
LEK. SIROV.	God. XXXV	Broj 35	Str. 75 – 87	Beograd 2015.
LEK. SIROV.	Vol. XXXV	No. 35	Pp. 75 – 87	Belgrade 2015.

Pregledni rad – Review paper
UDC: 615.456.014; 615.277.015
COBISS.SR-ID 220243212

Rukopis primljen: 15.12.2015.
Prihvaćen za publikovanje: 21.12.2015.

**NOSAČI/PREPARATI NA BAZI HIJALURONSKE KISELINE ZA
PARENTERALNU PRIMENU SA POSEBNIM OSVRTOM NA
KONJUGACIJU SA TAKSOLOM**

**Čujić Nada¹, Ibrić Svetlana², Bigović Dubravka¹, Noveski Nebojša¹,
Šavikin Katarina¹**

¹ Institut za proučavanje lekovitog bilja dr „Josif Pančić“, Tadeuša Koćuška 1, 11000
Beograd, Srbija

² Farmaceutski fakultet, Institut za farmaceutsku tehnologiju, Vojvode Stepe 450, 11000
Beograd, Srbija

IZVOD

Preparati sa produženim oslobađanjem su poslednjih godina posebno aktuelni jer omogućavaju veću terapijsku efikasnost, smanjuju pojavu neželjenih efekata i omogućavaju ciljano delovanje. Posebno su poslednjih godina interesantni konjugati hijaluronske kiseline i citostatika, a jedan od njih je i taksol, koji pored mnogobrojnih terapijskih indikacija ispoljava i niz neželjenih efekata. Cilj konjugovanja taksola sa hijaluronskom kiselinom je smanjenje toksičnosti na zdravim i povećanje selektivnosti na tumorskim ćelijama. Hijaluronska kiselina se može primenjivati u različitim farmaceutskim preparatima, pa i u parenteralnim, jer ima niz prednosti kao što su biokompatibilnost i biodegradibilnost. Spada u *in situ* gelirajuće sisteme koji se podvrgavaju faznom prelazu u odgovoru na spoljne stimulanse kao što su temperatura, pH ili prisustvo jona, čime se omogućava produženo dejstvo lekovite supstance. Mnoge tumorske ćelije pokazuju ekspresiju velikog broja receptora za hijaluronsku kiselinu, pa ona ima veliki afinitet za tumorske ćelije. Inkorporiranjem taksola u gelirajući sistem sa hijaluronskom kiselinom omogućava se postepeno oslobađanje leka, povećanje antikancerskog delovanja, smanjuje se oštećenje zdravih ćelija i povećava selektivnost leka.

Ključne reči: taksol, hijaluronska kiselina, *in situ* sistem, produženo delovanje.

UVOD

Makromolekuli kao DDS (*Drug delivery systems*) su predloženi u literaturi kao potencijalna sredstva koja bi potencijalno omogućila savladavanje rezistencije leka, poboljšanje terapijske efikasnosti i sprečavanje tolerancije. DDS sistemi ne samo da smanjuju učestalost aplikacije leka, neželjene efekte, već poboljšavaju i komfor pacijenta prilikom primene lekovitog sredstva. Posebno su poslednjih godina interesantni konjugati hijaluronske kiseline i hemoterapijskih lekova, odnosno citostatika, lekova koji se koriste u tretmanu kancerogenih oboljenja. Jedno od aktuelnih ispitivanja je konjugacija hijalurona sa raznim antitumorskim sredstvima, a posebno je interesantna konjugacija sa taksolom (Paclitaxel^R) [1].

Taksol je citostatik iz grupe biljnih derivata poznatih pod nazivom taksani. Svoje dejstvo ostvaruje delujući na mikrotubule, tako što ih stabilizuje, „zamrzava“ u polimerizovanom stanju i sprečava nekontrolisanu proliferaciju ćelija kancera. Glavna indikacija za primenu je karcinom dojke, dok u kombinaciji sa drugim lekom, karboplatinom (alkilujućim agens), predstavlja terapiju izbora za karcinom ovarijuma. Neželjena dejstva mogu biti ozbiljna i uključuju mijelosupresiju i kumulativnu neurotoksičnost. Moguća je pojava preosetljivosti i retencije tečnosti koja se manifestuje edemom nogu [1-3].

