

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KLEMENTINA KOZODERC

**DIPLOMSKA NALOGA**  
**UNIVERZITETNI ŠTUDIJ KOZMETOLOGIJE**

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KLEMENTINA KOZODERC

**VPLIV DERIVATOV D-GLUKONAMIDA NA LASTNOSTI LIPOSOMOV**

**IMPACT OF D-GLUCONAMIDE DERIVATIVES ON LIPOSOME  
CHARACTERISTICS**

Ljubljana, 2014

Diplomsko naloge sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Petre Kocbek in somentorstvom asist. dr. Staneta Pajka. Masno spektrometrične analize so opravili na Inštitutu Jožef Stefan, elementne analize pa na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani.

### **Zahvala**

*Iskreno se zahvaljujem mentorjema doc. dr. Petri Kocbek in asist. dr. Stanetu Pajku za vsestransko pomoč, ves trud in, ker sta si vedno vzela čas za razlago ter usmerjanje pri nastajanju diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi vsem ostalim prisotnim v laboratorijih Katedre za farmacevtsko tehnologijo in Katedre za farmacevtsko kemijo, za koristne nasvete, Inštitutu Jožef Stefan za opravljene masno spektrometrične analize in Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani za elementne analize.*

*Zahvala tudi staršem, da so mi omogočili študij, ter fantu Klemnu za potrpežljivost tekom nastajanja diplome.*

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko naloge samostojno izdelala pod vodstvom mentorice doc. dr. Petre Kocbek in somentorja asist. dr. Staneta Pajka.

Klementina Kozoderc

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Matjaž Jeras

Član komisije: doc. dr. Ilija Ilić

## Vsebina

POVZETEK .....	III
ABSTRACT.....	IV
SEZNAM OKRAJŠAV .....	V
1 UVOD .....	1
1.1 LIPOSOMI.....	1
1.1.1 SESTAVA IN NASTANEK LIPOSOMOV .....	1
1.1.2 LIPIDNI DVOSLOJ IN HOLESTEROL.....	2
1.2 METODE IZDELAVE LIPOSOMOV .....	3
1.3 FIZIKALNA STABILNOST LIPOSOMOV .....	4
1.3.1 STABILIZACIJA LIPOSOMOV.....	5
1.3.1.1 STERIČNA STABILIZACIJA .....	5
1.3.1.2 ELEKTROSTATSKA IN ELEKTROSTERIČNA STABILIZACIJA.....	7
1.4 VREDNOTENJE LIPOSOMOV .....	8
1.4.1 FOTONSKA KORELACIJSKA SPEKTROSKOPIJA (PCS) .....	8
1.4.2 LASERSKA DOPPLERJEVA ANEMOMETRIJA .....	8
1.5 DERMALNA UPORABA LIPOSOMOV .....	9
2 NAMEN DELA .....	10
3 MATERIALI IN METODE .....	11
3.1 SINTEZA POMOŽNIH SNOVI ZA STABILIZACIJO LIPOSOMOV NA OSNOVI D-GLUKONAMIDA .....	13
3.1.1 SINTEZA (2S,3S,4R)-N-heksadecil-2,3,4,5,6-pentahidroksiheksanamida (SKK-1) ....	13
3.1.2 SINTEZA (2S,3S,4R)-N-((3R,10S,13R,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)heksadekahidro-1 <i>H</i> -ciklopenta[ <i>a</i> ]fenantren-3-il)-2,3,4,5,6-pentahidroksiheksanamida (SKK-4).....	14
3.1.3 SINTEZA (2S,3S,4R)- <i>N</i> -(2-(((10 <i>R</i> ,13 <i>R</i> ,17 <i>R</i> )-10,13-dimetil-17-(( <i>R</i> )-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradekahidro-1 <i>H</i> -ciklopenta[ <i>a</i> ]fenantren-3-il)amino)etyl)-2,3,4,5,6-pentahidroksiheksanamida (SKK-6) .....	16
3.2 PRIPRAVA LIPOSOMOV IN METODE NJIHOVEGA VREDNOTENJA.....	17
3.2.1 PRIPRAVA LIPOSOMOV .....	17
3.2.2 EKSTRUDIRANJE DISPERZIJE LIPOSOMOV .....	18
3.2.3 VREDNOTENJE LIPOSOMOV .....	18
4 REZULTATI IN RAZPRAVA .....	20

4.1	SINTEZA POMOŽNIH SNOVI ZA STABILIZACIJO LIPOSOMOV NA OSNOVI D-GLUKONAMIDA .....	20
4.2	PRIPIRAVA LIPOSOMOV .....	23
4.3	VPLIV SINTETIZIRANIH POMOŽNIH SNOVI NA LASTNOSTI LIPOSOMOV .....	25
4.3.1	VREDNOTENJE LIPOSOMOV Z EPR .....	25
4.3.2	VREDNOTENJE POVPREČNE VELIKOSTI IN VREDNOSTI PI LIPOSOMOV TAKOJ PO IZDELAVI .....	26
4.3.3	FIZIKALNA STABILNOST LIPOSOMOV .....	27
4.3.3.1	NEEKSTRUDIRANE DISPERZIJE LIPOSOMOV .....	27
4.3.3.2	DISPERZIJE LIPOSOMOV PO 10 PREHODIH SKOZI MEMBRANO .....	29
4.3.3.3	DISPERZIJE LIPOSOMOV PO 20 PREHODIH SKOZI MEMBRANO .....	31
4.3.4	VPLIV SINTETIZIRANIH POMOŽNIH SNOVI NA ZETA POTENCIAL LIPOSOMOV .....	32
4.3.5	VPLIV DELEŽA SINTETIZIRANIH POMOŽNIH SNOVI NA LASTNOSTI DISPERZIJ LIPOSOMOV .....	35
4.3.5.1	LIPOSOMI Z SKK-4 .....	35
4.3.5.2	LIPOSOMI Z SKK-6 .....	38
4.4	VREDNOTENJE LIPOSOMOV Z INVERTNIM OPTIČNIM MIKROSKOPOM .....	43
5	SKLEP .....	44
6	LITERATURA .....	46
7	PRILOGE .....	50

## POVZETEK

Liposomi so metastabilne strukture, ki so kinetično stabilne, termodinamsko pa ne. Večina uporabljenih stabilizatorjev lipidnega dvosloja je polimerov, ki se adsorbirajo na površino, zato je bil namen diplomske naloge sintetizirati strukturno enostavnejše pomožne snovi, in sicer derivate D-glukonamida, z manjšo molekulsko maso, kot jih imajo polimeri, ki pa se v lipidni dvosloj vgradijo. Holesterolni ostanek jih zagotavlja močno lipofilno sidro za vgrajevanje v lipidni dvosloj, s tem ga modificirajo, njihove velike polarne glave pa zaradi obsežne hidratacije in iztezanja iz lipidnega dvosloja v disperzni medij, izboljšajo fizikalno stabilnost liposomov. Liposome smo pripravili z metodo tankih filmov, ki jim je sledila ekstruzija, in sicer iz nenasičenih fosfolipidov, tako, da smo 10 ali 40 % (m/m) delež holesterola v recepturi nadomestili s sintetiziranimi pomožnimi snovmi (glavni in vmesni produkti sinteze). Z izbranimi derivati D-glukonamida smo nadomestili le del holesterola v recepturi, in sicer tako, da je bila vsebnost le-teh 1, 2, 3, 4 ali 5 % (m/m). Ekstrudirane disperzije liposomov (20 prehodov) s sintetiziranimi pomožnimi snovmi so bile večinoma transparentne, brez prisotnosti oborine in so tak izgled ohranile vsaj še 2 meseca po izdelavi. Sposobnost vgrajevanja izbranih sintetiziranih derivatov D-glukonamida v lipidni dvosloj smo potrdili z elektronsko paramagnetno oz. spinsko resonanco. Prisotnost omenjenih pomožnih snovi v lipidnem dvosloju vpliva na povprečno velikost veziklov, kar smo določali s fotonsko korelacijsko spektroskopijo. Zeta potencial liposomov z vključenimi sintetiziranimi pomožnimi snovmi pa kaže na njihovo boljšo fizikalno stabilnost, v primerjavi s tistimi, ki vsebujejo holesterol, kar smo dokazali z lasersko Dopplerjevo anemometrijo. Z invertno optično mikroskopijo pa smo uspeli prikazati neekstrudirane disperzije liposomov z vgrajeno spojino, ki je imela prilagodljiv kratek distančnik med izrazito lipofilnim sterolom in hidofilnim sladkorjem. Ugotovili smo, da bi bila disperzija liposomov s 40 % sintetiziranega (2S,3S,4R)-N-((3R,10S,13R,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)heksadekahidro-1H-ciklopenta[*a*]fenantren-3-il)-2,3,4,5,6-pentahidroksiheksanamida (**SKK-4**) glede na konsistenco primerna za dermalni nanos, medtem ko bi pri ostalih proučevanih disperzijah liposomov morali dodati zgoščevala, za doseganje primerne konsistence za tovrstno aplikacijo. Sintetizirane spojine predstavljajo obetavne pomožne snovi za stabilizacijo liposomov, vendar bi pred njihovo morebitno uporabo na koži, morali izvesti ustrezne toksikološke raziskave.

**KLJUČNE BESEDE:** liposomi, derivati D-glukonamida, stabilizacija

## ABSTRACT

Liposomes are metastable structures which are kinetically, but not thermodynamically stable. The most common stabilizers of the lipid bilayer are polymers, which are adsorbed onto the surface, therefore, is the purpose of this diploma thesis to synthesize simpler excipients, D-gluconamide derivatives, with a lower molecular weight as polymers, which would be incorporated into the lipid bilayer. The cholesterol residue represent strong lipophilic anchor for incorporation into the lipid bilayer, thereby modifying it, their large polar heads due to extensive hydration and extention from lipid bilayer into the dispersion medium, improve the physical stability of liposomes. We prepared liposomes by the method of thin films, with following extrusion from unsaturated phospholipids. We replaced 10 or 40% (m/m) share of cholesterol in the formulation with synthesised excipients (the main and intermediate products of synthesis). In the case of selected D-gluconamide derivatives we replaced only part of the cholesterol in the formulation so that the content of these was 1, 2, 3, 4, or 5% (m/m). Extruded dispersions of liposomes (20 passages) with synthesised excipients used were mostly transparent, without precipitate and have maintained such appaerance for at least 2 months after preparation. With an electron paramagnetic (spin) resonance we confirmed the incorporation of selected D-gluconamide derivatives into the lipid bilayer. The presence of mentioned excipients in the lipid bilayer effects the average size of the vesicles, which was determined by photon correlation spectroscopy. Zeta potential of liposomes with synthesized excipients incorporated, illustrates their better physical stability compared with the cholesterol liposomes, which was determined by laser Doppler anemometry. With inverted optical microscopy we managed to show nonextruded dispersion of liposomes with compound, which had a flexible short spacer between the highly lipophilic sterol and hydrophilic sugar. We have found that the dispersion of liposomes with 40 % of (2S,3S,4R)-N-((3R,10S,13R,17R)-10,13-dimethyl-17-((R)-6-methylheptan-2-yl)hexadecahydro-1H-cyclopenta[*a*]phenanthren-3-yl)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexanamide (**SKK-4**) would be, according to their consistency, suitable for dermal application, while to the rest of studied dispersions of liposomes, we would have to add thickening agents to achive suitable consistency for this kind of application. Synthesized compounds represent potential excipients for stabilization of liposomes, but before their potential application on the skin, we need to perform corresponding toxicological studies.

**KEYWORDS:** liposomes, D-gluconamide derivatives, stabilisation

## SEZNAM OKRAJŠAV

GDL	D-(+)-Glukonska kislina- $\delta$ -lakton
DKM	diklorometan
EPR	elektronska paramagnetna (spinska) resonanca
KAS	kozmetično aktivna sestavina
MeFASL (2, 11)	metilni ester 13-doksil palmitinske kisline
MF	mobilna faza
NMR	nuklearna magnetna resonanca
PAS	površinsko aktivna snov
PCS	fotonska korelacijska spektroskopija
PEG	polietilenglikol
PI	polidisperzni indeks
SD	standardna deviacija
TLC	tankoplastna kromatografija
Tm	temperatura glavnega prehoda lipidov
ZP	zeta potencial

## 1 UVOD

### 1.1 LIPOSOMI

Liposomi so mikroskopski vezikli, sestavljeni iz enega ali več fosfolipidnih dvoslojev, ki v koncentrično obliko zaobjamejo enako število vodnih predelov. Prav zaradi te edinstvene strukture je nabor možnosti za njihovo uporabo velik. Primerni so za vgrajevanje hidrofilnih, hidrofobnih in amfifilnih kozmetično aktivnih sestavin (KAS) (1, 2).

Njihova velikost je običajno med 20 in 500 nm (3). Kadar fosfolipidni dvosloj zajame vodno jedro, je nastali vezikel unilamelaren. Glede na velikost je tak vezikel lahko majhen ali velik. V primeru nastanka unilamelarnih veziklov z velikostjo več kot 1000 nm, le-te opredelimo kot gigantske unilamelarne vezikle. Kadar je v veziklu večje število koncentričnih fosfolipidnih dvoslojev, ki jih ločuje enako število vodnih predelov, govorimo o velikih multilamelarnih veziklih. Kot novost se pojavljajo tudi dvojni liposomi, ki jih sestavljajo tisti, ki vsebujejo več manjših veziklov in multivezikularni liposomi, za katere je značilen neprekinjen zunanji lipidni dvosloj in številni notranji vodni predeli, medsebojno ločeni s pregradami lipidnega dvosloja. Na velikost in slojnost liposomov vplivata metoda izdelave in sama njihova sestava. Vezikli niso statične, ampak so dinamične strukture, zato se njihova oblika spreminja (2, 3, 4, 5, 6, 7).

#### 1.1.1 SESTAVA IN NASTANEK LIPOSOMOV

Poglavitna sestavina liposomov so naravni ali sintezi fosfolipidi. Prisotnost hidrofilne glave in dveh lipofilnih repov v molekulah fosfolipidov jim daje sposobnost, da se v vodnem okolju spontano organizirajo v sferično urejene dvosloje (1, 2, 8).

Spontana organizacija amfifilnih, površinsko aktivnih snovi (PAS) v vodnem okolju je odvisna od njihove molekulske strukture in je termodinamsko pogojena. Zaradi hidrofilnih in hidrofobnih lastnosti PAS se lahko v vodnem okolju organizirajo v morfološko različne strukture. Samozdruževanje amfifilnih molekul in agregiranje micelov ter veziklov je posledica t.i. hidrofobnega efekta, katerega gonilna sila je težnja po minimizaciji stika hidrofobnih delov z vodnim okoljem. Odbojne sile, ki delujejo med vezikli, so posledica steričnega učinka zaradi hidratacije polarnih glav PAS, ki sestavljajo vezikle. V primeru prisotnosti ionogenih PAS v lipidnem dvosloju veziklov, pa delujejo tudi elektrostatske odbojne sile med nabitimi funkcionalnimi skupinami polarne glave (5).

### **1.1.2 LIPIDNI DVOSLOJ IN HOLESTEROL**

Holesterol vgrajujemo v liposome zaradi uravnavanja fluidnosti lipidnih dvoslojev, kar vgrajeni učinkovini zagotavlja, da ostane ujeta v dostavni sistem (9). Hidrofobni steroidni obroč holesterola se zasidra med verige fosfolipidov v lipidnem dvosloju, medtem ko njihova hidroksilna skupina zagotavlja amfifilni značaj molekule, saj se orientira proti vodni fazi. Hidroksilna skupina omogoča tvorbo vodikovih vezi z molekulami vode ter s polarnimi glavami molekul lipidov. Holesterolov obročni sistem zagotavlja planarnost in rigidnost molekule, medtem ko je stranska izooktilna veriga fleksibilna (10, 11).

Pri temperaturi glavnega prehoda ( $T_m$ , v literaturi se pojavlja tudi kratica  $T_c$ ) se zgodi prehod urejene gelske faze fosfolipidov v fluidno, pri čemer se površina membrane poveča, debelina membrane stanjsa, stopnja urejenosti lipidov v membrani pa zmanjša. Ti prehodi so pomembni tudi v bioloških membranah, saj je za preživetje celic pomembno ohranjanje njihove fluidnosti. V bioloških membranah je vsebnost holesterola tudi do 40 %, kar močno vpliva na organizacijo fosfolipidov v njih. V zmesi različnih lipidov, brez prisotnosti holesterola, pride do prehoda med fluidno in gelsko fazo znotraj širšega temperaturnega območja. Prisotnost holesterola v membrani namreč preprečuje prehod fosfolipidov v gelsko fazo in tako pomembno vpliva na ohranjanje njene fluidnosti, hkrati pa vpliva tudi na lokalno strukturo membrane, in sicer tako, da omogoča nastanek območij, v katerih je porazdelitev lipidov neenakomerna. Tako neurejeno stanje ni ugodno za fuzijo membran. Fuzija je namreč olajšana, takrat ko je urejenost fosfolipidov v lipidnem dvosloju povečana. Interakcije med steroidnim skeletom holesterola in alkilnimi repi fosfolipidov vodijo v nastanek tekoče urejene faze, za katero je značilno, da je v primerjavi s tekočo neurejeno fazo debelejša in manj prožna, prehajanja molekul fosfolipidov iz ene strani na drugo stran lipidnega dvosloja pa je manj (9, 12, 13).

V membrani, ki je zgrajena iz fosfolipidov in holesterola, pride do ločevanja na območja z obilico holesterola, ki predstavljajo tekočo urejeno fazo in na področja revna s holesterolom, ki predstavljajo tekočo neurejeno fazo. Vzrok za takšno obnašanje so razlike v afiniteti med lipidi in holesterolom, zato se slednji različno meša s fosfolipidi in sicer glede na stopnjo nasičenosti njihovih ogljikovodikovih verig (nepolarnih repov) ter glede na naravo prisotnih polarnih skupin. Zaradi manjše dinamike nasičenih verig maščobnih kislin v fosfolipidih, teži holesterol prednostno k interakcijam z njimi, zato se z njimi tesneje veže kot z nenasičenimi (9, 13, 14).

## 1.2 METODE IZDELAVE LIPOSOMOV

Znanih je več metod izdelave liposomov, med katere sodijo: metoda tankih filmov, dispergiranje fosfolipidov v vodno fazo s homogenizatorjem rotor-stator, injiciranje etanolne ali etrne raztopine fosfolipidov v vodno fazo, detergentna dializa in uporaba proliposomov (3, 15, 16). Pri izbiri ustrezne metode moramo upoštevati predvsem fizikalno-kemijske lastnosti uporabljenih sestavin in naravo disperznega medija. Na izbiro metode vpliva tudi želena velikost liposomov in njihova polidisperznost. Kadar potrebujemo liposome za vgrajevanje KAS, moramo upoštevati tudi njeno ciljno vsebnost v končni formulaciji ter njeno potencialno toksičnost in pot vnosa v organizem. V primeru izdelave liposomov v velikem obsegu, moramo pri izbiri metode za njihovo izdelavo upoštevati tudi ponovljivost med proizvodnimi serijami (15).

### **Metoda tankih filmov**

Pri izdelavi liposomov z metodo tankih filmov, zmes lipidov najprej raztopimo v organskem topilu, da dobimo homogeno raztopino, zato je pomembno, da izberemo takšno topilo, v katerem so lipidi dobro topni. Najpogosteje v ta namen uporabljamo kloroform ali mešanico kloroforma in MeOH. Za nastanek tankega filma lipidov, moramo organsko topilo odstraniti. Način odstranjevanja topila je odvisen od začetnega volumna raztopine lipidov. Pri majhnih volumnih lahko organsko topilo odparimo s pomočjo toka dušika ali argona, pri večjih pa uporabimo rotavapor. Ko topilo odpari, nastane iz raztopine lipidni film. Za odstranjevanje ostankov organskih topil in temeljitejše sušenje filma lahko uporabimo vakuumsko črpalko. Vsebnik s tankim filmom nato tesno zapremo in shranimo pri ustrezni temperaturi do hidratacije (15, 16).

To izvedemo tako, da v vsebnik dodamo medij, s katerim želimo hidratirati lipidni film in ga nežno mešamo ali stresamo. Izbira medija za hidratacijo je odvisna od nadaljnje uporabe liposomov. V ta namen uporabljamo najpogosteje: prečiščeno vodo, fiziološko raztopino, pufrske raztopine in raztopine neelektrolitov, npr. sladkorjev. Temperatura medija za hidratacijo mora biti praviloma nad Tm uporabljenega lipida in jo vzdržujemo skozi celoten postopek. V primeru uporabe lipidov z visoko Tm, izvedemo hidratacijo filma s pomočjo rotavaporja brez vzpostavljenega vakuma, pri čemer se z vrtenjem bučke v segreti vodni kopeli, temperatura medija ves čas ohranja nad Tm (15, 16).

Po dodatku medija se lipidni dvosloji hidratirajo in nabreknejo ter v obliki veziklov odtrgajo s stene vsebnika. Pri tem nastanejo liposomi različnih velikosti. Čas potreben za

hidratacijo filma je odvisen od vrste uporabljenih lipidov in njihove strukture. Praviloma zadošča 1 ura mešanja in stresanja, lahko pa je potrebno tudi več časa. V določenih primerih se struktura liposomov popolnoma vzpostavi šele po 1 dnevu, sčasoma pa se izboljša tudi homogenost porazdelitve glede na velikosti veziklov. Produkt hidratacije tankega lipidnega filma so veliki multilamelarni vezikli, ki so po strukturi podobni čebuli, saj so zanje značilni koncentrični lipidni dvosloji, ločeni s plastjo vode (15). KAS ali pomožne snovi, ki jih želimo vključiti v liposome, dodamo, odvisno od topnosti, bodisi k mediju za hidratacijo ali pa že v izhodno raztopino lipidov v organskem topilu. Med hidratacijo lahko ob prisotnosti nekaterih lipidov nastanejo lipidni kompleksi edinstvenih struktur. Tako s hidratacijo filma zelo nabitih lipidov z raztopino z nizko ionsko močjo, nastane viskozen gel, pri šibko hidratiranih lipidih, kot je npr. fosfatidiletanolamin, pa je hidratacija težavna, saj le-ti težijo k samoagregiranju. Zaradi tankih hidratiranih plasti na površini tovrstnih liposomov, pri njihovem približevanju ne pride do odboja, temveč nastopi združevanje membran z nastankom agregatov (15, 16).

