

Lipozomların Fiziksel ve Kimyasal Stabilitelerinin İncelenmesi
An Investigation of Physical and Chemical Stabilities on Liposomes

Asuman BOZKIR

Saadet KOÇYİĞİT*

ÖZET

Bu derlemede, ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan lipozomların kimyasal ve fiziksel stabiliteleri incelenerek, stabilitelerini artırmak amacı ile yapılan çalışmalar özetlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Lipozom, Lipozomların stabilitesi, Lipozomların fiziksel ve kimyasal stabilitesi.

SUMMARY

In this review we have investigated the physical and chemical stabilities of liposomes as a drug delivery system and the studies to improve their stability were also summarized.

Key Words: Liposomes, Stability of liposomes, Physical and chemical stabilities of liposomes.

Lipozomlar; aralarında sulu bir faz bulunan, biyolojik membrana benzeyen lipid tabakalarının oluşturduğu, mikroskobik boyutlarda, genellikle küre şeklindeki yapılardır. Lipozomların temel yapılarının hücre membran yapısına çok benzemesi ve bu nedenle in vitro araştırmalarda model membran olarak kullanılabilmeleri, ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilmeleri,, araştırmacıların ilgisini çekmiş ve özellikle son yıllarda üzerinde en çok çalışılan dozaj şekillerinden biri haline getirmiştir (1, 2).

Ancak lipozomların günümüze kadar tam çözümlenememiş sorunlarından biri hazırlanmalarından kullanılmalarına kadar geçen süre içerisindeki kimyasal ve fiziksel stabiliteleridir (3, 4).

Redaksiyona verilmiş tarihi : 13.12.1994.

* Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi.

Lipozomların Stabilitelerini Etkileyen Faktörler

Lipozomların kimyasal ve fiziksel stabilitelerinin korunmasında öncelikle lipozomun yapısı, etken maddenin lipozomda tutulduğu faz, lipozomun büyüklüğü, yükü, hazırlama koşulları ve etken maddenin fizikokimyasal özellikleri önemli rol oynamaktadır (1, 3-5).

A- Lipozomların Kimyasal Stabilitesi:

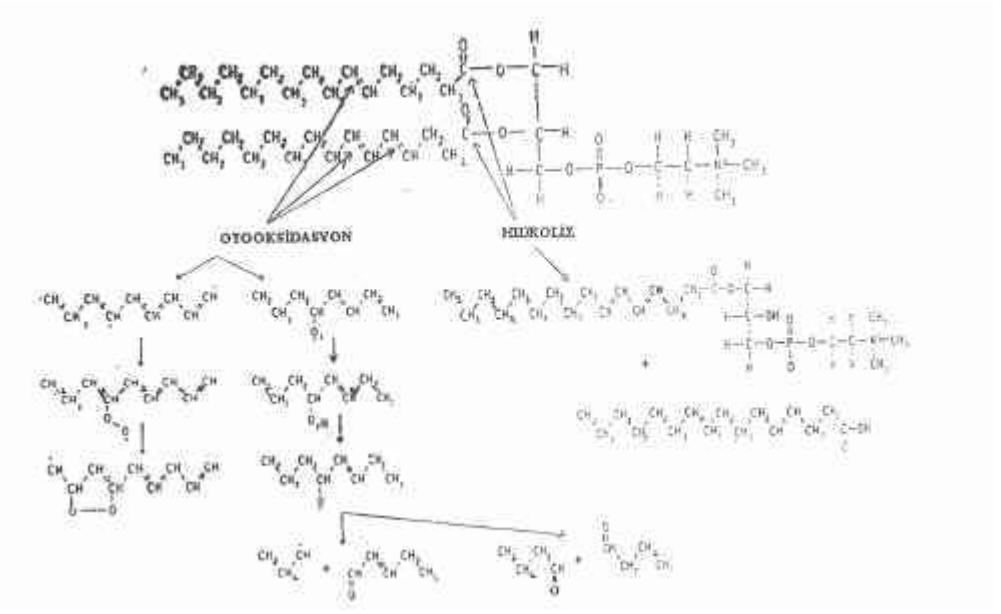
Lipozomların stabilitesini etkileyen en önemli faktör, bunların temel yapılarını oluşturan fosfolipidlerin kimyasal stabiliteleridir (6). Fosfolipidler, lipozom yapısı içinde iki şekilde kimyasal parçalanmaya uğrayabilirler.