Taksol je terpeniski alkaloid koji se dobija iz dve vrste roda *Taxus*, *Taxus baccata* poznata pod nazivom evropska tisa ili *Taxus brevifolia*, zapadno pacifička tisa, familija *Taxaceae*. Tisa se javlja u obliku niskog drveta ili žbuna, a može izrasti i do 10 m. Listovi su u obliku mekih, na vrhu zašiljenih četina, 2-3cm dugih. Tamno zelene su boje, spiralno raspoređeni, ravnog oboda. Plodovi su vrlo karakteristične koštunice sa sočnim crvenim arilusom. Pacifička tisa raste po šumama istočnog dela severnoameričkog kontinenta. Kod nas se sporadično javlja *Taxus baccata*, inače prisutna u šumama srednje Evrope. Veoma je rasprostranjena kao hortikulturna, parkovska vrsta. Za ekstrakciju sastojaka koriste se svi delovi biljaka (kora, grančice, listovi, mladi izdanci). Ipak najčešće se koristi kora i to pacifičke tise. Kora se skida u periodu od maja do avgusta. Najkvalitetnija droga se dobija sa stabala koja su stara 100 godina [4].

Taksol je najpoznatiji i prvi korišćen prirodni lek protiv raka [2]. Vođen istorijskom pričom da je kralj Gala, Kativolkus, izvršio samoubistvo ispijanjem čaja od lišća evropske tise, botaničar Arthur S. Barclay je 1962. godine sakupio uzorke ove biljke, smatrajući da sadrži citotoksična jedinjenja. Sirovi ekstrakti kore tise, analizirani u Research Triangle Institute (Karolina, SAD), pokazali su neobično širok spektar citotoksične aktivnosti protiv ćelija leukemije i brojnih ćelija raka. U periodu od 1960-1981. godine, taksol je između 110.000 jedinjenja iz 35.000 biljaka pokazivao najbolju aktivnost [2]. Međutim, njegova upotreba nije odmah otpočela, jer je veliki problem predstavljala niska rastvorljivost taksola, kao i veoma skup proces izolovanja. Masovna seča šuma *Taxus brevifolia* dovela je do

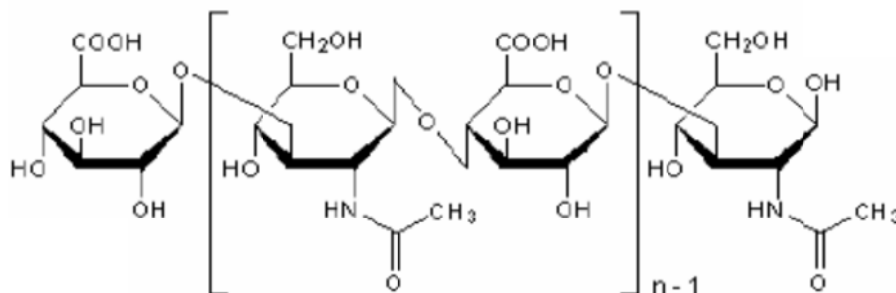
promena u određenim ekosistemima. 1994. godine izvršena je totalna sinteza taksola. Mada je do danas objavljeno šest totalnih sinteza taksola, one su ekonomski neisplative, pa se taksol danas proizvodi polusintetskim putem [5]. Pored niza citotoksičnih efekata na ćelije raka, taksol ispoljava i niz neželjenih efekata na zdrave ćelije. Cilj konjugovanja taksola sa hijaluronskom kiselinom kao nosačem je smanjenje toksičnosti na okolnim tkivima i povećanje selektivnosti na tumorskim ćelijama [6].

Karakteristike hijaluronske kiseline

Sinonimi: Hyaluronic acid, Hyaluronate, Hyaluronic acid sodium salt, Sodium hyaluronate

Hemijski naziv: (1→3)-O-(2-Acetamid-2-deoksi-β-D-glukopiranozil)-(1→4)-O-β-D-glukopiranosiduronan

Molekulska formula: (C₁₄H₂₁NO₁₁)_n



Slika 1. Strukturna formula hijaluronske kiseline

Figure 1. The structural formula of hyaluronic acid

Hijaluronska kiselina je razgranat polisaharid velike molekulske mase sastavljen naizmenično od D-glukuronske kiseline i N-acetilglukozamina. To je makromolekul koji može sadržati i do 25.000 disaharidnih jedinica u lancu. Polimeri hijalurona mogu biti veličine od 5000 do 20000 Da u *in vivo* uslovima. Dobija se ekstrakcijom iz petlove kreste ili se dobija fermentacijom streptokoka (Lancefieldova grupa A i C) [3].

Prisutna je u vezivnom tkivu svih pršljenova u vidu hijaluronata, i u visokoj koncentraciji nalazi se u koži, hrskavicama, u pupčanoj vrpci, u staklastom telu u oku i sinovijalnim tečnostima [3, 7]. Komponenta je građivnog dela svake supstance i tkiva koji daju čvrstinu okolnim ćelijama. Hijaluronska kiselina se najčešće nalazi u obliku soli, natrijum-hijaluronata [7]. Danas se pod terminom hijaluronan podrazumeva i hijaluronska kiselina i natrijum-hijaluronat [3].