### **Poenotenje velikosti liposomov**

Po hidrataciji lipidnega filma nastane disperzija, v katerih lahko velikost, slojnost in polidisperznost velikih multilamelarnih veziklov zmanjšamo s pomočjo različnih metod. Najpogosteje se v ta namen uporablja ekstruzija in soniciranje. Pri ekstruziji, disperzije liposomov potiskamo skozi polikarbonatne membrane z različno velikostjo por, ki jih ponavadi izberemo glede na želeno velikost liposomov. Soniciranje pa temelji na uporabi ultrazvoka, pri čemer lahko spremojamo moč in čas tega procesa. Ekstruzija je v primerjavi s soniciranjem preprostejša, cenejša in primernejša za liposome iz občutljivejših sestavin. Volumni s katerimi lahko delamo so manjši ter težavno zagotavljanje konstantne temperature vzorca med samo ekstruzijo (15, 16).

## **1.3 FIZIKALNA STABILNOST LIPOSOMOV**

Liposomi so metastabilne strukture, saj so kinetično stabilne, termodinamsko pa ne. Koloidna disperzija liposomov je stabilna, takrat ko elektrostatske in sterične odbojne sile skupaj s tistimi, ki so posledica solvatacije, prevladajo nad privlačnimi van der Waalsovimi silami. Glavna procesa, ki potekata in sta posledica nestabilnosti, sta fuzija veziklov in njihovo agregiranje. Pride pa lahko tudi do odpiranja lipidnih dvoslojev, kar vodi v neželeno sproščanje vgrajene učinkovine iz dostavnega sistema (17, 18).

## **Fuzija**

Kot smo omenili že v podpoglavlju 1.1.2, pride do fuzije liposomov prej, če je urejenost fosfolipidnega dvosloja večja (12). Predpogoj za fuzijo dveh lipidnih dvoslojev je, da se razdalja med liposomoma zmanjša in se njuni površini tesno približata. Da ta proces nastopi, je potrebna desolvatacija polarnih glav fosfolipidov, kar pa je energijsko zelo potratno. Če se to zgodi, pride v naslednji stopnji do delnih motenj v organizaciji lipidnega dvosloja in sicer do prehoda zunanjih delov dvoslojev na stičnem mestu, iz lamelarne v inverzno heksagonalno fazo. To pa povzroči fuzijo zunanjih slojev dvoslojev obeh veziklov, pri čemer nastane intermediat, ki predstavlja delno fuzijo. Sledi prerazporeditev lipidov notranjega lipidnega dvosloja in nastanek por, s čimer je omogočeno mešanje notranjih vodnih vsebin obeh veziklov in s tem tudi končanje procesa fuzije (19).

## **Agregiranje**

Agregiranje se pogosteje pojavlja pri velikih veziklih, in sicer zaradi večje ravnosti (ang. flatness) njihovih membran oz. zaradi večje površine, ki je na razpolago za medsebojni stik. Pogoj za agregacijo liposomov je trk vsaj dveh veziklov, pri čemer mora biti sila trka dovolj velika. Možnost za agregacijo liposomov se povečuje z naraščanjem števila trkov. Agregiranje liposomov pomeni združevanje liposomov v skupke, ki jih sestavljajo posamezni liposomi. V nasprotju s fuzijo pa je ta proces reverzibilen (18, 19, 20).

### **1.3.1 STABILIZACIJA LIPOSOMOV**

Z vprašanjem, kako izboljšati stabilnost liposomov, so se ukvarjali že mnogi. Med razpoložljivimi pristopi se največkrat poslužujejo metod modifikacije površine liposomov (21). Izboljšano termodinamsko stabilnost disperzij liposomov ter homogenejšo porazdelitev velikosti veziklov lahko dosežemo z dodatkom ionogenih in/ali neionogenih PAS (7).

#### ***1.3.1.1 STERIČNA STABILIZACIJA***

Osnova sterične stabilizacije je adsorpcija neionogene, amfifilne in fleksibilne makromolekule na površino liposomov. Najpogosteje uporabljene makromolekule so polimeri. Polimerni plašček, ki nastane z adsorpcijo polimera na površino veziklov, predstavlja sterično bariero, ki poveča stabilnost disperzije, zaradi osmotskega in entropijskega učinka. Pri približevanju dveh sterično stabiliziranih liposomov se koncentracija polimera v območju med vezikloma v primerjavi z okoliškim medijem poveča, zato osmotski tlak v tem območju naraste in molekule disperznega medija vdrejo v

območje med liposomoma, kar ju požene narazen. V primeru, da sterični efekt ne prepreči približevanja liposomov in se začnejo verige steričnih stabilizatorjev stikati in prepletati, pa lahko poteče dehidratacija teh verig, kar za sistem ni ugodno, saj se entropija sistema zmanjša. Sistem teži k stanju nereda, torej k čim večji entropiji, ki je gonilo, ki žene liposome narazen, pri čemer se verige steričnih stabilizatorjev sprostijo in sistem stabilizira (20, 22).

Konformacija steričnega stabilizatorja na površini liposomov je odvisna od njegove narave, kemične zgradbe in disperznega medija. Struktura polimera, ki ga uporabimo v ta namen mora biti amfifilna, saj se lahko v tem primeru s hidrofobnim delom adsorbira na površino liposoma, njihov hidrofilni del pa se izteza v disperzni medij. Z uporabo tako imenovanih blok kopolimerov, ki so mešanica dveh različnih monomerov, od katerih ima eden afiniteto do površine, drugi pa do disperznega medija, pri čemer je zaporedje posameznih monomernih enot v polimeru urejeno v odseke. Sterično stabilizacijo liposomov lahko dosežemo tudi s kovalentno vezavo polimera na površino vezikla (polimeri, kovalentno vezani v eni sami točki). Homopolimeri (popolnoma lipofilne snovi) niso ustrezni sterični stabilizatorji, saj se po pripetju na površino veziklov sčasoma popolnoma iztegnejo oz. adsorbirajo, zato je sterična plast zelo tanka ali pa je sploh ni. Za dosego maksimalne debeline steričnega plašča na površini liposomov in s tem čim boljše stabilnosti, moramo zagotoviti maksimalno iztegnjenost verig steričnega stabilizatorja v disperzni medij (20, 22). V tem smislu sta pomembni izbira ustrezne koncentracije in molekulske mase steričnega stabilizatorja, da bo površina liposomov optimalno zasedena. V kolikor je koncentracija polimera prenizka in je njegova molekulska masa prevelika, lahko odseki istega polimera med seboj povezujejo različne liposome, pri čemer je učinek ravno nasproten od želenega (8, 20, 22).

Najpogosteje uporabljen polimer za kovalentno modifikacijo površine liposomov je polietilenglikol (PEG). Z vključevanjem PEGiliranih pomožnih snovi v lipidni dvosloj veziklov nastanejo tako imenovani PEGilirani liposomi. Najpogosteje se za njihovo pripravo uporabljam PEG-fosfolipidi, v katerih je linearna veriga PEG kovalentno vezana na polarno glavo fosfolipida. V splošnem velja: daljša kot je veriga PEG, boljša je sterična stabilizacija veziklov. PEG pa lahko kovalentno vežemo tudi na druge sestavine lipidnega dvosloja. Tako so razvili tudi skupino nefosfolipidnih sider za pripenjanje PEG, predstavnik katere je npr. holesterol. Verigo PEG lahko z etrsko ali estrsko vezjo pripnemo na -OH skupino holesterola, na mestu 3. Pri izdelavi liposomov se PEGiliran derivat

holesterola zlahka vsidra v lipidni dvosloj ter sočasno vpliva še na fluidnost in propustnost le-tega (8, 23).

V literaturi zasledimo tudi objave o modifikacijah površin liposomov s sladkorji. Ideja izvira iz strukture glikokaliksa celic, kjer s sladkorji bogato hidratirano področje predstavlja bariero, ki ščiti celice in preprečuje nespecifično adsorpcijo nanje. Sladkorji, ki se uporabljajo v ta namen so saharoza, maltoza, galakto, manoza, dekstran, amilopektin in drugi. V primeru uporabe glikoziliranih derivatov lipidov za izdelavo liposomov, govorimo o glikoliposomih (24, 25).

#### ***1.3.1.2 ELEKTROSTATSKA IN ELEKTROSTERIČNA STABILIZACIJA***

Elektrostatsko stabilizacijo lahko dosežemo tako, da povečamo naboj na površini veziklov in sicer z vključevanjem nabitih pomožnih snovi v lipidni dvosloj, z zmanjševanjem ionske moči ali s spremjanjem vrednosti pH disperznega medija. Naboja na površini veziklov ne moremo izmeriti neposredno, ampak le posredno. Običajno v ta namen uporabljamo metodo laserske Dopplerjeve anemometrije, s katero lahko izmerimo zeta potencial (ZP) veziklov (18, 22, 26).

Slabost elektrostatske stabilizacije je velika občutljivost na spremembe vrednosti pH in ionske moči disperznega medija. Povečanje ionske moči slednjega (dodatek soli) povzroči zmanjšanje razdalje od površine nabitega vezikla do elektronevtralnega območja v disperznem mediju. To pomeni, da se debelina difuznega sloja stanjša, kar vodi v nestabilnost disperzije liposomov (18).

Kombinacija elektrostatske in sterične stabilizacije, tako imenovana elektrosterična stabilizacija pa vodi v nastanek visoko stabilnih disperzij liposomov. Elektrosterična stabilizacija temelji na dodatku polielektrolitov, ki se adsorbirajo na površino veziklov in na ta način vplivajo na njihov naboj ter posledično na ZP. Zaradi svoje velikosti, molekule vplivajo tudi na debelino plašča na površini liposomov, ki tvori sterično bariero. Enak učinek lahko dosežemo tudi s kombinacijo ionogene PAS in steričnega stabilizatorja. Elektrostatska stabilizacija je posledica delovanja naboja na površini liposomov in/ali naboja zaradi adsorbiranih ionogenih PAS. Elektrostatski prispevek adsorbiranih ionskih PAS povzroči, da se celokupni naboj na površini liposomov poveča, zaradi česar se debelina električnega dvosloja razširi, to pa posledično doprinese k izboljšanju stabilnosti disperzije. Debelina električnih dvoslojev je pomembna, kajti ko se liposomi dovolj približajo, se začnejo ti prekrivati, kar pa je za sistem neugodno, saj pride do odboja med

vezikli. Primera stabilizatorjev z negativnim nabojem sta poliakrilna kislina in diacetilfosfat, med tiste s pozitivnim nabojem pa sodita hitosan in stearilamin (18, 21, 22, 28).

## 1.4 VREDNOTENJE LIPOSOMOV

Nestabilnost liposomov lahko vpliva na njihovo obnašanje po aplikaciji, zato moramo pred vključevanjem le-teh v formulacijo, opraviti obširne raziskave stabilnosti. Grobo lahko ocenimo disperzijo liposomov kot fizikalno stabilno, če vsebuje majhne, monodisperzne in stabilne vezikle. Vrednotenje njihove velikosti, geometrije, notranje strukture in drugih lastnosti liposomov v vodni disperziji pa je ključno za njihovo potencialno uporabo v farmaciji in kozmetologiji. V ta namen so razvili širok nabor metod in tehnik, med katerimi so najpogostejsé tiste, ki temeljijo na sisanju svetlobe in mikroskopije. Poglavitni parametri liposomov, ki jih pri vrednotenju *in vitro* proučujemo so: velikost, polidisperzni indeks (PI), ZP, lamelarnost, učinkovitost vgrajevanja KAS oz. pomožnih snovi ter vrednotenje zaostanka organskih topil (3, 29).

### 1.4.1 FOTONSKA KORELACIJSKA SPEKTROSKOPIJA (PCS)

Fotonska korelacijska spektroskopija je metoda, ki temelji na merjenju intenzitete sipane svetlobe na strukturah koloidnih velikosti v vzorcu. Če vzorec liposomov osvetlimo z lasersko svetlobo, se ta na liposomih siplje. Ker pa se ti veziklov v vzorcu Brownovo gibajo, intenziteta sipane svetlobe ni konstantna, ampak niha. Hitrost teh nihanj je odvisna od velikosti liposomov in viskoznosti disperznega medija. Aparatura na podlagi meritve hitrosti omenjenih fluktuacij in uporabe različnih algoritmov, poda povprečni hidrodinamski premer veziklov in vrednost PI, ki je merilo za porazdelitev velikosti delcev v vzorcu. Izmerjena velikost s PCS je hidrodinamska in ni absolutna, saj gre v tem primeru za prispevek vezanih molekul disperznega medija na površino liposomov. Vrednosti PI se nahajajo med 0 in 1, pri čemer 0 pomeni popolnoma monodisperzno distribucijo delcev, 1 pa popolnoma polidisperzno. Meritve so občutljive na spremembe temperature, ki vpliva na hitrost Brownovega gibanja, zato mora biti tekom meritev konstantna. (22, 30).

### 1.4.2 LASERSKA DOPPLERJEVA ANEMOMETRIJA

Če disperzijo liposomov izpostavimo električnemu polju, se vezikli premikajo proti nasprotno nabiti elektrodi, in ko jih osvetlimo z lasersko svetlobo, se zaradi njihovega gibanja spremeni frekvenca sipane svetlobe, ki jo merimo. ZP in hitrost gibanja liposomov

sta povezana s spremembo frekvence sipane svetlobe. Torej, kadar se liposom giblje, se del na njegovo površino vezanih ionov premika skupaj z njim in potencial, ki pri tem nastane in ga na tej meji izmerimo, imenujemo ZP (18, 22, 26).

### **1.5 DERMALNA UPORABA LIPOSOMOV**

Koža je organ, ki je neposredno dostopen za aplikacijo farmacevtskih in kozmetičnih izdelkov. Glavno oviro za dostavo učinkovin v in skozi kožo predstavlja učinkovita naravna bariera, rožene plasti kože (stratum corneum). Sestavljena je iz korneocitov in lipidov ter ima t.i. strukturo malte in opeke. Cilj številnih raziskav je razvoj pristopov, ki bi omogočili učinkovit prehod KAS skozi roženo plast, saj se za sodobne kozmetične izdelke pričakuje, da delujejo aktivno. Za doseganje aktivnih učinkov, pa moramo KAS dostaviti v globlje plasti kože. Prvi kozmetični izdelek z liposomi, ki se je pojavil na trgu leta 1986, je bila krema proti staranju Capture, (Cristian Dior) (3, 31, 32). V dermatologiji in kozmetologiji se uporabljajo tudi liposomi brez vključenih učinkovin, saj imajo že sami po sebi ugodne učinke na kožo. Najpogosteje so izdelani iz rastlinskih fosfolipidov. Ti imajo zaestrenih veliko nenasičenih maščobnih kislin, zlasti linolne, zaradi česar povečajo barierno funkcijo kože in zmanjšajo transepidermalno izgubo vode. Uporaba formulacij z liposomi deluje na kožo ugodno, zaradi strukturne podobnosti med lipidnimi dvosloji veziklov in naravnimi membranami kožnih celic. Liposomi lahko spremenijo tudi fluidnost celičnih membran in se z njimi zligejo (3, 33, 34).

Rezultati novejših raziskav kažejo, da se klasični liposomi zadržijo v roženi plasti in da je zato prehajanje vanje vgrajenih KAS v globlje plasti kože majhno ali pa ga sploh ni. Da bi KAS dostavili v globlje plasti kože, so pričeli z intenzivnim razvojem novega razreda lipidnih veziklov, tj. transfersomov, ki se lahko deformirajo in zaradi tega dostavijo KAS globlje v kožo. Pri tem naj bi že sam gradient hidratacije kože zagotavljal zadostno gonalno silo za prehajanje transfersomov skozi nepoškodovano roženo plast, globlje v epidermis. Velika sposobnost deformacije tovrstnih veziklov je posledica prisotnosti PAS (ponavadi enoverižne) v lipidnem dvosloju (32, 35).

## 2 NAMEN DELA

V okviru diplomske naloge bomo sintetizirali amfifilne pomožne snovi na osnovi D-glukonamida, za izdelavo liposomov. Istovetnost produktov sinteze bomo ugotavljali s pomočjo nuklearne magnetne resonanse (NMR), masne spektrometrije in elementne analize.

Sintetizirane pomožne snovi bomo vključili v lipidni dvosloj liposomov in proučevali njihov vpliv na velikost in fizikalno stabilnost veziklov. Liposome bomo izdelali z metodo tankih filmov in jih ekstrudirali. S pomočjo elektronske paramagnetne (spinske) resonanse (EPR) bomo ugotavljali vplive sintetiziranih derivatov D-glukonamida, ki vsebujejo sterolni lipofilni del, na lastnosti lipidnega dvosloja. Velikost liposomov bomo vrednotili z metodo PCS, ZP pa z lasersko Dopplerjevo anemometrijo.

Disperzije liposomov z izbranim derivatom D-glukonamida bomo mikroskopsko opredelili z invertnim optičnim mikroskopom.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### Reagenti in topila

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali topila in kemikalije naslednjih proizvajalcev: Acros, Aldrich, Sigma, Emsure, Fluka, Panreac, Merck, brez dodatnega prečiščevanja. Prečiščeno vodo smo pripravili na Fakulteti za farmacijo. Za pripravo liposomov smo izbrali komercialno dostopni nehidrogenirani sojin fosfolipid- fosfatidilholin, LIPOID S100 (Lipoid, Nemčija). Za spinsko označevanje liposomov smo uporabili metilni ester 13-doksil palmitinske kisline (MeFASL (2, 11)), ki so ga pripravili na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo.

#### Poglavitna laboratorijska oprema

- Analitski tehnici: Metler-Toledo AG245 (Schwachenback, Švica), Metler-Toledo XS205 (Schwachenback, Švica)
- Polavtomatske pipete (Biohit, Finska)
- Rotavaporja Büchi rotavapor RE111 in Büchi rotavapor R-124 (Büchi Labortechik AG; Švica)
- NMR spektrometer: Brucker AVANCE III 400 MHz (Brucker, ZDA)
- Zetasizer Nano ZS, (Malvern Instruments, Anglija); kivete za merjenje velikosti liposomov (model: DTS0012), celica za merjenje ZP (model: DTS1060C)
- EPR spektrometer: MiniScope MS400 (Magnetech, Nemčija)
- Invertni optični mikroskop: Olympus IX 81 (Olympus, ZDA)

#### Metode za karakterizacijo sintetiziranih spojin

##### Tankoplastna kromatografija (TLC)

Detekcijo spojin s TLC, smo izvedli na kromatografskih ploščah TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>, aluminijasti nosilec, z debelino nanosa 0,22 mm, proizvajalca Merck. Po razvijanju plošč v izbrani mobilni fazi (MF), smo spojine detektirali s pomočjo UV svetilke ( $\lambda = 254$  nm in  $\lambda = 366$  nm), za boljšo vizualizacijo pa smo dodatno uporabili orositvene reagente in sicer: ninhidrin, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> v EtOH in fosfomolibdensko kislino.

### Kolonska kromatografija

Za stacionarno fazo smo uporabljali silikagel (Kieselgel 60: 0,040-0,063 mm), proizvajalca Merck. Uporabljene MF v volumskih razmerjih smo navedli pri opisu postopkov sinteze posameznih spojin.

### NMR

Spektre NMR sintetiziranih spojin je posnel in analiziral asist. dr. Stane Pajk, in sicer z NMR spektrometrom v topilih:  $\text{CDCl}_3$ , piridin-d<sub>5</sub>,  $\text{DMSO-d}_6$ .

### Masna spektrometrija

Masne spektre so nam posneli z masnim spektrometrom Q-TOF Premier, proizvajalca Waters-Micromass z ESI tehniko, in sicer v Centru za masno spektrometrijo, na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

### Elementna analiza

Relativno vsebnost ogljika, vodika in dušika v izbranih sintetiziranih spojinah so izmerili z analizatorjem Perkin Elmer 2400 CHN, na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani.

### **Nomenklatura in strukture**

Za risanje kemijskih schem in poimenovanje struktur smo uporabili programe ChemDraw, ChemSketch in Adobe Illustrator.

### **Določanje izkoristka sinteze**

$$n = \frac{m \text{ (izhodna spojina oz. končni produkt)}}{M \text{ (izhodna spojina oz. končni produkt)}}$$

$$\eta = \frac{n \text{ (končni produkt)}}{n \text{ (izhodna spojina)}} \times 100$$

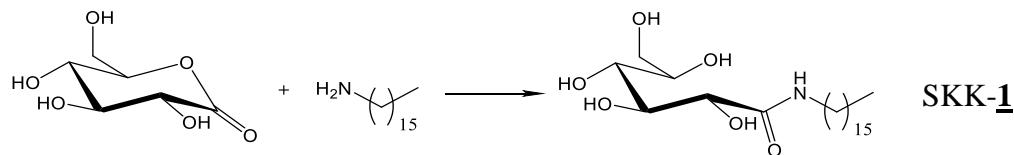
Enačba 1: Izračun množine spojin

Enačba2: Izračun izkoristka sintetizirane spojine

Molekulsko maso izhodnih spojin in končnih produktov smo preračunali na podlagi narisanih schem v programu ChemDraw, nato pa glede na njihovo stehtano maso, s pomočjo Enačbe 1 izračunali množino produktov, z Enačbo 2, pa izkoristek sinteze.