- a) Oksidasyon (lipid peroksidasyonu)
- b) Hidroliz** (yağlı asit esterlerinin hidrolizi)

a) Oksidasyon:

Doğal fosfolipidlerin kimyasal yapısı, oksidatif hidrolitik işlemler yoluyla bozulmaya meyillidir. Lipozomlarda kullanılan fosfolipidlerin çoğu moleküler yapı olarak doymamış açil zinciri içerirler. Bu zincirler oksidatif parçalanmaya karşı dayanıksızdırlar. Özellikle doymamış yağ asidi içeren fosfolipidlerle hazırlanan lipozomlar peroksidasyona uğrayabilir. Örneğin; lesitin'in oksidasyonu sonunda oksiperoksi ve epoksi gibi ara ürünler oluşur. Bunlar daha sonra karbonil bileşiklerine, hidrokarbonlara ve furanlara dönüşerek bozunurlar. Hatta toksik bozunma ürünleride meydana gelebilir. **Şekil 1.** bu bozunma olayım ve bozunma sonucu oluşan ara ürünleri göstermektedir.

Lipidlerde meydana gelen bu oksidatif bozunma peroksitlerin ve hidro peroksitlerin oluşumu ile de sonuçlanan karmaşık bir olaydır. Meydana gelen bozunmanın miktarı ve hızı pH'ya, tampon ortamına ve sıcaklığa bağlı olarak değişir. Lipozomların hazırlanması sırasında doymamış fosfolipidler kullanılır ve oksidasyonun azaltılması için özel önlemler alınmazsa bu reaksiyonlar kolayca oluşur. Böylece lipozomların hazırlanması, depolanması ve kullanımı sırasında oksidasyon reaksiyonları meydana gelebilir. Araştırmacılar lipozom dispersiyonlarında sulu faz olarak Tris ve HEPES tamponlarının kullanımının lipid peroksidasyonunu büyük ölçüde önleyen faktörlerden biri olduğunu belirtmişlerdir (5-7).



Şekil 1. Lipozomların temel yapısını oluşturan fosfolipidlerden, fosfatidilkolin'in kimyasal parçalanma mekanizması (Otooksidasyon sonucu peroksitler ve aldehitler; Hidroliz sonucu lizo-lesitin ve yağ asitleri oluşmaktadır).

Lipozomların kimyasal stabilitesi için istenmeyen lipid oksidasyonunun bir kaç yöntemle en aza indirilebileceği bildirilmiştir (3, 7, 8). Bunlar;

- Uygunsa, doymamış fosfolipidlerin en az miktarda kullanımı,
- Ortamdaki oksijen varlığını en aza indirmek için azot ve argon gazı kullanımı,
- Düşük dirençli kapların kullanımı,
- Ortamdan ağır metallerin uzaklaştırılması,
- Antioksidanların kullanımı (a- Tokoferol gibi).

b) Hidroliz:

Hidroliz olayında; pH, sıcaklık, zaman, tampon, iyonik güçler, fosfolipid'in zincir uzunluğu ve yapısı en etkili faktörlerdendir. Bir fosfolipid molekülünde mevcut olan ester bağları su varlığında hidroliz olur. Örneğin; lesitin'in hidrolizi sonucu lizo-lesitin oluşur. Lipid tabakalarında belli oranda lizo-lesitin bulunmasının lipozomların

dayanıklığını artırdığı belirtilmiştir ve bazı araştırmacılar lizo-lesitin oluşumunu fosfolipidlerin kimyasal stabilitesini sağlayan bir faktör olarak düşünmüşlerdir. Bununla beraber depolama sırasında lizo-lesitin oluşumunun belli sınırların üzerine çıkmaması önemlidir. Lipozomların hazırlanmasında kullanılan sonikasyon gibi bazı faktörler lizo-lesitin oluşumunu etkilese bile bu problemi azaltmanın en iyi yolu kullanılacak fosfolipid miktarının uygun şekilde ayarlanmasıdır (9-11).