Osobine: Beo ili skoro beo, veoma higroskopan prašak ili se nalazi u obliku vlaknastih agregata. Umereno je rastvorljiv u vodi, praktično nerastvorljiv u anhidrovanom alkoholu ili acetonu i ostalim organskim rastvaračima. 0.5% rastvor u vodi ima pH od 5,0-8,5. Čuva se u hermetički zatvorenim kontejnerima, zaštićen od svetlosti i vlage [3, 7].

LD₅₀ (srednja letalna doza): >2400 mg/kg ako se primeni oralno kao natrijum-hijaluronat kod miša, >4000 mg/kg ako se primeni subkutano, a 1500 mg/kg intraperitonealno [3].

Neželjeni efekti: Zabeleženi su izveštaji o pojavi prolaznog porasta očnog pritiska kada se natrijum-hijaluronat primenjuje u oko. Ako se ubrizgava u koleno, može se javiti lokalna inflamacija na mestu aplikacije u vidu bola i upale. Javljali su se povremeni izveštaji o preosetljivosti, i retko anafilaksija [2, 3].

Rastvor soli natrijum-hijaluronata je viskozan i koristi se prilikom hiruških zahvata na oku, npr prilikom operacije katarakte. Preko fine kanile se u prednju i zadnju očnu komoru uvodi i omogućava da tkiva tokom operacije budu odvojena i štiti ih od traume [3]. Koristi se i kombinacija natrijum-hijaluronata sa hipromelozom da se stvori film na oku prilikom hiruških intervencija i da se spreči hiruško prijanjanje instrumenata. Koristi se i u tretmanu suvog oka u kombinaciji sa veštačkim suzama, kod operacija katarakte, pri implanataciji intraokularnog sočiva, kod transplatacije rožnjače, i terapiji glaukoma.

Natrijum-hijaluronat se može koristiti i za reparaciju lezija oralne sluzokože.

Hijaluronat se prirodno nalazi u zglobovima, gde deluje kao sredstvo koje amortizuje pokrete u zglobu, pomažući nesmetane pokrete kolena [2]. Starenjem količina sinovijalne tečnosti se smanjuje unutar zglobova pri čemu se javlja bol i smetnje pri obavljanju pokreta [8]. Natrijum-hijaluronat se koristi i za aplikaciju unutar zglobova u terapiji osteoartritisa kolena. Koristi se takođe prilikom artroskopskih procedura i koristi se kao privremena zamena za sinovijalnu tečnost. U patologiji osteoartritisa koncentracija molekula hijaluronske kiseline koja je prirodno prisutna u sinovijalnoj tečnosti se smanjuje. Jedan pristup u tretmanu osteoartritisa je suplementacija sinovijalne tečnosti sa zadnje strane kolena sa hijaluronskom kiselinom ili njenim derivatima. Takve injekcije mogu smanjiti bol u roku od 1-6 meseci, ali mogu biti praćene kratkoročnim povećanjem upale kolena. Studije pokazuju da to može biti efikasna opcija za pacijente koji nisu u stanju da uzimaju oralno NSAID ili primaju kortikosteroide, ili koji nisu kandidati za operaciju zamene zgloba [2]. Hijaluronska kiselina se primenjuje i lokalno radi

stimulacije zarastanja rana. Pored natrijumove soli takođe se koristi i cink-hijaluronat, mada znatno ređe. Hilan polimeri, koji su proizvodi unakrsnog hemijskog umrežavanja hijaluronske kiseline divinil-sulfonom koriste se na sličan način kao i sama hijaluronska kiselina u terapiji osteoartritisa i rana. Hilan polimeri su netoksični, neinflamatorni, ne ponašaju se kao antigeni i ne izazivaju reakcije stranog tela u organizmu. Hemijskim umrežavanjem hijaluronske kiseline povećava se dodatno molekulska masa i viskoelastične osobine, što je najbližije prirodnoj sinovijalnoj tečnosti.

Natrijum-hijaluronat postavljen intravezikularno se koristi kao privremena zamena za glikozaminoglikanski sloj u bešici za terapiju simptomatickog intersticijalnog artritisa [9-10]. Gel hijaluronske kiseline se može koristiti i u tretmanu aknoznih keratoza [2].

Polimer (makromolekul) je sastavljen od velikog broja malih molekula (strukturnih jedinica) međusobno povezanih kovalentnim vezama. Hijaluronska kiselina dobijena iz kultura ćelija se naknadno hemijski modifikuje i umrežava. Tokom i nakon bubrenja zadržava svoj oblik i strukturu. Nerastvorljivost u vodi je posledica umrežavanja, ali tako umrežena hijaluronska kiselina zadržava afinitet za vodu. Kao rezultat umrežavanja pa rastvaranja u vodi dobija se transparentni gel pogodan za intradermalne injekcije. Umrežavanje može biti hemijsko (permanently) ili fizičko. Ako je mreža nastala kovalentnim umrežavanjem onda je ona hemijski gel, dok se formiranje fizičkog gela odvija preko fizičke asocijacije između polimernih lanaca ili nanočestica. U nekim slučajevima u jednom gelu mogu koegzistirati i fizički i hemijski gelovi [9].