### 3.1 SINTEZA POMOŽNIH SNOVI ZA STABILIZACIJO LIPOSOMOV NA OSNOVI D-GLUKONAMIDA

#### 3.1.1 SINTEZA (2S,3S,4R)-N-heksadecil-2,3,4,5,6-pentahidroksiheksanamida (SKK-1)

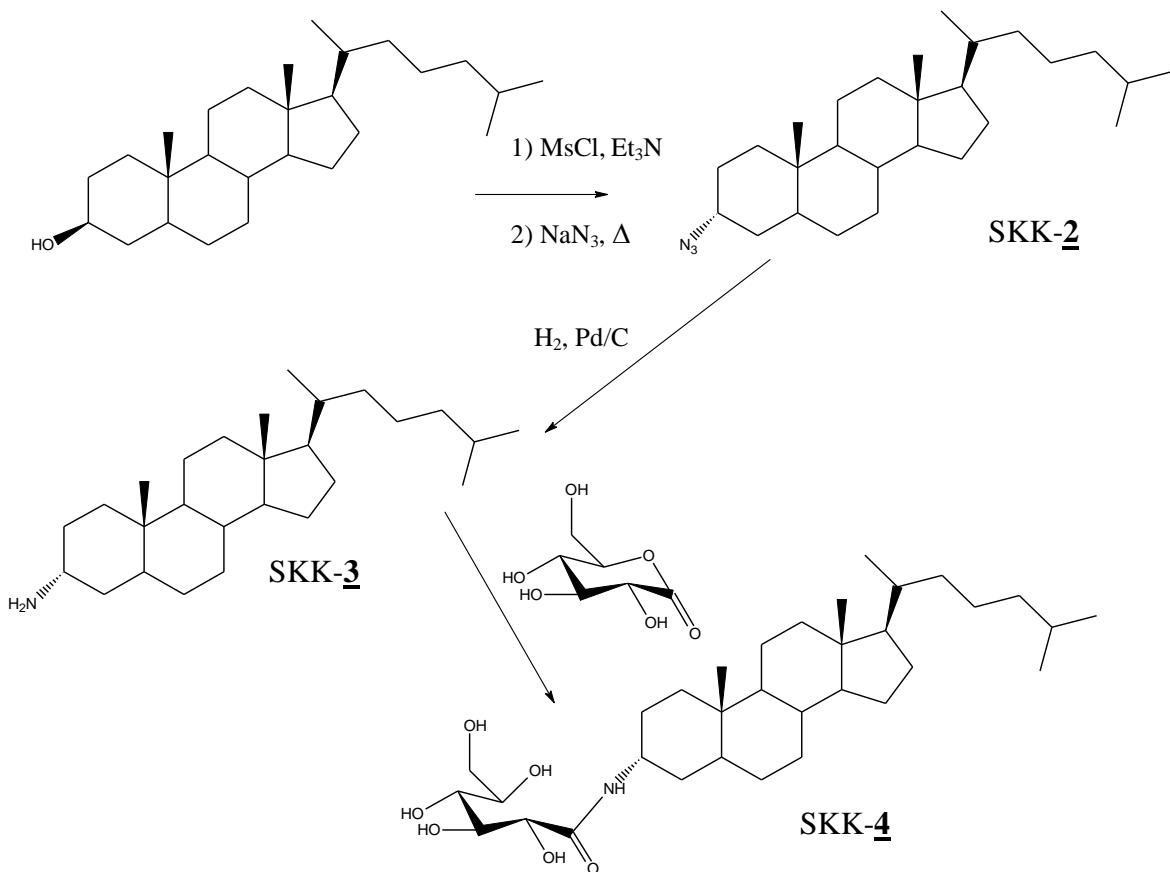


Slika 1: Reakcijska shema sinteze SKK-1

#### POSTOPEK SINTEZE SKK-1:

D-(+)-Glukonsko kislino- $\delta$ -lakton (GDL) (1,62 g, 9,09 mmol) in heksadecilamin (2,0 g, 8,28 mmol, 1,1 e.q.) smo suspendirali v MeOH (30 ml) ter 1,5 h mešali pri 50 °C. Produkt je izpadel iz reakcijske zmesi v obliki bele oborine, ki smo jo filtrirali z odsesavanjem. Produkt smo sprali z MeOH (5 ml) in dietiletrom (3 x 25 ml). Zaostanek na filter papirju smo posušili z odsesavanjem in tako izolirali produkt SKK-1 (2,92 g, 6,96 mmol).

**3.1.2 SINTEZA (2S,3S,4R)-N-((3R,10S,13R,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)heksadekahidro-1H-ciklopenta[a]fenantren-3-il)-2,3,4,5,6-pentahidroksiheksanamida (SKK-4)**



Slika 2: Reakcijska shema sinteze SKK-2, SKK-3, SKK-4

▪ **POSTOPEK SINTEZE (3R,10S,13R,17R)-3-azido-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)heksadekahidro-1H-ciklopenta[a]fenantrena (SKK-2):**

Dihidroholisterol (10,0 g, 25,73 mmol) smo raztopili v diklorometanu (DKM) (60 ml), dodali trietilamin (4,63 ml, 33,40 mmol, 1,3 e.q.) in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Nato smo dodali mezilklorid (2,19 ml, 28,28 mmol, 1,1 e.q.) in mešali 0,5 h. Potek reakcije smo spremljali s TLC analizo. Reakcijsko zmes smo nato spirali s prečiščeno vodo (30 ml), 1 M HCl (30 ml), nasičeno raztopino NaCl (30 ml) in jo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Organsko fazo smo filtrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo takoj uporabili v naslednji stopnji sinteze.

Surov produkt 1. stopnje smo raztopili v dimetilformamidu (40 ml), dodali natrijev azid (5,0 g, 76,92 mmol, 3 e.q.) in 24 h mešali pri sobni temperaturi, nato pa še 24 h na 50 °C. Potek reakcije smo preverili s TLC in tako ugotovili, da ni potekla v zadostni meri. Zato smo v reakcijsko zmes smo dodali še nekaj natrijevega azida (3,3 g, 50,77 mmol, 2 e.q.) in jo mešali 72 h pri 80 °C. Ponovna TLC analiza je pokazala, da je reakcija potekla do konca. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in zaostanek suspendirali v etilacetatu (100 ml). Organsko fazo smo spirali s prečiščeno vodo (3 x 50 ml), nasičeno raztopino NaCl (50 ml) in jo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nato smo jo filtrirali in odparili topilo pod znižanim tlakom. Tako smo izolirali produkt SKK-**2** (8,43 g, 20,38 mmol).

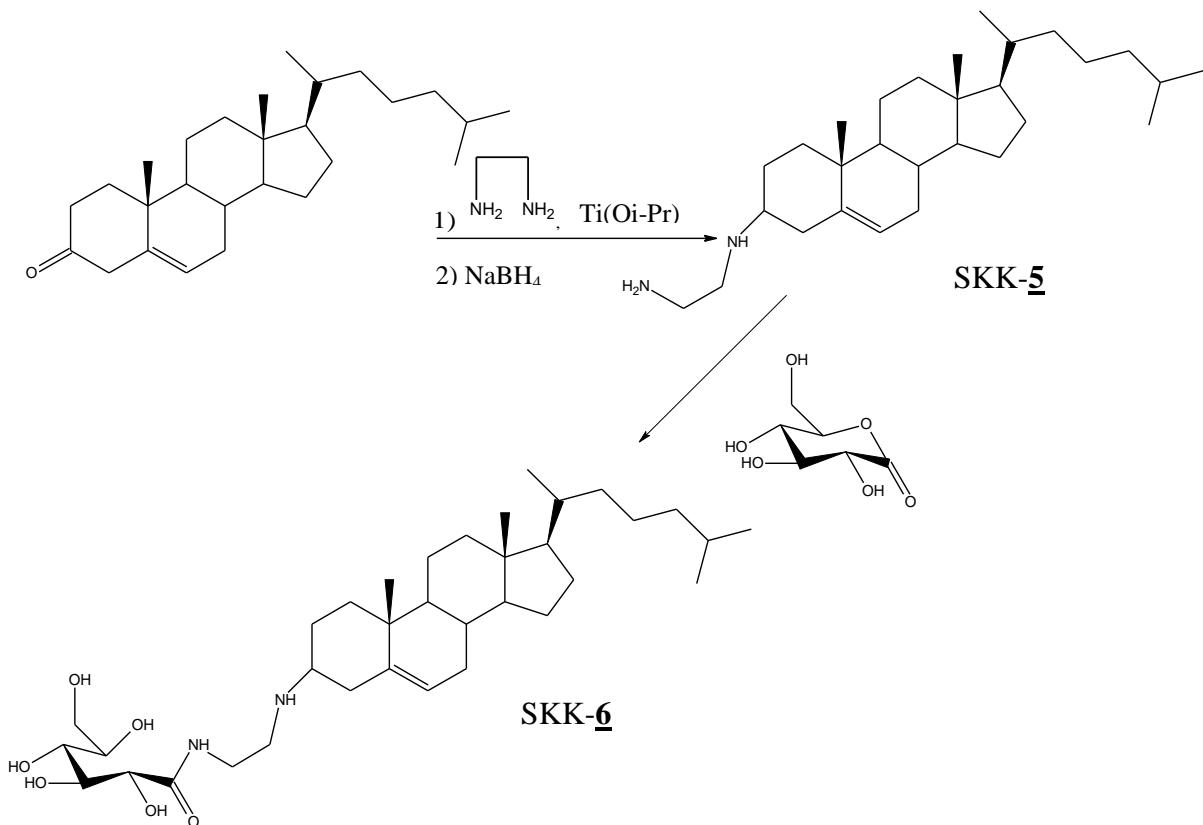
▪ **POSTOPEK SINTEZE (3R,10S,13R,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)heksadekahidro-1H-ciklopenta[a]fenantren-3-amina (SKK-3):**

Produkt SKK-**2** (1,43 g, 3,46 mmol) smo raztopili v tetrahidrofuranu (50 ml) in raztopino med mešanjem 5 min prepihovali z argonom. K reakcijski zmesi smo dodali paladij na ogljiku (Pd/C) (0,158 g) in reakcijsko zmes prepahali z vodikom (H<sub>2</sub>). Nato smo jo mešali 19 h ob nadtlaku vodika, 5 min prepihovali z argonom in odfiltrirali Pd/C ter odparili topili pod znižanim tlakom. Zaostanek smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: DKM/MeOH = 20:1) in z odparevanjem topila pod znižanim tlakom izolirali produkt SKK-**3** (0,875 g, 2,26 mmol).

▪ **POSTOPEK SINTEZE (2S,3S,4R)-N-((3R,10S,13R,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)heksadekahidro-1H-ciklopenta[a]fenantren-3-il)-2,3,4,5,6-pentahidroksiheksanamida (SKK-4):**

Produkt SKK-**3** (0,812 g, 2,09 mmol) smo raztopili v MeOH (37 ml), dodali GDL (0,746 g, 4,19 mmol, 2 e.q.) in raztopino 19 h mešali pri 82 °C. Nato smo potek reakcije preverili s TLC in na podlagi potovanja lis ugotovili, da je SKK-**3** zreagiral in da je reakcija potekla. Reakcijsko zmes smo ohladili, pri čemer je nastal gel. Produkt smo odfiltrirali z odsesavanjem ter ga sprali z nekaj ml MeOH in prečiščene vode. Suhi zaostanek smo suspendirali v heksanu in ponovno izvedli filtracijo. Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: DKM/MeOH = 20:1 → 7:1) in z odparevanjem topila pod znižanim tlakom izolirali produkt SKK-**4** (0,570 g, 1,01 mmol).

**3.1.3 SINTEZA (*2S,3S,4R*)-*N*-(2-(((10*R*,13*R*,17*R*)-10,13-dimetil-17-((*R*)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradekahidro-1*H*-ciklopenta[*a*]fenantren-3-il)amino)etil)-2,3,4,5,6-pentahidroksoheksanamida (SKK-6)**



Slika 3: Reakcijska shema sinteze SKK-5 in SKK-6

- **POSTOPEK SINTEZE *N*1-((10*R*,13*R*,17*R*)-10,13-dimetil-17-((*R*)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradekahidro-1*H*-ciklopenta[*a*]fenantren-3-il)etan-1,2-diamina (SKK-5):**

Spojino SKK-5 smo pripravili po že znanem postopku iz literature, z nekaj spremembami (42). 4-hosten-3-on (2,1 g, 5,46 mmol) smo raztopili v MeOH (35 ml), dodali titanov (IV) izopropoksid (2144 µl, 7,14 mmol, 1,3 e.q.) in etilendiamin (1095 µl, 16,38 mmol, 3 e.q.) ter reakcijsko zmes mešali 19 h pri sobni temperaturi. Zmes smo nato ohladili na -40 °C, ter ji med mešanjem dodali natrijev borhidrid (0,400 g, 10,57 mmol, 1,9 e.q.) in nadaljevali z mešanjem še 19 h pri -40 °C. Reakcijsko zmes smo postopoma segreli do sobne temperature in reakcijo prekinili z dodatkom prečiščene vode (7 ml). Surovi produkt smo odsesavali z odsesavanjem, sprali z nekaj ml MeOH, DKM in etilacetata ter ga čistili s

pomočjo kolonske kromatografije (MF: DKM/MeOH= 20:1 → 10:1, DKM/MeOH/NH<sub>3</sub>= 7:1,5:0,5, 14:4:1, 7:3:1), nato pa z odparevanjem topila pod znižanim tlakom izolirali produkt SKK-**5** (0,488 g, 1,14 mmol).

▪ **POSTOPEK SINTEZE (2S,3S,4R)-N-(2-(((10R,13R,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradekahidro-1H-ciklopenta[a]fenantren-3-il)amino)ethyl)-2,3,4,5,6-pentahidroksiheksanamida (SKK-6):**

Produktu SKK-**5** (0,568 g, 1,33 mmol) smo dodali GDL (0,780 g, 4,38 mmol, 3,3 e.q.) in zmes suspendirali v MeOH (20 ml) ter mešali 18 h pri 90 °C. Reakcijski zmesi smo odparili topilo in surovi produkt čistili s kolonsko kromatografijo (MF: DKM/MeOH= 6:1 → 4:1, DKM/MeOH/NH<sub>3</sub>= 7:3:1, 6:3:1). Z odparevanjem topil pod znižanim tlakom smo izolirali produkt SKK-**6** (0,436 g, 0,718 mmol).

## 3.2 PRIPRAVA LIPOSOMOV IN METODE NJIHOVEGA VREDNOTENJA

### 3.2.1 PRIPRAVA LIPOSOMOV

Liposome smo pripravili z metodo tankih filmov. Najprej smo v bučko z okroglim dnom natehtali fosfolipid, holesterol in sintetizirane pomožne snovi. Skupna masa natehtanih sestavin je znašala 125 mg, deleža holesterola v vzorcih pa sta bila 10 % ali 40 % (m/m). Holesterol v recepturi smo nadomestili s sintetiziranimi pomožnimi snovmi. V primeru dveh izbranih sintetiziranih pomožnih snovi (SKK-**4** in SKK-**6**) smo nadomestili le del holesterola in sicer tako, da je bila njuna vsebnost v recepturi 1, 2, 3, 4 ali 5 % (m/m). Spojino SKK-**4** smo volumsko odmerili iz predhodno pripravljene raztopine v DKM, SKK-**6** pa iz raztopine v DKM/MeOH= 7:3. Topilo smo nato odstranili s sušenjem v digestoriju ali v sušilni komori pri 50 °C. K natehtanim sestavinam smo dodali 5 ml DKM, da so se popolnoma raztopile, nato pa s pomočjo rotavaporja z odparevanjem topila pod znižanim tlakom pri 50 °C, na stenah bučke pripravili tanek lipidni film. Zaostanke topila smo odstranili s sušenjem v digestoriju pri sobni temperaturi preko noči ali s pomočjo vakuumske črpalke. Tako pripravljene filme smo hidratirali s 5 ml prečiščene vode, ob previdnem mešanju pri sobni temperaturi in ~2 ml vzorca prenesli v mikrocentrifugirko ter ga shranili v hladilniku.

### **3.2.2 EKSTRUDIRANJE DISPERZIJE LIPOSOMOV**

V ekstrudor smo namestili polikarbonatno membrano z velikostjo por 800 nm in 1 ml vzorca pripravljene disperzije liposomov napolnili v 1 ml stekleno brizgo. Nato smo z ekstrudorjem disperzijo potiskali skozi membrano pri sobni temperaturi in sicer bodisi 10-krat ali 20-krat. Po ekstrudirjanju smo vzorce liposomov s pomočjo brizge prenesli v mikrocentrifugirke in jih shranili v hladilniku.

### **3.2.3 VREDNOTENJE LIPOSOMOV**

#### **METODA EPR**

Metoda je primarno uporabna za proučevanje paramagnethnih snovi oz. snovi z vsaj enim nesparjenim elektronom. V vzorce, ki ne vsebujejo paramagnethnih centrov, med katere sodijo tudi liposomi oz. fosfolipidne membrane, lahko le-te uvedemo tako, da jih spinsko označimo s spinskimi označevalci. Natančno smo natehtali 1,99 mg spinskega označevalca MeFASL (2, 11) in ga raztopili v etanolu, da smo dobili raztopino s koncentracijo  $10^{-3}$  M. V plastične epruvete smo odmerili 16,5  $\mu\text{l}$  raztopine označevalca in topilo odparili pod znižanim tlakom. Nato smo v epruveto dodali 100  $\mu\text{l}$  neekstrudirane disperzije liposomov z SKK-**4**, SKK-**6** ali s holesterolom (10 %, m/m), in sicer 11 tednov po njihovi izdelavi ter jih zatesnili in 30 min s pomočjo rotacije rotavaporja (brez vakuma), rahlo mešali na vodni kopeli pri 50-60 °C, da se je spinski označevalc vključil v lipidne membrane. Nato smo epruvete na vibracijskem mešalniku stresali 3 min pri sobni temperaturi, kapilare napolnili z označenimi liposomi in posneli spektre EPR.

#### **Merjenje velikosti liposomov s PCS**

Povprečno velikost liposomov in PI smo izmerili z napravo Zetasizer Nano ZS. Vzorec smo za meritev pripravili tako, da smo liposome v mikrocentrifugirki dobro pretresli na vibracijskem mešalu in eno kapljico disperzije dodali v kiveto k ~1 ml prečiščene vode ter vzorec s pomočjo kapalke dobro premešali. Nato smo kiveto zaprli s pokrovčkom, njeno zunanjost pa natančno obrisali. Meritve smo izvedli takoj po izdelavi liposomov, po ekstrudirjanju ter v določenih časovnih točkah med njihovim shranjevanjem, in sicer pri 10-krat ekstrudiranih vzorcih po 1 dnevnu, 1 tednu, 2, 3 in 4 tednih ter enako pri 20-krat ekstrudiranih vzorcih, s katerimi smo izvedli še dodatno meritev po 8 tednih. Neekstrudiranim vzorcem liposomov smo izmerili povprečno velikost dvakrat, in sicer

takoj po izdelavi in po 1 dnevu. Do časovne točke 1 teden, smo za vsak ekstrudiran vzorec izvedli po 1 meritev, po 1 tednu pa smo paraleli po 10 prehodih ekstrudiranja združili in od tedaj naprej izvajali po 3 zaporedne meritve združenega vzorca. Vse meritve smo izvedli pri pogojih, ki so navedeni v Preglednici I.

Preglednica I: Pogoji meritev velikosti liposomov

<b>Temperatura:</b>	25 °C
<b>Lomni količnik disperznega medija (vode):</b>	1,330
<b>Viskoznost disperznega medija:</b>	0,8872 mPas
<b>Kot merjenja:</b>	173°
<b>Valovna dolžina laserske svetlobe (laser He-Ne):</b>	633 nm

**Merjenje ZP liposomov z metodo laserske Dopplerjeve anemometrije**

Notranjost celice za merjenje ZP smo najprej omočili z etanolom in jo nato sprali s prečiščeno vodo, pri čemer je bilo pomembno, da smo optične poti in elektrode ohranili suhe in se jih nismo dotikali. Zeta potencial smo izmerili 20-krat ekstrudiranim vzorcem liposomov, in sicer 8 tednov po njihovi izdelavi. Liposomom smo izmerili ZP takoj po meritvi velikosti, in sicer tako, da smo s pomočjo igle, vzorec napolnili v 2 ml brizgo in ga nato v merilno celico injicirali toliko, da smo z njim napolnili kapilaro, ki se nahaja v nej. Pri tem smo bili pozorni, da smo iz kapilare izgnali vse mehurčke zraka, saj ti motijo meritev. Merilno celico smo nato zaprli s pokrovčkoma in zunanjost dobro obrisali, ter z aparatom Zetasizer Nano ZS izmerili ZP (Preglednica II).