B- Lipozomların Fiziksel Stabilitesi:

Lipozomların fiziksel stabilitesi; lipozomun yapısına, kullanılan etken maddenin hidrofilik ya da hidrofobik olmasına ve lipozomların depolanma şartlarına önemli ölçüde bağlıdır (1, 3, 4, 12). Genellikle bir lipozom preparatının fiziksel özelliklerindeki değişiklikler veziküllerin agregasyonu ya da lipozom hacminin büyümesi şeklinde görülür. Veziküllerde meydana gelen sızma ve füzyon olayları lipozomların üretimi sırasında membran yapısında bazı zararlara yol açmaktadır. Bu durum özellikle SUV'lerin (Small Unilamellar Vesicle) faz geçiş sıcaklığı altında hazırlanmasıyla meydana gelmektedir. Bunun yanı sıra diğer lipozomlarda faz geçiş sıcaklığı üzerinde membran yapısında bazı hasarlar oluşabilir. Etken maddenin lipozom yapısından dışarı sızması tek tabakalı lipozomlarda daha çok görülmekte, çok tabakalı lipozomlarda bu olaya daha ender rastlanmaktadır. Çok tabakalı lipozomun, lipid tabakasında tutulmuş etken maddenin dışarı sızması sulu fazdaki etken maddenin dışarı sızmasına göre daha zordur (12). Molekül ağırlığı büyük olan etken maddelerin lipozomlardan dışarı sızmaları daha güçtür (M.A. > 1000). Buna karşılık küçük molekül ağırlıklı maddeler daha kolay dışarı sızabilirler. Sonikasyon koşullarının uygun olmadığı durumlarda lipozomlarda birleşme eğilimi artar ve etken madde daha kolay dışarı sızabilir.

Van der Waals etkileşimleri nötral lipozomların agregasyonu ve sedimentasyonuna neden olabilir. Bu yüzden membranlar birbirine temas ederek büyük yapıların oluşmasına neden olur, böylece membran tabaka sayısı artar ve büyük veziküller oluşur. Özellikle nötr lipozomlarda bu durum çok fazla görülür. İyi uçurulmamış artık çözücüler ve eser elementler bu olayı arttırabilirler.

Faz geçiş sıcaklığında, özellikle küçük tek tabakalı lipozomlar membranın eğrisel yapısından ileri gelen direncin az olması nedeniyle füzyona meyillidir. Lipozomların faz geçiş sıcaklığında meydana gelen

bu olayı önlemek için lipozom dispersiyonlarını faz geçiş sıcaklığından uzak bir sıcaklıkta saklamak yerinde olur. Ayrıca membran yapısına yeterli miktarda kolesterol ilavesi ile faz geçişi azalır veya tamamen ortadan kalkar. Lipozom membranlarının geçirgenliği, membranin lipid tabakasına ve lipozom içinde tutulan etken maddenin yapısına bağlıdır. Lipozom membranları arasında özellikle büyük, polar veya iyonik maddeler, küçük molekül ağırlığına sahip lipofilik maddelerden daha etkili biçimde tutulurlar (3, 5, 11).

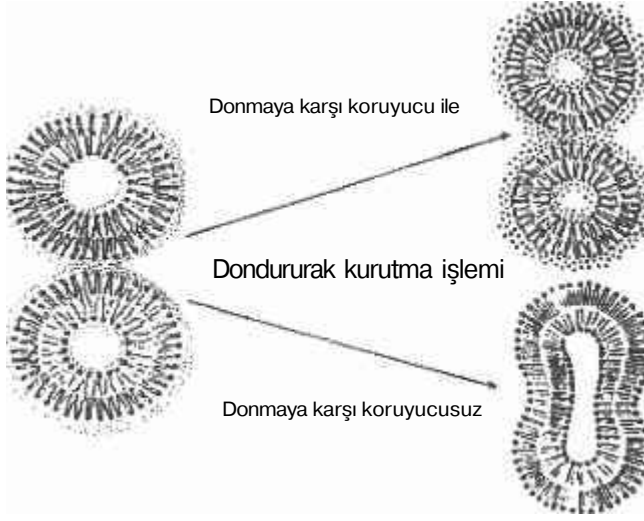
Lipozomların stabiliteilerinin sağlanması amacıyla yapılan çalışmalar

Araştırmacılar lipozomların fiziksel ve kimyasal stabiliteilerini artırmak için çeşitli çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmalarda lipozomların stabilitesini artırmak için en fazla uygulanan yöntemin liyofilizasyon olduğu görülmektedir (9-11, 13, 14).