Hijaluronska kiselina ima niz prednosti a pre svega biokompatibilnost i to što joj proizvodi nakon degradacije nisu toksični. Hijaluron se polako apsorbira i raspoređuje sa mesta aplikacije, jer spada u biodegradabilne prirodne polimere. Degradira se enzimima poznatim pod nazivom hijaluronidaze, što ga u organizmu čini biodegradabilnom supstancom [2, 9, 10]. Nedostaci su joj slaba mehanička svojstva, a ako se dobija iz životinskih organizama može biti kontaminirana virusima [9]. Još jedan nedostatak je postupak dobijanja hijaluronske kiseline koji je zametan i skup. Prema FDA smernicama hijaluronska kiselina spada u nosače aktivnih supstanci koji se mogu primenjivati u različitim farmaceutskim preparatima, pa i u parenteralnim [11]. Hijaluronska kiselina kao nosač aktivne supstance se može koristiti kao tzv. *klizeći gel (shear-thinning polymer)*, male viskoznosti koji se kao takav direktno aplikuje ili kao *in situ* gelirajući sistem. Viskozni gel hijaluronske kiseline, čiji se viskozitet smanjuje smicanjem odnosno prolaskom kroz iglu može da se ubrizga kroz relativno mali promer igle. Nakon prestanka delovanja sile ubrizgavanja formira se gel na mestu primene *in situ*. Viskoznost hijaluronske kiseline opada sa porastom temperature što je čini pogodnom za injekcionu primenu [12].

Vrste nosača lekovite supstance na bazi hijaluronske kiseline za parenteralnu primenu

Gelovi koji se formiraju *in situ* predstavljaju novu klasu sistema za isporuku lekovitih supstanci. Imaju jedinstvenu sposobnost da se podvrgavaju faznom prelazu kao odgovoru na spoljne stimulanse kao što su temperatura, pH ili prisustvo jona, čime se omogućava produženo dejstvo lekovite supstance. Ovi gelovi ispoljavaju odličnu kompatibilnost sa drugim ekscipijensima, imaju malu toksičnost i visok kapacitet solubilizacije za različite lekovite supstance. Ne izazivaju iritaciju na mestu primene [10, 12].

Bubrenje hidrogelova zavisi od osmotskog pritiska koji je u ravnoteži sa elastičnošću mreže sve dok na mrežu ne deluje neki spoljni stimulan. Bubrenje prirodnog polimera zavisi od stepena umrežavanja, sadržaja hidrofilnih grupa, stepena jonizacije, fleksibilnosti polimernih lanaca. Stepenn bubrenja je važan zbog primene hidrogelova, koeficijenta difuzije vode kroz hidrogel, optičkih i mehaničkih svojstava. Hijaluronska kiselina je polimer osetljiv na spoljne stimulanse, jer sadrži komponente koje reaguje na promene u spoljašnjoj sredini. Pri tome joj se menja bubrenje i otpuštanje pri čemu se zadržava oblik i struktura. Zbog svoje sposobnosti zadržavanja vode i drugih sposobnosti, hidrogelovi, pa i hijaluronska kiselina kao takva predstavljaju jedinstvene biomaterijale koji se primenjuju u tkivnom inženjeringu, kontrolisanom oslobađanju aktivne supstance, imobilizaciji enzima, kao biosenzor, separaciona membrana, itd. Hidrogelovi se mogu koristiti u obliku liofilizata, komprimovanih praškova pripremljenih za rekonstituciju odgovarajućim rastvaračem za oralnu upotrebu, mikro i nanočestica, i poslednjih godina veoma aktuelno kao nosači lekova za transdermalnu primenu [9-12].

Kriterijumi koji se moraju uzeti kao parametri za dizajniranje hidrogelova za kontrolisano oslobađanje leka su: molekulska masa polimera i veličina molekula aktivne supstance, mesto delovanja leka, vreme za koje je potrebno da supstanca deluje, stepen umrežavanja, interakcija polimera i leka, biodegradacija polimera, uslovi od kojih zavisi umrežavanje (temperatura, pH, jonska jačina, mehanička svojstva hidrogela, osetljivost na spoljne stimulanse) [11].