Preglednica II: Pogoji meritev ZP liposomov

<b>Temperatura:</b>	25 °C
<b>Viskoznost disperznega medija-vode:</b>	0,8872 mPas
<b>Dielektrična konstanta vode:</b>	78,5

### **Mikroskopija**

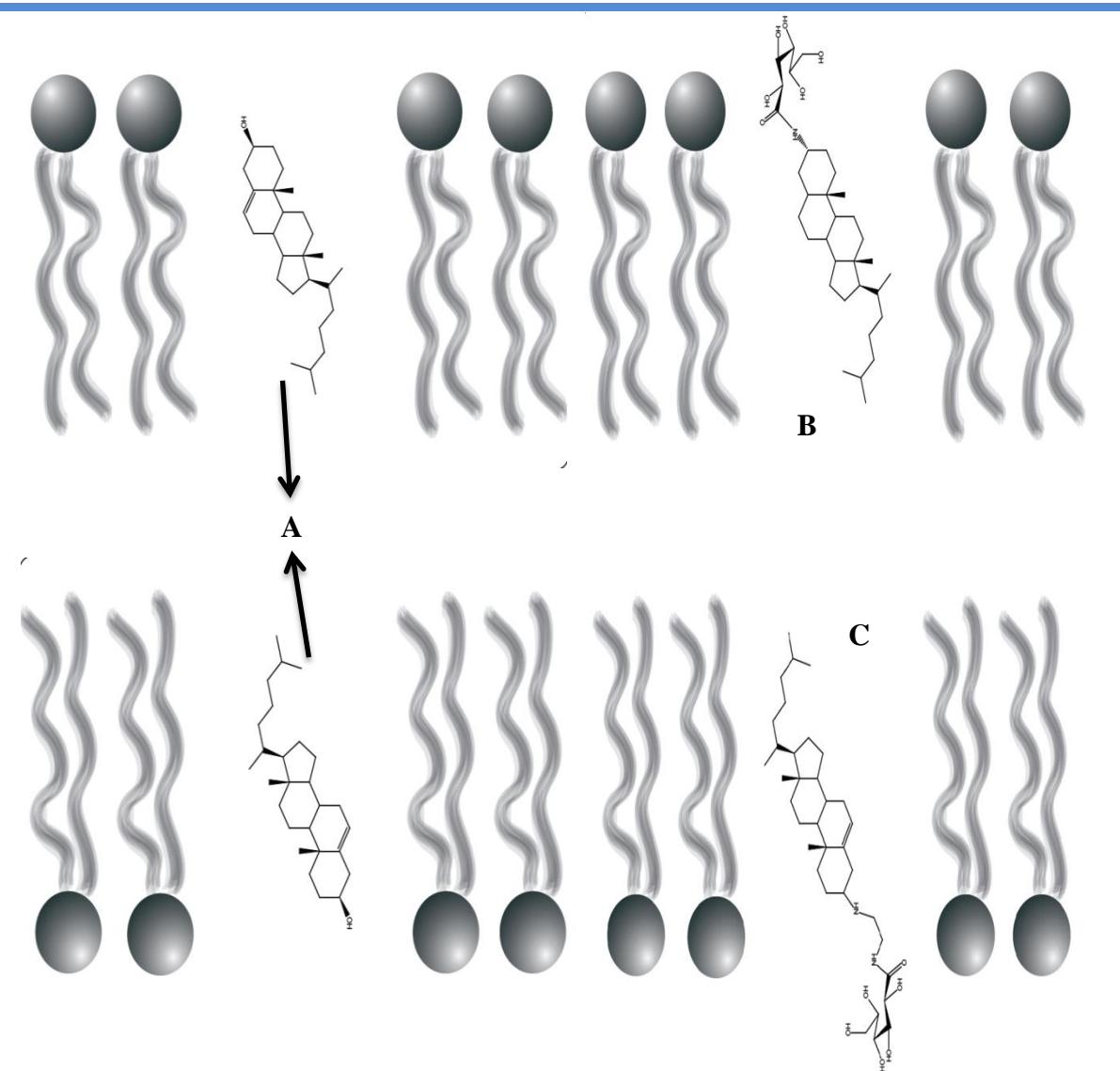
Skupna masa natehtanih sestavin za pripravo liposomov z metodo tankih filmov je znašala 62,5 mg, pri čemer je 10 % (m/m) predstavljala pomožna snov SKK-**6**, preostanek pa LIPOID S100. Najprej smo natehtali SKK-**6**, nato LIPOID S100 in zmes raztopili v 2,5 ml DKM. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom s pomočjo rotavaporja pri 50 °C, ter morebitni zaostanek topila odstranili z vakuumsko črpalko. Na steni bučke je nastal suh lipidni film, ki smo ga hidratirali z 2,5 ml prečiščene vode, med rahlim mešanjem pri sobni temperaturi. Nerazredčeno disperzijo liposomov smo pogledali pod invertnim optičnim mikroskopom in posneli slike.

## **4 REZULTATI IN RAZPRAVA**

### **4.1 SINTEZA POMOŽNIH SNOVI ZA STABILIZACIJO LIPOSOMOV NA OSNOVI D-GLUKONAMIDA**

#### **Izhodišča za sintezo pomožnih snovi**

- Kot smo že omenili v podpoglavlju 1.3.1.1, je večina uporabljenih stabilizatorjev lipidnega dvosloja polimerov, ki se adsorbirajo na površino veziklov. Želeli smo pripraviti strukturno enostavnejše PAS, z manjšo molekulsko maso, kot jih imajo polimeri, ki pa bi kljub temu stabilizirali liposome v podobnem obsegu in se vgradili v lipidni dvosloj ter ga tako modificirali.
- Predvidevali smo, da bo holesterolni ostanek predstavljal močno lipofilno sidro sintetiziranih molekul, kar bo omogočalo njihovo učinkovito vključevanje v lipidni dvosloj (Slika 4) in s tem vpliv na izboljšanje stabilnosti in povečanje hidratacije površine liposomov. Zaradi večjih polarnih glav derivatov D-glukonamida, v primerjavi s holesterolom, smo predvidevali tudi, da se bo stabilnost izboljšala zaradi posledičnega daljšega iztezanja le-teh iz lipidnega dvosloja v disperzni medij in da bo v tem smislu najoptimalnejši prilagodljiv kratek distančnik med močno lipofilnim sterolom in hidofilnim sladkorjem, kot je to v primeru spojine SKK-**6**.



Slika 4: Prikaz umestitve holesterola (A) in sintetiziranih pomožnih snovi **SKK-4** (B) ter **SKK-6** (C) v lipidni dvosloj

- PAS, ki imajo v svoji strukturi eno lipofilno verigo, lahko v vodnem mediju spontano tvorijo micele, ki destabilizirajo lipidni dvosloj, temu pojavu pa se lahko z uporabo PAS z dvema lipofilnima verigama v strukturi izognemo (37). Holesterol in njegovi derivati prav tako ne tvorijo micelov v vodi (38). Glede na strukturo sintetiziranih pomožnih snovi torej pričakujemo, da spojini **SKK-4** in **SKK-6** ne bosta tvorili micelov, saj imata sterolno lipofilno verigo. Pripravili smo tudi pomožno snov **SKK-1**, ki ima enako polarno glavo kot **SKK-4**, vendar pa v nasprotju z njo, lipofilni del predstavlja le ena alkilna veriga. Prisotnost ene same alkilne verige v molekuli **SKK-1** pomeni, da bo del spojine prosto raztopljen v okoliškem mediju, drugi del pa bo tvoril micele. Omenjeni lastnosti sta značilni za detergente in sta v našem primeru nezaželeni. Predvidevali smo, da bo pri

shranjevanju liposomov, izdelanih s to pomožno snovjo, pri višjih temperaturah (nad sobno temperaturo) prišlo do razgradnje lipidnega dvosloja, in smo zato pomožno snov **SKK-1** pripravili z namenom negativne kontrole.

- Z odprtjem obroča sladkorja se hidrofilnost, v primerjavi s hidrofilnostjo cikličnih sladkorjev, poveča. Dodatno lahko z odprtjem verige na laktunu pripravimo PAS, ki ima povečano polarnost in zato preprečuje združevanje veziklov (39).

- Takšnih amfifilnih pomožnih snovi, kot smo jih sintetizirali, po dostopnih podatkih v literaturi, še niso uporabili pri izdelavi liposomov. Pojavlja pa se uporaba podobnih snovi (s sladkorjem in sterolom v strukturi), v glavnem kot tvorilci gela (40, 41). Derivati glukonamidov se uporablajo tudi kot tvorilci stabilne pene (42), kot t.i. dvojčki PAS (ang. gemini surfactants), sestavljeni iz dveh monomernih PAS, ki sta povezani z distančnikom. Takšne molekule so detergenci, zato znižujejo površinsko napetost in imajo nizko kritično micelsko koncentracijo (43). PAS so tudi polimerni derivati glukonolaktona (glikopolimeri), ki se uporablajo za stabilizacijo emulzij (39).

### **Rezultati sinteze**

V preglednici III so prikazani rezultati naše sinteze pomožnih snovi za liposome. Kot glavne produkte smo opredelili **SKK-1**, **SKK-4** in **SKK-6**. Vmesne produkte sinteze pa smo označili z **SKK-2**, **SKK-3** in **SKK-5**.

Preglednica III: Rezultati sinteze pomožnih snovi

IME PRODUKTA	AGREGATNO STANJE IN IZGLED	IZKORISTEK SINTEZE [%]
<b>SKK-1</b>	trden, bele barve, z bisernim sijajem	77
<b>SKK-2</b>	trden, bledo rumene barve	79
<b>SKK-3</b>	trden, bele barve, z bisernim sijajem, luskam podobnega videza	65
<b>SKK-4</b>	trden, bele barve, z bisernim sijajem	48
<b>SKK-5</b>	trden, rumene barve	21
<b>SKK-6</b>	trden, bledo oranžne barve	54

### **Analiza sintetiziranih pomožnih snovi**

Istovetnost spojin smo potrdili z naslednjimi metodami:  $^1\text{H}$  NMR, masna spektroskopija in elementna analiza. S tem smo potrdili njihove kemijske strukture, ki smo jih predstavili v reakcijskih shemah v podpoglavlju 3.1.

## 4.2 PRIPRAVA LIPOSOMOV

V preglednici IV so prikazana opažanja tekom priprave liposomov in ustrezne modifikacije metode, če so bile potrebne.

Preglednica IV: Izgled tankih filmov in nastalih disperzij po njihovem hidratiranju.

	Delež v zmesi (disperziji) (%, m/m)	Priprava lipidnega filma	Hidratacija	Modifikacija metode: po dodatku DKM (a), po dodatku prečiščene vode (b)
<b>BREZ POMOŽNIH SNOVI</b>	/	homogen film na steni bučke	daljša hidratacija, nastanek netransparentne disperzije	(b) mešanje pri sobni temperaturi (~1 h)
<b>HOLESTEROL</b>	10	homogen film na steni bučke	nastanek neizrazito transparentne disperzije	/
<b>HOLESTEROL</b>	40	homogen film na steni bučke	neuspešna, na stenah bučke vidni kristali, kar pomeni, da vezikli niso nastali	(b) mešanje pri sobni temperaturi (~3 h), stanje čez noč pri sobni temperaturi
<b>SKK-1</b>	10	homogen film na steni bučke	nastanek neizrazito transparentne disperzije	/
<b>SKK-1</b>	40	težavno raztpljanje zmesi v DKM, ob mešanju pri sobni temp.	/	(a) segrevanje na vodni kopeli pri 50 °C (nekaj minut), stanje čez noč pri sobni temperaturi
<b>SKK-2</b>	40	nehomogen film na steni bučke	neuspešna, na stenah bučke vidni kristali, kar pomeni, da vezikli niso nastali	(b) stresanje na stresalniku (~1 h)
<b>SKK-3</b>	10	homogen film na steni bučke	nastanek izrazito transparentne disperzije	/
<b>SKK-3</b>	40	nehomogen film na steni bučke	neuspešna, na stenah bučke vidni kristali, kar pomeni, da vezikli niso nastali	(b) mešanje pri sobni temperaturi (~2 h), segrevanje na vodni kopeli pri 50 °C (nekaj min)

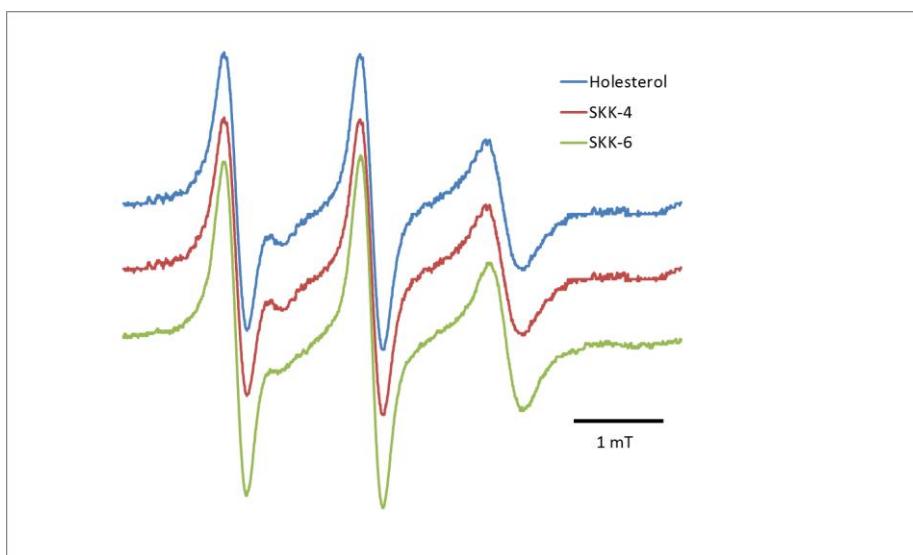
	Delež v zmesi (disperziji) (%, m/m)	Priprava lipidnega filma	Hidratacija	Modifikacija metode: po dodatku DKM (a), po dodatku prečiščene vode (b)
<b>SKK-4</b>	10	homogen film na steni bučke	nastanek neizrazito transparentne disperzije	/
<b>SKK-4</b>	40	- težavno raztopljanje zmesi v DKM ob mešanju pri sobni temperaturi - homogen film na steni bučke	- ob dodatku prečiščene vode k filmu, se je ta na steni bučke začel obnašati kot gel - ob rahlem mešanju se je viskoznost postopoma začela povečevati in je bila po končani hidrataciji znatno večja, v primerjavi z ostalimi disperzijami - po drugem dodatku prečiščene vode je disperzija postala izrazito transparentna	(a) segrevanje na vodni kopeli pri 50 °C (nekaj min) (b) redčenje disperzije s ponovnim dodatkom 5 ml prečiščene vode
<b>SKK-4</b>	5, 4, 3, 2, 1	homogeni filmi na steni bučke	nastanek netransparentnih disperzij	/
<b>SKK-5</b>	10	homogen film na steni bučke	neuspešna, po končanem stresanju so bili na stenah bučke vidni kristali, kar pomeni, da vezikli niso nastali	(b) stresanje na stresalniku (~1 h), stanje čez noč pri sobni temperaturi
<b>SKK-6</b>	10	homogen film na steni bučke	nastanek izrazito transparentne disperzije	/
<b>SKK-6</b>	40	- težavno raztopljanje zmesi v DKM ob mešanju pri sobni temp. - homogen film na steni bučke	nastanek izrazito transparentne disperzije	(a) mešanje pri sobni temperaturi (~20 min)
<b>SKK-6</b>	5, 4, 3, 2, 1	homogeni filmi na steni bučke	nastanek izrazito transparentnih disperzij	/

### 4.3 VPLIV SINTETIZIRANIH POMOŽNIH SNOVI NA LASTNOSTI LIPOSOMOV

Pri izdelavi liposomov z metodo tankih filmov smo dodajali sintetizirane pomožne snovi in ugotavljali njihov vpliv na spektre EPR (**SKK-4** in **SKK-6**), povprečno velikost, ter vrednosti PI in ZP veziklov.

#### 4.3.1 VREDNOTENJE LIPOSOMOV Z EPR

Spektre EPR smo posneli z namenom proučevanja vpliva zamenjave holesterola s sintetiziranimi pomožnimi snovema **SKK-4** in **SKK-6** na lastnosti lipidnega dvosloja. Za označevanje liposomov smo izbrali spinski označevalec MeFASL (2, 11), ker je le-ta občutljiv na dinamiko membrane v bližini sredine lipidnega dvosloja. Z vgradnjo holesterola v lipidni dvosloj, se je bistveno povečala dinamika lipofilnih repov fosfolipidov v delu membrane, ki je bliže sredici, na kar je omenjeni spinski označevalec zelo občutljiv. Glede na to, da je nepolarni del spojin **SKK-4** in **SKK-6** zelo podoben holesterolnemu, smo predvidevali, da bo dinamika zelo podobna in da bodo posledično podobni tudi spektri EPR, kar potrjujejo rezultati na Sliki 5. Spektra EPR liposomov z vgrajenima spojinama **SKK-4** in **SKK-6** sta zelo podobna spektru liposomov, ki vsebuje holesterol. Na podlagi tega rezultata lahko sklepamo, da sta **SKK-4** in **SKK-6** vgrajeni v lipidni dvosloj. Da so se sintetizirane pomožne snovi vgradile v lipidni dvosloj smo sklepali tudi na podlagi izgleda vzorca, saj po hidratiranju lipidnega filma na stenah bučke nismo opazili zaostankov kristalov pomožnih snovi.



Slika 5: Spektri EPR liposomov z **SKK-4**, **SKK-6** in holesterolom, 10 % (m/m)

#### **4.3.2 VREDNOTENJE POVPREČNE VELIKOSTI IN VREDNOSTI PI LIPOSOMOV TAKOJ PO IZDELAVI**

##### **Povprečna velikost liposomov**

Iz rezultatov meritev, ki so prikazane v Preglednici V, lahko razberemo, da prisotnost sintetizirane pomožne snovi v lipidnem dvosloju vpliva na povprečno velikost veziklov takoj po njihovi izdelavi (pred ekstruzijo). Največje liposome smo določili v primeru disperzije brez dodanih pomožnih snovi, najmanjše pa v primeru 10 % deleža SKK-3 (vmesnega produkta naše sinteze), kar pojasnjuje izrazito transparenten izgled le-te. Da bi zmanjšali in poenotili velikost in slojnost liposomov, smo takoj po izdelavi disperzije liposomov ekstrudirali. Ugotovili smo, da se njihova velikost z ekstrudiranjem manjša.

##### **Polidisperznost disperzij liposomov**

Vsi vzorci liposomov so bili zelo polidisperzni, saj se je vrednost PI gibala od 0,230 do 0,890. Po 10 prehodih polikarbonatne membrane, se je disperzijam z vključenima glavnima produktoma naše sinteze, SKK-4 (10 %) in SKK-6 (10 %), polidisperznost zmanjšala, prav tako pa tudi v primeru uporabe vmesnega produkta SKK-3 (10 %), medtem ko v primerih prisotnosti spojine SKK-1 (10 %), holesterola 10 % in takrat ko nismo dodali pomožnih snovi, pa se je povečala. Po 20 prehodih polikarbonatne membrane se je v disperzijah z vključenimi glavnimi produkti sinteze, SKK-1 (10 %), SKK-4 (10 %) in SKK-6 (10 %), vrednost PI liposomov zmanjšala, prav tako tudi v prisotnosti (10 %) SKK-3. Pri liposomih z 10 % holesterola in v disperziji tistih brez pomožnih snovi, pa smo ponovno opazili zvišanje vrednosti PI, in sicer glede na vzorce takoj po izdelavi. Sklepamo lahko torej, da je glede na začetno velikost, pri največjih liposomih potrebnih več prehodov za dosego enotnejših velikosti veziklov.

Velikost liposomov po ekstrudiranju je lahko manjša ali večja, lahko pa tudi enaka, kot so pore uporabljene membrane. Liposomi so dinamične strukture in se zato lahko pri potisku skozi membrano zožijo oz. skrčijo in zato je lahko njihova končna velikost po prehodu skozi membrano, večja od njihovih por. Velikost veziklov je lahko manjša od por, takrat, ko se npr. zunanji sloji pri večslojnih liposomih odtrgajo in iz njih nastanejo manjši vezikli, od por uporabljene membrane (44).

Preglednica V: Velikosti in vrednosti PI liposomov brez pomožnih snovi, z 10 % (m/m) sintetizirane pomožne snovi ali holesterola (HOL): (a) takoj po izdelavi, (b) po ekstrudirjanju z 10 prehodi in (c) po 20 prehodih. Vzorec označen z »BREZ PS« predstavlja liposome brez dodanih pomožnih snovi. Rezultati meritev po ekstrudirjanju (10 prehodov) so podani v obliki povprečja 3 meritev ± standardne deviacije (SD).

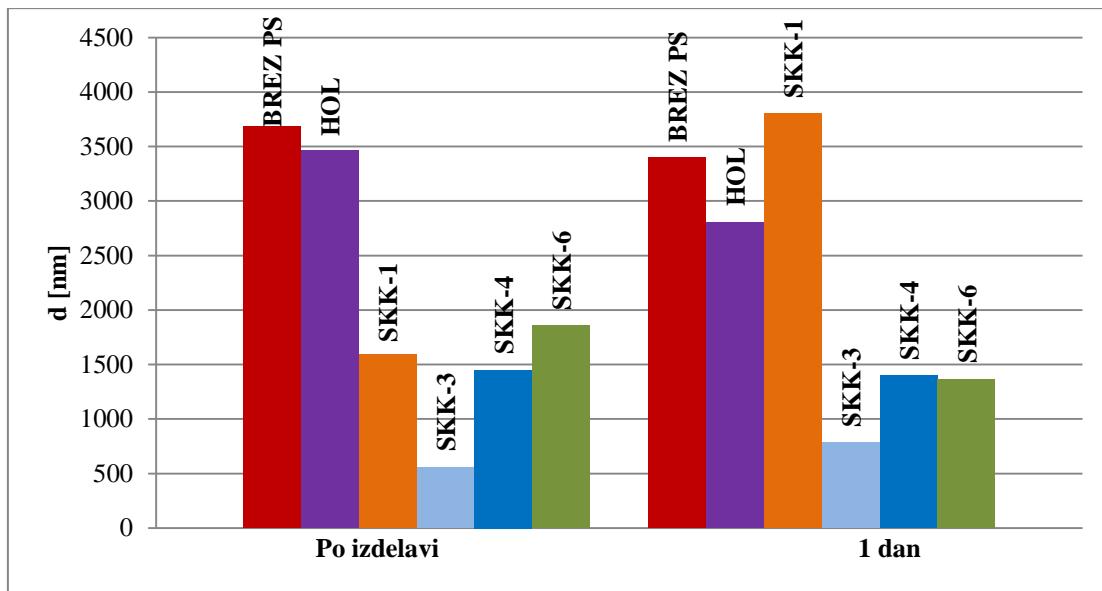
VKLJUČENA POMOŽNA SNOV	d [nm]	PI
<b>BREZ PS (a)</b>	3686	0,230
<b>BREZ PS (b)</b>	395,2 ± 53,1	0,382 ± 0,057
<b>BREZ PS (c)</b>	401,2	0,296
<b>HOL 10 % (a)</b>	3462	0,381
<b>HOL 10 % (b)</b>	255,4 ± 28,6	0,818 ± 0,094
<b>HOL 10 % (c)</b>	204,0	0,451
<b>SKK-1 10 % (a)</b>	1592	0,407
<b>SKK-1 10 % (b)</b>	261,4 ± 111,2	0,494 ± 0,117
<b>SKK-1 10 % (c)</b>	153,5	0,269
<b>SKK-3 10 % (a)</b>	557	0,540
<b>SKK-3 10 % (b)</b>	252,5 ± 77,7	0,400 ± 0,105
<b>SKK-3 10 % (c)</b>	174,8	0,268
<b>SKK-4 10 % (a)</b>	1449	0,656
<b>SKK-4 10 % (b)</b>	389,4 ± 90,1	0,412 ± 0,092
<b>SKK-4 10 % (c)</b>	403,7	0,508
<b>SKK-6 10 % (a)</b>	1858	0,890
<b>SKK-6 10 % (b)</b>	226,7 ± 16,0	0,319 ± 0,044
<b>SKK-6 10 % (c)</b>	198,9	0,270

#### 4.3.3 FIZIKALNA STABILNOST LIPOSOMOV

Z meritvami povprečne velikosti liposomov in vrednosti PI smo želeli ugotoviti vpliv staranja na fizikalno stabilnost disperzij liposomov. Meritve smo izvedli v naslednjih časovnih točkah: po 1 dnevu, 1 tednu, 2 tednih, 3 tednih in 4 tednih po izdelavi ter rezultate primerjali z vrednostmi meritev, ki smo jih opravili takoj po izdelavi.