Crowe ve arkadaşları, liyofilizasyon yöntemiyle lipozomlarda daha olumlu bir stabilite sağlandığını açıklamışlardır. Diğer bazı araştırmacılar çeşitli fizikokimyasal teknikler kullanarak stabilizasyon çalışmaları yapmışlar ve bunları yetersiz bulmuşlardır. Bununla beraber yapılan çalışmalar, lipozom preparatlarının liyofilizasyonu için sistematik olarak bir optimasyonun oluşturulmadığını, ancak bunun farklı sonuçlar elde eden araştırmacıların kıyaslama yapmasında önemli olduğunu vurgulamışlardır (15-18).

Talsma, Crowe, Strauss ve arkadaşları, dondurarak saklamanın liyofilizasyon işlemi boyunca, dondurma-eritme işlemlerinde lipozomları korumak amacıyla kullanıldığını belirtmişlerdir. Bu amaçla laktoz, maltoz, sakkaroz ve trehaloz gibi karbohidratlar kullanılmıştır. Elektrolit içeren, bazı bileşiklerin ve gliserolün dondurma-eritme tekniğinde avantaj sağladığı, fakat liyofilizasyon sırasında kriyoprotektan (dondurma koruyucusu) olarak etkisiz olduğu anlaşılmıştır (17-19).

Crowe ve arkadaşları, lipozomların kriyoprotektanlarla ilgili mekanizmalarını açıklayarak, karbohidratların faz değiştirme sıcaklığında artış, füzyon, faz ayrışması ve lipozomlardan içerik kaybı gibi zararlı membran etkilerini dehidrasyon ile önlediklerini belirtmişlerdir. Karbohidratlardan özellikle trehaloz'un füzyonu büyük ölçüde önlediğini, diğerlerinin ise füzyon olayını kısmen önlediğini belirtmişlerdir (18). **Şekil 2'de** liyofilizasyon işlemi sırasında kullanılan kriyoprotektanların lipozom yapısı üzerindeki etkisi görülmektedir.



Şekil 2. Liyofilizasyon işlemi sırasında kullanılan kriyoprotektanların lipozom stabilitesi üzerindeki etkisi.

Strauss ve Hauser, lipozomların % 10 sukroz ile hazırlandıkları taktirde toplam hacimlerinin % 20 arttığını ve fosfolipidten oluşan baş kısmının karbohidratların mevcudiyetinde fosfat baş grupları arasına eklenmesi nedeniyle daha çok yer kapladıklarını açıklamışlardır. Kullanılan şekerlere göre lipozomlarda meydana gelen büyümenin;

Trehaloz > Sakkaroz > Glukoz > Inositol

sırası ile olduğu, liyofilizasyon süresince kriyoprotektif etkinin ise yine aynı sıra ile olduğu belirlenmiştir. IR spektroskopisi yöntemi kullanılarak fosfolipid baş grupları ile etkileşen trehaloz incelenerek kesin bir kanıt elde edilmiştir (19).

Talsma ve arkadaşları, hazırladıkları lipozomlara kriyoprotektan ilave ederek liyofilizasyon işlemi uygulamışlardır. Kullanılan kriyoprotektanın etkisi dondurma eritme sirkülasyonu uygulanarak DSC yöntemiyle takip edilerek değerlendirilmiş ve kriyoprotektan sayesinde lipozomlarda aglomerasyon oluşmadığı, böylece ortalama partikül büyüklüğü 0.15 µm olan daha dayanıklı lipozomların hazırlandığı bildirilmiştir (16, 17).