Različite lekovite supstance mogu biti inkorporirane *in situ* i samim aplikovanjem injekcije njihovih vodenih rastvora na ciljnim mestima postiže se produženo dejstvo, uz minimalnu invazivnost i bol. Tako nije potreban dodatak bilo kojih drugih supstanci koje omogućavaju produženo delovanje, već sam *in situ* gel omogućava produžen efekat supstance. Pored brojnih biomaterijala, injekcioni hidrogelovi formirani *in situ* hemijskom polimerizacijom ili formirani tranzicijom sol-gel faze od nedavno se dosta primenjuju [12]. Ovi sistemi su tečni vodeni rastvori pre primene, ali kada se ubrizgaju prelaze u gel stanje u fiziološkim uslovima. Formiranje gela nakon injektovanja ima niz prednosti: matriks za

injektovanje se može ugraditi u ljudsko telo uz minimalnu hirušku intervenciju, i bioaktivni molekuli ili ćelije se mogu jednostavno inkorporirati u nosač neposredno pre aplikacije. Nakon geliranja, ovi matriksi postaju depoi lekovite supstance ili depoi za regeneraciju tkiva. Gelovi su posebno termo osetljivi, jer su specifični injekcioni biomaterijali zbog njihovog spontanog geliranja koje je zavisno od telesne temperature bez bilo kakvog zahteva za dodatnim hemijskim tretmanom. Kada se primenjuju kao DDS, lek/polimer formulacija može da bude oslobođena od bilo kog organskog rastvarača, koji mogu denaturisati osetljive terapijske agense koji se ugrađuju u polimer, npr. proteine. Step en osobađanja lekovite supstance se može kontrolisati menjanjem karakteristika samog polimera (9, 11). Hidrogel formulacije su korisne i primenjuju se za parenteralnu primenu i injekcije koje imaju specifično mesto primene i delovanja [12].

Injekcije sa hidrogelovima pružaju alternativni pristup koji omogućava da se obuhvate ćelije na koje je potrebno delovati uz minimalnu invazivnost. Neka umrežavanja prolaze bez primene ili dodatka hemijskog ili fizičkog stimulusa. Jedan od tih primera je hijaluronska kiselina [1].

Hidrofobna udruženja su još jedna mogućnost fizičkog geliranja. Derivati hijaluronske kiseline modifikovani linearnim aminima mogu da formiraju fizičke gelove u vodi i da imaju dugotrajnu stabilnost. Hijaluron fizički gel koristi se u vidu injekcija za rekonstrukciju mekih tkiva, kao što su masno tkivo i za ispitivanje antiinflamatornog odgovora. To su sve pozitivne osobine hijaluronske kiseline kao tkivnog inženjerskog materijala. Za razliku od ostalih fizičkih gelova, fizički gelovi koji su derivati hijaluronske kiseline nisu reverzibilni niti zavise od temperature tela [10, 12].

Najznačajni ekscipijensi u formulaciji preparata/nosača na bazi hijaluronske kiseline

U formulaciji gelirajućih *in situ* sistema pored hijaluronske kiseline ili njenih derivata za parenteralnu primenu uključeni su: voda za injekcije, sredstvo za izotonizaciju (manitol, sorbitol, glukoza, natrijum-hlorid), sredstva za podešavanje pH (puferi: acetatni, fosfatni, citratni), konzervansi (benzalkonijum hlorid, parabeni), antioksidansi (askorbinska kiselina). Princip pri formulaciji parenteralnih preparata je jednostavnost formulacije kad god je to moguće. Pomoćne materije se dodaju samo kada je to neophodno [13].

Rastvarači koji se koriste za izradu parenteralnih preparata treba da budu: neiritantni, netoksični, nesenzibilisajući, da ne pokazuju terapijsku aktivnost, da ne utiču na delovanje lekovite supstance, da su fizički i hemijski stabilni pri različitim pH vrednostima. Viskozitet i fluidnost rastvarača treba da omogućí laku aplikaciju preparata [13-14]. Voda za injekcije (*Aqua ad injectabilia*) je najvažniji i najviše

upotrebljavani vehikulum za parenteralne preparate. Organizam je dobro prihvata. Mora biti apirogena i viskog stepena hemijske čistoće [15].

Parenteralni preparati su sterilni preparati namenjeni za aplikaciju injekcionim, infuzionim putem ili implantacijom u ljudski ili životinjski organizam. Parenteralni preparati se aplikuju putem koji zaobilazi gastrointestinalni trakt i često se koristi za lekove koji ne mogu da se daju oralno, a omogućava se stabilizacija lekovite supstance, ciljana isporuka leka, omogućava se brza i potpuna apsorpciju lekovite supstance, manji gubitak supstance, izbegavanje metabolozma u jetri, trenutna raspoloživost leka [13].