##### 4.3.3.1 NEEKSTRUDIRANE DISPERZIJE LIPOSOMOV

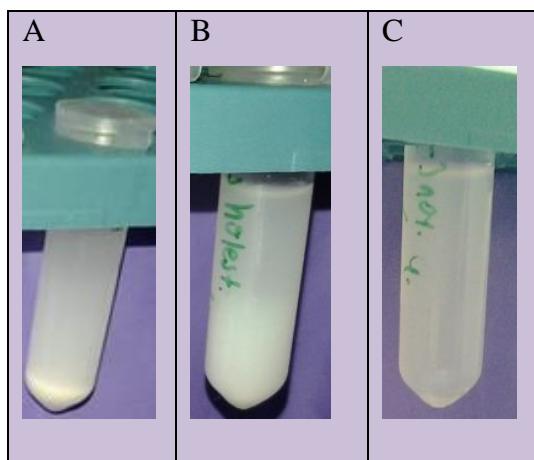
Meritve, ki smo jih opravili takoj po izdelavi in 1. dan po izdelavi, so grafično prikazane na Sliki 6 in v preglednici, Priloga 1.



Slika 6: Povprečne velikosti liposomov z dodatkom 10 % (m/m) testirane pomožne snovi ali holesterola, takoj po izdelavi in po 1. dnevu shranjevanja.

Rezultati kažejo, da se je v večini vzorcev povprečna velikost po enem dnevu zmanjšala, kar je verjetno posledica dejstva, da se takoj po izdelavi struktura veziklov še ni v celoti vzpostavila. Ker so liposomi dinamične strukture, ki nastanejo spontano, je potreben določen čas, da se njihova struktura vzpostavi, oz., da dosežemo ravnotežno stanje v disperziji. Na osnovi izsledkov lahko ugotovimo, da liposomi potrebujejo za vzpostavitev strukture daljši čas, kot pa smo ga uporabili za izdelavo. Vzorci so bili tudi po 1 dnevu zelo polidisperzni, kar dokazujejo visoke vrednosti izmerjenih PI (Priloga 1). Trenda naraščanja ali padanja vrednosti PI vzorcev z vključenimi sintetiziranimi pomožnimi snovmi in holesterolom, v primerjavi z disperzijo liposomov brez dodanih pomožnih snovi pa nismo opazili. V primerih uporabe **SKK-1**, **SKK-6** (10 %) in v disperziji liposomov brez pomožnih snovi, so vrednosti PI v neekstrudiranih vzorcih po 1. dnevu narasle, v primerih dodatka 10 % **SKK-3** in **SKK-4** ter holesterola pa padle (Priloga 1).

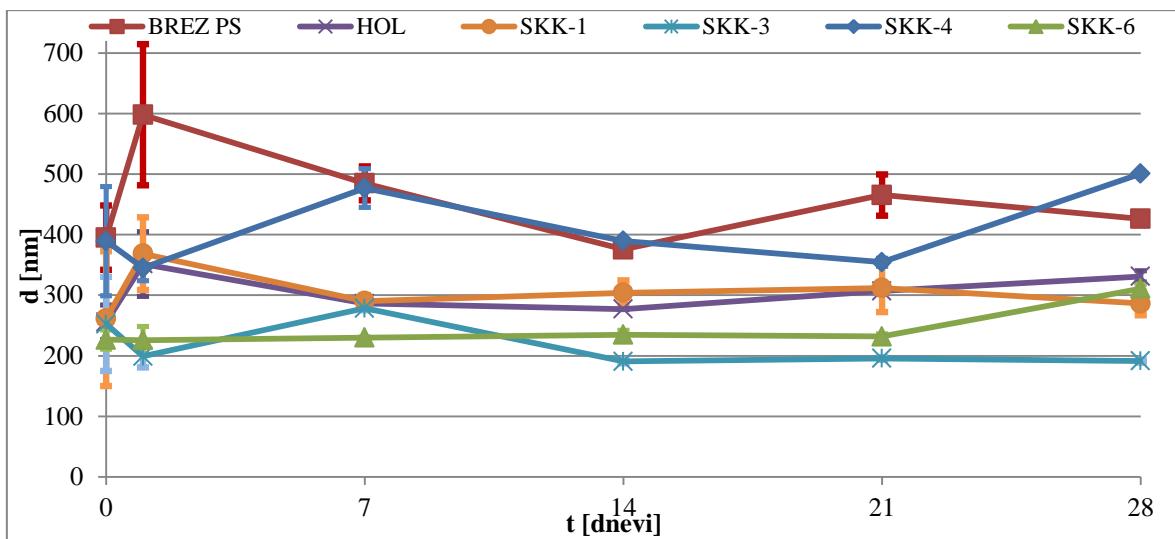
Zaradi heterogenosti velikosti veziklov v neekstrudiranih vzorcih, tem liposomom v nadaljevanju nismo merili povprečne velikosti in vrednosti PI, temveč smo njihove spremembe opazovali le makroskopsko, torej glede na njihov izgled. V neekstrudiranem vzorcu disperzije liposomov brez vključenih pomožnih snovi se je že dan po izdelavi pojavila oborina, medtem ko so neekstrudirane disperzije veziklov z vključenimi sintetiziranimi pomožnimi snovmi ali holesterolom ohranile transparentnost in odsotnost oborine vsaj še 2 tedna po njihovi izdelavi. V primeru dodane 10 % **SKK-3** pa je bil izgled vzorca nespremenjen celo 4 tedne po izdelavi liposomov (Slika 7).



Slika 7: Izgled neekstrudiranih disperzij liposomov: (A) brez dodanih pomožnih snovi, po 48 urah (B) cholesterol, 10 %, po 2 tednih (C) SKK-3,10 %, po 4 tednih

#### **4.3.3.2 DISPERZIJE LIPOSOMOV PO 10 PREHODIH SKOZI MEMBRANO**

Rezultati meritev velikosti in vrednosti PI liposomov z vključenimi sintetitiziranimi pomožnimi snovmi, po ekstrudiraju (10 prehodov skozi membrano) so grafično prikazani na Sliki 8, tabelarično pa v Prilogi 1. Glede na videz, se ekstrudirane disperzije liposomov z vključenimi pomožnimi snovmi (10 prehodov) skozi obdobje 1 meseca niso spremajale, saj so ostale transparentne, brez pojave oborine, medtem ko se je v disperziji veziklov brez vključenih pomožnih snovi, že po enem dnevu pojavila oborina, ki pa smo jo z mešanjem na vibracijskem mešalu (~20 s) kratkoročno lahko redispergirali. V primeru liposomov z dodano pomožno snovjo SKK-1 ni prišlo do pojava oborine in razgradnje lipidnega dvosloja, najverjetneje zaradi nizkih temperatur shranjevanja in razmeroma dolge lipofilne verige spojine SKK-1.



Slika 8: Povprečne velikosti liposomov z 10 % (m/m) dodanih sintetiziranih pomožnih snovi ali holesterola, po ekstrudiranju (10 prehodov skozi polikarbonatno membrano), v obdobju 1 meseca. Oznaka »BREZ PS« predstavlja liposome brez dodanih pomožnih snovi. Rezultati so podani v obliki povprečja 3 meritev  $\pm$  SD.

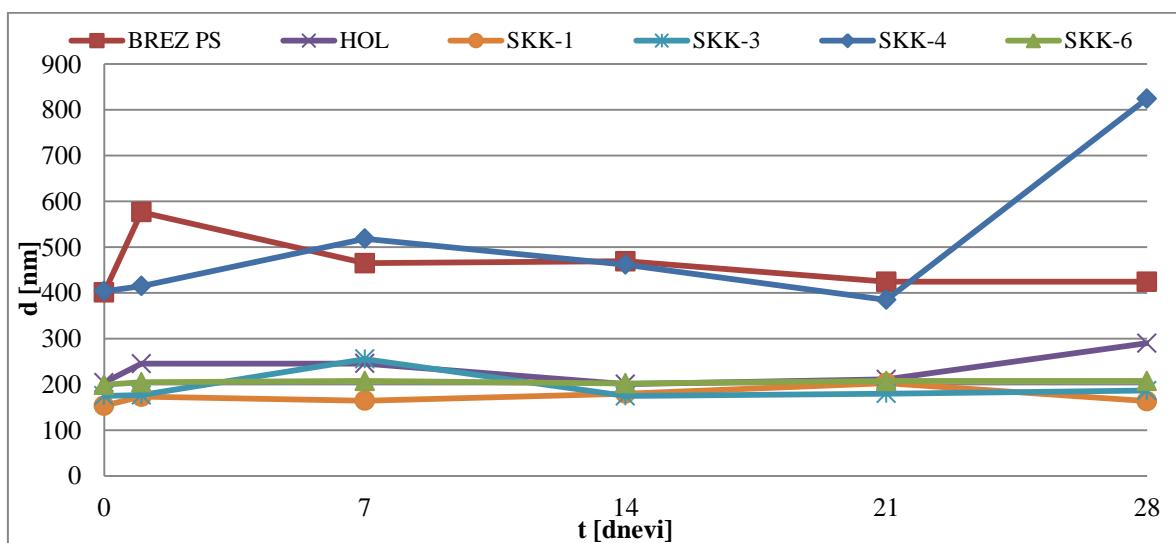
Povprečna velikost liposomov se je najmanj spremajala v primerih dodatka: 10 % **SKK-1** in 10 % holesterola. V vzorcih veziklov z 10 % **SKK-3** in 10 % **SKK-6** so bile spremembe velikosti opaznejše na začetku in koncu meritev, in sicer glede na izrazitejši spremembi velikosti liposomov z dodanimi 10 % **SKK-4** in disperzije tistih, brez pomožnih snovi. Po 1 mesecu smo izmerili najmanjo velikost liposomov v primeru dodatka 10 % **SKK-3**, zato je bila njihova disperzija izrazito transparentna. Kljub temu da imata spojini **SKK-1** in **SKK-4** enako strukturo polarne glave, pa smo med njima opazili razlike v spremjanju povprečne velikosti liposomov. Predvidevamo, da se mora, v kolikor vmeščanje hidrofilnega glukonamida spojine **SKK-4** med polarne glave fosfolipidov ni optimalno, ugodnejšemu položaju prilagoditi sterolni del, kar pa je seveda prav tako energetsko neugodno. V primeru spojine **SKK-1**, ki vsebuje namesto sterola alkilno verigo, se ta, v primerjavi s sterolom, laže prilagodi položaju polarne glave. Seveda pa prisotnost le ene alkilne verige v spojini **SKK-1** pomeni, da je del molekule prosto raztopljen v okoliškem mediju, drugi del pa tvori micle.

Vzorci liposomov so bili zelo heterogeni glede na velikost, saj so bile vrednosti PI vseh vzorcev nahajal v območju od  $0,294 \pm 0,013$ , do  $0,949 \pm 0,029$  (Priloga 1). Nismo pa ugotovili trenda naraščanja ali padanja vrednosti PI v vzorcih disperzij veziklov z vključenimi sintetiziranimi pomožnimi snovmi in holesterolom, v primerjavi z disperzijo liposomov, izdelanih brez pomožnih snovi. Skozi celotno obdobje 1 meseca so imeli najvišje vrednosti PI vzorci liposomov z vključenim holesterolom. Na podlagi meritev

povprečne velikosti liposomov lahko zaključimo, da se njihova velikost tekom 1 meseca v večini disperzij, ki so vsebovale vezikle s sintetiziranimi pomožnimi snovmi, ni znatno spremenjala ter da so disperzije liposomov z vključenimi sintetiziranimi pomožnimi snovmi (z izjemo SKK-4) po ekstrudiranju skozi polikarbonatno membrano (10 prehodov), fizikalno stabilne vsaj 1 mesec. Stabilnost omenjenih vzorcev je bila primerljiva s stabilnostjo disperzije liposomov z vključenimi 10 % holesterola (Slika 8, Priloga 1).

#### **4.3.3.3 DISPERZIJE LIPOSOMOV PO 20 PREHODIH SKOZI MEMBRANO**

Z meritvami velikosti in vrednosti PI smo v obdobju 1 meseca spremljali fizikalno stabilnost ekstrudiranih (20 prehodov skozi membrano) disperzij liposomov izdelanih z dodatkom sintetiziranih pomožnih snovi (Slika 9, Priloga 1). Izgled disperzij na ta način ekstrudiranih liposomov z vključenimi pomožnimi snovmi se, podobno kot pri vzorcih, ki smo jih ekstrudirali z 10 prehodi skozi membrano, tekom 1 meseca ni spremenil. Pojav oborine v vzorcu liposomov, izdelanih brez dodatka pomožnih snovi, pa smo opazili že naslednji dan po izdelavi. Oborino smo sicer z mešanjem na vibracijskem mešalu (~20 s) uspeli redispergirati, a le kratkoročno. V prisotnosti pomožne snovi SKK-1 pa ni prišlo do pojava oborine in razgradnje lipidnega dvosloja, in sicer predvidoma zaradi razlogov, ki smo jih navedli že v prejšnjem podpoglavlju.



Slika 9: Povprečne velikosti liposomov z dodatkom 10 % (m/m) sintetiziranih pomožnih snovi ali holesterola, po ekstrudiranju (20 prehodov skozi polikarbonatno membrano), v obdobju 1 meseca. Oznaka »BREZ PS« predstavlja liposome brez pomožnih snovi.

Iz Slike 9 in vrednosti meritev navedenih v Prilogi 1, lahko razberemo, da se je v večini ekstrudiranih disperzij liposomov, izdelanih z dodatkom pomožnih snovi, po 20 prehodih

skozi membrano, njihova velikost s staranjem ni bistveno spremajala. Izrazitejše odstopanje smo opazili le v primeru spojine SKK-**4**. Izmerjene velikosti veziklov z vključenimi sintetiziranimi pomožnimi snovmi (z izjemo SKK-**4**) so bile povsem primerljive z velikostjo tistih, ki smo jih izdelali z dodatkom 10 % holesterola. Nasprotno pa so bile izmerjene velikosti v vzorcu z SKK-**4** in liposomov brez pomožnih snovi večje, poleg tega pa se je velikost liposomov, izdelanih z SKK-**4** po 1 mesecu znatno povečala. Opazili smo razlike v obnašanju pomožnih snovi SKK-**1** in SKK-**4**, ki imata enako sicer strukturo polarnih glav, pri čemer so bile te v primerjavi s tistimi, ugotovljenimi po 10 prehodih znatnejše, pripisujemo pa jih razlogom omenjenim v prejšnjem podpoglavlju. Proučevani vzorci so bili dokaj heterogeni glede na velikost veziklov, saj so bile vrednosti vseh PI v območju 0,211 do 0,894 (Priloga 1). Trenda naraščanja oz. padanja vrednosti PI v medsebojnih primerjavah veziklov z vključenimi sintetiziranimi pomožnimi snovmi in holesterolom, s tistimi brez dodanih pomožnih snovi, nismo opazili. Skozi celotno obdobje 1 meseca so imeli med liposomi s sintetiziranimi pomožnimi snovmi najvišje vrednosti PI tisti, z vgrajeno spojino SKK-**4**. Na podlagi meritev povprečnih velikosti veziklov lahko zaključimo, da so disperzije liposomov z vključenimi 10 % sintetiziranimi pomožnimi snovmi (z izjemo SKK-**4**) ali holesterola, po ekstrudirjanju (20 prehodov) fizikalno stabilne vsaj 1 mesec.

#### **4.3.4 VPLIV SINTETIZIRANIH POMOŽNIH SNOVI NA ZETA POTENCIAL LIPOSOMOV**

Ekstrudiranim disperzijam liposomov (20 prehodov) z vključenimi 10 % sintetiziranimi pomožnimi snovi, smo izmerili tudi ZP, in sicer 2 meseca po izdelavi, da bi ugotovili kako le-te vplivajo na to lastnost liposomov in seveda posledično na njihovo fizikalno stabilnost (Preglednica VI).

Preglednica VI: Vrednosti ZP, povprečne velikosti in vrednosti PI ekstrudiranih (20 prehodov) liposomov z dodatki 10 % sintetiziranih pomožnih snovi ali holesterola in tistih brez pomožnih snovi, 2 meseca po izdelavi. ZP: povprečja 3 meritev istega vzorca  $\pm$  SD

Vzorec	ZP [mV]	d [nm]	PI
<b>BREZ PS</b>	- $11,5 \pm 0,4$	423,5	0,304
<b>HOL</b>	$8,0 \pm 0,3$	220,9	0,692
<b>SKK-1</b>	$22,0 \pm 0,7$	208,6	0,296
<b>SKK-3</b>	$65,9 \pm 6,5$	176,6	0,260
<b>SKK-4</b>	$14,1 \pm 0,6$	501,1	0,428
<b>SKK-6</b>	$67,4 \pm 1,2$	301,9	0,499

Rezultati, prikazani v Preglednici VI kažejo, da dodatki sintetiziranih pomožnih snovi vplivajo na vrednosti ZP liposomov, saj se te razlikujejo od tistih s holesterolom ali liposomov brez pomožnih snovi. Prvi pokazatelj izboljšane stabilnosti v prisotnosti pomožnih snovi v strukturi liposomov je že sam izgled disperzij, ki se 8 tednov ni bistveno spremenil. Bile so transparentne in brez vidnih oborin. Pojav oborine v vzorcu liposomov brez vključenih pomožnih snovi pa smo opazili že takoj naslednji dan po njihovi izdelavi. Glede na podatke iz literature, smatramo, da so koloidne disperzije, ki so elektrostatsko stabilizirane, stabilne takrat, ko je vrednost ZP absolutno višja od 30 mV (45). Nad to vrednostjo pa med delci, v našem primeru liposomi, prevladujejo odbojne elektrostatske sile, ki preprečujejo njihovo združevanje. S tega vidika lahko kot stabilne opredelimo vzorce liposomov, izdelanih z dodatkom SKK-3 in SKK-6. Ker pa so naše sintetizirane pomožne snovi amfifilne in imajo poleg lipofilnega dela, ki se vključi v lipidni dvosloj, tudi hidrofilni del, ki se lahko izteza v disperzni medij, so taki liposomi še dodatno sterično stabilizirani. Za tovrstne koloidne disperzije velja, da so stabilne, če je vrednost njihovega ZP absolutno višja od 20 mV (45).

Predvidevamo, da je razlog za visoko vrednost ZP liposomov z SKK-3, primarna amino skupina v strukturi, ki lahko pri določenih pogojih (ustrezen pH medija) disociira, pri čemer molekula posledično dobi pozitiven naboj, to pa prispeva k elektrostatski stabilizaciji veziklov. S pretvorbo SKK-3 v SKK-4 smo primarno amino skupino pretvorili v sekundarno, zato postane njena ionizacija manjša, to pa ima za posledico nižje vrednosti ZP v primerjavi s tistimi, izdelanimi z SKK-3. Ker pa je v molekuli SKK-4 vezan tudi

monosaharid, pomožna snov s tako strukturo vpliva tudi na sterično stabilizacijo liposomov, zato sprememb v izgledu disperzije 2 meseca po izdelavi nismo opazili. Vrednost ZP liposomov, ki so vsebovali SKK-**1** je bila rahlo višja, v primerjavi s tisto, izmerjeno v vzorcu veziklov z SKK-**4**, in sicer predvidoma zato, ker prisotnost ene alkilne verige v spojni SKK-**1** pomeni, da je del molekule prosto raztopljen v okoliškem mediju, drugi pa prisoten v obliki micelov. Za spojino SKK-**4** pa vemo, da je vgrajena v lipidni dvosloj, kar smo potrdili s spektrom EPR. Razlike so bile tudi v izmerjeni velikosti veziklov, ki je v prisotnosti SKK-**1** manjša, kar je v skladu z meritvami, opravljenimi takoj po izdelavi liposomov.

