Zrinka Rajić Đolić, Branka Zorc, Dizajniranje i sinteza derivata klorokina kao potencijalnih Michaelovih akceptora, Simpozij studenata farmacije i medicinske biokemije (FARMEBS) 2018, 2018., oralna prezentacija
2. Barbara Rubinić, Luca Udovičić, Sinteza i karakterizacija novih derivata cimetine kiseline i harmina, Simpozij studenata kemičara (SiSK) 6., 2019., oralna prezentacija
3. Barbara Rubinić, Mia Dubravčić, Hrvoje Jurin, Danijel Lovrić, Borka Pezo-Nikolić, Mislav Puljević, Vedran Velagić, Davor Puljević, Significant improvement of systolic

function after pulmonary vein isolation by cryoablation – a case report, 13. Hrvatski kardiološki konges s međunarodnim sudjelovanjem, 2020., poster prezentacija

Publikacije

1. Kristina Pavić, Barbara Rubinić, Zrinka Rajić, Diana Fontinha, Miguel Prudêncio, Lidija Uzelac, Marijeta Kralj, Jana Held, Branka Zorc, Primaquine homodimers as potential antiplasmodial and anticancer agents, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 29, Issue 19, 2019, 126614

Projekti i organizacije

2018.-2021. Dio projekta „Čuvajmo naše srce“, a od 2019. i voditeljica istog projekta koji ima za cilj edukaciju učenika srednjih škola o načinu i važnosti primarne prevencije kardiovaskularnih bolesti

2019.-2021. Predsjednica Studentske sekcije za kardiologiju, Medicinski fakultet

2018./2019. Član vijeća Studentske sekcije za kardiologiju, Medicinski fakultet

2020. Koautor prijevoda knjige s engleskog na hrvatski jezik – „Ova knjiga misli da si istraživač“

2018.-2020. Znanstveni odbor kongresa Croatian Students Summit (CROSS)

2018. Koautor prijevoda knjige s engleskog na hrvatski jezik – „Ova knjiga misli da si znanstvenik“

Volontiranje

12/2020-2/2021 Volontiranje na Klinici za infektivne bolesti „dr. Fran Mihaljević“ radi SARS-CoV-2 pandemije

11/2020 Volontiranje na Hrvatskom zavodu za javno zdrastvo radi SARS-CoV-2 pandemije

2017.-2021. Pripreme za Državnu maturu iz kemije, salezijanska zajednica, Župa Svete Mati Slobode

2013.-2015. Volonter u Specijalnoj bolnici za kronične bolesti dječje dobi
Gornja Bistra

2013.-2015. član Volonterskog kluba u I. Gimnaziji (u 4. razredu predsjednica kluba) te volontiranje kao dio kluba u pučkoj kuhinji, organizacija Božićnog koncerta u Domu za starije i nemoćne, prikupljanje sredstava za organizaciju „Marijini obroci“ te prezentacije volontiranja u drugim srednjim školama što je rezultiralo osivanjem volonterskih klubova u tim školama