Parenteralni preparati mogu da sadrže pomoćne supstance, npr. sredstva za izotonizaciju, koji regulišu pH vrednost, povećavaju rastvorljivost, sprečavaju degradaciju lekovitih supstanci, obezbeđuju adekvatno antimikrobno dejstvo, ali i da ne utiču negativno na terapijsko delovanje aktivne supstance ili izradu u koncentracijama u kojima se koriste, da ne izazovu toksičnost ili nepotrebnu lokalnu iritaciju [13, 15-16].

Parenteralni preparati su svrstani u nekoliko kategorija [13]:

- injekcije
- infuzije
- koncentracije za injekcije i infuzije
- praškovi za injekcije i infuzije
- gelovi za injekcije
- implantati

Parenteralni preparati se izrađuju korišćenjem materijala i metoda koje obezbeđuju sterilnost i sprečavaju kontaminaciju i razvoj mikroorganizama.

Modifikovano oslobađanje, odnosno produženo delovanje je nekada poželjno zbog smanjenja učestalosti aplikovanja leka, što je najčešći razlog izrade preparata sa produženim delovanjem [13].

Postupci izrade (laboratorijski nivo) preparata/nosača na bazi hijaluronske kiseline

Izrada parenteralnog preparata na bazi hijaluronske kiseline kao nosača izvodi se pod aseptičnim uslovima, što podrazumeva smanjenje mogućnosti mikrobiološke kontaminacije na najmanju moguću meru [13].

Parenteralni preparati se izrađuju pod aseptičnim uslovima u komori sa laminarnim protokom vazduha. Hidrofilni gelovi sa hijaluronskom kiselinom za parenteralnu primenu se izrađuju hladnim postupkom [1]. Hijaluronska kiselina ili njeni derivati se rastvore u propisanoj količini hladne vode, pa se potom dodaju druge pomoćne materije i lekovita supstanca. Disperzija se čuva u frižideru na 4°C, uz povremeno mešanje sve dok se ne dobije homogen rastvor. Da bi se obezbedila stabilnost i zadovoljavajuća tolerancija mogu se podešavati pH i osmolarnost [13].

Ukoliko je moguće, odnosno ukoliko aktivna i pomoćne supstance to dozvoljavaju poželjno je na kraju uraditi završnu toplotnu sterilizaciju (preporučeni uslovi sterilizacije: temperatura 121°C, pritisak 101,3 kPa, u trajanju od 15 min). U slučaju da tokom sterilizacije parom dolazi do degradacije lekovite supstance ili značajne promene viskoziteta preparata, koristi se metoda sterilizacije filtracionim medijumom na sobnoj temperaturi. Tada je potrebno obezbediti mali nivo presterilizacionog bioopterećenja (*bioburden*): < 100 CFU/mL [13, 15-18].

Ako je u formulaciju uključena lekovita supstanca koja je rastvorna u vodi, najpre se ona rastvori pa se potom dodaju pomoćne materije pa tek na kraju hijaluronska kiselina [13, 16].

Osnovni zahtevi za kvalitet koje treba da ispuni nosač

Cilj formulisanja nosača za parenteralnu primenu tipa *in situ* gela ili tzv *klizećeg gela* se zasniva na smanjenju frekvence primene leka, čime se poboljšava komplijansa pacijenata. Takođe, prednosti su da se injektabilni nosač implantira sa minimalnom ranom na mestu aplikacije [1].

Opšti zahtevi za *in situ* gelirajuće sisteme su [10]:

- sterilnost
- bistrina rastvora koji *in situ* gradi gel
- pH vrednost
- kapacitet geliranja
- sadržaj lekovite supstance
- reološki parametri
- konzistencija
- izotoničnost
- interakcije lek – polimer
- oslobađanje lekovite supstance iz preparata
- antibakterijska aktivnost sistema preparata/nosača u cilju procene potrebe za uključivanjem konzervansa i njihove koncentracije
- stabilnost

Idealni medicinski hidrogel treba da ispunjava sledeće uslove [9, 10]:

- Da bi se garantovala injektibilnost, gel sistem treba da je u *sol* stanju pre primene. Preparat u *sol* stanju treba da je dovoljno niskog viskoziteta i da se tako omogući injektovanje i postizanje odgovarajućeg efekta.
- Geliranje posredstvom bilo kog hemijskog i fizičkog umreživača počinje da se odvija posle injekcione aplikacije.
- Gelovi treba da budu biorazgradivi ili postepeno rastvorljivi, a produkti razgradnje treba da budu netoksični i da se nepromenjeni ili nakon metabolizma izlučuju iz organizma.

Zahtevi za kvalitet parenteralnih preparata koji u sebi sadrže gelirajući sistem su [13]:

- sterilnost
- izotoničnost
- bistrina rastvora
- pH vrednost
- optimalno terapijsko delovanje
- stabilnost preparata za potrebno vreme
- sterilnost tokom celog perioda upotrebe
- dobra podnošljivost

Sterilnost ovih preparata se obezbeđuje izradom pod aseptičnim uslovima. Dodatkom konzervansa obezbeđena je sterilnost tokom celog perioda upotrebe. Izotoničnost se postiže upotrebom sredstava za izotonizaciju (glicerol, manitol, natrijum-hlorid) [13].