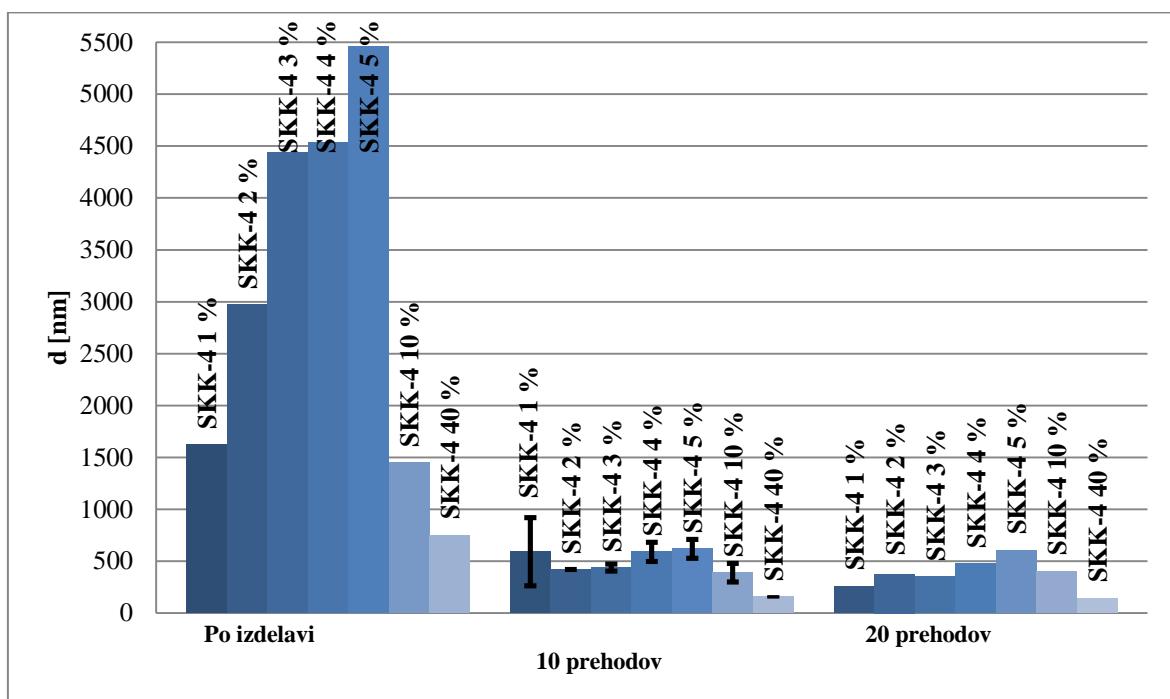
Izmerjena vrednost ZP liposomov z SKK-**6** je bila najvišja, najverjetneje zaradi predpostavke o najoptimalnejši stabilizaciji s to molekulo, in sicer zaradi doprinosa prilagodljivega kratkega distančnika med močno lipofilnim sterolom in hidofilnim sladkorjem. Kratek aminski distančnik namreč lahko pod določenimi pogoji (ustrezen pH medija) disociira, s čimer molekula pridobi pozitiven naboj, to pa prispeva k elektrostatski stabilizaciji liposomov. Spojina SKK-**6** ima med vsemi pripravljenimi PAS glede na molsko maso največjo polarno glavo, ki pa prispeva k sterični stabilizaciji liposomov, vendar pa glede na izmerjeno povprečno velikost, liposomi, izdelani z dodatkom SKK-**6** niso bili največji. To dokazuje, da izmerjena hidrodinamska velikost veziklov ne korelira z velikostjo molekul PAS, temveč je odvisna od konformacije in hidratacije teh molekul v lipidnem dvosloju oz. v disperziji. Polarne glave pomožne snovi SKK-**4** so dobro hidratirane in tvorijo na površini veziklov solvatni plašč, ki prispeva k sterični stabilizaciji liposomov, zato je bila izmerjena hidrodinamska velikost teh liposomov večja, a se 2 meseca po izdelavi ni ohranila. Povprečna velikost liposomov, izdelanih z dodatkom sintetizirane pomožne snovi SKK-**3** v strukturi pa se ni spremenila niti 2 meseca po izdelavi, saj je njihova disperzija ostala izrazito transparentna. Negativna vrednost ZP liposomov, pripravljenih brez pomožnih snovi je posledica negativnega naboja fosfolipidov, ki gradijo njihov lipidni dvosloj, zato smo tak rezultat pričakovali. Vrednost ZP liposomov z dodatkom holesterola v strukturi je bila v primerjavi z liposomi brez pomožnih snovi rahlo pozitivna, kar je v skladu s podatki iz literature (47). V literaturi smo zasledili tudi podatek, da se vrednosti ZP liposomov, izdelanih z derivati holesterola z dimetilaminsko skupino v njihovi strukturi, poveča do  $33,6 \pm 1,3$  mV (48).

#### 4.3.5 VPLIV DELEŽA SINTETIZIRANIH POMOŽNIH SNOVI NA LASTNOSTI DISPERZIJ LIPOSOMOV

Da bi proučili vpliv deleža sintetiziranih pomožnih snovi na lastnosti liposomov, smo pripravili vezikle z 1, 2, 3, 4, 5, 10 in 40 % SKK-**4** in SKK-**6** ter merili njihovo povprečno velikost, ter vrednosti PI in ZP liposomov.

##### 4.3.5.1 LIPOSOMI Z SKK-4

Povprečne velikosti liposomov z dodanim SKK-**4**, izmerjene takoj po izdelavi in po ekstrudirjanju (10 in 20 prehodov membrane) so prikazane na Sliki 10, medtem ko so vrednosti PI disperzij prikazane v tabeli Priloge 2.



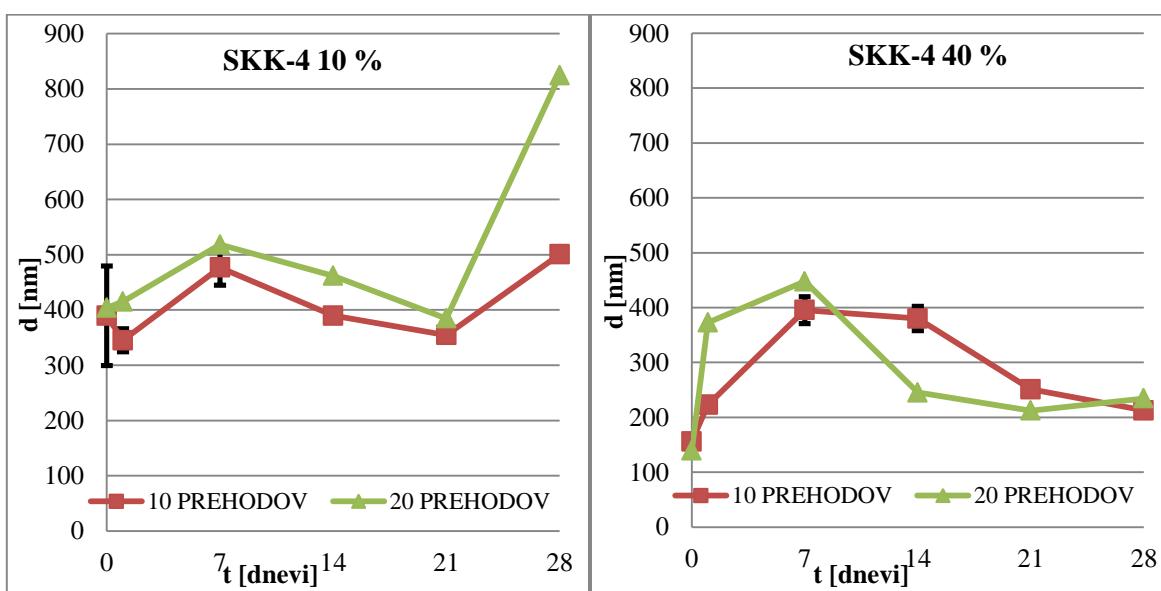
Slika 10: Povprečne velikosti liposomov, izdelanih z dodatkom SKK-**4** takoj po izdelavi in po ekstrudirjanju (10 in 20 prehodov). Rezultati meritev po ekstrudirjanju (10 prehodov) so podani kot povprečja 3 meritev  $\pm$  SD.

Rezultati kažejo, da smo takoj po izdelavi dobili velike polidisperzne vezikle, mikrometrskih velikosti, razen v primeru, ko smo v liposome vgradili 40 % deleža SKK-**4**. Po ekstruziji pa se je povprečna velikost liposomov v vseh vzorcih zmanjšala in se je gibala od 139,8 nm do 605,4 nm. Vrednost PI se je v primeru vgradnje 10 in 40 % SKK-**4** zmanjšala. Zanimiva je tudi ugotovitev, da je bila večina liposomov, ki so imeli v strukturi vgrajenih manj kot 10 % SKK-**4**, skrajno polidisperznih, zaradi česar so bili nestabilni, saj so se oborine pojavile že nekaj ur po njihovi izdelavi. Zaradi tega v nadaljevanju v tej seriji

vzorcev nismo izvedli meritev PCS. Zaključimo lahko, da spremenjanje deleža SKK-**4** v liposomih vpliva na povprečno velikost veziklov po ekstruziji (Slika 10, Priloga 2).

Z vključitvijo 3, 4 in 5 % SKK-**4** so nastali vezikli primerljivih velikosti, kot tisti v vzorcu disperzije liposomov brez vključenih pomožnih snovi. Manjše vezikle pa smo izmerili takrat, ko so bili deleži SKK-**4** 1, 2, 10 ali 40 % (Prilogi 1, 2). Izgled disperzij liposomov z 10 in 40 % SKK-**4** se tekom staranja ni spremenil, prav tako pa v teh vzorcih nismo opazili oborine, v nasprotju s tistimi, ki so imeli vgrajenih manj kot 10 % SKK-**4**. Pri teh smo opazili pojav oborine že nekaj ur po izdelavi. Podobne rezultate smo dobili tudi v primeru disperzije liposomov, izdelanih brez dodatka pomožnih snovi, pri katerih smo pojav oborine opazili že po enem dnevu. Ugotovili smo, da je vgrajevanje 10 % holesterola v lipidni dvosloj nenasičenih fosfolipidov (LIPOID S100) uspešno, medtem ko je pri uporabi 40 %, kapaciteta vgrajevanja holesterola presežena. Z modifikacijo dihidroholesterola pa smo nato uspeli izdelati stabilne liposome z nenasičenimi fosfolipidi, in sicer z uporabo 10 in 40 % spojine SKK-**4**. Nasprotno pa se je uporaba deležev SKK-**4**, ki so bili manjši od 10 %, izkazala za neustrezno glede stabilnosti veziklov.

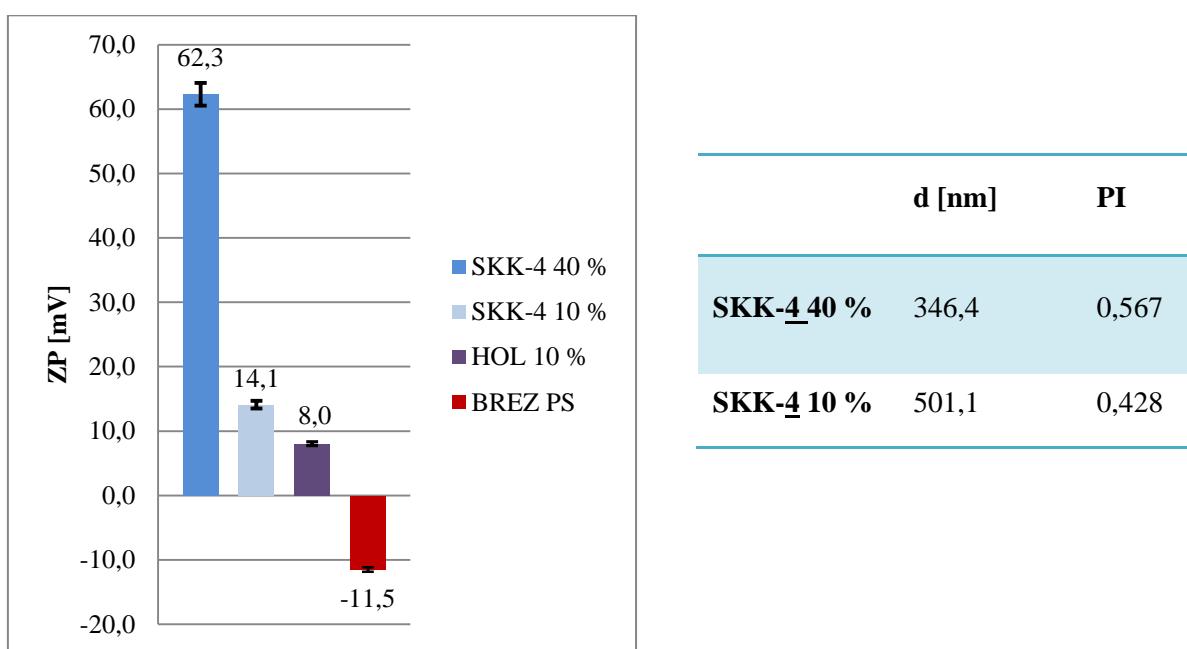
Meritve povprečne velikosti in vrednosti PI smo izvajali 1 mesec. Z namenom, da bi ugotovili, kako povečevanje deleža SKK-**4** v liposomih vpliva na stabilnost njihovih ekstrudiranih disperzij (Slika 11, Priloga 3).



Slika 11: Vpliv deleža vgrajene spojine SKK-**4** na velikost liposomov. Rezultati ekstrudiranih vzorcev (10 prehodov) so prikazani kot povprečne vrednosti 3 meritev  $\pm$  SD.

Tekom staranja disperzij smo opazili, da se je povprečna velikost liposomov bolj spremenjala v primeru uporabe 40 %, kot pa 10 % SKK-**4**, in da povečanje števila prehodov skozi membrano ni bistveno izboljšalo njihove stabilnosti (Slika 11, Priloga 3). V primerjavi z velikostjo liposomov, izdelanih brez pomožnih snovi, so bili tisti s 40 % SKK-**4** manjši in stabilnejši, saj je njihova disperzija ostala transparentna. Velikost liposomov, izdelanih z dodatkom 10 % SKK-**4** pa je bila primerljiva s tisto, izmerjeno v disperziji veziklov brez dodanih pomožnih snovi. Kljub temu da je bila njihova disperzija manj transparentna kot v primeru veziklov s 40 % SKK-**4**, pa oborine ni bilo, tako kot v vzorcu liposomov, ki niso vsebovali pomožnih snovi (Prilogi 1 in 3).

Ekstrudiranim disperzijam liposomov (20 prehodov) smo izmerili vrednosti ZP 2 meseca po izdelavi, da bi ugotovili ali vgradnja SKK-**4** vpliva na to lastnost veziklov liposomov. Dodatno smo v tej časovni točki izmerili še povprečne velikosti in vrednosti PI liposomov (Slika 12).



Slika 12: Vrednosti ZP, povprečne velikosti in vrednosti PI ekstrudiranih (20 prehodov) liposomov, izdelanih z dodatkom 10 % in 40 % SKK-**4**, 10 % holesterola in brez uporabe pomožnih snovi, 2 meseca po njihovi izdelavi.

Vidimo, da se z večanjem deleža SKK-**4** v liposomih njihov ZP povečuje. To je namreč posledica večjega števila ioniziranih molekul SKK-**4** v strukturi liposomov. Glede na vrednosti ZP liposomov z dodanimi 10 % holesterola in tistih brez uporabe pomožnih snovi, smo pri obeh deležih SKK-**4**, ugotovili, da je stabilnost tovrstnih veziklov

izboljšana. Ugotovili smo, da so glede na povprečno velikost, liposomi z večjim deležem SKK-**4** manjši, kar je v skladu z meritvami velikosti takoj po njihovi izdelavi in bolj transparentnim videzom njihove disperzije (Slika 12, Priloga 1).

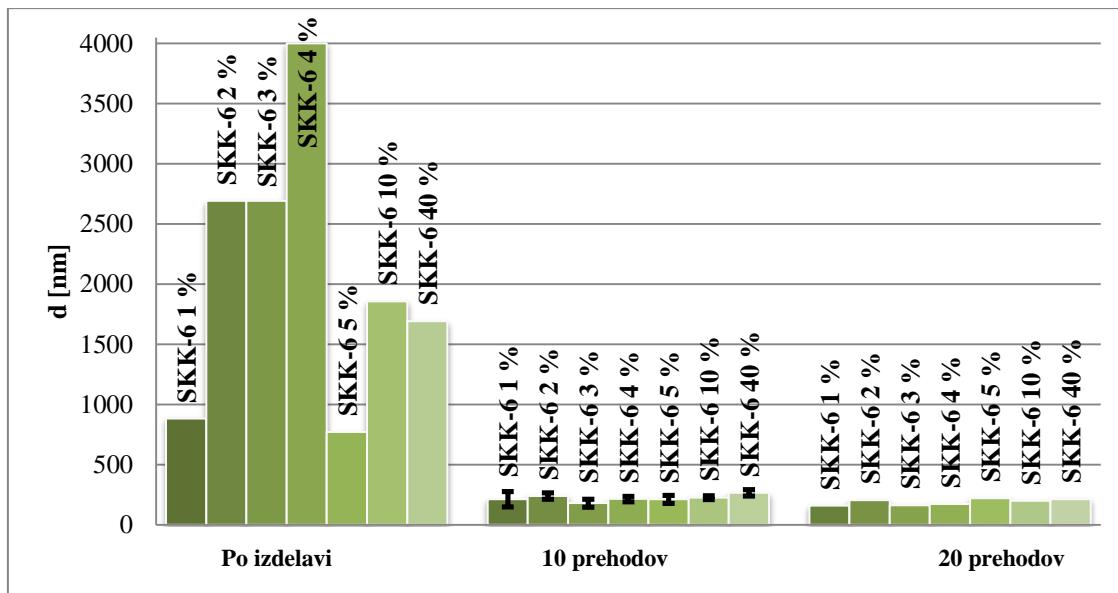
### **Vpliv SKK-4 na viskoznost disperzije**

Opazili smo, da je bila viskoznost disperzije liposomov, ki smo jo pripravili iz tankega filma s 40 % SKK-**4** bistveno večja kot viskoznost ostalih proučevanih disperzij. Zato smo želeli ugotoviti, ali je povečanje viskoznosti disperzije morda posledica geliranja SKK-**4** v vodi. Pripravili smo tanek film le iz SKK-**4** in ga hidratirali. Viskoznost disperzije, ki smo jo dobili, se ni bistveno razlikovala od viskoznosti samega medija za hidratiranje, tj. prečiščene vode. S hidratiranjem filma iz SKK-**4**, ob odsotnosti fosfolipidov smo tako potrdili, da sama spojina v vodi pri uporabljeni koncentraciji ne gelira in da je za drastično povečanje viskoznosti disperzije liposomov, izdelanih z njenim dodatkom, nujno potrebna prisotnost fosfolipidov. Za natančnejšo primerjavo viskoznosti pa bi morali viskoznost disperzij instrumentalno izmeriti. Predvidevamo, da je razlog za povečanje viskoznosti omenjene disperzije, hidratacija koloidnih struktur, pri čemer nastane debel solvatacijski plašč na površini liposomov, in sicer zaradi omenjene vgrajene spojine SKK-**4**. Ugotovili smo, da je za povečanje viskoznosti disperzije potreben dovolj velik delež SKK-**4**, saj pri vgradnji 10, 5, 4, 3, 2 in 1 % SKK-**4** v liposome, take spremembe nismo opazili.

Disperzija liposomov s 40 % SKK-**4** bi bila zato, glede na konsistenco, primerna za dermalni nanos, medtem ko bi pri ostalih disperzijah liposomov morali dodati zgoščevala, da bi dosegli ustrezne konsistence.

#### ***4.3.5.2 LIPOSOMI Z SKK-6***

Povprečne velikosti liposomov z vgrajeno spojino SKK-**6** takoj po izdelavi in po ekstrudirjanju (10 in 20 prehodov membrane) prikazuje Slika 13, vrednosti PI njihovih disperzij pa so navedene v Prilogi 4.