Crommelin ve Van Bloois, doxorubicin lipozomlarının stabilitesi için yaptıkları çalışmada lipozomların jel veya sıvı kristal halde bulunmasının, tampon fazda tutulmuş etken madde için liyofilizasyon, donma-erime işlemlerinin önemli olduğunu buna karşılık lipid tabakada tutulmuş etken madde için önemli olmadığını bildirmişlerdir. Neden olarak, sıvı kristal fazdaki etken maddenin dışarı çıkışının kolaylaştığı, oysa kriyoprotektan ilavesiyle lipozomun bütünlüğünün korunabildiği bildirilmiştir (20).

Özer ve arkadaşları, bir grup kriyoprotektif maddenin lipozomların liyofilizasyonu üzerindeki etkilerini araştırmak üzere yaptıkları çalışmada özellikle trehaloz'un bu amaçla kullanılan maddeler arasında en etkili olduğunu saptamışlardır. Burada trehalozun hidrojen bağı yaparak fosfolipid membran ile doğrudan etkileştiği bildirilmiştir (21).

Özer ve Talsma, 5-FU içeren lipozomlardan etken madde çıkışını oda sıcaklığında ve buzdolabında muhafaza ederek incelemiştir. Etken madde kaybının oda sıcaklığında bekletilen lipozomlarda daha fazla olduğu saptanmıştır. Ayrıca sıvı dispersiyon halinde bulunan lipozomların jel halinde bulunanlara oranla daha az stabil oldukları ve daha çok etken madde kaybına uğradıkları belirtilmiştir (22).

Dang ve Rogers, hazırladıkları lipozomları polimerlerle kaplamışlardır. Bu amaçla önce polimerin hidrofilik ve iyonik güçler yardımı ile lipozom yüzeyine adsorbsiyonu sağlanmış, daha sonra polimerin hidrofilik gruplara bağlanması gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle hazırlanan lipozomlardan asetil salisilik asitin salımını ve lipozom stabilitesini incelemiştir. Çalışma sonucunda polimerle kaplı lipozomların stabilitelerinin ve etken madde salımlarının kaplanmamış lipozomlara göre daha iyi olduğunu saptamışlardır (23).

Pajeau ve arkadaşları, kollajen ve lipidler arasındaki ilişkiyi incelemiştir. İn vitro ve in vivo olarak çok tabakalı lipozomlarda, farklı sıcaklıklarda, tip-1 kollajenin varlığında ve yokluğunda çalışılmış, lipozomların kollajen ile birlikte daha uzun sürede etken madde çıkışı sağladıkları belirlenmiştir. Ortama % 0.8 oranında kollajen ilavesiyle, lipozomların yağ oksidasyonlarındaki ve geçirgenliklerindeki azalma sayesinde stabil kaldıkları bildirilmiştir (24).

Lipozomlarda yapılan stabilite testleri

Preparatların stabilite problemlerini belirlemeye yönelik faktörlerin anlaşılması, hangi test metodlarının ürünün raf ömrünün tah-

minine yarayacak bilgiyi saptama hususunda yardımcı olacaktır. Stabilite testleri sistemi her zaman karşılaşacağı koşulların ötesinde baskı altında tutar. Özellikle lipozomlar gibi hassas sistemlere stabilite testleri sırasında uygulanan sıcaklık artışının ne yaptığı önemlidir (25). Lipozomlar için yüksek sıcaklıklar; membran yapısını, faz geçiş sıcaklığına ulaşıldığı takdirde geri dönüşümsüz olarak değiştirebilir. Sistemin karşılaşılabileceği sıcaklıktan daha yüksek sıcaklıkların kullanılması halinde sistemin tekrar eski halini almama riski vardır (26).

Van Bommel ve Crommelin, tek bir donma-erime deneyine bile doymamış fosfolipidlerden hazırlanan karboksiflorosein lipozomlarının dayanmadığını belirtmişlerdir. Fosfolipid yapısına ilave edilen kolesterole rağmen karboksifloroseinin lipozomlardan hızlı bir şekilde salını gözlenmiştir. Buna karşılık distearilfosfatidilkolin / dipalmitoilfosfatidilgliserol / kolesterol içeren lipozomlar, aynı donma-erime deneyine daha olumlu sonuç vermişlerdir (14).

Lipozom preparatları için hazırlanmış tam bir stabilite testi protokolünün verilmemiş olmasına rağmen tipik bir protokolün aşğıdaki koşuldaki testleri içerebileceği belirtilmiştir (3).