Ispitivanja koja se sprovode u cilju procene kvaliteta nosača na bazi hijaluronske kiseline [12]:

- bistrina rastvora pre geliranja ili samog gela-određuje se vizuelnom metodom na crnoj i beloj podlozi
- mehanička karakterizacija gelova – analiziraju se konzistencija i kohezivnost, što je važno za laku injektibilnost i prolazak kroz špic
- tranziciona temperatura prelaza *sol* u *gel* i vreme geliranja
- otpornost gela-određuje se uz pomoć reometra
- viskozitet i reološke osobine-važni parametri za procenu *in situ* formiranih gelova
- određivanje procenta vode u gelovima-metodom Fourierove infracrvene transmisionne spektroskopije (FTIR) i termalne analize (TGA)
- interakcije u gelu- metodom diferencijalne skenirajućekalorimetrije (DSC)
- ispitivanja citotoksičnosti u kombinaciji hijaluronske kiseline i citostatika
- *in vitro* ispitivanja – na kancerogenim ćelijama ovarijuma i testisa.

Primeri model lekovitih supstanci koje su ispitivane u nosaču koji se obrađuje

In situ gelirajući sistemi omogućuju poboljšanje bioraspoloživosti hidrofilnih i lipofilnih lekovitih supstanci kao i poboljšanje prihvatljivosti od strane pacijenta. Na ovaj način se takođe obezbeđuje verovatnoća da pravi lek za odgovarajućeg pacijenta bude prisutan na pravom mestu u pravo vreme [9].

Polimerni konjugatihemoterapijskih lekova su napravljeni tako da u ćeliju ulaze endocitozom i da se akumuliraju u lizozomima, čime se omogućava da lek bude oslobođen od polimera vrlo blizu ciljanog mesta delovanja [9-10].

Veličinom polimera tj. makromolekula i leka koji je konjugovan sa polimerom, određeno je mesto delovanja tj. onemogućen je prelazak u okolno zdravo tkivo, čime je omogućena selektivnost a smanjena toksičnost. S druge strane, makromolekuli imaju i dalje sposobnost da pređu prepreku do tumorske ćelije i da se akumuliraju u njoj i tu deluju [9].

Hijaluron ima krucijalnu ulogu u raznim ćelijskim procesima, adheziji, rastu ćelija, migraciji, kao signal za ćelijsku motilizaciju, inflamaciju i metastaze. Mnoge tumorske ćelije pokazuju ekspresiju velikog broja receptora za hijaluronsku kiselinu, što rezultira time da ona ima veliki afinitet za tumorske ćelije. Nekoliko tipova ćelijskih receptora reagije na signal hijalurona. To su CD44 odgovorni za limfocitnu aktivnost, RHAMM receptori odgovorni za ćelijsku pokretljivost i HARE receptori, odgovorni za receptor posredovana preuzimanja hijalurona u jetri. Receptori CD44 i RHAMM su široko rasprostranjeni u tumorskom tkivu, uključujući tumor jajnika, tako da konjugati hijaluronske kiseline i hemoterpijskog sredstva treba da pokazuju visoku selektivnost za kancerogene ćelije, obezbeđujući uz to, niz drugih prednosti, solubilizaciju, stabilizaciju, lokalizaciju i kontrolisano oslobađanje [1].

Banzato i saradnici [1] su opisali konjugovanje 20 % rastvora taksola sa hijaluronskom kiselinom kao nosačem. Ispitivana je *in vitro* citotoksičnost konjugata i taksola, na izolovanim kulturama ćelija IGROV-1 i OVCAR-3 tumorskim ćelijama jajnika. Ispitivanje je pokazalo manju toksičnost i veću selektivnost za tumorske ćelije biokonjugata u poređenju sa čistim taksolom.

Inkorporiranjem taksola u *in situ* gelirajući sistem sa hijaluronskom kiselinom kao nosačem omogućeno je ne samo postepeno oslobađanje leka u tumorom zahvaćenom tkivu nego je primećeno i značajno povećanje antikancerske efikasnosti, lokalno delovanje i smanjeno je oštećenje okolnog zdravog tkiva, kao i smanjenje incidence pojave neželjenih reakcija. Na ovaj način se višestruko povećala selektivnost leka [15].