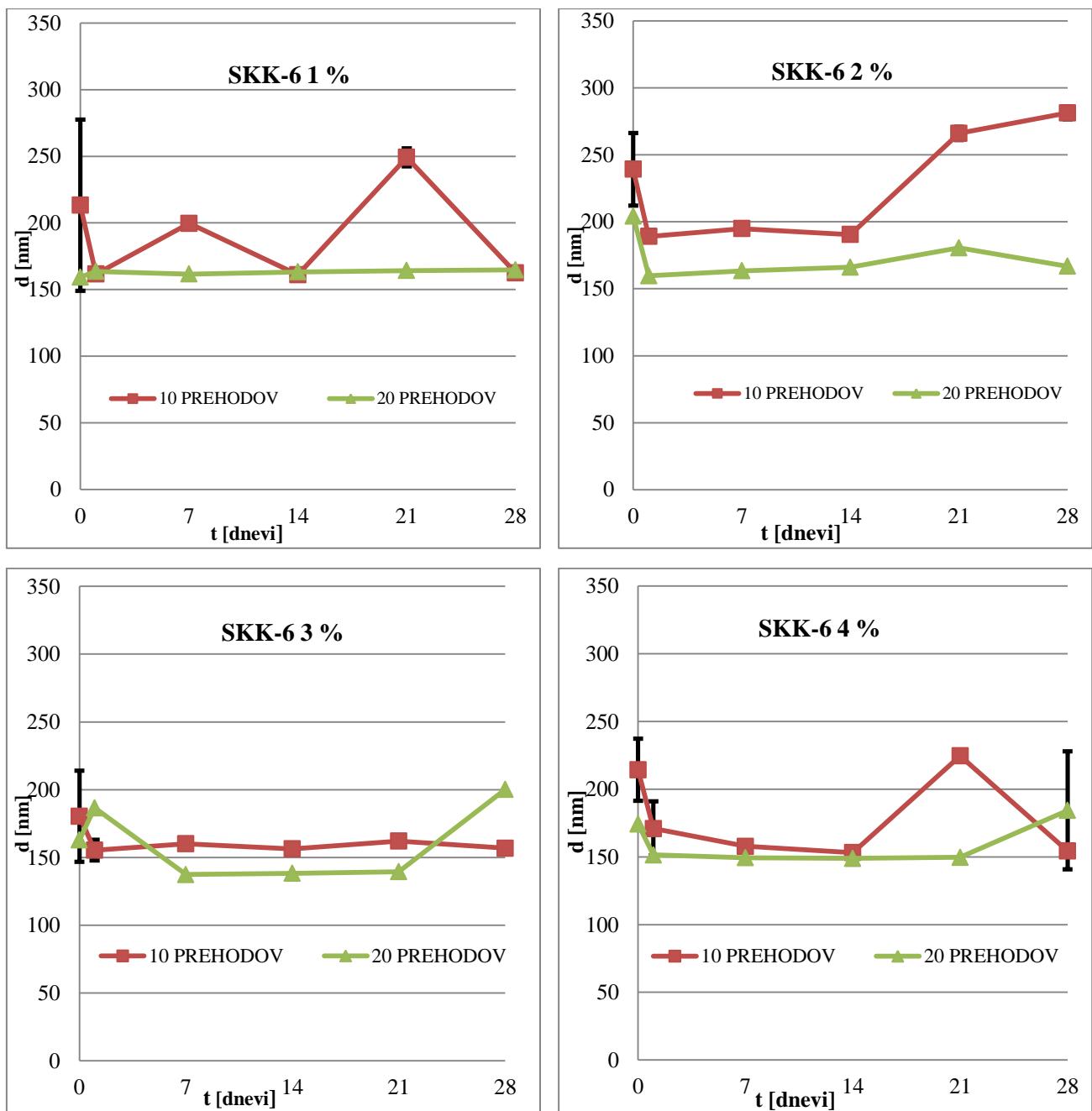
Slika 13: Povprečne velikosti liposomov z različnimi vsebnostmi SKK-**6**. Rezultati so pri ekstrudiranih vzorcih (10 prehodov) podani kot povprečja 3 meritev  $\pm$  SD.

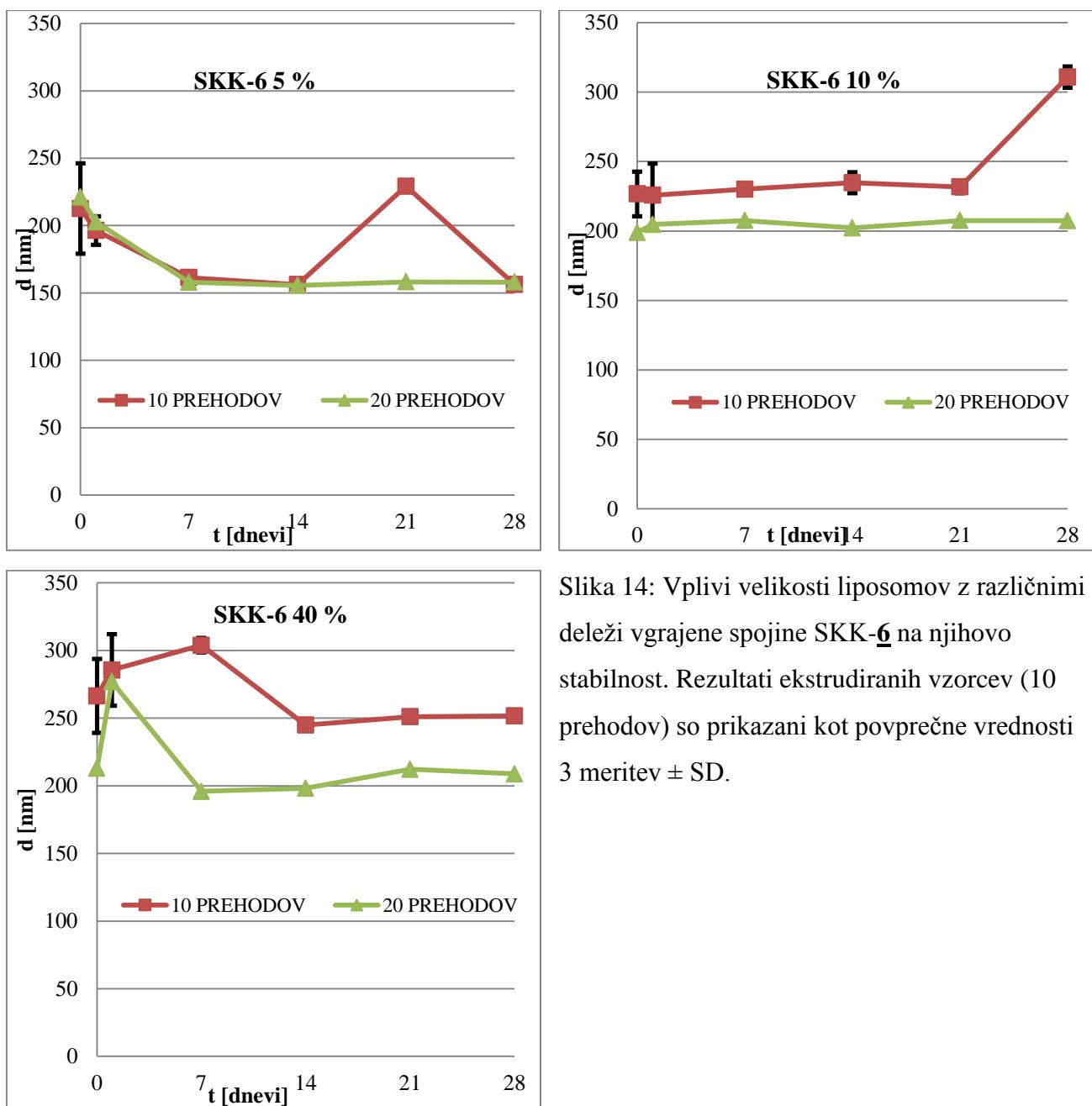
Rezultati kažejo, da smo takoj po izdelavi dobili velike polidisperzne vezikle, mikrometrskih velikosti, razen v primerih 1 % in 5 % deleža SKK-**6** v vzorcu. Po ekstrudiranju se je povprečna velikost liposomov v vseh vzorcih zmanjšala in se je gibala od 159,3 nm do 221,1 nm. Zmanjšala se je tudi vrednost PI, ki je dosegla najmanjšo vrednost  $< 0,3$ . Zaključimo lahko, da spreminjanje deleža SKK-**6** v liposomih ne vpliva znatno na povprečno velikost veziklov po ekstruziji (Slika 13, Priloga 4).

V primerjavi z velikostjo liposomov brez vključenih pomožnih snovi, so v prisotnosti SKK-**6** nastali manjši vezikli, in sicer ne glede na delež vgrajene SKK-**6** (Prilogi 1 in 4). Vsi vzorci disperzij liposomov z SKK-**6** so tekom 1 meseca ohranili izrazito transparenten videz brez prisotne oborine, kar je v nasprotju z disperzijo tistih, izdelanih brez pomožnih snovi, v katerih smo oborino opazili že po enem dnevu.

V nasprotju z neuspešnim vgrajevanjem 40 % holesterola v liposome, pripravljenih iz nenasičenih fosfolipidov, pa smo uspešno izdelali liposome s 40 % sintetiziranega derivata holesterola (SKK-**6**).

Meritve povprečnih velikosti in vrednosti PI smo izvajali 1 mesec, da bi ugotovili, kako različni deleži SKK-**6** v liposomih vplivajo na njihovo fizikalno stabilnost (Slika 14, Priloga 5).



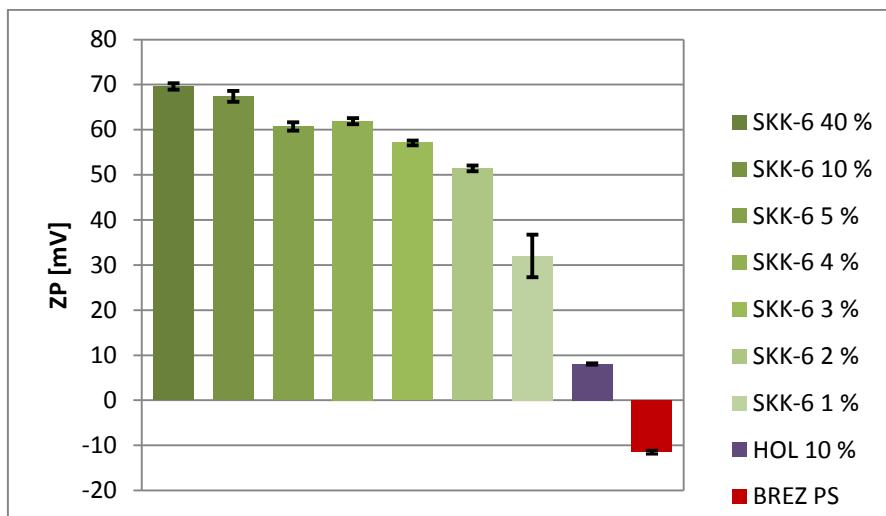


Slika 14: Vplivi velikosti liposomov z različnimi deleži vgrajene spojine SKK-**6** na njihovo stabilnost. Rezultati ekstrudiranih vzorcev (10 prehodov) so prikazani kot povprečne vrednosti 3 meritev  $\pm$  SD.

Vidimo, da se povprečna velikost liposomov, ki smo jih ekstrudirali z 20 prehodi skozi membrano, skozi čas praktično ni spremajala, medtem ko je bila po 10 prehodih manj konstantna. Zanimiva je ugotovitev, da večanje deleža SKK-**6** v liposomih ne vpliva bistveno na stabilnost njihovih ekstrudiranih disperzij. Primerjava velikosti liposomov brez dodatka pomožnih snovi in tistih, izdelanih v prisotnosti SKK-**6**, je pokazala, da so bili slednji stabilni, in sicer ne glede na delež SKK-**6**, medtem ko smo pri vzorcih brez pomožnih snovi opazili pojave oborine že prvi dan po izdelavi (Slika 14, Priloga 5).

Primerjava naših izsledkov z dostopnimi rezultati iz literature, kjer so skušali stabilnost liposomov povečati z vgrajevanjem 20 % estrov laktoze in lipida (ang. lactose ester-lipid) in 40 % holesterola kaže, da smo že z uporabo 1 % SKK-**6** in ekstrudiranjem (20 prehodov) izdelali liposome z manjšo povprečno velikostjo in vrednostjo PI ter boljšo stabilnostjo znotraj enakega časovnega obdobja (28 dni). Zavedati pa se moramo, da se sestavi primerjanih vzorcev razlikujeta tudi glede na uporabljene fosfolipide in medija za hidratacijo (24).

Ekstrudiranim disperzijam liposomov (20 prehodov) smo izmerili vrednosti ZP 2 meseca po izdelavi, da bi ugotovili, ali vključevanje SKK-**6** vpliva na to njihovo fizikalno značilnost in stabilnost (Slika 15). Dodatno smo v tej časovni točki izmerili še velikosti veziklov in vrednosti PI (Priloga 6).



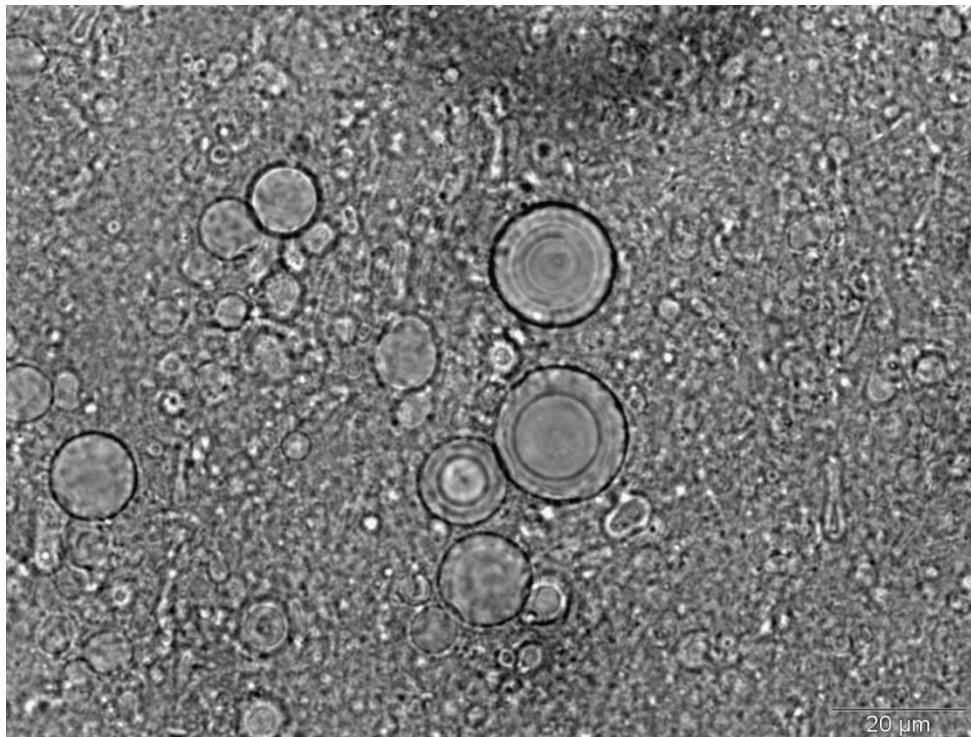
Slika 15: Vrednosti ZP liposomov z različnimi vsebnostmi SKK-**6**, 10 % holesterola in brez pomožnih snovi, 2 meseca po izdelavi. Prikazana so povprečja 3 meritev vsakega vzorca  $\pm$  SD. Izjema so liposomi z 1 % SKK-**6**, za katere smo izračunali povprečje meritev dveh vzorcev  $\pm$  SD

Ugotovili smo, da se je s spremenjanjem deleža SKK-**6** v liposomih, spremnjala tudi vrednost ZP. Z večanjem deleža SKK-**6** v liposomih se je vrednost ZP povečevala, kar je posledica večjega števila ioniziranih molekul SKK-**6** v strukturi veziklov. Že ob vgraditvi 1 % SKK-**6** je bila vrednost ZP liposomov  $> 30$  mV, kar pomeni, da je takšna disperzija stabilna, v nasprotju s tistimi, ki so vsebovale vezikle z 10 % holesterola ali liposome brez dodanih pomožnih snovi. Stabilnost smo potrdili tudi z nespremenjeno povprečno velikostjo liposomov in izrazito transparentnim videzom disperzije celo po 2 mesecih.

Povprečne velikosti in vrednosti PI liposomov po 2 mesecih pa ne korelirajo z deležem vgrajenega SKK-**6** vanje, saj so se te vrednosti v obdobju 2 mesecev spremenjale.

#### 4.4 VREDNOTENJE LIPOSOMOV Z INVERTNIM OPTIČNIM MIKROSKOPOM

Z meritvami povprečne velikosti, vrednosti PI in ZP ter spektrov EPR disperzij različno izdelanih liposomov smo dobili »le« številčne informacije. Zato ima vizualizacija proučevanih vzorcev dodano vrednost. V ta namen smo liposome z vključeno sintetizirano pomožno snovjo SKK-**6** pregledali pod invertnim optičnim mikroskopom (Slika 16). Slika kaže heterogenost vzorca zaradi prisotnosti struktur različnih velikosti. Vidni so posamezni multilamelarni vezikli mikrometrskih velikosti. Slika torej potrjuje rezultate meritev istega vzorca liposomov s PCS takoj po njihovi izdelavi (brez ekstruzije), v katerih smo določili povprečno velikost liposomov 1858 nm in vrednost PI 0,889.



Slika 16: Neekstrudirani liposomi z 10 % SKK-6. Slika je bila posneta z invertnim optičnim mikroskopom.

## 5 SKLEP

- Uspešno smo sintetizirali 3 derivate D-glukonamida, SKK-1, SKK-4 in SKK-6. Iz nenasičenih fosfolipidov in omenjenih sintetiziranih pomožnih snovi (SKK-1, SKK-4 in SKK-6), prav tako pa tudi z vmesnim produkтом sinteze (SKK-3), smo uspeli z metodo tankih filmov pripraviti liposome. Ob vgradnji pomožne snovi SKK-1 ni prišlo do pojava oborine in razgradnje lipidnega dvosloja, najverjetneje zaradi nizkih temperatur shranjevanja liposomov in razmeroma dolge lipofilne verige v omenjeni spojini. Disperzije liposomov z vgrajenima spojinama SKK-3 in SKK-6 so bile izrazito transparentne, brez oborin in so po ekstrudiranju (20 prehodov) ohranile nespremenjen izgled vsaj še 2 meseca po izdelavi. Na podlagi spektrov EPR liposomov z vgrajenima spojinama SKK-4 in SKK-6 lahko sklepamo, da sta se obe v lipidni dvosloj vgradili.
- Na podlagi spremljanja povprečnih velikosti liposomov po ekstrudiranju v obdobju 1 meseca, je bila stabilnost disperzij veziklov z vključenimi 10 % (m/m) sintetiziranih pomožnih snovi, (z izjemo SKK-4) povsem primerljiva s stabilnostjo disperzije liposomov z 10 % (m/m) holesterola. Spojina SKK-6 ima med sterolnim delom in hidrofilnim sladkorjem kratek distančnik, zato ima glede na molsko maso največjo polarno glavo. Kljub temu pa liposomi z SKK-6 niso bili največji, kar dokazuje, da hidrodinamska izmerjena velikost veziklov ne korelira z velikostjo molekul PAS, saj je odvisna tudi od konformacije in hidratacije teh molekul v lipidnem dvosloju oz. v disperziji.
- Izdelava liposomov s 40 % (m/m) SKK-4 in SKK-6 je bila uspešna, v nasprotju s pripravo veziklov s 40 % (m/m) holesterola.
- Fizikalna stabilnost liposomov z SKK-6 (1 - 5 %, m/m) je bila boljša v primerjavi z vezikli z 10 % holesterola, medtem ko je stabilnost liposomov z enakim deležem SKK-4 slabša.
- Vrednosti ZP liposomov z vgrajenimi spojinami: SKK-3, SKK-4 in SKK-6, so se gibale med 14,1 in 69,6 mV, kar kaže na njihovo boljšo fizikalno stabilnost v primerjavi z liposomi s holesterolom, (vrednost ZP= 8,0 mV). Vrednost ZP liposomov z vgrajenim SKK-6 je bila najvišja, kar podpira predpostavko o najoptimalnejšem prispevku te spojine k njihovi stabilizaciji, in sicer zaradi prilagodljivega kratkega distančnika med izrazito hidrofilnim sterolom in hidrofilnim sladkorjem v molekuli. Vrednost ZP liposomov z SKK-1 je bila rahlo višja v primerjavi s tisto, ki smo jo določili za liposome z SKK-4, in sicer predvidoma zato, ker prisotnost ene alkilne

verige v molekuli SKK-**1** pomeni, da je del spojine prosto raztopljen v okoliškem mediju, drugi pa prisoten v obliki micelov. Za spojino SKK-**4** pa smo dokazali, da je vgrajena v lipidni dvosloj, kar smo potrdili s spektrom EPR.

- Prisotnost 40 % spojine SKK-**4** v liposomih poveča viskoznost njihove disperzije, zato je konsistenza le-te primerna za dermalno uporabo.
- Posamezni gradniki, ki smo jih uporabili pri sintezi pomožnih snovi SKK-**4** in SKK-**6** so biokompatibilni. Vendar pa za sklopljene fragmente, t.j. za novo sintetizirane pomožne snovi, tega brez dodatnih raziskav ne moremo zagotovo trditi. Zato bi pred morebitno uporabo teh snovi na koži, morali izvesti ustrezne toksikološke raziskave.
- Nadalje bi bilo zanimivo vključiti liposome s sintetiziranimi pomožnimi snovmi v formulacijo za dermalno uporabo (krema, gel, fluid) in proučiti, ali se integriteta veziklov v prisotnosti ostalih sestavin v izdelku ohrani.
- V okviru diplomske naloge smo izvedli tudi poskus sinteze fluorescenčnega označevalca, ki pa pri danih pogojih fluorescenčne mikroskopije ni dajal signala, zato menimo, da bi bilo v nadalnjih raziskavah smiselno sintetizirati nove fluorescenčne označevalce, ki bi omogočili učinkovito označevanje lipidnega dvosloja in vizualizacijo liposomov s fluorescenčnim mikroskopom.