- 45°C'de bir ay
- 4°C'de bir ay
- 37°C'de altı ay
- Oda sıcaklığında 12-14 ay
- Muhtelif ışık yoğunluğunda 12-24 ay
- İki-üç "donma erime devri" (-20°C <-> 25°C)
- Altı-sekiz "ısıtma-soğutma" devri (5°C \leftrightarrow 45°C ve her bir sıcaklıkta 48 saat)
- Dakikada 60 devir yapan çalkalayıcı üzerinde 24-48 saat (taşınma durumlarını tahmin etmek üzere)

SONUÇ

Sonuçta; her bir test koşulu altında bekletilen lipozomlarda mikroskopik incelemeler (flokülasyon v.s.), partikül büyüklüğü, reolojik incelemeler, kimyasal stabilite ve etken madde salını araştırılarak gerekli bilgiler toplanabilir (3, 24, 25).

Henüz lipozomların stabilite problemleri tam olarak çözümlenmiş değildir. Örneğin; bir çok araştırmacı lipozomlarda stabilite araştırmak üzere sıklıkla uygulanan liyofilizasyon tekniğinin lipozomlarda orta dereceli bir stabilizasyon sağladığını düşünmektedirler. Özellikle suda çözünebilir ilaçların bu yöntemle hazırlanmalarında bazı problemler ortaya çıkmıştır. Bu yüzden liyofilizasyon ünitelerinin çok iyi kontrol edilerek dikkatle çalışılması gerektiği vurgulanmaktadır (11).

Bunun yanısıra lipozomların stabiliteleri ile ilgili şu genel gözlemler sıralanabilir;

1- Lipozomların uzun süreli stabiliteleri ile ilgili yayınlanmış kaynak henüz çok az sayıdadır.

2- Lipozomların stabilite testi ve hızlandırılmış stabilite testi için ayrıntılı protokollerin yayınlandığı resmi bir rapor yoktur.

3- Depolama boyunca MLV (Multi Lamellar Vesicule) ve REV'ler (Reverse Phase Evaporation Vesicule) SUV'lere nazaran daha dayanıklı lipozomlardır.

4- Doymuş fosfolipidlerin kullanımı ve kolesterolün lipozoma katılımı genel olarak stabilizeyi artırır.

5- 4°C de depolanan lipozomlar oda sıcaklığında depolanana oranla daha stabildir.

6- Bazı olumsuz örneklerine rağmen "liyofilizasyon" tekniği lipozomların stabilitesi için önemli bir işlemdir.

7- Lipozomların hazırlanmasında kullanılan etken maddelerin fizikokimyasal özelliği ve hazırlama yöntemide stabilitede etkilidir.

KAYNAKLAR

1. Gürsoy, A., Pişkin, E., Dortunç, B., Peppas, N.A., Kontrollü İlaç Serbestleştirici Sistemler, Tekno Grafik, Ada Ofset, İstanbul, 173-196 (1989).
2. **Taylan, B., Özer, A.Y.**, "Lipozomların tıpta uygulanması", *Pharmacia*, 31, 16-35 (1991).
3. **Riaz, M., Weiner, N., Martin, F.**, "Liposomes", In Lieberman, H.A., Rieger, M.M. Banker, G.S., *Pharmaceutical Dosage Forms Disperse Systems*, Vol 2, Marcel Dekker Inc., New York and Basel, 567-602 (1989).
4. **Crommelin, D.J.A., Storm, G.**, "Pharmaceutical Aspects of Liposomes-Preparation, Characterization and Stability" Müller, B.W., (Ed), *Controlled Drug Delivery*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 80-91 (1987).