LITERATURA

1. A. Banzato, S. Bobisse, M. Rondina, D. Renier, F. Bettella, G. Esposito, L. Quintieri, L. Melendez-Alafort, U. Mazzi, P. Zanovello, A. Rosato (2008): A Paclitaxel-Hyaluronanbioconjugatetargetingovariancanceraffords a potent in vivo therapeutic activity. *Clinical Cancer Research*, **14**: 3598-3606.
2. Rang and Dale's Pharmacology (2007): 6th edition, H. P. Rang, M.M. Dale, J.M. Ritter, R. Flower, Elsevier Health Sciences, Churchill Livingstone
3. Martindale (2009): The Complete Drug Reference, 36th edition, Sean C Sweetman, London, Chicago, Pharmaceutical Press.
4. PDR (Physicians Desk References) for Herbal Medicines (2005), 3rd edition, Medical Economics Company, Thomson at Montvale NJ.

5. R. Renneberg (2007): Biotech History: Yew trees, paclitaxel synthesis and fungi. *Biotech Journal*, **2**(10): 1207-1209.
6. S. Cai, Y. Xie, T. R. Bagby, M. S. Cohen, M. L. Forrest (2008): Intralymphatic chemotherapy using a hyaluron an-cisplatin conjugate. *Journal Surgery Research*, **147**(2): 247–252.
7. The MerckIndex (1996): 12th Edition, Merck & Co Inc. Whitehouse Station, NJ.
8. D. Y. Wen (2000): Intra-articular hyaluronic acid injections for knee osteoarthritis, *Am Fam Physician*, **62**(3):565-570.
9. D. Chitkara, A. Shikanov, N. Kumar, A. J. Domb (2006): Biodegradable injectable *in situ* depot-forming drug delivery systems. *Macromolecul Bioscience*, **6** :977–990.
10. L. Yu, J. Ding (2008): Injectable hydrogels as unique biomedical materials, *The Royal Society of Chemistry*, **37**: 1473–1481.
11. A. Vintiloiu, J.C. Leroux (2008): Organogels and their use in drug delivery — A review. *Journal of Controlled Release* **125**:179–192.
12. C.B. Packhaeuser, J. Schnieders, C.G. Oster, T. Kissel (2004): *In situ* forming parenteral drug delivery systems: an overview. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **58**: 445–455.
13. J. Milić, M. Primorac, M. Stupar (2005): Priručnik za vežbe iz farmaceutske tehnologije sa biofarmacijom, Oblast: Sterilni lekoviti preparati, Farmaceutski fakultet.
14. *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (2009): 6th edition, The Pharmaceutical Press, London, American Pharmaceutical Association, Washington.
15. *European Pharmacopoeia*, 7th edition (2011): European Directorate for the Quality of Medicines, Strasbourg, France.
16. *Jugoslovenska farmakopeja*, Peto izdanje (2000): Savezni zavod za zaštitu i unapređenje zdravlja, Savremena administracija, Beograd.
17. S. K. Niazi (2004): *Handbook of pharmaceutical manufacturing formulations*, 1st edition, Vol 6: Sterile products, CRC Press, Boca Raton.
18. *Guidance for Industry, Sterile Drug Products, Produced by Aseptic Processing-Current Good Manufacturing Practice* (2004): U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), Office of Regulatory Affairs (ORA).

**PHARAMACEUTICAL HYALURONIC ACID BASED CARRIERS FOR
PARENTERAL USE, PARTICULARLY CONJUGATES WITH TAXOL:
A REVIEW**

**Ćujić Nada¹, Ibrić Svetlana², Bigović Dubravka¹, Noveski Nebojša¹,
Šavikin Katarina¹**

¹Institute for Medicinal Plant Reasearch „Dr Josif Pančić“, Tadeuša Koćuška 1, 11000
Belgrade, Republic of Serbia

²Faculty of Pharmacy, Department for pharmaceutical technology, University of Belgrade,
Vojvode Stepe 450, 11000 Belgrade, Republic of Serbia

SUMMARY

In recent years, drug delivery systems are especially interesting because they allow therapeutic efficiency and reduce side effects. Conjugates of hyaluronic acid and chemotherapeutic agents, especially taxol, have been recognized as excellent solution for many therapeutic indications. The aim of conjugation of taxol with hyaluronic acid was the toxicity reduction on healthy cells and increase of selectivity on tumor cells. Hyaluronic acid could be used in various pharmaceutical preparations, also in parenteral, because of its biocompatibility and biodegradability. Hyaluronic acid as a carrier belongs to *in situ* gelling systems, which is passing a phase transition in response to external conditions such as temperature, different pH value or the presence of ions, enabling prolonged effect of the drug substances. Many tumor cells have a large number of receptors for hyaluronic acid, which has a great affinity for the tumor cells. The incorporation of taxol in gelling system of hyaluronic acid provides sustained drug release, increased anticancer activity, reduced damage of healthy cells and increased selectivity on cancer cells.

Keywords: taxol, hyaluronic acid, *in situ* systems, drug delivery.