## 6 LITERATURA

- 1) Patel M, Patel H, Suthar R, Patel S: Liposomes: As A Topical Drug Delivery System. *International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences* 2012; 1(1): 1-10
- 2) Lasic DD: Applications of Liposomes. Lipowsky R, Sackmann E: Handbook of Biological Physics, Volume 1, Elsevier Science BV, Menlo park (California), 1995: 493-496
- 3) Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H: Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology* 2012; 1: 147–168
- 4) Egbaria K, Weiner N: Liposomes as a topical drug delivery system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1990; 5: 287-300
- 5) Šegota S, Težak Đ: Spontaneous formation of vesicles. *International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences / Advances in Colloid and Interface Science* 2006; 121: 51–75
- 6) Yamabe K et al.: Potentiability of double liposomes containing salmon calcitonin as an oral dosage form. *Journal of Controlled Release* 2003; 89: 429–436
- 7) Ramprasad MP et al.: The sustained granulopoietic effect of progenipoitin encapsulated in multivesicular liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 2003; 261: 93–103
- 8) Nag KO, Awasthi V: Surface Engineering of Liposomes for Stealth Behavior. *Pharmaceutics* 2013; 5, 542-569
- 9) McMullen PWT, McElhaney NR: Physical studies of cholesterol-phospholipid interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 1996; 1: 83-90
- 10) Boyer RF: Lipidi, biološke membrane in transport. Boyer RF. Temelji biokemije 2 ed. Študentska založba, Ljubljana, 2005: 208-240
- 11) Kodrič N: Vpliv modifikacije polarne skupine holesterola na tvorbo tekoče urejene lipidne faze in vezavo citolitičnega proteina ostreolizina. Diplomska naloga, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2006
- 12) Saez R, Goi FM, Alonso A: The effect of bilayer order and fluidity on detergent-induced liposome fusion, *Febs letters*, Elsevier Science BV 1985; 179(2): 311-315
- 13) Pajk S: Vplivi nekaterih produktov oksidacije holesterola na strukturiranost modelnih membran. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2011

- 14) Xu X, London F: The effect on sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce domain formation. *Biochemistry* 2000; 39, 844- 849
- 15) Dua JS, Rana AC, Bhandari AK: Liposome: methods of preparation and applications. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research* 2012; 3(2), 14-20
- 16) Sipai Altaf Bhai. M et al: Liposomes: an overview. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation* 2012; 1(1): 13-21
- 17) Swaroop Kumar SLVVS N. et al.: Stability of liposomes. *International Journal of Advances In Pharmaceutical Sciences* 2011; 2(4): 301-307
- 18) Yadav AV, Murthy MS, Shete AS, Sakhare S: Stability Aspects of Liposomes. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 2011; 45(4)
- 19) Roy SM, Sarkar M: Membrane Fusion Induced by SmallMolecules and Ions. *Journal of Lipids* 2011; 2011, 1-14
- 20) Myers D: Colloids and Colloidal Stability. Myers D: Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications, 2nd Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999: 214-238
- 21) Takeuchi H et al.: Physical stability of size controlled small unilamellar liposomes coated with a modified polyvinyl alcohol. *International Journal of Pharmaceutics* 1998; 164: 103–111
- 22) Bowman JB, Ofner MC, Schott H: Colloidal dispersions. Troy BD: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Editon, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2006: 293-313
- 23) Torchilin VP et al. Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidones: synthesis, properties and liposome surface modification. *Biomaterials* 2001; 22: 3035-3044
- 24) J. Zhu et al.: Surface modification of liposomes by saccharides: Vesicle size and stability of lactosyl liposomes studied by photon correlation spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science* 2005; 289: 542–550
- 25) Zhang T, Marchant ER: Novel Polysaccharide Surfactants: The Effect of Hydrophobic and Hydrophilic Chain Length on Surface Active Properties. *Journal Of Colloid and Interface Science* 1996; 177: 419–426
- 26) Disalvo EA, Bouchet AM: Electrophoretic mobility and zeta potential of liposomes due to arginine and polyarginine adsorption. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 2014; 440: 170– 174

- 27) Ciobanu M, Heurtault B, Schultz P. Layerosomes: Development and optimization of stable liposomes as a drug delivery system. *Int J Pharm* 2007; 344: 154-157
- 28) Chen MX et al. Layer-by-layer assembly of chitosan stabilized multilayered liposomes for paclitaxel delivery. *Carbohydrate Polymers* 2014; 111, 298–304
- 29) Ruozzi B et al. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: Two techniques for rapid characterization of liposomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005; 25: 81–89
- 30) Svanberg C, Bergman R: Photon Correlation Spectroscopy. Chalmers University of Technology, 2005:  
[http://fy.chalmers.se/~f1xjk/TIF060/home\\_files/pcstheo.pdf](http://fy.chalmers.se/~f1xjk/TIF060/home_files/pcstheo.pdf)(17.6.2014)
- 31) Blume G: Flexible liposomes for topical applications in Cosmetics. Science and Application of Skin Delivery Systems, Wiechers, Allured Publishing, Carol Street, ZDA, 2008, 269-282
- 32) De Leeuw J et al.: Liposomes in dermatology today. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 2009; 23: 505–516
- 33) Egbaria K, Weiner N: Liposomes as a topical drug delivery system. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1990; 5: 287-300
- 34) Maghrabya EGM et al.: Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008; 34: 203–222
- 35) Gillet A et al.: Skin penetration behaviour of liposomes as a function of their composition. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2011; 79: 43–53
- 36) Salmi C et al.: New stereoselective titanium reductive amination synthesis of 3-amino and polyaminosterol derivatives possessing antimicrobial activities. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2008; 43: 540-547
- 37) Neo D, Somasundaran P: Mechanism of mixed liposome solubilization in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 2001; 186: 33–41
- 38) Chou TH et al.: Simple synthesis, self-assembly, and cytotoxicity of novel dimeric cholesterol derivatives. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2014; 1161: 53–159
- 39) Bordege' V et al.: Gluconolactone-Derived Polymers: Copolymerization, Thermal Properties, and Their Potential Use as Polymeric Surfactants. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2011; 49(2): 526–536

- 40) Zabel V. Amphiphilic properties of synthetic glycolipids based on amide linkages. II. Crystal and molecular structure of N-(n-octyl)-D-gluconamide, an amphiphilic molecule in head-to-tail packing mode. *Chemistry and Physics of Lipids* 1986; 39 (4): 313-327
- 41) Sun S, Wu P: Spectral insights into gelation microdynamics of N-octyl-D-gluconamide in water. *Soft Matter* 2011; 7: 6451-6456
- 42) Piłakowska-Pietras D et al.: Investigations on foamability of surface-chemically pure aqueous solutions of functionalized alkylaldonamides. *Journal of Colloid and Interface Science* 2006; 294: 423–428
- 43) Sakai K et al.: Adsorption and micellization behavior of novel gluconamide-type gemini surfactants . *Journal of Colloid and Interface Science* 2008; 318: 440–448
- 44) Berger N et al.: Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *International Journal of Pharmaceutics* 2001; 223: 55–68
- 45) Honary S, Zahir F: Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2013; 12 (2): 265-273
- 46) Nelson SG et al.: Divergent reaction pathways in amine additions to  $\beta$ -lactone electrophiles. An application to  $\beta$ -peptide synthesis. *Tetrahedron* 2002; 58: 7081–7091
- 47) Nie Y et al.: Cholesterol Derivatives Based Charged Liposomes for Doxorubicin Delivery: Preparation, In Vitro and In Vivo Characterization. *Theranostics* 2012; 2 (11): 1092-1103
- 48) Takeuchi K et al.: Effect of zeta potential of cationic liposomes containing cationic cholesterol derivatives on gene transfection. *FEBS Letters* 1996; 397: 207-209
- 49) Wang JM, London E: Relationship between sterol/steroid structure and participation in ordered lipid domains (lipid rafts): implications for lipid raft structure and function. *Biochemistry* 2004; 43(4): 1010-1018

## 7 PRILOGE

	TAKOJ PO IZDELAVI		1 DAN		7 DNI		14 DNI		21 DNI		28 DNI	
VZOREC	d [nm]	PI	d [nm]	PI	d [nm]	PI	d [nm]	PI	d [nm]	PI	d [nm]	PI
BREZ PS (a)	3686	0,230	3397	0,557								
BREZ PS (b)	395,2 ± 53,1	0,382 0,057	597,9 ± 116,5	0,517 0,008	484,8 ± 27,9	0,617 0,143	375,8 ± 4,1	0,401 0,047	465,4 ± 34,1	0,554 0,019	426,2 5,9	0,465 0,035
BREZ PS (c)	401,2	0,296	576,5	0,487	464,9	0,330	469,0	0,325	424,3	0,310	424,5	0,293
holesterol 10 % (a)	3462	0,381	2805	0,343								
holesterol 10 % (b)	255,4 ± 28,6	0,818 0,094	351,6 53,5	0,757 0,344	286,4 3,8	0,758 0,016	277,1 0,9	0,813 0,009	306,9 5,4	0,943 0,029	331,1 9,1	0,949 0,029
holesterol 10 % (c)	204,0	0,451	245,1	0,686	245,7	0,629	200,3	0,584	211,0	0,620	290,1	0,859
SKK-1 10 % (a)	1592	0,407	3801	0,539								
SKK-1 10 % (b)	261,4 ± 111,2	0,494 0,117	368,7 60,2	0,764 0,144	290,2 10,0	0,606 0,107	304,0 20,6	0,662 0,036	312,1 40,1	0,577 0,049	286,4 19,4	0,549 0,097
SKK-1 10 % (c)	153,5	0,269	173,1	0,320	164,5	0,379	179,90	0,329	202,9	0,269	163,5	0,315

Kozoderc K: Vpliv derivatov D-glukonamida na lastnosti liposomov

	TAKOJ PO IZDELAVI		1 DAN		7 DNI		14 DNI		21 DNI		28 DNI	
VZOREC	d [nm]	PI	d [nm]	PI	d [nm]	PI	d [nm]	PI	d [nm]	PI	d [nm]	PI
SKK-3 10 % (a)	557,0	0,540	784,8	0,522								
SKK-3 10 % (b)	252,5 ± 77,7	0,400 0,105	199,2 18,5	0,366 0,043	278,4 3,3	0,519 0,008	190,5 2,7	0,374 0,018	195,7 2,1	0,398 0,007	191,4 2,4	0,375 0,015
SKK-3 10 % (c)	174,8	0,268	176,60	0,211	255,40	0,428	174,50	0,241	179,90	0,240	186,40	0,344
SKK-4 10 % (a)	1449	0,656	1398	0,624								
SKK-4 10 % (b)	389,4 ± 90,1	0,412 0,092	345,2 21,0	0,364 0,098	476,9 31,9	0,513 0,025	389,7 1,2	0,479 0,004	354,5 6,6	0,419 0,023	500,7 1,6	0,610 0,102
SKK-4 10 % (c)	403,7	0,508	415,0	0,408	518,3	0,456	461,9	0,409	384,8	0,357	824,4	0,894
SKK-6 10 % (a)	1858	0,889	1366	0,925								
SKK-6 10 % (b)	226,7 ± 6,0	0,319 ± 0,044	225,7 ± 22,9	0,319 ± 0,036	230,1 ± 0,8	0,300 ± 0,006	234,8 ± 7,5	0,294 ± 0,013	231,8 ± 4,5	0,321 ± 0,023	310,8 ± 7,6	0,460 ± 0,030
SKK-6 10 % (c)	198,9	0,270	204,7	0,289	207,5	0,283	202,2	0,280	207,5	0,275	207,4	0,327

Priloga 1: Velikosti in vrednosti PI liposomov brez dodanih pomožnih snovi, z 10 % (m/m) sintetiziranih pomožnih snovi ali holesterola: (a) takoj po izdelavi, (b) po ekstrudirjanju skozi polikarbonatno membrano z velikostjo por 800 nm (10 prehodov) in (c) 20 prehodov, v obdobju 1 meseca.

Kozoderc K: Vpliv derivatov D-glukonamida na lastnosti liposomov

VZOREC	d (nm)	PI
SKK-4 1 % (a)	1624	0,548
SKK-4 1 % (b)	591,0 ± 329,7	0,669 ± 0,153
SKK-4 1 % (c)	257,4	0,443
SKK-4 2 % (a)	2971	0,376
SKK-4 2 % (b)	419,0 ± 78,2	0,687 ± 0,282
SKK-4 2 % (c)	375,8	0,579
SKK-4 3 % (a)	4442	0,213
SKK-4 3 % (b)	438,2 ± 33,3	1 ± 0
SKK-4 3 % (c)	349,9	0,896
SKK-4 4 % (a)	4533	0,581
SKK-4 4 % (b)	589,1 ± 92,8	1 ± 0
SKK-4 4 % (c)	475,20	1
SKK-4 5 % (a)	5463	0,457
SKK-4 5 % (b)	618,6 ± 90,8	1 ± 0
SKK-4 5 % (c)	605,4	1
SKK-4 10 % (a)	1449	0,656
SKK-4 10 % (b)	389,4 ± 90,1	0,412 ± 0,092
SKK-4 10 % (c)	403,7	0,508
SKK-4 40 % (a)	746,9	0,674
SKK-4 40 % (b)	155,9 ± 7,2	0,320 ± 0,089
SKK-4 40 % (c)	139,8	0,266

Priloga 2: Povprečne velikosti in vrednosti PI liposomov z vgrajeno spojino SKK-4. (a) takoj po izdelavi, (b) po ekstrudirjanju skozi polikarbonatno membrano z velikostjo por 800 nm (10 prehodov) in (c) 20 prehodov.

Kozoderc K: Vpliv derivatov D-glukonamida na lastnosti liposomov

	TAKOJ PO IZDELAVI		1 DAN		7 DNI		14 DNI		21 DNI		28 DNI	
VZOREC	d [nm]	PI	d [nm]	PI	d [nm]	PI	d [nm]	PI	d [nm]	PI	d [nm]	PI
SKK-4 10 % (a)	1449	0,656	1398	0,624								
SKK-4 10 % (b)	389,4 ± 90,1	0,412 ± 0,092	345,2 ± 21,0	0,364 ± 0,098	476,9 ± 31,9	0,513 ± 0,025	389,7 ± 1,2	0,479 ± 0,004	354,5 ± 6,6	0,419 ± 0,023	500,7 ± 1,6	0,610 ± 0,102
SKK-4 10 % (c)	403,70	0,508	415,0	0,408	518,3	0,456	461,9	0,409	384,8	0,357	824,4	0,894
SKK-4 40 % (a)	746,9	0,674	386,6	0,467								
SKK-4 40 % (b)	155,9 ± 7,2	0,320 ± 0,089	222,9 ± 5,9	0,453 ± 0,002	395,5 ± 24,5	0,641 ± 0,117	380,0 ± 22,1	0,831 ± 0,063	251,0 ± 4,1	0,314 ± 0,026	212,6 ± 9,9	0,455 ± 0,013
SKK-4 40 % (c)	139,8	0,266	372,7	0,501	447,80	0,605	245,30	0,485	212,20	0,289	234,50	0,480

Priloga 3: Meritve povprečnih velikosti in vrednosti PI disperzij liposomov z različnimi deleži spojine SKK-4, v obdobju 1 meseca. (a) takoj po izdelavi, (b) po ekstrudirjanju (10 prehodov), (c) po ekstrudirjanju (20 prehodov).

Vzorec	d [nm]	PI
<b>SKK-6 1 % (a)</b>	882,3	0,983
<b>SKK-6 1 % (b)</b>	213,3 ± 64,2	0,388 ± 0,094
<b>SKK-6 1 % (c)</b>	159,3	0,267
<b>SKK-6 2 % (a)</b>	2692	0,718
<b>SKK-6 2 % (b)</b>	239,2 ± 27,1	0,452 ± 0,026
<b>SKK-6 2 % (c)</b>	204,2	0,414
<b>SKK-6 3 % (a)</b>	556,1	1
<b>SKK-6 3 % (b)</b>	180,4 ± 33,7	0,357 ± 0,090
<b>SKK-6 3 % (c)</b>	163,0	0,295
<b>SKK-6 4 % (a)</b>	4000 ± 4393,4	0,253
<b>SKK-6 4 % (b)</b>	214,4 ± 23,0	0,447 ± 0,026
<b>SKK-6 4 % (c)</b>	174,3	0,408
<b>SKK-6 5 % (a)</b>	770,9	0,772
<b>SKK-6 5 % (b)</b>	212,6 ± 33,6	0,443 ± 0,051
<b>SKK-6 5 % (c)</b>	221,1	0,434
<b>SKK-6 10 % (a)</b>	1858	0,886
<b>SKK-6 10 % (b)</b>	226,7 ± 16,0	0,319 ± 0,044
<b>SKK-6 10 % (c)</b>	198,9	0,270
<b>SKK-6 40 % (a)</b>	1692	0,565
<b>SKK-6 40 % (b)</b>	266,5 ± 27,3	0,380 ± 0,085
<b>SKK-6 40 % (c)</b>	213,0	0,293

Priloga 4: Povprečne velikosti in vrednosti PI liposomov z dodatkom spojine SKK-6. (a) takoj po izdelavi, (b) po ekstrudirjanju skozi polikarbonatno membrano z velikostjo por 800 nm (10 prehodov) in (c) 20 prehodov. Pri 4 % SKK-6 smo izvedli dodatno meritev (a).

Kozoderc K: Vpliv derivatov D-glukonamida na lastnosti liposomov

	TAKOJ PO IZDELAVI		1 DAN		7 DNI		14 DNI		21 DNI		28 DNI	
VZOREC	d [nm]	PI	d [nm]	PI	d [nm]	PI	d [nm]	PI	d [nm]	PI	d [nm]	PI
SKK-6 40 % (a)	1692	0,565	1664	0,435								
SKK-6 40 % (b)	266,5 ± 27,3	0,380 ± 0,084	285,6 ± 26,4	0,400 ± 0,134	303,8 ± 5,4	0,465 ± 0,018	244,9 ± 3,8	0,363 ± 0,022	251,0 ± 4,1	0,314 ± 0,026	251,7 ± 2,8	0,382 ± 0,017
SKK-6 40 % (c)	213,0	0,293	276,9	0,474	195,9	0,367	198,2	0,352	212,2	0,289	208,8	0,297
SKK-6 10 % (a)	1858,0	0,89	1366	0,93								
SKK-6 10 % (b)	226,7 ± 16,1	0,319 ± 0,044	225,7 ± 22,9	0,319 ± 0,036	230,1 ± 0,8	0,300 ± 0,006	234,8 ± 7,5	0,294 ± 0,013	231,8 ± 4,5	0,321 ± 0,023	310,8 ± 7,6	0,460 ± 0,030
SKK-6 10 % (c)	198,9	0,270	204,7	0,289	207,5	0,283	202,2	0,28	207,50	0,275	207,4	0,327
SKK-6 5 % (a)	770,9	0,772	847,90	0,723								
SKK-6 5 % (b)	212,6 ± 33,6	0,443 ± 0,051	196,3 ± 10,6	0,402 ± 0,003	161,4 ± 0,8	0,282 ± 0,005	156,2 ± 1,5	0,251 ± 0,003	229,2 ± 2,7	0,455 ± 0,024	156,2 ± 2,1	0,267 ± 0,005
SKK-6 5 % (c)	221,1	0,434	202,6	0,396	157,9	0,234	155,6	0,262	158,2	0,256	158,00	0,260
SKK-6 4 % (a)	4000 ± 4393,4	0,253	2028	0,565								
SKK-6 4 % (b)	214,4 ± 23,0	0,447 ± 0,026	171,0 ± 20,0	0,351 ± 0,121	157,8 ± 2,6	0,308 ± 0,034	153,2 ± 2,2	0,264 ± 0,006	224,6 ± 3,8	0,450 ± 0,014	154,4 ± 1,3	0,266 ± 0,009

Kozoderc K: Vpliv derivatov D-glukonamida na lastnosti liposomov

	TAKOJ PO IZDELAVI		1 DAN		7 DNI		14 DNI		21 DNI		28 DNI	
VZOREC	d [nm]	PI	d [nm]	PI	d [nm]	PI	d [nm]	PI	d [nm]	PI	d [nm]	PI
SKK-6 4 % (c)	174,3	0,408	151,5	0,261	149,4	0,265	148,9	0,254	149,7	0,267	184,4 ± 43,6	0,437
SKK-6 3 % (a)	556,1	1	4435	0,404								
SKK-6 3 % (b)	180,4 ± 33,7	0,357 ± 0,090	155,4 ± 7,6	0,257 ± 0,018	160,1 ± 2,2	0,277 ± 0,004	156,3 ± 2,1	0,258 ± 0,014	162,1 ± 2,9	0,331 ± 0,014	156,8 ± 2,7	0,265 ± 0,010
SKK-6 3 % (c)	163,0	0,295	186,6	0,423	137,4	0,242	138,3	0,232	139,5	0,230	200,2	0,423
SKK-6 2 % (a)	2692	0,718	3204	0,395								
SKK-6 2 % (b)	239,2 ± 27,1	0,452 ± 0,026	189,1 ± 0,9	0,320 ± 0,030	194,9 ± 3,6	0,362 ± 0,010	190,5 ± 2,1	0,321 ± 0,029	266,0 ± 5,0	0,482 ± 0,025	281,3 ± 4,8	0,474 ± 0,036
SKK-6 2 % (c)	204,2	0,414	159,7	0,266	163,4	0,275	166,1	0,276	180,6	0,369	166,8	0,322
SKK-6 1 % (a)	882,3	0,983	829,7	0,431								
SKK-6 1 % (b)	213,3 ± 64,2	0,388 ± 0,094	161,6 ± 3,8	0,279 ± 0,002	199,6 ± 1,8	0,447 ± 0,019	161,1 ± 2,4	0,293 ± 0,028	249,2 ± 6,7	0,483 ± 0,046	162,6 ± 0,9	0,285 ± 0,007
SKK-6 1 % (c)	159,30	0,267	163,6	0,273	161,6	0,261	163,2	0,269	164,30	0,272	164,8	0,326

Priloga 5: Meritve povprečnih velikosti in vrednosti PI disperzij liposomov z različnimi deleži SKK-6, v obdobju 1 meseca. (a) takoj po izdelavi, (b) po ekstrudirjanju (10 prehodov), (c) po ekstrudirjanju (20 prehodov). Pri 4 % SKK-6 smo izvedli dodatno meritve(a).

Kozoderc K: Vpliv derivatov D-glukonamida na lastnosti liposomov

VZOREC	d [nm]	PI	ZP [mV]
SKK-6 40 %	278,0	0,479	69,6 ± 0,7
SKK-6 10 %	301,9	0,499	67,4 ± 1,2
SKK-6 5 %	152,9	0,264	60,7 ± 0,9
SKK-6 4 %	212,1	0,418	61,9 ± 0,7
SKK-6 3 %	137	0,249	57,1 ± 0,5
SKK-6 2 %	199,9	0,462	51,4 ± 0,6
SKK-6 1 %	163,4 ± 0,6	0,321 ± 0,047	32,0 ± 4,7

Priloga 6: Vplivi vgrajenih deležev SKK-6 v disperzije liposomov na vrednosti ZP v časovni točki 2 meseca, z dodatnimi meritvami njihovih povprečnih velikosti in vrednosti PI. Pri 1 % SKK-6 smo izvedli dodatno meritev.