5. **Konings, A.W.T.**, Lipid Peroxidation in Liposomes, In Gregoriadis, G. (Ed.), Liposome Technology-Vol 1, CRC Press, Boca Raton, 141-161 (1984).
6. **Piraube, C., Postaire, E., Lize, J.M., Prognon, P., Pradeau, D.**, "Evidence of Chemical Instability of Phospholipids in Liposomes", *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 4600-4602 (1988).
7. **Weiner, N., Martin, F., Riaz, M.**, "Liposomes as Drug Delivery System", *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 15, 1523-1524 (1989).
8. **Hunt, CA., Tsang, S.**, " α -Tocopherol Retards Autooxidation and Prolongs the Shelf-Life of Liposomes", *Int. J. Pharm.*, 8, 101-110 (1981).
9. **Grit, M., Underberg, W.J.M., Crommelin, D.J.A.**, "Hydrolysis of Saturated Soybean Phosphatidyl Choline in Aqueous Liposome Dispersions", *J. Pharm. Sci.*, 82, 362-366 (1993).
10. **Grit, M., Snidt, J.H., Struijke, A., Crommelin, D.J.A.**, "Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions", *Int. J. Pharm.*, 50, 1-6 (1989).
11. **Ausborn, M., Nuhn, P., Schreier, H.**, "Stabilization of Liposomes by Freeze-Thaw and Lyophilization Techniques: Problems and Opportunities", *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 38, 133-139 (1992).
12. **Arica, B., Özer, Y., Hincal, A.A.**, "Primakin Difosfat Lipozomlarının Stabilitesi Üzerinde Çalışmalar", *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 14, 39-49 (1994).
13. **Lentz, B.R., Carpenter, T.J., Alford, D.R.**, "Spontaneous Fusion of Phosphatidylcholine Small Unilamellar Vesicles in the Fluid Phase", *Biochemistry*, 26, 5389-5397 (1987).
14. **Van Bommel, E.M.G., Crommelin, D.J.A.**, "Stability of Doxorubicin-Liposomes on Storage: as an Aqueous Dispersion, Frozen or Freeze-dried", *Int. J. Pharm.*, 22, 299-310 (1984).
15. **Assadullahi, T.P., Hamid, K., Hider, R.C.**, "In vitro Stability of Liposomes in the Presence of Polymers, Trehalose and Sodium taurocholate", *J. Microencapsulation*, 9, 317-327 (1992).
16. **Talsma, H., Steenbergen, M., Saiemink, P.J.M., Crommelin, D.J.A.**, "The Cryopreservation of Liposomes. 1" *Pharm. Res.* 8, 1021-1026 (1991).
17. **Talsma, H., Steenbergen, Crommelin, D.J.A.**, "The Cryopreservation of Liposomes: 3", *Int. J. Pharm.*, 77, 119-126 (1991).
18. **Crowe, J.H., Womersley, C, Crowe, L.M., Reid, D., Appel, L., Rudolph, A.**, "Prevention of Fusion and Leakage in Freeze-dried Liposomes by Carbohydrate", *Biochim. Bio Phys. Acta*, 861, 131-140 (1986).
19. **Strauss, G., Hauser, H.**, "Stabilization of Lipid Bilayer Vesicles by Sucrose During Freezing", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 2422 (1986).
20. **Crommelin, D.J.A., Van Bloois, L.**, "Preparation and Characterization of Doxorubicin Containing Liposomes 2", *Int. J. Pharm.*, 17, 135-144 (1983).

21. **Özer, A. Y., Talsma, H., Crommelin, D. J.A.**, "Influence of Freezing and Freeze Drying on the Stability of Liposomes Dispersed in Aqueous Media", *Acta Pharm. Techn.*, 34, 129-139 (1988).
22. **Özer, A. Y., Talsma, H.**, "Preparation and Stability of Liposomes Containing 5-FU", *Int. J. Pharm.*, 55, 185-191 (1989).
23. **Dang, C, Rogers, J.A.**, "Poly (4-vinylpyridine) Coated Liposomes: Stability Studies and Release of Acetylsalicylic acid", *J. Microencapsulation*, 9, 437-448 (1992).
24. **Pajean, M., Huc, A., Herbage, D.**, "Stabilization of Liposomes with Collagen", *Int J. Pharm.*, 77, 31-40 (1991).
25. **Carstensen, J.T.**, "Drug Stability-Principles and Practices", Marcel Dekker, Inc, Newyork and Basel, 115-117 (1990).
26. **Frokjear, S., Hijorth, E.L., Worts, O.**, "Stability Testing of Liposomes during Storage" in Gregoriadis G. (Ed.) *Liposome Technology-Vol 1*, Florida, GRC Press, Boca Raton, 235-244 (1984).